

# Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih komponenata industrijske konoplje: optimiranje, kinetika i kemometrija

---

Matešić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:610581>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019

Nikolina Matešić

1119/PI

**MIKROVALOVIMA  
POTPOMOGNUTA  
EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI  
AKTIVNIH KOMPONENATA  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE:  
OPTIMIRANJE, KINETIKA I  
KEMOMETRIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Ane Jurinjak Tušek, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Manuele Panić, mag. ing. iz Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za Biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE: OPTIMIRANJE, KINETIKA I KEMOMETRIJA

*Nikolina Matešić, 1119/PI*

**Sažetak:** Cilj ovoga rad bio je ispitati potencijal primjene mikrovalova u svrhu ekstrakcije biološki aktivnih molekula iz industrijske konoplje, definirati optimalne procesne uvjeta za provođenje procesa ekstrakcije (omjera tekuće-kruto, udjela etanola, vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i snaga mikrovalova), analizirati dinamiku procesa ekstrakcije te razviti modele neuronskih mreža za predikciju fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS-NIR spektra. Metodom odzivnih površina procijenjeni su optimalni procesni uvjeti:  $L/S = 30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 25 \%$ ,  $t = 25 \text{ min}$ ,  $T = 45 \text{ °C}$  i  $P = 600 \text{ W}$ . Na temelju dinamičkog eksperimenta ekstrakcije zaključeno je da učinkovitost ekstrakcije pokazuje značajan trend porasta vrijednosti do 15. minute procesa, nakon čega vrijeme ekstrakcije više nema utjecaja. Također na temelju visoke vrijednosti koeficijenta determinacije za testiranje, tretiranje i validaciju modela neuronskih mreža može se zaključiti da je UV-VIS i NIR spektroskopija uspješna metoda za analizu fizikalnih (vodljivost, prinos ekstrakcije) i kemijskih (koncentracija ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom) svojstava biljnih ekstrakata.

**Ključne riječi:** industrijska konoplja, biološki aktivne molekule, mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija, UV-VIS i NIR spektroskopija, optimiranje i modeliranje

**Rad sadrži:** 70 stranica, 13 slika, 19 tablica, 102 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *doc.dr.sc Ana Jurinjak Tušek*

**Pomoć pri izradi:** *Manuela Panić, mag. ing.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Davor Valinger*
2. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
3. Doc.dr.sc. *Maja Beković*
4. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević* (zamjena)

**Datum obrane:** rujan, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Laboratory for Measurements, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF INDUSTRIAL HEMP: OPTIMIZATION, KINETICS AND CHEMOMETRY

*Nikolina Matešić, 1119/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the potential of microwaves for extraction of biologically active molecules from industrial hemp, to define optimal process conditions for the extraction process (liquid-solid ratio, ethanol concentration in extraction solvent, extraction time, extraction temperature and microwave power), to analyse the dynamic of the extraction process and to develop neural network models for the prediction of the physical and properties of industrial hemp extracts based on the UV-VIS-NIR spectra. Optimal extraction conditions ( $L/S = 30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 25\%$ ,  $t = 25 \text{ min}$ ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $P = 600 \text{ W}$ ) were estimated by response surface method. The dynamic experiments revealed that extraction efficiency increases up to 15 min of the processes and prolongation of the extraction time has no effect on the extraction efficiency. Also, based on the high values of the coefficient of determination for testing, training and validation of the neural network model, it can be concluded that UV-VIS and NIR spectroscopy is a useful method for the analysis of the physical (conductivity, extraction yields) and chemical (total polyphenols concentration, antioxidant activity of DPPH and FRAP method) properties of the plant extracts.

**Keywords:** industrial hemp, biologically active molecules, microwaves assisted extraction, UV-VIS and NIR spectroscopy, optimisation and modelling

**Thesis contains:** 70 pages, 13 figures, 19 tables, 102 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis inprinted and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Ana Jurinjak Tušek*

**Technical support and assistance:** *Manuela Panić, mag. i ng.*

**Reviewers:**

1. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** September, 2019.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	2
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke .....	2
2.1.2. Kemijski sastav <i>Cannabis Sativa</i> L. ....	4
2.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	6
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	8
2.3. OPTIMIRANJE I KINETIKA PROCESA EKSTRAKCIJE.....	10
2.3.1. Metodologija odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije .....	11
2.3.2. Kinetika procesa ekstrakcije .....	12
2.4. PRIMJENA UV-VIS I NIR SPEKTROSKOPIJE U ANALIZI PROCESA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci industrijske konoplje.....	15
3.1.2. Kemikalije .....	15
3.1.3. Aparatura i pribor .....	15
3.2. METODE.....	16
3.2.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih komponenata .....	16
3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata .....	18
3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja .....	18
3.2.4. Određivanje boje uzoraka ekstrakta industrijske konoplje .....	19
3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola.....	19
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	21
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	22
3.2.8. UV-VIS spektroskopija .....	24
3.2.9. NIR spektroskopija.....	24
3.2.10. Statistička analiza, optimiranje procesa ekstrakcije, analiza kinetike procesa ekstrakcija i analiza UV-VIS-NIR spektara ekstrakata industrijske konoplje .....	24
3.2.10.1. Osnovna statistička analiza rezultata .....	24
3.2.10.2. Multivarijantna analiza varijance (MANOVA) .....	25
3.2.10.3. Analiza osnovnih komponenata (PCA).....	25
3.2.10.4. Metoda odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije .....	25
3.2.10.5. Umjetne neuronske mreže za optimiranje procesa ekstrakcije .....	26
3.2.10.6. Modeliranje kinetike ekstrakcije biološki aktivnih molekula .....	27
3.2.10.7. Analiza glavnih komponenata kontinuiranih UV-VIS-NIR spektara.....	28
3.2.10.8. Modeli neuronskih mreža za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS-NIR spektara .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	30
4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE DOBIVENIH POSTUPKOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA.....	30

4.2. OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA IZ INDUSTRIJSKE KONOPLJE .....	39
4.3. MODELIRANJE KINETIKE EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA .....	47
4.4. ANALIZA UV-VIS-NIR SPEKTRA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE PRIPREMLJENIH PREMA DIZAJNU EKSPERIMENATA.....	51
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>59</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>60</b>



## **1. UVOD**

*Cannabis sativa* L. je biljka koja se uzgaja širom svijeta već tisućama godina zbog svojih vrijednih prirodnih sastojaka. Dosadašnja znanstvena istraživanja konoplje pokazala su da sadrži više od 550 različitih bioaktivnih spojeva, a osobito se izdvajaju kanabinoidi koji pripadaju skupini terpenskih spojeva. Bioaktivne komponente konoplje pokazuju razne beneficije na zdravlje ljudi. Djeluju učinkovito protiv upala, imaju pozitivan učinak na metaboličke puteve, imaju neuroprotektivna svojstva, ali pokazuju i mnoge druge pozitivne učinke. Djeluju na način da reagiraju sa slobodnim radikalima i reaktivnim oblicima kisika, a njihovom neutralizacijom sprječavaju razvojne procese brojnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, astme, ranih upalnih procesa i drugo (ElSohly i sur., 2017). Ekstrakcija je ključan korak u postupku određivanja fenolnih spojeva, ali i ostalih biološki važnih spojeva iz biljnog materijala. Na ekstrakciju fenolnih spojeva utječu razni parametri poput korištenog otapala, temperature, vremenu kontakta, omjera otapala i otopljene tvari, veličine čestice i pH (Takeuchi i sur., 2009). U industrijskim procesima za ekstrakciju fenola iz biljnog materijala pretežito se koristi etanol ili vodena otopina etanola iz razloga što je manje toksičan. Razvojem modernih metoda ekstrakcija postiže se veća učinkovitost, smanjeni su troškovi izolacije spojeva i potrošnja otapala te je ubrzan proces ekstrakcije u odnosu na klasične metode. Nove metode ekstrakcije su primjerice ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Routray i Orsat, 2012).

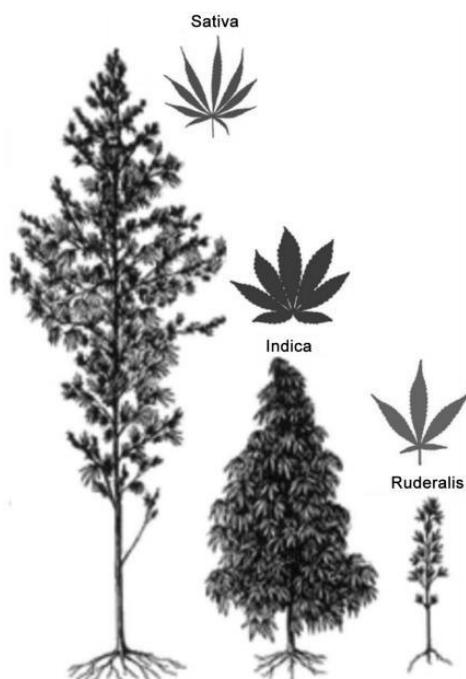
Cilj ovoga rada bio je ispitati potencijal primjene mikrovalova u svrhu ekstrakcije biološki aktivnih molekula iz industrijske konoplje, definirati optimalne procesne uvjeta za provođenje procesa ekstrakcije (omjera tekuće-kruto, udjela etanola, vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i snaga mikrovalova), analizirati dinamiku procesa ekstrakcije te razviti modele neuronskih mreža za predikciju fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS-NIR spektra.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

### 2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

*Cannabis sativa* L. raste na različitim staništima i nadmorskim visinama, od razine mora pa sve do alpskog podnožja Himalaje, otkuda vjerojatno i potječe (Merlin, 2003). Prema politipskoj prirodi rod *Cannabis* podijeljen je u tri vrste: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis* (Schultes i sur., 1974). Kultivacija *Cannabisa* i njena uporaba datira između 5000 i 6000 godina, a jedna je od najstarijih biljnih izvora hrane i tekstilnih vlakana (Jiang i sur., 2006; Kriese i sur., 2004). Ruska sorta *ruderalis* je nižeg rasta i rjeđe rasprostranjena u odnosu na sorte *sativa* i *indica*. Prosječna visina biljaka varijeteta *sativa* iznosi 2,5-3,5 metra, dok su biljke sorte *indica* prosječnog rasta oko 1,8 metra te grmolikog rasta sa tamno zelenim listovima (ElSohly i sur, 2017). Morfološke razlike među njima prikazane su na slici 1.



Slika 1. Podvrste *Cannabis sativa* L.: *C. sativa sativa*, *C. sativa indica*, *C. sativa ruderalis* (Hartsel i sur, 2016).

Konoplja je dvodomna biljka, što znači da se muški i ženski cvjetovi razvijaju na zasebnim biljkama, a u fazi vegetacije teško je vidjeti razliku između njih, međutim danas se koriste molekularne tehnike koje omogućuju njihovo razlikovanje u ranijoj fazi (ElSohly i sur.,

2017). Jednogodišnja je biljka, a može se uzgajati pri unutarnjim i vanjskim uvjetima. Jedna od razlika između ta dva uzgoja je što se unutarnjim uzgojem može potaknuti cvjetanje i sazrijevanje više puta, odnosno može se dobiti tri do četiri usjeva godišnje, dok je kod vanjskog uzgoja moguće dobiti jedan usjev godišnje (ElSohly i sur., 2017).

Uobičajeno razdoblje sjetve započinje krajem ožujka do početka travnja, a usjev traje od studenog do početka prosinca na sjevernoj polutki, ali to ovisi o sorti. Dva do tri mjeseca nakon sjetve pojavljuju se muški, a potom i ženski cvjetovi. U usporedbi sa ženskim cvjetovima, muški cvjetovi imaju manje  $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinola ( $\Delta 9$ -THC), stoga se oni odstranjuju. Osim toga cilj je i izbjeći unakrsno oprašivanje između različitih sorti i unutar istih sorti. Vanjske kultivacije biljaka imaju veću biomasu u usporedbi sa unutarnjim, a to ovisi o vremenskim prilikama i prostoru na kojem se nalaze. Zbog unakrsne gnojidbe teško je održati konstantan kemijski profil, stoga se provodi vegetativno razmnožavanje reznicama u cilju postizanja ujednačenog kemijskog profila (ElSohly i sur., 2017).

Kultivacija *Cannabis sativa* u zatvorenom prostoru uključuje kontrolirane uvjete okoliša što znači da je u potpunosti kontroliran životni ciklus biljke, a to dovodi do upravljanja kvalitetom i količinom biomase. Takva vrsta uzgoja je bitna kod proizvodnje *C. sativa* sa specifičnim kemijskim sastavom za farmaceutsku upotrebu. Na rast i razvoj ove biljke u zatvorenom prostoru utječu okolišni uvjeti kao što su razina svjetlosti, fotoperiod, vlaga, temperatura, koncentracija CO<sub>2</sub> i cirkulacija zraka (ElSohly i sur., 2017). *Cannabis sativa* zahtijeva visoku fotosintetsku gustoću protoka fotona (PPFD) za fotosintezu i rast. Unatoč korištenju različitih izvora svjetlosti pri zatvorenom uzgoju, teško je postići odgovarajuću razinu fotosintetski aktivnog zračenja. Fotoperiodi utječu na regulaciju vegetativnog i cvjetnog rasta *C. sativa*. Vegetativni rast izaziva fotoperiodni ciklus koji se sastoji od minimalno 18 sati izlaganja svjetlu i 6 sati izlaganja mraku, dok cvjetanje izaziva 12-satni fotoperiod (Chandra i sur., 2008). Razina vlage bitna je za sve faze rasta biljke, od klijanja pa sve do branja. Mlade biljke zahtijevaju visoku vlažnost zraka u usporedbi sa dobro razvijenim biljkama, stoga ih je potrebno redovito prskati vodom kako bi održale visoku vlažnost (oko 70-75%), dok aktivni vegetativni i cvjetni dijelovi zahtijevaju vlažnost od 55 do 60%. Korištenjem električnih ventilatora provodi se cirkulacija zraka koja je vrlo bitna jer omogućuje izmjenu plinova i vodene pare između lišća i mikrookoline, što u konačnici utječe na fiziologiju i rast biljke (ElSohly i sur., 2017).

Kultivacija ove biljke provodi se razmnožavanjem pomoću sjemenki, vegetativno reznicama te mikropropagacijom. Najčešća metoda uzgoja *C. sativa* je razmnožavanje pomoću sjemenki

same biljke. Osiguravanjem vlažnog okruženja, cirkulacije zraka i topline, klijanje započinje nakon 4-5 dana. Početni vegetativni rast uzrokuje izlaganje sadnica hladnom fluorescentnom svjetlu (18-satni fotoperiod), a potom slijedi presađivanje u veće posude te ponovno izlaganje svjetlosti u vremenu od 18 sati. Nakon što je postignut željen vegetativni rast, daljnjim izlaganjem svjetlosti u trajanju od 12 sati postiže se cvatnja. Reznice sa grana ženskih biljaka mogu se koristiti za vegetativno razmnožavanje (ElSohly i sur., 2017).

Optimalna faza žetve određuje se svakodnevnom analizom sadržaja kanabinoida u različitim dijelovima biljke. Tako se primjerice količina  $\Delta^9$ -THC povećava tokom sazrijevanja biljke, a najveća je u fazi pupanja u kojoj doseže svoj maksimum za jedan do dva tjedna, nakon čega slijedi njegovo opadanje. Prije sušenja potrebno je odvojiti odumrlo lišće i stabljiku od pupoljaka. Osušeni biljni materijal prolazi kroz sito kako bi se odvojile sjemenke i male stabljike. Prije samog skladištenja osušeni materijal može se spremiti u polietilenske vrećice koje je odobrila američka Agencija za hranu i lijekove (FDA), a prilikom skladištenja potrebno je osigurati nižu temperaturu (oko 10°C) i odsutnost svjetla kako bi se održala stabilnost većine kanabinoida (ElSohly i sur., 2017).

### 2.1.2. Kemijski sastav *Cannabis sativa* L.

Osim što je ova biljka bogat izvor celuloznih i drvenih vlakana, zanimljiva je i zbog velikog sadržaja fitokemikalija od kojih su od većeg značaja kanabinoidi, terpeni i fenolni spojevi. Pretežito su zastupljeni terpenofenolni spojevi fitokanabinoidi skupine C21 i C22 (za karboksilne oblike) (Andre i sur., 2016). Najznačajnije komponente koje sadrži su THCA, kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabinolna kiselina (CBNA), zatim kanabigerolna kiselina (CBGA), kanabikromenska kiselina (CBCA), kanabinodiolna kiselina (CBNDA) (ElSohly i Slade, 2005). Najzastupljeniji kanabinoid u indijskom tipu *Cannabisa* je THCA, dok CBDA prevladava u industrijskoj konoplji. Kanabikromenska kiselina (CBCA) dominira u mladim biljkama, međutim udio opada njenim sazrijevanjem (Meijer i sur., 2009). Fitokanabinoidne kiseline u biljci prevode se u neutralni oblik neenzimskim procesom dekarboksilacije, a do porasta njihovog udjela dolazi prilikom zagrijavanja nakon žetve (Flores-Sanchez i Verpoorte, 2008). Fitokanabinoidi najviše su zastupljeni u ženskim cvjetovima i u većini zračnih dijelova biljke, a manje u ostalim dijelovima biljke, odnosno u sjemenu (Ross i sur., 2000), korijenju (Stout i sur., 2012) i peludu (Ross i sur., 2005). Njihov udio u lišću opada starenjem biljke i duž osi stabljike, a viši udio je pri vrhu stabljike (Pacífico i sur., 2008).

Djelovanje kanabinoida na ljudski organizam očituje se u njihovoj interakciji sa endokanabinoidnim sustavom ljudi u kojem se nalaze dva kanabinoidna receptora povezana s proteinima, CB1 i CB2, te dva endogena liganda, anandamid i 2-arahidonilglicerol. Smatra se da imaju regulatornu ulogu u raznim fiziološkim procesima poput apetita, osjeta boli, raspoloženja, pamćenja, upala, utjecaja na inzulin te na metabolizam masti i energije (De Petrocellis i sur., 2011; Di Marzo i Piscitelli, 2015). Receptori CB1 nalaze se u središnjem živčanom sustavu, mozgu, imunološkim stanicama, zatim u gastrointestinalnom, reproduktivnom, tkivu nadbubrežne žlijezde, plućnom, srčanom te u tkivu mokraćnog mjehura. S druge strane, smatra se da receptori CB2 imaju imunomodulacijski učinak te reguliraju imunost citokina. Dekarboksilacijom THCA nastaje psihoaktivna komponenta THC koja pokazuje veći afinitet za receptor CB1, u odnosu na CB2, preko kojeg dolazi do djelovanja na sam organizam. Osim što dolazi do vezanja na spomenute receptore, THC stupa i u mnoge druge molekularne interakcije te uzrokuje protuupalno, antikancerogeno, analgetsko, neuro-antioksidativno djelovanje te opuštanje mišića (De Petrocellis i sur., 2011). THC uzrokuje i određene nuspojave, poput anksioznosti, kolinergički deficit i smanjenje efikasnosti imuno sustava (Russo, 2011). Najzastupljeniji fitokanabinoid u industrijskoj konoplji je CBDA. Dekarboksilirani oblik CBDA, CBD, bitan je spoj jer smanjuje nuspojave koje uzrokuje THC (Englund i sur., 2012). Prema *in vitro* istraživanjima i ispitivanjima na životinjama CBD je pokazao djelovanje protiv tjeskobe, mučnine, protuupalno djelovanje te imunomodulacijska svojstva (Burstein, 2015). Nadalje, pokazao se kao potencijalno terapijsko sredstvo u pretkliničkim modelima bolesti središnjeg živčanog sustava poput epilepsije, shizofrenije, neurodegenerativne bolesti i multipleskleroze, ali i antibakterijsko i antifungalno djelovanje, a osobito protiv meticilin rezistentne *Staphylococcus aureus* (Hill i sur., 2012; Appendino i sur., 2008). Najveću skupinu fitokemikalija sa više od 100 molekula detektiranih u Cannabisu čine terpeni koji su ujedno i odgovorni za miris i okus (Rothschild i sur., 2005; Brenneisen, 2007, Small, 2015). Njihov udio u pojedinim dijelovima biljke uvelike ovisi o provedenom procesu dobivanja esencijalnog ulja, o uvjetima okoliša u kojem raste biljka te o njenom stupnju zrelosti (Meier i Mediavilla, 1998; Brenneisen, 2007). Monoterpeni i seskviterpeni zastupljeni su u cvjetovima biljke, korijenju i lišću konoplje, a glavno mjesto njihovog nastanka su sekretorne žljezdane dlačice. Najzastupljeniji monoterpeni su D-limonen,  $\beta$ -mircen,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, terpinolen i linalool (Fischedick i sur., 2010). U većim količinama u ekstraktu konoplje nalaze se i seskviterpeni,  $\beta$ -kariofil i  $\alpha$ -humulen. Triterpeni, odnosno friedelin i epifriedelanol zastupljeni su u korijenu (Slatkin i sur., 1971), dok u vlaknima konoplje nalazi se  $\beta$ -amirin (Gutiérrez i Ríó Andrade, 2005), a u sjemenkama

konoplje cikloartenol,  $\beta$ -amirini damaradienol (Montserrat de la Paz i sur., 2014). Zbog svoje lipofilne prirode lako prolaze kroz membrane u ljudskom organizmu, a osobito krvno-moždanu barijeru. Za D-limonen smatra se da ima antikancerogeno i imunostimulirajuće djelovanje te smanjuje tjeskobu u ljudi.  $\beta$ -mircen je uglavnom smješten u cvijetu konoplje a pokazuje protuupalna svojstva, pomaže u ublažavanju bolova i smanjenju tjeskobe (Komori i sur., 1995; Cleemput i sur., 2009). Kao inhibitor acetilkolinesteraze djeluje  $\alpha$ -pinen koji na taj način utječe na kognitivne procese, osobito pamćenje (Kennedy i sur., 2011). U konoplji je identificirano oko 20 flavonoida koji se svrstavaju u podrazrede flavona i flavonola. Neki od zastupljenih spojeva su O-glikozidne verzije aglikona apigenin, luteolin, kaempferol, kvercetin, kanflavin A i B koji su metilirani izoprenoidni flavoni jedinstveni za konoplju (Flores-Sanchez i Verpoorte, 2008; Ross i sur., 2005). U sjemenki konoplje pronađeni su lignani poput siringaresinola, medioresinola, sekoizolariciresinola, lariciresinola i pinoresinola. U usporedbi sa lanenim sjemenkama koje su bogate lignanima, sjemenke konoplje sadrže oko 20 puta manju količinu (Smeds i sur., 2012). Nadalje, u sastavu konoplje pronađeno je devetnaest spojeva stilbena kao što je spiran, fenantren i bibenzil, ali i kanabistilben I, IIa i IIb te dihidroresveratrol (Flores-Sanchez i Verpoorte, 2008; Marti i sur., 2014). Fenolni spojevi su poznati antioksidansi koji u nepovoljnim uvjetima štite organizam od oksidacijskog stresa. Ljudski organizam moguće je zaštititi od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te od karcinoma unosom fenolnih spojeva hranom, ali to uvelike ovisi o njihovoj bioraspodjivosti (Arts i Hollman, 2005). Budući da djeluju i kao prooksidanti i stvaraju reaktivne kisikove vrste mogu inducirati povećanje regulacije endogenih antioksidativnih enzima. Flavoni i flavonoli pronađeni u konoplji imaju široki raspon bioloških učinaka, uključujući svojstva koja dijele terpeni i kanabinoidi, a najznačajnija su protuupalna, antikancerogena i neuro-zaštitna svojstva (Halliwell i sur., 2005; Andre i sur., 2010). Lignani uz već spomenuta pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje pokazuju i antivirusno djelovanje te pomažu u smanjenju pretilosti. Zanimljivo je da se sekoizolariciresinol, lariciresinol i pinoresinol pretvaraju u enterolignane anaerobnom crijevnom mikroflorom, a to su prekursori sisavaca (fitoestrogeni) (Wang i sur., 2010).

## **2.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA**

Ekstrakcija je ključan korak u postupku određivanja fenolnih spojeva, ali i ostalih biološki važnih spojeva iz biljnog materijala. To je postupak izolacije spojeva koju određuje prijenos tvari iz otopine, krute smjese ili suspenzije u otapalo, pri čemu tvar koja se izolira treba biti



topljivija nego u početnoj fazi (Garcia-Salas i sur., 2010). Na ekstrakciju fenolnih spojeva utječu razni parametri poput korištenog otapala, temperature, vremenu kontakta, omjera otapala i otopljene tvari, veličine čestice i pH (Takeuchi i sur., 2009). Provođenjem procesa ekstrakcije na višim temperaturama dovodi do bržeg otapanja tvari te povećanja brzine difuzije tvari u volumen otapala (Raso i sur., 1999). Međutim, potrebno je odabrati optimalnu temperaturu, ali i vrijeme ekstrakcije kako bi se izbjegla moguća degradacija željenih komponenti ili izolacija nepoželjnih tvari. Prije same ekstrakcije namirnica se usitnjava zbog proporcionalnog odnosa brzine difuzije i površine namirnice te se po potrebi homogenizira (Jerman i sur., 2010). Postoji ekstrakcija kruto-tekuće, gdje dolazi do prijenosa tvari iz krute faze u tekuću fazu, odnosno otapalo te ekstrakcija tekuće-tekuće gdje dolazi do raspodjele tvari između dvije tekuće faze koje se ne miješaju (Naczki i Shahidi, 2006).

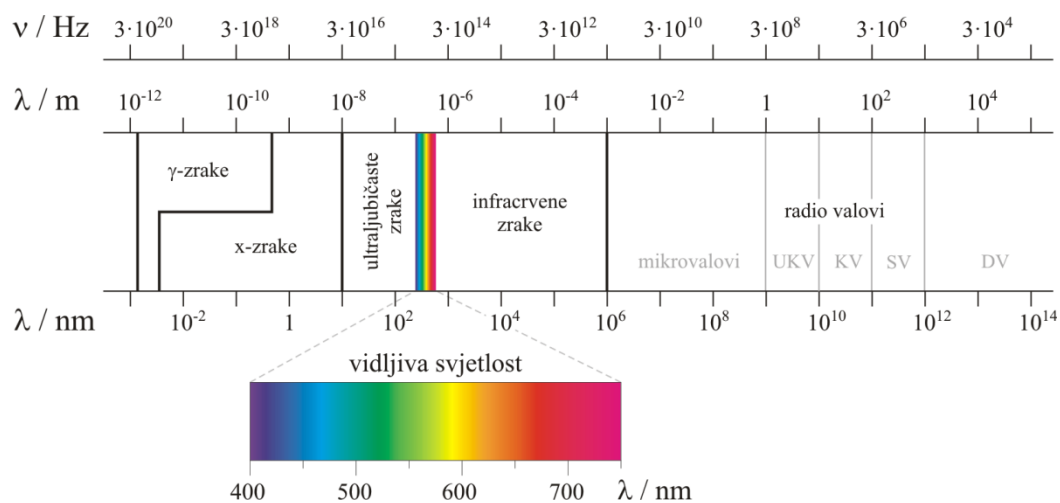
Za ekstrakciju je vrlo važan izbor otapala, ono ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju želimo izolirati. Prilikom odabira otapala vrlo je bitno uzeti u obzir: polarnost otapala, točku ključanja (poželjno je da bude što niža da se olakša odvajanje otapala od komponente), reaktivnost (otapalo ne smije reagirati s ekstraktom), viskozitet (poželjno je da otapalo ima što nižu viskoznost), ekstrakcijski kapacitet otapala, selektivnost, stabilnost otapala na temperaturu, kisik i svjetlo, otapalo ne smije biti škodljivo za ljude niti za okoliš (Albu i sur., 2004). Prema literaturi najčešće korištena otapala za ekstrakciju biološki aktivnih molekula iz biljnog materijala su etanol, aceton i metanol, ili razna otapala miješana s vodom. Bitno je uzeti u obzir i strukturu polifenola, jer mogu sadržavati više hidroksilnih skupina, koje se pak mogu konjugirati s šećerima, kiselinama ili alkilnim skupinama. Polarnost fenolnih spojeva je vrlo značajna i teško je otkriti općenitu metodu za optimalnu ekstrakciju svih fenolnih spojeva. Stoga je optimiranje ekstrakcije bitno da bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet iz različitih uzoraka biljnih materijala (Garcia-Salas i sur., 2010).

Kod konvencionalne ekstrakcije najčešća otapala koja se koriste su metanol i etanol s različitim udjelom organskih otapala u vodenoj fazi. U usporedbi sa etanolom, metanol se pokazao kao efikasnije ekstrakcijsko otapalo jer omogućuje ekstrakciju 20% više fenolnih komponenti (Kapasakalidis i sur., 2006). Unatoč tome, u industrijskim procesima za ekstrakciju fenola iz biljnog materijala pretežito se koristi etanol ili vodena otopina etanola iz razloga što je manje toksičan (Ignat i sur., 2011; Bimakr i sur., 2011). Razvojem modernih metoda ekstrakcija postiže se veća učinkovitost, smanjeni su troškovi izolacije spojeva i potrošnja otapala te je ubrzan proces ekstrakcije u odnosu na klasične metode. Nove metode

ekstrakcije su primjerice ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Garcia-Salas i sur., 2010).

### 2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja. Njihova je frekvencija u rasponu od 1 GHz do 300 GHz, valne duljine od 1 mm do 1 m (slika 2), te pripadaju valovima kojima se prenose radijski i televizijski signali (Wang i Weller, 2006). Smješteni su između radiofrekventnih valova i infracrvenog zračenja u elektromagnetskom spektru (Routray i Orsat, 2012). Karakteristike mikrovalova su te da se odbijaju od metala, prolaze kroz papir, staklo i plastiku te u hrani zagrijevaju vodu (Gedye i sur., 1986).



Slika 2. Valna duljina mikrovalova (Afaghi i sur., 2001)

Mikrovalovi se sastoje od međusobno okomitog električnog i magnetskog polja koji osciliraju. Direktnim djelovanjem mikrovalova na molekule ciljanog materijala dolazi do njegovog zagrijavanja. Pretvorba elektromagnetske energije u toplinsku odvija se putem dva mehanizma: ionskom kondukcijom i rotacijom dipola u otapalu i matriksu uzorka. Ionska indukcija je elektroforetska migracija iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Ukoliko otopina pruža otpor migraciji iona dolazi do trenja i zagrijavanja iste otopine. Rotacija dipola uzrokovana je dodatnim gibanjem polarnih molekula koje sadrže dipolne momente (stalne ili inducirane električnim poljem) koji se pokušavaju uskladiti s nametnutim elektromagnetskim poljem. Uslijed smanjenja električnog polja dolazi do povećanja entropije sustava, a time i oslobađanjem topline (Eskilsson i Bjorklund, 2000; Destandau i sur., 2013). Djelovanjem mikrovalova dolazi do zagrijavanja biljnog materijala, a posljedično i

isparavanja vode koja se nalazi unutar biljne stanice. Isparavanje uzrokuje pritisak na staničnu stjenku koje dovodi do njenog puknuća i ispuštanja aktivnih sastojaka unutar stanice (Delazar i sur., 2012). Kako se većina sekundarnih biljnih metabolita nalaze u membrani ili citoplazmi stanice, na ovaj način se pospješuje difuzija sekundarnih metabolita u otapalo te ulazak otapala u biljni materijal (Starmans i Njhuis, 1996).

Konvencionalna metoda ekstrakcije uključuje zagrijavanje reakcijske smjese preko izmjenjivača topline ili nekog drugog grijaćeg izvora (npr. vodena kupelj). Takav način prijenosa toplinske energije je spor i neučinkovit jer ovisi o toplinskoj provodljivosti materijala. S druge strane mikrovalnim zagrijavanjem omogućeno je direktno zagrijavanje reakcijske smjese, a time i brže zagrijavanje. Iz tog razloga znatno je skraćeno vrijeme trajanja reakcije uz veći prinos i bolju konverziju supstrata u produkt, ali je i olakšana njegova izolacija iz reakcijske smjese (Kormin i sur., 2010).

Na efikasnost postupka MAE (eng. *Microwave Assisted Extraction*) značajan utjecaj ima izbor otapala, vrijeme tretiranja, snaga mikrovalova i temperatura. Otapalo je jedan od najvažnijih čimbenika u procesu ekstrakcije. Općenito, što je veća dielektrična konstanta i dielektrični gubitak, to je veća sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju, što dovodi do bržeg zagrijavanja otapala u odnosu na biljni materijal. Svojstva otapala mogu se izmijeniti kombiniranjem različitih otapala, što uzrokuje različitu selektivnost otapala za različite spojeve. Za ekstrakciju termolabilnih spojeva, može se upotrijebiti kombinacija otapala s relativno nižim dielektričnim svojstvima koja će osigurati da temperatura otapala ostane niža. MAE se uglavnom provodi u otapalima kao i kod klasične ekstrakcije, a odabir otapala za MAE ovisi o topivosti ciljnih komponenta i interakcijama između otapala i biljnog materijala (Routray i Orsat, 2012).

Jedna od glavnih prednosti MAE je vrlo kratko vrijeme ekstrakcije (minute ili sekunde) u usporedbi s drugim konvencionalnim metodama. U mnogim prijavljenim studijama primijećeno je da prinos ekstrakcije ima tendenciju povećanja s produženjem vremena ekstrakcije, ali je ustanovljeno da je porast prinosa vrlo mali s daljnjim porastom vremena (Wang i sur., 2008). Ponekad se uzorci ekstrahiraju u više koraka primjenom uzastopnih ciklusa ekstrakcije, što je također primjer upotrebe veće količine otapala i dužeg vremena primjene mikrovalne (Xiao i sur., 2008). Ovakav način pomaže u daljnjem poboljšanju iskorištenja ekstrakcije, sprječavajući dugotrajno zagrijavanje upotrebom iste količine otapala.

MAE metoda ekstrakcije polifenola bilježi porast analita u ekstraktu do četvrte minute ekstrakcije, a nakon toga se smanjuje (Mandal i sur., 2007). Najčešće se ekstrakcija provodi u vremenu od 30 sekundi do 5 minuta (Ballard i sur., 2010; Zhang i sur., 2008).

Raznim studijama dokazano je da se iskorištenje ekstrahiranog spoja povećava povećanjem snage mikrovalova (Hu i sur., 2008). Međutim, upotreba veće snage mikrovalova može pretjerano povećati temperaturu proizvoda i na taj način smanjiti prinos ekstrakcije oštećenjem proizvoda ili raspadom spoja (Ma i sur., 2009).

Visoka temperatura uzrokuje bolju topljivost što dovodi do boljih ekstrakcijskih rezultata. Povećana temperatura također može uzrokovati porast staničnog tlaka što dovodi do pucanja stanice i otvaranja staničnog matriksa, a kao rezultat toga, povećana raspoloživost komponenata može se ekstrahirati u otopinu. Nadalje, pri visokoj temperaturi smanjuje se viskoznost otapala, povećavajući njegovu pokretljivost i topljivost, povećavajući na taj način učinkovitost ekstrakcije (Khajeh i sur. 2009). Međutim, u nekim slučajevima, primijećeno je da se učinkovitost ekstrakcije povećava porastom temperature sve dok se ne dobije optimalna temperatura i omjer otapalo – kruta faza, a zatim se počne smanjivati s daljnjim porastom temperature. To također varira s tipom spojeva koji se trebaju izdvojiti jer je temperatura razgradnje svakog spoja različita. Viša temperatura ili produljena primjena visoke temperature, izazvana dugotrajnom primjenom visokih razina snaga mikrovalova, mogu dovesti do degradacije i kasnijeg smanjenja iskorištenja i kvalitete (Routray i Orsat, 2012). U znanstvenom istraživanju kojeg su proveli Liazid i sur. (2007) ispitivana je stabilnost fenolnih spojeva tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pri različitim temperaturama. Zaključili su da spojevi koji imaju veći broj hidroksilnih supstituenata lakše razgrađuju u uvjetima ekstrakcije visoke temperature.

### **2.3. OPTIMIRANJE I KINETIKA PROCESA EKSTRAKCIJE**

Optimiranje je pojam koji predstavlja poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa uz što manje troškove, a može se provesti empirijskim ili statističkim metodama. Svaki tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, a praćenjem i mijenjanjem jednog parametra uz zadržavanje ostalih konstantnima, teško je vidjeti međusobni utjecaj varijabli, ali i konačan efekt parametara na proces. Danas se u optimiranju procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a osim toga pružaju uštedu na vremenu jer smanjuju broj eksperimenata (Baş i Boyacı, 2007).

### 2.3.1. Metodologija odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije

Metodologiju odzivnih površina (RSM) razvili su Box i suradnici 50-ih godina prošlog stoljeća, a danas je jedna od najpopularnijih metoda optimiranja koja se koristi (Bezerra i sur., 2008). RSM je skup statističkih i matematičkih tehnika korisnih za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa u kojima je cilj definirati odnos između varijable odziva i nezavisnih varijabli. RSM ima važnu primjenu u dizajnu, razvoju i formuliranju novih proizvoda, kao i u poboljšanju postojećeg dizajna proizvoda. Ona definira utjecaj nezavisnih varijabli, samih ili u kombinaciji, na procese. Uz analizu učinaka nezavisnih varijabli, ova eksperimentalna metodologija stvara matematički model koji opisuje kemijske ili biokemijske procese (Anjum i sur., 1997; Myers i sur., 1995). Međutim, primjena RSM nije samo u svrhu optimiranja određenog procesa, već i za određivanje kinetičkih konstanti i ispitivanje enzimske stabilnosti i kinetike. Rana i suradnici (2003) su u svom znanstvenom istraživanju procijenili vrijednosti kinetičkih parametara reakciju kataliziranu alkohol dehidrogenazom korištenjem RSM-a.

Primjena metode odzivnih površina sastoji se od nekoliko faza: potrebno je izabrati nezavisne varijable koje imaju glavni učinak na promatrani sustav, odabrati eksperimentalni dizajn i provesti pokus prema odabranoj eksperimentalnoj matrici, matematičko-statistička obrada dobivenih podataka eksperimenta, procjena prihvatljivosti modela, provjera mogućnosti provođenja pomaka u pravcu optimalnog područja i dobivanje optimalnih vrijednosti za svaku ispitivanu varijablu (Bezerra i sur., 2008).

Brojne varijable mogu utjecati na odziv ispitivanog sustava, a gotovo da je neizvedivo prepoznati i kontrolirati svaku od njih. Iz tog razloga provodi se „Screening dizajn“ pomoću kojeg se odabiru eksperimentalne varijable s najvećim učincima (Lunstedt i sur., 1998). Najjednostavniji model koji se može koristiti u RSM-u temelji se na linearnoj funkciji, a eksperimentalni podaci tvore krivulje. Za procjenu zakrivljenosti mora se koristiti model drugog reda, dok razina polinomnog modela trebala bi sadržavati dodatne izraze koji opisuju interakciju između različitih eksperimentalnih varijabli. Za procjenu parametara polinomnog modela eksperimentalni dizajn mora osigurati da se sve proučavane varijable izvode na najmanje tri razine. Među poznatijim dizajnima drugog reda su tvornički dizajn na tri razine, Box-Behnken dizajn, centralni kompozitni dizajn i Doehlert dizajn. Ovi se simetrični nacrti međusobno razlikuju s obzirom na odabir eksperimentalnih točaka, broj razina ispitivanih varijabli te broj pokusa (Bezerra i sur., 2008).

Nakon prikupljanja podataka koji se odnose na svaku eksperimentalnu točku odabranog dizajna, potrebno je prilagoditi matematičku jednadžbu za opisivanje odziva u skladu s

razinama ispitivanih vrijednosti. Jednadžba se rješava statističkim pristupom koja se naziva metoda najmanjih kvadrata (eng. *Method of least square, MLS*). MLS je tehnika višestruke regresije koja se koristi kako bi se matematički model prilagodio setu eksperimentalnih podataka generirajući najniži mogući broj. Procjena prihvatljivosti matematičkog modela provodi se primjenom analize varijance (ANOVA). Model će se dobro uklopiti s eksperimentalnim podacima ako pokazuje signifikantnu regresiju i neznatno nepoklapanje. Površine koje se dobivaju iz linearnih modela mogu se upotrijebiti pri odabiru izmjene izvornog dizajna kako bi se postigli optimalni uvjeti. Za kvadratne modele, kritična se točka može okarakterizirati kao maksimalna, minimalna ili sedla. Koordinate kritične točke moguće je izračunati kroz prvu derivaciju matematičke funkcije, koji opisuje površinu odziva i izjednačava ga s nulom. Za modele drugog reda (kvadratni modeli), kritična se točka može okarakterizirati kao maksimalna, minimalna ili točka sedla. Točka sedla je točka savijanja između relativnog maksimuma i relativnog minimuma. Koordinate kritične točke moguće je izračunati kroz prvi derivat matematičke funkcije, koji opisuje površinu odziva i izjednačava ga s nulom. Vizualizacija jednadžbe predviđenog modela može se dobiti pomoću grafikona površinskog odziva. Obično se može nacrtati dvodimenzionalni prikaz trodimenzionalne slike. Dakle, ako postoje tri ili više varijabli, vizualizacija grafikona je moguća samo ako je jedna ili više varijabli postavljeno na konstantnu vrijednost (Bezerra i sur., 2008).

### 2.3.2. Kinetika procesa ekstrakcije

Kao što je već prethodno spomenuto, *Cannabis sativa* L. sadrži brojne bioaktivne komponente poput kanabinoida, terpena i polifenola koji imaju značaj u očuvanju zdravlja ljudi. Te se molekule mogu izdvojiti iz čvrste faze procesom ekstrakcije. U kruto-tekućoj ekstrakciji, kruta faza je inertna i nije topljiva u otapalu, međutim priroda čvrste strukture može promijeniti kinetiku prijenosa mase. Prema Fick-ovom zakonu, difuzija topljivih komponenata ovisi o gradijentu koncentracije koji postoji između krute i tekuće faze, odnosno odvija se niz koncentracijski gradijent iz krute faze koja je koncentriranija u tekuću koja je manje koncentrirana (Harouna-Oumarou i sur., 2007). Gradijent se stvara kako bi se postigla ravnoteža između dviju faza (Perry i sur., 1997) prilikom koje difuzija postaje zanemariva neovisno o tome koliko dugo se sam proces odvija. Međutim, konstantnim obnavljanjem otapala difuzija se razvija do maksimalnog kapaciteta ekstrakcije. Kinetika prijenosa tvari uključuje tri koraka: (i) ostvarivanje kontakta materijala koji se podvrgava ekstrahiranju i otapala pri čemu dolazi do distenzije čestica i solubilizacije spojeva, (ii) prienos otopljenih

tvari iz čvrste faze molekularnom difuzijom, (iii) razrjeđivanje otopljenih tvari u otapalu tvoreći ekstrakt (Schwartzberg i Chao, 1982). Modeliranje procesa ekstrakcije omogućuje dizajniranje čitavog procesa te olakšava optimiranje, simulaciju, oblikovanje i kontrolu samog procesa. Osim toga omogućuje uštedu vremena prilikom izvođenja eksperimenta, smanjenje potrošnje energije te upotrebu otapala (Amendola i sur., 2010). Postoje različiti modeli koji opisuju kinetiku sorpcijskih procesa prehrambenih materijala. U ovome radu ispitano je 6 modela kinetike ekstrakcije biološki aktivnih molekula te je ispitano njihovo poklapanje sa eksperimentalnim podacima.

#### **2.4. PRIMJENA UV-VIS I NIR SPEKTROSKOPIJE U ANALIZI PROCESA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA**

Neke studije su pokazale da zajednička uporaba NIR i UV-Vis spektroskopije može u najvećoj mogućoj mjeri iskoristiti komplementarne informacije s različitih profila i može predstavljati prikladnu strategiju za poboljšanje točnosti predviđanja bez dodatnih eksperimentiranja (Biancolillo i sur., 2014; Casale i sur., 2010).

Ciljevi studije koju su proveli Wang i sur. (2015) bili su integriranje podataka NIR i UV-Vis spektra kako bi se učinkovito razlikovao zeleni čaj različitih varijeteta pomoću metode glavnih komponenti (PCA) i modeliranja nasumičnog šuma (RF) te uspostavljanje kalibracijskog modela za brzo predviđanje ukupne koncentracije polifenola u zelenom čaju iz podataka NIR spektroskopije s linearnom djelomičnom regresijom najmanjih kvadrata (PLSR). Rezultat je pokazao da je FT-NIR spektroskopija zajedno s PLS algoritmom brza metoda za određivanje TPC-a u zelenom čaju, a uz to s ovom metodom moguće je brzo razlikovati ispitivane varijetete.

Dai i sur. (2016) u svom su istraživanju on-line metodu UV-NIR spektroskopije koristili za praćenje ekstrakcije *Coptis Rhizome* on-line i u stvarnom vremenu. UV mjeren on-line koristio se kao referentna metoda. Razvijeni model kalibracije NIR-a potvrđen je za postizanje zadovoljavajućih svojstava i uspješno se primjenjuje u nadziranju postupka ekstrakcije *Coptis Rhizome* u stvarnom vremenu. Uz to su metode pomični blok standardne devijacije (MBSD) i stopa promjene relativne koncentracije (RCCR) omogućile brzo određivanje krajnje točke postupka ekstrakcije. Zaključeno je da ova metoda može uštedjeti vrijeme, materijale i radnu snagu.

Wu i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem su primijenili NIR spektroskopiju za nadgledavanje procesa ekstrakcije skutelareina iz *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand-Mazz. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) korištena je kao referentna metoda za određivanje skutelareina u ekstraktu otopine. Rezultati su pokazali da su koeficijenti korelacije kalibracije modela i unakrsne validacije bili 0,9967, odnosno 0,9811, a osnovna srednja kvadratna pogreška kalibracije i unakrsne validacije su 0,044, odnosno 0,105. Osim toga, i metoda standardnog odstupanja pokretnog bloka (MBSD) i test usklađenosti korišteni su za identificiranje završetka ekstrakcije, pružajući podatke u stvarnom vremenu i trenutne povratne informacije o tijeku ekstrakcije. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da tehnika NIR spektroskopije pruža učinkovit i ekološki prihvatljiv pristup za brzo određivanje skutelareina i kontrolu krajnje točke postupka ekstrakcije.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci industrijske konoplje

Istraživanje je provedeno na suhom biljnom materijalu (smjesa lista, cvijeta i sjemenaka) industrijske konoplje. Uzorci su nabavljeni od registriranog proizvođača OPG Levačić (Prelog, Međimurje) iz berbe 2018.

#### 3.1.2. Kemikalije

- 1,1,-difetil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), Sigma-Aldrich, Njemačka
- 2,4,6,-tripridil-1,3,5-triazina (TPTZ,  $C_{18}H_{12}O_6$ ), Sigma-Aldrich, Švicarska
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox,  $C_{14}H_{18}O_4$ ), Sigma-Aldrich, Rusija
- etanol ( $C_2H_5OH$ ), 96%-tni, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Hrvatska
- galna kiselina ( $C_6H_2(OH)_3COOH$ ), Sigma-Aldrich, Njemačka
- klorovodična kiselina (HCl), Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska
- koncentrirana octena kiselina ( $CH_3COOH$ ), T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm
- metanol ( $CH_3OH$ ), Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska
- natrijev acetat-trihidrat ( $CH_3COONa \times 3H_2O$ ), Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev karbonat ( $Na_2CO_3$ ), Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- željezo(II)-sulfat-heptahidrat ( $FeSO_4 \times 7H_2O$ ), Sigma Aldrich, Njemačka
- željezo(III)-klorid-heksahidrat ( $FeCl_3 \times 6H_2O$ ), Gram Mol, Hrvatska

#### 3.1.3. Aparatura i pribor

- analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- eksikator (Normax, Portugal)
- kolorimetar PCE-CSM3 (PCE Instruments, Njemačka)
- konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska)
- laboratorijski sušionik (InkoLab, ST60T, Hrvatska)
- magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)
- mikrovalno-ultrazvučni reaktor (Lab Kits, SAD)

- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  Control Development inc., SAD)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija biološki aktivnih komponenata

U ovom radu provedene su dvije vrste eksperimenata mikrovalovima potpomognute ekstrakcije:

#### 1. Eksperimenti u svrhu optimiranja uvjeta ekstrakcije:

Analiziran je utjecaj mikrovalova na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje. U Erlenmayer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom doda se  $V = 20$  mL odabranog otapala za ekstrakciju (25 % otopina etanola, 50 % otopina etanola te destilirana voda) zagrijanog na određenoj temperaturi te određena masa osušenog uzorka konoplje. Uvjeti provedbe eksperimenta prikazani su u tablici 1. Nakon provedene ekstrakcije uzorak se filtrira kako bi se odvojio ekstrakt od krute faze. Nakon provedene ekstrakcije ekstraktima su određena fizikalna i kemijska svojstva.

#### 2. Dinamički eksperimenti:

Dinamički eksperimenti provedeni su u nizu sukcesivnih eksperimenata priomjeru tekuće i krute faze, udjelu etanola, temperaturi, vremenu ekstrakcije i snazi mikrovalova prethodno određenim kako optimalnima ( $L/S = 30$  mL  $\text{g}^{-1}$ ,  $v/v = 25$  %,  $T = 45$  °C,  $t = 25$  min,  $P = 600$  W). U Erlenmayer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom doda se  $m = 0,3$  g osušenog uzorka konoplje,  $V = 10$  mL 25% otopina etanolazagrijanog na temperaturi od  $T = 45$  °C te se ekstrakcija provodi u vremenu od  $t = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 21, 23$  i 25 min. Nakon provedene ekstrakcije ekstraktima su određena fizikalna i kemijska svojstva.

**Tablica 1.** Parametri provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Eksp.	omjer tekuće i krute faze (mL g <sup>-1</sup> )	udio etanola (%)	temperatura (°C)	vrijeme (min)	snaga mikrovalova (W)
1	10	0	45	25	600
2	50	0	45	25	600
3	10	50	45	25	600
4	50	50	45	25	600
5	30	25	30	5	600
6	30	25	60	5	600
7	30	25	30	45	600
8	30	25	60	45	600
9	30	0	45	25	400
10	30	50	45	25	400
11	30	0	45	25	800
12	30	50	45	25	800
13	10	25	30	25	600
14	50	25	30	25	600
15	10	25	60	25	600
16	50	25	60	25	600
17	30	25	45	5	400
18	30	25	45	45	400
19	30	25	45	5	800
20	30	25	45	45	800
21	30	25	45	25	600
22	30	25	45	25	600
23	30	25	45	25	600
24	30	0	30	25	600
25	30	50	30	25	600
26	30	0	60	25	600
27	30	50	60	25	600
28	10	25	45	5	600
29	50	25	45	5	600
30	10	25	45	45	600
31	50	25	45	45	600
32	30	25	30	25	400
33	30	25	60	25	400
34	30	25	30	25	800
35	30	25	60	25	800
36	10	25	45	25	400
37	50	25	45	25	400
38	10	25	45	25	800
39	50	25	45	25	800
40	30	0	45	5	600
41	30	50	45	5	600
42	30	0	45	45	600
43	30	50	45	45	600
44	30	25	45	25	600
45	30	25	45	25	600
46	30	25	45	25	600

### 3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata

Pripremljenim vodenim ekstraktima određuju se fizikalna svojstva (pH, vodljivost, ukupne otopljene čvrste tvari i prinos ekstrakcije). Za svaki uzorak izmjerena je električna vodljivost i udio otopljenih čvrstih tvari pomoću konduktometra (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska). Za određivanje pH uzorka korištena je staklena pH elektroda spojena na pH metar (Jenco 601A, SAD), koji je prethodno kalibriran koristeći standarde s vrijednostima pH = 4 i pH = 7.

### 3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

*Princip određivanja:*

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koji ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na  $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$  do konstantne mase (AOAC, 1995).

*Postupak određivanja:*

U suhu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se kvarcni pijesak u dovoljnoj količini da prekrije dno posudice. Posudica se suši u sušioniku sat vremena sa skinutim poklopcem na temperaturi od  $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću  $m = \pm 0,0002\text{ g}$ . U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom, odvaže se određena količina uzorka ( $m = 1-5\text{ g} \pm 0,0001$ ); volumena približno  $V = 3\text{ mL}$ . Uzorak se suši  $t = 4\text{ h}$  pri  $T = 105^{\circ}\text{C}$  u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu su posudice bile otvorene. Po završetku sušenja posudice se zatvaraju u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se bilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode. Na ispitivanom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2 % obzirom na udio vode odnosno udio suhe tvari.

Udio suhe tvari u uzorku određen je na temelju mase isparene vode prema (formula 1):

$$\begin{aligned}\% \text{ vode} &= (a-b) \cdot 100/m \\ \% \text{ suhe tvari} &= 100 - \% \text{ vode}\end{aligned}\quad [1]$$

gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b - masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

#### 3.2.4. Određivanje boje uzoraka ekstrakta industrijske konoplje

Boja svih uzoraka određena je primjenom kolorimetra PCE-CSM3 (PCE Instruments, Njemačka). Primjenom Hunterovih koordinata za boje određuje se  $L^*$  što predstavlja svjetlost,  $a^*$  što predstavlja raspon od zelene do crvene boje, te  $b^*$  što predstavlja raspon od plave do žute. Vrijednosti koordinata  $a^*$  i  $b^*$  koriste se za izračunavanje Hue kuta te kroma vrijednosti.

Hue kut računa se prema izrazu (jednadžba 2):

$$H = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad [2]$$

Kroma vrijednosti računa se prema izrazu (jednadžba 3):

$$C = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad [3]$$

#### 3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola

*Princip određivanja:*

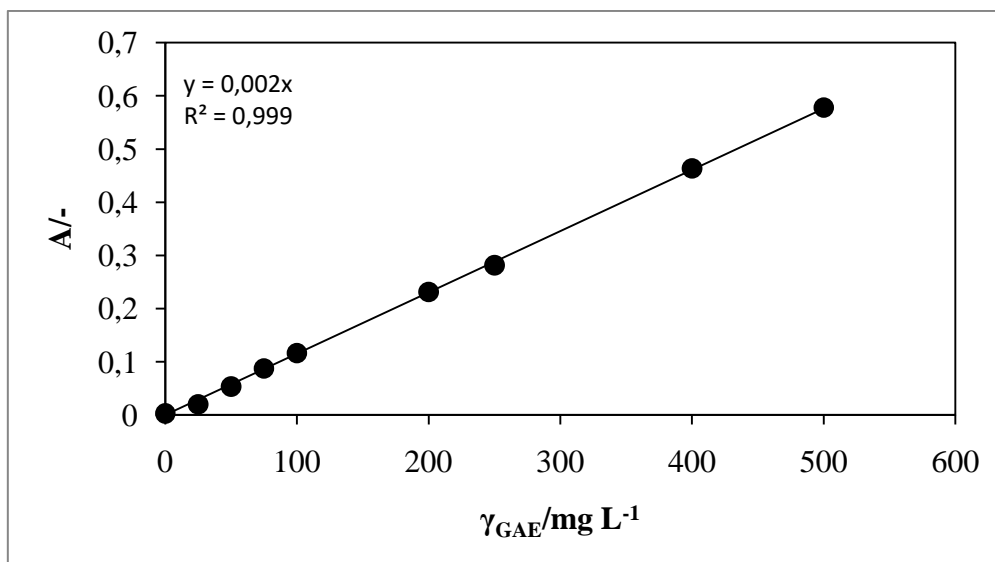
Određivanje koncentracije ukupnih polifenola temeljeno je na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). U spomenutoj reakciji dolazi do oksidacije fenola i redukcije Folin-Ciocalteu reagensa do volframovog i molibdenovog oksida koji daju plavo obojenje. Nastali intenzitet plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od  $\lambda = 765$  nm (Lachman i sur., 1998). Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari biljke.

*Postupak određivanja:*

Ekstrakti industrijske konoplje dobiveni metodom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima razrijeđeni su prije analize 20 puta demineraliziranom vodom. U staklenu epruvetu otpipetira se  $V = 100 \mu\text{L}$  uzorka,  $V = 500 \mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa,  $V = 7,9 \text{ mL}$  destilirane vode i  $V = 1,5 \text{ mL}$  20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te se sve skupa pomiješa pomoću Vortexa. Pripremljeni uzorci stoje  $t = 2 \text{ h}$  na sobnoj temperaturi u mraku, a po isteku vremena mjeri se apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na valnoj duljini od  $\lambda = 765 \text{ nm}$ . Slijepa proba priprema se na isti način samo što se umjesto uzorka uzima destilirana voda. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost.

#### *Izrada baždarnog dijagrama:*

Za izradu baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji polifenola pripremljene su pojedinačne standardne otopine galne kiseline. U staklenu epruvetu otpipetirano je  $100 \mu\text{L}$  standarda određene koncentracije te je dalje primijenjen protokol za određivanje koncentracije ukupnih polifenola. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtan je baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apcisu nanose koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene apsorbancije kod  $\lambda = 765 \text{ nm}$  (slika 3). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 3. Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi (jednadžba 4):

$$Y=0,001 \cdot X \quad R^2=0,999 \quad [4]$$

gdje je:

$Y$  - apsorbancija pri  $\lambda = 765$  nm

$X$  – koncentracija galne kiselina  $\text{mg L}^{-1}$

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

*Princip određivanja:*

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) u metanolnoj otopini daje ljubičasto obojenje koje apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od  $\lambda = 515$  nm. Metoda se temelji na tome da se ion DPPH reducira iz DPPH• u DPPH<sub>2</sub> prilikom primanja protona (H) od strane antioksidansa, a ljubičasto obojenje prelazi u žuto obojenje što je popraćeno smanjenjem apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

*Postupak određivanja:*

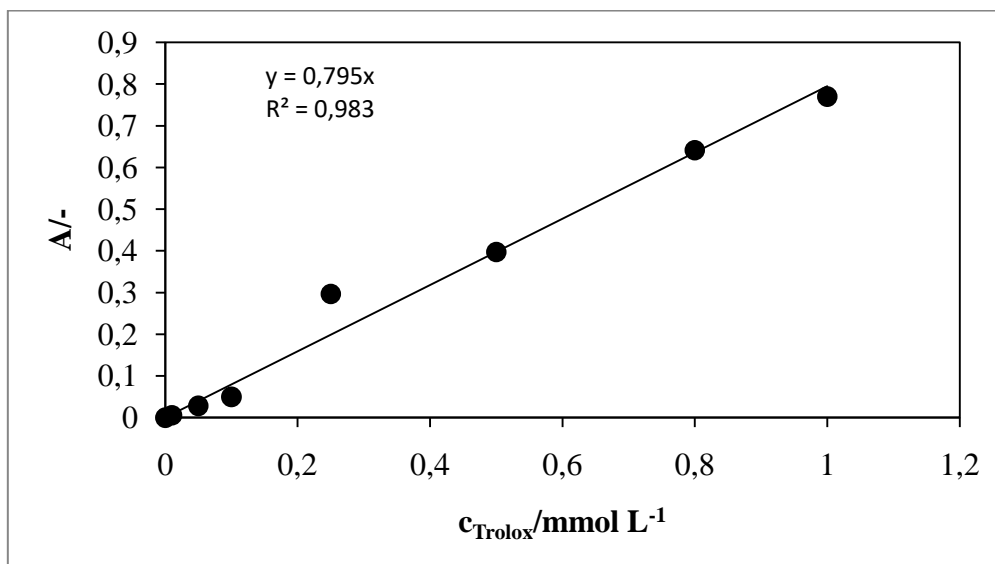
Ekstrakti industrijske konoplje dobiveni metodom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima razrijeđeni su prije analize 20 puta demineraliziranom vodom. Nakon pripreme otopine DPPH radikala u metanolu koncentracije  $c = 0,094 \text{ mmol L}^{-1}$ , u staklenu epruvetu doda se  $V = 100 \mu\text{L}$  ispitivanog uzorka te  $V = 3,9 \text{ mL}$  pripremljene otopine DPPH koji se potom promiješaju pomoću Vortexa. Reakcija se odvija  $t = 30$  minuta u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od  $\lambda = 515$  nm. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost.

*Izrada baždarnog dijagrama:*

Postupak izrade baždarnog dijagrama je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto  $V = 100 \mu\text{L}$  uzorka dodaje  $V = 100 \mu\text{L}$  otopine Troloxa poznate koncentracije ( $c = 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,8, 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtan je baždarni pravac pomoću programa



Microsoft Excel pri čemu se na apcisu nanase koncentracija otopine Troloxa ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene apsorbancije kod  $\lambda = 515 \text{ nm}$  (slika 4.). Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca Trolox-a, a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Troloxa po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 4. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi (jednadžba 5):

$$Y=0,795 \cdot X \quad R^2=0,983 \quad [5]$$

gdje je:

$Y$  - apsorbancija pri  $\lambda = 515 \text{ nm}$

$X$  – koncentracija otopine Trolox  $\text{mmol L}^{-1}$

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

*Princip određivanja:*

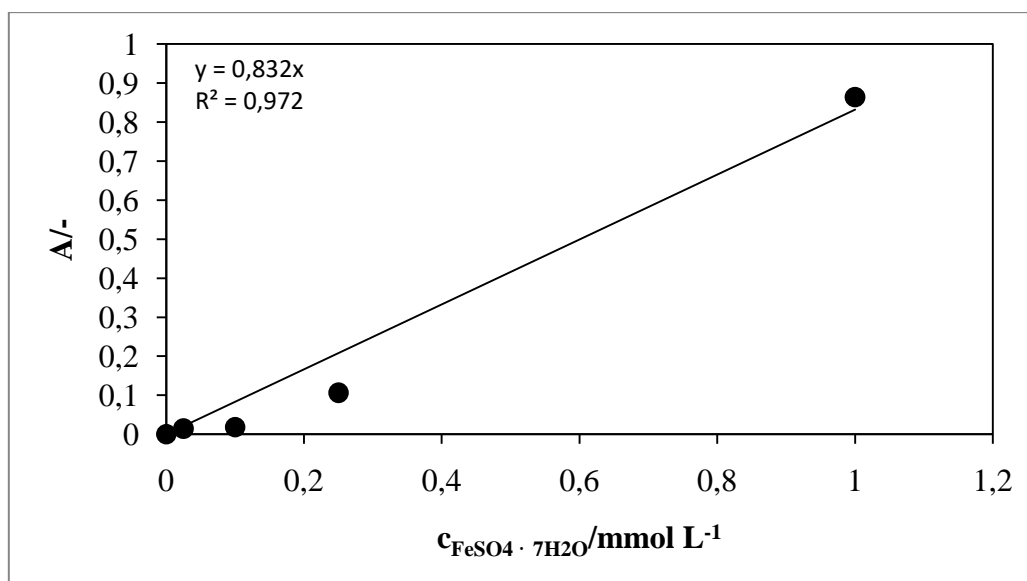
Ova kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) u fero formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Redukcija navedenog spoja prati se spektrometrijski pri valnoj duljini od  $\lambda = 593 \text{ nm}$ .

*Postupak određivanja:*

Ekstrakti industrijske konoplje dobiveni metodom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima razrijeđeni su prije analize 20 puta demineraliziranom vodom. Prethodno je pripremljen FRAP reagens koji sadrži  $V = 25 \text{ mL}$   $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$  acetatnog pufera,  $V = 2,5 \text{ mL}$   $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$  otopine 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) te  $V = 2,5 \text{ mL}$   $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$  vodene otopine željezo(III)-klorid-heksahidrata tako da omjer otopina bude 10:1:1. U staklenu epruvetu pomiješa se  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka i  $V = 950 \text{ }\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Nakon 4 minute izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od  $\lambda = 593 \text{ nm}$ . Slijepa proba se priprema na isti način samo što se umjesto uzorka dodaje  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost.

*Izrada baždarnog dijagrama:*

Postupak izrade baždarnog dijagrama je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka dodaje  $V = 50 \text{ }\mu\text{L}$  otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrata( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) poznate koncentracije ( $c = 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,75, 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtan je baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apcisu nanose koncentracija otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrata ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene apsorbancije kod  $\lambda = 593 \text{ nm}$  (slika 5). Antioksidacijska aktivnost računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 5. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi (jednadžba 6):

$$Y=0,832 \cdot X \qquad R^2=0,972 \qquad [6]$$

gdje je:

$Y$  - apsorbancija pri  $\lambda = 593$  nm

$X$  – koncentracija otopine  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  mmol L<sup>-1</sup>

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.8. UV-VIS spektroskopija

UV-Vis spektri ekstrakata industrijske konopljepripremljenih u eksperimentima optimiranja uvjeta ekstrakcije snimani su na spektrofotometru (Biochrom Libra S11, Engleska) u rasponu valnih duljina od  $\lambda = 325$  do 900 nm uz razmak između mjerenja od 1 nm. Pripremljeni uzorci mjereni su na spektrofotometru u plastičnim kivetama te su za svaki uzorak provedena tri mjerenja.

### 3.2.9. NIR spektroskopija

Kontinuirani NIR spektri ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih u eksperimentima optimiranja uvjeta ekstrakcije snimani su u rasponu valnih duljina  $\lambda = 904 - 1699$  nm primjenom NIR spektrometara (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  Control Development inc., SAD) povezanog s računalom. Promjena apsorbancije pri valnim duljinama od  $\lambda = 904 - 1699$  nm analizira se primjenom programskog paketa Control Development Spec 32 (Control Development inc., SAD). Sva mjerenja provedena su u tri paralele.

3.2.10. Statistička analiza, optimiranje procesa ekstrakcije, analiza kinetike procesa ekstrakcija i analiza UV-VIS-NIR spektara ekstrakata industrijske konoplje

#### 3.2.10.1. Osnovna statistička analiza rezultata

Sva mjerenja u ovome radu provedena su u dvije paralele te je za njih provedena osnovna statistička analiza (srednja vrijednost, standardna devijacija, standardna pogreška) u programskom paketu Statistica 13.0. Međusobni odnosi ili povezanosti između fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih vodenih ekstrakata izabranih analizirani su na temelju korelacijske matrice u programskom paketu Statistica 13.0 sa probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD).

### 3.2.10.2. Multivarijantna analiza varijance (MANOVA)

Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u procesu ekstrakcije primijenjena je multivarijantna analiza varijance u programskom paketu Statistica 13.0 privremena licenca (TIBCO Software Inc., SAD). Multivarijantna analiza varijance testira razlike između dviju ili više nezavisnih varijabli i dviju ili više zavisnih varijabli. Primjenjuje se u dva slučaja: (i) ako postoji nekoliko koreliranih zavisnih varijabli te se primjenjuje jedan test na čitavom setu varijabli umjesto nekoliko pojedinačnih testova te (ii) kad se želi ispitati kako nezavisne varijable utječu na odziv zavisnih varijabli.

### 3.2.10.3. Analiza osnovnih komponenata (PCA)

Fizikalna i kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje analizirana su primjenom metode glavnih komponenata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) u programskom paketu XLSTAT privremena licenca (Addinsoft Inc., SAD).

Metoda glavnih komponenata je najjednostavnija metoda multivarijantne statistike koju možemo definirati kao alat za pronalaženje sličnosti i različitosti između podataka. Cilj PCA je konstrukcija novog koordinatnog sustava s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glavne uzroke varijacija podataka.

### 3.2.10.4. Metoda odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije

Metoda odzivnih površina (eng. *Response surfaces methodology; RSM*) sastoji se od skupine matematičkih i statističkih tehnika koje se temelje na uklapanju empirijskih modela u eksperimentalne podatke dobivene u odnosu na eksperimentalni dizajn. Box i suradnici razvili su 50-ih godina prošlog stoljeća ovu metodu koja analizira odnose između nekoliko ulaznih varijabli te jedne ili više varijabli odziva. Osnovni motiv za korištenje RSM metode je pronalaženje optimalnih uvjeta za dobivanje optimalnog odziva (Bezerra i sur., 2008).

Prije primjene RSM metodologije potrebno je odabrati eksperimentalni dizajn koji će definirati koje eksperimente treba izvesti u eksperimentalnom području koje se proučava. U ovom istraživanju plan eksperimenata za optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz industrijske konoplje izrađen je pomoću Box-Behnken eksperimentalni dizajn u programskom paketu Statistica 13.0 sa probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD).

Box-Behnken eksperimentalni dizajn zahtijeva minimalno tri parametra, a u ovome istraživanju ispitan je utjecaj omjera tekuće i krute faze, udjela etanola, temperature, vremena

ekstrakcije i snage na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih komponenti industrijske konoplje. Svaka od varijabli analizirana je na 3 nivoa, a za odabranih 5 faktora na 3 nivoa algoritam predlaže 46 eksperimenata.

#### 3.2.10.5. Umjetne neuronske mreže za optimiranje procesa ekstrakcije

Umjetna neuronska mreža (eng. *Artificial Neural Network; ANN*) je računalni sustav koji je u stanju obraditi informacije pomoću svog dinamičkog odgovora na ulazne parametre. U širem smislu umjetnu neuronsku mrežu moguće je opisati kao sustav koji se temelji na oponašanju rada ljudskog mozga, osobito u nastojanju simuliranja postupka učenja i obrade podataka. ANN uči iz primjera kroz iteraciju prilagođavanjem unutarnje strukture da odgovara obrascu između ulaznih i izlaznih varijabli. Mogu aproksimirati kontinuirane funkcije pomoću eksperimentalno dobivenih podataka (Afaghi i sur., 2001).

U svrhu predikcije kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje razvijene su višeslojne perceptronske neuronske mreže (eng. *multiple layer perceptron, MLP*) u programskom paketu Statistica 13.0 s probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD). Višeslojne perceptronske neuronske mreže izgrađene su od perceptron neurona organiziranih u serijski povezane slojeve. Slojevi se najčešće opisuju brojevima od 0 do  $N$ , pri čemu nulti sloj samo prosljeđuje vektor ulaznih veličina u mrežu, dok je  $N$ -ti sloj ujedno i izlazni sloj mreže. Slojevi između nultog i  $N$ -tog nazivaju se unutarnjim ili skrivenim slojevima. Kao ulazne veličine za razvoj neuronskih mreža odabrani su uvjeti provedbe ekstrakcije (omjer tekuće i krute faze, udio etanola, temperatura, vrijeme ekstrakcije i snaga mikrovalova) dok su izlazne veličine kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata (koncentracija ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom i antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom). Eksperimentalni podaci su podijeljeni u omjeru 70:15:15 za učenje, testiranje i validaciju predloženog modela. Kao algoritam učenja upotrijebljen je algoritam povratnog prostiranja izlazne pogreške (eng. *Back - Propagation Algorithm*) implementiran u korištenom programskom paketu Statistica 13.0. Odabir optimalne neuronske mreže proveden je na temelju srednjeg kvadratnog odstupanja (RMSE) i linearnog korelacijskog koeficijenta ( $R^2$ ) određenih između eksperimentom izmjerenih vrijednosti te modelom predviđenih vrijednosti.

### 3.2.10.6. Modeliranje kinetike ekstrakcije biološki aktivnih molekula

U svrhu analize dinamike procesa ekstrakcije biološki aktivnih molekula iz industrijske konoplje provedena je procjena vrijednosti parametara kinetičkih modela i to: modela kinetike prvog reda, dvostupanjskog kinetičkog modela, Pelegovog modela, eksponencijalnog modela, Pageovog modela i logaritamskog modela) u programskom paketu Statistica 13.0 s probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD). Prihvatljivost modela određena je na temelju koeficijenta determinacije  $R^2$ , srednje kvadratne pogreške (eng. *Root Mean Square Error*; *RMSE*) i prosječne srednje kvadratne pogreške (eng. *Scaled Root Mean Square Error*; *SRMSE*).

*Model kinetike prvog reda* (Karacabey i sur., 2011) prikazan je izrazom (jednadžba 7):

$$c_t = c_{eq} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad [7]$$

gdje  $c_{eq}$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju tvari koja se ekstrahira na međufaznoj površini kruto-tekuće,  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ , a  $k$  predstavlja volumni koeficijent prijenosa.

*Dvostupanjski kinetički model* (Karacabey i sur., 2011) prikazan je izrazom (jednadžba 8):

$$c_t = c_{eq} \cdot [1 - (F \cdot e^{-k_1 \cdot t}) - [(1-F) \cdot e^{-k_2 \cdot t}]] \quad [8]$$

gdje  $c_{eq}$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju tvari koja se ekstrahira na međufaznoj površini kruto-tekuće,  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ ,  $F$  predstavlja dio tvari koja se ekstrahira i brzo se otpušta,  $(1-F)$  dio tvari koja se ekstrahira i sporo se otpušta,  $k_1$  konstantu brzine koja opisuje brzo otpuštanje, a  $k_2$  konstantu brzine koja opisuje sporo otpuštanje.

*Peleg-ov model* (Peleg, 1988) prikazan je izrazom (jednadžba 9):

$$c_t = c_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad [9]$$

gdje  $c_0$  predstavlja koncentraciju koja se ekstrahira u vremenu  $t = 0$ ,  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ , dok  $k_1$  predstavlja brzinu ekstrakcije, a  $k_2$  konstantu kapaciteta ekstrakcije.

*Eksponencijalni model* (Lin i sur., 2018) prikazan je izrazom (jednadžba 10):

$$c_t = B \cdot t^n \quad [10]$$

gdje  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ , dok  $B$  predstavlja brzinu ekstrakcije, a  $n$  eksponenta modela ( $<1$ ).

*Page-ov model* (Jokić i sur., 2010) prikazan je izrazom (jednadžba 11):

$$c_t = e^{(-k \cdot t^n)} \quad [11]$$

gdje  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ , dok  $k$  i  $n$  predstavljaju konstante Page-ovog modela.

*Logaritamski model* (Bucić-Kojić i sur., 2007) prikazan je izrazom (jednadžba 12):

$$c_t = a \cdot \log(t) + b \quad [12]$$

gdje  $c_t$  predstavlja koncentraciju tvari koja se ekstrahira u vremenu  $t$ , dok  $a$  i  $b$  predstavljaju konstante logaritamskog modela.

### 3.2.10.7. Analiza glavnih komponenata kontinuiranih UV-VIS-NIR spektara

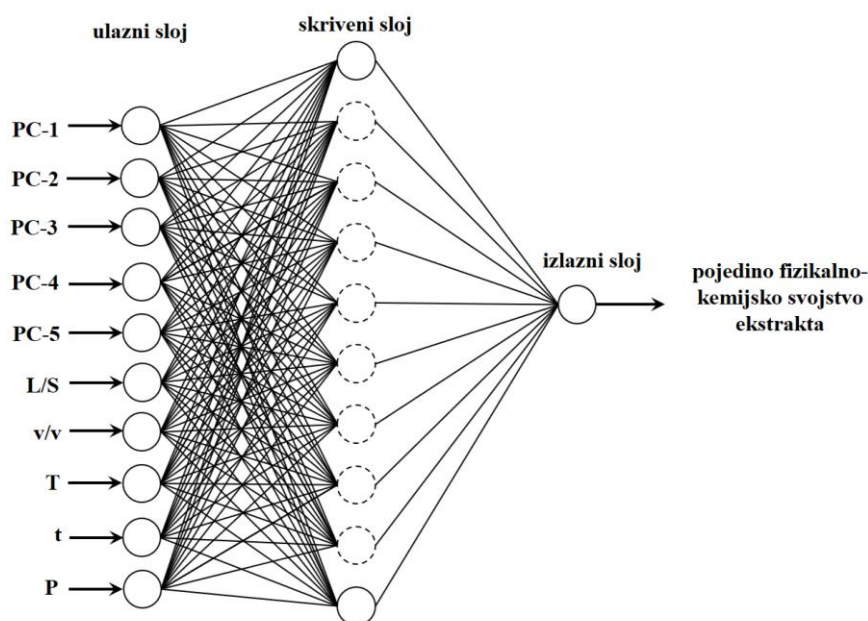
Prikupljeni UV-VIS-NIR spektri ekstrakata industrijske konoplje pripremljeni u eksperimentima optimiranja uvjeta ekstrakcije analizirani su metodom glavnih komponenata (eng. *Principle Component Analysis*, PCA) u programskom paketu Statistica 13.0 s probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD). Metoda glavnih komponenata je najjednostavnija metoda multivarijante statistike koju možemo definirati kao alat za pronalaženje sličnosti i različitosti između podataka. Cilj PCA je konstrukcija novog koordinatnog sustava s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glavne uzroke varijacija podataka.

### 3.2.10.8. Modeli neuronskih mreža za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS-NIR spektara

U svrhu predikcije fizikalno-kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje razvijene su višeslojne perceptronske neuronske mreže (eng. *multiple layer perceptron*, MLP) u programskom paketu Statistica 13.0 s probnom licencom (TIBCO Software Inc., SAD). Višeslojne perceptronske neuronske mreže izgrađene su od perceptron neurona organiziranih u serijski povezan slojeve. Slojevi se najčešće opisuju brojevima od 0 do  $N$ , pri čemu nulti sloj samo prosljeđuje vektor ulaznih veličina u mrežu, dok je  $N$ -ti sloj

ujedno i izlazni sloj mreže. Slojevi između nultog i N-tog nazivaju se unutarnjim ili skrivenim slojevima.

U ovom radu kao ulazne veličine za razvoj neuronskih mreža odabrane su koordinate prvih 5 faktora iz PCA analize UV-VIS-NIR spektara te uvjeti provedbe ekstrakcije (omjer tekuće i krute faze, udio etanola, temperatura, vrijeme ekstrakcije i snaga mikrovalova) dok su izlazne veličine bile fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata (vodljivost, prinos ekstrakcije, koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom i antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom) (slika 6). Eksperimentalni podaci su podijeljeni u omjeru 70:15:15 za učenje, testiranje i validaciju predloženog modela. Kao algoritam učenja upotrijebljen je algoritam povratnog prostiranja izlazne pogreške (eng. *Back - Propagation Algorithm*) implementiran u korištenom programskom paketu. Odabir optimalne neuronske mreže proveden je na temelju srednjeg kvadratnog odstupanja (RMSE) i linearnog korelacijskog koeficijenta ( $R^2$ ) određenih između eksperimentom izmjerenih vrijednosti te modelom predviđenih vrijednosti.



Slika 6. Arhitektura neuronskih mreža za predikciju fizikalno-kemijskih svojstva ekstrakata industrijske konoplje na prvih pet faktora analize osnovnih komponenata UV-VIS-NIR spektara i uvjeta provedbe ekstrakcije



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Bioaktivne komponente koje se nalaze u nekim namirnicama kvantitativno čine samo mali dio njih. Neki od najvažnijih bioaktivnih komponenti iz biljnih izvora su polifenolni spojevi i flavonoidi koji djeluju kao antioksidansi, odnosno stabiliziraju slobodne radikale te na taj način štite od oksidativnih reakcija koje se odvijaju unutar tijela. Mikrovalna ekstrakcija jedna je od najnaprednijih metoda ekstrakcije koja je postala popularna za izdvajanje bioaktivnih komponenti iz biljnih preparata. U usporedbi sa konvencionalnim metodama ekstrakcije, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima traje znatno kraće vrijeme što pridonosi očuvanju kvalitete ekstrakta (Routray i Orsat, 2012).

#### **4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE DOBIVENIH POSTUPKOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA**

U okviru ovoga rada analizirana je učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz industrijske konoplje pod utjecajem zadanog omjera tekuće i krute faze, udjela etanola, temperature, vremena i snage mikrovalova. Prema planu eksperimenta provedeno je 46 pokusa sa različitim zadanim uvjetima, a dobivenim ekstraktima određivala su se fizikalna svojstva (pH, ukupna otopljena tvar, vodljivost i suha tvar) te kemijska (ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost metodom DPPH i FRAP). Rezultati su prikazani u tablici 2. Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata (tablica 2) može se uočiti da je najniža pH vrijednost ekstrakta u provedenom eksperimentu broj 4 ( $L/S = 50 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 50 \%$ ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t = 25 \text{ min}$ ,  $P = 600 \text{ W}$ ), a najviša u provedenom eksperimentu broj 15 ( $L/S = 10 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 25 \%$ ,  $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t = 25 \text{ min}$ ,  $P = 600 \text{ W}$ ). U usporedbi sa pH vrijednosti ukupna otopljena tvar ekstrakta značajno varira od uzorka do uzorka pri čemu je najniža vrijednost uočena u eksperimentu broj 4 ( $L/S=50 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=50 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=25 \text{ min}$ ,  $P=600 \text{ W}$ ), dok je najviša u ekstraktu provedenom eksperimentu broja 1 ( $L/S=10 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=0 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=25 \text{ min}$ ,  $P=600 \text{ W}$ ). Analizom tablice 2. vidljivo je da je vodljivost najniža u ekstraktu pri provedenim procesnim uvjetima eksperimenta 10 ( $L/S=30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=50 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=25 \text{ min}$ ,  $P=400 \text{ W}$ ), a najviša u eksperimentu broj 1 ( $L/S=10 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=0 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=25 \text{ min}$ ,  $P=600 \text{ W}$ ).

**Tablica 2.** Fizikalne karakteristike ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije

Eksp.	<i>L/S</i> (mL g <sup>-1</sup> )	<i>v/v</i> (%)	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	<i>Snaga</i> (W)	<i>pH/-</i>	<i>TDS</i> (mgL <sup>-1</sup> )	<i>G</i> (μScm <sup>-1</sup> )	% <i>suhe</i> <i>tvare</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Hue</i>	<i>Chroma</i>
1	10	0	45	25	600	7,25	1405,0	2810	1,122	39,14	-0,34	2,17	-1,415	2,196
2	50	0	45	25	600	7,32	537,0	1074	0,290	39,31	-0,27	2,23	-1,450	2,246
3	10	50	45	25	600	6,91	402,0	805	1,144	39,29	-0,31	2,20	-1,431	2,222
4	50	50	45	25	600	6,20	88,1	176,2	0,277	39,42	-0,17	2,37	-1,499	2,376
5	30	25	30	5	600	6,90	202,0	404	0,204	39,23	-0,16	2,40	-1,504	2,405
6	30	25	60	5	600	7,58	413,0	824	0,142	39,11	-0,32	2,13	-1,422	2,154
7	30	25	30	45	600	7,38	504,0	1007	0,523	39,16	-0,32	2,21	-1,427	2,233
8	30	25	60	45	600	7,83	627,0	1254	0,808	39,09	-0,34	2,10	-1,410	2,127
9	30	0	45	25	400	7,05	473,0	950	0,287	39,08	-0,22	2,19	-1,471	2,201
10	30	50	45	25	400	6,31	127,5	255	0,237	39,27	-0,26	2,22	-1,454	2,235
11	30	0	45	25	800	6,82	467,0	935	0,249	39,59	-0,18	2,27	-1,492	2,277
12	30	50	45	25	800	6,33	163,3	327	0,293	39,24	-0,26	2,30	-1,458	2,315
13	10	25	30	25	600	6,94	539,0	1089	0,508	39,17	-0,23	2,23	-1,468	2,242
14	50	25	30	25	600	7,60	206,0	417	0,125	39,29	-0,26	2,22	-1,454	2,235
15	10	25	60	25	600	8,14	1339,0	2640	1,425	39,10	-0,37	2,40	-1,418	2,428
16	50	25	60	25	600	7,55	405,0	823	0,441	39,10	-0,33	2,25	-1,425	2,274
17	30	25	45	5	400	6,94	254,0	521	0,311	39,24	-0,14	2,18	-1,507	2,184
18	30	25	45	45	400	7,51	541,0	1082	0,584	39,12	-0,29	2,35	-1,448	2,368
19	30	25	45	5	800	7,01	285,0	578	0,305	39,12	-0,23	2,13	-1,463	2,142
20	30	25	45	45	800	7,43	475,0	1015	0,586	39,37	-0,31	2,21	-1,431	2,232
21	30	25	45	25	600	6,99	433,0	862	0,362	40,57	-0,23	2,16	-1,465	2,172
22	30	25	45	25	600	6,57	444,0	890	0,382	39,09	-0,28	2,05	-1,435	2,069
23	30	25	45	25	600	7,02	465,0	917	0,330	39,68	-0,14	2,22	-1,508	2,224
24	30	0	30	25	600	7,21	583,0	1272	0,305	40,79	-0,22	2,59	-1,486	2,599
25	30	50	30	25	600	6,62	153,3	309	0,287	39,14	-0,22	1,96	-1,459	1,972
26	30	0	60	25	600	8,12	990,0	1967	0,532	39,06	-0,32	2,27	-1,431	2,292
27	30	50	60	25	600	7,34	227,0	453	0,308	39,06	-0,35	2,21	-1,414	2,238
28	10	25	45	5	600	7,09	660,0	1322	0,527	39,01	-0,32	2,12	-1,421	2,144
29	50	25	45	5	600	7,05	182,9	363	0,171	39,16	-0,19	2,15	-1,483	2,158
30	10	25	45	45	600	7,48	768,0	1557	0,985	39,19	-0,34	2,36	-1,428	2,384
31	50	25	45	45	600	7,37	251,0	502	0,236	39,59	-0,15	2,17	-1,502	2,175
32	30	25	30	25	400	7,02	318,0	630	0,291	39,25	-0,24	2,42	-1,472	2,432
33	30	25	60	25	400	7,92	443,0	896	0,488	39,11	-0,34	2,31	-1,425	2,335
34	30	25	30	25	800	7,02	323,0	657	0,276	39,55	-0,26	2,19	-1,453	2,205
35	30	25	60	25	800	8,03	518,0	1029	0,598	39,40	-0,36	2,33	-1,418	2,358
36	10	25	45	25	400	7,33	720,0	1434	0,965	39,48	-0,35	2,11	-1,406	2,139
37	50	25	45	25	400	7,28	310,0	618	0,258	39,62	-0,14	2,17	-1,506	2,175
38	10	25	45	25	800	7,23	778,0	1549	1,166	39,61	-0,33	2,52	-1,441	2,542
39	50	25	45	25	800	6,83	207,0	417	0,120	39,69	-0,22	2,16	-1,469	2,171
40	30	0	45	5	600	7,03	532,0	1097	0,234	39,58	-0,17	2,42	-1,501	2,426
41	30	50	45	5	600	6,44	132,7	264	0,245	39,55	-0,26	2,48	-1,466	2,494
42	30	0	45	45	600	7,13	599,0	1198	0,356	39,44	-0,32	2,38	-1,437	2,401
43	30	50	45	45	600	7,08	145,3	291	0,359	39,70	-0,34	2,21	-1,418	2,236
44	30	25	45	25	600	6,88	414,0	830	0,451	39,54	-0,26	2,25	-1,456	2,265
45	30	25	45	25	600	7,31	388,0	756	0,374	39,47	-0,29	2,42	-1,452	2,437
46	30	25	45	25	600	7,28	389,0	761	0,528	39,44	-0,29	2,27	-1,444	2,288

**Tablica 3.** Osnovna statistička analiza fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije

	<i>pH</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	% suhe tvari	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>Hue</i>	<i>Chroma</i>	<i>UF</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
srednja vrijednost	7,166	452,763	909,287	0,456	39,374	-0,266	2,253	-1,453	2,270	17,713	0,199	0,075
minimum	6,200	88,100	176,200	0,119	39,010	-0,370	1,960	-1,507	1,972	5,645	0,051	0,017
maksimum	8,140	1405,00	2810,00	1,425	40,790	-0,140	2,590	-1,406	2,599	35,514	0,385	0,138
standardna devijacija	0,445	279,023	556,581	0,305	0,349	0,067	0,127	0,030	0,126	6,8951	0,083	0,033

Prema tablici 3. možemo uočiti da udio suhe tvari u pripremljenim ekstraktima varira oko 0,456, dok najmanji udio iznosi 0,119, a najveći 1,425. Ekstrahirana količina ukupnih polifenola kreće se oko  $UF = 17,713 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t}}^{-1}$ , dok je maksimalna vrijednost ekstrahiranih ukupnih polifenola  $UF = 35,514 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t}}^{-1}$ .

Utjecaj omjera tekuće i krute faze, udjela etanola, temperature, vremena i snage mikrovalova na ekstrakciju ukupnih ekstrahiranih polifenola te na antioksidacijsku aktivnost prikazana je u tablici 4. Promatrajući eksperiment broj 29 ( $L/S=50 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=25 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=5 \text{ min}$ ,  $P=600 \text{ W}$ ) vidljivo je da je iz tog uzorka ekstrahirana najveća količina polifenola te ona iznosi  $UF = 35,514 \pm 1,289 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t}}^{-1}$ . U usporedbi s njime u eksperimentu 1 ( $L/S=10 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=0 \%$ ,  $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t=25 \text{ min}$ ,  $P=600 \text{ W}$ ) određena je količina polifenola u vrijednosti  $UF = 5,645 \pm 0,515 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t}}^{-1}$  što je 6,3 puta manje u odnosu na eksperiment broj 29. Budući da prethodno navedeni eksperimenti provedeni pri istim temperatura i istim snagama mikrovalova, a pri različitim omjerima tekuće i krute faze i pri različitim udjelima etanola, može se zaključiti da viši omjer tekuće prema krutoj fazi i viši udio etanola u otapalu za ekstrakciju imaju za posljedicu veću količinu ekstrahiranih polifenola. Određivanje antioksidacijske aktivnosti temeljilo se na DPPH i FRAP metodi. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerena DPPH metodom iznosi kod eksperimenta broj 29 ( $L/S= 50 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v= 25 \%$ ,  $T= 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t= 5 \text{ min}$ ,  $P= 600 \text{ W}$ ) te iznosi  $DPPH = 0,385 \pm 0,004 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{st}}^{-1}$ , dok je najniža vrijednost primijećena kod eksperimenta broj 13 ( $L/S= 10 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v= 25 \%$ ,  $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t= 25 \text{ min}$ ,  $P= 600 \text{ W}$ ) te iznosi  $DPPH = 0,051 \pm 0,001 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{st}}^{-1}$ . Najviša antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom izmjerena je u ekstraktu koji je pripremljen prema procesnim uvjetima eksperimenta broj 8 ( $L/S= 30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v= 25 \%$ ,  $T= 60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t= 45 \text{ min}$ ,  $P= 600 \text{ W}$ ), a iznosi  $FRAP = 0,138 \pm 0,003 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{st}}^{-1}$ . S druge strane najniža je vrijednost izmjerena u ekstraktu eksperimenta broja 9 ( $L/S= 30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v=$

0 %,  $T= 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 25\text{ min}$ ,  $P= 400\text{ W}$ ), a antioksidacijska aktivnost iznosi  $FRAP = 0,017\pm 0,003\text{ mmol}_{\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}}\text{ g}_{\text{st}}^{-1}$ . Navedeni rezultati pokazuju da primijenjene metode mjerenja uzrokuju različitu antioksidacijsku aktivnost kod ekstrakata.

Prema istraživanju Dragović-Uzelac i suradnika (2012) koji su proveli ekstrakciju polifenola iz kadulje optimalni uvjeti za ekstrakciju su snaga 500 W, vrijeme ekstrakcije od 9 minuta te otapalo polarnosti 30 % (etanol i aceton). Navedene vrijednosti uglavnom odgovaraju rezultatima provedene studije.

Također, Simić i suradnici (2015) u svom radu ispitali su optimalne uvjete ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju polifenola iz aronije. Varirana je snaga (300 W, 450 W i 600 W), polarnost otapala etanola (25 %, 50 % i 75 %) te vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta). Određena je koncentracija ukupnih fenola u uzorcima te su statistički dobivene optimalne vrijednosti: snaga od 300 W, polarnost otapala 53,6 % i 5 minuta ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije odgovara rezultatima ovog rada, međutim snaga mikrovalova te polarnost otapala pokazuju značajno odstupanje. Razlika u rezultatima može se pripisati različitoj konzistenciji i tkivu materijala koji je korišten za ekstrakciju.

Li i Jiang (2010) u svome radu proveli su ekstrakciju polifenola potpomognutu mikrovalovima iz zelenog čaja. Pratili su utjecaj četiri faktora na ekstrakciju polifenola, odnosno vrijeme tretiranja mikrovalovima, snagu mikrovalova, broj ciklusa zračenja te omjer biljnog materijala i vode. Rezultati su pokazali da su optimalni uvjeti ekstrakcije snaga mikrovalova 600 W, vrijeme tretiranja 3 minute, jedan ciklus zračenja te omjer biljnog materijala i vode 1:20. Osim toga, zaključili su da duže vrijeme tretiranja i veća snaga mikrovalova uzrokuje bolju ekstrakciju polifenola. Rezultati ove studije slažu se sa dobivenim rezultatima ovog rada.

Cao i suradnici (2016) ispitali su optimalne uvjete ekstrakcije ukupnih flavonoida iz lišća konoplje te procjenu njihove antioksidativne aktivnosti. Ispitan je utjecaj svakog parametra zasebno (koncentracija etanola, omjer tekuće i čvrste tvari, vrijeme ekstrakcije, temperatura) na prinos ukupnih flavonoida. Najprije je ispitan utjecaj koncentracije etanola (40, 50, 60, 70 i 80 %) na ekstrakcijski prinos ukupnih flavonoida iz lišća konoplje, pri omjeru tekućine i materijala 30:1 ( $\text{mL g}^{-1}$ ), vremenu ekstrakcije od  $t = 20\text{ min}$  i  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Najveća koncentracija ekstrahirana je pri otapalu polarnosti 70 %. Prilikom ispitivanja različitog omjera tekućine u materijalu (20: 1, 25: 1, 30: 1, 35: 1 i 40: 1) na prinos ekstrakcije, omjer koji je izazvao najveće prinos bio je 35:1  $\text{mL g}^{-1}$ . Ekstrakcija se provodila na 5, 10, 20, 30 i 40 minuta, prinos ukupnih flavonoida znatno je porastao povećanjem vremena ekstrakcije s 5 na 20 minuta

nakon čega je prinos smanjen. Utjecaj temperature na ekstrakciju pratio se tretiranjem uzorka na 40, 50, 60, 70 i 80 °C. Porastom temperature do  $T = 60$  °C uočen je nagli prinos flavonoida, nakon čega nema značajnijeg porasta. Na temelju eksperimenta pojedinačnog parametra i RSM analize, dobiveni su optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih flavonoida: koncentracija etanola od 69,15 %, omjer otapalo / čvrsta tvar 31,69 mL g<sup>-1</sup>, vrijeme ekstrakcije  $t = 25,14$  min i temperatura ekstrakcije  $T = 69,96$  °C. U tim uvjetima, maksimalni prinos UF bio je  $3,04 \pm 0,62\%$ .

**Tablica 4.** Kemijske karakteristike ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Eksp.	L/S (mL g <sup>-1</sup> )	v/v (%)	T (°C)	t (min)	P (W)	UF/mg <sub>GAE</sub> g <sub>St</sub> <sup>-1</sup>	DPPH/mmol <sub>Trolox</sub> g <sub>St</sub> <sup>-1</sup>	FRAP/mmol <sub>FeSO4·7H2O</sub> g <sub>St</sub> <sup>-1</sup>
1	10	0	45	25	600	5,646±0,515	0,060±0,002	0,043±0,005
2	50	0	45	25	600	10,017±1,288	0,234±0,001	0,106±0,009
3	10	50	45	25	600	11,838±0,515	0,080±0,001	0,081±0,002
4	50	50	45	25	600	26,863±7,083	0,269±0,015	0,063±0,017
5	30	25	30	5	600	9,288±1,545	0,157±0,011	0,106±0,021
6	30	25	60	5	600	30,870±2,704	0,172±0,003	0,128±0,003
7	30	25	30	45	600	9,835±1,545	0,146±0,0100	0,069±0,001
8	30	25	60	45	600	21,582±1,159	0,173±0,005	0,138±0,003
9	30	0	45	25	400	10,108±1,159	0,132±0,005	0,017±0,003
10	30	50	45	25	400	19,943±1,159	0,166±0,009	0,070±0,010
11	30	0	45	25	800	16,664±1,932	0,143±0,008	0,028±0,003
12	30	50	45	25	800	13,932±0,386	0,166±0,005	0,094±0,002
13	10	25	30	25	600	6,192±1,288	0,051±0,001	0,022±0,001
14	50	25	30	25	600	17,757±0,644	0,221±0,001	0,045±0,005
15	10	25	60	25	600	14,843±0,386	0,077±0,001	0,119±0,002
16	50	25	60	25	600	27,319±5,151	0,381±0,023	0,136±0,005
17	30	25	45	5	400	13,386±1,159	0,158±0,009	0,032±0,005
18	30	25	45	45	400	24,040±0,773	0,180±0,015	0,093±0,006
19	30	25	45	5	800	12,020±2,318	0,168±0,006	0,058±0,003
20	30	25	45	45	800	27,865±1,545	0,176±0,005	0,108±0,014
21	30	25	45	25	600	19,396±5,022	0,228±0,004	0,056±0,002
22	30	25	45	25	600	19,123±0,773	0,219±0,009	0,051±0,006
23	30	25	45	25	600	19,396±0,386	0,209±0,002	0,036±0,008
24	30	0	30	25	600	19,943±0,386	0,201±0,005	0,032±0,001
25	30	50	30	25	600	21,308±1,545	0,218±0,006	0,095±0,003
26	30	0	60	25	600	19,943±0,386	0,240±0,004	0,083±0,001
27	30	50	60	25	600	22,401±1,545	0,263±0,002	0,128±0,016
28	10	25	45	5	600	14,843±3,735	0,095±0,001	0,059±0,002
29	50	25	45	5	600	35,514±1,289	0,385±0,004	0,110±0,034
30	10	25	45	45	600	8,287±0,386	0,092±0,001	0,062±0,002
31	50	25	45	45	600	18,668±0,644	0,368±0,005	0,074±0,004
32	30	25	30	25	400	25,679±1,545	0,222±0,002	0,054±0,005
33	30	25	60	25	400	15,025±1,159	0,249±0,005	0,114±0,014
34	30	25	30	25	800	7,103±0,773	0,218±0,007	0,034±0,016
35	30	25	60	25	800	24,587±0,773	0,263±0,001	0,132±0,002
36	10	25	45	25	400	18,140±0,618	0,101±0,001	0,067±0,003
37	50	25	45	25	400	28,229±6,439	0,365±0,003	0,052±0,001
38	10	25	45	25	800	11,201±1,674	0,101±0,002	0,074±0,001
39	50	25	45	25	800	17,757±3,220	0,367±0,023	0,080±0,004
40	30	0	45	5	600	10,654±1,159	0,217±0,003	0,029±0,003
41	30	50	45	5	600	18,303±1,159	0,233±0,001	0,050±0,001
42	30	0	45	45	600	12,567±0,773	0,205±0,011	0,071±0,001
43	30	50	45	45	600	21,855±2,318	0,247±0,002	0,105±0,006
44	30	25	45	25	600	18,850±0,386	0,242±0,007	0,083±0,005
45	30	25	45	25	600	13,386±1,932	0,174±0,076	0,070±0,001
46	30	25	45	25	600	22,674±0,386	0,135 ± 0,002	0,085±0,005

Radi lakšeg razmatranja povezanosti fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određena je korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika. U tablici 5 prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije između pH, TDS, vodljivosti, postotka ekstrahirane suhe tvari, koncentracije ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom te antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Zanimljivo je uočiti da je vodljivost pozitivno korelirala sa svim fizikalnim karakteristikama, a negativno sa svim kemijskim karakteristikama. Pozitivnu korelaciju sa svim fizikalnim i kemijskim karakteristikama, izuzev antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom, možemo uočiti kod pH. Ukupna otopljena tvar i postotak ekstrahirane suhe tvari pozitivno su korelirali sa svim fizikalnim karakteristikama te sa antioksidacijskom aktivnosti koja je mjerena FRAP metodom, dok su negativno korelirali sa ukupnim polifenolima i antioksidacijskom aktivnosti mjenom DPPH metodom. Ukupni polifenoli pozitivno su korelirali sa svim kemijskim karakteristikama, a negativno sa svim fizikalnim karakteristikama izuzev pH. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom negativno je korelirala sa svim fizikalnim karakteristikama, a pozitivno sa svim kemijskim karakteristikama. S druge strane, antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom pozitivno je korelirala sa svim kemijskim i fizikalnim karakteristikama, osim sa vodljivosti gdje je uočena negativnost. U tablici 5. svi statistički signifikantni koeficijenti korelacije su podebljani.

**Tablica 5.** Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

	<i>pH</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	<i>% suhe tvari</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>Hue</i>	<i>Chroma</i>	<i>UF</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
<i>pH</i>	1,000	0,564	0,562	0,411	-0,176	-0,529	0,072	0,493	0,105	0,087	-0,008	0,440
<i>TDS</i>	<b>0,564</b>	1,000	0,999	0,763	-0,114	-0,494	0,072	0,453	0,176	-0,339	-0,507	0,017
<i>G</i>	<b>0,562</b>	<b>0,999</b>	1,000	0,758	-0,098	-0,490	0,154	0,447	0,018	-0,339	-0,507	-0,025
<i>%suhe tvari</i>	<b>0,411</b>	<b>0,763</b>	<b>0,758</b>	1,000	-0,175	-0,602	0,123	0,569	0,161	-0,286	-0,588	0,169
<i>L</i>	-0,176	-0,114	-0,098	-0,175	1,000	0,311	0,332	-0,367	0,311	0,056	0,189	-0,328
<i>a</i>	<b>-0,529</b>	<b>-0,494</b>	<b>-0,490</b>	<b>-0,612</b>	<b>0,311</b>	1,000	-0,031	-0,976	-0,090	0,051	0,328	-0,520
<i>b</i>	0,072	0,145	0,154	0,123	<b>0,332</b>	-0,031	1,000	-0,177	0,998	-0,144	-0,106	-0,097
<i>Hue</i>	<b>0,493</b>	<b>0,453</b>	<b>0,447</b>	<b>0,569</b>	<b>-0,367</b>	<b>-0,976</b>	-0,177	1,000	-0,118	-0,019	-0,309	0,527
<i>Chroma</i>	0,105	0,176	0,018	0,161	<b>0,311</b>	-0,090	<b>0,998</b>	-0,118	1,000	-0,145	-0,125	-0,064
<i>UF</i>	0,087	<b>-0,339</b>	<b>-0,339</b>	-0,286	0,056	0,051	-0,144	-0,019	-0,145	1,000	0,591	0,454
<i>DPPH</i>	-0,008	<b>-0,507</b>	<b>-0,507</b>	<b>-0,588</b>	0,189	<b>0,328</b>	-0,106	<b>-0,309</b>	-0,125	<b>0,591</b>	1,000	0,271
<i>FRAP</i>	<b>0,440</b>	0,017	-0,025	0,169	<b>-0,328</b>	<b>-0,520</b>	-0,097	<b>0,527</b>	-0,064	<b>0,454</b>	0,271	1,000



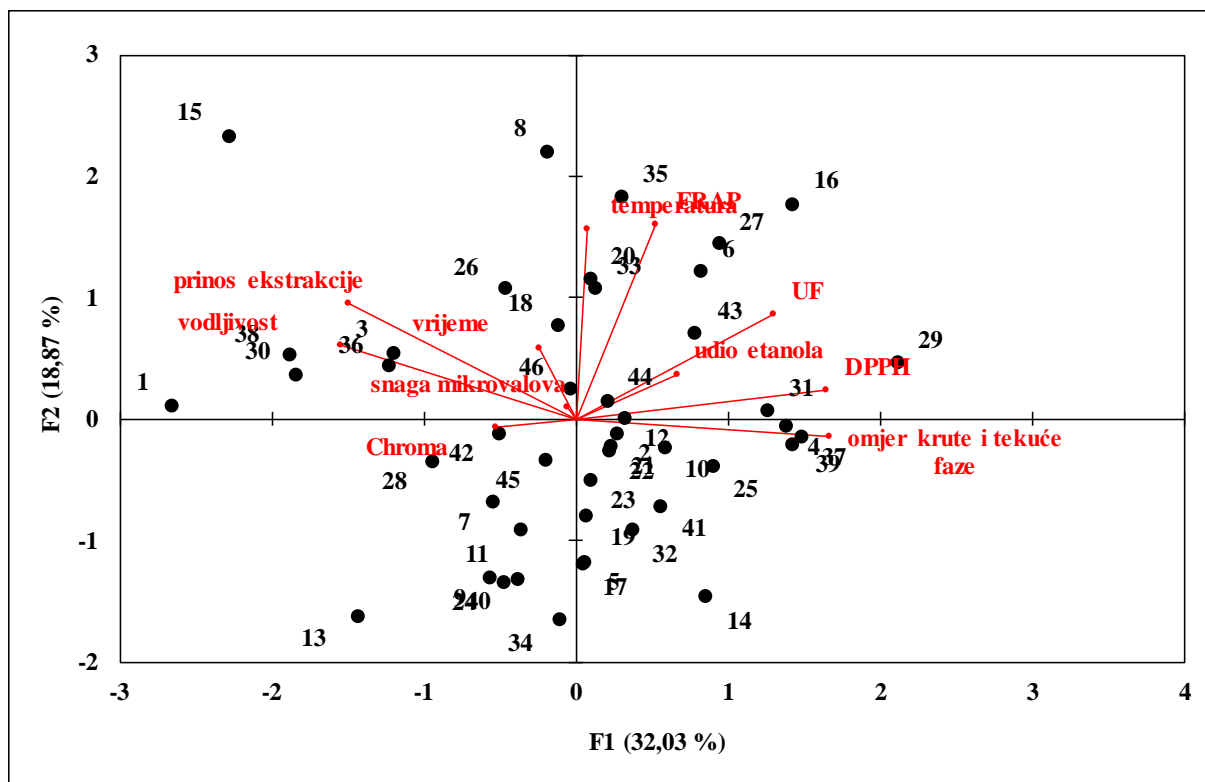
Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u procesu ekstrakcije potpomognute mikrovalovima primijenjena je multivarijatna analiza varijance (MANOVA). Analizom rezultata prikazanih u tablici 6 može se uočiti da na vodljivost te prinos ekstrakcije utječu omjer krute i tekuće faze, udio etanola te temperatura ekstrakcije dok na boju izraženu preko veličine Chroma nije uočen utjecaj. Može se također uočiti značajan utjecaj navedenih ulaznih varijabli (omjer krute i tekuće faze, udio etanola, temperatura ekstrakcije) na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola i na antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom, dok je za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom uočen samo utjecaj omjera krute i tekuće faze.

Analiza osnovnih komponenata (PCA) upotrijebljena je kako bi se analiziralo grupiranje ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na temelju njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava (slika 7). Iz rezultata se može vidjeti da prva dva faktora opisuju 50,9 % varijance. Može se također uočiti da su se uzorci ekstrakata na temelju fizikalnih i kemijskih svojstava rasporedili u sva četiri kvadranta bez značajnog profila. Može se također analizirati veza između pojedine ulazne varijable (uvjeta ekstrakcije) i dobivenih fizikalno-kemijskih svojstava na temelju relativne udaljenosti na PCA grafu. Rezultati PCA analiza mogu se jednostavno povezati s koeficijentima korelacije. Vidljivo je da na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom i na ukupnu količinu ekstrahiranih polifenola značajno utječe promjena omjera tekuće i krute faze, udio etanola i temperatura ekstrakcije, dok na antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom značajno utječe samo promjena omjera tekuće i krute faze. Ulazne varijable nisu pokazale značajan utjecaj na boju izraženu preko veličine Chroma.

**Tablica 6.** Multivarijatna analiza varijance (MANOVA)

Varijacije parametara		<i>S</i>	<i>EY</i>	<i>Chroma</i>	<i>UF</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
<i>L/s</i>	10	1650,750 <sup>a</sup>	0,980 <sup>a</sup>	2,287 <sup>a</sup>	11,374 <sup>a</sup>	0,082 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>
	30	807,700 <sup>b</sup>	0,374 <sup>b</sup>	2,277 <sup>a</sup>	18,058 <sup>b</sup>	0,197 <sup>b</sup>	0,075 <sup>a</sup>
	50	548,775 <sup>c</sup>	0,249 <sup>c</sup>	2,226 <sup>a</sup>	22,765 <sup>b</sup>	0,323 <sup>b</sup>	0,083 <sup>a</sup>
<i>v/v</i>	0	1412,875 <sup>a</sup>	0,421 <sup>a</sup>	2,330 <sup>a</sup>	13,193 <sup>a</sup>	0,187 <sup>a</sup>	0,051 <sup>a</sup>
	25	921,467 <sup>a</sup>	0,482 <sup>a</sup>	2,256 <sup>a</sup>	18,428 <sup>b</sup>	0,203 <sup>a</sup>	0,078 <sup>b</sup>
	50	360,025 <sup>b</sup>	0,394 <sup>a</sup>	2,261 <sup>a</sup>	19,555 <sup>b</sup>	0,205 <sup>a</sup>	0,085 <sup>b</sup>
<i>T</i>	30	723,125 <sup>a</sup>	0,315 <sup>a</sup>	2,291 <sup>a</sup>	14,638 <sup>a</sup>	0,179 <sup>a</sup>	0,057 <sup>a</sup>
	45	871,873 <sup>b</sup>	0,457 <sup>b</sup>	2,263 <sup>a</sup>	17,372 <sup>b</sup>	0,197 <sup>a</sup>	0,067 <sup>b</sup>
	60	1235,750 <sup>a</sup>	0,592 <sup>b</sup>	2,275 <sup>a</sup>	22,071 <sup>b</sup>	0,227 <sup>a</sup>	0,122 <sup>c</sup>
<i>t</i>	5	671,625 <sup>a</sup>	0,267 <sup>a</sup>	2,263 <sup>a</sup>	18,109 <sup>a</sup>	0,198 <sup>a</sup>	0,071 <sup>a</sup>
	25	951,607 <sup>b</sup>	0,481 <sup>b</sup>	2,272 <sup>a</sup>	17,508 <sup>a</sup>	0,199 <sup>a</sup>	0,071 <sup>a</sup>
	45	988,250 <sup>b</sup>	0,555 <sup>b</sup>	2,269 <sup>a</sup>	18,087 <sup>a</sup>	0,198 <sup>a</sup>	0,089 <sup>a</sup>
<i>P</i>	400	798,250 <sup>a</sup>	0,427 <sup>a</sup>	2,258 <sup>a</sup>	19,318 <sup>a</sup>	0,196 <sup>a</sup>	0,062 <sup>a</sup>
	600	964,473 <sup>a</sup>	0,465 <sup>a</sup>	2,270 <sup>a</sup>	17,638 <sup>a</sup>	0,199 <sup>a</sup>	0,077 <sup>a</sup>
	800	813,375 <sup>a</sup>	0,448 <sup>a</sup>	2,280 <sup>a</sup>	16,391 <sup>a</sup>	0,200 <sup>a</sup>	0,759 <sup>a</sup>

\*različita slova u istom stupcu upućuju na značajno različitu vrijednost promatranog parametra ovisno o promatranim promjenama parametara



Slika 7. Analiza osnovnih komponenta i promatranih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenta iz industrijske konoplje postupkom mikrovalovima potpomognutom ekstrakcijom

#### 4.2. OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA IZ INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Cilj korištenja metode odzivnih površina bio je definirati optimalne uvjete ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz industrijske konoplje potpomognutom mikrovalovima. Analiziran je utjecaj pet varijabli (omjer tekuće i krute faze, polarnost, temperatura, vrijeme i snaga mikrovalova) na tri razine (omjer tekuće i krute faze  $L/S = 10, 30, 50 \text{ mL g}^{-1}$ , udio etanola  $v/v = 0, 25, 50 \%$ , temperatura  $T = 30, 45, 60 \text{ }^\circ\text{C}$ , vrijeme  $t = 5, 25, 45 \text{ min}$ , snaga mikrovalova  $P = 400, 600, 800 \text{ W}$ ) na koncentraciju ukupnih polifenola te antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom.

Polinomi drugog stupnja s interakcijskim članovima upotrijebljeni su za opis eksperimentalnih podataka. Za predložene modele dobiveno je slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom predviđene vrijednosti u iznosu od  $R^2(\text{UF}) = 0,621$ ,  $R^2(\text{DPPH}) = 0,800$  i  $R^2(\text{FRAP}) = 0,725$ . Prema Le Man i sur. (2010) model se može smatrati primjenjivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između eksperimentalnih

vrijednosti i modelom previđenih vrijednosti prelazi 0,75. Na temelju te pretpostavke može se zaključiti daje razvijeni model odzivne površine primjenjiv za opis antioksidacijske aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje određene DPPH metodom, dok razvijeni modeli odzivnih površina za koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi zahtijevaju poboljšanje. Prema tablici 7 vidljivo je da linearni članovi omjera tekuće i krute faze ( $X_1$ ), udio etanola ( $X_2$ ) i temperatura ( $X_3$ ) te interakcijski članovi temperature ( $X_3$ ) i snage ( $X_5$ ) su vrlo značajni na utjecaj ukupnih polifenola na razini  $p < 0,05$ , dok ostali parametri (vrijeme ekstrakcije i snaga mikrovalova) nisu značajni ( $p > 0,05$ ). U slučaju DPPH jedino se linearni parametar omjera tekuće i krute faze ( $X_1$ ) pokazao kao signifikantan na razini  $p < 0,001$ , dok ostali parametri nisu signifikantni. Stupanj značajnosti pokazao je da linearni članovi udjela etanola ( $X_2$ ) i temperature ( $X_3$ ) imaju značajan utjecaj na FRAP, za razliku od ostalih parametara koji su se pokazali kao beznačajni. Također analiza varijance modela (ANOVA) je pokazala da su sva tri razvijena modela signifikantna (za  $p < 0,05$ ) (tablica 8). Prema Teng i sur. (2011) za svaki parametar modela, visoka vrijednost koeficijenta determinacije i mala  $p$ -vrijednost bi značile signifikantan utjecaj analizirane varijable. Statistička analiza je također pokazala da je odstupanje modela (eng. *lack of fit*) nije signifikantno ( $p > 0,05$ ) te da su  $F$ -vrijednost za modela visoke ( $F$  (UF) = 2,048,  $F$  (DPPH) = 5,005,  $F$  (UF) = 3,306). Dobiveni rezultati indiciraju pouzdanost razvijenog modela odzivne površine za analizirani raspon ulaznih varijabli.

**Tablica 7.** Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije

Parameter	UF			DPPH			FRAP		
	vrijednost	standardana pogreška	p-vrijednost	vrijednost	standardana pogreška	p-vrijednost	vrijednost	standardana pogreška	p-vrijednost
Linerani članovi									
$X_1 (L/S)$	16,714	2,157	<0,001	0,241	0,025	<0,001	0,017	0,012	0,144
$X_2 (v/v)$	6,363	2,847	0,035	0,026	0,025	0,302	0,034	0,012	0,006
$X_3 (T)$	7,433	2,847	0,015	0,047	0,025	0,067	0,064	0,012	<0,001
$X_4 (t)$	-0,022	2,847	0,993	0,001	0,025	0,986	0,018	0,012	0,127
$X_5 (P)$	-2,927	2,847	0,313	0,003	0,025	0,889	0,013	0,012	0,258
Kvadratni članovi									
$X_1^2$	1,268	1,927	0,516	-0,004	0,017	0,817	-0,004	0,008	0,627
$X_2^2$	2,195	1,927	0,265	0,010	0,017	0,551	0,004	0,008	0,594
$X_3^2$	-0,445	1,927	0,819	-0,004	0,017	0,788	-0,024	0,008	0,005
$X_4^2$	-0,104	1,927	0,957	0,002	0,017	0,907	-0,012	0,008	0,134
$X_5^2$	0,221	1,927	0,909	0,002	0,017	0,922	0,003	0,008	0,689
Interakcijski članovi									
$X_1X_2$	5,327	5,694	0,358	0,007	0,050	0,884	-0,040	0,023	0,094
$X_1X_3$	0,455	5,694	0,936	0,067	0,050	0,193	-0,003	0,023	0,899
$X_1X_4$	-5,149	5,694	0,374	-0,007	0,050	0,891	-0,019	0,023	0,413
$X_1X_5$	-1,766	5,694	0,758	0,001	0,050	0,983	0,011	0,023	0,654
$X_2X_3$	0,546	5,694	0,924	0,002	0,050	0,954	-0,009	0,023	0,687
$X_2X_4$	0,819	5,694	0,886	0,013	0,050	0,792	0,006	0,023	0,788
$X_2X_5$	-6,286	5,694	0,280	-0,005	0,050	0,913	0,006	0,023	0,775
$X_3X_4$	-4,917	5,694	0,396	0,006	0,050	0,909	0,023	0,023	0,322
$X_3X_5$	14,069	5,694	0,021	0,008	0,050	0,864	0,019	0,023	0,409
$X_4X_5$	2,595	5,694	0,653	-0,007	0,050	0,893	-0,006	0,023	0,801

**Tablica 8.** ANOVA modela odzivnih površina

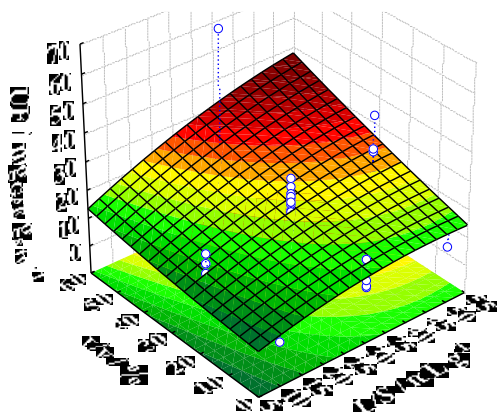
	Izvor varijacije	Suma kvadarta odstupanja	Broj stupnjeva slobode	Srednji kvadrat odstupanja	F-vrijednost	p-vrijednost	R <sup>2</sup>
UF	model	1328,646	20	66,432	2,048	0,045	0,621
	slučajno odstupanje u uzorcima	810,745	25	32,429			
	Ostatak	756,607	20	38,280	4,240	0,058	
	Pogreška	45,138	5	9,027			
	Ukupno	2139,392	45				
DPPH	Model	0,252	20	0,012	5,005	<0,001	0,800
	slučajno odstupanje u uzorcima	0,063	25	0,003			
	Ostatak	0,055	20	0,003	1,741	0,208	
	Pogreška	5	0,001				
	Ukupno	45					
FRAP	Model	0,035	20	0,002	3,306	0,003	0,725
	slučajno odstupanje u uzorcima	0,013	25	0,001			
	ostatak	0,011	20	0,001	1,587	0,321	
	pogreška	0,002	5	0,001			
	ukupno	0,049	45				

Kako bi se ispitao interaktivni utjecaj nezavisnih varijabli te njihova međusobna interakcija na koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidativnu aktivnost mjerenu *DPPH* i *FRAP* metodom prikazani su trodimenzionalni profili odzivne površine (slika 8).

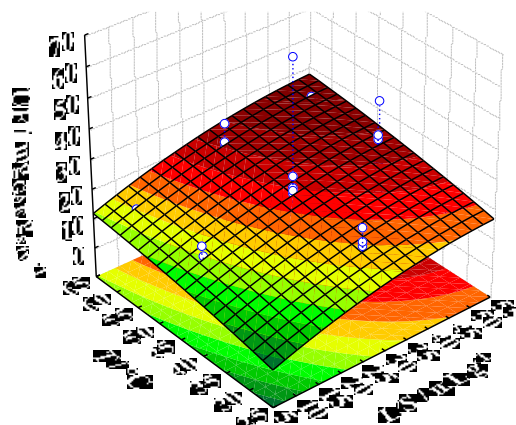
Odnos između zavisnih varijabli (*UF*, *DPPH*, *FRAP*) i nezavisnih varijabli modela (omjer tekuće i krute faze, udio etanola, temperatura, vrijeme i snaga mikrovalova) je prikazan 3D odzivnim površinama na slici 8. Grafovi su konstruirani prikazujući dvije varijable modela u analiziranom rasponu te držeći preostale tri varijable konstantnima. Za grafički prikaz izabrane su varijable koje su se pokazale signifikantne u razvoju modela odzivne površine. Na slici 8a prikazan je utjecaj omjera tekuće i krute faze te udjela etanola na koncentraciju ekstrahiranih polifenola te je vidljivo da porastom omjera krute i tekuće faze te porastom udjela etanola raste koncentracija ekstrahiranih ukupnih polifenola. Iste utjecaj uočen je i za djelovanje temperature ekstrakcije i omjer krute i tekuće faze (slika 8b) te za djelovanje udjela etanola i temperature ekstrakcije (slika 8c) na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih polifenola.

Utjecaj omjera tekuće i krute faze i temperature na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom prikazan je na slici 8d te se može očititi da antioksidacijska aktivnost raste porastom navedenih varijabli. Dok pak kod antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, temperatura ima pozitivan utjecaj, a udio etanola negativan utjecaj (slika 8e).

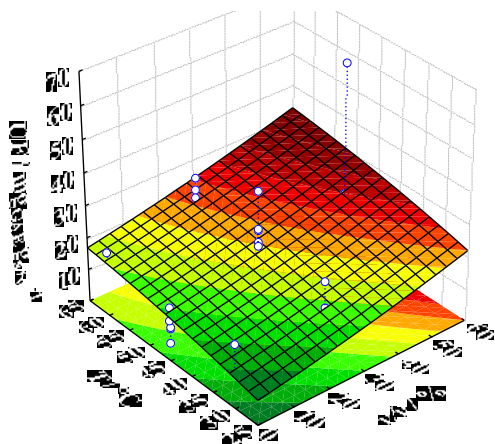
a) utjecaj omjera tekuće i krute faze te udjela etanola na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih polifenola



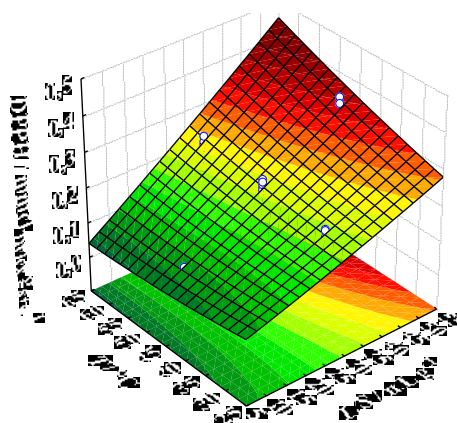
b) utjecaj omjera tekuće i krute faze te temperature ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih polifenola



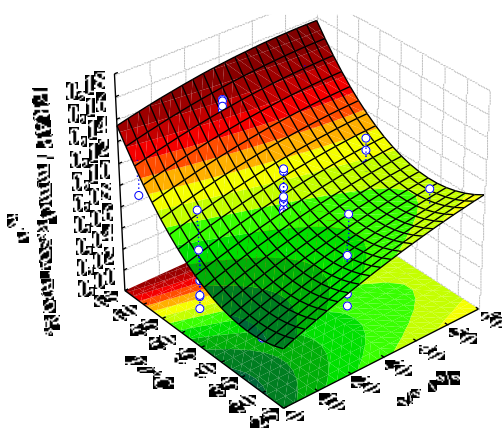
c) utjecaj udjela etanola te temperature ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih polifenola



d) utjecaj omjera tekuće i krute faze te temperature ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom



e) utjecaj udjela etanola te temperature ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost FRAP metodom



Slika 8. Odzivne površine utjecaja signifikantnih varijabli na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene *DPPH* i *FRAP* metodom ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije



Prema polinomnom modelu drugog stupnja omjer tekuće i krute faze, udio etanola, temperatura, vrijeme i snaga mikrovalova određeni su optimalni procesni uvjeti za provođenje procesa mikrovalovima potpomognute ekstrakcije biološki aktivnih molekula iz industrijske konoplje. Kao što je prikazano u tablici 9, optimalni procesni uvjeti su: omjer tekuće i krute faze od  $L/S = 30 \text{ mL g}^{-1}$ , udio etanola od  $v/v = 25 \%$ , temperatura ekstrakcije od  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ , vrijeme ekstrakcija od  $t = 25 \text{ min}$  te snaga mikrovalova od  $P = 600 \text{ W}$ . Pri optimalnim procesnim uvjetima model je validan nezavisnim eksperimentom te je dobivena koncentracija ukupnih polifenola od  $UF = 18,804 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$ , antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom od  $DPPH = 0,201 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$  te antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom od  $FRAP = 0,063 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$  dok model pri istim eksperimentalnim uvjetima previđa  $UF = 26,015 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$ ,  $DPPH = 0,217 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$  i  $FRAP = 0,074 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{st.}}^{-1}$ .

Metodologija odzivnih površina za optimiranje procesa mikrovalovima potpomognute ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje primijenjena je i u radu Teh i sur. (2014) gdje je ispitan utjecaj omjera tekuće i krute faze, vremena djelovanja mikrovalova, snage mikrovalova te djelovanja pulsirajućeg električnog polja na učinkovitost ekstrakcije. Rezultati spomenutog rad pokazuju da integriranje djelovanja mikrovalova i pulsirajućeg električnog polja doprinosi ekstrakciji polifenola i prinosu ekstrakcije iz sjemenki industrijske konoplje.

**Tablica 9.** Usporedba eksperimentom izmjerenih i modelima predviđenih vrijednosti izlaznih varijabli pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima

Izlazna varijabla	$L/S / \text{mL g}^{-1}$	$v/v / \%$	$T / ^\circ\text{C}$	$t / \text{min}$	$P / \text{W}$	model	eksperiment
<i>UF</i>	30	25	45	25	600	26,015	18,804
<i>DPPH</i>	30	25	45	25	600	0,217	0,201
<i>FRAP</i>	30	25	45	25	600	0,774	0,063

U svrhu predikcije udjela ekstrahiranih polifenola te antioksidacijske aktivnosti određena *DPPH* i *FRAP* metodom razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža na temelju uvjeta ekstrakcije kao ulaznih varijabli. U tablici 10 prikazane su arhitekture razvijениh mreža za

simultano predviđanje *UF*, *DPPH* i *FRAP* pripremljenih ekstrakata. Odabrana je mreža MLP 5-6-3 sa skrivenom aktivacijskom funkcijom Logističkom funkcijom i Eksponencijalnom funkcijom kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za izabranu mrežu iznose 0,801, 0,839 odnosno 0,876. Na temelju navedenih koeficijenta determinacije može se zaključiti da je odabrana mreža pouzdana za predviđanje kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje. Na temelju koeficijenata determinacije za pojedinu izlaznu varijablu modela (tablica 11) može se zaključiti za korištena neuronska mreža najbolje opisuje *FRAP*, dok je najveće odstupanje među podacima uočeno za *UF*.

**Tablica 10.** Arhitektura neuronskih mreža za predikciju udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalova potpomognute ekstrakcije

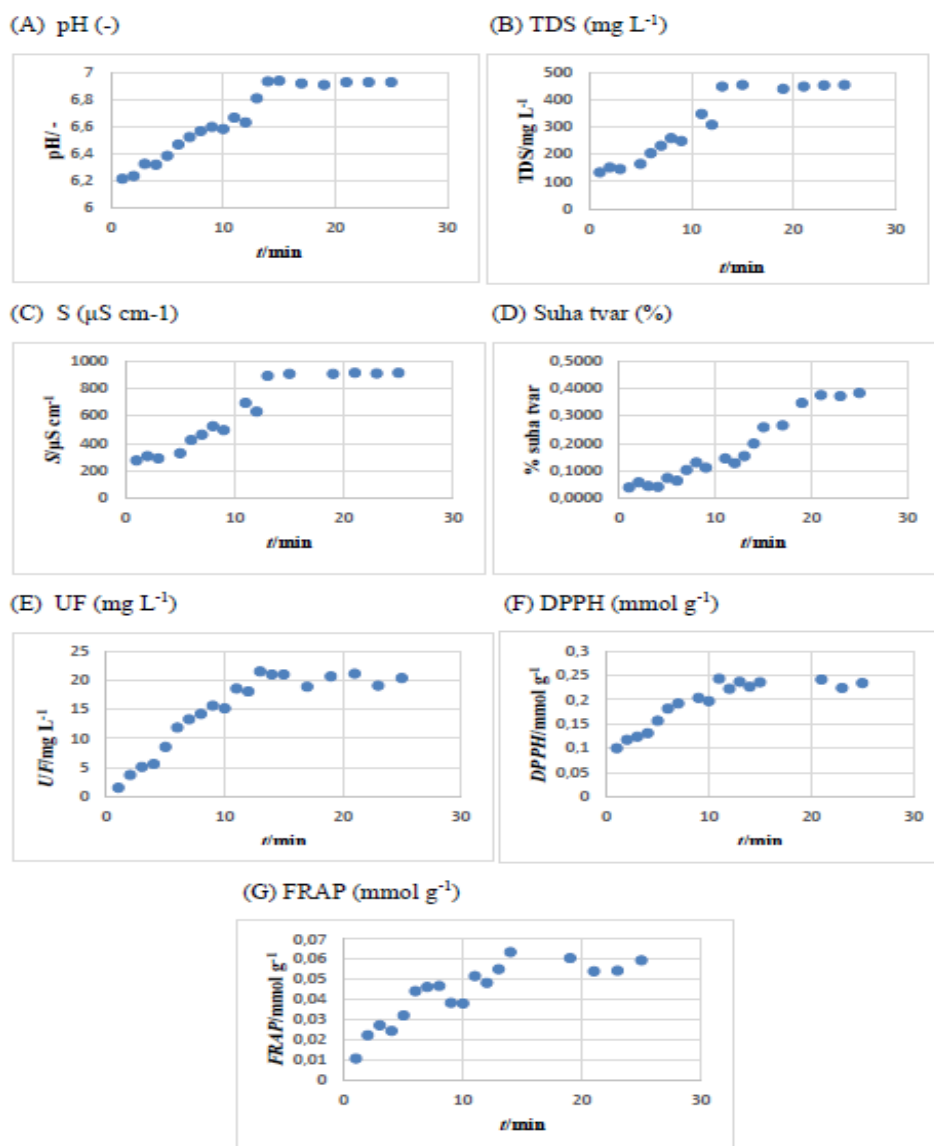
mreža	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
MLP 5-9-3	0,806	0,851	0,866	0,036	0,053	0,047	Logistička funkcija	Eksponencijalna funkcija
MLP 5-4-3	0,826	0,837	0,861	0,033	0,053	0,028	Tanh	Logistička funkcija
MLP 5-8-3	0,805	0,834	0,850	0,036	0,059	0,048	Logistička funkcija	Eksponencijalna funkcija
<b>MLP 5-6-3</b>	<b>0,801</b>	<b>0,839</b>	<b>0,876</b>	<b>0,037</b>	<b>0,057</b>	<b>0,048</b>	<b>Logistička funkcija</b>	<b>Eksponencijalna funkcija</b>
MLP 5-8-3	0,811	0,837	0,869	0,035	0,057	0,040	Logistička funkcija	Eksponencijalna funkcija

**Tablica 11.** Koeficijenti determinacije za predikciju udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalne ekstrakcije na osnovu neuronske mreža MLP 5-6-3

	$R^2$		
	Učenje	testiranje	validacija
<i>UF</i>	0,704	0,791	0,784
<i>DPPH</i>	0,872	0,953	0,956
<i>FRAP</i>	0,829	0,775	0,989

### 4.3. MODELIRANJE KINETIKE EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA

Slika 9 prikazuje grafički prikaz ovisnosti pH, TDS, vodljivosti, suhe tvari, ukupnih polifenola, te antioksidacijske aktivnosti određenu DPPH i FRAP metodom o vremenu ekstrakcije za vodene ekstrakte industrijske konoplje. Iz slike 9 vidljiv je trend koji govori da produženjem vremena ekstrakcije, pH (slika 9A), TDS (slika 9B), vodljivost (slika 9C), suha tvar (slika 9D), ukupni polifenoli (slika 9E) te antioksidacijska aktivnost određena DPPH (slika 9F) i FRAP (slika 9G) metodom u vodenim ekstraktima industrijske konoplje je u porastu. Osim toga, vidljivo je da je trend porasta vrijednosti navedenih parametara značajan do između 10. i 15. minute, nakon čega više nema značajan rast.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti fizikalnih i kemijskih karakteristika o vremenu ekstrakcije

Statistička obrada podataka provedena je u programu Statistica 13.0. Za matematičke modele računao se koeficijent determinacije  $R^2$ , a srednja kvadratna pogreška ( $RMSE$ ) i prosječna srednja kvadratna pogreška ( $SRMSE$ ) izračunate su u Excelu. U tablicama 12-17 prikazane su dobivene statističke vrijednosti parametara eksperimentalnih modela za pripremljene ekstrakte industrijske konoplje dobivene postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem. Razmatranjem navedenih tablica možemo uočiti da dvostupanjski kinetički model pokazuje najbolje poklapanje sa eksperimentalno dobivenim podacima za varijable vodljivost,  $DPPH$  i  $FRAP$  (gdje  $R^2$  redom za navedene varijable iznosi 0,988, 0,997 te 0,990), a najlošije poklapanje pokazuje eksponencijalni model (gdje  $R^2$  redom za navedene varijable iznosi 0,946, 0,993 te 0,983). Dvostupanjski kinetički model pokazuje najlošije poklapanje sa  $TDS$  ( $R^2 = 0,753$ ), dok se najbolje podudara sa eksponencijalnim modelom pri čemu faktor determinacije iznosi  $R^2 = 0,944$ . Najviši faktor determinacije od 0,990 pokazuju dobivene vrijednosti Pelegovog modela za varijablu  $UF$ , dok je najniži koeficijent determinacije od 0,921 dobiven eksponencijalnim modelom. Prema jednadžbi Pelegovog modela što je kinetički parametar  $k_1$  manji, veća je brzina ekstrakcije, a što je kinetički parametar  $k_2$  manji to je veći prinos ekstrakcije. Prema tablici 14 vidi se da ta dva parametra pokazuju nisku vrijednost. Eksperimentalne i predviđene koncentracije polifenola dobivene ekstrakcijom pokazuju trend porasta u ovisnosti o vremenu ekstrakcije.

Dvostupanjski kinetički model ima najviši faktor determinacije prema eksperimentalnim podacima varijable  $pH$  te iznosi 0,999, ali i suhe tvari gdje on iznosi 0,976. S druge strane najslabije poklapanje sa podacima za varijablu  $pH$  pokazao je Peleg-ov model ( $R^2=0,934$ ), a za varijablu suhe tvari logaritamski model ( $R^2=0,883$ ). Za eksperimentalne podatke varijabli  $pH$ , vodljivost, suhu tvar,  $DPPH$  i  $FRAP$  najbolje poklapanje pokazao je dvostupanjski kinetički model. Najbolje poklapanje većine ispitivanih varijabli sa ovim modelom može biti iz razloga što dvostupanjski kinetički model na dva mjesta opisuje ekstrakciju, odnosno brzu i sporu ekstrakciju koje se uzastopno slijede za razliku od drugih modela. Parametri  $k_1$  i  $k_2$  predstavljaju konstante brzog i sporog otpuštanja, dok parametri  $F$  i  $(1-F)$  predstavljaju dio tvari koja se ekstrahira i brzo, odnosno sporo otpušta.

**Tablica 12.** Procijenjene vrijednosti parametara modela kinetike prvog reda

<b>Varijabla</b>	$c_{eq}$	$p(c_{eq})$	$k$	$p(k)$	$R^2$	$RMSE$	$SRMSE$
<b>pH</b>	6,672 ± 0,006	<0,001	2,538 ± 0,471	<0,001	0,999	0,233	0,035
<b>TDS</b>	524,904 ± 51,431	<0,001	0,095 ± 0,019	<0,001	0,984	31,954	0,107
<b>Vodljivost</b>	1059,36 ± 103,372	<0,001	0,093 ± 0,019	<0,001	0,984	63,259	0,103
<b>Suha tvar</b>	12,323 ± 113,238	0,915	0,001 ± 0,013	0,920	0,969	0,035	0,210
<b>UF</b>	23,207 ± 1,385	<0,001	0,117 ± 0,016	<0,001	0,990	1,678	0,114
<b>DPPH</b>	0,234 ± 0,007	<0,001	0,263 ± 0,030	<0,001	0,993	0,009	0,047
<b>FRAP</b>	0,059 ± 0,003	<0,001	0,184 ± 0,025	<0,001	0,990	0,005	0,116

**Tablica 13.** Procijenjene vrijednosti parametara dvostupanjskog kinetičkog modela

<b>Varijabla</b>	$c_{eq}$	$p(c_{eq})$	$k_1$	$p(k_1)$	$k_2$	$p(k_2)$	$F$	$p(F)$	$R^2$	$RMSE$	$SRMSE$
<b>pH</b>	7,154 ± 0,122	<0,001	966,874 ± 0,001	<0,001	0,078 ± 0,020	0,001	0,849 ± 0,011	<0,001	0,999	0,065	0,010
<b>TDS</b>	331,359 ± 53,908	<0,001	712,628 ± 0,001	<0,001	1,000 ± 0,644	0,147	-4895 ± 0,001	0,322	0,753	112,912	0,378
<b>Vodljivost</b>	1231,03 ± 261,835	<0,001	2783,14 ± 0,001	<0,001	0,059 ± 0,027	0,053	0,113 ± 0,047	0,033	0,988	72,399	0,117
<b>Suha tvar</b>	1,476 ± 46,047	0,975	0,032 ± 8,628	0,997	0,040 ± 9,790	0,997	4,398 ± 8910,97	1,000	0,976	0,032	0,192
<b>UF</b>	23,207 ± 5,007	<0,001	0,117 ± 0,001	1,000	0,117 ± 0,001	1,000	0,799 ± 0,134	<0,001	0,990	1,678	0,114
<b>DPPH</b>	0,244 ± 0,008	<0,001	0,169 ± 0,031	<0,001	36,586 ± 0,001	<0,001	0,753 ± 0,058	<0,001	0,997	0,011	0,057
<b>FRAP</b>	0,059 ± 0,004	<0,001	0,166 ± 0,058	0,014	1,810 ± 14,849	0,905	0,936 ± 0,207	0,001	0,990	0,005	0,116

**Tablica 14.** Procijenjene vrijednosti parametara Pelegovog modela

Varijabla	$c_0$	$p(c_0)$	$k_1$	$p(k_1)$	$k_2$	$p(k_2)$	$R^2$	<i>RMSE</i>	<i>SRMSE</i>
<b>pH</b>	6,257 ± 0,001	<0,001	0,174 ± 513,68	1,000	-5,71 ± 0,001	1,000	0,934	0,766	0,115
<b>TDS</b>	296,738 ± 34,184	<0,001	31,000 ± 309,758	0,922	-1,342 ± 0,001	0,922	0,872	123,675	0,413
<b>Vodljivost</b>	143,249 ± 76,720	0,085	0,015 ± 0,006	0,017	0,001 ± 0,0002	0,009	0,987	77,946	0,126
<b>Suha tvar</b>	0,006 ± 0,020	0,765	89,137 ± 22,091	<0,001	-1,184 ± 0,001	0,193	0,975	0,036	0,216
<b>UF</b>	-4,864 ± 0,001	0,091	0,183 ± 0,062	0,010	0,029 ± 0,002	<0,001	0,990	1,784	0,121
<b>DPPHA</b>	0,050 ± 0,025	0,065	22,031 ± 9,536	0,040	4,185 ± 0,336	<0,001	0,996	0,014	0,073
<b>FRAP</b>	-0,002 ± 0,001	0,807	62,983 ± 32,743	0,080	13,506 ± 1,341	<0,001	0,989	0,005	0,116

**Tablica 15.** Procijenjene vrijednosti parametara eksponencijalnog modela

Varijabla	$B$	$p(B)$	$n$	$p(n)$	$R^2$	<i>RMSE</i>	<i>SRMSE</i>
<b>pH</b>	6,034 ± 0,053	<0,001	0,044 ± 0,004	<0,001	0,944	0,069	0,01
<b>TDS</b>	91,918 ± 14,875	<0,001	0,524 ± 0,060	<0,001	0,944	41,783	0,140
<b>Vodljivost</b>	183,662 ± 29,043	<0,001	0,526 ± 0,058	<0,001	0,946	82,025	0,133
<b>Suha tvar</b>	0,009 ± 0,002	0,001	1,176 ± 0,088	<0,001	0,976	0,034	0,204
<b>UF</b>	4,387 ± 0,819	<0,001	0,529 ± 0,069	<0,001	0,921	2,727	0,185
<b>DPPHA</b>	0,105 ± 0,008	<0,001	0,281 ± 0,032	<0,001	0,993	0,02	0,104
<b>FRAP</b>	0,019 ± 0,003	<0,001	0,381 ± 0,052	<0,001	0,983	0,006	0,14

**Tablica 16.** Procijenjene vrijednosti parametara Pageovog modela

Varijabla	$K$	$p(k)$	$n$	$p(n)$	$R^2$	<i>RMSE</i>	<i>SRMSE</i>
<b>pH</b>	-1,798 ± 0,001	<0,001	0,024 ± 0,001	<0,001	0,9998	0,067	0,01
<b>TDS</b>	-4,634 ± 0,003	<0,001	0,091 ± 0,011	<0,001	0,9432	43,317	0,145
<b>Vodljivost</b>	-5,315 ± 0,001	<0,001	0,082 ± 0,009	<0,001	0,9852	85,469	0,139
<b>Suha tvar</b>	11,452 ± 2,341	<0,001	-0,772 ± 0,025	<0,001	0,9615	0,031	0,186
<b>UF</b>	-1,745 ± 0,003	<0,001	0,187 ± 0,030	<0,001	0,9694	2,856	0,194
<b>DPPHA</b>	2,364 ± 0,094	<0,001	-0,171 ± 0,041	<0,001	0,9938	0,018	0,094
<b>FRAP</b>	4,098 ± 0,157	<0,001	-0,123 ± 0,001	<0,001	0,9850	0,006	0,14

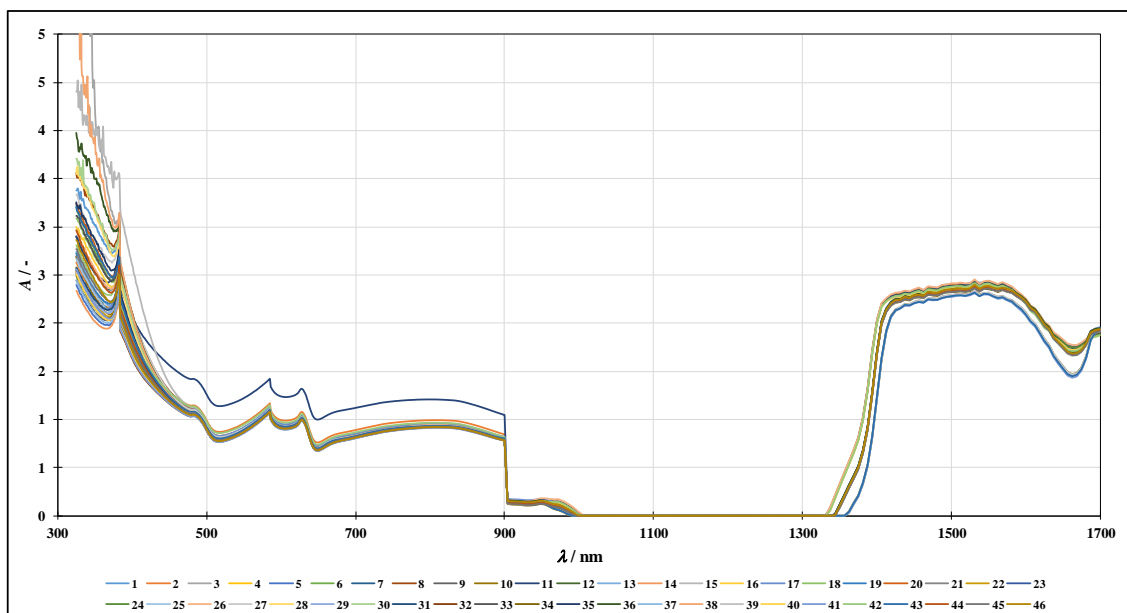
**Tablica 17.** Procijenjene vrijednosti parametara logaritamskog modela

Varijabla	<i>a</i>	<i>p(a)</i>	<i>b</i>	<i>p(b)</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>RMSE</i>	<i>SRMSE</i>
<b>pH</b>	0,287 ± 0,025	<0,001	6,025 ± 0,057	<0,001	0,939	0,478	0,072
<b>TDS</b>	127,105 ± 16,292	<0,001	37,664 ± 37,418	0,331	0,902	218,581	0,731
<b>Vodljivost</b>	586,532 ± 74,997	<0,001	76,562 ± 74,805	0,323	0,974	80,707	0,131
<b>Suha tvar</b>	0,268 ± 0,046	<0,001	-0,084 ± 0,001	0,084	0,883	0,077	0,461
<b>UF</b>	16,942 ± 1,253	<0,001	-1,093 ± 0,001	0,396	0,986	1,969	0,133
<b>DPPHA</b>	0,119 ± 0,011	<0,001	0,086 ± 0,010	<0,001	0,994	0,774	4,031
<b>FRAP</b>	0,037 ± 0,003	<0,001	0,010 ± 0,003	0,008	0,988	0,002	0,047

#### 4.4. ANALIZA UV-VIS-NIR SPEKTRA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE PRIPREMLJENIH PREMA DIZAJNU EKSPERIMENATA

U okviru ovog rada provedena je analiza UV-VIS i NIR spektara ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih prema dizajnu pokusa u 46 nezavisnih eksperimenata. Kontinuirani UV-VIS spektri snimani u rasponu valnih duljina od  $\lambda = 325$  nm do  $\lambda = 900$  nm dok kontinuirani NIR spektri snimani u rasponu valnih duljina od  $\lambda = 904$  nm do  $\lambda = 1699$  nm. Na slici 10 prikazani su spojeni spektri za sve pripremljene ekstrakte. Precizna analiza UV-VIS spektara uzoraka s potencijalnom antioksidacijskom aktivnosti je veoma važna kako bi se mogli predvidjeti spektri novih komponenata, razumjeti promjene u boji biljnih vrsta, procijeniti kapacitet molekula da djeluju kao UV filteri i razumjeti kapacitet molekula koje su podložne kemijskoj promjeni pod djelovanjem UV zračenja (Anouar i sur., 2012). Analizom rezultata (slika 10) može se uočiti postojanje pika apsorbancije u području valnih duljina  $\lambda = 350$  nm do  $\lambda = 400$  nm što se prema literaturi opisuje valnim područjem u kojem apsorbiraju flavonoidi. Može se također uočiti postojanje pika apsorbancije u području valnih duljina  $\lambda = 550$  nm do  $\lambda = 560$  nm što se prema literaturi opisuje valnim područjem u kojem apsorbiraju antocijanidi (Anouar i sur., 2012). Isto tako može se uočiti da kod UV-VIS spektara pripremljenih ekstrakata postoji malo odstupanje između apsorbancija različitih uzoraka. Može se uočiti da u NIR području dolazi do znatnog skoka apsorbancije na valnom području od  $\lambda = 900$  nm do  $\lambda = 950$  nm i  $\lambda = 1400$  nm do  $\lambda = 1600$  nm. Navedena valna područja govore da su u uzorcima detektirane C-H i O-H veze što govori u prilog tome da uzorci sadržavaju vodu s obzirom na način na koji su pripremljeni. Valno područje od  $\lambda = 1410$  nm do  $\lambda = 1600$  nm ukazuje da u uzorku postoje C-H veze što govori u prilog tome da uzorci

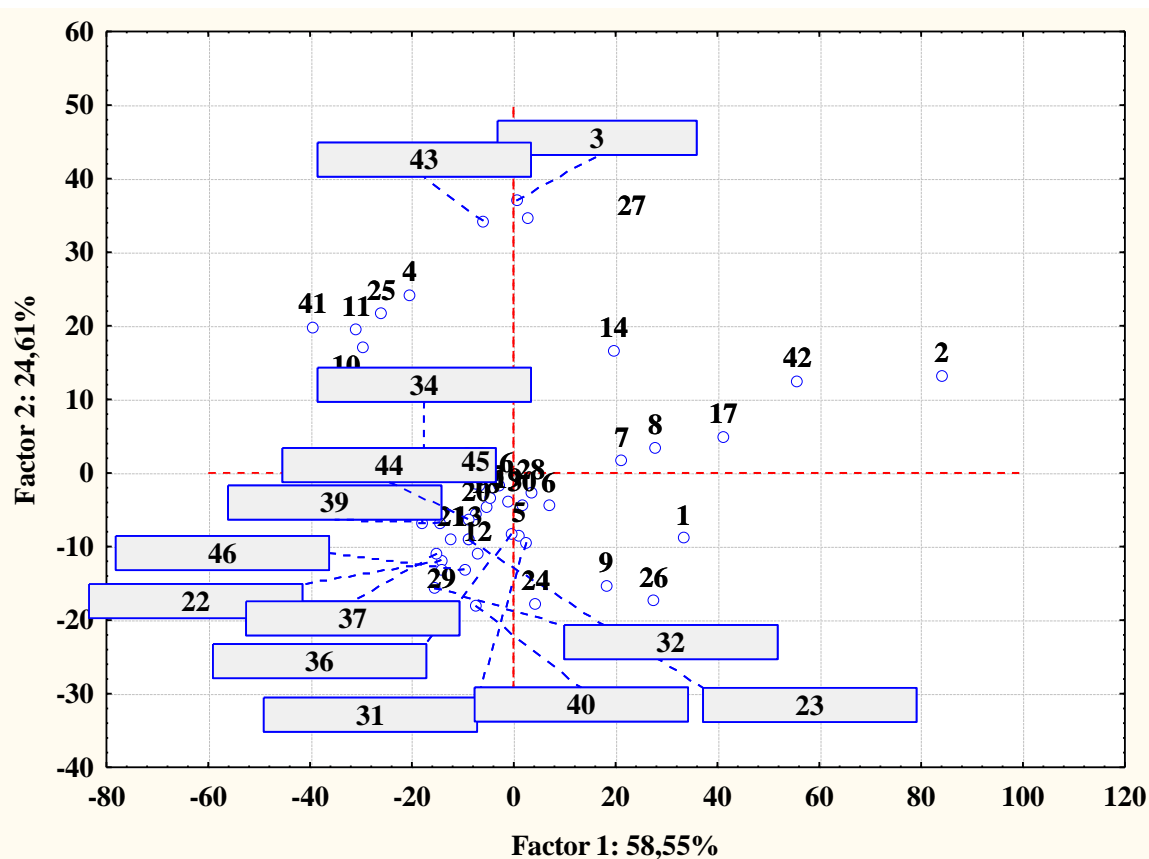
sadržavaju fenole i antioksidanse (Ridley i sur., 2015). Važno je također naglasiti da je kod svih 46 pripremljenih ekstrakata uočena ravna linija spektra koja se proteže u području valnih duljina od  $\lambda = 930$  nm do  $\lambda = 1350$  nm što upućuje na odsutnost N-H veza tj. proteina.



Slika 10. Grafički prikaz kontinuiranih UV-VIS-NIR spektara ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih prema dizajnu eksperimenata

Metoda analize glavnih komponenti korištena je kako bi se vizualizirao odnos pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS i NIR spektra budući da su ekstrakti pripremljeni pri različitim procesnim uvjetima (odnos krute i tekuće faze, udio etanola, temperatura, vrijeme ekstrakcije i snaga mikrovalova). Cilj je PCA ekstrahirati maksimalnu varijancu iz seta podataka sa svakom komponentom. Prva glavna komponenta linearna je kombinacija promatranih vrijednosti koja maksimalno razdvaja podatke, dok su sve iduće komponente linearne kombinacije promatranih varijabli koja ne korelira s prvom komponentom. Prva komponenta ekstrahira najviše varijance, a posljednja komponenta najmanje. Provedena je PCA analiza UV-VIS-NIR spektra industrijske konoplje (slika 11) za područje valnih duljina od  $\lambda = 325$  nm do  $\lambda = 900$  nm te za područje valnih duljina od  $\lambda = 1300$  nm do  $\lambda = 1699$  nm. Rezultati pokazuju da prve dvije PCA komponente uzimaju u obzir 83,16 % varijabilnosti podataka te pokazuju grupiranje uzorka prema udjelu etanola u otapalu za ekstrakciju.





Slika 11. Rezultati PCA analize UV-VIS-NIR spektara ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih prema dizajnu eksperimenata

Koordinate prvih 5 faktora provedene PCA analize te uvjeti provedbe ekstrakcije upotrijebljeni su kao ulazne varijable za predviđanje odabranih fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje primjenom neuronskih mreža. U tablici 18 su prikazane arhitekture izabranih mreža za predikciju fizikalnih svojstava, a u tablici 19 arhitekture izabranih mreža za predikciju kemijskih svojstava. Za predviđanje vodljivosti pripremljenih ekstrakata odabrana je mreža MLP 10-11-1 sa skrivenom aktivacijskom funkcijom Tanh i Eksponencijalnom funkcijom kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za ovaj model iznose 0,982, 0,985 odnosno 0,886. Za opis i previđanje prinosa ekstrakcije ekstrakata industrijske konoplje izabrana je mreža MLP 10-8-1 sa skrivenom aktivacijskom funkcijom Tanh i Fukcijom identiteta kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za navedenu mrežu iznose 0,999, 0,985 odnosno 0,919. Na temelju navedenih koeficijenta determinacije može se zaključiti da su obje mreže pouzdane za previđanje fizikalnih svojstava ekstrakata industrijske konoplje. U svrhu predviđanja koncentracije ukupnih fenola izabrana je mreža MLP 10-4-1 sa Eksponencijalnom funkcijom kao skrivenom aktivacijskom i Tanh kao izlaznom aktivacijskom funkcijom, za predviđanje antioksidacije aktivnosti DPPH metodom odabrana

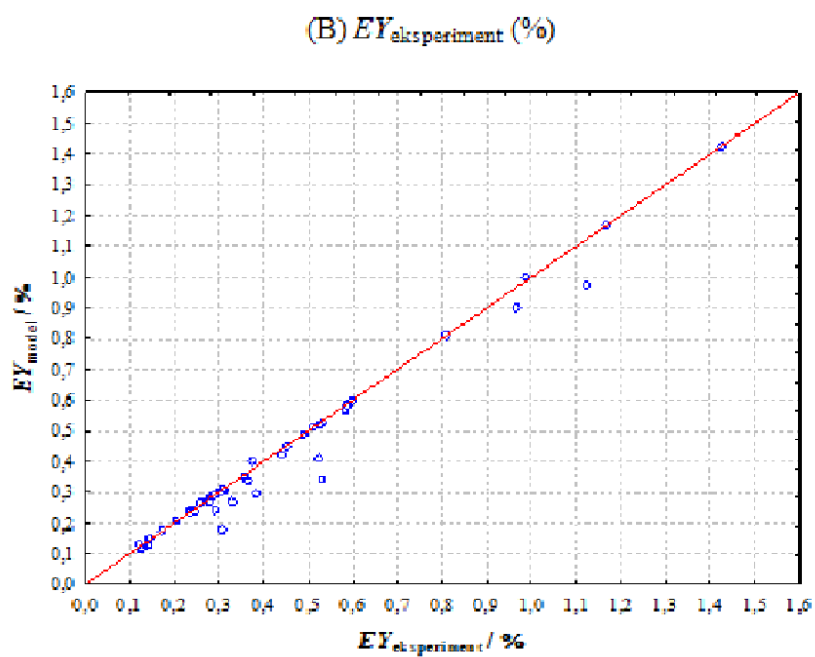
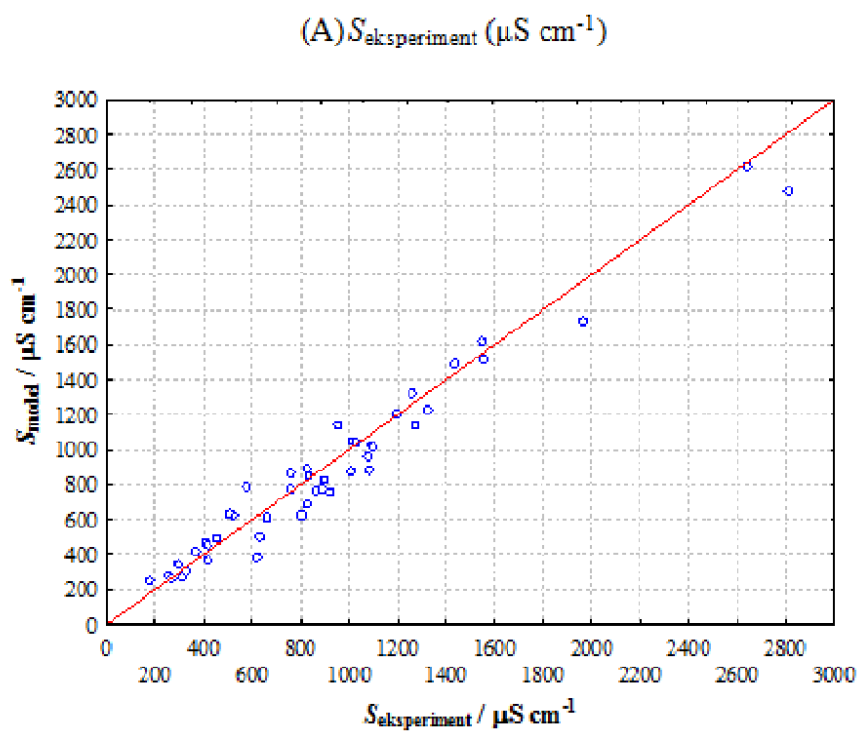
je mreža MLP 10-8-1 sa Tanh kao skrivenom aktivacijskom i kao izlaznom aktivacijskom funkcijom, dok je predviđanje antioksidacije aktivnosti FRAP metodom odabrana je mreža MLP 10-10-1 sa Logističkom funkcijom kao skrivenom aktivacijskom i Tanh kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Sve tri navedene mreže karakteriziraju visoke vrijednosti koeficijenta determinacije za testiranje, treniranje i validaciju što se može vidjeti na slikama 12 i 13. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji potencijal primjene UV-VIS i NIR spektroskopije za predikciju kvalitativnih i kvantitativnih svojstava biljnih ekstrakta. Callado i sur. (2018) opisali su primjenu NIR spektroskopije za odrađivanje udjela kanibinoida u *Cannabis sativa* L. te pokazali da PLS model na temelju FT-NIR spektara opisuje eksperimentalne vrijednosti s koeficijentom determinacije od približno 0,89. Također Valinger i sur. (2018) su opisali primjenu neuronskih mreža za predikciju udjela ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti i prinos ekstrakcije vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupom klasične ekstrakcije, postupkom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije i postupkom ultrazvukom i mikrovalovima potpomognute ekstrakcije. U navedenom radu su za sve analiziran izlazne veličine dobiveni koeficijenti determinacije viši od 0,87.

**Tablica 18.** Arhitektura neuronskih mreža za predikciju fizikalnih svojstava ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalne ekstrakcije na temelju UV-VIS-NIR spektra i uvjeta provedbe ekstrakcije

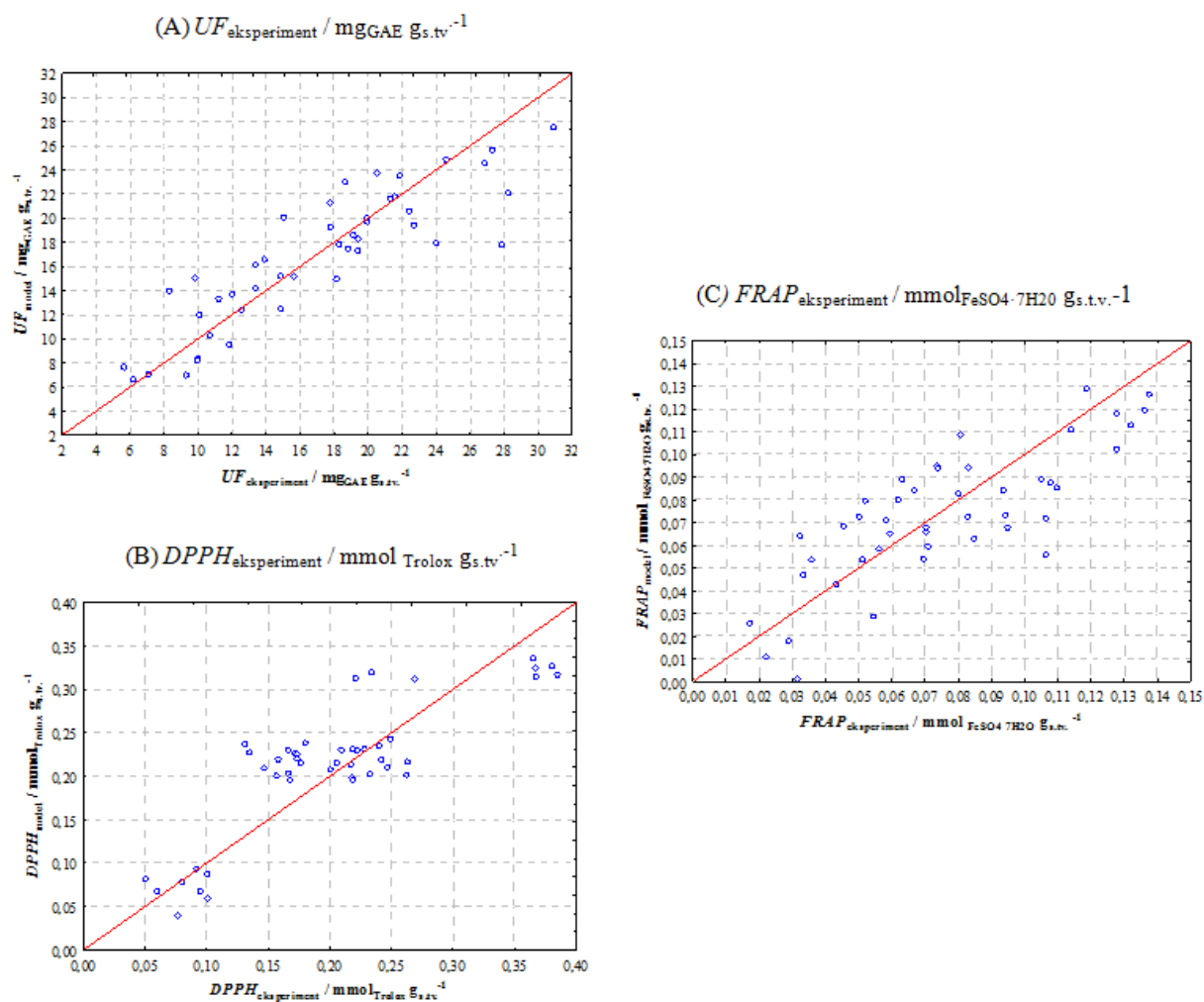
Izlazna varijabla	mreža	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
vodljivost	MLP 10-12-1	0,968	0,991	0,867	0,001	0,002	0,004	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-6-1	0,965	0,975	0,885	0,002	0,003	0,005	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
	MLP 10-12-1	0,969	0,992	0,872	0,001	0,002	0,004	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-5-1	0,969	0,989	0,870	0,001	0,002	0,004	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
	<b>MLP 10-11-1</b>	<b>0,982</b>	<b>0,985</b>	<b>0,886</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>Tanh</b>	<b>Eksponecijalna funkcija</b>
prinos ekstrakcije	MLP 10-13-1	0,996	0,984	0,916	<0,001	0,001	0,011	Eksponecijalna funkcija	Tanh
	<b>MLP 10-8-1</b>	0,999	0,986	0,919	<0,001	0,001	0,003	<b>Tanh</b>	<b>Funkcija identiteta</b>
	MLP 10-10-1	0,990	0,979	0,937	<0,001	0,001	0,005	Eksponecijalna funkcija	Logistička funkcija
	MLP 10-11-1	0,999	0,982	0,866	<0,001	0,001	0,003	Tanh	Funkcija identiteta
	MLP 10-13-1	0,996	0,984	0,919	<0,001	0,001	0,0103	Eksponecijalna funkcija	Tanh

**Tablica 19.** Arhitektura neuronskih mreža za predikciju kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalne ekstrakcije na temelju UV-VIS-NIR spektra i uvjeta provedbe ekstrakcije

Izlazna varijabla	mreža	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
koncetracija ukupnih fenola	<b>MLP 10-4-1</b>	<b>0,892</b>	<b>0,889</b>	<b>0,812</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	<b>0,011</b>	<b>Eksponencijalna funkcija</b>	<b>Tanh</b>
	MLP 10-13-1	0,741	0,850	0,840	0,016	0,009	0,008	Tanh	Funkcija identiteta
	MLP 10-8-1	0,773	0,899	0,718	0,013	0,009	0,017	Logistička funkcija	Eksponencijalna funkcija
	MLP 10-13-1	0,946	0,892	0,822	0,004	0,006	0,042	Tanh	Tanh
	MLP 10-4-1	0,935	0,911	0,757	0,004	0,006	0,033	Tanh	Tanh
DPPH	MLP 10-4-1	0,898	0,990	0,734	0,006	0,001	0,009	Tanh	Funkcija identiteta
	<b>MLP 10-8-1</b>	<b>0,850</b>	<b>0,989</b>	<b>0,712</b>	<b>0,009</b>	<b>0,002</b>	<b>0,016</b>	<b>Tanh</b>	<b>Tanh</b>
	MLP 10-7-1	0,825	0,989	0,770	0,011	0,001	0,018	Tanh	Funkcija identiteta
	MLP 10-6-1	0,867	0,990	0,747	0,008	0,002	0,015	Funkcija identiteta	Tanh
	MLP 10-5-1	0,865	0,987	0,747	0,008	0,001	0,013	Tanh	Tanh
FRAP	MLP 10-4-1	0,813	0,936	0,738	0,014	0,003	0,027	Logistička funkcija	Tanh
	MLP 10-9-1	0,841	0,926	0,725	0,013	0,004	0,013	Tanh	Tanh
	MLP 10-4-1	0,794	0,947	0,761	0,016	0,001	0,022	Logistička funkcija	Tanh
	MLP 10-6-1	0,898	0,931	0,729	0,008	0,003	0,029	Logistička funkcija	Tanh
	<b>MLP 10-10-1</b>	<b>0,823</b>	<b>0,923</b>	<b>0,881</b>	<b>0,014</b>	<b>0,006</b>	<b>0,018</b>	<b>Logistička funkcija</b>	<b>Tanh</b>



Slika 12. Usporedba eksperimentalnih i modelom neuronskih mreža predviđenih vrijednosti vodljivosti (A) i prinosa (B) ekstrakcije vodenih ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalne ekstrakcije na temelju UV-VIS-NIR spektra i uvjeta provedbe ekstrakcije



Slika 13. Usporedba eksperimentalnih i modelom neuronskih mreža predviđenih vrijednosti ukupnih polifenola (A) te antioksidacijske aktivnosti određene metodom DPPH (B) i FRAP (C) ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih metodom mikrovalne ekstrakcije na temelju UV-VIS-NIR spektra i uvjeta provedbe ekstrakcije

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenih eksperimenata može se zaključiti da je:

1. Najviša koncentracija polifenola dobivena ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz industrijske konoplje izmjerena je pri uvjetima:  $L/S = 50 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 25 \%$ ,  $t = 5 \text{ min}$ ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $P = 600 \text{ W}$  te ona iznosi  $UF = 35,396 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ .
2. Optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenolnih spojeva primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su:  $L/S = 30 \text{ mL g}^{-1}$ ,  $v/v = 25 \%$ ,  $t = 25 \text{ min}$ ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $P = 600 \text{ W}$ . Pri tim uvjetima udio ukupnih polifenola iznosi  $UF = 19,396 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ .
3. Na temelju dinamičkog eksperimenta ekstrakcije vidljivo je da sve analizirane varijable pokazuju značajan trend porasta vrijednosti do 15. minute, nakon čega vrijeme ekstrakcije više nema utjecaja. Ispitivani matematički modeli pokazali su zadovoljavajući kriterij preciznosti,  $R^2 > 0,900$ , međutim isti model nije primjenjiv za svaku ispitanu varijablu.
4. Razvijeni su modeli neuronskih mreža (MLP) u svrhu predikcije fizikalno kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje na temelju UV-VIS-NIR spektara. Na temelju visoke vrijednosti koeficijenta determinacije za testiranje, tretiranje i validaciju može se zaključiti da je UV-VIS i NIR spektroskopija uspješna metoda za predikciju fizikalnih (vodljivost, prinos ekstrakcije) i kemijskih (koncentracija ukupnih polifenola, antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom) svojstava istraživanih ekstrakata.



## **6. LITERATURA**

Afaghi, M., Ramaswamy, H. S., Prasher, S. O. (2001) Thermal process calculations using artificial neural network models. *Food Res. Int.* **34**(1), 55-65.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**(3-4), 261-265.

Amendola, D., De Faveri, D. M., Spigno, G. (2010) Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J. Food Eng.* **97**(3), 384-392.

Andre, C. M., Hausman, J. F., Guerriero, G. (2016) *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.* **7**, 19.

Andre, C. M., Larondelle, Y., Evers, D. (2010) Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6** (1), 2–12. doi:10.2174/157340110790909563.x

Anjum, M. F., Tasadduq, I., Al-Sultan, K. (1997) Response surface methodology: A neural network approach. *European Journal of Operational Research.* **101** (1), 65–73. doi: 10.1016/S0377-2217(96)00232-9.x

Anouar, E. H., Gierschner, J., Duroux, J.-L., Trouillas, P. (2012) UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time dependent density function theory study. *Food Chem.* **131**, 79-89.

AOAC (1995) Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, 16. izd., Arlington VA, USA.

Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., Rahman, M. M. (2008) Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J. Nat. Prod.* **71**, 1427–1430. doi:10.1021/np8002673.x

Arts, I. C., Hollman, P. C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1), 317–325. doi: 10.1093/ajcn/81.1.317S.x

Ballard, S. T., Malikarjunan, P., Zhou, K., O'Keffe, S. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem.* **120**(4), 1185-1192. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.063.x

- Baş, D., Boyacı, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78**(3), 836-845. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.x
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239** (1), 70-76.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* **76**(5), 965-977.
- Biancolillo, A., Bucci, R., Magri, A. L., Magri, A. D., Marini, F. (2014) Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication. *Anal. Chim. Acta.* **820**, 23-31.
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod. Process.* **89**(1), 67-72.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology.* **28**, 25.
- Brenneisen, R. (2007) Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *cannabis* constituents. U: Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine (ElSohly, M. A. ured.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, str. 17–49. doi:10.1007/978-1-59259-947-9\_2.x
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, N., Velić, D. (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grade seeds. *Journal of Food Engineering.* **81** (1), 236-242.
- Burstein, S. (2015) Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorgan. Med. Chem.* **23** (7), 1377–1385. doi: 10.1016/j.bmc.2015.01.059.x
- Callado, C. S. C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S., Ferreira-Vera, C. (2018) The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study. *Talanta.* **190**, 147-157.

- Cao, J., Hao, L., Zhang, L., Xu, M., Ge, H., Kang, C., Yu, J., Wang, Z. (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids from China-hemp leaves and evaluation of its antioxidant activities. U: International Conference on Applied Biotechnology(Liu, H, Song, C., Ram, A., ured.), Springer, Singapore, str. 555-567. doi:10.1007/978-981-10-4801-2\_57.x
- Casale, M., Oliveri, P., Armanino, C., Lanteri, S., Forina, M. (2010) NIR and UV–vis spectroscopy, artificial nose and tongue: comparison of four fingerprinting techniques for the characterisation of Italian red wines. *Anal. Chim. Acta.* **668**(2), 143-148.
- Chandra S., Lata H., Khan I. A., ElSohly M. A. (2008) Photosynthetic response of *C. sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO<sub>2</sub> conditions. *Physiol Mol Biol Pla.* **14**, 299.
- Cleemput, M. V., Cattoor, K., Bosscher, K. D., Haegeman, G., Keukeleire, D. D., Heyerick, A. (2009) Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J. Nat. Prod.* **72** (6), 1220–1230. doi:10.1021/np8 00740m.x
- Dai, X., Song, H., Liu, W., Yao, S., Wang, G. (2016) On-line UV-NIR spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for on-line and real-time monitoring of the extraction process of Coptis Rhizome. *Rsc Adv.* **6**(12), 10078-10085.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S. (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Brit. J. Pharmacol.* **163** (7), 1479–1494. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x
- Delazar, A. Nahar, L., Hamedeyaz, S., Sarkerdan, S. D. (2012) Microwave-assisted extraction in natural products isolation. U: Natural Products Isolation (Sarker S. D., Nahar L.), Humana Press, vol. 864, str. 89-115. doi:10.1007/978-1-61779-624-1\_5.x
- Destandau, E., Michel, T., Elfakir, C. (2013) Microwave - assisted Extraction. U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113-135.
- Di Marzo, V., Piscitelli, F. (2015) The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. *Neurotherapeutics.* **12** (4), 692–698. doi: 10.1007/s13311-015-0374-6.x

- Dragović-Uzelac, V., Elez Grofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol. Biotech.* **50**(3), 377-383.
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. U: Phytocannabinoids (Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J.) Springer, Switzerland, str. 1-36.
- ElSohly, M. A., Slade, D. (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *LifeSci.* **78** (5), 539–548. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.011.x
- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000) Analytical- scale microwave assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **902**(1), 227-250.
- Englund, A. M., Stone, J., Morrison, P. D. (2012) *Cannabis* in the arm: what can we learn from intravenous cannabinoid studies? *Curr. Pharm. Design.* **18** (32), 4906–4914. doi:10.2174/138161212802884618.x
- Fischedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2010) Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry.* **71** (17-18), 2058–2073. doi:10.1016/j.phytochem.2010.10.001.x
- Flores-Sanchez, I. J., Verpoorte, R. (2008) Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochem. Rev.* **7**(3), 615–639. doi:10.1007/s11101-008-9094-4.x
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Phenolic-compound-extraction systems from fruit and vegetable samples. *Molecules.* **15**(12), 8813-8826.
- Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J. (1986) The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron lett.* **27** (3), 279-282.
- Gutiérrez Suárez, A., Río Andrade, J. C. D. (2005) Chemical characterization of pitch deposits produced in the manufacturing of high-quality paper pulps from hemp fibers. *Bioresource Technol.* **96**, 1445–1450. doi:10.1016/j.biortech.2004. 12.008.x

- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: director in direct effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1), 268–276.
- Harouna-Oumarou, H. A., Fauduet, H., Porte, C., Ho, Y. S. (2007) Comparison of kinetic models for the aqueous solid-liquid extraction of *Tilia* sapwood in a continuous stirred tank reactor. *Chem. Eng. Commun.* **194** (4), 537-552.
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., Makriyannis, A. (2016) Cannabis sativa and Hemp. U: Nutraceutical: Efficacy, Safety and Toxicity(Ramesh, C. G., ured.), Elsevier, str. 735-754. doi:10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X.x
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., Stephens, G. J. (2012) Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Therapeut.* **133** (1), 79–97. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.09.002.x
- Hu, Z., Cai, M., Liang, H. H. (2008) Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from Radix bupleuri. *Sep. Purif. Technol.* **61**(3), 266–275.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**(4), 1821-1835.
- Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea Europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* **123** (1), 175-182.
- Jiang, H. E., Li, X., Zhao, Y. X., Ferguson, D. K., Hueber, F., Bera, S., Wang, Y. F., Zhao, L. C., Liu, C. J., Li, C. S. (2006) A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J. Ethnopharmacol.* **108**(3), 414-422.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010) Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols form soybeans. *Czech. J. Food Sci.* **28** (3), 206-212.
- Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., Gordon, M.H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *J. Agr. Food Chem.* **54**(11), 4016-4021.

- Karacabey, E., Bayindirli, L., Artik, N., Mazza, G. (2011) Modelling solid-liquid extraction kinetics of trans-resveratrol and trans- $\epsilon$ -viniferin from grape cane. *J. Food Process Eng.* **36**(1), 13-112.
- Kennedy, D. O., Dodd, F. L., Robertson, B. C., Okello, E. J., Reay, J. L., Scholey, A. B. (2011) Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *J. Psychopharmacol.* **25** (8), 1088–1100. doi: 10.1177/0269881110385594.x
- Khajeh, M., Moghaddam, A. R. A., Sanchooli, E. (2009) Application of doehlert design in the optimization of microwaveassisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS. *Food Anal. Method.* **3** (3), 133-137. doi:10.1007/s12161-009-9099-7, 1-5.x
- Komori, T., Fujiwara, R., Tanida, M., Nomura, J., Yokoyama, M. M. (1995) Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulat.* **2** (3), 174–180. doi:10.1159/000096889.x
- Kormin, F., Ahmed, I., Yunus, R. M., Yusof, Z. A. M. (2010) The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *Inter. J. Eng. Technol.* **10**, 7-21.
- Kriese, U., Schumann, E., Weber, W. E., Beyer, M., Brühl, L. (2004) Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica.* **137** (3), 339-351.
- Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec V., Orsak, M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. U: Cereals for Human Health and Preventive Nutriotion(Ehrenbergerová, J., Vaculová, K., ured.), Mendelova Zemedelska a Lesnicka Univerzita, Brno, str. 118-125.
- Le Man, H., Behera, S. K., Park, H. S. (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int. J. Environ. Sci. Te.* **7**(1), 157-164.
- Li, D. C., Jiang, J. G. (2010) Optimization of the microwave-assisted extraction conditions of tea polyphenols from green tea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **61**(8), 837-845.

- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. **1140**(1–2), 29–34.
- Lin, C.H., Jingwen, P., Ali, A. (2018) Extraction kinetics of *Ziziphus jujuba* fruit using solid-liquid extraction. *Journal of Engineering Science and Technology*. **13**, 27-39.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pertensen, J., Bergman, R. (1998) Experimental design and optimization. *Chemometr. Intell. Lab.* **42** (1-2), 3-40.
- Ma, W., Lu, Y., Dai, X., Liu, R., Hu, R., Pan, Y. (2009) Determination of anti-tumor constituent mollugin from traditional Chinese medicine *Rubia cordifolia*: comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Separ. Sci. Technol.* **44**(4), 995–1006.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*. **1**(1), 7-18.
- Marti, G., Schnee, S., Andrey, Y., Simoes-Pires, C., Carrupt, P.-A., Wolfender, J.-L. (2014) Study of leaf metabolome modifications induced by UV-C radiations in representative *Vitis*, *Cissus* and *Cannabis* species by LC-MS based metabolomics and antioxidant assays. *Molecules*. **19**(9), 14004–14021. doi: 10.3390/molecules190914004.x
- Meier, C., Mediavilla, V. (1998) Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *J. Int. Hemp Assoc.* **5**, 16–20.
- Meijer, E. P. M., de Hammond, K. M., Micheler, M. (2009) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L.(III): variation in cannabichromene proportion. *Euphytica*. **165**(2), 293–311. doi:10.1007/s10681-008-9787-1.x
- Merlin, M. D. (2003) Archaeological evidence for the tradition of psychoactive plant use in the old world. *Econ. Bot.* **57**(3), 295-323.
- Montserrat de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Giemenéz, M., D., Fernández-Arche, M. D. (2014) Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agr. Food Chem.* **62** (5), 1105–1110. doi: 10.1021/jf404278q.x



Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (1995) Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons. Inc, New York, str. 134-174.

Naczek, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **41**(5), 1523-1542.

Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., Mandolino, G. (2008) Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*. **160** (2), 231–240. doi:10.1007/s10681-007-9543-y.x

Peleg, M. (1988) An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* **53** (4), 1216-1219.

Perry, R., Green, D. W., Maloney, J. O. (1997) *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7. izd., McGraw-Hill, New York.

Rana, D. S., Theodore, K., Naidu, G. S. N., Panda, T. (2003) Stability and kinetics of  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem.* **39** (2), 149–155.

Raso, J., Manas, P., Pagan, R., Sala, F. J. (1999) Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **5** (4), 157- 162.

Ridley-Ellis, D., Popescu, C.M., Keating, B., Popescu, M.C., Hill, C.A.S. (2015) Stiffness changes during low temperature thermal treatment of scots pine, assessed by acoustic NTD. 7th European conference on wood modification, Lisbon, Portugal, 10.03-12.03.2015.

Ross, S. A., ElSohly, M. A., Sultana, G. N., Mehmedic, Z., Hossain, C. F., Chandra, S. (2005) Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochem. Analysis.* **16** (1), 45–48. doi:10.1002/pca.809.x

Ross, S. A., Mehmedic, Z., Murphy, T. P., ElSohly, M. A. (2000) GC-MS analysis of the total  $\Delta^9$ -THC content of both drug- and fiber-type *Cannabis* seeds. *J. Anal. Toxicol.* **24** (8), 715–717. doi:10.1093/jat/24.8.715.x

Rothschild, M., Bergström, G., Wängberg, S. Å. (2005) *Cannabis sativa*: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, Northern Lights and Hawaiian Indica. *Bot. J. Linn. Soc.* **147** (4), 387–397. doi: 10.1111/j.1095-8339.2005.00417.x

- Routray, W., Orsat, V. (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Tech.* **5**(2), 409-424.
- Russo, E. B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Brit. J. Pharmacol.* **163** (7), 1344–1364. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x
- Schultes, R. E., Klein, W. M., Plowman, T., Lockwood, T. E. (1974) Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University.* **23**(9), 337-367.
- Schwartzberg, H. G. Chao, R. Y. (1982) Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technol.-Chicago.* **73**, 73–86.
- Simić, V.M., Rajković, K.M., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, L.M., Karabegović, I.T. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep. Purif. Technol.* **160**, 89-97.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16** (3), 144-158.
- Slatkin, D. J., Doorenbos, N. J., Harris, L. S., Masoud, A. N., Quimby, M. W., Schiff, P. L. (1971) Chemical constituents of *Cannabis sativa* L. Root. *J. Pharm. Sci.* **60** (12), 1891–1892. doi:10.1002/jps.2600601232.x
- Small, E. (2015) Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *Bot. Rev.* **81** (3), 189–294. doi:10.1007/s12229-015-9157-3.x
- Smeds, A. I., Eklund, P. C., Willför, S. M. (2012) Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chem.* **134** (4), 1991–1998. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.133.x
- Starmans, D. A., Nijhuis, H. H. (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **7**(6), 191-197.
- Stout, J. M., Boubakir, Z., Ambrose, S. J., Purves, R. W., Page, J. E. (2012) The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis for medbyan acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *Plant J.* **71** (3), 353–365. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04949.x

- Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M. A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: Extracting bioactive compounds from food products (Meireles, M. A.A., ured.), Crc press, Taylor& Francis group, New york, str. 137-218.
- Teng, D., Fang, Y., Song, X., Gao, Y. (2011) Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta. *Food Bioprod. Process.* **89**, 202-208.
- The, S.-S., Niven, B. E., Bekhit, A. E.-D. A, Carne, A., Birch, E. J. (2014) The use of microwave and pulsed electric field as a pretreatment step in ultrasonic extraction of polyphenols from defatted hemp seed cake (*Cannabis sativa*) using response surface methodology. *Food Bioproc. Technol.***7**, 3064-3076.
- Valinger, D., Kušen, M., Jurinjak Tušek, A., Panić, M., Jurina, T., Benković, M., Radojčić Redovniković I., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) Development of Near Infrared Spectroscopy Models for Quantitative Prediction of the Content of Bioactive Compounds in Olive Leaves. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32** (4), 535-543.
- Wang, X., Huang, J., Fan, W., Lu, H. (2015) Identification of green tea varieties and fast quantification of total polyphenols by near-infrared spectroscopy and ultraviolet-visible spectroscopy with chemometric algorithms. *Anal. Methods-UK.* **7**(2), 787-792.
- Wang, C.-Z., Ma, X.-Q., Yang, D.-H., Guo, Z.-R., Liu, G.-R., Zhao, G.-X., Tang, J., Zhang, J.-N., Ma, M., Cai, S.-Q., Ku, B.-S., Liu, S.-L. (2010) Production of enterodiol from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* **10** (1), 115. doi: 10.1186/1471-2180-10-115.x
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17** (6), 300-312.
- Wang, Y., You, J., Yu, Y., Qu, C., Zhang, H., Ding, L., Zhang, H., Li, X. (2008) Analysis of ginsenosides in Panax ginseng in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chem.* **110**(1), 161–167.

Wu, Y., Jin, Y., Ding, H., Luan, L., Chen, Y., Liu, X. (2011) In-line monitoring of extraction process of scutellarein from *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand-Mazz based on qualitative and quantitative uses of near-infrared spectroscopy. *Spectrochim. Acta A.* **79** (5), 934-939.

Xiao, W., Han, L., Shi, B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. *Sep. Purif. Technol.* **62** (3), 614–618.

Zhang, B, Yang, R., Liu, C.Z. (2008) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep. Purif. Technol.* **62** (2), 480-483.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Nikolina Bakšić

Ime i prezime studenta