

Utjecaj mikrovalnog zračenja na koncentraciju klorofila iz origana

Zrinski, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:313937>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Kristina Zrinski

7560/PT

**UTJECAJ MIKROVALNOG ZRAČENJA NA KONCENTRACIJU KLOROFILA IZ
ORIGANA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Filip Šupljika

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj mikrovalnog zračenja na koncentraciju klorofila iz origana

Kristina Zrinski, 0058212278

Sažetak: Cilj ovoga rada bio je ispitati kako ekstrakcija mikrovalnim zračenjem (MAE) utječe na masenu koncentraciju klorofila a i b iz usitnjenih listića origana. Ekstrakcija se provodila pri temperaturama od 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C i vremenskom periodu od 3, 6, i 9 minuta te je provedena u 90%-tnom metanolnom ekstraktu. Masena koncentracija klorofila a i b je utvrđena primjenom UV/VIS spektrofotometrije. Optimalni uvjeti dobiveni eksperimentalnim radom za izolaciju pigmenata klorofila a i b iz listića origana primjenom MAE su sljedeći: temperatura 50 °C i vrijeme tretiranja 9 minuta.

Ključne riječi: mikrovalno zračenje, ekstrakcija, klorofili, pigmenti, origano

Rad sadrži: 24 stranice, 16 slika, 2 tablice, 19 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Filip Šupljika

Datum obrane: 01.09.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Bachelor thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

The effect of microwave radiation on the concentration of chlorophyll in oregano

Kristina Zrinski, 0058212278

Abstract: The aim of this study was to investigate how does microwave-assisted extraction (MAE) impacts on concentration of chlorophylls a and b from leaves of oregano. Extraction was conducted at temperatures of 35 °C, 40 °C, 45 °C and 50 °C in time period of 3, 6 and 9 minutes with 90% aqueous methanol solution. The mass concentration of chlorophylls a and b was determined by UV/VIS spectroscopy. The optimum conditions that were gotten from experimental work for the isolation of chlorophylls a and b from oregano leaves by MAE are: temperature 50 °C and time period 9 minutes.

Keywords: microwave radiation, extraction, chlorophylls, pigments, oregano

Thesis contains: 24 pages, 16 figures, 2 tables, 21 references

Original in: Croatian

Thesis contains: 24 pages, 16 figures, 2 tables, 19 references

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Filip Šupljika PhD, Assistant Professor

Defence date: September 1st 2020

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Mikrovalno zračenje.....	2
2.2. Klorofil.....	5
2.2.1. Strukture, vrste klorofila i biološka uloga.....	7
2.2.2. Kemijska i funkcionalna svojstva klorofila.....	10
2.3. UV/VIS spektroskopija.....	11
2.3.1. Svojstva elektromagnetskog zračenja.....	12
2.3.2. Određivanje klorofila primjenom UV/VIS spektroskopije.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Biljni materijal.....	17
3.2. Kemikalije.....	17
3.3. Aparatura i pribor.....	18
3.4. Priprema uzorka.....	18
3.5. Metode rada.....	18
3.5.1. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem.....	18
3.5.2. Ekstrakcija pigmenata iz taloga.....	19
3.5.3. UV/VIS spektroskopsko određivanje klorofila a i b.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJČAK.....	22
6. LITERATURA.....	23

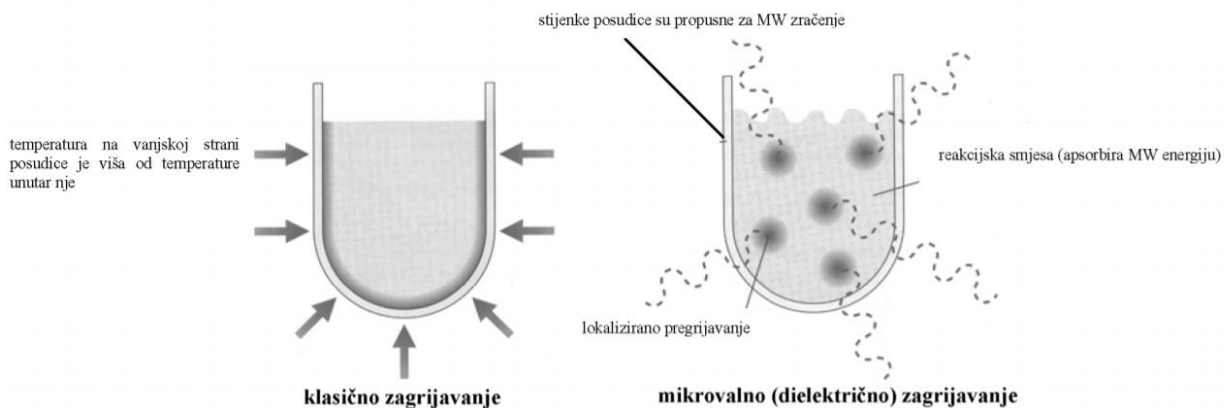
1. UVOD

Origano (*Origanum vulgare* L.) je aromatična i ljekovita biljka slatko-pikantnog mirisa sličnog timijanu. Koristi se najviše u kulinarstvu, posebice na području Italije gdje je bitan sastojak u jelima tipičnima za to područje. Njegovi listovi ovalnoga su oblika, tamnozeleno boje te gorkoga okusa. Rasprostire se po Europi i centralnoj Aziji, a koristi se još od antičkog doba na području Mediterana i Bliskog Istoka kao dio rimske, grčke i arabijske kuhinje. U današnje vrijeme koristi se najviše kao začim u talijanskoj kuhinji. Kako bi se sačuvao okus, osušeni se listići origana kidaju na manje komadiće, ne obrađujući se u prah. Jedni od glavnih kemijskih spojeva koji utječu na specifičnu aromu esencijalnog ulja origana su timol i karvakrol, a osim njih prisutni su i neki drugi spojevi u manjim i promjenjivijim količinama. U ovom radu istražit će se utjecaj mikrovalnoga zračenja na koncentraciju klorofila a i b iz origana mikrovalnom ekstrakcijom u ovisnosti o vremenu trajanja ekstrakcije i određenoj temperaturi. Koncentracija klorofila će se određivati uz pomoć instrumentalne metode UV/VIS spektroskopije. Mikrovalna ekstrakcija ima mnoge prednosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Klasična ekstrakcija je kompliciranija, dugotrajnija, aparatura je složenija, potrebne su više temperature, znatno dulje vrijeme zagrijavanja te je visoka energetska potrošnja. Upravo kako bi se sve to izbjeglo sve je više u uporabi mikrovalna ekstrakcija koja je brza i pouzdana analitička metoda te je ta metoda korištena u ovom istraživanju. Klorofil a i b su termolabilni pigmenti. Uzevši u obzir i tu značajku, logičan izbor pri odabiru metode ekstrakcije bila bi mikrovalna ekstrakcija. Također postoje i alternativne metode ekstrakcije koje se koriste pri istraživanju termolabilnih komponenti kao što je na primjer ekstrakcija ultrazvukom. Kada se radi s tvarima koje sadrže termolabilne komponente, bez obzira radi li se klasična ekstrakcija ili neka druga novija metoda ekstrakcije, mora se paziti na temperaturu. Previsoka temperatura može imati negativni ishod koji utječe na kvalitetu ekstrahiranog spoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROVALNO ZRAČENJE

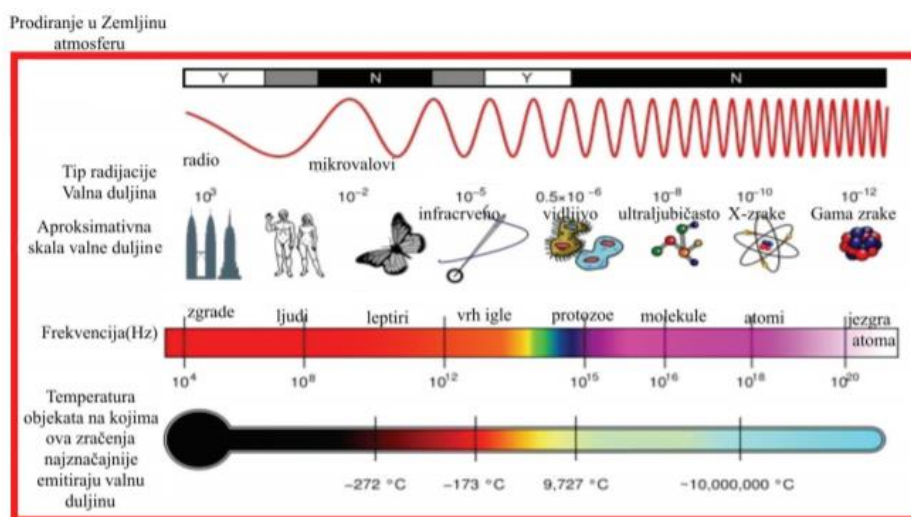
Mikrovalno ili dielektrično zračenje danas je u znatno većoj uporabi pred klasičnim zagrijavanjem te se primjenjuje kao njena alternativa. Mikrovalno zračenje ima značajne prednosti u odnosu na klasično, a to se ponajprije odnosi na vrijeme zagrijavanja koje se kod mikrovalnog zračenja skraćuje s nekoliko sati ili dana na svega nekoliko minuta (Slika 1). To ubrzanje kemijskih reakcija djelovanjem mikrovalnog zračenja nastaje zbog iznimno jakoga trenutačnoga grijanja, a što je posljedica kinetičkoga tj. termičkoga djelovanja.



Slika 1. Shematski prikaz zagrijavanja uzoraka klasičnim i MW- zagrijavanjem (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005)

D. R. Baghurst i D. M. P. Mingos pokazali su primjenom Arrheniusova zakona da povišenje temperature utječe na brže kretanje molekula (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005). Samim time, brže kretanje molekula uzrokuje povećani broj povoljnih sudara u kojima će doći do interakcije između molekula, koje pri tome moraju imati povoljnu orijentaciju da bi sudar bio moguć. Oni su to pokazali tako da reakcija prvog reda, koja se odvijala 68 dana na 27 °C, ima isti iznos konverzije kao i reakcija koja se odvija na 227 °C za 1,61 sekundu. Osim toga, neki autori govore i o tome da ubrzavaju reakcije, osim termičkih učinaka, pridonose i neki netermički mikrovalni učinci. Netermički mikrovalni učinci zasnivaju se na interakciji između električnoga polja s određenim molekulama u električnom polju. Na primjer, u slučaju dipolarne molekule, one će se orijentirati u smjeru polja što izravno utječe na predeksponencijalni faktor A ili na promjenu u energiji aktivacije (E_a)

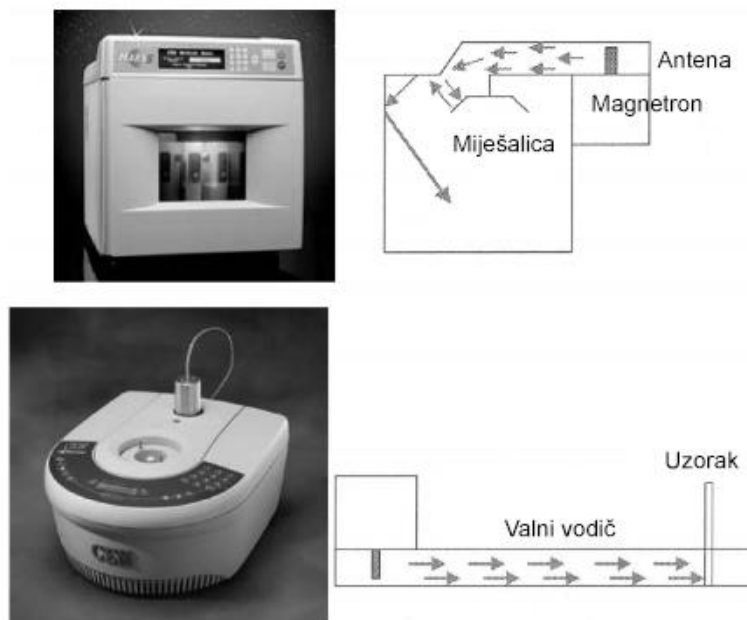
Mikrovalno zračenje se u elektromagnetskom spektru nalazi između IR- i radiofrekventnih valova. Frekvencija mikrovalnog zračenja je između 30 GHz i 300 MHz, što odgovara valnim duljinama od 1 cm do 1 m (Slika 2). Većina laboratorijskih uređaja za mikrovalnu ekstrakciju radi pri valnoj duljini od 12,25 cm tj. 2,45 GHz. To odgovara energiji fotona od 0,0016 eV. Takvi mikrovalni fotoni nemaju dovoljnu količinu energije da bi došlo do pucanja kemijske veze uslijed primjene elektromagnetske energije. Dolazi samo do polarizacije naboja u materiji, koje inducira električno polje. Polarizirane molekule se rotiraju uslijed izmjeničnog električnog polja no njihova brzina nije dovoljno velika da bi mogle pratiti brze izmjene smjera polja, što uzrokuje pretvorbu elektromagnetske energije u toplinsku. Mikrovalovi, zbog ograničenoga eneretskoga potencijala, ne uzrokuju kidanje veze niti promjene u strukturi tvari, već molekule samo titraju u mjestu te njihovim titranjem i dodirivanjem dolazi do porasta temperature tj. pretvorbe kinetičke energije molekula u toplinsku. Mikrovalovi, koji spadaju u istu grupu kao radijski i televizijski valovi, s infracrvenim zrakama i zrakama vidljive svjetlosti čine neionizirajuće zračenje. Za razliku od njih, ultraljubičaste, rendgenske, gama i kozmičke zrake pripadaju ionizirajućem zračenju. Takvo zračenje uzrokuje promjene u strukturi tvari te predstavlja opasnost za zdravlje.



Slika 2. Elektromagnetski spektar zračenja (Blekić i sur., 2011)

U početku, pri istraživanju mikrovalnog zračenja, koristile su se kućne mikrovalne pećnice, no statističkom obradom podataka je utvrđeno da je reproducibilnost vrlo niska. Jedna od najvećih mana je bila promjenjiva snaga zračenja do koje dolazi zbog povremenoga isključivanja magnetrona. Također, kućna mikrovalna pećnica nema mogućnost mjerenja tlaka i temperature, veliki nedostatak

je nemogućnost miješanja reakcijske smjese, lako može doći do eksplozije, nemogućnost kontrole sigurnosti itd. Zbog mnogo nedostataka i nemogućnosti provođenja svih istraživanja, došlo je do razvoja mikrovalnih reaktora koji su danas u upotrebi. Mikrovalni reaktori, kao i pećnice, rade na principu energije mikrovalnog zračenja tj. elektromagnetskoga zračenja. Elektromagnetsko zračenje je gibanje energije i nastaje kao fizikalni fenomen protokom električne struje kroz vodič. To su višefunkcijski i monofunkcijski mikrovalni reaktori koji se razlikuju u načinu raspodjele mikrovalnoga zračenja unutar kućišta (Slika 3). Kod višefunkcijskoga se MW-zračenje raspodjeljuje u svim smjerovima, dok kod monofunkcijskoga MW-zračenje dolazi do reakcijske posude kroz valnovod te pada samo na reakcijsku posudu, koja je na točno određenoj udaljenosti od izvora. Odabir reaktora s kojim će se raditi ovisi o vrsti uzorka i o količini reaktanata.



Slika 3. Shematski prikaz višefunkcijskog i jednofunkcijskog kućišta uz fotografije oba tipa MW reaktora (Zrinski i Ekcert-Maksić, 2005)

Primjena mikrovalnoga zračenja u prehrambenoj industriji je višestruka. Mikrovalovi se ponajprije koriste za zagrijavanje, pečenje, sušenje, odmrzavanje, blanširanje, dehidraciju, pasterizaciju i sterilizaciju. Sve više se mikrovalno zračenje primjenjuje i u ekstrakciji – mikrovalna ekstrakcija koja ima brojne prednosti pred uobičajenom, konvencionalnom ekstrakcijom kruto-tekuće. Ovim postupkom mogu se lako provesti analize tragova organskih spojeva, polifenolnih spojeva, pigmenta iz biljaka i njihovih metabolita i slično. Ekstrakcija čvrsto-tekuće osnovna je operacija odvajanja jedne ili više komponenti sadržanih u čvrstoj fazi tekućom fazom ili otapalom (Ibarz i Barbosa-Canovas,

2002). Ekstrakcija se provodi na temelju različite topljivosti tvari u otapalu za ekstrakciju i ovisno o vrsti otapala, različite komponente prelaze iz krute u tekuću fazu. Različiti faktori utječu na efikasnost ekstrakcije kao što su npr. temperatura, koja je jedan od bitnijih čimbenika, vrijeme ekstrakcije, pH, vrsta otapala koje se koristi te veličina uzorka iz kojega se želi ekstrahirati neka određena komponenta. Otapalo koje se pri tome koristi ne smije biti reaktivno, odnosno ne smije reagirati s ostalim spojevima u uzorku, visoka selektivnost je poželjna kao i veliki ekstrakcijski kapacitet, mora biti potpuno hlapljivo te, gledano s ekonomskog aspekta, imati nisku cijenu. Kod ekstrakcije čvrstih materijala, ekstrakcija će biti brža i efikasnija ako je dodirna površina otapala i čvrste tvari veća, što se postiže usitnjavanjem. Mikrovalna ekstrakcija koristi energiju mikrovalova za dielektrično zagrijavanje otapala s uzorkom. Dipolne molekule se orijentiraju, vibriraju te se oslobađa toplina uslijed trenja. Odabir otapala je vrlo bitan. Otapalo treba imati visoku dielektričnu konstantu, tj. mora dobro apsorbirati energiju mikrovalova, pretvoriti ju u toplinu i dalje predati okolini. Otapalo treba prilagoditi tvari iz koje se ekstrahiraju komponente ovisno o stupnju topljivosti koji se želi postići te o međusobnom odnosu između otapala i tvari. Općenito su dobra otapala etanol, metanol i voda, koji su dovoljno polarne molekule i mogu se zagrijati mikrovalovima. Mikrovalna ekstrakcija može se provoditi u zatvorenim posudama i u mikrovalnim pećnicama. Mikrovalna ekstrakcija u zatvorenim posudama, pri kojoj su tlak i temperatura kontrolirani, provodi se pri niskim ili visokim temperaturama ekstrakcije. Mikrovalna ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama provodi se pri atmosferskom tlaku.

2.2. KLOROFIL

Klorofil je molekula zelenog pigmenta, koja izravno sudjeluje u procesu fotosinteze skupljajući energiju svjetlosti. Pigmenti su prirodne tvari, nosioci boje, a u biljkama se nalaze u stanicama i staničnom tkivu. Nalaze se u mnogim namirnicama biljnog porijekla kao što su špinat, brokula, kupus, zeleni čaj itd. (Slika 4)



Slika 4. Klorofil u povrću (Anonymus 1, 2020)

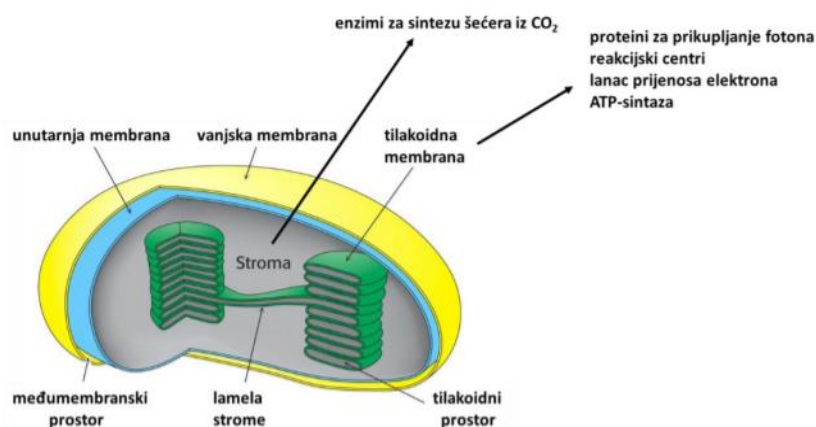
U biljnim stanicama se nalaze u posebnim ogranelima – kloroplastima. (Slika 5)



Slika 5. Kloroplasti u biljnim stanicama (Anonymus 2, 2020)

Kloroplasti imaju vanjsku i unutrašnju membranu (Slika 6). Prostor unutrašnje membrane se naziva stroma te se u njoj nalaze tilakoidne vrećice. Tilakoidne vrećice se povezuju strominim lamelama.

Tilakoidna membrana obavija tilakoidne vrećice i odvaja stromu od unutrašnjeg sadržaja tilakoidnih vrećica. Klorofil se nalazi u tilakoidnoj membrani. (Berg i sur., 2007)



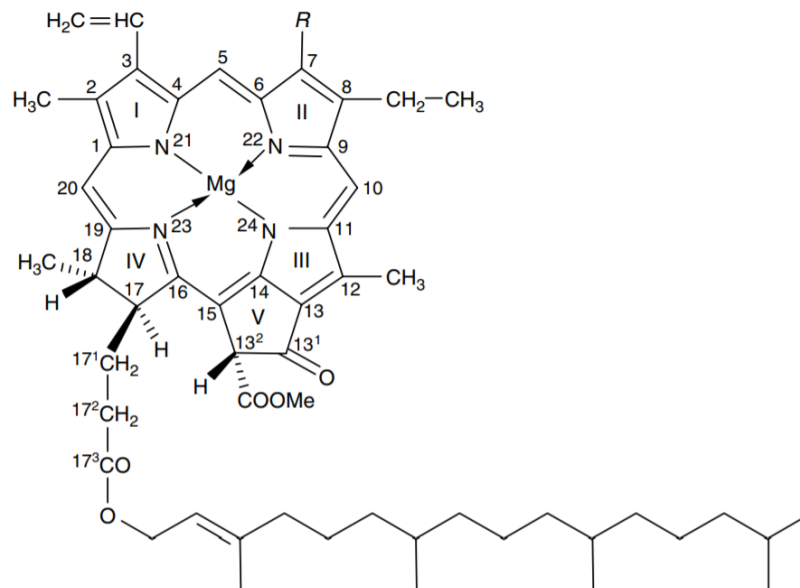
Slika 6. Građa kloroplasta (Berg, 2007)

Postoji nekoliko velikih skupina osnovnih hranjivih tvari, a to su ugljikohidrati, lipidi, proteini, oligoelementi i vitamini. Svaka od njih ima posebnu biološku ulogu u prehrani. (Hurst i sur., 2008) Klorofil ne spada niti u jednu od navedenih skupina. Njegov nedostatak u prehrani ne uzrokuje nutritivni deficit, ali njegova prisutnost može biti jako korisna, posebice jer sprječava razvoj različitih dugoročnih bolesti. Zelena boja koju klorofil daje namirnicama biljnog porijekla igra dvostruku ulogu, estetsku i tehnološku. Estetska uloga je osobito bitna za potrošača koji najprije vizualno ocjenjuje kvalitetu proizvoda. Boja proizvoda je od vrlo velike važnosti jer se prema njoj može odrediti identitet proizvoda, kvaliteta i aroma. Mogu se odrediti i neke karakteristike poput zrelosti, stupnja rafinacije, čistoća, svježina, te u konačnici ispravnost proizvoda. Boja također može ukazati i na mikrobiološko kvarenje proizvoda. Boja je značajno organoleptičko svojstvo proizvoda.

2.2.1. STRUKTURA, VRSTE KLOOROFILA I BIOLOŠKA ULOGA

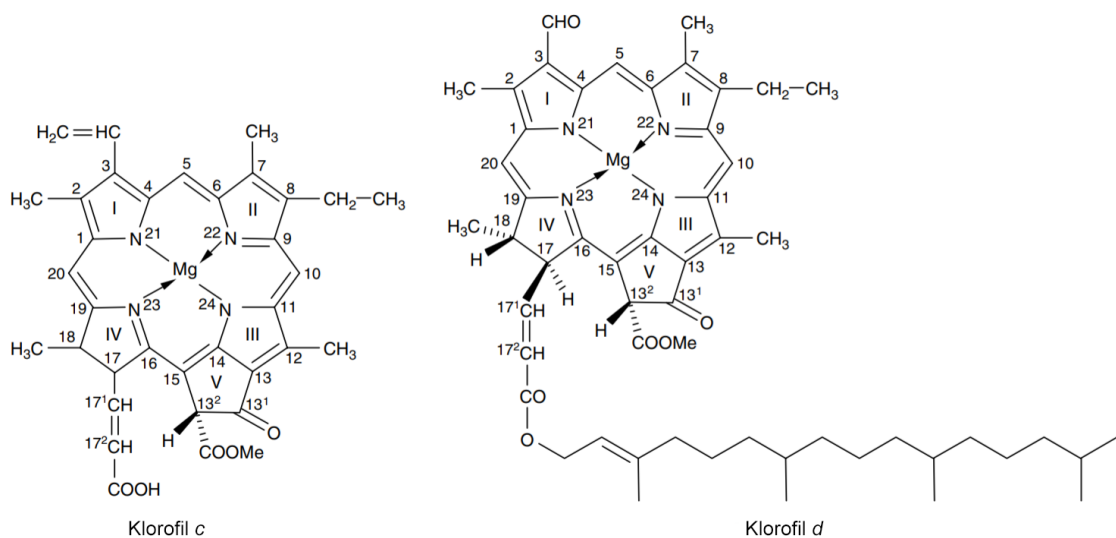
Sve vrste klorofila imaju jednaku osnovnu strukturu. Pripadaju u grupu porfirina. Osnova struktura je građena od porfina, koji se sastoji od 4 pirolske jedinice, čiji su alfa položaji povezani metinskim mostovima. Takva struktura tvori novi aromatski, planarni, vrlo stabilni sustav. Unutar planarnog sustava nalazi se metal koji je omeđen s četiri atoma dušika. Ta sposobnost porfirina da stvara intramolekularne veze s metalnim ionima – kelate, jedna je od najznačajnijih karakteristika. Kod klorofila, taj metal je magnezij. Postoji više vrsta klorofila, klorofil a , b, c, d i bakterioklorofil. Klorofil a razlikuje se od klorofila b po skupini koju veže na ugljiku C7, na drugom pirolnom prstenu.

Klorofil a ima metilnu, a klorofil b formilnu skupinu. (Slika 7)



Slika 7. Struktura klorofila a ($R=CH_3$) i b ($R=CHO$) (Hurst i sur., 2008)

Klorofil c ima ostatak propionske kiseline na C-17, dok klorofil d ima zasićenu vezu između C-17 i C-18 IV prstena (Slika 8). U bakterioklorofilu, alkoholi koji se esterificiraju na C-17 su , osim fitola, farnezil i geranil geraniol (Hurst i sur., 2008).



Slika 8. Struktura klorofila c i d (Hurst i sur., 2008)

Tilakoidna membrana, koja je po svome sastavu dvosloj fosfolipida s uronjenim proteinima, veže klorofile za te proteine. Klorofili se mogu vezati zahvaljujući svojoj amfoternoj prirodi. Na taj je način fitolski lanac ugrađen u membranu sa porfirinskim prstenom, koji je vezan na proteine nekovalentnom vezom. Takva se supermolekularna struktura naziva fotosustav (PS). Kod viših biljaka uvijek postoje dva fotosustava: fotosustav I (PSI) i fotosustav II (PSII). Fotosustav I reducira NADP^+ , a fotosustav II je odgovoran za fotolizu vode. U fotosustavu II se uglavnom nalazi klorofil b, pogotovo u organizmima koji su evolucijski razvijeniji. Interakcija koja je nastala vezanjem klorofila i proteina omogućuje hvatanje energije zračenja u cijelom vidljivom spektru jer se vezanjem proteina mijenja energija pobude. Tako je pronađeno šest tipova klorofil a-protein grupa s karakterističnim elektron apsorpcijskim maksimumima (Cla661, Cla669, Cla677, Cla684, Cla691 i Cla700-720). Za klorofil b nađene su samo dvije grupe (Clb640 i Clb650). Život na zemlji ne bi bio moguć da ne postoje fotosintetski pigmenti kao što je klorofil koji apsorbira energiju zračenja i pretvara ju u kemijsku energiju. Cijeli proces se temelji na tome da molekule fotoreceptora pretvaraju svjetlosnu energiju u kemijsku. Kako je klorofil a jedini zajednički svim fotosintetskim organizmima, pretpostavljeno je da je klorofil a jedini pigment koji opskrbljuje stanice energijom izravno fotosintezom i da svi ostali pigmenti prenose apsorbiranu energiju u klorofil a. Klorofil a i b su široko rasprostranjeni u prirodi te kao takvi su i najpoznatiji. Klorofil a se nalazi u svim fotosintetskim organizmima osim kod nekih grupa bakterija. Klorofil b je prisutan u svim višim biljkama te u algama koje pripadaju skupinama *Chlorophyta* i *Euglenophyta*, prateći uvijek klorofil a kao dodatak pigmenta u procesu fotosinteze. Ostale vrste klorofila (c, d i e) nalaze se samo u algama, ali uvijek u kombinaciji s klorofilom a. Bakterioklorofili su klorofili fotosintetizirajućih bakterija, a strukturno su malo drugačiji od onih tipičnih za više biljke. U višim biljkama prisutni su samo klorofil a i b. Njihov omjer obično varira između 3 i 1 što ovisi o mnoštvu faktora genetskih (vrsta, raznolikost itd.) i okolišnih (blistavost, vodeni pritisak, mineralna prehrana itd.). Tako, na primjer, biljke izložene suncu imaju veći omjer a / b nego biljke u hladu (Hurst i sur., 2008).

2.2.2. KEMIJSKA I FUNKCIONALNA SVOJSTVA

Klorofili su vrlo stabilne komponente u svom prirodnom okruženju, kloroplastu. Kada dođe do promjena na organelima te se izgube fiziološki elementi, klorofili postanu labilni. Do promjena na organelima može doći zbog naglih promjena u temperaturi i pH, radi enzimskih reakcija, kisika, svjetlosti itd. Najvažnije kemijsko svojstvo klorofila jesu strukturne modifikacije. Postoje četiri glavne točke na kojima započinju te modifikacije, a to su: kelati, esterska veza fitolovog alkohola, izociklički prsten te na osnovama porfirinske strukture (Hurst i sur., 2008). Reakcija modifikacije kelata započinje zamjenom magnezijevog iona s dva atoma vodika te se takva reakcija naziva feofitinizacija. Rezultat ove reakcije se vidi u promjeni boje. U slučaju klorofila a, koji je plavkasto-zelene boje, nastat će sivi feofitin a. U slučaju klorofila b žuto-zelene boje, pretvara se u smeđu boju feofitina b. Iako njegovo postojanje još nije potvrđeno, postoje dokazi da je enzim koji katalizira ovu vrstu reakcije magnezij deketalaza, koji time igra vrlo bitnu ulogu u metabolizmu klorofila. Reakcija se odvija u kiseloj sredini. Kinetički gledano, reakcija feofitinizacije klorofila a je 2,5 – 10 puta brža od reakcije feofitinizacije klorofila b. Ako se vodikov atom zamijeni s nekim drugim dvovalentnim metalom, poput cinka ili bakra, nastali kompleks može biti još stabilniji i više nego početni magnezijev kelat te poprima zelenu boju. Kod reakcije deesterifikacije ne dolazi do promjene boje jer se ne modificira osnovna makrociklička struktura. Dolazi do gubitka fitola koji čini molekulu klorofila topljivom u lipidima. Rezultat toga jeste povećan polaritet proizvoda. Ovu reakciju katalizira endogeni enzim klorofilaza. Supstrat klorofilazi može biti i feofitin pri čemu se kao produkt reakcije dobiva feoforbidi. Budući da reakcija nije specifična za kisele i alkalne uvjete, uobičajeno je praćena oksidativnim nus-reakcijama. Postoje tri vrste različitih reakcija na izocikličkom prstenu. Reakcija epimerizacije na C-13, reakcija dekarbometoksilacije na C-13 i alomerizacija. U reakciji epimerizacije se događa najmanje promjena. Nema promjena u boji, ni u apsorpcijskom spektru elektrona. To je jednostavna prostorna izomerizacija i dolazi samo do malog povećanja u polaritetu molekule. Dekarbometoksilacija je oksidativna reakcija u kojoj je karbometoksilna grupa na C-13 zamijenjena s atomom vodika pri čemu osnovna porfirinska struktura ostaje nepromijenjena. Kao i u reakciji epimerizacije, nastali spojevi – piroderivati, ostaju iste boje s istim spektroskopskim svojstvima kao i njihovi prekursori (klorofili, feofitni, klorofilidi i fioforbidi) te dolazi do blage promjene polariteta. Koliko brzo će se odvijati reakcija te kojim intenzitetom, ovisi o temperaturi i vremenu reakcije. Kod alomerizacije, izociklički prsten je oksidiran trima molekulama kisika, koje zamijenjuju atome vodika. U ovisnosti u kakvom se mediju odvija reakcija, može nastati OH-klorofil ili MeO-klorofil. OH- klorofil nastaje ako se reakcija odvija u vodenom mediju, a ako se reakcija odvija u alkoholnoj otopini, primjerice metanola, supstituent će biti metoksilna skupina MeO- (Shuman, 1975). Predloženi reakcijski mehanizmi odvijanja reakcija mogu biti razni: prijenos preko slobodnih radikala, oksidacijski enzimi poput klorofil-oksidge ili

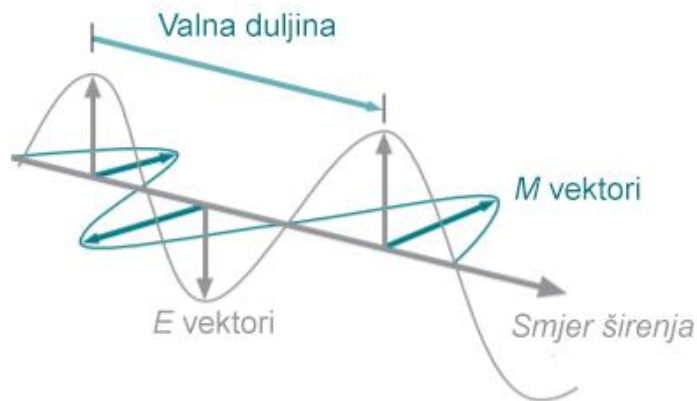
peroksidaze. Za sve tri reakcije koje se događaju na izocikličkom prstenu vrijedi isto. Ne dolazi do promjene boje jer se modifikacije ne odvijaju na porfirinskom prstenu. Jedino dolazi do promjene u polaritetu molekula. Četvrta vrsta modifikacije koja se događa je cijepanje makrocikla. Prva u nizu oksidativnih reakcija koje se događaju je cijepanje porfirinskog prstena, dolazi do gubitka originalnih svojstava na kromoforu što rezultira bezbojnim proizvodom. Zbog delokalizacije dvostruke veze u pirolskom prstenu, konačni derivati se pretvaraju u nefluorescentne proizvode (Hurst i sur., 2008). Klorofili i njihovi derivati kao i većina spojeva u prirodi imaju biološku aktivnost. U dosadašnjim istraživanjima su se istraživala neka svojstva kao što su antimutagena aktivnost, antikancerogena aktivnost i prevencija raka, antioksidacijska svojstva, antiupalna svojstva, kako djeluju na probavu, apsorpciju i metabolizam. Posebice u prehrani, pigmenti zauzimaju značajno mjesto, ponajviše zbog vrlo izraženog antioksidacijskog učinka. Klorofil sadrži visoki udio vitamina A, C, i E. Zahvaljujući tome što klorofil veže metale (kelat), pomaže pri uklanjanju štetnih metala iz organizma npr. žive. Klorofil po svojoj kemijskoj strukturi sadrži i atome magnezija pa se unosom klorofila u organizam unose i male količine magnezija kao i nekih drugih funkcionalnih tvari, posebice minerala (željezo, kalcij) i vitamina K, C i folne kiseline.

2.3. UV/VIS SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija je grana fizike koja proučava fizikalni sustav promatranjem efekata vezanih uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja. UV/VIS spektroskopija je instrumentalna metoda koja koristi elektromagnetsko zračenje ultraljubičastih valova i temelji se na interakciji elektromagnetskog zračenja s uzorkom (Paré i Bélanger, 1997). Tvar koju mjerimo, emitira ili apsorbira točno određenu količinu elektromagnetskog zračenja koja se zatim interpretira. Područje valne duljine (λ) unutar kojeg se mjeri UV/VIS spektrometrima, nalazi se između 200 i 800 nm. Spektroskopske tehnike upotrebljavaju svjetlost za interakciju s materijom te se tako dolazi i do saznanja o strukturi i konzistenciji uzorka. Elektronski prijelazi u molekulama se mogu podijeliti prema sudjelujućim molekularnim orbitalama. Od četiri moguća prijelaza ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$), samo su dva moguća ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$). Dio molekule koji apsorbira UV/VIS zračenje se naziva kromofor. Taj dio mora biti konjugiran kako bi se omogućio prijelaz elektrona. Ako nije konjugiran, mora postojati nezasićena veza npr. C=C. Prisutnost dvostrukih konjugiranih veza u organskim molekulama rezultira proširenim p-sustavom elektrona koji smanjuje energiju π^* -orbitale delokalizacijom elektrona. Takvi sustavi imaju $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelaze u UV/VIS rasponu elektromagnetskog spektra. Takve molekule su korisni alati za primjenu u kolorimetrijskim analizama. Lambert-Beerovim zakonom se može izraziti apsorbanca (Hofmann, 2010).

2.3.1. SVOJSTVA ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA

Elektromagnetsko zračenje pokazuje svojstva čestice i vala. Ako se gleda kao val, elektromagnetsko zračenje se sastoji od okomito oscilirajućeg električnog i magnetskog polja (Slika 9., a svaki oscilira u ravnini pod pravim kutom u smjeru rasapa. (Hofmann, 2010).

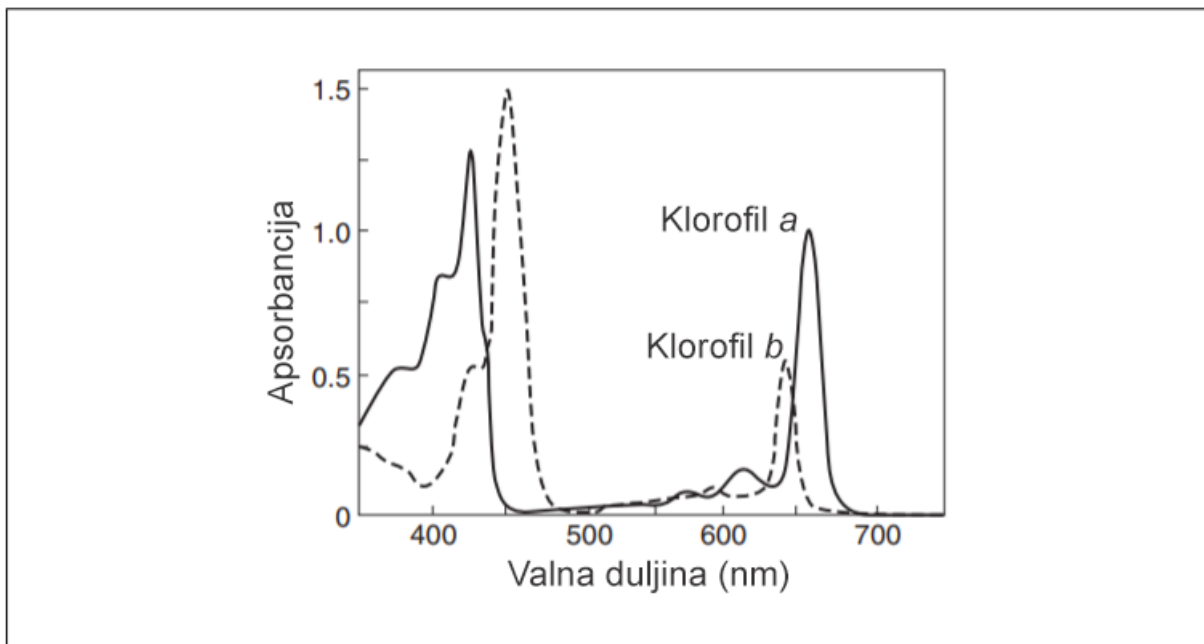


Slika 9. Elektromagnetsko zračenje (Hofmann, 2010.)

Valna duljina (λ) je prostorna udaljenost između dva susjedna brijega ili dva susjedna dola u sinusnom valnom obliku, a obično se mjeri u nanometrima (nm). Maksimalna duljina vektora naziva se amplituda. Frekvencija (ν) elektromagnetskog zračenja je broj oscilacija koje je napravio val u jednoj sekundi. Iz toga proizlazi da je mjerna jedinica za frekvenciju $1s^{-1}$ ili 1 Hz. Frekvencija je povezana s valnom duljinom preko brzine svjetlosti c ($c = 2,998 \times 10^8$ m/s u vakuumu). Formula koja povezuje sva tri parametra glasi: $\nu = c/\lambda$. Ako se elektromagnetsko zračenje gleda kao čestica, sastoji se od „paketa“ energije, koji se nazivaju fotoni. Energija pojedinog fotona je direktno proporcionalna njegovoj frekvenciji : $E = h \times \nu = h \times c / \lambda$ (Hofmann, 2010).

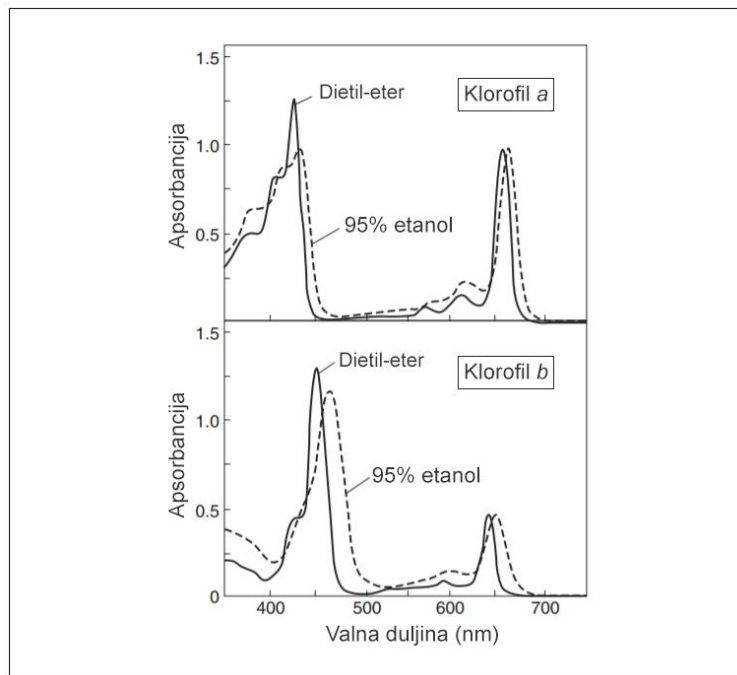
2.3.2. ODREĐIVANJE KLOROFILA PRIMJENOM UV/VIS SPEKTROSKOPIJE

Kvantitativno određivanje klorofila a i klorofila b u ekstraktu zelenog biljnog tkiva UV/VIS spektroskopijom ovisi o uzorku, otapalu te o korištenom spektrofotometru (Lichtenthaler, 1982). Slika 10. prikazuje apsorpcijski spektar izoliranih klorofila a i b u dietil-eteru. Klorofili a i b apsorbiraju uskim vrpčama (pikovi) u plavom (u blizini 428 i 453 nm) i crvenom (u blizini 661 i 642 nm) području elektromagnetskog spektra.



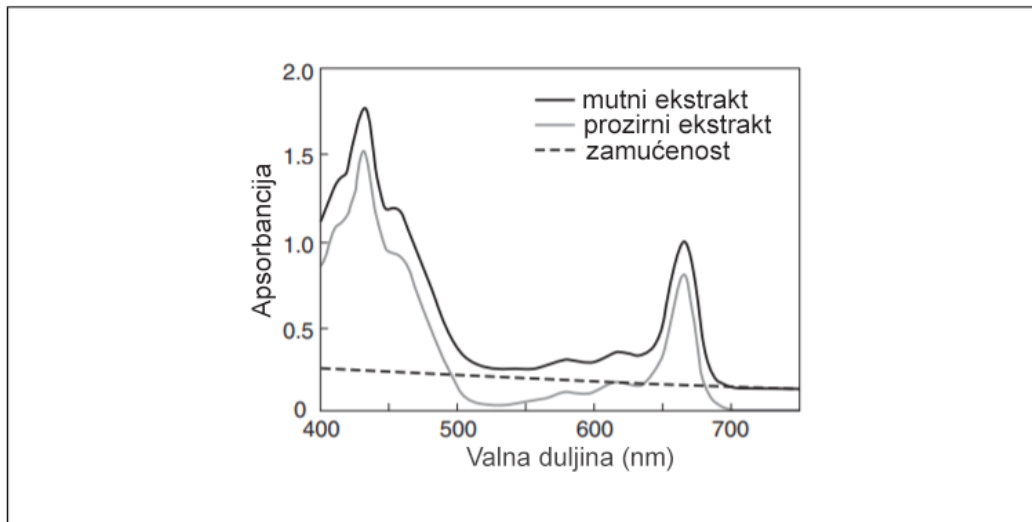
Slika 10. Apsorpcijski spektar izoliranih klorofila a i b u dietil-eteru
(Lichtenthaler, 2001)

Apsorpcijski maksimum jako ovisi o vrsti otapala koje je korišteno prilikom ekstrakcije te u nekim slučajevima i o vrsti spektrofotometra. Na primjer, ako se poveća polarnost otapala, apsorpcijski maksimum u crvenom području elektromagnetskog spektra klorofila a se pomiče sa 660 na 665 nm, dok se kod plavog područja elektromagnetskog spektra pomiče s 428 na 432 nm. Isto tako, apsorpcijski maksimumi klorofila b se u slučaju crvenog područja elektromagnetskog spektra pomiču sa 642 na 652 nm, dok se u slučaju plavog područja elektromagnetskog spektra s 452 na 469 nm. (Slika 11)



Slika 11. Razlike u apsorpcijskim spektrima klorofila a i b u dietil-eteru i 95% etanolu (Lichtenthaler, 2001)

Za kvantitativno određivanje klorofila koriste se apsorpcijski koeficijenti koji su u izravnoj korelaciji s pomacima valne duljine apsorpcijskih maksimuma. Zbog toga je bitno da se mjerenja apsorbancije pigmentata iz ekstrakta rade pri točnoj valnoj duljini. Molarni apsorpcijski koeficijent, koji je specifičan za svako otapalo, mora se uzeti u obzir prilikom primjene odgovarajućih jednadžbi za proračun sadržaja pigmenta. Biljni uzorak koji se ekstrahira organskim otapalom, prije nego što mu se izmjeri apsorbancija, mora biti čist odnosno uzorak ne smije biti mutan. Uzorak treba centrifugirati ili filtrirati kako bi postao proziran jer zamućenost i rasipanje svjetlosti dovode do veće apsorpcije između 400 i 800 nm s malim, ali kontinuiranim porastom prema kraćim valnim duljinama. Dakle, ako uzorak nije čist, odnosno proziran, rezultati mjerenja razine pigmentata će biti pogrešni (Slika 12).



Slika 12. Apsorpcijski spektar ekstrakta lista prije (mutno) i poslije (prozirno) centrifuge u 100%-tnom acetonu (Lichtenthaler, 2001)

Lambert-Beerov zakon predstavlja osnovu spektroskopske kvantifikacije pigmentata:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija na određenoj valnoj duljini svjetlosti (bezdimenzijska veličina), ε je molarni apsorpcijski koeficijent (-izražen u $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c je množinska koncentracija tvari u otopini (izražena u mol L^{-1}), a l je duljina puta svjetlosti kroz uzorak tj. duljina kivete (izražena u cm) koja je najčešće duga 1 cm . Ova jednadžba je primjenjiva samo ako se radi o jednom izoliranom pigmentu. Ako uzorak sadrži više klorofila, jednadžba postaje kompliciranija. Apsorbancija se tada izražava kao suma apsorbancija klorofila a i klorofila b jer pri apsorpcijskom maksimumu apsorpcija klorofila a pridonosi apsorpciji klorofila b i obrnuto :

$$A_{\max a} = A_{(a)\max a} + A_{(b)\max a} = (\varepsilon_{(a)\max a} \times c_a \times l) + (\varepsilon_{(b)\max a} \times c_b \times l) \quad (2)$$

$$A_{\max b} = A_{(a)\max b} + A_{(b)\max b} = (\varepsilon_{(a)\max b} \times c_a \times l) + (\varepsilon_{(b)\max b} \times c_b \times l) \quad (3)$$

Ako se uzme da je duljina puta svjetlosti 1 cm i uvede faktor z (6), izrazi za koncentraciju klorofila a i b se preuređuju:

$$c_a = \left(\frac{\varepsilon_{(b)\max b} \times A_{\max a}}{z} \right) - \left(\frac{\varepsilon_{(b)\max a} \times A_{\max b}}{z} \right) \quad (4)$$

$$c_b = \left(\frac{\varepsilon_{(a)\max a} \times A_{\max b}}{z} \right) - \left(\frac{\varepsilon_{(a)\max b} \times A_{\max a}}{z} \right) \quad (5)$$

$$Z = (\varepsilon_{(a) \max a} \times \varepsilon_{(b) \max b}) - (\varepsilon_{(a) \max b} \times \varepsilon_{(b) \max a}) \quad (6)$$

U ekstraktu biljnog materijala se osim klorofila nalaze i karotenoidi ($x+c$ = ksantofili i karoteni). Apsorbancija pri 470 nm određena je sumom klorofila a, klorofila b i karotenoida:

$$A_{470} = A_{(x+c)470} + A_{(a)470} + A_{(b)470} \quad (7)$$

iz čega slijedi, prema Lambert-Beerovom zakonu :

$$A_{(a)470} = \varepsilon_{(a)470} \times c_a \times l \quad (8)$$

$$A_{(b)470} = \varepsilon_{(b)470} \times c_b \times l \quad (9)$$

$$A_{(x+c)470} = \varepsilon_{(x+c)470} \times c_{(x+c)} \times l \quad (10)$$

Duljina puta svjetlosti je 1 cm pa za koncentraciju karotenoida vrijedi sljedeća jednadžba:

$$c_{(x+c)} = \frac{A_{(a)470} - (\varepsilon_{(a)470} \times c_a) - (\varepsilon_{(b)470} \times c_b)}{\varepsilon_{(x+c)470}} \quad (11)$$

S obzirom na vrstu otapala koje je korišteno, može se odrediti koncentracija klorofila a i b i karotenoida. Pri tome se koriste literaturno dostupni podaci o molarnim apsorpcijskim koeficijentima čistih tvari u pojedinom otapalu ili smjesi otapala te se izrazi (4), (5) i (11) pojednostavljaju. Tako su za npr. 90% metanolni ekstrakt jednadžbe sljedeće:

$$\gamma_a (\mu g/ml) = 16,82A_{665,2} - 9,28A_{652,4} \quad (12)$$

$$\gamma_b (\mu g/ml) = 36,92A_{652,4} - 16,54A_{665,2} \quad (13)$$

$$\gamma_{(x+c)} (\mu g/ml) = \frac{1000A_{470} - 1,91\gamma_a - 95,15\gamma_b}{225} \quad (14)$$

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

- Osušeni i usitnjeni listići origana (KOTÁNYI, Wolkersdorf, Austrija) (Slika 13)



Slika 13. Uzorak origana

3.2. Kemikalije

- 90%-tna vodena otopina metanola
- Deionizirana voda

3.3. Aparatura i pribor

- Tehnička vaga (Slika 14)
- Vortex miješalica
- Laboratorijske čaše
- Erlenmeyerove tikvice
- Tikvice s okruglim dnom
- Odmjerne tikvice
- Boca štrcaljka
- Menzure
- Automatska pipeta volumena 100-1000 μL
- Graduirane pipete

- Propipete
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapić
- Magnetni štapić
- Špatula
- Filter papir
- Filtar 0,2 μm PTFE
- Mikrovalni reaktor Milestone Start S (Slika 15.)
- UV/VIS spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25 (Slika 16.)
- kvarcne kivete

3.4. Priprema uzorka

Uzorak origana važe se na tehničkoj vagi (Slika 14.) u papirnoj lađici. 500 g prethodno izvaganog origana se stavlja u tikvicu s ravnim dnom od 50 mL, dodaje se 20 mL 90%-tne otopine metanola. U tako pripremljeni uzorak se dodaje magnet kako bi se postiglo ravnomjerno miješanje te se stavlja u mikrovalni reaktor.



Slika 14. Tehnička vaga

3.5. Metode rada

3.5.1. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem

Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem radila se u mikrovalnom reaktoru Milestone Start S (Slika 15) u Laboratoriju za fizikalnu kemiju i koroziju PBF-a. 500 g uzorka pomiješanog s 20 mL 90%-tne otopine metanola stavlja se u mikrovalni reaktor na 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C u vremenskom periodu od 3 minute, 6 minuta i 9 minuta.



Slika 15. Mikrovalni reaktor Milestone Start S

3.5.2. Ekstrakcija pigmenata iz taloga

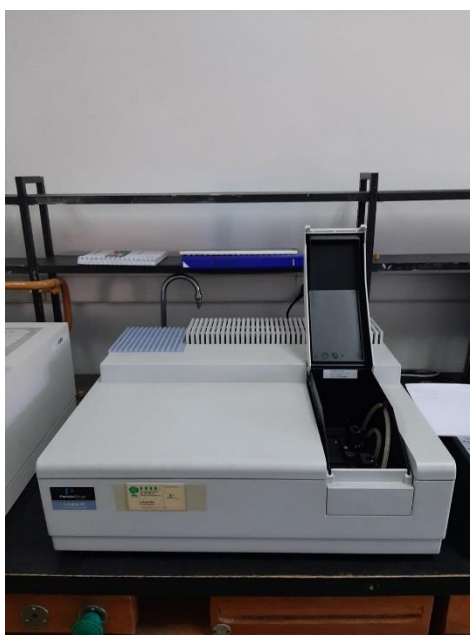
Od taloga origana mora se odvojiti ekstrakt kojem će se određivati koncentracija klorofila. Suspenzija se najprije filtrira kroz Büchnerov lijevak, a zatim se metanolni ekstrakt, koji sadrži klorofile, filtrira kroz 0,2 μm PTFE filtar.

3.5.3. UV/VIS spektroskopsko određivanje klorofila *a* i *b*

Parametri snimanja na UV/VIS spektrofotometru (Slika 16):

- početna valna duljina: 350 nm
- konačna valna duljina: 700 nm
- interval: 0,2 nm
- brzina snimanja: 480 nm/min

Masena koncentracija klorofila a i b u 90% metanolnom ekstraktu listića origana određuje se pomoću UV/VIS spektrofotometra primjenom Lichtenhalterovih jednadžbi. U dvoznačnom UV/VIS spektrofotometru se mjeri apsorbancija 90%-tnih metanolnih ekstrakata tako da se u jednu kvarcnu kivetu stavlja 90%-tni čisti metanol, a u drugu ekstrakt. Apsorbancija otopine se očitava pri valnoj duljini od 665,2 i 652,4 nm te se uz pomoć jednadžbi (12) i (13) izračuna koncentracija klorofila a i b u ekstraktu.



Slika 16. UV/VIS spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 25

4. Rezultati i rasprava

Cilj rada bio je ispitati utjecaj mikrovalnog zračenja na koncentraciju klorofila a i b u uzorku origana u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije. Svaki uzorak za ekstrakciju imao je masu 500 mg koji je dodan u 20 mL 90% metanola. Ekstrakcija uzoraka provodila se pri temperaturama od 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C u vremenskom razdoblju od 3 minute, 6 minuta i 9 minuta. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti biljnog materijala mikrovalnim zračenjem ima mnogo prednosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Ekstrakcija mikrovalnim zračenjem je brža, odnosno vrijeme ekstrakcije je skraćeno, manja potrošnja energije, manji utrošak otapala, prinos je veći te su potrebne niže temperature za isti učinak. Iz tih razloga ovu metodu ubrajamo u „zelene“ metode ekstrakcije. U ovom radu su korišteni osušeni listići origana preostali nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem. U tablicama 1. i 2. prikazan je utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na masenu koncentraciju klorofila a i b u uzorku.

Tablica 1. Prikaz utjecaj temperature i vremena na masenu koncentraciju klorofila a u 90% metanolnom ekstraktu origana

UZORAK	3 min γ (mg/mL)	6 min γ (mg/mL)	9 min γ (mg/mL)
35 °C	1,647	1,783	1,861
40 °C	1,535	1,711	2,019
45 °C	2,133	2,153	2,207
50 °C	1,817	2,210	3,544

Tablica 2. Prikaz utjecaj temperature i vremena na masenu koncentraciju klorofila b u 90% metanolnom ekstraktu origana

UZORAK	3 min γ (mg/mL)	6 min γ (mg/mL)	9 min γ (mg/mL)
35 °C	1,140	1,419	1,447
40 °C	1,250	1,484	1,606
45 °C	1,613	1,749	1,696
50 °C	1,655	1,954	2,526

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti kako koncentracija klorofila a i b raste s porastom vremena ekstrakcije. Kod klorofila a na 35 °C masena koncentracija raste od početne 1,647 mg/mL preko 1,783 mg/mL do konačne 1,861 mg/mL. Na 40 °C raste od početne 1,535 mg/mL do konačne 2,019 mg/mL preko 1,711 mg/mL. Na 45 °C, masena koncentracija također raste od 2,133 mg/mL do 2,207 mg/mL te i pri 50 °C raste od 1,817 mg/mL do 3,544 mg/mL. Za klorofil b vrijedi isto, gdje pri svakoj konstantnoj temperaturi s porastom vremena raste i masena koncentracija izuzev pri 45 °C. Na temperaturi od 45 °C masena koncentracija raste od početne 1,613 mg/mL do 1,749 mg/mL (6 minuta) te se zatim smanjuje na 1,696 mg/mL (9 minuta). Ova se pogreška može pripisati eksperimentalnom radu u izvođenju eksperimenta u laboratoriju budući da se nije radilo više ponavljanja. Može se zaključiti da s porastom vremena zagrijavanja raste i masena koncentracija klorofila a i b pri konstantnoj temperaturi ekstrakcije. Do porasta masene

koncentracije također dolazi i s porastom temperature pri konstantnom vremenu ekstrakcije. Tako pri vremenu ekstrakcije od 3 minute koncentracija klorofila b raste od početne 1,140 mg/mL do 1,655 mg/mL, u vremenskom periodu od 6 minuta raste od 1,419 mg/mL do 1,954 mg/mL te u vremenskom periodu od 9 minuta raste od 1,447 mg/mL do 2,526 mg/mL. Za klorofil a se mogu uočiti neke nepravilnosti ako se gledaju rezultati s obzirom na konstantno vrijeme pri čemu se mijenja temperatura ekstrakcije. U vremenskom periodu od 3 minute početna koncentracija klorofila a je 1,647 mg/mL, zatim pada na 1,535 mg/mL te na kraju dolazi do velikog skoka na 2,133 mg/mL te ponovno pada na 1,817 mg/mL što je i konačna koncentracija. U vremenskom periodu od 6 minuta, masena koncentracija raste s početne 1,783 mg/mL, zatim pada na 1,711 mg/mL te dalje nastavlja rasti na 2,153 mg/mL i u konačnici na 2,210 mg/mL. Pad pri 40 °C se može uzeti kao pogreška pri radu te zanemariti. U vremenskom periodu od 9 minuta, masena koncentracija raste postupno od početne 1,861 mg/mL, zatim se povećava na 2,019 mg/mL te i dalje raste na 2,207 mg/mL sve do konačne pri 50 °C koja iznosi 3,544 mg/mL. Zaključno, masena koncentracija pri konstantnom vremenu raste postepeno s povišenjem temperature. Razlog zbog kojeg je došlo do odstupanja od pravila, koja su se dogodila pri vremenskom periodu od 3 minute, može biti prekratko vrijeme zagrijavanja kako bi se postigli relevantni rezultati.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti kako se koncentracija klorofila a i b povećava s povećanjem temperature i vremena mikrovalne ekstrakcije. Koncentracija klorofila a i b u metanolnom ekstraktu određena je primjenom UV/VIS spektroskopije.

6. Popis literature

Anonymus 1 (2020),

<<https://portalosuma.com/2016/10/20/dobrobiti-klorofila/>> Pristupljeno 23.srpnja 2020.

Anonymus 2 (2020),

<<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/074ffbb3-a1b7-4fe1-9f4a-1ea3539d642d/biologija-1/m03/j06/index.html>> Pristupljeno 9. srpnja 2020.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2013) Biochemistry, 6. izd., W. H. Freeman and Company. str. 542-565.

Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3** (1): 32-47.

Delazar A., Nahar L., Hamedayazdan S., Sarker S. D. (2012) Natural Products Isolation. Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation, Springer Science+Business Media, str. 90-98.

Hofmann A. (2010) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Spectroscopic Techniques: I Spectrophotometric Techniques, Cambridge University Press. str. 477-492.

Humphrey, A. M. (1980) Chlorophyll. *Food Chemistry*, Elsevier Ltd. **5** (1): 57-67.

Hurst W.J. (2008), Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. U: Chlorophylls, 2. izd., Mínguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero L., Roca M., Jarén-Galán M., ur., Taylor&Francis Group. str. 337-376.

Ibarz A., Barbosa-Canovas G.V. (2002) Unit Operations in Food Engineering, Taylor&Francis Group. str. 773.

Kaufmann B., Christen P. (2002): Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction *Phytochemical Analysis* **13**: 105–113.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy U: Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA), Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., ur., John Wiley and Sons, F4.3.1- F4.3.8

Makri O. (2002) Cultivation of oregano, in Kintzios S (ed.), Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles – Oregano: The Genera *Origanum* and *Lippia*, Taylor & Francis. str. 153–162.

Negishi T., Rai H., Hayatsu H. (1997) Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Research* **376**: 97-100.

Neral B. i sur. (2007) Efikasnost mikrovalnog fiksiranja reaktivnog bojila C.I. Reactive Red 24 u digitalnom tisku pamučnih tkanina. *Tekstil* **56** (6): 358-367

Paré J. R. J., Bélanger J. M. R. (1997) Instrumental methods in Food analysis,. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry-Vol 18, Elsevier. str. 93-178.

Shuman F.R., Lorenzen C.J. (1975), Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore1. *Limnology and Oceanography* **20** (4): 580-586.

Van Wyk Ben-Erik (2013) Culinary herbs and spices of the world, The University of Chicago Press, Ltd., Royal Botanic Gardens, Kew. str. 198.

Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. G. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *The plant cell* **7**:1039-1057.

Zrinski I., Eckert-Maksić M. (2005) Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi, *Kemija u industriji* **54**: 469- 473.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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



ime i prezime studenta