

Aromatski profil ekstrakata kadulje dobivenih primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Mikolaj, Elena

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:159:304693>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019

Elena Mikolaj

1105/PI

**AROMATSKI PROFIL
EKSTRAKATA KADULJE
DOBIVENIH PRIMJENOM
VISOKONAPONSKOG
ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak te uz pomoć doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, dr.sc. Predraga Putnika, te Marinele Nutrizio, mag.nutr.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak koja je uvijek bila spremna pomoći, diskutirati o problematici i velikodušno prenijeti svoja znanja te je svojim stručnim vodstvom, pristupačnošću i korisnim savjetima olakšala i uljepšala ovaj zadnji korak mog studiranja.

Zahvaljujem dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću, dr. sc. Predragu Putnik i mag. nutr. Marineli Nutrizio na pomoći oko izrade rada, uloženom vremenu i trudu koji su iskazali kako bi moj diplomski rad bio uspješno izveden.

Također se zahvaljujem dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na velikoj pomoći, strpljenju i vremenu za brojne upite.

Hvala svim dragim prijateljima i prijateljicama koji su uvijek bili uz mene, pomogli savjetima, dijelili motivaciju i sreću.

Na kraju, najveće hvala roditeljima koji su mi sve ovo omogućili, vjerovali u mene i upućivali me na pravi put. Isto tako, hvala sestri na podršci i dijeljenju iskustva. I naravno, hvala mom dečku što je cijelo vrijeme bio uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

AROMATSKI PROFIL EKSTRAKATA KADULJE DOBIVENIH PRIMJENOM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNjenja

Elena Mikolaj, 1105/PI

Sažetak:

*Svrha istraživanja je utvrditi učinkovitost netopinske metode ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja korištenjem „zelenih otapala“. Tijekom istraživanja uzorci kadulje (*Salvia officinalis*) tretirani su u plazma generatoru IMP-SSPG-1200 pri frekvenciji 100 Hz i različitim vrijednostima napona u struji dušika (20 kV i 25 kV), odnosno u struji argona (15 kV i 20 kV). Ekstrakcija tretiranih i netretiranih uzoraka (1 g uzorka u 50 mL otapala) provodila se 3 i 9 minuta u 0 %-tnoj, 25 %-tnoj i 50 %-tnoj otopini etanola. Najveći prinos fenolnih spojeva od 6,07 % ostvaren je u uzorku kadulje tretiranom u struji dušika 9 minuta, pri naponu od 25 kV, u otopini 25 %-tnog etanola. Uporabom hladne plazme određena je viša antioksidacijska aktivnost uzoraka u usporedbi s klasičnom metodom. Razvijeni su regresijski modeli za predviđanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti sličnih uzoraka na temelju analitičkih podataka i blisko infracrvene spektroskopije. Aromatski profil uzoraka kadulje određen je analizom plinske kromatografije – spektroskopije masa.*

Ključne riječi: *kadulja, visokonaponsko električno pražnjenje, ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet, aromatski profil*

Rad sadrži: 57 stranica, 21 slika, 9 tablica, 61 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Zvonimir Marijanović, dr.sc. Predrag Putnik, mag.nutr. Marinela Nutrizio*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. Prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
3. Doc.dr.sc. *Zvonimir Marijanović*
4. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević* (zamjena)

Datum obrane: 20. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

AROMATIC PROFILE OF SAGE EXTRACTS OBTAINED BY MEANS OF HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE TECHNOLOGY

Elena Mikolaj, 1105/PI

Abstract:

*The purpose of the study was to determine the efficiency of the non-thermal extraction method by using high-voltage electrical discharge (HVED) treatment using "green solvents". Sage samples (*Salvia officinalis*) were treated in the plasma generator IMP-SSPG-1200 at frequency of 100 Hz and different voltage values in the nitrogen (20 kV and 25 kV) or argon (15 kV and 20 kV) stream. Extraction duration of treated and untreated samples (1 g of sample in 50 mL of solvent) was 3 and 9 minutes in 0 %, 25 % and 50 % ethanol solution. The highest yield of phenolic compounds was 6.07 % achieved during 9 minutes treatment, in 25 % ethanol solution and the nitrogen stream at 25 kV. Using HVED treatment demonstrate higher antioxidant activity of samples compared to the classical method. Regression models for prediction of total phenol content and antioxidant activity of similar samples were developed based on analytical data and near-infrared spectroscopy. The aromatic profile of sage samples was determined by analysis of gas chromatography - mass spectroscopy.*

Keywords: *sage, high-voltage electrical discharge, total phenolic compounds, antioxidant capacity, aromatic profile*

Thesis contains: 57 pages, 21 figures, 9 tables, 61 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Anet Režek Jambrak, PhD*

Technical support and assistance: *Zvonimir Marijanović, PhD, Predrag Putnik, PhD, Marinela Nutrizio, mag.*

Reviewers:

1. PhD *Jasenska Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. PhD *Zvonimir Marijanović*
4. PhD *Danijela Bursać Kovačević* (substitute)

Thesis defended: 20th September 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kadulja.....	2
2.1.1. Kemijski sastav.....	3
2.1.2. Djelovanje i upotreba	3
2.2. Ekstrakcija zelenim otapalima	4
2.3. Visokonaponsko električno pražnjenje.....	5
2.4. Fenolni spojevi	7
2.5. Antioksidacijska aktivnost.....	9
2.6. Blisko-infracrvena spektroskopija (NIR), analiza glavnih komponenata (PCA) i regresija glavnih komponenata (PCR).....	11
2.7. Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Uzorak.....	15
3.1.2. Reagensi.....	15
3.1.3. Aparatura i pribor.....	16
3.2. Metode rada.....	17
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva primjenom visokonaponskog pražnjenja	17
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	20
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	22
3.2.4. NIR, PCA i PCR analize	25
3.2.5. GC-MS analiza	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Rezultati mjerenja ukupnih fenola	31
4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti	32
4.2.1. FRAP metoda	32
4.2.2. DPPH metoda	34
4.3. Prinos ekstrakcije.....	35
4.4. NIR analiza.....	37
4.5. PCA analiza.....	40
4.6. PCR analiza	42
4.7. GC-MS analiza	46
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	52

1. UVOD

Kadulja, čije latinsko ime *Salvia*, koje dolazi od latinske riječi *salvare*, u prijevodu znači spasiti ili izliječiti, sadrži brojna ljekovita svojstva, a Rimljani su je još prije 2000 godina koristili za liječenje. Upotreba ove biljke je raznovrsna: farmaceutske svrhe, u prehrani kao začin i čaj, eterično ulje se koristi u medicini i kozmetici i spada u visoko medonosne biljke. Njene supstance djeluju protuupalno, antivirusno, antibakterijsko i protugljivično te je dobar antioksidans zahvaljujući sadržaju fenolnih spojeva. U sastavu kadulje uz razne minerale nalaze se vitamini A, B₁, B₂ i C te niz aktivnih spojeva poput: alfa i beta tujona, 1,8-cineola, kamfora, kamfena, alfa pinena, borneola, beta pinena, alfa humulena itd. Kako bi se iskoristila moć kadulje, u ovom radu će se istražiti mogućnosti efikasnije ekstrakcije aktivnih komponenti sa antioksidacijskim djelovanjem. Fenolni spojevi djeluju antioksidativno na način da neutraliziraju već nastale slobodne radikale ili sprječavaju njihovo nastajanje. Trenutni glavni način ekstrakcije fenolnih spojeva iz bljnih materijala uključuje klasične metode koje su dugotrajne, koriste visoke temperature (>60 °C) i velike količine organskih otapala štetnih po okoliš pošto se ne mogu rastaviti do biorogradivih jedinica. Stoga, da bi se prevladali nedostaci ovih metoda, razvijaju se nove metode ekstrakcije koje karakterizira kratko trajanje, niske temperature (<35 °C) i korištenje zelenih otapala. Takve metode su posebno pogodne za ekstrakciju fenolnih spojeva budući da su ti spojevi u pravilu termolabilni. Primjer nove netoplinske metode koja slijedi načela zelene kemije je ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem koja je korišten u ovom istraživanju. Načela zelene kemije uključuju primjenu ekološki prihvatljivih otapala, npr. smjesa etanola i vode, ponovno iskorištavanje nusprodukata, povećanje iskorištenja procesa, održivost i konstantni razvoj. Primjenjivanjem novih načina ekstrakcije može se proizvesti kvalitetan ekstrakt uz smanjenje potrošnje energije. U istraživačkoj fazi ključno je ispitati utjecaj postavljenih parametara procesa i odabrati optimalne uvjete za postizanje maksimalne efikasnosti. Nadalje, istražiti će se mogućnost razvijanja modela za predviđanje sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti uzoraka kadulje čime bi se izbjeglo provođenje dugotrajnih laboratorijskih analiza koje koriste velike količine reagensa i zahtijevaju više radne snage te obradu rezultata. Na kraju će se odrediti i aromatski profil ekstrakata kadulje dobivenih primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja te izraziti postotak najzastupljenijih hlapivih komponenti, sastavnica eteričnog ulja ove autohtone mediteranske biljke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KADULJA

Kadulja (*Salvia officinalis*) je ljekovita i aromatična biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Porijeklom je s priobalja Balkanskog poluotoka i jadranskih otoka, a danas je rasprostranjena u kulturi Europe i Sjeverne Amerike. U Hrvatskoj se može naći kao samonikla biljka u primorju, Dalmaciji i dalmatinskom zaleđu gdje raste na osunčanim obroncima kamenjara i vapnenastom tlu, zalazeći visoko (do 1000 m) u područje priobalnih krških planina. Iz tog podneblja se i danas uglavnom skuplja iz prirode, suši i izvozi kao najkvalitetnija ljekovita kadulja u svijetu (Žutić, 2007).

Kadulja je višegodišnja zimzelena biljka grmolikog oblika životnog vijeka do desetak godina te je vrlo otporna na sušu (Dragović-Uzelac, 2017). Ima račvasti drvenasti korijen koji duboko prodire u tlo te zeljastu slaborazgranjenu pri dnu drvenastu stabljiku (Žutić, 2007). Listovi su jajastog do izduženo kopljastog oblika smješteni unakrsno-nasuprotno te prekriveni dlačicama sivobijele boje, dok su mladi izdanci svijetlozeleni do ljubičasti (Slika 1.). Cvat je klasast te se sastoji od 2 do 8 cvjetova plave, ružičaste ili bijele boje i vrlo ugodna mirisa koji privlači pčele. Kadulja je biljka toplog podneblja i klija pri temperaturi od 12 do 15°C, može i pri temperaturi 6-8 °C, no tada klija sporije. Početni razvoj je vrlo spor, rijetko cvate u prvoj godini, no u drugoj procvate vrlo rano. U uvjetima kontinentalne klime cvjetanje započinje početkom svibnja te traje do kraja lipnja (ljekovito bilje, brošura). Biljka obično nosi od 100 do 150 cvatova, a razmnožavati se može generativno (sjemenom) i vegetativno (reznicama, povaljenicama) (Žutić, 2007).



Slika 1. Kadulja (Anonymous 1, 2019)

2.1.1. Kemijski sastav

Kadulja sadrži eterično ulje koje se nalazi u cijelom nadzemnom dijelu biljke, a najviše u listovima (Dragović-Uzelac, 2017). Vrsta *S. officinalis* sadrži 1 – 2,5 % eteričnog ulja, tanine, smole te gorke tvari, čiji je kemijski sastav uvjetovan zemljopisnim porijeklom i vremenom berbe biljke. Glavni djelotvorni antioksidativni fenolni spojevi su fenolne kiseline, derivati karnozola i flavonoidi, zatim ružmarinska kiselina, karnozinska kiselina i karnozol te kafeinska kiselina. Međutim, nekoliko autora je pokazalo da su neki od najučinkovitijih antioksidacijskih spojeva, poput karnozinske kiseline i karnozola, vrlo nestabilni te ovise o faktorima kao što su temperatura, svjetlo, kisik i otapalo koje se koristi kod ekstrakcije (Santos-Gomes i sur., 2002). Postotak eteričnog ulja ljekovite kadulje na hrvatskim prostorima je najveći u listovima kadulje ubrane u mjesecu srpnju. Najzastupljenije sastavnice tog eteričnog ulja su monoterpeni: α - i β - tujon (do 50 %), 1,8-cineol (15 %), (+)-kamfor, (-)-borneol i bornilacetat. Pojedina ulja kadulje sadrže i fenole, timol i karvakrol (Kuštrak, 2005). Najcijenjenija je dalmatinska kadulja jer sadrži najviše tujona (Dragović-Uzelac, 2017). Sadržaj tujona u kadulji je vrlo promjenjiv te se obično razlikuju tri kemotipa: s niskim (9 %), srednjim (22-28 %) i visokim (39-44 %) sadržajem tujona koji također ovisi o uvjetima sušenja, vremenu berbe i sezonskim varijacijama, geografskim i klimatskim uvjetima i gnojidbi, te pokazuje gradijent čak i unutar jedne individue. Način priprema uzoraka, primjerice pomoću parne destilacije ili ekstrakcijom otapala, također može imati utjecaja na sadržaj tujona (Walch i sur., 2011).

2.1.2. Djelovanje i upotreba

Namjena kadulje je raznolika pa su tako mladi ogranci i listovi te eterična ulja pronašla primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, medicini, prehrambenoj industriji i kulinarstvu (Dragović-Uzelac, 2017). Ljekovita, aromatična, antiseptička i antioksidativna svojstva opravdavaju upotrebu eteričnog ulja u farmaceutskoj industriji u obliku pripravaka za njegu usne šupljine i desni, u kozmetičkoj industriji kao sredstva za njegu kože, kose i zubiju te kao sapuni i deterdženti te u prehrambenoj industriji kao začini i konzervansi (Žutić, 2007). Ljekovitost se uglavnom pripisuje fenolnim kiselinama, fenolnim glikozidima, diterpenoidima i flavonoidima koje vrsta *S. officinalis* sadrži u velikim količinama (Capek i Hřibalová, 2004). Čaj od kadulje služi za obloge za rane te za ispiranje usta i grla radi dezinfekcije. Ima jaki

fiziološki utjecaj na vitalne organe čovjeka ali ipak se najčešće upotrebljava kao eterično ulje (Dragović-Uzelac, 2017). Kadulja se zbog sadržaja bioaktivnih tvari može koristiti kao biljni lijek koji se prodaje u obliku biljnog čaja i kao tekući ekstrakt ili tinktura te je stoga ovisno o namjeni regulirana kao hrana ili kao lijek.

2.2. EKSTRAKCIJA ZELENIM OTAPALIMA

Izolacija fenolnih spojeva iz biljnih materijala postiže se postupkom ekstrakcije pri čemu dolazi do potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Dai i Mumper, 2010). Ekstrakcija "zelenim otapalima" ili tzv. zelena ekstrakcija temelji se na principu ekstrakcije gdje će se smanjiti potrošnja energije, omogućiti korištenje obnovljivih biljnih materijala i alternativnih otapala koja nisu štetna za okoliš, osigurati siguran i kvalitetan proizvod te na kraju zbrinuti otpad. Brojna istraživanja upravo su posvećena "zelenim otapalima" za koja je dokazano da svojim raspadom na pojedine komponente ni na koji način ne štete prirodi (Anastas i Eghbali, 2010). Prednosti su te da imaju veliku moć otapanja i pružaju visok prinos produkata, biorazgradiva su, netoksična i nezapaljiva, a njihove limitacije vezane su za cijenu, viskoznost i temperature vrenja. Vrste "zelenih otapala" koja se najčešće koriste su: voda, etanol, superkritični fluidi, metilni esteri, terpeni, itd., a odabir pojedinog ovisi o više čimbenika, uključujući i kategoriju spojeva koje želimo izolirati. Etanol je najčešće "zeleno otapalo", a dobiva se fermentacijom biljnih materijala bogatih šećerom poput šećerne repice ili žitarica. Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, koristi se u velikoj mjeri jer je lako dostupan, jeftin, visoke je čistoće i potpuno je biorazgradiv, a i dobro ekstrahira polarne komponente iz prethodno pripremljenog biljnog materijala (Chemat i sur., 2012). U ovom istraživačkom radu kao otapalo za ekstrakciju koristila se smjesa vode i etanola u različitim omjerima, te čista voda koja je univerzalno otapalo, potpuno je sigurna i ne predstavlja nikakvu opasnost za okoliš ni za ljude.

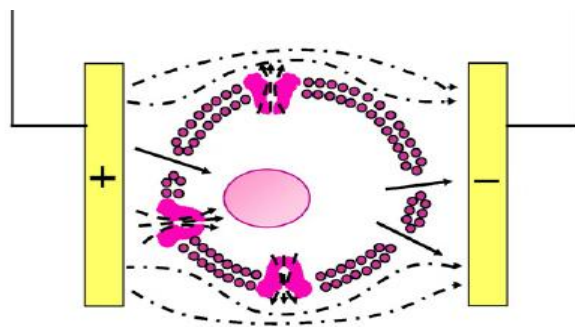
Za razliku od navedenih prednosti koje opisuju zelenu ekstrakciju, konvencionalne metode ekstrakcije rabe hlapiva organska otapala u velikim količinama koja isparavaju u atmosferu i stvaraju "efekt staklenika", troše puno energije zbog dugotrajnosti procesa i često se provode pri povišenoj temperaturi te ne ostvaruju potpuno iskorištenje procesa. Kako bi se prevladali nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije, znanstvenici, istraživački i industrijski sektor uviđaju prednosti novih netoplinskih metoda i okreću se načelima zelene

kemije čiji je koncept prvi put spomenut na početku devedesetih godina prošlog stoljeća. Znanstvenici Paul Anastas i John Warner 1998. godine osmislili su dvanaest načela zelene kemije koja su dizajnirana kao pomoć kemičarima za postizanje cilja održivosti što uključuje pomno planiranje kemijskih procesa kako bi se minimizirale potencijalne štetne posljedice. Načela zelene kemije odnose se na poznavanje učinka na okoliš te ekonomskih učinaka energetske zahtjeva kemijskih procesa, obnovljive sirovine i materijale, neškodljive degradacijske produkte, održivu djelotvornost i smanjenu toksičnost. Zelena ekstrakcija je jedno od bitnijih polja zelene kemije i dobiva sve veću važnost, a njezin cilj je proizvesti proizvode i procese koji su profitabilni, ali da svojim svojstvima ne škodi ljudskom zdravlju ni okolišu (Chemat i sur., 2012).

Za uspostavljanje inovativnih procesa zelene ekstrakcije potrebno je osigurati novu i inovativnu tehnologiju, agro-otapala, intenzivirati proces te omogućiti štednju energije (Chemat i sur., 2012). Neki primjeri smanjenja potrošnje energije su ponovna uporaba energije te primjena inovativnih tehnologija kao što su aktivacija mikrovalovima, ultrazvukom ili hladnom plazmom i primjena alternativnih otapala, npr. superkritičnih fluida (CO₂ i voda), ionskih kapljevine, eutektičnih i zelenih otapala.

2.3. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE

Inovativne tehnologije danas se sve više istražuju zbog njihovog značaja u ostvarivanju veće profitabilnosti i manje štetnosti na okoliš te upravo zbog svojih prednosti nastoje zamijeniti konvencionalne metode i njihove nedostatke. Jedna od novih metoda za ekstrahiranje sadržaja iz biljnih materijala je ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem koja uzrokuje fenomen elektroporacije čime je omogućena učinkovitija i brža ekstrakcija unutarstaničnih komponenti. Sama metoda temelji se na električnom izboju između dvije elektrode uslijed djelovanja visokog napona i nastajanju hladne plazme. Kada se stanice nađu u električnom polju, otvaraju se pore staničnih membrana pri čemu dolazi do oslobađanja biomolekula iz stanica – tzv. fenomen elektroporacije (Slika 2.) (Rajha i sur., 2015).



Slika 2. Elektroporacija (He i sur., 2008)

Za nastajanje hladne plazme potrebno je česticama plina osigurati energiju iz vanjskog izvora, a to se postiže električnim pražnjenjem plina koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije. Nastalo električno polje uzrokuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anoda), dok je pozitivna jezgra privučena od strane negativne elektrode (katoda). Povećanjem napona, povećava se i naprezanje u atomima sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode. U drugoj fazi dolazi do naglog porasta jakosti struje, nakon čega slijedi električno pražnjenje, odnosno pad jakosti struje pri čemu se oslobađa energija - ta faza dovodi do stvaranja lokalizirane plazme (Boussetta i Vorobiev, 2014). Boja plazme ovisi o plinu koji se koristi, a nastaje kao posljedica povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje pri čemu se emitira energija u vidljivom dijelu spektra. U laboratorijskoj primjeni najčešće korišteni plinovi su argon, dušik, ugljikov dioksid i helij (Fridman, 2008).

U elektrostatskom smislu, plazma je kvazineutralna što znači da je makroskopski gledano neutralna, ali su njezini dijelovi električki nabijeni (Fridman, 2008). Sa znanstvenog stajališta, sva poznata materija u svemiru dijeli se na četiri agregatna stanja: čvrsto, tekuće, plinovito i plazma stanje tvari. Dakle, plazma predstavlja četvrto agregatno stanje potpuno ionizirane tvari. Dovođenjem energije, odnosno zagrijavanjem krutine, tekućine ili plina povećava se kinetička energija sastavnih čestica koje prelaze na viša energetska stanja i u mogućnosti su savladati međumolekulske sile što dovodi do faznih prijelaza. No, mora se naglasiti da u termodinamičkom smislu ovaj prijelaz nije fazni zbog toga što se javlja postupno s promjenom, tj. povećanjem temperature. Ako se osigura dovoljna količina energije, molekularni plin će postupno disociirati u atomizirani plin kao posljedica sudara između čestica, čija kinetička energija prelazi energiju molekularnih sila. Na dovoljno visokim temperaturama, sve veći dio atoma sadržavat će dovoljnu količinu kinetičke energije, te sudari postaju toliko intenzivni da dolazi do oslobađanja elektrona pri čemu nastaju

negativno nabijeni elektroni i pozitivno nabijeni ioni. Nastaje elektromagnetsko polje i dobiva se energija za daljnju ionizaciju plina, odnosno nastajanje plazme (Bittencour, 2004).

U električnim pražnjenjima karakterističnima za plazmu koja se generira u laboratorijskim uvjetima koristi se termin - hladna plazma, tj. neravnotežna netermička plazma. Razlog tome je što se ne zagrijavaju jednoliko cijeli atomi pa se zapravo proces odvija pri sobnoj temperaturi. Energija iz električnog polja prvo se prenosi na elektrone, a zatim na ostale čestice rezultirajući višom temperaturom elektrona koji zbog razlike u masi ne može prenijeti tu količinu energije na druge teže čestice prisutne u plazmi, odnosno jezgre atoma (temperatura elektrona je oko 10 000 K, dok je ostatak čestica plazme na sobnoj temperaturi) (Fridman, 2008).

Hladna plazma nastaje uslijed djelovanja visokog napona, a u tekućini uzrokuje formiranje udarnih valova i visokointenzivnog UV svjetlo. Uz to nastaju i kavitacijski mjehurići ispunjeni plinom, a njihovim pucanjem dolazi do stvaranja sekundarnih udara i turbulencije te slabljenja tj. rupture staničnih struktura zbog električnog pražnjenja. Isti fenomeni mogu dovesti do fragmentacije tretiranog materijala (na makroskopskom nivou) i nastajanja turbulencije u tekućini što ubrzava procese izlaska biomolekula iz stanica biološkog materijala (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Netoplinska tehnika visokonaponskog električnog pražnjenja omogućava povećanje brzine ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala s minimalnim utroškom energije te u posljednje vrijeme dobiva sve veću primjenu u prehrambenoj industriji. Za uspješnost ove metode i rezultate sa što većim prinosima potrebno je osigurati optimalne uvjete ekstrakcije - napon, temperaturu i vrijeme trajanja, u skladu s materijalom koji se tretira i ciljanom komponentom koju želimo ekstrahirati (Boussetta i sur., 2012).

2.4. FENOLNI SPOJEVI

Ljekovite biljne vrste su zbog svog kemijskog sastava bogatog bioaktivnim spojevima predmet brojnih znanstvenih istraživanja kojima je cilj identificirati vrste prisutnih tvari i učinke njihovih aktivnih sastojaka. Ti aktivni sastojci su najčešće sekundarni metaboliti, tj. spojevi sintetizirani u biljkama koji sudjeluju u interakcijama biljke s okolinom. Najpoznatiji sekundarni metaboliti su fenolni spojevi kojima su iznimno bogate ljekovite biljke.

Polifenoli su glavni biljni sekundarni metaboliti koji su povezani s različitim funkcijama u biljkama, uključujući apsorpciju, sintezu proteina, aktivnost enzima, fotosintezu i sl., odgovorni su za glavna organoleptička i nutritivna svojstva hrane, a ekstrahirani iz biljnih materijala nalaze i brojne praktične primjene. Popularnost fenolnih spojeva posljednjih godina, kako za potrošače tako i za proizvođače i istraživačke skupine, posljedica je njihovog iznimnog antioksidacijskog djelovanja koje ima ulogu u prevenciji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao što su degenerativne bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih oboljenja. Učinak polifenola na ljudsko zdravlje ovisi o unesenoj količini i njihovoj bioraspoloživosti (Manach i sur., 2004).

Njihova uloga u biljkama je zaštita biljke od UV zračenja, ekstremnih temperatura, zagađenja zraka, infekcija i sl. te utječu na senzorske karakteristike, pigmentaciju i oksidacijsku stabilnost biljnih vrsta. Visok udio polifenola može uzrokovati gorčinu i trpkost proizvoda (Naczk i Shahidi, 2004). Sastav i koncentracija polifenola varira ovisno o vrsti biljke ali i tehnikama uzgoja, procesu zrenja, vremenu berbe te uvjetima obrade i načinu skladištenja (Naczk i Shahidi, 2006).

Polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih proizvoda u biljnom svijetu, a trenutno je poznato više od 8000 fenolnih struktura (Tsao, 2010). Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina sa širokim rasponom polimerizacije (Bravo, 1998). Fenolni spojevi mogu biti jednostavni poput fenolnih kiselina, ali i visokopolimerizirane molekule poput lignina i tanina. Glavna podjela polifenola je fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavoni), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) i ostale polifenolne spojeve kao što su kumarini i lignani (Naczk i Shahidi, 2006), a osim toga polifenoli se mogu povezivati s različitim ugljikohidratima i organskim kiselinama ili međusobno (Manach i sur., 2004). U prirodi su fenolni spojevi najčešće prisutni kao konjugati s mono- i polisaharidima, povezani s jednom ili više fenolnih skupina, a mogu se pojaviti i kao esteri i metilni esteri (Balasundram i sur., 2005).

Kao antioksidansi nadopunjavaju funkcije vitamina i enzima u cilju obrane od oksidativnog stresa uzrokovanog viškom reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala. Polifenoli potiskuju stvaranje slobodnih radikala čime se smanjuje brzina oksidacije inhibicijom ili deaktiviranjem aktivnih vrsta i prekursora slobodnih radikala (Tsao, 2010). Antioksidacijsko

djelovanje fenolnih spojeva povezuje se upravo s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala te zaustavljanja lančanih oksidacijskih reakcija (Kazazić, 2004). Nadalje, polifenoli imaju sposobnost vezanja prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima te inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

Općenito, svojstva fenolnih spojeva možemo podijeliti na: farmakološke učinke i nutritivna svojstva. Kod nutritivnih svojstava, najvažnije svojstvo je interakcija fenolnih spojeva s proteinima, no mogu tvoriti komplekse i s ugljikohidratima, a ulaze u interakcije čak i s mineralima i vitaminima te na taj način smanjuju njihovu dostupnost u organizmu (Shahidi i Naczk, 1995). Moguća je također i interakcija između flavonoida i fenolnih kiselina s drugim fiziološkim antioksidansima. Ipak, kao i ostali antioksidansi, flavonoidi mogu djelovati i kao prooksidansi u posebnim okolnostima. Interakcije molekula niske molekulske mase, poput fenolnih kiselina i flavonoida, s makromolekulama može mijenjati njihova kemijsko-fizikalna svojstva. Različite studije potvrđuju da fenoli imaju sposobnost modificiranja pojedinih enzima kao što su npr. hidrolaze, transferaze, kinaze, oksidaze, itd. (Pietta i sur., 2003).

Antioksidacijska svojstva polifenola postala su sve interesantnija prehrambenoj industriji zbog moguće primjene fenolnih spojeva u zaštiti lako oksidirajućih sastojaka hrane te primjene polifenola u liječenju i prevenciji mnogih bolesti uzrokovanih neravnotežom oksidacijskih procesa u tijelu (Scalbert i sur., 2005). Upravo iz spomenutih navoda korisne primjene, kako bi se postigao što veći unos količine polifenola, cilj je ekstrahirati fenolne spojeve s antioksidacijskom aktivnošću te proizvesti ekstrakte koji će omogućiti njihovu implementaciju u druge prehrambene proizvode ili dobiti farmaceutsku primjenu.

2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva predstavlja sposobnost neutralizacije nastalih slobodnih radikala te sprječavaju njihovu pojavu, doniranjem atoma vodika ili elektrona, uz nastajanje manje reaktivnog fenoksilradikala. Iz kemijske točke gledišta, molekule fenolnih kiselina, nakon što doniraju elektron ili atom vodika, same postaju

slobodni radikali, no nastali radikali su znatno manje aktivni, premda ukoliko je njihova koncentracija visoka mogu potencijalno izazvati prooksidacijske reakcije (Tsao, 2010). Slobodni radikali su kemijske vrste koje imaju kratki vijek trajanja jer sadrže jedan ili više nesparenih elektrona te ih takva nepotpuna elektronska konfiguracija čini nestabilnima i izrazito reaktivnima. Zbog toga takve nestabilne vrste teže primanju ili doniranju elektrona od drugih molekula, sudjelovanjem u redoks reakcijama, a zatim novonastali slobodni radikali ponovno reagiraju s drugim molekulama što posljedično dovodi do oštećenja staničnih struktura (Chandra i sur., 2010). Nespareni elektron se može nalaziti na bilo kojem atomu, pa tako postoje slobodni radikali, odnosno reaktivne radikalske vrste kisika, dušika, klora, itd. Također, postoji podjela na radikalske i neradikalske (oksidacijska sredstva koja lako prelaze u radikale) vrste.

Reaktivne kisikove čestice nastaju i tijekom normalnog staničnog metabolizma, no pojačano se stvaraju u uvjetima stresa uzrokovanog štetnim djelovanjem različitih biotičkih i abiotičkih faktora, odnosno uslijed neravnoteže oksidacijskih procesa. Slobodni radikali poput reaktivnih kisikovih čestica i reaktivnih dušikovih čestica uzrokuju oksidativna oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina, stoga su upravo antioksidansi koji neutraliziraju slobodne radikale od velike važnosti u prevenciji nastanka raznih bolesti. Flavonoidi i drugi biljni fenoli, kao što su fenolne kiseline, lignani, lignini i tanini, ističu se po svom visokom redoks potencijal (Kahkonen i sur., 1999). Antioksidacijsko djelovanje polifenola kadulje, koje podrazumijeva flavonske glikozide i niz derivata ružmarinske kiseline, posjeduje sposobnost uklanjanja dušikovog radikala i superoksidnog aniona (Lu i Foo, 2001). Različite fenolne kiseline pokazuju nejednaku moć uklanjanja slobodnih radikala, a razlog leži u supstituentima prisutnima na aromatskom prstenu koji utječu na stabilizaciju molekula (Robbins, 2003). Nadalje, utvrđeno je da antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina raste s povećanjem broja hidroksilnih grupa u aromatskom prstenu, a hidroksilne grupe u *orto*- i *para*- položaju doprinose jačoj antioksidativnoj i antiradikalskoj aktivnosti (Sroka, 2005).

Antioksidansi mogu djelovati na dva različita načina:

1. HAT (eng. *Hydrogen Atom Transfer*) - hvatati slobodne radikale, donirajući atom vodika
2. SET (eng. *Single Electron Transfer*) - prenositi jedan elektron, kako bi reducirali metalne ione, radikale i karbonile

Radikali dobiveni iz antioksidansa s molekularnim strukturama poput fenola, stabilne su vrste i djeluju povoljno na način da će zaustaviti oksidacijsku lančanu reakciju.

Kemijske metode koje se najčešće koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka zasnivaju se na spektrofotometrijskom praćenju promjene koncentracije nekog od reaktanata ili produkata reakcije antioksidanasa sa slobodnim radikalima. Najčešće korištene spektrofotometrijske metode koje se danas koriste su DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda, ABTS/TEAC (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina/Trolox Equivalents Antioxidant Capacity) metoda, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda i Folin–Ciocalteu (FC) metoda koja služi za određivanje koncentracije ukupnih fenola te određuje ukupan redukcijski kapacitet uzorka (Sikorski i Kolakowska, 2011).

U ovom radu antioksidacijska aktivnost određivana je FRAP i DPPH metodom koje se zasnivaju na različitom principu, pa tako i u reakcije ulaze različiti antioksidansi. Metoda DPPH uključuje vezanje vodika od strane antioksidansa na DPPH radikal, dok FRAP metoda uključuje sposobnost antioksidansa da reducira ion željeza doniranjem elektrona (mjeri redukcijski kapacitet), iako su obje metode temeljene na izmjeni elektrona. DPPH metoda se koristi za mjerenje antioksidacijske aktivnosti iz razloga što dobro simulira reaktivne kisikove i dušikove oblike koji se nalaze u biološkim sustavima.

2.6. BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (NIR), ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA (PCA) I REGRESIJA GLAVNIH KOMPONENATA (PCR)

Nakon provođenja analitičkih metoda često se primjenjuju tehnika blisko-infracrvene spektroskopije (NIR) i kemometrijske multivarijantne statističke analize (PCA i PCR) kako bi se pojasnio sastav ekstrakata. NIR analiza (eng. *Near InfraRed*) proučava interakcije elektromagnetskog zračenja i materije te nam daje informacije o sastavu i građi tvari. Analiza glavnih komponenata (PCA, eng. *Principal Component Analysis*) se često koristi u obradi NIR spektara u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka, odnosno prepoznavanje najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara koji sadrže veliku količinu informacija o jednom uzorku (Abdi i Williams, 2010). Kao rezultat analize dobiva se slikovni prikaz u kojem su uzorci grupirani prema sličnosti u kvadrante (Jednačak i Novak, 2013). Za regresiju glavnih komponenata (PCR, eng. *Principal Component Regression*) koriste se PCA grafički prikazi kao temelji, a upravo zahvaljujući korelacijskim vezama među varijablama lako je proučiti njihov odnos. PCR potencijalno postiže redukciju velikog broja varijabli do skromnog modela, što može služiti za modeliranje i za predviđanje budućih opažanja, budući

da se u PCR metodi dobiveni rezultati glavnih komponenti koriste kao regresijske varijable za izgradnju predikcijskog modela.

Bliskoinfracrvena spektroskopija koristi infracrveno područje elektromagnetskog spektra od 780 nm do 2500 nm. Princip rada je uključuje prenošenje infracrvenog zračenja optičkim vlaknom iz izvora do sustava leća, a potom se ono usmjerava prema uzorku gdje dolazi do njegove djelomične apsorpcije. Propušteno zračenje se na kraju prenosi pomoću optičkog vlakna natrag do detektora. Dobiveni NIR spektri odlikuju se vrlo visokim omjerom signala i šuma, a intenzitet i položaj pojedinih vrpci može se vrlo precizno odrediti (Jednačak, 2013). NIR spektar obuhvaća kombinacije vibracijskih vrsta i overtone koji sadrže C-H, O-H i N-H kemijske veze, a dobivaju se preklapanjem odgovarajućih apsorbanacija (Alishahi i sur., 2010). Zbog slabe apsorpcije vode i stakla, omogućeno je analiziranje uzoraka vodenih otopina u staklenim tikvicama ili reaktorima, bez nužne korekcije pozadinskog signala (Jednačak, 2013). NIR spektroskopija pokazala se kao vrlo učinkovita i napredna tehnika za praćenje i kontrolu procesa u prehrambenoj industriji, kao i za kontrolu kvalitete prehrambenih proizvoda (Herceg i sur., 2016). Glavna prednost NIR-a leži u tome što najčešće nije potrebna priprema uzoraka, pa je analiza vrlo brza (15-90 s) i jednostavna, a omogućeno je istovremeno mjerenje nekoliko sastavnih komponenti. Riječ je o neinvazivnoj i ekološki prihvatljivoj metodi s niskim troškovima rada, koja prikuplja podatke o spektru mjenenog uzorka, te se brzo dolazi do rezultata koji su spremni za on-line obradu primjenom kemometrijskih alata. Još jedna od njenih prednosti svakako je mogućnost analize različitih vrsta uzoraka, od krutih uzoraka, preko tekućina do raznih pasta (Jednačak i Novak, 2013), a primjer NIR analizatora prikazan je na Slici 3.



Slika 3. NIR spektrofotometar (Anonymous 3, 2019)

Analiza glavnih komponenata je metoda koja se rabi u kemometriji, posebnoj grani analitičke kemije, koja uključuje uporabu matematike, statistike i računala u kemijskoj analizi bez postavljenog fizičkog modela. Princip PCA analize baziran je na grupiranju seta podataka u određene manje odjeljke, koji najbolje opisuju njihovu povezanost, omogućavajući na taj način brzu i pouzdanu interpretaciju rezultata, a da se pritom zadrži većina informacija iz prvotnog velikog seta podataka. Dobiveni se podaci prikazuju kao točke u n -dimenzijskom prostoru, u kojem svaki vektor predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak, 2013), odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini. Uvođenjem glavnih komponenti (eng. PC, *Principal Components*), koje zapravo predstavljaju linearne kombinacije određenog broja varijabli, smanjuje se dimenzionalnost sustava. PCA je statistička obrada koja uključuje ortogonalnu transformaciju kako bi skup promatranja koreliranih varijabli pretvorila u skup vrijednosti linearno nekoreliranih varijabli. Prva glavna komponenta (PCA 1) je linearna kombinacija onih podataka koji imaju najveću varijancu i kojoj pripada najveći dio varijacije uzoraka, nakon čega slijede redom PCA 2, PCA 3, PCA 4 itd., od kojih svaka sljedeća obuhvaća sve manji iznos varijacija u setu podataka koji se obrađuju. Glavne komponente su međusobno ortogonalne i orijentirane tako da predstavljaju sljedeću najveću varijaciju među podacima (Metrohm, 2013).

Primjenom PCR metode rješava se problem višestruke regresije, odnosno sprječavaju se nerealne procjene zavisne varijable i slični matematički problemi. PCR metoda koristi se ukoliko broj osnovnih komponenata prelazi broj kalibracijskih pokazatelja. Broj osnovnih komponenata se može reducirati koristeći nekolicinu nezavisnih varijabli. Ova metoda daje zadovoljavajuće rezultate što omogućava uzimanje u obzir većine varijacija između glavnih komponenata i predviđanje zavisne varijable (Miller i Miller, 2000).

2.7. PLINSKA KROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata među dvije faze, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne). Mobilnu fazu čini inertni plin (npr. N₂, He, Ar, H₂) koji ispire komponente smjese u koloni koja je napunjena stacionarnom fazom. Za razliku od tekućinske kromatografije, kod plinske kromatografije analit ne reagira s mobilnom fazom. Stacionarna faza je čvrsta tvar na koju se adsorbiraju analizirane komponente smjese (Radić i Kukoč Modun, 2017).

Metoda GC-MS temelji se na razdvajanju i detekciji hlapivih organskih spojeva i nekih anorganskih plinova iz smjese na način da se hlapljivi sastojci u plinu nosiocu uvode u kromatografsku kolonu ispunjenu krutom ili tekućom nepokretnom fazom. Analit se injektira u injektor kromatografa gdje dolazi do miješanja analiziranog uzorka s mobilnom fazom tj. plinom nosiocem koji odnosi komponente smjese na kolonu (Marčec, 2015). Uzorak ulazi u kapljevitom stanju, ali zbog visoke temperature na početku kolone koja se nalazi u termostatiranom prostoru, prelazi u plinovito stanje. Visoka temperatura i struja inertnog plina pomažu da se otklone tvari koje bi mogle onečistiti uzorak, a osim toga visoka temperatura sprječava kondenzaciju uzorka na putu do detektora (Čulina, 2018). Prolaskom kroz kolonu smjesa tvari se razdjeljuje između stacionarne i mobilne faze na osnovi različitih topljivosti u nepokretnoj fazi. Polarni spojevi se najduže zadržavaju na koloni čija je stacionarna faza polarna, pa će stoga imati najdulje retencijsko vrijeme (Marčec, 2015). Retencijsko vrijeme je vrijeme injektiranja uzorka pojave signala na detektoru. Svaka tvar ima svoje vrijeme zadržavanja te je karakterističan parametar za svaku komponentu (Čulina, 2018). Ključno je da je polarnost stacionarne faze kolone što sličnija analitu kako bi se razdvajanje baziralo na vrelištu molekula. Komponenta koja prva izlazi iz kolone je najslabije topljiva u stacionarnoj fazi. Na izlazu iz kolone, odijeljene komponente ulaze u detektor masenog spektrometra (Marčec, 2015). Maseni spektrometar detektira strukturne informacije odijeljenih komponenti uzorka tako da se analiziraju molekule na temelju njihove mase (m) i naboja (z) (Marčec, 2015). Molekula je bombardirana strujom elektrona visoke energije te fragmentacijom dolazi do njezinog cijepanja, a fragmenti uzorka su raspodijeljeni prema omjeru m/z , prilikom čega većina detektiranih fragmenata ima naboj $+1$. Nabijeni molekulski ion i fragmenti prolaze kroz analizator koji ih raspoređuje prema omjeru m/z (Škorić, 2018). Kao detektor u plinskoj kromatografiji koristi se maseni spektrometar (MS; GC-MS). Rezultati analize hlapljivih sastojaka uzoraka vidljivi su na računalu spojenom na GC-MS uređaj kao kromatogram na kojem x-os označava retencijsko vrijeme (RT), dok y-os označava visinu pika izdvojenih hlapljivih spojeva (Marčec, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

- osušeni i usitnjeni listovi kadulje (berba 2018.)

3.1.2. Reagensi

- otapalo: destilirana voda i etanol (etanol 96 %-tni, Gram-Mol, Zagreb) : voda
- Folin-Ciocalteuov reagens (FC reagens) (Kemika, Zagreb)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- standard galne kiseline (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- 100 %-tni metanol (J.T. Baker, Nizozemska)
- 70,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (Sigma-Aldrich, SAD))

Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl (CARLO ERBA Reagents, a Dasit Group S.p.A, Italija)

Priprema: 330 μ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.

- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6

Priprema: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T. Baker, Nizozemska) u odmjernej tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl_3

Priprema: 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ otopi u 10 ml destilirane vode, otopina se priprema svježa.

- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)

Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernej tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja.

- Standard željezo (II)-sulfat septahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD)

Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Odvažuje se 0,139 g željezo (II)-sulfat heptahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilroman-2-karbonska kiselina) (0,02 M) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu troloxa u koncentraciji $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. 500 mg troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernej tkvici od 100 mL. Otopinu troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

- FRAP reagens

Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl_3 (omjer 10:1:1).

3.1.3. Aparatura i pribor

- odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 1 L
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- staklena posuda 20 mL

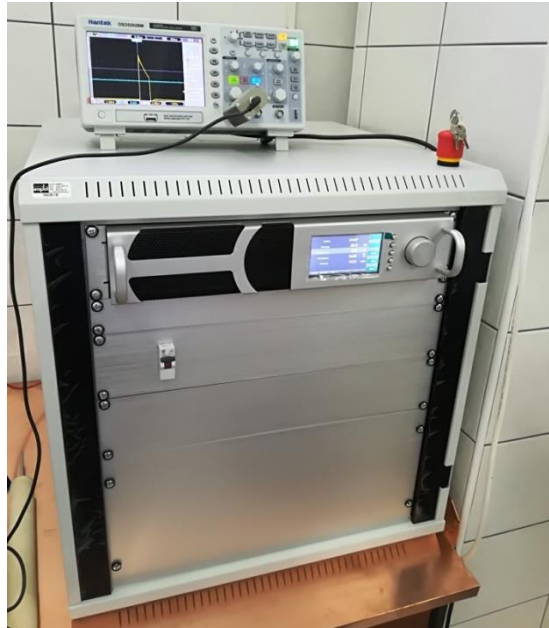
- vodena kupelj
- staklene kivete
- spektrofotometar (Spectrophotometer Secomam Uviline 9400, Secomam, Ales, Francuska)
- tehnička vaga (Axis, Spolka z o.o., Gdansk, Poland)
- analitička vaga (Sartorius GMBH Gottingen, Germany)
- mikropipete, volumena 100 μ L i 1000 μ L
- staklene čaše volumena 50 mL, 250 mL i 500 mL
- termometar
- menzura, volumena 100 mL, 250 mL i 1 L
- staklene epruvete
- plastična ladica za vaganje
- stalak za epruvete
- generator hladne plazme (IMP-SSPG-1200, Impel grupa, Zagreb, Hrvatska)
- Büchnerov lijevak
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR- 128-1.7-USB/6.25/50 μ m
- štoperica
- falkonice od 50 mL
- tehnička vaga Adam PGW 1502i (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- vodenu kupelj s termostatom (Heidolph EKT 3001, Njemačka)
- držač za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (Supelco Co., SAD)
- sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies (Santa Clara, SAD): plinski model 7820A i spektrometar masa model 5977E MSD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva primjenom visokonaponskog pražnjenja

U ovom se eksperimentalnom istraživanju ekstrakcija provodi u generatoru IMP-SSPG-1200 (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska), koji generira hladnu atmosfersku plazmu u

uzorku na način da dolazi do ionizacije plina (argon ili dušik). Korišteni plazma generator prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Plazma generator

Tehnički parametri plazma generatora IMP-SSPG-1200:

- podesivost napona istosmjerne struje u području 1 kV do 30 kV
- podesivost maksimalne istosmjerne struje 40 mA (30 kV)
- generiranje pravokutnih impulsa (čvrsto stanje) iz visokog napona istosmjerne struje (max. 100 kHz)
- industrijski komunikacijski standardi RS485 MODBUS za proširivost prema vanjskim uređajima (analogni i digitalni I/O modul, senzori, pretvarači)
- TCP/IP s web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje
- napajanje 230 V, 50 Hz – gradska mreža
- ambijentalna temperatura 5 °C – 40 °C , ambijentalna vlažnost 10 % – 90 %
- forsirano zračno hlađenje



Slika 5. Visokonaponsko električno pražnjenje u suspenziji

Prije ekstrakcije uzorak je potrebno pripremiti. Lišće kadulje se prethodno usitni profesionalnim uređajem za usitnjavanje (Grindomix GM 300, RETSCH, Retsch GmbH, Germany). Izvaže se 1 g osušenog i usitnjenog lišća kadulje te se pomiješa s 50 mL odgovarajućeg otapala (voda i etanol:voda). Ekstrakcija pripremljenog uzorka potpomognuta je tretmanom visokonaponskog električnog pražnjenja (Slika 5.) gdje se generira hladna atmosferska plazma u uzorku određeno vrijeme pri odgovarajućim uvjetima napona i frekvencije. Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Buchnerovog lijevka te prikuplja u falcon epruvete za daljnju analizu.

Ekstrakcija pripremljenih uzoraka kadulje provodila se u trajanju od 3 ili 9 minuta kod korištenja visokonaponskog pražnjenja kao i kod klasične metode koja je uključivala samo ekstrakciju, odnosno maceraciju, u 50 mL otapala različitih omjera etanola i vode. Nova ispitivana metoda koristila je generator plazme koji je služio za ionizaciju plina - argona ili dušika, a korišteni naponi bili su 15 ili 20 kV za argon i 20 ili 25 kV za dušik te frekvencija od 100 Hz. Kako bismo zaključili koji su optimalni uvjeti ekstrakcije, kao varijabla postavljen je i udio etanola u vodi, pa je tako kao otapalo u kojem se nalazila kadulja korištena voda s 0 % etanola, vodena otopina s 25 % etanola i vodena otopina s 50 % etanola. Sukladno tome uzorcima su dodijeljene različite oznake prikazane u Tablici 1. koje su povezane s određenim parametrima ekstrakcije. Slova u nazivu uzoraka koji nisu tretirani hladnom plazmom

objašnjavaju pojam "netretirana kadulja" = NK, pojašnjeno na jednom primjeru oznaka 3NK0/1 označava uzorak netretirane kadulje, vrijeme trajanja ekstrakcije je 3 minute u 0 % otopini etanola, odnosno u čistoj vodi, a 1 na kraju označava 1 gram uzorka. Tretirani uzorci sadržavaju dva slova gdje prvo označava kadulju, a drugo slovo u nazivu uzorka sugerira korišteni plin – A za argon, N za dušik te broj koji im je pridružen kronološki, pa je parametre potrebno očitati iz Tablice 1.

Tablica 1. Oznake analiziranih uzoraka kadulje s pridruženim parametrima ekstrakcije

oznaka uzorka	vrijeme tretiranja (min)	% EtOH	oznaka uzorka	vrijeme tretiranja (min)	napon (kV)	% EtOH	oznaka uzorka	vrijeme tretiranja (min)	napon (kV)	% EtOH
3NK0/1	3	0	KA1	3	15	50	KN1	3	20	50
3NK25/1	3	25	KA2	9	15	0	KN2	9	20	0
3NK50/1	3	50	KA3	3	15	0	KN3	3	20	0
9NK0/1	9	0	KA4	3	20	0	KN4	3	25	0
9NK25/1	9	25	KA5	9	20	25	KN5	9	25	25
9NK50/1	9	50	KA6	9	15	25	KN6	9	20	25
			KA7	9	15	50	KN7	9	20	50
			KA8	9	20	50	KN8	9	25	50
			KA9	3	20	25	KN9	3	25	25
			KA10	9	20	0	KN10	9	25	0
			KA11	3	20	50	KN11	3	25	50
			KA12	3	15	25	KN12	3	20	25

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Maseni udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima određen je Folin-Ciocalteuovom metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji koja je posljedica reakcije fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim (FC) reagensom te je primjenom spektrofotometrijske metode mjeren intenzitet nastalog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenove i fosfomolibdenove kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojani (Agbor i sur., 2014).

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez tretmana visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji argona ili dušika.

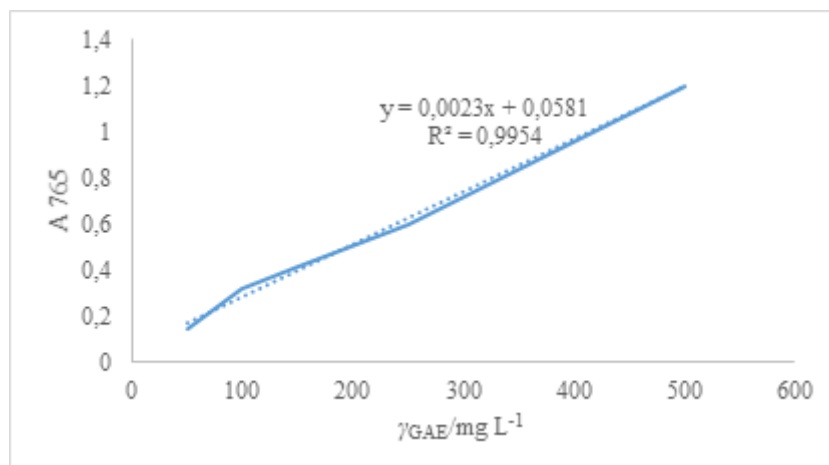
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteuova reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^\circ\text{C}$ u vodenoj kupelji. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneji tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteuova reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve zajedno se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^\circ\text{C}$ u vodenoj kupelji. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Koristeći izmjerene vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarna krivulja pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se preko dobivene jednadžbe pravca (Slika 6.).



Slika 6. Baždarna krivulja za određivanje koncentracije ukupnih fenola

Određivanje prinosa ekstrakcije netretiranih i tretiranih uzoraka kadulje:

Prinos ekstrakcije određen je kao udio fenolnih spojeva nakon provedene ekstrakcije, a računa

se po formuli: $prinos (\%) = \frac{\text{sadržaj ukupnih fenola (mg GAE)}}{\text{masa uzorka (mg)}} * 100$

Masa uzorka, odnosno biljke kadulje, iznosila 1 g, to jest 1000 mg.

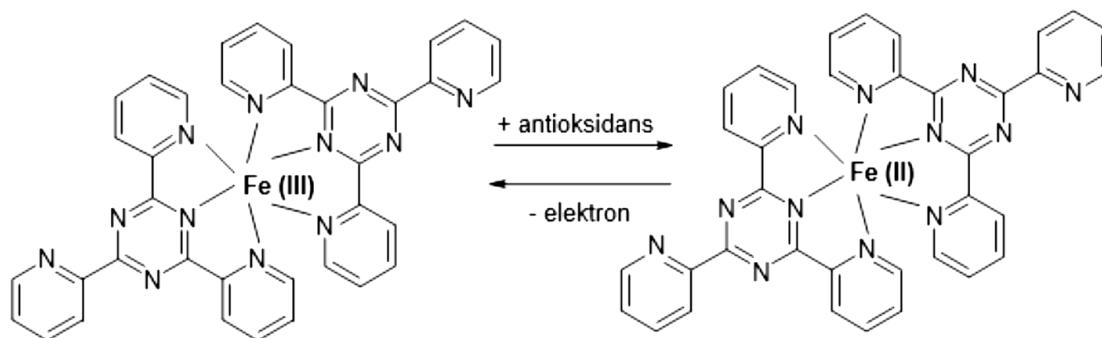
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

FRAP metoda

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda često se koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti biljnih polifenola. U osnovi, FRAP analiza tretira antioksidanse u uzorku kao reducense u redoks kolorimetrijskoj reakciji (Prasad i sur., 2010).

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt (Slika 7.). Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. U reakciji dolazi do redukcije Fe³⁺ iona u Fe²⁺ ione u otopini

2,4,6-tripiridil-*s*-triazina, a sama redukcija prati se mjerenjem promjene apsorbancija pri 593 nm.



Slika 7. FRAP metoda, redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ) s antioksidansom (Benzie i Strain, 1996)

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez tretmana visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji argona ili dušika.

Postupak određivanja:

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancija pri 593 nm. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe ekvivalenta (FE) mL}^{-1}$ uzorka.

Opis metode:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka (prethodno adekvatno razrijeđenog) i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzorka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 500 mL 1 mM otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0; 0,25; 1; 2,5; 5 i

7,5 mL alikvot otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240 μ L destilirane vode, 80 μ L otopine standarda i 2080 μ L FRAP reagensa, kratko promiješa na vortex uređaju, te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtana se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom (Benzie i Strain, 1996).

DPPH metoda

Ukupna antioksidativna aktivnost određena je i metodom po Brand-Williamsu iz ekstrakata kadulje. Prati se reakcija između stabilnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila ($\text{DPPH}\cdot$) i uzorka u kojem se mjeri antioksidacijska aktivnost. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Sparivanjem nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa stvara se reducirani oblik DPPH-H te dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez tretmana visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji argona ili dušika.

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100 %-tnog metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8- tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,5 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te nadopuni metanolom do oznake. Od 0,02 M otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 μM na način da se redom otpipetira 0,125, 0,25, 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice od 100 mL te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL otopine standarda te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Office Excela s vrijednostima koncentracije Troloxa (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na oordinati. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka na temelju izmjerenih apsorbancija određenih DPPH metodom (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

3.2.4. NIR, PCA i PCR analize

Za NIR spektroskopiju koristio se NIR spektrometar Control Development Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm s instaliranim Control Development softverom Spec32 kao neinvazivna tehnika u bliskom infracrvenom području od 904 nm do 1699 nm, u kojem se reflektira zračenje ekstrakta.

Prije snimanja, uzorci ekstrakata se pipetiraju u kivetu, koja se zatim postavlja u držač koji je povezan s dva optička kabela, od kojih je jedan povezan s izvorom svjetlosti, a drugi s

računalom. Držač se zatim poklopi poklopcem kako bi se osiguralo pravilno osvjetljenje i spriječio utjecaj okolnog svjetla. Nakon toga se uključi izvor svjetlosti te na računalu pokrene program za snimanje apsorpcijskog spektra – Spec 32. Spektri uzorka snimaju se tri puta zaredom i spremaju u odgovarajuću odabranu datoteku. Od tri se spektra prikazuje jedan spektar koji predstavlja srednju vrijednost mjerenja.

PCA (eng. *Principal Component Analysis*), odnosno analiza glavnih komponenata, je metoda koja se rabi u kemometriji, posebnoj grani analitičke kemije, te primjenjuje statističke ili matematičke tehnike u svrhu obrade analitičko-kemijskih podataka bez postavljenog fizičkog modela. Često se koristi u obradi NIR spektara u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka. Budući da NIR spektri daju veliku količinu informacija o jednom uzorku, glavna svrha PCA analize je prepoznavanje najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara kako bi se reducirala količina podataka (Abdi i Williams, 2010).

Princip PCA analize bazira se na grupiranju seta podataka u određene manje odjeljke koji najbolje opisuju njihovu povezanost, omogućavajući na taj način pouzdanu i brzu interpretaciju rezultata, a da se pritom zadrži većina informacija iz prvotnog velikog skupa podataka. Dobiveni podaci se u sustavu prikazuju kao točke u n -dimenzijskom prostoru gdje svaki vektor predstavlja određenu varijablu, odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini (Jednačak i Novak, 2013). Uvođenjem glavnih komponenti (eng. PC, *Principal Components*), koje predstavljaju linearne kombinacije određenog broja varijabli, smanjuje se dimenzionalnost.

Analiza glavnih komponenti (PCA) se koristi u regresiji glavnih komponenti (PCR) u svrhu uvođenja neovisnih varijabli u ortogonalnu osnovu glavne komponente te kako bi se odabrao podskup tih komponenti kao varijabli za predviđanje. PCR analiza je često korištena metoda multivarijantne statističke analize koja svoju primarnu ulogu ima u smanjenju broja dimenzija u linearnoj regresiji. Skup koreliranih varijabli prevodi se u manji broj novih nekoreliranih varijabli (Mishra i Vanli, 2015) i to preko tri glavna koraka: 1. pokretanje PCA (Analiza glavnih komponenti) u tablici varijabli; 2. pokretanje regresije najmanjih kvadrata (OLS regresija) koja se naziva i linearna regresija na odabranim komponentama; 3. računanje parametara modela koji odgovaraju ulaznim varijablama. Dobivaju se grafički prikazi koji opisuju strukturu analiziranih podataka, a upravo zahvaljujući korelacijskim vezama među varijablama lako je proučiti njihov odnos. Grafički prikazi korelacija i opažanja daju informacije o blizini uzorka i strukturi skupa analiziranih podataka, a biplot prikuplja sve te

podatke i prikazuje ih u jednom zajedničkom grafikonu. PCR omogućuje redukciju velikog broja varijabli do modela potencijalnog za modeliranje i predviđanje budućih opažanja, s obzirom da se u PCR metodi dobiveni rezultati glavnih komponenti koriste kao regresijske varijable za izgradnju predikcijskog modela.

Obje metode, PCA i PCR (Control Development softver Spec32), su vrlo korisne kemometrijske tehnike za smanjenje dimenzionalnosti pri modeliranju, a posebno kada imamo visoko kolinearne varijable.

3.2.5. GC-MS analiza

Prije same izvedbe GC-MS analize hlapljivih spojeva provedena je izolacija hlapljivih spojeva.

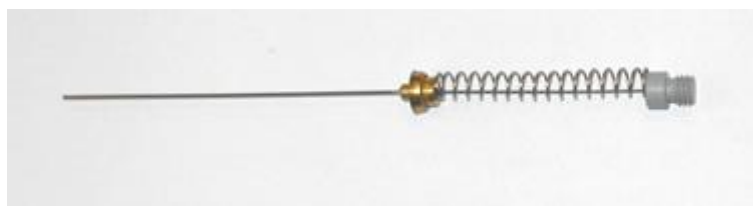
1 g uzorka kadulje stavi se u staklenu posudu od 20 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (40 °C) s termostatom. Na Slici 8. je prikazana korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME, eng. *Headspace solid-phase microextraction*).



Slika 8. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (Marijanović, 2014)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min na 270 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka (Marijanović, 2014).

Za uzorke kadulje korišteno je sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), prikazano na Slici 9.



Slika 9. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (Nemec, 2017). Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME (Serreli i sur., 2017).

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7820A, u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977E, spojenim na računalo (Slika 10.). Analize su izvršene na koloni nepolarnom stacionarnom fazom HP-5MS ((5 % fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD).



Slika 10. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Plin nositelj je helij protoka 1 mL min^{-1} ; omjer cijepanja 1:50; temperatura injektora $250 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura detektora $280 \text{ }^\circ\text{C}$; energija ionizacije 70 eV . Temperatura peći je programirana kako slijedi: $0,0 \text{ min}$ na $70 \text{ }^\circ\text{C}$, zatim $70 - 200 \text{ }^\circ\text{C}$ s porastom od $3 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena s vremenima zadržavanja poznatih tvari iz začina origana. Osim toga identifikacija je provedena i usporedbom retencijskih indeksa (RI, u odnosu na $\text{C}_8\text{-C}_{28}$ *n*-alkane za HP-5MS kolonu), kao i usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz *Wiley Library 9 MS* (Wiley, SAD) i *NIST14* (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, SAD) i /ili usporedbom s onima iz literature (Anonymous 2, 2019).

Za svaki uzorak analiziran vezanim sustavom GC-MS dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje;
- vrijeme zadržavanja svake komponente (koja je na kromatogramu predstavljena pikom), odakle je izračunat retencijski indeks;
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini);
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbližiji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postocima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od glavnih ciljeva istraživanja je utvrditi učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva i eteričnih ulja iz kadulje kao autohtonog mediteranskog bilja te odrediti optimalne uvjete ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem uz upotrebu "zelenih otapala". Nakon provedenih ekstrakcija bilo je potrebno usporediti rezultate netoplinke metode ekstrakcije primjenom tretmana hladne plazme s klasičnom metodom ekstrakcije. Također, nužno je utvrditi efikasnost ekstrakcije, stoga je određen sadržaj ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima te antioksidacijska aktivnost dobivenih ekstrakata. Tijekom istraživanja primijenjeni su različiti parametri tretmana visokonaponskog električnog pražnjenja kao što su vrsta plina, udio etanola u vodi, napon i vrijeme trajanja tretmana, te je uočen njihov utjecaj na ekstrakciju fenolnih spojeva i na antioksidacijsku aktivnost. Dovođenjem u korelaciju rezultata analitičkih istraživanja pomoću reagensa i rezultata brze neinvazivne tehnike NIR spektroskopije, nastoji se razviti model za predviđanje sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti sličnih uzoraka kadulje na temelju NIR spektara. I na kraju, s ciljem da bi se odredio aromatski profil ekstrakata, provedena je GC-MS analiza te su dobiveni udjeli pojedinih komponenti zastupljenih u uzorku kadulje.

4.1. REZULTATI MJERENJA UKUPNIH FENOLA

U nastavku (Tablica 2.) prikazani su rezultati mjerenja ukupnih fenola za netretirane i tretirane uzorke kadulje izraženi u mg GAE (ekvivalent galne kiseline) g⁻¹ uzorka.

Tablica 2. Sadržaj ukupnih fenola u netretiranim i tretiranim uzorcima kadulje izraženi u mg GAE g⁻¹

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka	
3NK0/1	14,47	KA1	49,03	KN1	50,86
3NK25/1	12,78	KA2	50,43	KN2	38,69
3NK50/1	9,95	KA3	38,34	KN3	20,51
9NK0/1	32,17	KA4	32,95	KN4	39,64
9NK25/1	26,43	KA5	48,08	KN5	60,69
9NK50/1	22,21	KA6	42,86	KN6	47,38
-	-	KA7	39,56	KN7	46,51
-	-	KA8	40,77	KN8	47,03
-	-	KA9	43,30	KN9	42,08
-	-	KA10	43,99	KN10	25,90
-	-	KA11	47,38	KN11	49,64
-	-	KA12	30,08	KN12	35,38

Rezultati pokazuju znatno viši sadržaj ekstrahiranih fenola nakon korištenja tretmana hladne plazme kao nove netoplinske tehnike ekstrakcije, što je bio i cilj dokazati. Udjeli ekstrahiranih polifenolnih spojeva ovise o fizikalno-kemijskim karakteristikama ekstrahiranog uzorka te o polarnosti korištene smjese otapala, vremenskom trajanju i temperaturi ekstrakcije (Bors i sur., 1990). Stoga se ne može generalno zaključiti koji plin (argon ili dušik) je ovdje pokazao bolje rezultate ekstrakcije jer uspješnost ekstrakcije ovisi i o ostalim postavljenim parametrima. Najveći udio ukupnih fenola dobiven je u uzorku koji je bio tretiran dušikom pri naponu od 25 kV, ekstrahiran u 25 %-tnoj otopinu etanola u trajanju od 9 minute (KN5), a iznosi 50,86 mg GAE g⁻¹ uzorka, dok je sadržaj fenola dobiven ekstrakcijom pri istom vremenskom trajanju i u istom otapalu, ali bez tretmana, 2,3 puta manji – 26,43 mg GAE g⁻¹ uzorka (9NK25/1). Kad bismo usporedili rezultate ekstrahiranih fenola kod primjene različitih plinova – dušika i argona, može se vidjeti kako u ekstraktima s 0 % etanola, veću uspješnost ima korištenje argona (uzorci KA2 i KA10), no kod drugih kombinacija prednjači korištenje dušika kao plina za ionizaciju (uzorci KN5, KN6, KN7 i KN8). Najmanji udio fenola dobiven

je klasičnom ekstrakcijom u trajanju od 3 minuta pomoću 50 %-tne otopine etanola i iznosi 9,95 mg GAE g⁻¹ uzorka. Kod tretiranih uzoraka, najmanji prinos fenola pokazao je HVED tretman s dušikom (KN3), 20,51 mg GAE g⁻¹ uzorka, gdje su primijenjeni parametri bili: vremensko trajanje od 3 minute, napon od 20 kV i 0 %-tna otopina etanola. Moguće je primjetiti da se fenolni spojevi u uzorcima kadulje bolje ekstrahiraju u otopini etanola više koncentracije, u usporedbi sa čistom vodom, te da duže vrijeme ekstrakcije i veći napon također mogu utjecati na veću količinu ukupnih fenola u ekstraktu. Boussetta i suradnici (2013) pokazali su da dodatak etanola u vodu ima sinergistički učinak kod prinosa ukupnih fenola iz „kolača“ lana, s obzirom da se njihovi rezultati pokazali povećanje sadržaja ekstrahiranih fenola s 3,49 mg g⁻¹ na 4,33 mg g⁻¹ nakon što su čistu vodu kao otapalo zamijenili s otopinom 25 %-tnog etanola. Uporaba hladne plazme kod ekstrakcije još je u tijeku istraživanja, no utvrđivanjem optimalnih parametara ova nova netoplinska tehnika vrlo je isplativa. Sadržaj fenola kod netretiranih uzoraka kreće se od 9,95 do 32,17 mg GAE g⁻¹ uzorka, a kod uzoraka tretiranih hladnom plazmom od 20,51 do 60,69 mg GAE g⁻¹ uzorka.

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

U ovom radu antioksidacijska aktivnost određivana je dvjema metodama, FRAP i DPPH metodom, koje se zasnivaju na različitom principu djelovanja, stoga nije nužno i ne očekuje se da rezultati prate isti trend. U reakcije s reagensima koji se dodaju u analizama ulaze različiti antioksidansi te se na kraju analiza kod spektroskopskog mjerenja detektiraju drugačiji ekvivalenti spojeva koji predstavljaju antioksidacijsku aktivnost.

4.2.1. FRAP metoda

U sljedećoj tablici (Tablica 3.) prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću FRAP metode za netretirane i tretirane uzorke kadulje izraženi u $\mu\text{mol FE}$ (ekvivalent Fe^{2+}) g⁻¹ uzorka.

Tablica 3. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom za netretirane i tretirane uzorke kadulje izraženi u $\mu\text{mol FE g}^{-1}$.

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka	
3NK0/1	146,21	KA1	979,57	KN1	1073,86
3NK25/1	181,21	KA2	-	KN2	-
3NK50/1	149,79	KA3	-	KN3	-
9NK0/1	518,36	KA4	2626,71	KN4	4368,14
9NK25/1	346,93	KA5	953,86	KN5	1042,43
9NK50/1	339,79	KA6	932,43	KN6	1458,14
-	-	KA7	791,00	KN7	1099,57
-	-	KA8	855,29	KN8	998,14
-	-	KA9	1059,57	KN9	876,71
-	-	KA10	339,57	KN10	-
-	-	KA11	881,00	KN11	938,14
-	-	KA12	1042,43	KN12	826,71

Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom rezultat je detektiranja onih antioksidanasa koji reduciraju ion željeza doniranjem svog elektrona. U otopinu se dodaje žuto obojeni kompleks Fe^{3+} -TPTZ koji redukcijom prelazi u plavo obojeni oblik Fe^{2+} -TPTZ čija koncentracija se mjeri na spektrofotometru i taj ekvivalent željeza predstavlja antioksidacijsku aktivnost određenih vrsta fenolnih spojeva koji djeluju na ovaj način. Antioksidacijska aktivnost uzoraka KA2, KA3 te KN2, KN3 i KN10 nije određene s obzirom da je vrijednost apsorbancije iznosila $>3,3$ i pri razrjeđenju uzorka od 20 puta. Samim pogledom na Tablicu 3. uočljivo je da su više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene kod uzoraka koji su bili tretirani visokonaponskim električnim pražnjenjem za razliku od onih koji su dobiveni klasičnom ekstrakcijom bez tretmana. Antioksidacijska aktivnost netretiranih uzoraka kreće se od $146,21 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ do $518,34 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, a kod tretiranih od $339,57 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ do $4368,14 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka. Najviše vrijednosti dobivene su u uzorcima s oznakom KA4 i KN4 koje dijele iste parametre tretmana: najkraće vrijeme i udio etanola (3 min, 0 % etanola) te viši napon za različite plinove – za argon 20 kV, za dušik 25 kV. Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod tretiranih uzoraka dobivena je u uzorku s oznakom KA10 kojeg karakterizira najdulje vrijeme tretmana od 9 minuta, 0 %-tna otopina etanola i napon od 20 kV za plin argon. Tretman visokonaponskim pražnjenjem pokazuje pozitivne rezultate s obzirom na znatno više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, no bitno je

obratiti pozornost na parametre. U ovom slučaju bolji rezultati su dobiveni s kraćim vremenom tretmana ili u čistoj vodi, s 0 % etanola.

4.2.2. DPPH metoda

Nadalje, slijedi Tablica 4. koja prikazuje rezultate određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode za netretirane i tretirane uzorke kadulje izražene u $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (Trolox ekvivalent) g^{-1} uzorka.

Tablica 4. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom za netretirane i tretirane uzorke kadulje izraženi u $\mu\text{mol TE g}^{-1}$

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka	
3NK0/1	28,39	KA1	27,53	KN1	26,89
3NK25/1	29,10	KA2	25,60	KN2	26,06
3NK50/1	30,74	KA3	27,24	KN3	27,78
9NK0/1	27,71	KA4	26,92	KN4	25,78
9NK25/1	27,74	KA5	26,03	KN5	25,71
9NK50/1	30,53	KA6	27,64	KN6	25,03
-	-	KA7	29,42	KN7	25,31
-	-	KA8	29,67	KN8	27,42
-	-	KA9	27,21	KN9	26,81
-	-	KA10	25,96	KN10	25,42
-	-	KA11	28,74	KN11	27,10
-	-	KA12	27,60	KN12	26,81

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti netretiranih uzoraka kreću se od $27,71 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka do $30,74 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka, a kod tretiranih uzoraka od $25,03 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka do $29,67 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka, što dovodi do generalnog zaključka kako DPPH metodom nije dokazana viša antioksidacijska aktivnost uzoraka koji su bili tretirani hladnom plazmom za razliku od onih dobivenih ekstrakcijom klasičnom metodom. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kod tretiranih uzoraka dobivene su u ekstraktima označenim s KA7 i KA8, a te uzorke povezuje najdulje vrijeme tretiranja od 9 minuta i otopina 50 %-tnog etanola. Također, može se istaknuti i uzorak pod oznakom KA11 s vremenom tretiranja od 3 minute, no ponovo s visokim udjelom etanola u otopini (50 %). Dakle, može se zaključiti

kako je udio etanola bitan faktor kod ekstrakcije fenolnih spojeva, a vrijeme tretiranja isto tako utječe da kvantitetu ekstrahiranih fenola. Ostale dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti tretiranih uzoraka kadulje većinom su manje i od najviših dobivenih udjela antioksidacijske aktivnosti kod netretiranih uzoraka. Uzrok tome vjerojatno je smanjena količina vodikovih atoma, odnosno protona, koji imaju glavnu ulogu kod DPPH metode. U otopinu se dodaje reaktivan DPPH radikal koji ima nespareni elektron te se na njega veže vodik od strane antioksidansa i dolazi do nastanka reduciranog DPPH-H oblika čija koncentracija se na kraju analize mjeri na spektrofotometru. Niže vrijednosti ukazuju na manje količine DPPH-H oblika otopini, odnosno nedostatak protona u ekstraktima. Ova metoda određuje antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva, odnosno antioksidanasa koji djeluju na ovakav način – doniraju proton kako bi ugasili štetno djelovanje radikala, no u otopini se nalazi mnogo različitih antioksidanasa čija aktivnost se određuje drugim metodama, primjerice FRAP metodom koja je pokazala kako je u tretiranim uzorcima aktivnost antioksidanasa još viša. Moguće je da tretman visokonaponskim pražnjenjem djeluje degradacijski na određene molekule zbog stvaranja reaktivnih vrsta tijekom električnog pražnjenja. Posljedice električnih izboja hladne plazme jesu fizikalne promjene kao što su emisija UV svjetla, nastanak udarnih valova i kavitacije te kemijske promjene koje uključuju nastajanje vodikovih, kisikovih i hidroksilnih radikala ($H\bullet$, $O\bullet$, $OH\bullet$) i raznih reaktivnih molekula kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) te ozon (O_3) koji imaju degenerativan učinak na fenolne spojeve (Jiang i sur., 2016). Tretman hladnom plazmom potpomaže oslobađanju fenolnih spojeva koji su vezani na staničnu membranu (fenomen elektroporacije), no kada se nalaze u slobodnom obliku postaju skloniji degradaciji izazvanoj reaktivnim vrstama. Stoga je bitno odrediti optimalno trajanje tretmana koje će dovesti do ekstrakcije veće količine fenolnih spojeva, ali i do njihove visoke antioksidacijske aktivnosti. Cilj je ekstrahirati fenolne komponente koje sadrže visoke vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kako bi se ostvarila njihova uloga.

4.3. PRINOS EKSTRAKCIJE

Prinos ekstrakcije određen je kao udio fenolnih spojeva nakon provedene ekstrakcije, a rezultati su prikazani u Tablici 5.

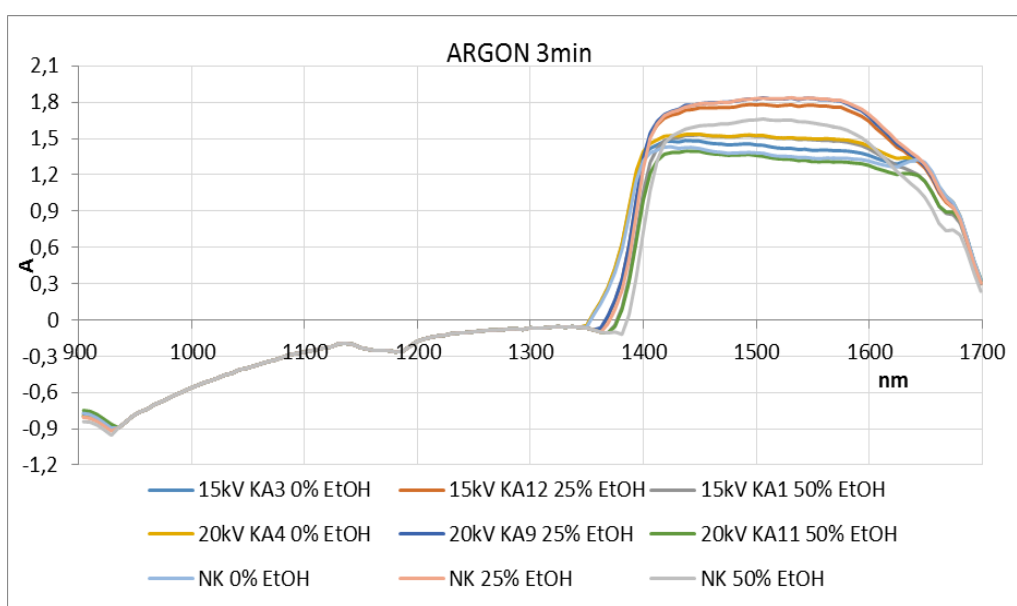
Tablica 5. Rezultati prinosa ekstrakcije (%) netretiranih i tretiranih uzoraka kadulje

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)	
3NK0/1	1,45	KA1	4,90	KN1	5,09
3NK25/1	1,28	KA2	5,04	KN2	3,87
3NK50/1	1,00	KA3	3,83	KN3	2,05
9NK0/1	3,22	KA4	3,29	KN4	3,96
9NK25/1	2,64	KA5	4,81	KN5	6,07
9NK50/1	2,22	KA6	4,29	KN6	4,74
-	-	KA7	3,96	KN7	4,65
-	-	KA8	4,08	KN8	4,70
-	-	KA9	4,33	KN9	4,21
-	-	KA10	4,40	KN10	2,59
-	-	KA11	4,74	KN11	4,96
-	-	KA12	3,01	KN12	3,54

Prinos ekstrakcije fenolnih spojeva kod uzoraka bez tretmana hladnom plazmom kreće se od 1,00 % do 3,22 %, a kod uzoraka koji su bili tretirani prinos je viši i kreće se u rasponu od 2,05 % do 6,07 % što upućuje na isplativost korištenja tretmana visokonaponskog pražnjenja kod ekstrakcije. Najveći prinos određen je u uzorku kadulje tretiranom u struji dušika 9 minuta, pri naponu od 25 kV, u otopini 25 %-tnog etanola, a tretman hladnom plazmom koji je uzrokovao najmanji prinos je trajanje 3 minute, 0 %-tna otopina etanola i napon od 20 kV, što ukazuje na to da duži tretman, veći udio etanola i viši napon rezultiraju s većom količinom ekstrahiranih fenola. Odabir otapala za ekstrakciju krucijalan je parametar i prvenstveno ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju želimo ekstrahirati. S obzirom da su polifenoli uglavnom polarni spojevi, zbog prisutstva OH grupe na aromatskom prstenu, jako polarna otapala (npr. voda) i nepolarna otapala (npr. etil acetat, kloroform i heksan) nisu pogodna za njihovu ekstrakciju, no smjesa vode s organskim otapalom čini umjereno polarni medij, niže viskoznosti od čiste vode, čime se mogu osigurati optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Čisti alkohol kao otapalo smanjio bi učinak ekstrakcije, no korištenjem vode u kombinaciji s alkoholom dolazi do povećanog bubrenja biljnog materijala što omogućava jače prodiranje otapala te je veća kontaktna površina između uzorka i otapala čime se pospješuje učinak ekstrakcije (Rafiee i sur., 2011). U takvom sustavu, voda je zaslužna za bubrenje biljnog materijala, a etanol za kidanje veza između tvari koja se želi ekstrahirati, u ovom slučaju fenolnih spojeva i biljnog materijala (Şahin i Şamlı, 2013).

4.4. NIR ANALIZA

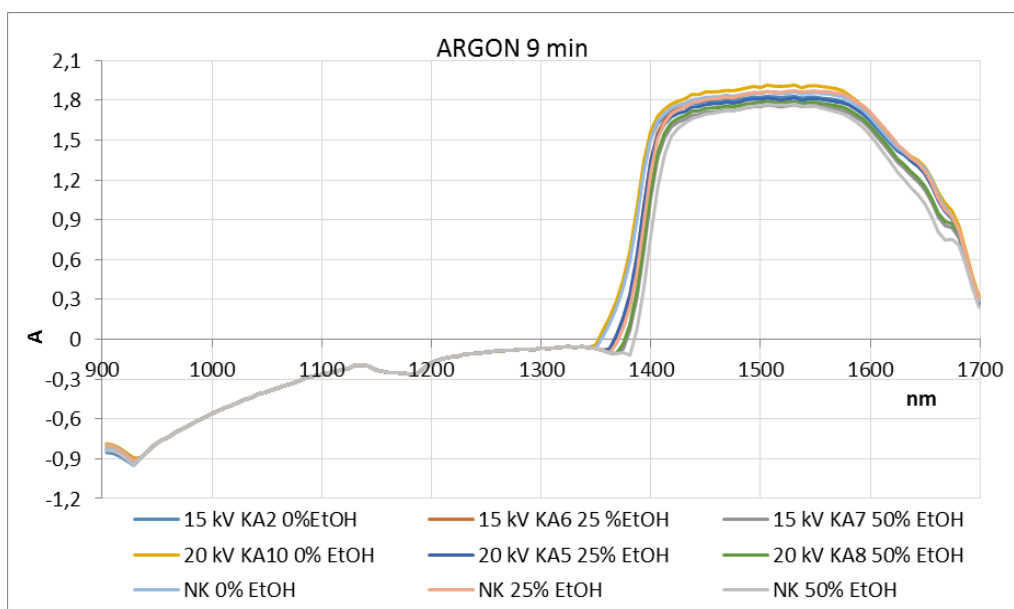
NIR analiza se sve češće koristi u istraživanjima znanosti o prehrani zbog osjetljivosti na C-H, N-H i O-H apsorpciju komponenta hrane (Ozaki i sur., 2007). Sljedeća slika (Slika 11.) prikazuje NIR spektar uzoraka tretiranih 3 minute u struji argona pod različitim naponima (15 kV ili 20 kV) te u otopini 0, 25 ili 50 %-og etanola, te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 3 minute klasičnom metodom u 0, 25 ili 50 %-tnoj otopini etanola.



Slika 11. NIR spektri uzoraka kadulje tretiranih u struji argona 3 minute te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 3 minute

U području valnih duljina od 1360 nm do 1699 nm detektirane su kemijske vrpce, a na području od 930 nm do 1360 nm vidljivo je da je došlo do gotovo potpunog preklapanja vrpce. Vrhovi u 1663 nm i 1674 nm posljedica su prvog overtona veza metilenske skupine i vibracija ArCH veza. Raspon valnih duljina od 1360 do 1699 nm odgovara rasponu vibracija C-H veza (prvi overtone), a vibracije u rasponu od 904 do 928 nm povezane su s trećim CH overtonom, drugim overtonom istezanja i kombinacije O-H veza u H₂O što i jesu zapravo kemijske veze i grupe karakteristične za fenolne spojeve i antioksidanse (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). U uzorcima kadulje nema očite razlike određene NIR analizom između tretiranih i netretiranih uzoraka, ali detektirane vibracije u području valnih duljina od 904 nm do 928 nm te od 1360 nm do 1699 nm upućuju zapravo na strukturne promjene fenolnih spojeva.

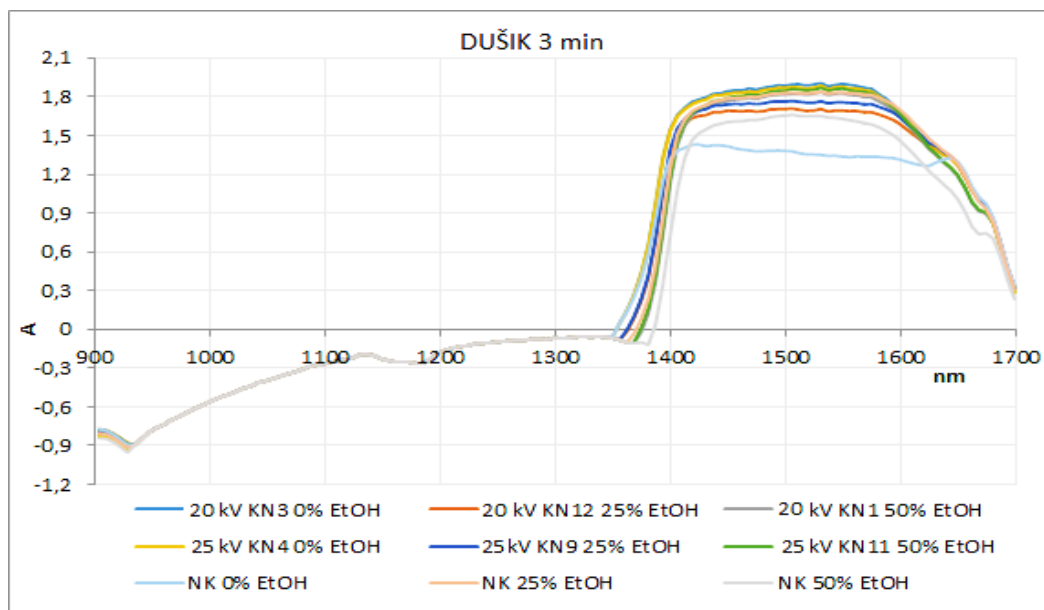
Nadalje, Slika 12. prikazuje NIR spektre uzoraka tretiranih 9 minuta u struji argona pri različitim naponima (15 kV ili 20 kV) te u otopini 0, 25 ili 50 %-og etanola, te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 9 minuta klasičnom metodom u 0, 25 ili 50 %-tnoj otopini etanola.



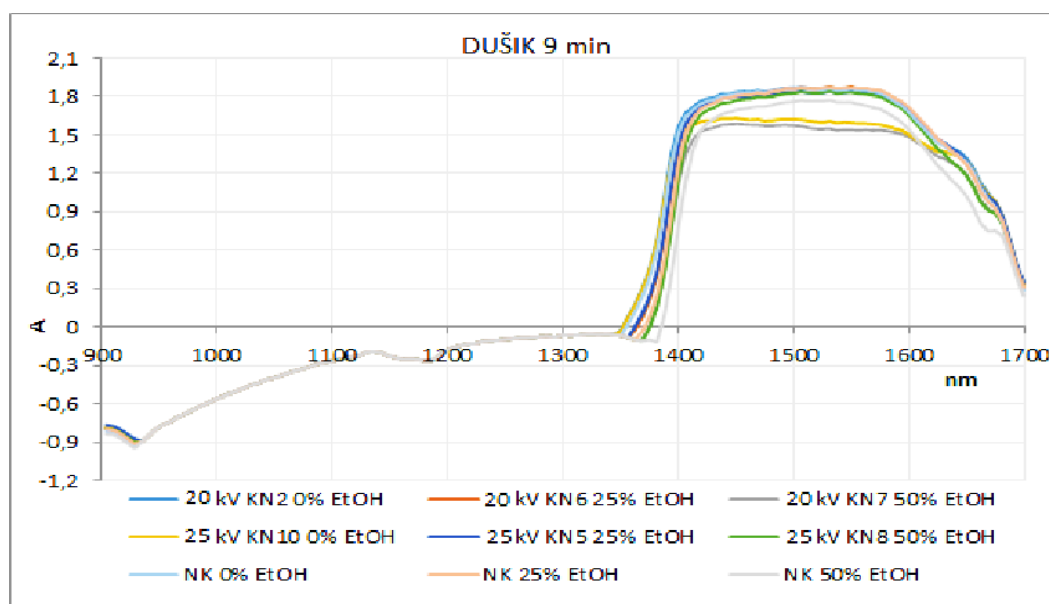
Slika 12. NIR spektri uzoraka kadulje tretiranih u struji argona 9 minute te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 9 minute

Na grafičkom prikazu može se vidjeti još jasnije zblizavanje vrpce na području valnih duljina od 1370 nm do 1699 nm i preklapanje od 928 nm do 1363 nm. U spomenutom području vidljive su višestruke vrpce različitih C-H veza (CH_3 , CH_2 , CH) i Ar-CH koje dominiraju tim područjem.

Slijede grafički prikazi NIR spektara dobivenih analizom uzoraka tretiranih 3 minuta u struji dušika pri različitim naponima (20 kV ili 25 kV) te u otopini 0, 25 ili 50 %-og etanola, te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 3 minuta klasičnom metodom u 0, 25 ili 50 %-tnoj otopini etanola (Slika 13.) te NIR spektara kao rezultata analize uzoraka tretiranih 9 minuta u struji dušika pri različitim naponima (20 kV ili 25 kV) te u otopini 0, 25 ili 50 %-og etanola i netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 9 minuta klasičnom metodom u 0, 25 ili 50 %-tnoj otopini etanola (Slika 14.).



Slika 13. NIR spektri uzoraka kadulje tretiranih u struji dušika 3 minute te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 3 minute



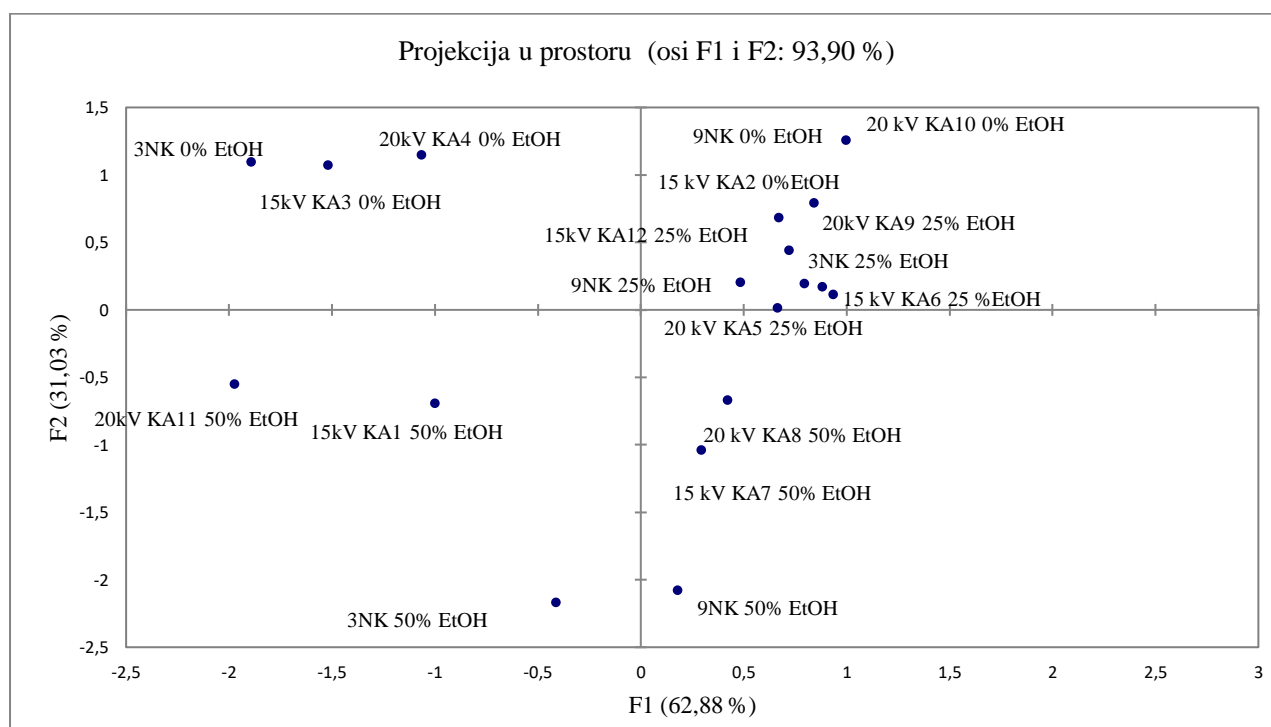
Slika 14. NIR spektri uzoraka kadulje tretiranih u struji dušika 9 minute te netretiranih uzoraka kadulje ekstrahiranih 9 minute

Dobiveni spektri pokazuju vrpce i veze od značaja u području valnih duljina 1365-1699 nm. Na grafičkim prikazima u području spektralnih vrijednosti 1400 – 1699 nm uočavamo različite vrpce višestrukih C-H veza, te prvog overtona veza N-H veza zbog tretiranja uzoraka strujom dušika. U rasponu od 1408 nm do 1604 nm na izgled vrpce utječu rastezne vibracije kemijskih veza H₂O molekula koje se nalaze u uzorku. Dobiveni NIR

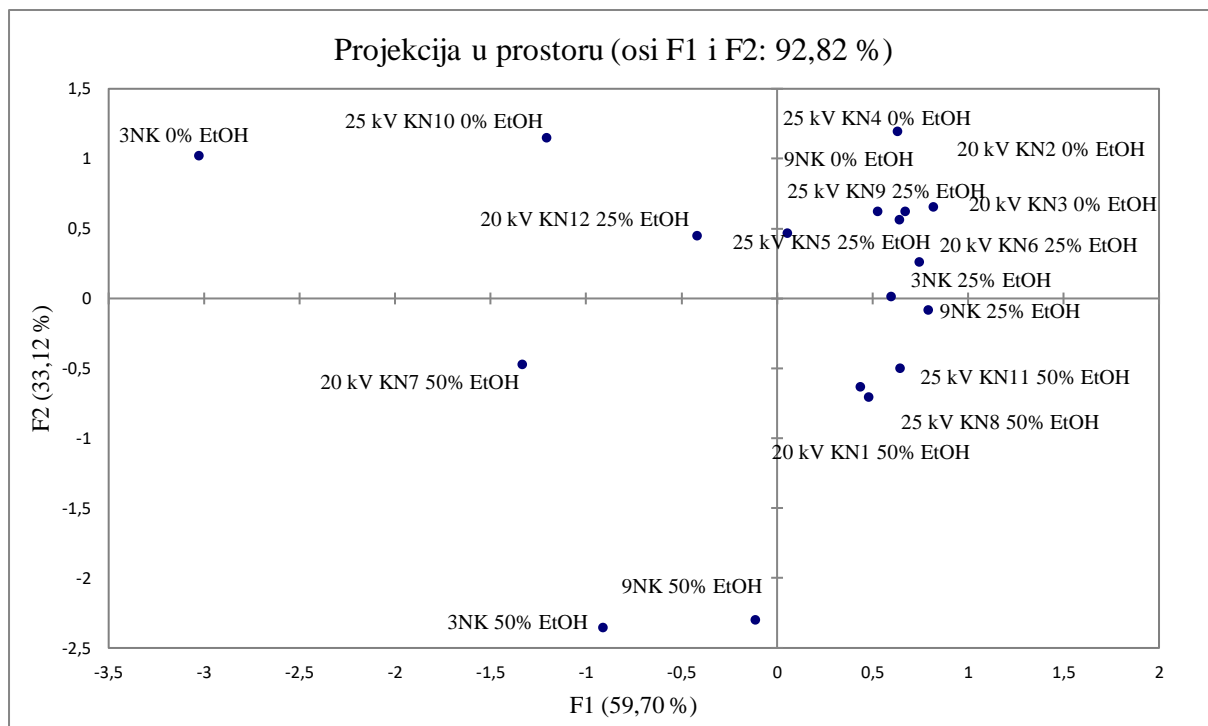
spektri nisu nam pružili direktno čitljive rezultate, u kvantitativnom obliku, no pomoću programa XL Stat, podaci bivaju obrađeni multivarijantnim metodama analize, odnosno uključena je i primjena kemometrije.

4.5. PCA ANALIZA

Kako bi se bolje objasnio prsitian velik broj varijabli, odnosno parametara koji se ispituju, pomoću što manjeg broja komponenti, primijenjena je tehnika analize glavnih komponenata, PCA. Razvoj informatičkih tehnologija i računala omogućio je njezinu široku primjenu u mnogim granama znanosti olakšavajući dugotrajan i kompliciran postupak izračuna. U nastavku su grafički prikazi projekcije u prostoru uzoraka kadulje tretirane u struji argona (Slika 15.) i uzoraka kadulje tretirane u struji dušika (Slika 16.) koji su prema svojim sličnostim, odnosno različitostima smješteni u kvadrante koordinatnog sustava.



Slika 15. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932 nm, 1350-1699 nm) za uzorke kadulje tretirane argonom i netretirane uzorke kadulje



Slika 16. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932 nm, 1350-1699 nm) za uzorke kadulje tretirane dušikom i netretirane uzorke kadulje

Na slikama 15. i 16. uočava se slična raspodjela uzoraka u kvadrante s obzirom na parametre tretiranja, osim korištenog plina. Iako je odabrano više ulaznih varijabli kako bi se opisala varijabilnost cijelog sustava, često je velik dio tog varijabiliteta opisan malim brojem varijabli koje predstavljaju glavne komponente i sadrže jednaku količinu informacija kao ulazne varijable. U ovom slučaju (Slika 15.) glavne komponente F1 i F2 obuhvaćaju 93,90 % varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke kadulje. 1.kvadrant (desni gornji) okuplja tretirane i netretirane uzorke kadulje u otopini 0 i 25 %-tnog etanola. 2. i 3. kvadrant sadrži većinom uzorke koji se nalaze u 50 %-tnoj otopini etanola, dok su u 4. kvadrantu uzorci u 0 %-tnoj otopini etanola. Vidljiv je trend raspodjele uzoraka po udjelu etanola u otopini te se povećanje udjela kreće od 4., preko 1. i 2. kvadranta do 3. kvadranta, u smjeru kazaljke na satu.

Na Slici 16. prikazani su netretirani uzorci i uzorci tretirani u struji dušika, a projekcija uzoraka je slična u prostoru kao i kod tretmana s argonom, a određena je prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 92,82 % varijance originalnih podataka. Uzorci kadulje koji se nalaze u otopini s najmanjim udjelom etanola prisutni su u 4. i 1. kvadrantu, dok su oni otopljeni u otopini s većim udjelom etanola prisutni u 3. i 4.

kvadrantu. Uzorci prisutni u istom kvadrantu i koji su općenito blizu, slični su međusobno po strukturi i svojstvima, što ukazuje na to da bi trebali biti slični i po rezultatima mjerenja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.

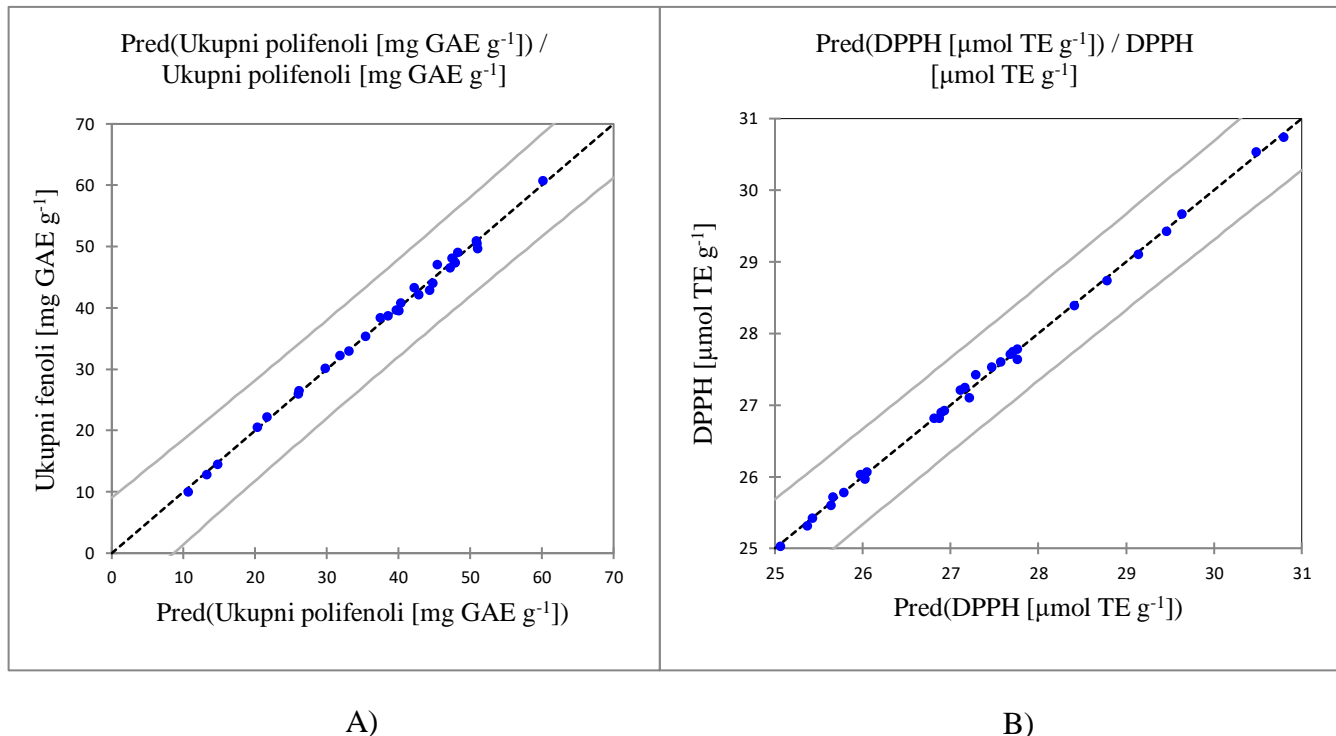
4.6. PCR ANALIZA

Za daljnju analizu odnosa NIR spektra i sadržaja bioaktivnih tvari u ekstraktima provedena je PCR analiza, odnosno regresija glavnih komponenata. Cilj ove analize je bio i ispitati primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu predikcije udjela polifenola, te antioksidativne aktivnosti netretiranih uzoraka i ekstrakata kadulje tretiranih visokonaponskim pražnjenjem uz upotrebu vode i etanola. Matrica podataka koja je korištena sadržavala je podatke o NIR spektrima, tj. apsorbancije određenog spektra valnih duljina, koncentracije ukupnih fenola te vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene DPPH metodom. PCR analiza provedena je uz pomoć programa XLStat, a modeli čiji su pokazatelji uspješnosti prikazani u Tablici 6., dobiveni su korištenjem izvornog spektara bez predprocesiranja.

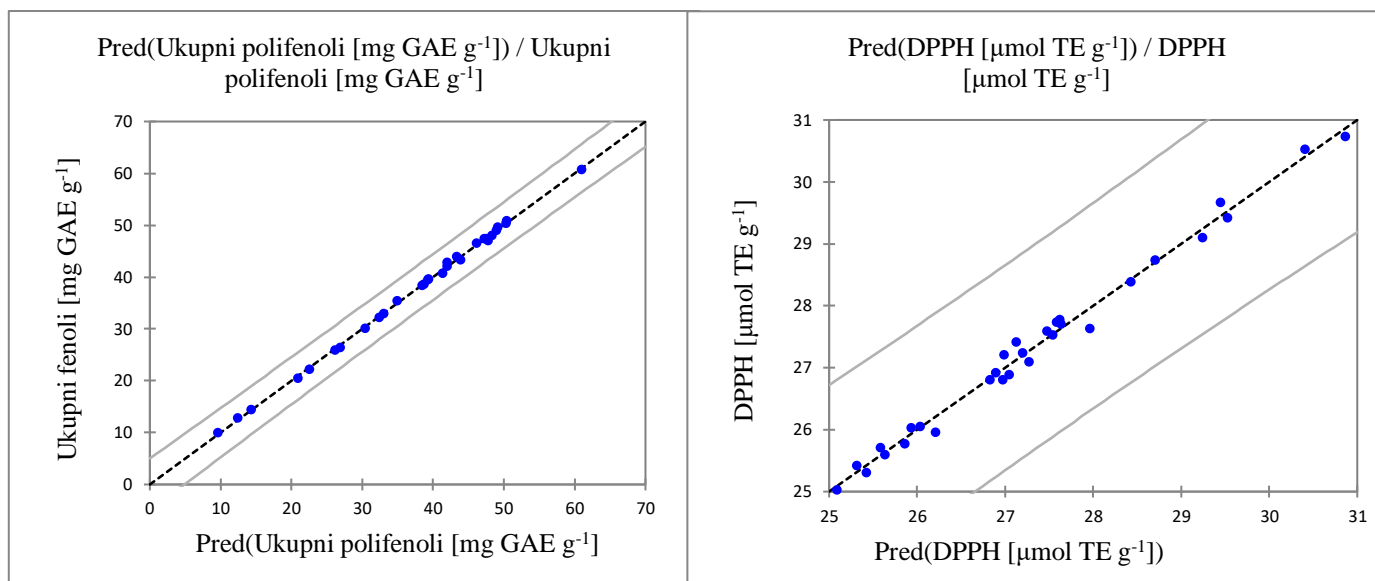
Tablica 6. Statistički pokazatelji razvijenih PCR modela za predikciju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (DPPH metoda) za kadulju

valna duljina (nm)		R ²	prilagođeni R ²	RMSE	RPD	RER	
Model 1	904-1699 nm	UF	0,997	0,908	3,817	3,291	13,292
		DPPH	0,998	0,956	0,316	4,770	18,069
Model 2	1350-1699 nm	UF	0,999	0,972	2,120	5,927	23,934
		DPPH	0,990	0,722	0,794	1,897	7,187
Model 3	904-935 nm, 1344-1699 nm	UF	0,994	0,840	5,032	2,497	10,084
		DPPH	0,998	0,956	0,316	4,770	18,069

Pokazatelji uspješnosti razvijenog modela, odnosno efikasnosti predikcije uključuju koeficijent determinacije za model (R^2), prilagođeni koeficijent determinacije (prilagođeni R^2), korijen srednje standardne pogreške (RMSE), omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD) te omjer raspona pogrešaka (RER). Prilagođeni R^2 je korekcija za R^2 , koji u obzir uzima broj varijabli korištenih u modelu i on može biti negativan ako je R^2 blizu nule (Analytical, 2018). Koeficijent determinacije pokazuje koliko se dobro podaci uklapaju u model, tj. govori o korelaciji i smjeru linearne povezanosti između dvije varijable, a njegova vrijednost može se kretati od 0 do 1, no što je bliže broju 1, to će model biti reprezentativniji. RMSE je standardna pogreška predviđanja, odnosno govori nam koliko su podaci udaljeni od regresijske linije. Predlaže se kao indikatori za izvrsne modele uzimaju u obzir predviđanja vrijednosti $R^2 > 0,95$ i vrijednosti $RPD > 6,5$. Visoko prihvatljivi modeli imaju niže vrijednosti RMSE, $R^2 > 0,8$ i $RPD > 3$ (Belščak-Cvitanović i sur., 2017). U nastavku su prikazani grafički prikazi 3 modela (Slika 17., Slika 18. i Slika 19.), odnosno linearne regresije predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne vrijednosti za uzorke kadulje, za koje su uzeti NIR podaci različitih raspona valnih duljina.



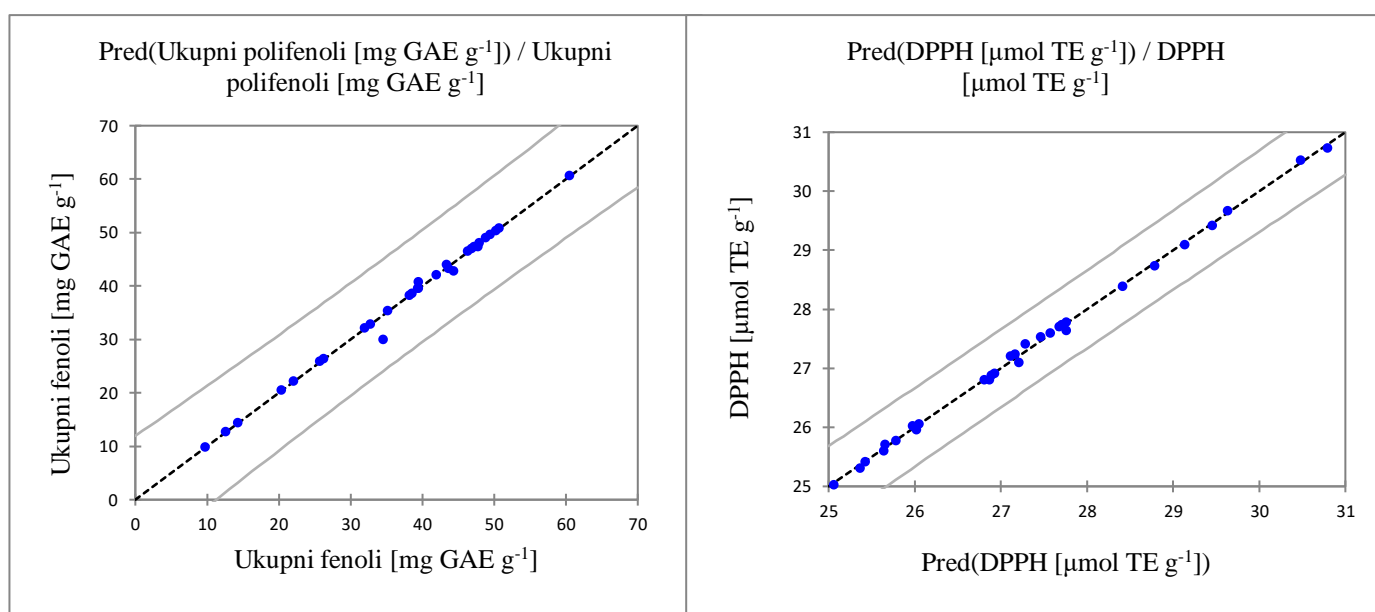
Slika 17. Model 1: Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke u području valnih duljina 904-1699 nm : A) sadržaj ukupnih fenola, B) antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom.



A)

B)

Slika 18. Model 2: Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke u području valnih duljina 1350-1699 nm : A) sadržaj ukupnih fenola, B) antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom.



A)

B)

Slika 19. Model 3: Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke u području valnih duljina 904-935 nm i 1344-1699 nm: A) sadržaj ukupnih fenola, B) antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom.

Prema podacima prikazanim u Tablici 6. usporedbom grafičkih prikaza modela, kao najbolji model za predikciju sadržaja ukupnih fenola (UF) na temelju izmjerenog NIR spektra, pokazao se onaj koji uzima u obzir spektar valnih duljina 1350-1699 nm - Model 2 (Slika 18.) Ovaj model je izvrstan za predviđanje koncentracije UF s obzirom da ima R^2 0,999, RPD 5,927 te nisku vrijednost RMSE od 2,120 (najnižu u usporedbi s ostalim modelima) što se može vidjeti i na grafičkom prikazu modela kako su podaci minimalno udaljeni od regresijske linije. Manje reprezentativni modeli za UF dobiveni su korištenjem cijelog spektra valnih duljina (904-1699 nm) te ograničenog spektra valnih duljina koji uključuje područja 904-935 nm i 1344-1699 nm. Koeficijent determinacije za te modele nešto je manji, a standardna pogreška veća, no modeli se i dalje svrstavaju u kategoriju visoko prihvatljivih modela.

Vrijednosti dobivene PCR analizom u svrhu razvijanja modela za predviđanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom poklapaju se kod dva modela (Tablica 6.). Model 1 koji uzima za analizu područje valnih duljina 904-1699 nm i model 3 koji obuhvaća spektar valnih duljina 904-935 nm i 1344-1699 nm pokazuju jednake parametre efikasnosti korištenja u svrhu predikcije. Iz ovog se može definitivno zaključiti kako područje valnih duljina 935-1344 nm ne sadržava informacije od koristi što se dalo naslutiti i iz NIR grafičkih prikaza (Poglavlje 4.4. NIR analiza). U područjima spomenutim za model 1 i model 3 uočene su vibracije kemijskih veza koje su sadržane u fenolnim spojevima bogatim antioksidacijskom aktivnošću. Model 1 i model 3 izvrsni su za predikciju antioksidacijske aktivnosti po DPPH metodi zbog visoke vrijednosti R^2 od 0,998 i jako niske vrijednosti RMSE od 0,316 što znači da su dobivene vrijednosti blizu regresijskog pravca. Za promatrane modele RPD vrijednost je 4,77, a RER 18,069 što predstavlja vrlo zadovoljavajuće rezultate.

Općenito su dobivene vrijednosti koeficijenta determinacije ovom analizom vrlo visoke (0,990-0,999) i ukazuju na dobru linearnu povezanost između fenolnih spojeva i vrijednosti NIR spektar snimljenih uzoraka kadulje. Korijen srednje standardne pogreške (RMSE) za kojeg je poželjno da je što manji, u predstavljenim modelima kreće se od 0,316 do 5,032, omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD) koji bi trebao biti veći od 3, ovdje iznosi od 1,897 do 5,927 te omjer raspona pogrešaka (RER) za bolju reprezentativnost modela treba iznositi >10 , a kod modela dobivenim ovom PCR analizom kreće se od 7,187 do 23,934. Cilj je bio razviti regresijske modele za predikciju sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta sličnih uzoraka na temelju NIR spektroskopije te su se sljedeći pokazali kao najbolji: Model 2 A) za UF, Model 1 B) i Model 3 B) za antioksidacijsku aktivnost po DPPH metodi, a izabrani su na temelju uskog intervala

pouzdanosti, izračunatih koeficijenata, standardne pogreške itd. Korištenjem ovih modela znatno je olakšano i ubrzano dobivanje željenih rezultata te je smanjeno korištenje reagensa pa tako i troškova analiza.

4.7. GC-MS ANALIZA

Na kraju je provedena GC-MS analiza sa svrhom određivanja hlapljivih komponenata koje čine aromatski profil ekstrakata. Izolacija hlapljivih spojeva iz uzoraka te njihova analiza odrađena je vezanim sustavom plinska kromatografija – spektroskopija masa (GC-MS). Za svaki analizirani uzorak dobiven je kromatogram ukupne ionske struje, vrijeme zadržavanja svake komponente koja je na kromatogramu označena pikom te je odatle izračunat retencijski indeks (RI), relativni udio pojedine komponente izražen u postotku i naziv spoja čiji spektar odgovara tom nepoznatom spektru analiziranog uzorka. U tablicama u nastavku (Tablica 7., Tablica 8., Tablica 9.) prikazani su rezultati GC-MS analize, odnosno relativni udjeli pojedinih komponenata u netretiranim uzorcima i uzorcima tretiranim hladnom plazmom pomoću plina argona ili dušika, izraženi u postocima koji predstavljaju udio površine pika u ukupnoj površini na kromatogramu.

Najzastupljeniji sastojci eteričnog ulja jesu zapravo hlapljivi sastojci α - i β - tujon (do 50 %), 1,8-cineol (oko 15 %) i kamfor (oko 10 %) koji čine aromatski profil kadulje. Imena spojeva određena su preko retencijskih indeksa (RI) koje je karakteristično za svaku komponentu, pa se tako etanol nalazi na RI <900, pik 1,8-cineola na RI 1038, α -tujona na 1111 i β - tujona na 1122, a kamfora na 1150, što je povezano s vremenom zadržavanja na koloni. Polarne komponente se najdulje vrijeme zadržavaju na koloni čija je stacionarna faza polarna, pa zato imaju i najdulje retencijsko vrijeme.

Tablica 7. Relativni udjeli pojedinih komponenata u netretiranim uzorcima kadulje izraženi u postocima (%)

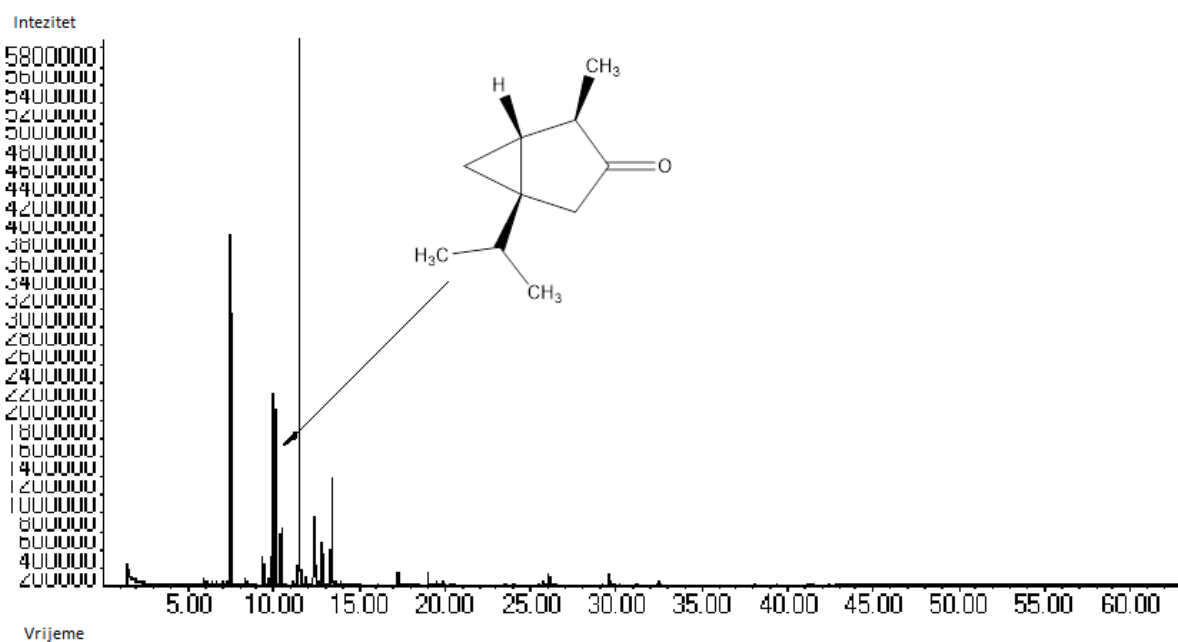
<i>Spoj</i>	etanol	1,8-cineol	α-tujon	β-tujon	kamfor
	<i>RI= < 900</i>	<i>RI=1038</i>	<i>RI=1111</i>	<i>RI=1122</i>	<i>RI=1150</i>
3NK 0 %	-	19,44	13,68	4,98	33,11
3NK 25 %	72,28	-	0,41	-	1,36
3NK 50 %	96,96	-	-	-	-
9NK 0 %	2,59	17,37	12,37	4,51	31,00
9NK 25 %	84,10	-	0,59	-	2,04
9NK 50 %	97,19	-	-	-	-

Iz rezultata prikazanih u Tablici 7. vidljivo je kako ekstrakti kadulje koji su se nalazili u 50 %-tnoj otopini etanola nisu pokazali prisutnost ovih spojeva, u ekstraktima koji su bili u 25 %-tnoj otopini etanola zabilježena je prisutnost α -tujon i kamfora, dok su u uzorcima kadulje s 0 %-etanola detektirani svi od ovih spojeva. Hlapljivi sastojci eteričnih ulja lako se otapaju u organskim otapalima, a vrlo teško u vodi. Zabilježen je najviši postotak kamfora, nakon čega slijedi 1,8-cineol, zatim α -tujon, te najmanje β -tujona. Najveći udio kamfora kod netretiranih uzoraka kadulje u iznosi od 33,11 % detektiran je kod ekstrakta dobivenog maceracijom u čistoj vodi (0 % etanola) u vremenskom trajanju od 3 minute, a nakon njega slijedi ekstrakt kadulje dobiven maceracijom u vodi u trajanju od 9 minuta. Uzorak s oznakom 3NK 0 % pokazuje i najviše vrijednosti drugih hlapivih spojeva: 19,44 % 1,8-cineola, 13,68 % α -tujona i 4,98 % β -tujona. Uzorci kadulje u otopini 25 %-tnog etanola s trajanjem maceracije 3 i 9 minuta pokazali su niže vrijednosti udjela α -tujon (0,41 % i 0,59 %) i kamfora (1,36 % i 2,04 %). U uzorcima s 50 %-tnom otopinom etanola detektiran je vrlo visok udio etanola od 96,96 % i 97,19 % zbog čega vjerojatno i nije zabilježeno prisustvo očekivanih hlapljivih spojeva iz kadulje, s pretpostavkom da su stupili u interakcije s etanolom.

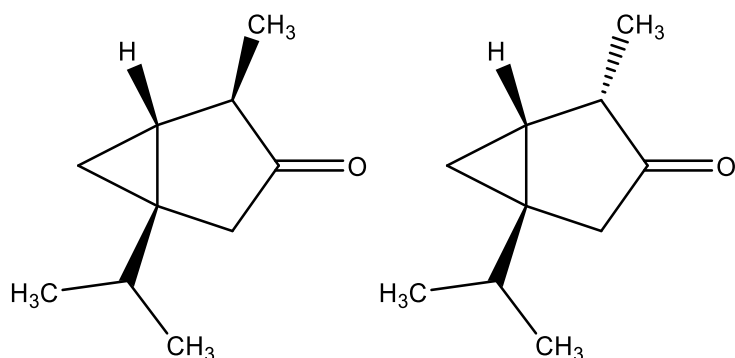
Tablica 8. Relativni udjeli pojedinih komponenata u uzorcima kadulje tretiranima plinom argonom izraženi u postocima (%)

<i>Spoj</i>	etanol <i>RI= < 900</i>	1,8-cineol <i>RI=1038</i>	α-tujon <i>RI=1111</i>	β-tujon <i>RI=1122</i>	kamfor <i>RI=1150</i>
KA1 (%)	85,29	1,69	0,79	0,30	1,51
KA2 (%)	-	-	-	-	-
KA3 (%)	1,89	19,05	12,03	3,61	35,56
KA4 (%)	4,62	18,97	14,27	4,43	35,35
KA5 (%)	69,25	6,48	3,55	1,18	9,12
KA6 (%)	73,75	5,57	2,76	0,88	7,04
KA7 (%)	90,72	1,34	0,62	0,23	1,38
KA8 (%)	80,00	1,11	0,47	0,16	1,12
KA9 (%)	68,91	6,94	3,25	1,10	7,58
KA10 (%)	0,77	20,50	13,28	3,85	35,50
KA11 (%)	91,37	1,34	0,54	0,19	1,16
KA12 (%)	61,83	6,67	3,25	1,06	8,30

Aromatski profil uzoraka kadulje tretiranih plinom argonom (Tablica 8.) pokazuje isti slijed po zastupljenosti detektiranih spojeva. U najvišem udjelu uzorci sadrže kamfor, zatim 1,8-cineol, pa α -tujon i β -tujon. Vrlo visok postotak hlapljivog spoja kamfora (35,56 %, 35,35 % i 35,50 %) detektiran je u uzorcima KA3, KA4 i KA10 čija je zajednička karakteristika otopina s 0 % etanola. S druge strane, uzorci s 50 %-tnom otopinom etanola (KA1, KA7, KA8, KA11) bilježe niske vrijednosti postotka kamfora (1,51 %, 1,38 %, 1,12 % i 1,16 %), a udio ostalih hlapljivih spojeva u tim uzorcima još je manji. Može se zaključiti kako otopina s višim udjelima etanola nije pogodna za izolaciju i detekciju hlapljivih spojeva iz uzorka na GC-MS-u. Kao najpogodniji tretman uzorka kadulje pokazao se onaj koji ima vrijeme tretiranja hladnom plazmom u trajanju od 9 minute, pri naponu od 20 kV i ekstrahiran pomoću čiste vode (KA10), gdje su detektirani sljedeći postoci hlapljivih komponenata: 20,50 % 1,8-cineola, 13,28 % α -tujona i 3,85 % β -tujona te 35,50 % kamfora. Kromatogram ukupne ionske struje na koloni HP5MS za uzorak KA3 te struktura detektiranog α -tujona prikazana je na Slici 20., a strukturna sličnost izomera α -tujona i β -tujona na Slici 21. Postoci hlapivih komponenti kod uzorka s oznakom KA3 (19,05 % 1,8-cineola, 12,03 % α -tujona i 3,61 % β -tujona te 35,56 % kamfora) su malo viši ili slični kao i vrijednosti detektirane kod netretiranog uzorka odstajalog 3 minute u otopini s 0 % etanola. Stoga se ne može reći da je tretman visokonaponskim pražnjenjem rezultirao povećanim udjelom hlapivih komponenti nakon ekstrakcije.



Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje na koloni HP5MS za uzorak KA 3.



α -tujon

β -tujon

Slika 21. Kemijske strukture izomera α -tujona i β -tujona

Tablica 9. Relativni udjeli pojedinih komponenata u uzorcima kadulje tretiranima plinom dušikom izraženi u postocima (%)

<i>Spoj</i>	etanol <i>RI= < 900</i>	1,8-cineol <i>RI=1038</i>	α-tujon <i>RI=1111</i>	β-tujon <i>RI=1122</i>	kamfor <i>RI=1150</i>
KN 1 (%)	86,9	2,01	0,90	0,33	1,98
KN 2 (%)	2,85	18,97	12,07	3,79	33,26
KN 3 (%)	0,41	19,87	13,34	3,94	32,91
KN 4 (%)	-	20,96	12,93	4,05	33,38
KN 5 (%)	56,07	8,29	4,35	1,41	11,93
KN 6 (%)	52,42	8,94	4,97	1,62	14,04
KN 7 (%)	84,09	2,66	1,33	0,46	2,86
KN 8 (%)	86,07	2,26	1,10	0,42	2,43
KN 9 (%)	58,63	8,66	4,43	1,41	12,64
KN 10 (%)	5,68	15,45	11,99	3,89	32,52
KN 11 (%)	84,81	2,34	1,10	0,39	2,40
KN 12 (%)	67,63	7,11	3,67	1,19	10,43

Tablica 9. prezentira rezultate aromatskog profila tretiranih uzoraka kadulje plinom dušikom, odnosno u kojem su postotku zastupljene pojedine hlapljive komponente kadulje u uzorcima. S obzirom na udjele detektiranih spojeva ponovo prednjače uzorci s 0 % etanola

(KN2, KN3, KN4, KN10), a kamfor je spoj koji je zabilježen kao najzastupljeniji (32,52-33,38 %) u spomenutim uzorcima. Iako su postoci kamfora u uzorcima s istim parametrima tretmana od 3 ili 9 minuta i 0 % etanola kod tretmana s argonom nešto viši, tretman dušikom pokazuje veće vrijednosti kod uzoraka s 25 %-tnom otopinom etanola u usporedbi s tretmanom argonom. Primjerice postotak kamfora u uzorcima KN5, KN6, KN9 i KN12 prelazi 10 %, dok je kod tretmana argonom bio < 10 %. Prema svim navedenim rezultatima, može se zaključiti da tretman hladnom plazmom ne djeluje značajno na povećanje ili smanjenje udjela hlapljivih komponenata sadržanih u aromatskom profilu kadulje. Najveće vrijednosti dokazane su kod tretmana uzorka kadulje koji ima vrijeme tretiranja hladnom plazmom u trajanju od 3 minute, pri naponu od 25 kV i ekstrahiran je pomoću čiste vode (KN4), gdje su detekrirani sljedeći postoci hlapivih komponenata: 20,96 % 1,8-cineola, 12,93 % α -tujona i 4,05 % β -tujona te 33,38 % kamfora.

Europski prehrambeni zakon nedavno je regulirao uporabu biljaka koje sadrže tujone u hrani, tj. prethodna granica za namirnice koje sadrže pripravke na bazi kadulje (25 mg kg⁻¹) i opća granica za hranu (0,5 mg kg⁻¹) je uklonjena iz nove regulacije o aromama, a samo pića koja sadrže *Artemisia* (tj. uglavnom apsint) ostaju regulirana. To znači da se *Salvia officinalis* i druge aromatične biljke koje sadrže α -tujon od sada mogu bez ograničenja koristiti u hrani. Ipak, tujon u kemijski čistom obliku nije dopušteno dodavati u hranu, no može se posredno unositi u hranu upotrebom biljaka koje sadrže tujone. Europska agencija za lijekove (EMA) nedavno je uvela prihvatljivi dnevni unos (ADI) tujona od 6,0 mg po osobi u maksimalnom trajanju od 2 tjedna. Za količinu od 1 g listova kadulje stavljenju u šalicu sa 150 mL vruće vode, EMA pretpostavlja udio tujona u rasponu između 0,7-5,0 mg po šalici, temeljeno na 3 % esencijalnog ulja koje sadrži 10-60 % α -thujona i 4-36 % β -thujona te 17,6 % ekstrakcije tijekom maceriranja listova. Situacija s kamforom je drugačija i EMA je procijenila udio kamfora 0,53-2,3 mg kamfora po šalici. Prema podacima Nacionalnog toksikološkog programa, predloženo je ograničenje od 6,6 mg tujona/dan, što znači da se dnevno može popiti do 6 šalica prosječnog čaja od kadulje (kao hrana) ili do 3 šalice prosječne ljekovite kadulje (kao lijek), a da se ne dosegne ova razina unosa. Stoga trenutno ne postoji rizik povremene uporabe kadulje preko hrane ili lijekova (Walch i sur., 2011).

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kadulje uspješno je provedena pomoću nove ispitivane metode visokonaponskog električnog pražnjenja korištenjem „zelenih otapala“.
2. Najveći prinos fenolnih spojeva od 6,07 % ostvaren je u uzorku kadulje tretiranom u struji dušika 9 minuta, pri naponu od 25 kV, u otopini 25 %-tnog etanola.
3. Tretman visokonaponskim pražnjenjem pokazuje prednost pred klasičnom metodom ekstrakcije s obzirom na znatno više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, dok DPPH metodom nije dokazana viša antioksidacijska aktivnost uzoraka koji su bili tretirani hladnom plazmom.
4. Dokazan je utjecaj sljedećih parametara tretmana visokonaponskog električnog pražnjenja: vrsta plina, udio etanola u vodi, napon i vrijeme trajanja tretmana, na ekstrakciju veće količine fenolnih spojeva, ali istodobno i na održavanje visoke antioksidacijske aktivnosti.
5. Provedena PCA analiza u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka iz NIR spektara pokazala je grupiranje ekstrakata prema sličnosti, odnosno trend raspodjele uzoraka po udjelu etanola u otopini (0 %, 25 % i 50 % EtOH).
6. PCR metodom razvijeni su regresijski modeli za predikciju sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti sličnih uzoraka kadulje na temelju spektara dobivenih brzom i neinvazivnom tehnikom NIR spektroskopije. Kao najreprezentativniji model za predviđanje koncentracije fenola pokazao se onaj koji uzima u obzir spektar valnih duljina 904-1699 nm, a za predviđanje antioksidacijske aktivnosti optimalna je kombinacija područja 904-935 nm i 1344-1699 nm u kojem su i detektirane vibracije kemijskih veza fenolnih spojeva NIR analizom.
7. Aromatski profil uzoraka kadulje određen je GC-MS analizom te je u najvećem udjelu zastupljeni kamfor, nakon čega slijedi 1,8-cineol, zatim α -tujon, te najmanje β -tujon. Najpogodniji tretman s obzirom na visoke postotke hlapljivih komponenata uključuje ekstrakciju pomoću 0 %-tne otopine etanola potpomognutu visokonaponskim pražnjenjem uz korištenje plina argona u trajanju od 9 minute, pri naponu od 20 kV pri čemu je detektirano: 20,50 % 1,8-cineola, 13,28 % α -tujona i 3,85 % β -tujona te 35,50 % kamfora.

6. LITERATURA

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2**, 433-459.

Agbor, G. A., Vinson, J. A., Donnelly, P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **8**, 147 - 156.

Analytical (2018) Near Infrared Spectroscopy, <<https://www.celignis.com/NIR.php#>>. Pristupljeno: 04. rujna 2018.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.

Anonymous 1 (2019) Kadulja, <<https://www.agroportal.hr/ljekovite-biljke/24965>>, Pristupljeno: 08. lipnja 2019.

Anonymous 2 (2019) Gas-chromatograph labeled diagram, <<http://www.holyoak.co/gas-chromatograph-labeled-diagram.html>>, Pristupljeno: 05. ožujka 2019.

Anonymous 3 (2019) NIR spektrofotometar, <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/25304-Pharmaceutical-Infrared-Spectroscopy-Equipment-Infrared-Spectrometers/7024521-TANGO-FT-NIR-Spectrometer/>>, Pristupljeno: 21. kolovoza 2019.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2005) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* **99**(1), 191-203.

Belščak-Cvitanović, A., Valinger, D., Benković, M., Tušek, A. J., Jurina, T., Komes, D., Gajdoš Kljusurić, J. (2017) Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using HPLC-DAD, spectrophotometric, near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Int. J. Food Prop.* **20**, 2463-2480.

Benzie, I. F. 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.

Bittencourt, J. A. (2004) Fundamentals of Plasma Physics, Springer Science and Business Media, Brazil, str. 1-2.

Bors, W., Heller, W., Michael, C., Saran, M. (1990) Radical chemistry of flavonoids antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**, 165-170.

Boussetta, N., Reess, T., Vorobiev, E., Lanoiselle', J. L. (2012) Pulsed electrical discharges: principles and application to extraction of biocompounds, U: Enhancing extraction processes in the food industry (Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat F., ured.), Taylor & Francis – *CRC Press*, str. 145–172.

Boussetta, N., Turka, M., Taeyec, C. D., Larondellec, Y., Lanoiselléd, J. L., Vorobiev, E. (2013) Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Ind. Crop. Prod.* **49**, 690-696.

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges. A review. *C. R. Chimie.* **17**, 197–203.

Braca, A., Tommasi, N. D., Bari, L. D., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Capek, P., Hříbalova, V. (2004) Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry* **65**, 1983-1992.

Chandra, N., Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on human health. *Pharma. Rev.* **4**, 118-126.

Chemat, F., Vian M., Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principle. *Int. J. of Mol. Sci.* **13** (7) 8615–8627.

Čulina, M. (2018) Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timijana nakon postupka inkapsulacije, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15** (10), 7313-7352.

Dragović-Uzelac, V. (2017) Odabrane vrste začinskog i aromatskog bilja.

Fridman, A. (2008) Plasma Chemistry, Cambridge University Press, Cambridge, str. 1-11.

Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Berry Fruits, *Food Technol. Biotechnol.* **54**, 236–242.

Herceg, Z., Kovačević, D. B., Kljusurić, J. G., Jambrak, A. R., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665–672.

Jednačak, T. (2013) Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62** (3-4), 71-80.

Jiang, B., Zheng, J., Wu, M. (2016) Nonthermal Plasma for Effluent and Waste Treatment. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 309-342.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3954-3962.

Kazazić, S., P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, **55**, str. 279-290.

He, H., Chang, C. D., Lee, Y. (2008) Nonlinear current response of micro electroporation and resealing dynamics for human cancer cells. *Biochemistry-US* **72**, 161-8. doi: 10.1016/j.bioelechem.2008.01.007.

Kuštrak, D. (2005) Farmakognozija: fitofarmacija, Golden Marketing – Tehnička Knjiga, Zagreb.

- Lu, Y., Foo, L. Y. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* **75**, 197-202. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00198-4)
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (5), 727-747.
- Marčec, N. (2015) ekstrakcija i karakterizacija lako hlapljivih komponenata iz ružmarina, kadulje i lavande pomoću HS-SPME / GC-MS metode, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Marijanović, Z. (2014) Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Osijek.
- Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes. Metrohm A.G., Herisau, Switzerland.
- Miller, J., N., Miller, J., C. (2000) Statistic and chemometric for analytical chemistry, 4. izd., Prentice Hall, England/New York, str. 241-243.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* **1054**, 95-111.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **41**, 1523–1542.
- Nemec, Z. (2017) Profil hlapljivih spojeva curry (mješavine) začina, Završni rad, Odjel za Prehrambenu tehnologiju, Sveučilište „Marko Marulić“ u Kninu.
- Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A. (2007) Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L. (2003) Plant Polyphenols: Structure, Occurrence And Bioactivity. U: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ured.) Elsevier Applied Science, London/New York, str. 258-294.

- Prasad, K. N., Chew, L. Y., Khoo, H. E., Kong, K. W., Azlan, A., Ismail, A. (2010) Antioxidant capacities of peel, pulp, and seed fractions of *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 1-8. doi:10.1155/2010/871379
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**(10), 4290-4302. doi:10.1021/jf0502698
- Radić, Nj., Kukoč Modun, L. (2017) Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb.
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**, 738-745.
- Rajha, H., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., Vorobiev, E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emerg.* **31**, 60-66.
- Robbins, R. J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Arg. Food Chem.* **51** (10), 2866-2887.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 595–602.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* **162**, 981-987. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00052-3)
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 215-217.
- Serreli, G., Jerković, I., Gil, K. A., Marijanović, Z., Pacini, V., Tuberoso, C.I.G. (2017) Phenolic Compounds, Volatiles and Antioxidant Capacity of White Myrtle Berry Liqueurs. *Plant Food. Hum. Nutr.* **72**, 1-6. doi:10.1007/s11130-017-0611-8
- Shahidi, F., Nacsk, M. (1995) Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application; Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA, str.75-100.
- Sikorski, Z. Z., Kolakowska, A. (2011) Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. *CRC Press.* str. 202.

Sroka, Z. (2005) Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch. C.* **60** (11-12), 833-843.

Škorić, I. (2018) Molekulska spektroskopija, nastavni tekst, <
https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf> Pristupljeno: 07. srpnja 2019.

Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2** (12), 1231-1246.

Žutić, I. (2007) Lavandin, kadulja i komorač u kontinentalnom području, priručnik, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Walch, S. G., Kuballa, T., Stuhlinger W., Lachenmeier, D. W. (2011) Determination of the biologically active flavour substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.) *Chem. Cent. J.* **5**(44), doi: 10.1186/1752-153X-5-44

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Elina Dubolj

Ime i prezime studenta