

INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON THE POLYPHENOL CONTENT OF AROMATIC PLANTS FROM THE *LAMIACEAE* FAMILY

Tome Kitanovski

Faculty of Technology and Metallurgy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, North Macedonia,
tome_kit22@yahoo.com

Katerina Atkovska

Faculty of Technology and Metallurgy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, North Macedonia,
kburevska@tmf.ukim.edu.mk

Erhan Mustafa

Inkohem D.O.O., Skopje, North Macedonia, erhanmustafa1978@gmail.com

Kiril Lisichkov

Faculty of Technology and Metallurgy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, North Macedonia,
lkiril@tmf.ukim.edu.mk

Abstract: Plants belonging to the *Lamiaceae* family represent a significant source of natural antioxidants and biologically active compounds, particularly polyphenols, which play an important role in the neutralization of free radicals and the prevention of oxidative stress. The aim of this study was to determine and optimize the extraction conditions for total polyphenols from peppermint (*Mentha × piperita* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) using the Folin–Ciocalteu method. Water and ethanol were used as extraction solvents at different temperatures (30, 40, and 50 °C) and extraction times (30, 60, and 120 min). The concentration of total polyphenols was determined spectrophotometrically at 750 nm using a calibration curve prepared with gallic acid. The obtained results showed that the moisture content of the analyzed plants ranged from 4.7 to 8.4%, which is in accordance with pharmacopoeial standards. Water proved to be a more efficient extraction solvent for peppermint, sage, and thyme, whereas ethanol provided better results for rosemary. The highest concentration of total polyphenols was obtained at an extraction temperature of 50 °C and an extraction time of 120 min. The constructed 2D contour plots confirmed the synergistic effect of temperature and extraction time on the yield of extracted polyphenols and enabled optimization of the maceration process.

Keywords: *Mentha × piperita* L., *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L., green extracts, total polyphenols, antioxidants

ВЛИЈАНИЕ НА УСЛОВИТЕ НА ЕКСТРАКЦИЈА ВРЗ СОДРЖИНАТА НА ПОЛИФЕНОЛИ КАЈ АРОМАТИЧНИ РАСТЕНИЈА ОД ФАМИЛИЈАТА *LAMIACEAE*

Томе Китановски

Технолошко – металуршки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје,
tome_kit22@yahoo.com

Катерина Атковска

Технолошко – металуршки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје,
kburevska@tmf.ukim.edu.mk

Erhan Mustafa

Инкохем Д.О.О., Скопје, erhanmustafa1978@gmail.com

Кирил Лисичков

Технолошко – металуршки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје,
lkiril@tmf.ukim.edu.mk

Апстракт: Растенијата од фамилијата *Lamiaceae* претставуваат значаен извор на природни антиоксиданти и биолошки активни соединенија, особено полифеноли, кои имаат важна улога во неутрализацијата на слободните радикали и спречувањето на оксидативниот стрес. Целта на ова истражување беше определување и оптимизација на условите за екстракција на вкупните полифеноли од нане (*Mentha × piperita* L.), жалфија (*Salvia officinalis* L.), мајчина душица (*Thymus vulgaris* L.) и рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.)

со примена на Folin-Ciocalteu метод. Како екстрактивни средства беа користени вода и етанол, при различни температури (30, 40 и 50 °C) и време на екстракција (30, 60 и 120 min). Концентрацијата на вкупните полифеноли беше определена спектрофотометриски на 750 nm со користење на калибрациона крива конструирана со гална киселина. Добиените резултати покажаа дека содржината на влага во анализираните растенија се движи од 4,7 до 8,4 %, што е во согласност со фармакопејските стандарди. Водата се покажа како поефикасно екстрактивно средство за нане, жалфија и мајчина душица, додека етанолот даде подобри резултати кај рузмаринот. Највисока концентрација на вкупни полифеноли беше добиена при екстракција на 50 °C во времетраење од 120 min. Конструираниите 2D контури потврдија синергистичко влијание на температурата и времето врз приносот на екстрахираните полифеноли и овозможија оптимизација на процесот на мацерација.

Клучни зборови: *Mentha x piperita L.*, *Salvia officinalis L.*, *Thymus vulgaris L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, зелени екстракти, вкупни полифеноли, антиоксиданс

1. ВОВЕД

Изминатив период употребата на зачински и ароматични растенија е широко распространета. Зголемениот интерес се одразува на бројни фитопрепарати за употреба во фармацевтската, козметичката, прехранбената и хемиската индустрија, поради што постојано се зголемуваат истражувањата на лековитите, зачински и ароматичните растенија. Растителните полифеноли се сметаат за моќни антиоксиданти кои се од големо значење во спречувањето на стареењето и многу болести поврзани со слободните радикали. Во човечкото тело во секој момент се одвиваат процесите на оксидација, тоа е основа за нормално функционирање на човековиот организам. Во текот на процесите на оксидација, се формираат високо реактивни честички - слободни радикали. За неутрализирање на акумулираните слободни радикали потребна е одредена количина на антиоксиданси (Franzoni et al., 2021).

Терминот „антиоксиданс“ се дефинира како супстанца која во релативно ниски концентрации, значително ја намалува, одложува или спречува оксидацијата на супстратот (Stoia & Oancea, 2022).

Ефективноста на антиоксидансите се рефлектира преку нивната способност да ги неутрализираат слободните радикали и да ги прекинуваат верижните реакции кои предизвикуваат автооксидација на целните молекули во организмот, како што се протеини, нуклеински киселини, липиди итн. и да доведе до промена во нивната структура и функција (Liguori et al., 2022).

Слободните радикали се неутрални интермедиерни честички со висока реактивност, кои се формираат со хомолитичко раскинување на ковалентни врски (термички и фотолитички) и на тој начин содржи најмалку еден неспарен електрон. Тие можат да реагираат едни со други (радикал-радикална интеракција) или со други молекули (интеракција радикал-молекула) (Pham-Huy et al., 2022). При радикално-радикална интеракција два слободни радикали може да се комбинираат за да формираат стабилна молекула. На пример, два хидроксилни радикали (OH•) може да реагираат за да формираат водород пероксид (H₂O₂) (Juan et al., 2021; Lushchak, 2021). При интеракција радикал-молекула, слободниот радикал може да реагира со стабилна молекула за да формира нов радикал и нова молекула. Овој тип на реакција е вообичаен во процесите како липидна пероксидација во биолошките мембрани (Halliwell, 2022; Pisoschi & Pop, 2021).

Природните антиоксиданси се појавуваат во сите делови на растенијата. Тие го спречуваат дејството на кислородот, ги заробуваат слободните радикали, ги разложуваат пероксидите, го спречуваат дејството на ензимите и делуваат синергистички (Neri-Numa et al., 2021).

Фенолните соединенија се група на метаболити добиени од растенијата преку нивните секундарни патишта при што антиоксидантната активност на растителните екстракти е главно поврзана со нивното присуство (Kumar et al., 2023).

Многубројни видови на фамилијата *Lamiaceae* се нашироко култивирани, што се должи не само на нивните ароматични квалитети, туку и на едноставно одгледување: овие растенија едни од оние кои лесно се размножуваат со резници од стеблото. Се користат во народната медицина за подготвување на чаеви, како и за квалитетни пасишта за пчели. Позначајни родови во оваа фамилија се следниве: мајчина душичка (*Thymus*), нане (*Mentha*), жалфија (*Salvia*), рузмарин (*Rosmarinus*), лаванда (*Lavandula*), босилек (*Osimum*), чубрица (*Satureja*) и др. Многу видови од овие родови се користат како лековити или зачински растенија бидејќи се ароматични.

Видовите од фамилијата *Labiatae* (*Lamiaceae*) избобилуваат со различни видови на антиоксиданти и тоа од групите на флавоноиди, танини, псевдотанини, дитерпени, тритерпени, фенолни киселини, каротеноиди и други. Растителни видови од семејството *Lamiaceae*, како што се рузмарин, жалфија, исоп, оригано, мајчина душица и босилек, се познати по своите антиоксидантни својства. Студиите за антиоксидантната активност

на екстрактите од растителните видови од семејството *Lamiaceae* покажаа дека тие имаат еквивалентно или посилено антиоксидативно дејство од синтетичките антиоксиданти.

Folin-Ciocalteu методот претставува една од најчесто применуваните спектрофотометриски методи за определување на вкупната содржина на полифеноли во растителни екстракти. Методот се базира на реакција на фенолните соединенија со Folin-Ciocalteu реагенсот, при што доаѓа до формирање на сино обоен комплекс чиј интензитет е пропорционален на концентрацијата на полифенолите. Апсорбанцата на добиениот раствор се мери спектрофотометриски, најчесто на 750 nm, а резултатите се изразуваат како еквиваленти на гална киселина.

Целта на ова истражување беше да се определи содржината на вкупните полифеноли во водени и етанолни екстракти на растенијата од фамилијата *Lamiaceae*: нане (*Mentha x piperita* L.), жалфија (*Salvia officinalis* L.), мајчина душица (*Thymus vulgaris* L.) и рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.) со примена на Folin-Ciocalteu метод. Дополнително, беше извршена оптимизација на условите за екстракција преку испитување на влијанието на екстрактивното средство, температурата и времето на екстракција врз приносот на вкупните полифеноли.

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Како работна суровина за целите на ова истражување беа користени надземни делови од растенијата жалфија (*Salvia officinalis* L.), рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.), мајчина душица (*Thymus vulgaris* L.) и нане (*Mentha x piperita* L.) собрани од југозападниот и југоисточниот региони на Република Северна Македонија.

Хомогенизираната дрога беше поставена во мал пластичен контејнер и како таква беше подготвена за понатамошни анализи. Дрогата е чувана на темно изолирано место на собна температура $\approx 22^{\circ}\text{C}$, заштитена од надворешни влијанија.

Содржината на влага се одредува гравиметриски преку одредување на разликата на масата на растителната суровина пред и после сушењето.

Зелените екстракти (мацерати) беа подготвени во вода и етанол при што беше споредена ефикасноста на различното време на екстракција (30, 60 и 120 min) и различна температура од 30°C , 40°C и 50°C . Исто така, беше определена и оптималната маса на растителниот материјал и волуменот на растворувач за подготовка на мацератите.

Концентрацијата на вкупни полифеноли во подготвените мацерати беше определена со Folin-Ciocalteu метод, кој се базира на оксидација на фенолите соединенија во присуство на Folin-Ciocalteu реагенсот и промена на бојата на растворот од жолта во сина. Концентрацијата се определува преку калибрациона крива конструирана од стандардни раствори на гална киселина.

Калибрационата права беше конструирана така што со микропипетор беше измерен волумен од 200 μL од стандардниот раствор со позната концентрација и беше префрлен во епрувета, а кон него беа додавани 2 mL реагенс Folin-Ciocalteu 1:10 и 1,8 mL Na_2CO_3 7,5% (w/v). Примероците беа чувани во темно 20 минути и апсорбанцата беше измерена на 750 nm со помош на UV-VIS спектрометар.

Концентрацијата на примероците беше определена на истиот начин. Со микропипетор беше измерен волумен од 200 μL од мацератот и беше префрлен во епрувета, а кон него беа додавани 2 mL реагенс Folin-Ciocalteu 1:10 и 1,8 mL Na_2CO_3 7,5% (w/v). Примероците беа чувани во темно 20 минути и апсорбанцата беше измерена на 750 nm со помош на UV-VIS спектрометар.

За анализа на влијанието на независните променливи температура и време врз концентрацијата на вкупни полифеноли и антиоксидативната активност како и дизајн на 2D контури и користен е софтверскиот пакет Statgraphic Centurion XV.I.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Содржината на влага во анализираниите растенија (*Mentha x piperita* L.; *Salvia officinalis* L.; *Thymus vulgaris* L. и *Rosmarinus officinalis* L.) од фамилијата *Lamiaceae* е одредена следејќи ја претходно опишаната постапка, при што се добиени следниве резултати кои се прикажани во Табела 1. Од добиените резултати може да се заклучи дека содржината на влага во испитуваните растенија се движи во опсег од 4,7 до 8,4 %. Ваквиот резултат е во согласност со светските фармакопеи каде што е пропишана максимална дозволена количина на влага до 12%. Вкупната концентрација на полифеноли во алкохолните и водените екстракти беше определена со Folin-Ciocalteu метод. Концентрацијата на вкупните полифеноли ќе биде изразена како mg на гална киселина во 1 g дрога со користење на калибрациона крива конструирана од стандардни раствори на гална киселина. Добиеениот коефициент на корелација изнесува 0,9995 што укажува на одлична линеарност на методот во испитуваниот концентрациски опсег. Со зголемување на концентрацијата на гална киселина

над 400 mg/L линеарноста на методот значително се намалува, односно апсорбанцата на растворот не е пропорционална со концентрацијата на стандардот.

Табела 1. Содржина на влага во анализираните растенија од фамилијата *Lamiaceae*

Растителна суровина	Маса на празно садче (g)	Маса на растение пред сушење (g)	Маса после сушење (g)	Маса на суво растение (g)	Маса на растение после сушење (g)	Маса на испарена вода (g)	Содржи на на влага s_w (% , m/m)
<i>Mentha x piperita</i> L.	24.7710	1.0073	25.7783	25.7113	0.9403	0.0670	6.65
<i>Salvia officinalis</i> L.	35.4047	1.0172	36.4219	36.3741	0.9694	0.0478	4.70
<i>Thymus vulgaris</i> L.	11.1038	1.0537	12.1575	12.0898	0.9860	0.0677	6.42
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	10.9405	1.0028	11.9433	11.8587	0.9182	0.0846	8.44

Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

Од добиените резултати може да се заклучи дека при употреба на етанол како екстрактивно средство најдобри резултати се добиваат при подготовка на мацератот со 1g дрога во 20 ml етанол. Екстрахираните полифеноли во другите два мацерати (1g во 30 ml и 1g во 40 ml) исто така може да се детектира но апсорбанците значително се пониски. Поради тоа во понатамошните испитувања етанолните мацерати ќе бидат подготвувани со употреба на 1 g дрога во 20 ml етанол. содржината на екстрахирани полифеноли е значително повисока при употреба на вода како екстрактивно средство. При тоа се забележува дека апсорбанцата на најголем број од примероците е 1,650. Ваквиот резултат не значи дека содржината на екстрахирани полифеноли во повеќето примероци е иста туку дека е достигнат горниот лимит на методот. Односно не може да се определи концентрацијата на екстрахирани вкупни полифеноли доколку таа надминува 400 mg/L, поради што потребно е да се направи дополнително разредување.

Со цел да се испита влијанието на екстрактивно средство температурата и времето на екстракција врз вкупните полифеноли беа направени серија од експерименти. При тоа како екстрактивни средства беа користени вода и етанол, екстракцијата беше изведена на 30, 40 и 50 °C за време од 30, 60 и 120 min. Добиените резултати за вкупни полифеноли добиени при различни услови и изразени како mg гална киселина/g растенија се прикажани во Табела 2, Табела 3 и Табела 4.

Табела 2. Содржина на вкупни полифеноли на водени и етаноли екстракти подготвени на 30 °C за време од 30, 60 и 120 min.

Етанол екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	0,47	1,58	2,16	7,03
60 min	0,76	2,68	2,83	8,08
120 min	0,94	3,89	3,58	9,08
Воден екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	6,58	2,21	8,47	3,16
60 min	10,00	2,74	11,47	3,38
120 min	14,00	3,47	17,21	3,55

Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

Табела 3. Содржина на вкупни полифеноли на водени и етаноли екстракти подготвени на 40 °C за време од 30, 60 и 120 min.

Етанолан екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	0,97	2,51	3,74	8,32
60 min	1,16	4,28	5,03	9,21
120 min	1,53	6,61	6,55	10,22
Воден екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	16,68	8,35	18,11	4,76
60 min	21,00	9,75	19,58	6,55
120 min	25,57	11,84	22,64	8,36

Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

Табела 4. Содржина на вкупни полифеноли на водени и етаноли екстракти подготвени на 50 °C за време од 30, 60 и 120 min.

Етанолан екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	1,74	5,18	6,72	9,83
60 min	3,16	7,93	7,84	10,35
120 min	3,53	12,12	8,94	11,64
Воден екстракт				
Време	Нане (mg/g)	Жалфија (mg/g)	Мајчина душица (mg/g)	Рузмарин (mg/g)
30 min	18,78	9,26	19,53	6,68
60 min	24,56	11,67	19,74	8,58
120 min	27,44	13,79	24,49	10,32

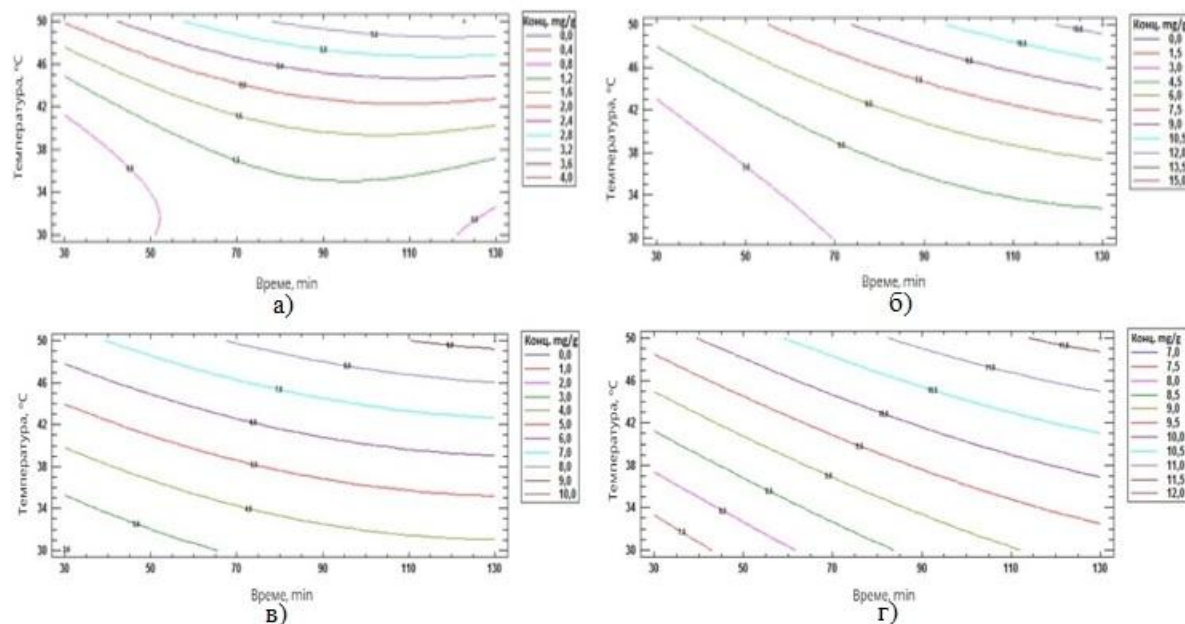
Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

Од добиените резултати може да се заклучи дека водата е подобро екстрактивно средство за подготовка на мацерати од нане, жалфија, мајчина душица а етанолот е подобар за екстракција на полифеноли од рузмарин. Ваквите резултати се должат на повеќе фактори како што се: поларноста на растворувачот, структурата на полифенолите и капацитет за формирање на водородни врски. При оптимизација на температурата и времето може да се забележи дека двата параметри покажуваат исто влијание врз концентрација на вкупни полифеноли кај сите испитувани растенија. При тоа повисоката температура (50 °C) и подолгото време на екстракција (120 min) резултираат со повисока концентрација на изолирани вкупни полифеноли.

Од добиените резултати може да се заклучи дека концентрацијата на вкупни полифеноли екстрахирани на различна температура и време се движи во опсег од 0,47 до 14,94 mg/g. При тоа се забележува дека најдобри резултати се добиваат при употреба на вода како екстрактивно средство на 50 °C за време од 120 min. При тоа содржината на вкупните полифеноли во мацератите од мајчина душица и нане е приближно иста и се движи во опсег од 24 до 27 mg/g. Додека пак вкупната концентрација на полифеноли на водениот екстракт од жалфија и етанолниот екстракт од рузмарин е малку пониска и се движи од опсег од 11 до 14 mg/g.

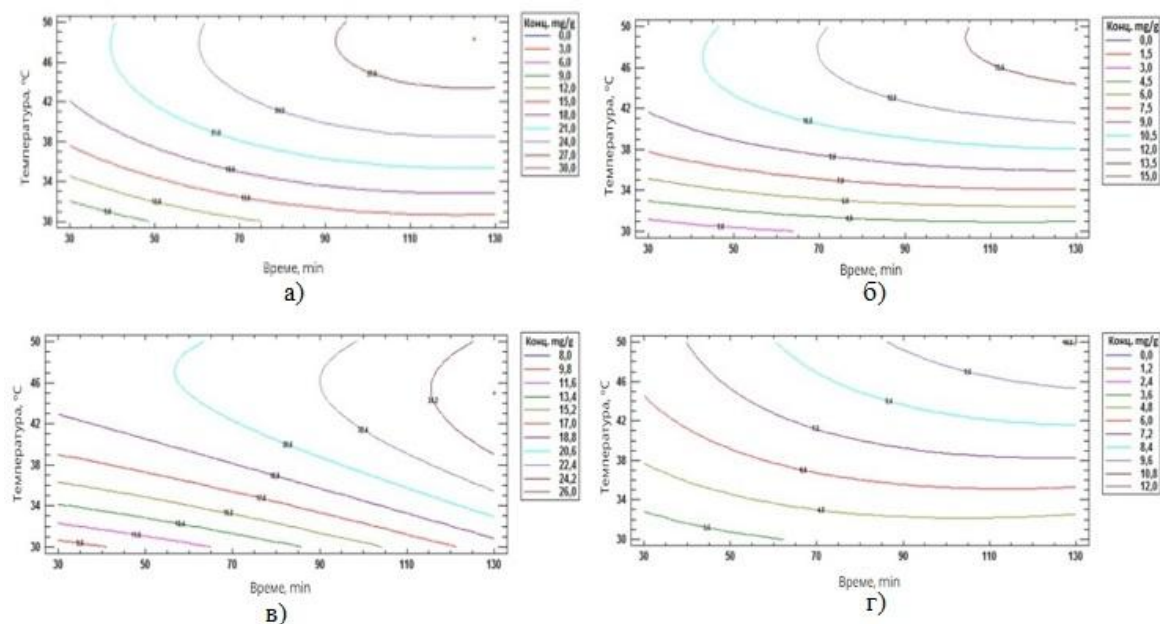
За демонстрирање на влијанието на испитуваните параметри температурата, времето и екстрактивното средство врз концентрацијата на вкупни полифеноли како и оптимизација на моделираниот процес конструирани се 2D контури на одзивна површина Слика 1 и Слика 2

Слика 1. 2D контури на одзивна површина при процес на мацерација со етанол кај а) нане, б) жалфија, в) мајчина душица и г) рузмарин



Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

Слика 2. 2D контури на одзивна површина при процес на мацерација со вода кај а) нане, б) жалфија, в) мајчина душица и г) рузмарин



Извор: Магистерски труд, Томе Китановски, ТМФ-Скопје

4. ЗАКЛУЧОК

Добиените резултати покажаа дека растенијата од фамилијата *Lamiaceae* претставуваат значаен извор на полифенолни соединенија со потенцијални антиоксидативни својства. Содржината на влага кај анализираниите растенија беше во согласност со фармакопејските стандарди. Водата се покажа како поефикасно екстрактивно средство за екстракција на полифеноли од нане, жалфија и мајчина душица, додека етанолот даде подобри резултати кај рузмарин. Зголемувањето на температурата и времето на екстракција доведе до повисок принос на вкупни полифеноли, при што оптимални услови беа постигнати

при 50 °C и 120 min. Конструираниите 2D контури потврдија синергистичко влијание на температурата и времето врз процесот на екстракција и овозможува оптимизација на мацерацијата за добивање максимален принос на полифенолни соединенија.

ЛИТЕРАТУРА

- Franzoni, F., Scarfò, V., Guidotti, S., Fusi, J. & Santoro, G. (2021). *Oxidative stress and cognitive decline: The neuroprotective role of natural antioxidants*. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 729757.
- Halliwell, B. (2022). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. *Free Radical Biology and Medicine*, 188, 14–23.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. (2021). *The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642.
- Kumar, N., Goel, N., & Singh, P. (2023). *Plant phenolics as natural antioxidants: Sources, chemistry and biological significance*. *Food Chemistry*, 405, 134763.
- Leri, M., Scuto, M., Ontario, M. L., Calabrese, V., & Calabrese, E. J. (2020). *Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms and clinical implications*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8555.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. & Abete, P. (2022). *Oxidative stress, aging, and diseases*. *Clinical Interventions in Aging*, 17, 757–772.
- Lushchak, V. I. (2021). *Free radicals, reactive oxygen species and oxidative stress: A new paradigm for aging and disease*. *Redox Biology*, 38, 101806.
- Neri-Numa, I. A., Soriano Sancho, R. A., Pereira, A. P. A. & Pastore, G. M. (2021). *Natural antioxidants: From food constituents to therapeutic agents*. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 587–602.
- Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C. (2022). *Free radicals, antioxidants in disease and health*. *International Journal of Biomedical Science*, 18(2), 89–96.
- Pisoschi, A. M. & Pop, A. (2021). *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112864.
- Stoia, M. & Oancea, S. (2022). *Low-molecular-weight synthetic antioxidants: Classification, pharmacological profile, effectiveness and trends*. *Antioxidants*, 11(4), 638.