

Karakterizacija kemijskog i bioaktivnog sastava dobričice (*Glechoma hederacea* L.) s različitih prirodnih staništa u Republici Hrvatskoj

Božac, Natalia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:675778>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Natalia Božac
1250/PI

KARAKTERIZACIJA
KEMIJSKOG I BIOAKTIVNOG
SASTAVA DOBRIČICE (*Glechoma*
***hederacea* L.) S RAZLIČITIH**
PRIRODNIH STANIŠTA U
REPUBLICI HRVATSKOJ

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes te uz pomoć asistentice Danijele Šeremet, mag. ing.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta „*Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda*“ (IP-2019-04-5879) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes koja mi je omogućila izradu ovog rada te olakšala njegovu izradu svojim stručnim vodstvom.

Od srca zahvaljujem i asistentici Danijeli Šeremet, mag. ing., na uloženom trudu i vremenu, strpljenju, korisnim savjetima i prijateljskoj podršci prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala obitelji i bliskim prijateljima, posebno roditeljima, teti Mariji i Matei bez kojih ne bih bila ovdje gdje sam sada. Hvala na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, strpljenju i motivaciji!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KARAKTERIZACIJA KEMIJSKOG I BIOAKTIVNOG SASTAVA DOBRIČICE (*Glechoma hederacea* L.) S RAZLIČITIH PRIRODNIH STANIŠTA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Natalia Božac, 1250/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bila je karakterizacija osnovnog kemijskog i bioaktivnog sastava uzoraka dobričice (*Glechoma hederacea* L.), ljekovite biljke tradicionalno upotrebljavane u narodnoj medicini, sakupljenih s različitih lokacija kontinentalnog dijela Republike Hrvatske. Korištene ekstrakcijske metode (konvencionalna ekstrakcija potpomognuta zagrijavanjem (HAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE)) optimirane su metodom odzivnih površina pri čemu su optimalni parametri za pojedine metode iznosili redom: 10 min, 100 °C i 0,01 g mL⁻¹; 90 °C, 4,93 min i 0,01 g mL⁻¹; 5 min, 200 °C i 0,01 g mL⁻¹. Uzorke dobričice karakterizira visok udjel netopljivih prehrambenih vlakana, proteina te pojedinačnih mineralnih tvari, dok je SWE metoda rezultirala ekstraktom najvišeg udjela ukupnih polifenola (101,71 mg GAE g⁻¹ s.tv) te najvećim antioksidacijskim kapacitetom (ABTS: 0,650 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,644 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.). Najviši udjel pojedinačnih polifenola, karakterističnih za dobričicu, određen je u ekstraktu dobivenom MAE, pri čemu su dominirale fenolne kiseline: klorogenska, kafeinska i ružmarinska te flavonoid rutin.

Ključne riječi: dobričica, ekstrakcija subkritičnom vodom, mikrovalna ekstrakcija, polifenoli

Rad sadrži: 83 stranice, 20 slika, 23 tablica, 97 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. Draženka Komes*

Pomoć pri izradi: *Danijela Šeremet, mag.ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo
2. Prof.dr.sc. Draženka Komes
3. Prof.dr.sc. Ksenija Marković
4. Prof.dr.sc. Nada Vahčić (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

CHARACTERIZATION OF CHEMICAL AND BIOACTIVE COMPOSITION OF GROUND IVY (*Glechoma hederacea* L.) FROM DIFFERENT NATURAL HABITATS IN CROATIA

Natalia Božac, 1250/PI

Abstract: The aim of this study was the evaluation of the chemical and bioactive composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.), an herb traditionally used in folk medicine, harvested at different locations of the Republics of Croatia continental part. Extraction methods used for obtaining ground ivy water extracts (heat-assisted extraction (HAE), microwave-assisted extraction (MAE) and subcritical water extraction (SWE)) were optimized using response surface methodology. Obtained optimal parameters were: 10 min, 100 °C and 0,01 g mL⁻¹; 90 °C, 4,93 min and 0,01 g mL⁻¹; 5 min, 200 °C and 0,01 g mL⁻¹, respectively. Ground ivy samples were found to be rich in insoluble dietary fiber, protein and mineral content. SWE method resulted in extract with highest total phenolic content (101,71 mg GAE g⁻¹ s.tv) and antioxidant capacity (ABTS: 0,650 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,644 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.). The highest content of individual phenolic compounds, characteristic for ground ivy, including phenolic acids chlorogenic, caffeic and rosmarinic acid and flavanoid rutin was detected in MAE extract.

Keywords: *ground ivy, microwave-assisted extraction, phenolic compounds, subcritical water extraction*

Thesis contains: 83 pages, 20 figures, 23 tables, 97 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: PhD. *Draženka Komes*, Full professor

Technical support and assistance: *Danijela Šeremet*, MSc

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Durgo, Full professor
2. PhD. Draženka Komes, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full professor
4. PhD. Nada Vahčić, Full professor

Thesis defended: September 29th, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BILJNA FLORA REPUBLIKE HRVATSKE.....	2
2.2. DOBRIČICA (<i>Glechoma hederacea</i> L.).....	2
2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI	4
2.4. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA	6
2.4.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	7
2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	8
2.4.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	10
2.5. OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJAL.....	16
3.1.1. Uzorci.....	16
3.1.2. Reagensi.....	17
3.1.3. Aparatura.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Određivanje makromolekularnog sastava	19
3.2.2. Određivanje udjela pigmenata.....	26
3.2.5. Određivanje ekstrakcijskog prinosa	34
3.2.6. Bliska infracrvena spektroskopija (NIR).....	35
4.1. ODREĐIVANJE MAKRO- I MIKROSASTAVA SAKUPLJENIH UZORAKA DOBRIČICE	36
4.1.1. Određivanje osnovnog makromolekulskog sastava	36
4.1.2. Određivanje sastava mineralnih tvari.....	38
4.1.3. Određivanje sastava masnih kiselina.....	40
4.2. ODREĐIVANJE UDJELA PIGMENATA U SAKUPLJENIM UZORCIMA DOBRIČICE	42
4.3. OPTIMIRANJE PARAMETARA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA DOBRIČICE	43
4.3.1. Optimiranje parametara za konvencionalnu metodu ekstrakcije (HAE)	44
4.3.2. Optimiranje parametara za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MAE)	50
4.3.3. Optimiranje parametara za ekstrakciju subkritičnom vodom (SWE)	56
4.4. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNIH EKSTRAKATA DOBRIČICE DOBIVENIH POD OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJA	63
4.4.1. Određivanje ekstrakcijskog prinosa	63
4.4.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata.....	64

4.4.3. NIR i PCA analiza.....	71
5. ZAKLJUČCI.....	75
6. LITERATURA.....	76

1. UVOD

Sukladno suvremenom načinu života razvijaju se i novi prehrambeni trendovi. Orijentiranost prema „zdravom“ načinu života doprinosi sve većem razvoju tržišta funkcionalnih proizvoda. Potrošači traže kvalitetnu, nutritivno vrijednu hranu, hranu s potencijalnim zdravstvenim benefitima te hranu bez sintetskih aditiva. U skladu s time, novija znanstvena istraživanja usmjerena su na proučavanje bioaktivnog sastava biljaka, posebice polifenola, u svrhu inkorporacije istih u prehrambene proizvode kao funkcionalnih sastojaka.

Polifenolni spojevi skupina su sekundarnih biljnih metabolita, kojima se pripisuje snažno antioksidacijsko djelovanje te antimikrobna, protuupalna, antialergijska i antikancerogena svojstva. Biljka dobričica (*Glechoma hederacea* L.) iz porodice *Lamiaceae*, kao ljekovita biljka s dugom tradicijom primjene u narodnoj medicini, također je prepoznata kao potencijalni izvor bioaktivnih spojeva, uključujući polifenole.

Kako bi se polifenolni spojevi biljnoga podrijetla mogli identificirati, kvantificirati, ali i dalje inkorporirati u proizvode, potrebno ih je prethodno iz biljnoga materijala i ekstrahirati. Odabir ekstrakcijske metode ovisi o vrstama i kemijskim strukturama ciljanih spojeva, svojstvima biljnoga materijala iz kojih se ekstrahiraju, ali i čimbenicima poput onih ekoloških i financijskih. Prilikom razvoja metode ekstrakcije potrebno je definirati parametre ekstrakcije poput veličine čestica, omjera uzorka i otapala, vremena, tlaka i temperature ekstrakcije te drugih parametara relevantnih za odabranu metodu. Metode ekstrakcije danas se najčešće dijele na konvencionalne i inovativne. Konvencionalne metode ekstrakcije imaju određene nedostatke, kao što su uporaba velikih količina otapala i uporaba toksičnih otapala, dugo vrijeme ekstrakcije, niska efikasnost, degradacija vrijednih spojeva te veliki utrošak energije. Kako bi se prevladali navedeni nedostaci novija istraživanja orijentiraju se na razvoj inovativnih metoda ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ekstrakcije subkritičnom vodom.

Cilj ovog rada je karakterizacija osnovnog kemijskog i bioaktivnog sastava uzoraka dobričice sakupljenih s različitih lokacija unutar kontinentalne Hrvatskoj. U svrhu dobivanje maksimalne ekstrakcijske učinkovitosti polifenola istražit će se konvencionalna metoda ekstrakcije potpomognuta toplinom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija subkritičnom vodom, čiji parametri će se optimirati metodom odzivnih površina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BILJNA FLORA REPUBLIKE HRVATSKE

Prema podacima Flora Croatica Database (2018), biljna flora Republike Hrvatske (RH) sastoji se od 4630 vrsta i 1186 podvrsta, koje pripadaju 1098 rodova, odnosno 189 porodica. RH je treća zemlja u Europi prema raznolikosti biljne flore što je posljedica specifičnog geografskog smještaja, koji se nalazi pod utjecajem sredozemne i kontinentalne klime te vrlo raznolikog reljefa (od planinskih masiva, krških polja, riječnih dolina do vrlo razvedene obale s brojnim otocima). Biljna flora RH uključuje 10 % endemskih vrsta, poput vrlo poznate biljke Velebitske degenije (*Degenia velebitica*) te prastaru floru (relikte) (Botanički vrt PMF, 2021; Nikolić, 2001). Oko 9 % vrsta klasificira se ugroženima, što je 2 do 4 puta manje u odnosu na susjedne zemlje. Ovaj podatak ukazuje na dobro očuvanje biljne flore RH (Nikolić, 2001).

Petnaest najvećih porodica sadrže oko 77 % svih vrsta i podvrsta, a tri najveće porodice su *Compositae* (742), *Fabaceae* (458) i *Poaceae* (448). Porodica *Lamiaceae* s ukupno 226 vrsta i podvrsta nalazi se na 8. mjestu (Nikolić, 2001). Oko 17 % biljnih vrsta imaju svoju primjenu, ponajviše u medicini, zatim prehrani, kao medonosne biljke, prehrambeni aditivi, sastojci u izradi različitih materijala, i slično. Najveći broj uporabnih biljaka pripada trima najvećim porodicama, no *Lamiaceae* se također nalaze pri vrhu te liste (Nikolić i Rešetnik, 2007).

Za uporabu u medicini i tradicionalnoj medicini koristi se čak 64 % poznatih vrsta, najviše u liječenju digestivnih i genitourinarnih poremećaja, infekcija, respiratornih tegoba, metaboličkih poremećaja, poremećaja lokomotornog i krvožilnog sustava te upala. Porodice koje obuhvaćaju najviše vrsta za medicinsku uporabu su *Rosaceae*, *Astraceae* i *Lamiaceae* (Nikolić i Rešetnik, 2007).

Biljna flora RH sastoji se od brojnih autohtonih i alohtonih vrsta. Uporaba autohtonih, samoniklih vrsta zamrla je razvojem poljoprivrede i industrije, no posljednjih su desetljeća postale predmetom brojnih istraživanja, prvenstveno zbog povoljnog kemijskog sastava, u svrhu ponovnog uključivanja u prehranu (Žuna Pfeiffer i sur., 2020).

2.2. DOBRIČICA (*Glechoma hederacea* L.)

Dobričica (slika 1) (*Glechoma hederacea* L., sinonim: *Napeta glechoma*, Benth.) je višegodišnja i aromatična zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Zbog karakteristične puzave stabljike naziva se i 'puzavom dobričicom' (Kumarasamy i sur., 2002). Stabljika

dobričice četvrtastog je presjeka te raste isprepletano uz tlo, dok se cvjetne stabljike pružaju u vis te rastu do 0,5 m visine. Listovi su nasuprotni i bubrežastog oblika s okruglastim rubovima. Lice, odnosno gornja površina lista je sjajna i tamno zelene boje, dok je naličje (donja) površina lista svjetlije boje i bez sjaja. Iz pazušaca srednjih i gornjih listova rastu cvjetovi skupljeni u cvatove (do 6 cvjetova u skupini). Cvjetovi su ljubičaste ili plave boje te se sastoje od pet latica, od kojih 3 čine gornju, a 2 donju usnu cvijeta. Dobričica cvate od travnja do kolovoza, a razmnožava se sjemenom i zakorijenjavanjem novih stabljika (Grlić, 1980).



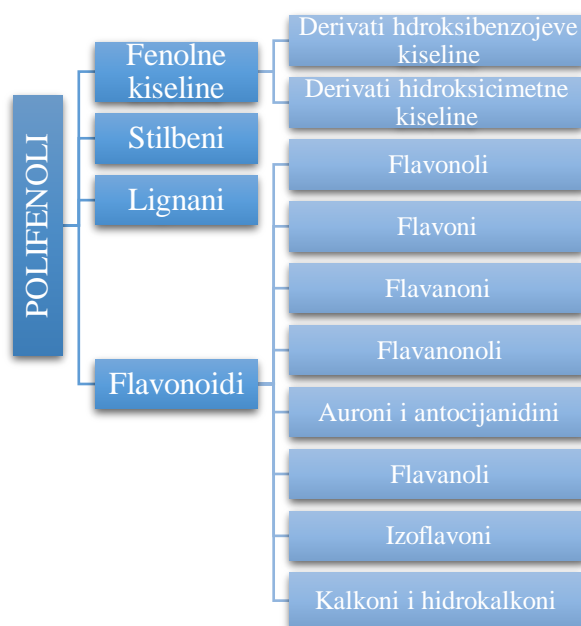
Slika 1. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) (Calow, 2007)

Dobričica je rasprostranjena u umjerenom klimatskom pojasu na području Azije, Europe i Sjedinjenih Američkih Država. Raste na sjenovitim mjestima; na vlažnim i hranjivim staništima poput livada, travnjaka, listopadnih šuma; uz jarke, potoke, živice, grmlje i putove (Kumarasamy i sur., 2002). Često raste kao korov po poljima, njivama i vrtovima. U Republici Hrvatskoj rasprostranjena je u kontinentalnom dijelu zemlje, dok u priobalnim područjima ne raste (Grlić, 1980).

Osim kao korov, dobričica je prepoznata i kao ljekovita biljka, posebice u liječenju prehlade, astme, bronhitisa, artritisa i slično. Nadzemni dijelovi biljke posjeduju antihipertenzijska, stimulativna, diuretička, protuupalna svojstva te svojstva adstringiranja (stezanja sluznica i tkiva) (Kumarasamy i sur., 2002; Grlić, 1980). Vodeni ekstrakti dobričice pokazali su različite povoljne biološke aktivnosti poput depigmentacije, antikancerogenih, antioksidacijskih, protuupalnih, hepatoprotektivnih i antimelanogenih svojstava. Za navedena svojstva najvjerojatnije su zaslužni polifenolni spojevi kao glavni antioksidansi dobričice (Chao i sur., 2020; Chou i sur., 2019).

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli, sekundarni biljni metaboliti viših biljaka, predmet su znanstvenih istraživanja dugi niz godina, prvenstveno zbog njihovog potencijalnog pozitivnog učinka na ljudski organizam. Zastupljeni su u svim vrstama biljnih tkiva, gdje imaju niz fizioloških i morfoloških uloga poput pigmenata, biljnih hormona, obrane biljaka od biotičkih i abiotičkih stresora. Polifenoli obuhvaćaju nekoliko tisuća spojeva različitih kemijskih struktura te se najčešće dijele na flavonoide i neflavonoide (slika 2) (Daglia, 2012; Górnjak i sur., 2019).



Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (Daglia, 2012; Górnjak i sur., 2019)

Polifenolni se spojevi u biljkama najčešće ne nalaze u slobodnom obliku. Mogu se naći vezani za ugljikohidrate (najčešće u obliku glikozida sa šećerima), organske kiseline ili su vezani međusobno. Kemijske strukture ovih spojeva uvjetuju njihova snažna antioksidacijska svojstva, antimikrobna, protuupalna, antialergijska i antikancerogena svojstva. Zbog navedenih svojstava polifenolni spojevi svoju su primjenu pronašli u prevenciji različitih bolesti, kao aditivi u prehrambenoj industriji, u kozmetičkoj industriji, industriji proizvodnje papira, i slično (Bravo, 1998; Daglia, 2012).

Mehanizmi antioksidacijskog učinka polifenola uključuju izravno uklanjanje slobodnih radikala (doniranjem elektrona ili vodikovog atoma), keliranja metalnih iona uključenih u nastajanje slobodnih radikala, inhibiciju enzima uključenih u nastajanje slobodnih radikala i regeneraciju antioksidansa staničnih membrana kao što je α -tokoferol. Polifenole karakterizira

niska bioraspoloživost, odnosno niska razina sposobnosti prelaska crijevne barijere i ulaska u krvotok. Zbog toga se većina antioksidacijske aktivnosti odvija u probavnom traktu. Primjer takve aktivnosti jest inhibicija peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina hem-željezom (Hollman i Katan, 1999; Vulcain i sur., 2005).

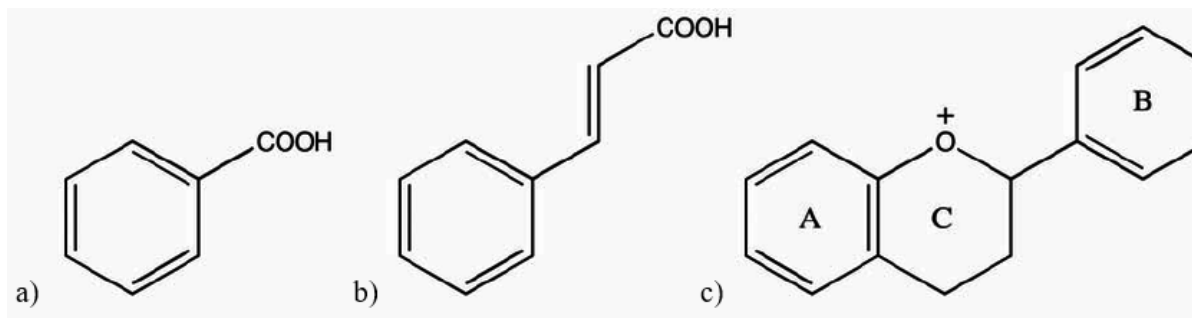
Osim same fenolne strukture polifenola, nezasićenost veza, stupanj metoksiliranosti i broj hidroksilnih skupina također znatno utječu na antioksidacijsku aktivnost polifenola. Na primjer, polimerizacijom flavonoidnih monomera nastaju proantocijanidini i kondenzirani tanini, koji zbog velikog broja hidroksilnih skupina imaju visoki antioksidacijski potencijal *in vitro*, dok glikozilacija značajno smanjuje antioksidacijski kapacitet polifenola (Bors i sur., 1990).

Struktura flavonoida je heterociklička: sastoje se od osnovnog kostura fenil-benzopirana ($C_6-C_3-C_6$). Osnovna struktura sastoji se od dva benzenska prstena (prsten A i B) spojena linearnim lancem od 3 ugljikova atoma. Lanac ugljikovih atoma tvori zatvoreni piranski prsten (prsten C) s A benzenskim prstenom kako je prikazano na slici 3. Prema nezasićenosti veza te oksidacijskom stanju središnjeg piranskog prstena flavonoidi se dijele na flavonole (npr. kvercetin, kampferol), flavone (najčešće u obliku glikozida luteolina i apigenina), flavanone, flavanole (katehini i proantocijanidini), izoflavone (npr. genistein), flavanonole, kalkone i hidrokalkone, aurone i antocijanidine (Daglia, 2012; Górnjak i sur., 2019). U prirodi se, osim u slobodnom obliku, nalaze i u obliku sulfoniranih i metiliranih derivata, glikozida te kompleksa s lipidima, aminima i organskim kiselinama (Duthie i sur., 2003).

Flavonoidi su najveća skupina polifenolnih spojeva u prirodi (poznato preko 8 000 različitih flavonoida). Prisutni su u većini biljaka te raspodijeljeni u većini njihovih organa, pri čemu njihova koncentracija varira ovisno o biljci i promatranom organu. Također, na količinu i sastav flavonoida prisutnih u biljci utječu genetičke predispozicije, starost biljke i okolišni čimbenici poput dostupnosti vode i nutrijenata, intenziteta sunčeve svjetlosti, i slično. Flavonoidi u biljkama imaju niz različitih uloga. Antocijani predstavljaju važne biljne pigmente u cvjetovima i plodovima biljaka. Također, uz neke nebojane flavonoide poput flavona i flavonola imaju protektivnu ulogu biljnih organa od biotičkih i abiotičkih stresora. Jedno od važnijih uloga flavonoida jest i antimikrobno djelovanje, zbog čega se proučavaju kao antimikrobni agensi u prehrambenim proizvodima, ali i kao tvari koje sinergistički djeluju s lijekovima te olakšavaju suzbijanje humanih infekcija multirezistentnim bakterijama. U ljudskoj prehrani predstavljaju značajan izvor antioksidansa te se povezuju sa zdravstvenim benefitima namirnica poput crvenog vina, čaja, meda, raznog voća, i slično (Górnjak i sur., 2019).

Fenolne kiseline predstavljaju trećinu fenolnih spojeva ljudske prehrane te se odlikuju visokim antioksidacijskim kapacitetom koji najviše ovisi o broju hidroksilnih skupina u molekuli. U prirodi se većinom nalaze u vezanom obliku te tvore estere, amide i glikozide te mogu biti vezane za makromolekule staničnih stijenki. Strukturu fenolnih kiselina karakterizira benzenski prsten, karboksilna skupina i jedna ili više hidroksilnih i/ili metoksilnih skupina, a dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Osnovne strukture fenolnih kiselina prikazane su na slici 3.

Hidroksibenzojeve kiseline derivati su benzojeve kiseline, sastoje se od 7 ugljikovih atoma (C₆-C₁) te su najjednostavnije fenolne kiseline u prirodi. Osim u obliku estera i glikozida, mogu se naći i vezane za spojeve stanične stijenke poput lignina. Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva, galna protokatehinska, vanilinska i siriginska. Hidroksicimetne kiseline sadrže 9 ugljikovih atoma (C₆-C₃) te imaju jača antioksidacijska svojstva i prisutnije su u prirodi od hidroksibenzojevih. U hrani se obično nalaze u obliku estera s kininskom kiselinom i glikozida s glukozom. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina jest klorogenska kiselina (ester kininske i kafeinske kiseline), a uz nju i ferulinska, *p*-kumarinska, kafeinska i sinapinska. (Kumar i Goel, 2019; Belščak-Cvitanović i sur., 2018).



Slika 3. Prikaz kemijskih struktura redom: a) benzojeve kiseline, b) cimetne kiseline te c) flavonoida (Khoddami i sur., 2013)

2.4. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija polifenolnih spojeva prvi je korak u njihovoj identifikaciji i kvantifikaciji, a podrazumijeva izdvajanje istih iz biljnog materijala pomoću prikladnog otapala (Xu i sur., 2017). Odabir prikladne metode ekstrakcije ovisi o čimbenicima poput vrste spojeva od interesa

i svojstva biljnog materijala iz kojeg se spojevi ekstrahiraju, ali i ekološkim i financijskim čimbenicima (Azmir i sur., 2013).

Glavni parametri koji utječu na proces ekstrakcije su svojstva uzorka (npr. veličina čestica), vrsta otapala, omjer uzorka i otapala te vrijeme, tlak i temperatura (Azmir i sur., 2013). Smanjenje veličine čestica povećava ekstrakciju željenih komponenti povećanjem aktivne površine materijala, čime otapalo i materijal dolaze u bolji kontakt. Za efikasnu ekstrakciju veličina čestica uzorka trebala bi biti manja od 0,5 mm (Azwanida, 2015). S obzirom na vrstu spojeva koji se žele ekstrahirati, potrebno je odabrati prikladno otapalo prema principu 'slično otapa slično' - polarna otapala koriste se za polarne spojeve, nepolarna za nepolarne. Često se koriste vodene otopine i mješavine različitih vrsta otapala kako bi se osigurao što veći prinos ekstrakcije (Xu i sur., 2017).

2.4.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Jedna od najjednostavnijih i najčešće provedenih ekstrakcija u svrhu izdvajanja polifenolnih spojeva iz biljnih materijala jest ekstrakcija kruto-tekuće. Princip metode podrazumijeva izravnu ekstrakciju svježeg ili osušenog i/ili zamrznutog biljnog materijala pomoću različitih otapala, često uz miješanje. Otapala koja su se pokazala najboljima u tu svrhu jesu voda te vodene otopine metanola, etanola i acetona. Iskorištenje procesa ovisi o parametrima poput vremena ekstrakcije, temperature, omjera otapala i uzorka, vrste i polarosti otapala te veličine čestica uzorka (Xu i sur., 2017; Azmir i sur., 2013).

Najčešće korištene konvencionalne metode ekstrakcije jesu maceracija, infuzija i dekokcija. Maceracija podrazumijeva namakanje usitnjenog ili fino mljevenog biljnog materijala u prikladnom otapalu u zatvorenom spremniku, pri sobnoj temperaturi u trajanju od nekoliko dana, te uz povremeno miješanje (Azwanida, 2015).

Infuzija i dekokcija zasnivaju se na istom principu. Infuzija podrazumijeva namakanje materijala u hladnom ili toplom otapalu kroz kraći vremenski period. Kod dekokcije biljni se materijal namače u točno definiranom volumenu otapala te se zagrijava na visoku temperaturu. Zbog zagrijavanja biljnog materijala u otapalu pri visokim temperaturama, metoda dekokcije prigodna je samo za ekstrakciju termostabilnih spojeva (Azwanida, 2015; Handa, 2008).

Konvencionalne metode ekstrakcije imaju određene nedostatke, kao što su uporaba velikih količina otapala i uporaba toksičnih otapala, dugo vrijeme ekstrakcije, niska efikasnost, degradacija vrijednih spojeva te visok utrošak energije. Kako bi se prevladali navedeni nedostaci tijekom zadnjih 50 godina razvijaju se nove, „zelene“ metode, poput ekstrakcija

potpomognutih visokim hidrostatskim tlakom, ultrazvukom, mikrovalovima, pulsirajućim električnim poljem i superkritičnim tekućinama. Konvencionalne metode ekstrakcije i dalje su u širokoj uporabi, a koriste se i kao referentne metode prilikom razvoja novih metoda ekstrakcija (Xu i sur., 2017; Azmir i sur., 2013; Vinatoru i sur., 2017).

2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima predmet je znanstvenih istraživanja već dugi niz godina te se pokazala učinkovitim metodom ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode. Naime, ova metoda ekstrahira bioaktivne komponente znatno brže u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije s jednakom učinkovitosti. Pri tome troši znatno manje energije, generira manje štetnog otpada te koristi manje otapala, što utječe na otpuštanje manje količine štetnih otapala u okoliš i manje ljudske izloženosti štetnim otapalima. Također, prikladna je za ekstrakciju termolabilnih komponenti, što joj uvelike daje prednost pred konvencionalnim i drugim toplinskim metodama (Bagade i Patil, 2021; Vinatoru i sur., 2017).

Mikrovalovi pripadaju elektromagnetskom spektru zračenja u rasponu frekvencija od 300 MHz do 300 GHz. Tek je nekoliko frekvencija iz tog raspona dozvoljeno za uporabu u industriji, znanosti i medicini. Najčešće korištene frekvencije su 0,915 i 2,450 GHz. Mikrovalno zračenje je neionizirajuće zračenje, stoga ne utječe na molekulske strukture, već u interakciji s određenim materijalima apsorpcijom mikrovalnog zračenja dolazi do njihova zagrijavanja. Učinkovitost zagrijavanja materijala mikrovalovima ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira elektromagnestko zračenje te ga prevodi u toplinsku energiju (Vinatoru i sur., 2017; Leonelli i sur., 2013).

Mehanizam zagrijavanja mikrovalovima posljedica je interakcije električne i magnetske komponente vala s materijalom. Kod nemetalnih materijala dolazi do dielektričnih gubitaka, koji se temelje na ionskoj provodljivosti i rotaciji dipola, pri čemu „nastaje“ toplinska energija. Ionska provodljivost označava elektroforetsku migraciju nabijenih čestica poput iona i elektrona pod utjecajem električne komponente mikrovalova. Migracija dovodi do trenja između gibajućih čestica i medija, što dovodi do zagrijavanja medija. Rotacija dipola odnosi se na rotaciju dipolnih molekula u izmjeničnom električnom polju mikrovalova, što također dovodi do sudaranja čestica, njihova trenja te posljedično zagrijavanja medija (Vinatoru i sur., 2017). Iz tog razloga, za ekstrakciju mikrovalovima pogodna su polarna otapala poput vode, metanola i etanola, koja upijaju više mikrovalne energije (Bagade i Patil, 2021).

Za razliku od konvencionalnog zagrijavanja kada je toplinu potrebno dovoditi izvana te se zagrijavanje provodi nejednoliko, mikrovalnim zagrijavanjem dolazi do jednakomjernog zagrijavanja uzorka kroz cijeli volumen (Veggi i sur., 2013). Zagrijavanjem biljnog materijala mikrovalovima prvo dolazi do zagrijavanja molekula vode u biljnim stanicama, što dovodi do povećanja tlaka u stanicama te rupture staničnih stijenki pri čemu dolazi do oslobađanja željenih molekula. Mikrovalovi u potpunosti razaraju strukturu stanice, dok je kod konvencionalnih metoda glavni mehanizam ekstrakcije penetracija otapala u biljni materijal te otapanje željenih komponenti u otapalu (Bagade i Patil, 2021). Mehanizam djelovanja mikrovalova na biljne stanice prikazan je na slici 4.



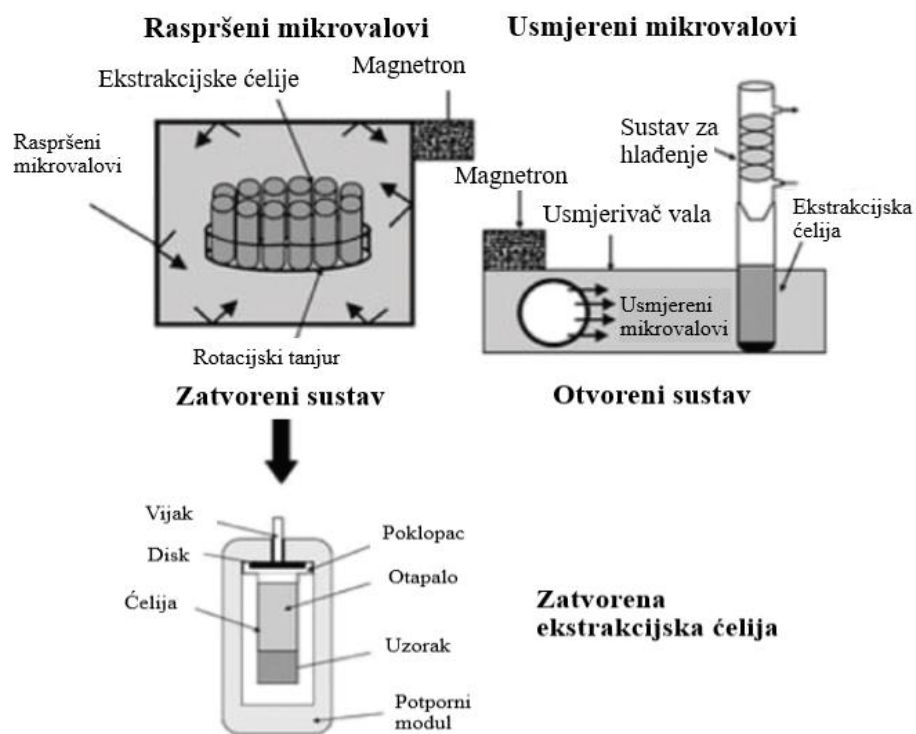
Slika 4. Mehanizam djelovanja mikrovalova na biljne stanice (prema Chan i sur., 2016).

Mehanizmi pretvorbe energije mikrovalova u toplinu ovise o temperaturi. Pri nižim temperaturama dominantnija je pretvorba rotacijom dipola, dok je pri višim temperaturama dominantnija ionska provodljivost. S obzirom da stanična tekućina biljnog materijala sadrži različite soli, biljni materijal ima dobru ionsku provodljivost, zbog čega se brzo zagrijava, posebice pri temperaturama višim od 40-50 °C. To je jedan od mnogih razloga zbog kojih je mikrovalna ekstrakcija postala jedna od glavnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kompleksnih biljnih pripravaka (Vinatoru i sur., 2017; Bagade i Patil, 2021).

Glavni parametri koji utječu na prinos ekstrakcije mikrovalovima su dielektrična svojstva otapala i biljnog materijala, snaga mikrovalova te trajanje ekstrakcije (Vinatoru i sur., 2017; Bagade i Patil, 2021). Izbor otapala ovisi o topljivosti željenih komponenti u otapalu te njegovih dielektričnih svojstava. Prikladna su otapala visoke dielektrične konstante, koja dobro apsorbiraju mikrovalove. Najpogodnija otapala za mikrovalnu ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala su voda, etanol i metanol te njihove mješavine. Snaga mikrovalova mora

biti prilagođena svojstvima i količini uzorka kako ne bi došlo do razvoja visoke temperature i time degradacije termolabilnih spojeva (Blekić i sur., 2011).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provodi se u otvorenim ili zatvorenim sustavima prikazanim na slici 5. Kod zatvorenog sustava ekstrakcija se provodi u zatvorenom spremniku pri čemu se mogu regulirati tlak i temperatura. Zbog mogućnosti povišenja tlaka ekstrakcija se može provoditi pri temperaturama višim od temperature vrenja odabranog otapala. Ovaj sustav pogodan je za ekstrakciju termostabilnih spojeva. Obično se provodi ekstrakcija pri temperaturi dva do tri puta višoj od temperature vrenja otapala, dok se u otvorenom sustavu provodi pri atmosferskom tlaku i temperaturi vrenja otapala (Uzel, 2018).



Slika 5. Shematski prikaz zatvorenog i otvorenog sustava ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (prema Uzel, 2018).

2.4.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Subkritična voda je stanje vode pri temperaturama iznad temperature vrenja vode (100 °C) i ispod kritične točke (374 °C) te tlaku pri kojem voda ostaje u tekućem stanju. Pri ovim uvjetima voda je manje polarna pa može zamijeniti organska otapala u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Jokić i sur., 2018).

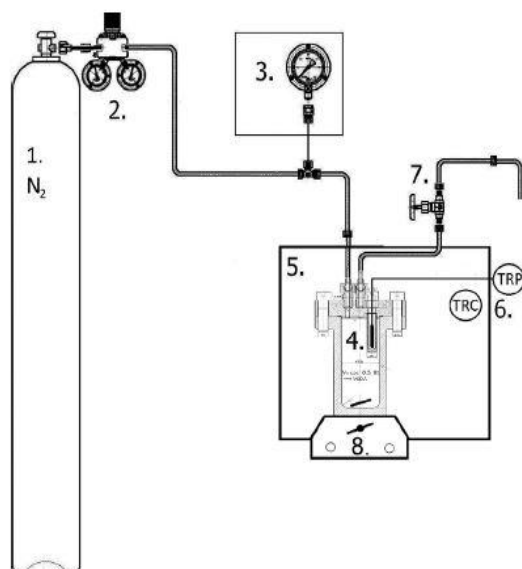
Ekstrakcija subkritičnom vodom temelji se na specifičnoj molekularnoj strukturi i termodinamičkim svojstvima vode. Voda je dipolna molekula s blago pozitivnim nabojem ($\delta+$) s jedne strane i blago negativnim nabojem ($\delta-$) s druge strane molekule, što utječe na biološki važna svojstva vode poput površinske napetosti, međusobnog povezivanja molekula vode vodikovim vezama, polarnost, i slično. Pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku voda ima vrlo visoku dielektričnu konstantu ($\epsilon = 80$), te se smatra izrazito polarnim otapalom (Gbashi i sur., 2017).

Dovođenjem vode u subkritično stanje bitno se mijenjaju njena ekstrakcijska svojstva. Porastom temperature dolazi do pada dielektrične konstante. Na primjer, pri 250 °C i 50 bara, ϵ iznosi 27, što je slično vrijednostima dielektričnih konstanti nepolarnih otapala (npr. metanola, $\epsilon = 33$). Voda postaje manje polarna te time pogodna za ekstrakciju nepolarnih spojeva iz biljnog materijala (Gbashi i sur., 2017; Jokić i sur., 2018). Posljedično tome, polarnije komponente ekstrahiraju se pri nižim temperaturama, dok se umjereno i slabo polarne komponente moraju podvrgnuti višim temperaturama (Haghighi Asl i Khajenoori, 2013). Osim toga, dolazi do smanjenja površinske napetosti, viskoznosti i gustoće vode. To omogućava bolje prodiranje vode u ekstrakcijski materijal, bolje vlaženje materijala te time i bolju difuziju željenih komponenti iz ekstrakcijskog materijala u vodu (Jokić i sur., 2018). Prijenos mase prilikom ekstrakcije subkritičnom vodom odvija se putem difuzije i konvekcije (Gbashi i sur., 2017).

Osim snižavanja dielektrične konstante, dolazi i do pada pH vode (tri reda veličine za temperaturni porast do 250 °C pri čemu se oslobađaju oksonijevi ioni (H_3O^+). Oksonijevi ioni potiču reakcije katalizirane kiselinama, što znači da se ekstrakcijom subkritičnom vodom mogu hidrolizirati konjugirane bioaktivne molekule (Cvetanović i sur., 2018; Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Povećanjem temperature dolazi do ometanja i prekidanja interakcija između željenih spojeva i matriksa, poput van der Waalsovih sila, vodikovih veza i dipolnih interakcija. Naime, toplinska energija može nadvladati kohezijske (interakcije između ciljanih komponenti) i adhezijske (interakcije između matriksa i ciljanih komponenti) interakcije snižavanjem energije aktivacije potrebne za desorpciju. Tlak pod kojim se provodi sama ekstrakcija važan je parametar zbog održavanja vode u tekućem stanju, no nema utjecaj na ekstrakcijski prinos. Obično se koriste tlakovi od 1 do 10 MPa za ekstrakcije pri 100 do 300 °C (Richter i sur., 1996; Jokić i sur., 2018; Gbashi i sur., 2017). Veličina čestica uzorka pokazala se optimalnom u razmjeru od 0,25 do 0,5 mm (Jokić i sur., 2018; Haghighi Asl i Khajenoori, 2013).

Dvije osnovne vrste sustava za ekstrakciju subkritičnom vodom jesu dinamički i statički sustavi. Slične su konstrukcije s obzirom na osnovne dijelove: ekstraktor, pećnicu i ventile. Slika 6 prikazuje shematski prikaz statičkog sustava. Ekstraktor se nalazi unutar pećnice koja precizno regulira temperaturu pomoću temperaturene sonde i regulatora temperature. Tlak se regulira pomoću plina. Koriste se inertni plinovi poput dušika kako bi se spriječila oksidacija uzoraka (Jokić i sur., 2018). Uzorak se zadržava u ekstrakcijskoj ćeliji s određenim volumenom vode pri zatvorenim termodinamičkim uvjetima. Nedostatak takvog sustava je potencijalno loša rekuperacija željenih spojeva zbog ograničenog volumena otapala, što se može dogoditi kod slabije topljivih spojeva ili uzoraka s visokom koncentracijom željenih spojeva. Kod visoke koncentracije analita u uzorku brzo će doći do ravnotežnog stanja između koncentracije analita u uzorku i otapalu, zbog čega neće doći do daljnje ekstrakcije neovisno o povećanju vremena, tlaka ili temperature ekstrakcije (Gbashi i sur., 2017).



Slika 6. Shema aparature za statičku ekstrakciju subkritičnom vodom: 1. Spremnik dušika, 2. Ventil za sniženje tlaka, 3. Manometar, 4. Ekstraktor, 5. Pećnica, 6. TRC (regulator temperature) i TRP (sonda za regulaciju temperature), 7. Ventil, 8. Magnetska miješalica (Jokić i sur., 2018)

Dinamički sustav podrazumijeva kontinuirani protok otapala kroz sustav. Time se može umanjiti ili potpuno eliminirati postizanje ravnotežnog stanja analita u uzorku i otapalu, što dovodi do većeg ekstrakcijskog prinosa. Kontinuirani protok otapala osigurava tlačna pumpa. Također, takav sustav zahtjeva i filtere kako bi se spriječilo začepljenje cjevčica. Prednost dinamičkog sustava nad statičkim jest vrijeme zadržavanja vode u sustavu, koje je znatno kraće, čime je smanjena i mogućnost degradacije termolabilnih komponenti. S druge strane, ovakav

sustav zahtjeva uporabu veće količine otapala te je skuplji (Gbashi i sur., 2017; Jokić i sur., 2018).

Prednosti ekstrakcije bioaktivnih komponenti subkritičnom vodom su uporaba vode kao široko dostupnog, jeftinog, netoksičnog i nezapaljivog otapala, pri čemu su i sami ekstrakti sigurniji za uporabu, bolja difuzija i prijenos mase u odnosu na konvencionalne metode, smanjeno vrijeme ekstrakcije, može se koristiti za ekstrakciju nepolarnih komponenti te općenito niži troškovi ekstrakcije. S druge strane, ekstrakcija subkritičnom vodom zahtijeva visoke investicijske troškove te pri visokim temperaturama ekstrakcije može doći do neželjenih reakcija kojima nastaju toksični spojevi (karamelizacija, Maillardove reakcije) te do degradacije termolabilnih spojeva i smanjene selektivnosti procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2018; Jokić i sur., 2018; Gbashi i sur., 2016).

2.5. OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Proces optimiranja provodi se u svrhu poboljšanja učinkovitosti sustava, procesa ili proizvoda. Pri tome se nastoji dobiti maksimalna učinkovitost uz smanjenje troškova i vremena procesa. U prehrambenoj tehnologiji i srodnim područjima optimiranje se najčešće koristi za utvrđivanje uvjeta određenih procesa kako bi se dobio što bolji odziv (Bezerra i sur., 2008).

Tradicionalno se optimiranje provodilo proučavanjem utjecaja jednog po jednog parametra na eksperimentalni odziv, odnosno univarijantnim metodama pri čemu bi se mijenjala vrijednost jednog parametra, dok bi se vrijednosti ostalih održavale konstantnima. Glavni nedostatak ove metode jest to što ne uzima u obzir međusobne interakcije različitih varijabli. Ukoliko postoji značajna interakcija između različitih parametara procesa, optimalni uvjeti predviđeni univarijantnom metodom neće u stvarnosti biti optimalni. Također, zahtjeva znatno veći broj eksperimenata za provođenje istraživanja/optimiranja u odnosu na multivarijantne. Posljedično tomu povećavaju se troškovi eksperimenta, kao i utrošak reagensa i vremena (Bezerra i sur., 2008; Ferreira i sur., 2007).

Kako bi se nadvladali navedeni nedostaci razvijene su multivarijantne statističke metode optimiranja procesa. Jedna od najpoznatijih i najviše upotrebljivanih jest metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*). Metoda odzivnih površina je skup statističkih i matematičkih metoda temeljenih na pronalaženju polinomialne jednadžbe (odzivne funkcije) koja dovoljno dobro opisuje i predviđa ponašanje eksperimentalnih podataka. Metoda je korisna za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa u kojima na odziv utječe nekoliko varijabli

s obzirom da može definirati utjecaj nezavisnih varijabli na odziv pojedinačno i njihovim međudjelovanjem (Bezerra i sur., 2008; Baş i Boyacı, 2007). Zavisne varijable predstavljaju rezultate, odnosno odziv procesa, koje ovise o parametrima procesa. Parametri procesa su nezavisne varijable te mogu biti kvalitativni i kvantitativni (Ferreira i sur., 2007).

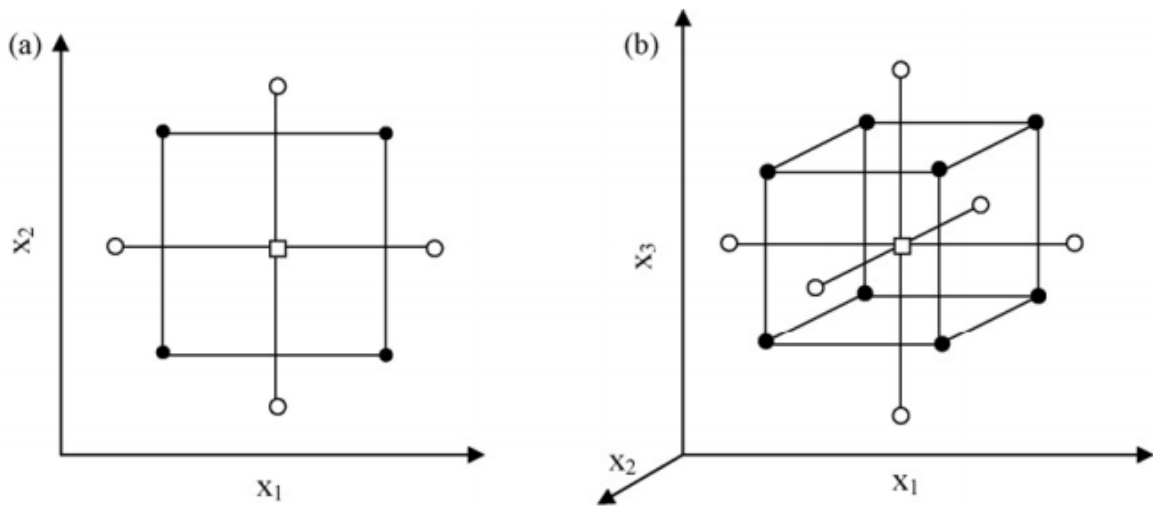
Optimiranje metodom odzivnih površina može se podijeliti u tri faze. Prva faza podrazumijeva preliminarna istraživanja u svrhu određivanja nezavisnih varijabli i njihovih vrijednosti. Druga faza podrazumijeva odabir dizajna eksperimenta, predviđanje oblika odzivne funkcije i njezinu verifikaciju. Treća faza odnosi se na generiranje dijagrama odzivne površine i konturnog dijagrama te određivanja optimalnih točaka (Baş i Boyacı, 2007).

Prije primjene ove metode potrebno je odabrati eksperimentalni dizajn koji definira koji bi se eksperimenti trebali provesti u promatranom eksperimentalnom području. Eksperimentalno područje/domena je područje koje mora biti istraženo, a definirano je minimalnim i maksimalnim vrijednostima proučavanih eksperimentalnih varijabli. Provedbom svih eksperimenata definiranih eksperimentalnim dizajnom dobiva se odzivna funkcija eksperimenta. Za eksperimentalne podatke koji se mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za modele prvog reda (npr. faktorijalni dizajn), dok se za ostale koriste dizajni za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su faktorijalni plan pokusa na tri razine, Box-Behnkenov, centralno kompozitni i plošno centrirani plan pokusa (Baş i Boyacı, 2007; Cajner, 2011).

Metoda odzivnih površina koristi se u prehrambenoj industriji za optimiranje procesa poput ekstrakcije, sušenja, pasterizacije, hidrolize i sličnih jediničnih operacija, kao i pri formulaciji novih proizvoda. S obzirom na velik raspon faktora koji utječu na procese u prehrambenoj industriji, evaluacija svakog zasebno je praktički nemoguća. Kako bi se razlučili faktori koji imaju značajan utjecaj na odziv procesa, često je potrebno prethodno iskustvo te preliminarna istraživanja. Preliminarna istraživanja mogu se izvršiti pomoću potpunog ili djelomičnog faktorijalnog plana eksperimenta (Yolmeh i Jafari, 2017).

Centralno kompozitni plan pokusa, koji je korišten u ovom radu, pripada skupini nezavisnih kvadratnih planova pokusa i temelji se na potpunom ili nepotpunom faktorijalnom planu pokusa. Sadrži i dodatni dizajn, najčešće aksijalni/'zvjezdasti' dizajn u kojem se eksperimentalne točke nalaze na udaljenosti α od središta (aksijalne točke) te centralnu točku. Centralna točka ukazuje na nelinearnosti u odzivu, dok aksijalne točke omogućuju učinkovitu procjenu parametara drugog reda. U ovom planu pokusa, aksijalnih točaka ima dvostruko više od faktora. Svaki se faktor varira na 5 razina, što utječe na kompleksnost izvedbe pokusa. Na slici 7 prikazan je centralno-kompozitni dizajn pokusa za optimiranje dvije (a) i tri (b) varijable,

pri čemu crne točke predstavljaju točke faktorijskog dizajna, bijele točke predstavljaju aksijalne točke te kvadrat središnju točku. Centralno kompozitni dizajn pokusa ima široku uporabu u razvoju metoda analitičke kemije te se najčešće koristi za optimiranje dvaju ili triju varijabli jer kod većeg broja varijabli ima smanjenu efikasnost (Cajner, 2011; Bezerra i sur., 2008).



Slika 7. Prikaz centralno-kompozitnog dizajna za optimiranje dvije (a) i tri (b) varijable redom (Bezerra i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U svrhu izrade ovog rada korišteni su uzorci dobričice s različitih lokacija Republike Hrvatske. Uzorak D1 sakupljen je u Loboru (Krapinsko-zagorska županija), uzorak D2 u parku Maksimiru (Grad Zagreb), uzorak D3 kupljen je od tvrtke Travar d.o.o. (Bilogora, Bjelovarsko-bilogorska županija), uzorak D4 sakupljen je na području Svetog Ilije (Varaždinska županija), uzorak D5 na području Donja Voća (Varaždinska županija) te uzorci D6 i D7 u Sikirevcima (Brodsko-posavska županija) pri čemu je uzorak D7 dobričica velikih listova. Lokacije sakupljanja uzoraka dobričice prikazane su na karti RH na slici 8. Nadzemni dijelovi dobričice osušeni su na zraku, usitnjeni i prosijani pri čemu se za sve daljnje analize koristila frakcija veličine čestica $<450 \mu\text{m}$.



Slika 8. Prikaz lokacija sakupljanja uzoraka dobričice po županijama na karti Republike Hrvatske.

3.1.2. Reagensi

Određivanje proteina po Kjeldhal-u

- Sumporna kiselina, 96 %-tna, Carlo Erba Reagents (Barcelona, Spain)
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Borna kiselina, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Bromkrezol-zeleno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Metil-crveno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Njemačka)
- Klorovodična kiselina, 0,1 N, Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Određivanje udjela masti po Soxhlet-u

- *n*-Heksan, Carlo Erba Reagents (Barcelona, Spain)

Određivanja sastava masnih kiselina

- Izooktan (2,2,4-trimetilpentan), Fischer Scientific (UK)
- Kalijeva lužina, Kemika (Zagreb)
- Metanol, J.T.Baker (US)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb)
- Bezvodni natrijev hidrogensulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Određivanje mineralnog sastava

- Dušična kiselina, Carlo Erba Reagents (Barcelona, Spain)

Određivanje udjela vlakana

- Enzimski set za određivanje vlakana, Megazyme (Wicklow, Irska)
- Etanol, 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Celite 545, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Trizma® Base (Sigma cat. no. T-1503), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Octena kiselina, Kefo d.o.o. (Sisak, Hrvatska)

Određivanje udjela pigmentata (ukupnih antocijana, pigmentata, i klorofila)

- Etanol, 96 %-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogensulfit, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- *n*-Heksan, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline), ≥ 98 %-tne čistoće, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka).
- Etanol, 96%-tni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Mravlja kiselina, 99 %-tna, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)
- Rutin trihidrat (> 97 %-tne čistoće), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Galna kiselina (> 97 %-tne čistoće), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Kafeinska kiselina (> 97 %-tne čistoće), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Klorogenska kiselina (> 97 %-tne čistoće), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

3.1.3. Aparatura

- Analitička vaga, New Classic MF, Mettler Toledo AG (Švicarska)
- Sušionik, Instrumentaria, Zagreb (Hrvatska)
- Kjeltec 2100 uređaj (destilacijska jedinica Kjeldahl), Foss (Danska)
- Blok za spaljivanje i aspiracijski modul, Tecator, Foss (Danska)
- Plinski kromatograf ATI Unicam 610 (Cambridge, Engleska)
- ICP-AES instrument, Mason (SAD)
- Spektrofotometar, UV-Vis Spektrofotometar Genesys 10S, Thermo Scientific (SAD)

- Centrifuga SL8 / 8R, Thermo Scientific (SAD)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma (Njemačka)
- NIR spektrofotometar NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m (Control Development, Inc., South Bend, IN, USA) sa instaliranim programom CDI software Spec32 (Control Development, Inc)
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz hrane, Ethos easy (Soriso, Italija)
- Uređaj za ekstrakciju subkritičnom vodom (opisan u radu Jokić i sur., 2018)

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje makromolekularnog sastava

3.2.1.1. *Određivanje udjela suhe tvari*

Udio suhe tvari određivan je prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990) metodi sušenjem uzoraka do konstantne mase pri 105 °C.

Postupak

Homogenizirani uzorci masa 0,5 g (s točnošću $\pm 0,1$ g) izvagani su u prethodno osušene (do konstantne mase pri 105 °C), ohlađene i izvagane aluminijske posudice s poklopcem. Nepokrivene posudice i poklopci suše se u sušioniku pri 105 °C do postizanje konstantne mase. Nakon sušenja, posudice se poklope i stave u eksikator na hlađenje do sobne temperature. Ohlađene posudice se izvažu, a prema razlici masa posudica prije i nakon sušenja izračuna se udio suhe tvari prema formuli [1]. Analiza je za svaki uzorak rađena u dvije paralele.

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{m_2 - m_1}{m(\text{uzorak})} \times 100 \quad [1]$$

m_2 – masa aluminijske posudice s poklopcem nakon sušenja (g)

m_1 – masa aluminijske posudice s poklopcem prije sušenja (g)

3.2.1.2. *Određivanje udjela proteina*

Udio proteina u uzorcima određivan je prema modificiranoj metodi određivanja sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u (HRN EN ISO 20483:2014 ICC 105/2).

Princip

Organske tvari uzorka razaraju se pomoću sumporne kiseline i Kjeldahl katalizatora pri visokoj temperaturi pri čemu se dušik iz uzorka prevodi u amonijev sulfat. Alkalizacijom s natrijevim hidroksidom anorganski dušik oslobađa se u obliku amonijaka, koji se zatim destilira u bornu kiselinu (koja je u suvišku u odnosu na amonijak) pri čemu nastaje amonijev borat. Nastali amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom

Postupak

U Tecator kivete odvagano je 1 g (s točnošću $\pm 0,1$ g) uzorka. U svaku kivetu dodana je po jedna tableta Kjeldahl katalizatora i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline te se lagano promiješa. U kivetu za slijepu probu dodana je samo sumporna kiselina. Kivete se postavljaju na uređaj za spaljivanje sa sustavom za odvod pare u digestoru. Prvih 10 min spaljivanja uzroka sustav za odvod pare radi pri maksimalnom protoku vode nakon čega se protok smanjuje za 50 %. Spaljivanje se provodi postepenim povećanjem temperature otprilike sat vremena. Reakcija je gotova kada u kivetama zaostane bistra zeleno-plava tekućina. Nakon mineralizacije, kivete se ohlade do sobne temperature. U svaku se dodaje po 80 mL destilirane vode.

Destilacija uzoraka provodi se u Kjeldahl uređaju. Kiveta i prihvatna Erlenmayer tikvica, u koju je prethodno dodano 25 mL borne kiseline, postavljaju se na predviđena mjesta. Pokretanjem uređaja, dolazi do ulijevanja 50 mL NaOH u kivetu te početka destilacije. Destilacija se odvija 4 min pri čemu destilat poprima tamno plavu boju (što ukazuje na prisustvo amonijaka).

Dobiveni destilat titrira se klorovodičnom kiselinom do promjene boje u crvenoružičastu. Iz utrošenog volumena HCl izračuna se udio proteina na suhu tvar uzorka prema formulama [2] i [3]. Uzorci su analizirani u 2 paralelna mjerenja.

Izračunavanje udjela dušika:

$$\% N = \frac{(V_u - V_{sp}) \times N \times f \times 1,4007}{m_u} \quad [2]$$

V_u – volumen HCl utrošen za titraciju uzorka [mL]

V_{sp} – volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe [mL]

N – molaritet kiseline [mol L^{-1}]; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

f – faktor kiseline; 1

m_u – masa suhe tvari uzorka [g]

Izračunavanje udjela proteina:

$$\% \text{ proteina} = \% N \times F \quad [3]$$

F – faktor za preračunavanje dušika u bjelančevine; 6,25

3.2.1.3. *Određivanje udjela masti*

Udjel masti određen je prema modificiranoj AOAC (1990) 920.39 metodi.

Princip

Metoda se temelji na ekstrakciji lipidnih komponenata biljnog matriksa pomoću nepolarnog organskog otapala u aparaturi po Soxhlet-u. Otapalo isparavanjem i kondenzacijom cirkulira u zatvorenoj aparaturi, a lipidna frakcija sakuplja se u tikvici.

Aparatura se sastoji od okrugle tikvice ravnog dna volumena 250 mL, na koju se nastavlja stakleni ekstraktor u kojem se nalazi celulozna čahura s uzorkom te vertikalno vodeno hladilo. Zagrijavanjem u pješčanoj kupelji dolazi do isparavanja otapala, koje se u vodenom hladilu kondenzira u ekstraktor iz kojeg se pri određenom volumenu prelijeva u tikvicu.

Postupak

U celulozne čahure odvaži se ~ 3 g uzorka te se čahure zatvore suhom vatom i postave uspravno u ekstraktor postavljen na prethodno osušenu i izvaganu tikvicu, koja sadrži 2 kuglice za vrenje. Zatim se u ekstraktor ulijeva *n*-heksan u volumenu od dva volumena ekstraktora (volumena potrebnog da se otapalo prelije iz ekstraktora u tikvicu putem preljevne cijevi). Tikvica s ekstraktorom spoji se na hladilo i postavi u kupelj. Ekstrakcija se provodi 5 h uz brzinu ekstrakcije 10-12 sifona po satu (jedan sifon je oznaka za jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu preko preljevne cijevi). Nakon toga se otapalo iz tikvice otpari na rotacijskom vakuum uparivaču, a tikvica s ekstrahiranom masti suši se do konstantne mase pri 105 °C te se hladi i čuva u eksikatoru. Ekstrakcije su provedene u 2 paralele za svaki uzorak, a udjel masti na suhu tvar uzorka izračunat je prema formuli [4].

$$\% \text{ masti} = \frac{m_2 - m_1}{m_u} \times 100 \quad [4]$$

m_2 – masa tikvice s ekstrahiranom masti [g]

m_1 – masa prazne tikvice (s kuglicama za vrenje) [g]

m_u – masa suhe tvari uzorka [g]

3.2.1.4. *Određivanje sastava masnih kiselina*

Princip

Sastav masnih kiselina određuje se plinskom kromatografijom, prije čega je potrebno masne kiseline transmetilacijom prevesti u njihove metilne estere. Transmetilacija se radi prema standardnoj metodi HR EN ISO 12966-2:2017.

Postupak

Izvaže se 0,1 g uzorka u epruvetu od 10 mL s čepom, zatim se doda 2 mL izooktana i 100 μL metanolne otopine KOH (2 mol L^{-1}) te snažno protrese 1 min. Smjesa se ostavi 2 min da reagira na sobnoj temperaturi pa se dodaje 2 mL otopine NaCl i kratko protrese. Izooktanski sloj se odvoji u drugu epruvetu te se u njega doda bezvodni natrijev hidrogensulfat i snažno protrese kako bi se uklonilo mogući ostaci vode. Bistra otopina prebacuje se u vijalicu.

Pripremljeni uzorci analiziraju se na plinskom kromatografu ATI Unicam 610 povezanim s plameno ionizacijskim detektorom (FID) te povezanim na računalo. Uvjeti analize zadani su u računalnom sustavu, a određeni su preliminarnim ispitivanjima kao optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora, injektora, protok plina i količina injektiranog uzorka).

Tablica 1. Prikaz uvjeta analize

Kolona	kapilarna TR-FAME (Thermo); 30 m x 0,22 mm; debljina filma 0,25 μm ; stacionarna faza: 70 % cijanopropil polisilfenilen-siloksan programirana;
Temperatura kolone	120 °C do 160 °C (4°C min^{-1}), 160 °C do 190 °C ($10^\circ\text{C min}^{-1}$, na 190 °C zadržava se 10 min)
Plin nosioc	Helij; protoka $0,7 \text{ mL min}^{-1}$
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura detektora	280 °C
Split	75:1
Količina injektiranog uzorka	1 μL

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provodi se usporedbom retencijskih vremena metilnih estera masnih kiselina iz uzorka s retencijskim vremenima metilnih estera komercijalno dostupne standardne smjese (F.A.M.E. C8 – C22, Supelco) poznatog sastava. Kvantifikacija se provodi normizacijom površina ispod pikova, a rezultati se izražavaju kao

udio pojedine masne kiseline. Iz rezultata se računa udio zasićenih, mono- i polinezasićenih masnih kiselina.

3.2.1.5. *Određivanje udjela pepela*

Određivanje udjela pepela provedeno je prema normi HR EN ISO 2171:2010.

Princip

Uzorci se karboniziraju na plameniku, a zatim mineraliziraju u mufolnoj peći pri određenoj temperaturi do postizanja jednolične svjetlo sive boje ili konstantne mase.

Postupak

U prethodno izarenu, ohlađenu i izvaganu porculansku posudicu odvagane se oko 0,5 (\pm 0,1) g dobro homogeniziranog uzorka. Uzorak se lagano podgrijava na plameniku dok ne pougljeni, a zatim se stavlja u mufolnu peć zagrijanu na 523 °C do potpune mineralizacije, odnosno dok uzorak ne poprimi jednoličnu svjetlo sivu boju konstantne mase bez crnih ostataka. Nakon spaljivanja, posudica se hladi u eksikatoru do postizanja sobne temperature te izvaže. Udio pepela izračuna se prema jednadžbi [5]. Provedena su dva paralelna mjerenja za svaki uzorak.

$$\text{udjel pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [5]$$

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice [g]

m_2 – masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja [g]

m_3 – masa porculanske zdjelice i uzorka nakon spaljivanja [g]

3.2.1.6. *Određivanje sastava mineralnih tvari*

Makroelementi i mikroelementi u uzorcima određeni su atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Određivani su udjeli sljedećih elemenata: As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sn, Tl, V i Zn.

Postupak

Uzorci masa 0,250 g razoreni su mikrovalovima uz dodatak 5 mL HNO₃ (50 %, v/v). Uzorci su ostavljeni u teflonskoj posudi da se ohlade te su razrijeđeni ultračistom vodom na konačni volumen od 25 mL. Postupak je ponovljen tri puta za svaki uzorak. Prije mjerenja

uzorci su profiltrirani. Uvjeti mikrovalnog razaranja te uvjeti mjerenja prikazani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Uvjeti mikrovalnog razaranja

	1	2	3
T [°C]	150	160	190
P [W]	80	80	80
t [min]	10	10	20

Tablica 3. Uvjeti mjerenja na ICP-AES instrumentu

Instrument	Prodigy High Dispersive ICP
Spektrometar	Ešlatnog tipa
RF-generator	„free-running“ 40 MHz
Protok plina (argon)	Vanjski: 18 L min ⁻¹ Pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ Za raspršivanje: 36 psi
Plamenik	Fasselov tip, Dual-view
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

3.2.1.7. *Određivanje topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana visoke molekulske mase*

Udjel prehrambenih vlakana određen je prema AOAC 2011.25 (2012) metodi.

Postupak:

U čiste filter lončiče dodaje se ~1 g Celita te se suše pri 105 °C do konstante mase nakon čega se hlade u eksikatoru i važu. Odvaje se $1,000 \pm 0,005$ g uzorka u 4 Duran boce s čepom volumena 250 mL. Uzorak se navlaži s 1 mL 96%-tnog etanola te se doda 40 mL maleatnog pufera, koji sadrži pankreasnu α -amilazu i amiloglukozidazu. Uzorci se inkubiraju pri 37 °C 16 h uz stalno miješanje. Tijekom inkubacije dolazi do hidrolize škroba na *D*-glukozu, maltozu i manju količinu maltrodekstrina. Po završetku inkubacije se dodaje 3 mL 0,75 M Trisma Base otopine (konačni pH ~ 8,2) te se lagano pomiješa. Boce se stavljaju u vodenu kupelj pri 95-100 °C tijekom 20 min s malo olabavljenim čepovima te se povremeno promiješaju. Nakon toga, uzorci se ohlade na 60 °C te se doda 100 μ L otopine proteaze, promiješa i inkubira pri 60 °C 30 min. Nakon vađenja iz kupelji dodaje se 4 mL 2 mM octene kiseline.

Tako pripremljeni uzorak koristi se za određivanje netopljivih vlakana. Postupak započinje filtracijom uzorka kroz prethodno izvagani i pripremljen sinter lončić. Talog zaostao na stjenki laboratorijske boce ispiru se s minimalnim volumenom (10 mL) deionizirane vode zagrijane na 60 °C. Dobiveni filtrat se zatim prebaci u staklenu menzuru te dopuni do oznake (70 mL) s deioniziranom vodom zagrijanom na 60 °C. Tako pripremljeni filtrat koristi se za određivanje topljivih vlakana. Talog na sinter lončiću se ispiru s 2 x 15 mL 78 % (v/v) etanola, 96% (v/v) etanola i acetona (sušenje izmjenom otapala). Nakon ispiranja, lončić se stavi u sušionik na 105 °C te se suši do konstantne mase. Osušeni lončić hladi se u eksikatoru, a nakon hlađenja se izvaže. Za izračun netopljivih vlakana potrebno je odrediti količinu proteina prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.2. i količinu mineralnih tvari prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.5. Za određivanje topljivih prehrambenih vlakana koristi se filtrat koji je skupljen prilikom određivanja netopljivih vlakana. U 70 mL filtrata zagrijanog na 60 °C doda se 280 mL 96 % (v/v) etanola temperature 60 °C. Uzorak se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 1 h u svrhu taloženja topljivih prehrambenih vlakana nakon čega slijedi filtracija kroz sinter lončiče, sušenje izmjenom otapala, sušenje do konstantne mase i određivanje udjela proteina i mineralnih tvari kao i u slučaju netopljivih vlakana.

3.2.2. Određivanje udjela pigmenata

3.2.2.1. *Određivanje udjela ukupnih antocijana*

Ukupni antocijani određivani su prema modificiranoj metodi opisanoj u radu Ough, i Amerine (1998).

Princip

Ion HSO_3^- veže se za antocijane na 2' položaju te na taj način prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Paralelni se uzorak tretira destiliranom vodom, a razlika u apsorbanciji ta dva uzorka proporcionalna je udjelu antocijana.

Postupak

Odvaže se 0,1 g uzorka u Falcon kivetu, zatim se doda 2 mL 96 %-tnog zakiseljenog EtOH i 40 mL 2 %-tne (v/v) HCl. Smjesa se dobro promiješa i centrifugira (10 min, 9500 rpm).

Nakon centrifugiranja, po 5 mL supernatanta otpipetira se u dvije epruvete. U prvu se dodaje 2 mL destilirane vode, a u drugu 2 mL 15 %-tnog (w/v) natrijevog hidrogensulfita. Reakcija se odvija 15 min na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm. Kao slijepa proba koristi se 2 %-tni HCl. Udjel ukupnih antocijana računa se pomoću formula [7] i [8].

$$Ac [mg L^{-1}] = 615 \times (A_1 - A_2) \quad [6]$$

615 – faktor preračunavanja

A_1 – apsorbancija uzorka tretiranog vodom

A_2 – apsorbancija uzorka tretiranog natrijevim hidrogensulfitom

Konačan rezultat izražen je na suhu tvar uzorka prema formuli [7].

$$Ukupni\ antocijani [mg\ g^{-1}] = \frac{Ac \times V}{1000 \times m_u} \quad [7]$$

V – volumen otapala [mL]

m_u – masa suhe tvari uzorka [g]

3.2.2.2. *Određivanje udjela ukupnih karotenoida*

Ukupni karotenoidi određivani su prema modificiranoj metodi opisanoj u radu Barros i suradnika (2008).

Princip

Biljni pigmenti karotenoidi ekstrahiraju se iz biljnog materijala pomoću smjese organskih otapala te se određuju spektrofotometrijski.

Postupak

Izvaže se 50 mg uzorka u Falcon kivete te se doda 5 mL mješavine acetona i heksana u omjeru 4:6. Snažno se miješa 1 min te profiltrira kroz filter papir Whatman br. 4. Apsorbancija filtrata mjeri se pri valnim duljinama od 543, 505 i 663 nm.

Udjeli β -karotena i likopena izračunaju se prema jednadžbama [8] i [9], a rezultati se izražavaju kao mg karotenoida po gramu suhe tvari uzorka.

$$\text{Likopen [mg (100 mL)}^{-1}] = -0,0458 \times A_{663} + 0,372 \times A_{505} - 0,0806 \times A_{453} \quad [8]$$

$$\beta - \text{karoten [mg (100 mL)}^{-1}] = 0,216 \times A_{663} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453} \quad [9]$$

A_{453} – izmjerena apsorbancija 453 nm

A_{505} – izmjerena apsorbancija pri 505 nm

A_{663} – izmjerena apsorbancija pri 663 nm

3.2.2.3. *Određivanje udjela klorofila*

Ukupni klorofil u uzorcima određivan je modificiranom metodom opisanom u radu Huanga i suradnika (2007).

Princip

Klorofil se ekstrahira iz biljnog materijala 80 %-tnim (v/v) acetonom te se određuje spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 663 nm (klorofil a) i 645 nm (klorofil b).

Postupak

Izvaže se oko 50 mg uzorka te se doda 25 mL 80 % (v/v) acetona. Snažno se miješa 2 min te profiltrira kroz filter papir. Zatim se izmjeri apsorbancija filtrata. Iz vrijednosti apsorbancija prema jednadžbama [10] i [11] izračunaju se udjeli klorofila a i klorofila b. Rezultati su izraženi kao ukupni klorofil u mg klorofila po g suhe tvari uzorka.

$$\text{Klorofil a [mg L}^{-1}] = 12,7 \times A_{663} - 2,95 \times A_{645} \quad [10]$$

$$\text{Klorofil b [mg L}^{-1}] = 22,95 \times A_{645} - 4,67 \times A_{663} \quad [11]$$

3.2.3. Optimiranje ekstrakcije polifenolnih spojeva

Optimiranje ekstrakcije polifenolnih spojeva dobričice provedena je u programu Design Expert (version 12) (Minneapolis, SAD) koristeći metodu odzivnih površina i centralno

kompozitni dizajn. Uzorak D3 korišten je kao materijal za definiranje optimalnih uvjeta ekstrakcija.

U slučaju konvencionalne metode ekstrakcije potpomognute zagrijavanjem (engl. *heat-assisted extraction* - HAE), nezavisne varijable bile su : i) vrijeme (10, 20 i 30 min); ii) temperatura (80, 90 i 100 °C) ; i iii) omjer uzorak/otapalo (w/v) (1g/100 mL (0.01 g/mL), 1g/40 mL (0.025 g/mL) i 1g/25 mL (0.04 g/mL)). Kod metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction* - MAE), nezavisne varijable bile su: i) vrijeme (3, 6 i 9 min); ii) temperatura (50, 70 i 90 °C) ; i iii) omjer uzorak/otapalo(w/v) (1g/100 mL (0.01 g/mL), 1g/40 mL (0.025 g/mL) i 1g/25 mL (0.04 g/mL)). Nezavisne varijable ekstrakcije subkritičnom vodom (engl. *subcritical water extraction* - SWE) bile su: i) vrijeme (5, 10 i 15 min); ii) temperatura (120, 160 i 200 °C) ; i iii) omjer uzorak/otapalo (w/v) (1g/100 mL (0.01 g/mL), 1g/40 mL (0.025 g/mL) i 1g/25 mL (0.04 g/mL)). Raspon nezavisnih varijabli za HAE, MAE i SWE prikazane su redom u tablicama 4, 5 i 6. Zavisne varijable svih triju metoda bile su udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (određen pomoću ABTS i DPPH metoda) te su predstavljale odziv u eksperimentalnom dizajnu za optimiranje procesa. Modeli i koeficijenti regresije smatrali su se značajnima pri $p < 0,05$.

HAE je provedena u vodenoj kupelji Inko VKZ ERN (Inkolab d.o.o., Zagreb, Hrvatska), a MAE u naprednom sustavu mikrovalne razgradnje Ethos Easy (Milestone, Sorisole, Italy). Snaga mikrovalova održavana je na 900 W dok nije postignuta željena temperatura ekstrakcije. SWE je provedena u aparaturi opisanoj u radu Jokić i suradnika (2018). Prilikom svih navedenih ekstrakcija kao otapalo korištena je destilirana voda te su sve provedene tri puta. Nakon ekstrakcije svi su uzorci centrifugirani (9500 rpm, 20 min) te filtrirani (pomoću Whatman® 4 filter papira).

Tablica 4. Prikaz raspona nezavisnih varijabli za konvencionalnu metodu ekstrakcije polifenolnih spojeva

Redni broj eksperimenta	X1: vrijeme (min)	X2: temperatura (°C)	X3: omjer uzorak/otapalo (g mL⁻¹)
1	30	100	0,010
2	30	80	0,010
3	20	80	0,025

4	10	100	0,040
5	20	100	0,025
6	20	90	0,025
7	10	90	0,025
8	30	90	0,025
9	10	100	0,010
10	30	80	0,040
11	10	80	0,040
12	20	90	0,040
13	10	80	0,010
14	30	100	0,040
15	20	90	0,025
16	20	90	0,010

Tablica 5. Prikaz raspona nezavisnih varijabli za MAE polifenolnih spojeva

Redni broj eksperimenta	X1: vrijeme (min)	X2: temperatura (°C)	X3: omjer uzorak/otapalo (g mL⁻¹)
1	3	90	0,01
2	3	70	0,025
3	9	50	0,04
4	3	90	0,04
5	9	70	0,025
6	6	50	0,025
7	6	90	0,025
8	6	70	0,025
9	9	90	0,04
10	3	50	0,01
11	6	70	0,025
12	9	90	0,01
13	6	70	0,04
14	3	50	0,04
15	6	70	0,01

Tablica 6. Prikaz raspona nezavisnih varijabli za SWE polifenolnih spojeva

Redni broj eksperimenta	X1: vrijeme (min)	X2: temperatura (°C)	X3: omjer uzorak/otapalo (g mL⁻¹)
1	10	160	0,01
2	15	200	0,04
3	15	160	0,025
4	5	120	0,01
5	10	120	0,025
6	5	200	0,01
7	10	160	0,025
8	10	160	0,025
9	15	200	0,01
10	10	160	0,04
11	5	120	0,04
12	15	120	0,04
13	5	160	0,025
14	10	200	0,025
15	15	120	0,01
16	5	200	0,04

3.2.4. Karakterizacija bioaktivnog sastava dobivenih ekstrakata

3.2.4.1. Određivanje ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteau reagensa

Princip

Ova metoda određivanja ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom. Folin-Ciocalteau reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibenske kiseline, koji reagira s fenoksid-ionom iz uzorka. Fenoksid-ion reducira Folin-Ciocalteau reagens do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Reakcija traje 2 h pri

čemu svi fenolni spojevi reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom te se nakon toga spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastalog plavog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak

U staklene epruvete otpipetira se redom 3,95 mL destilirane vode, 50 μ L uzorka, 250 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2) i 750 μ L 20 %-tne (w/v) otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa se dobro promiješa. Slijepa proba priprema se na isti način, samo se umjesto 50 μ L uzorka dodaje isti volumen destilirane vode. Nakon 2 h reakcije u tami pri sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija razvijenog obojenja pri 765 nm. Apsorbancija slijepe probe oduzima se od apsorbancije uzorka te se ta vrijednost (ΔA) koristi za izračun konačnog rezultata. Analiza se provodi za svaki uzorak u dvije paralelne probe. Udjel ukupnih polifenola u uzorku izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje [12], konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}). Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata galne kiseline (engl. *gallic acid equivalents* - GAE) po gramu suhe tvari uzorka (mg EGK g^{-1} s.tv.).

$$y = 0,0020x - 0,0001 \quad [12]$$

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola [mg L^{-1}]

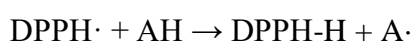
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm [ΔA]

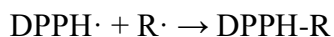
3.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet uzorka određuje se prema metodi opisanoj u radu Brand-Williamsa i suradnika (1995).

Princip

Metoda se temelji na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (pri valnoj duljini od 515 nm) zbog nesparenog elektrona. U prisutnosti antioksidansa, odnosno elektron donora (AH), dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu, što se prati smanjenjem apsorbancije.





Postupak

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. Apsorbancija te otopine mora biti oko 1,000 na 515 nm. U epruvetu se otpipetira 3,9 mL otopine DPPH i 100 μL uzorka. Uzorci se analiziraju u dva paralelna mjerenja. Za slijepu probu, umjesto 100 μL uzorka, u otopinu DPPH doda se jednak volumen metanola. Apsorbancija se mjeri nakon 30 min pri valnoj duljini od 515 nm.

Za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka iz jednadžbe baždarne krivulje [13], koristi se razlika apsorbancija uzorka i slijepe probe (ΔA). Jednadžba baždarne krivulje određena je za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}). Rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)}$.

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [13]$$

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a [mmol L^{-1}]

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije [ΔA]

3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip

Metoda se temelji na „gašenju“ ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)), plavo-zelenog radikal-kationa, koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Otopina ABTS-a oksidira se kalijevim persulfatom, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645, 734 ili 815 nm. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije ABTS kation-radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS+ radikala. Smanjenje apsorbancije ABTS radikala uspoređuje se sa smanjenjem apsorbancije, koju uzrokuje dodatak određene količine Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak

Otopina ABTS+ radikala priprema se oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,4 mM. Potrebno je pomiješati 88 μL (140 mM) otopine kalijevog persulfata s otopinom ABTS-a (7 mM) do volumena 5 mL. ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom

odnosu 1:0,5, zbog čega neće doći do potpune oksidacije pa je potrebno pripremljenu otopinu omotati aluminijskom folijom te ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi.

Na dan analize otopina se razrijedi etanolom 96% etanolom do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija otopine iznosi $0,700 \pm 0,02$ (1 mL otopine ABTS+ radikala stavi se u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom) na 734 nm.

Volumen od 20 μ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u epruveti te se nakon točno 6 min izmjeri apsorbancija pri 734 nm. Slijepa proba radi se tako da se umjesto 20 μ L uzorka doda jednaki volumen etanola.

Za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka iz jednadžbe baždarne krivulje [14], koristi se razlika apsorbancija uzorka i slijepa probe (ΔA). Jednadžba baždarne krivulje određena je za standard Trolox-a te prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}). Analiza se provodi u dvije paralelne probe, a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s.tv.).

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [14]$$

x – antioksidacijski kapacitet uzorka [$\text{mmol Trolox-a L}^{-1}$]

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm [ΔA]

3.2.4.4. *Određivanje polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)*

Pojedinačni polifenolni spojevi dobričice identificirani su i kvantificirani metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Postupak

Uzorci su pripremljeni na način da su nerazrijeđeni ekstrakti profiltrirani kroz celulozno-acetatni mikrofilter veličine pora 0,45 μm (Nylon Membranes, Supelco, Bellefonte, PA, USA) u HPLC vijalice. Analiza se provodila na HPLC sustavu Agilent 1200 Series s DAD detektorom (engl. *Diode Array Detector*) (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). U sustav je injektirano 5 μL uzorka te su provedena dva paralelna mjerenja za svaki uzorak. Analiza je provedena kromatografijom obrnutih faza na koloni Zorbax Extend C18 (4.6×250 mm, 5 μm i.d.) termostatiranoj na 25 °C pri čemu su kao mobilne faze korištene 1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 1 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu

(mobilna faza B) u različitim udjelima. Eluiranje analita provođeno je gradijentno pri protoku od 1 mL min⁻¹, tijekom 52 minuta, a analiti su detektirani pomoću DAD detektora pri valnim duljinama od 320 i 350 nm. Režim elucije prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Prikaz režima elucije analita za HPLC analizu polifenolnih spojeva

Vrijeme (min)	Volumni udio otapala A (%)	Volumni udio otapala B (%)	Protok (mL min ⁻¹)
0	93	7	1
5	93	7	1
45	60	40	1
47	30	70	1
52	30	70	1

Identifikacija polifenolnih spojeva dobričice provedena je usporedbom retencijskih vremena i UV spektra izdvojenih pikova na kromatogramima sa odgovarajućim HPLC standardima. Kvantifikacija identificiranih spojeva provedena je pomoću baždarnih dijagrama izrađenih za standardne otopine polifenolnih spojeva (tablica 8). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom u mg po gramima suhe tvari uzorka (mg g⁻¹ s.tv.).

Tablica 8. Jednadžbe baždarnih pravaca za identificirane polifenolne spojeve

Spoj	Jednadžba pravca	R ²	λ _{max}
Klorogenska kiselina	y=14,274x + 2,6832	0,9998	320 nm
Kafeinska kiselina	y=28,688x + 8,3483	0,9998	320 nm
Ružmarinska kiselina	y=10,876x - 0,1215	0,9999	320 nm
Rutin	y=7,7097x + 3,035	0,9997	350 nm

y – izmjerena vrijednost apsorbancije [ΔA]

x – udio polifenolnog spoja [mg g⁻¹]

3.2.5. Određivanje ekstrakcijskog prinosa

Ekstrakcijski prinos određuje se kao udjel suhe tvari ekstrakta sušenjem do konstantne mase pri 105 °C prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.3.

3.2.6. Bliska infracrvena spektroskopija (NIR)

Ekstrakti dobričice snimani su pomoću NIR spektroskopa NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m (Control Development, Inc., South Bend, IN, USA) sa instaliranim programom CDI software Spec32 (Control Development, Inc) u području spektra od 904 do 1699 nm. Svaki je uzorak sniman tri puta te je iz dobivenih rezultata izračunata srednja vrijednost. PCA analiza (engl. *Principal Component Analysis*) provedena je u programu XLStat (MS Excel 2019, Microsoft, Redmond, WA, USA; XLStat by Addinsoft, Paris, France) na dijelu NIR spektra koji je pokazao razlike između uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvojem i širenjem tržišta funkcionalnih proizvoda, novija znanstvena istraživanja bave se proučavanjem bioaktivnog sastava biljaka, među kojima i polifenola, u svrhu inkorporacije istih u prehrambene proizvode kao funkcionalnih sastojaka ili aditiva (Santos Fernandes i sur., 2019; Milovanović i sur., 2010). Biljka dobričica (*Glechoma hederacea* L.), kao ljekovita biljka u narodnoj medicini, prepoznata je kao potencijalni izvor bioaktivnih spojeva, posebice polifenola. U ovome istraživanju primijenjene su konvencionalna tehnika ekstrakcije potpomognuta toplinom (engl. *heat-assisted extraction* - HAE) te inovativne tehnike – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction* - MAE) te ekstrakcija subkritičnom vodom (engl. *subcritical water extraction* - SWE) u svrhu kvalitativne i kvantitativne karakterizacije polifenolnog sastava dobričice. Također, ispitan je osnovni makro- i mikrosastav analiziranih uzoraka.

Ispitivanje makro- i mikrosastava uzoraka, osim za kontrolu kvalitete biljaka i biljnih proizvoda, važno je i za analizu kvalitete biološke aktivnosti ekstrakata. Različite makromolekule kao što su određene aminokiseline i polisaharidi tvore komplekse s polifenolima te time utječu na biološku aktivnost ekstrakata (Bandyopadhyay i sur., 2012).

4.1. ODREĐIVANJE MAKRO- I MIKROSASTAVA SAKUPLJENIH UZORAKA DOBRIČICE

4.1.1. Određivanje osnovnog makromolekulskog sastava

Uzorci dobričice sušeni su na zraku do visokog udjela suhe tvari (> 90%), kao što je vidljivo u tablici 9. Udjeli proteina, masti, pepela te prehrambenih vlakana izraženi su kao postotak na suhu tvar uzoraka (% s.tv.). Iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti prikazanih u tablici 9 vidljivo je da uzorci dobričice obiluju vlaknima i proteinima te da sadrže visok udio pepela i relativno mali udjel masti.

Tablica 9. Prikaz osnovnog makromolekulskog sastava dobričice

Uzorak	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Suha tvar (%)	91,13±0,10	91,86±0,06	90,96±0,03	91,33±0,14	91,27±0,05	91,45±0,01	93,15±0,12

Proteini (% s.tv.*)	15,63±0,13	14,75±0,23	15,61±0,20	17,74±0,16	23,13±0,33	15,86±0,00	16,16±0,16
Masti (% s.tv.)	2,80±0,54	2,05±0,07	1,10±0,20	2,63±0,71	1,86±0,15	2,39±0,10	2,30±0,06
Pepeo (% s.tv.)	9,76±0,09	9,59±0,10	10,98±0,44	10,95±0,23	10,02±0,13	9,20±0,02	9,97±0,41
Ukupna prehrambena vlakna (% s.tv.)	37,74±2,11	43,14±1,15	46,65±1,19	55,23±3,42	41,44±0,65	44,05±1,08	49,76±1,10
• Netopljiva prehrambena vlakna (% s.tv.)	32,26±0,55	34,14±0,65	41,50±0,82	48,03±0,18	36,47±0,82	37,03±1,15	40,61±0,85
• Topljiva prehrambena vlakna (% s.tv.)	5,48±0,74	9,00±0,89	5,15±0,43	7,19±0,72	4,97±0,38	7,02±0,40	9,14±0,26

*suha tvar uzorka

Udio proteina u uzorcima dobričice varira od 15,63 (uzorak D1) do 23,13 % s.tv. (uzorak D5). Dobivene vrijednosti značajno su više od onih dobivenih u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2017), gdje je udio proteina u 16 različitih biljaka porodice *Laminaceae* iznosio 2,5 – 4,9 g kg⁻¹. Također, dobivene vrijednosti usporedive su s udjelom proteina u mahunarkama (17 do 40 %) koje se smatraju bogatim izvorom proteina (Abbas i Ahmad, 2018). Sličan udio proteina (15-20 %) imaju i chia sjemenke biljke *Salvia hispanica* L., također iz porodice *Lamiaceae* (Knez Hrnčić i sur, 2019). S obzirom na sve prisutnije posljedice klimatskih promjena nastalih ljudskim djelovanjem te promjene životnog stila, prvenstveno zapadnjačke kulture, sve je prisutniji trend zamjene životinjskih proteina biljnima. Proteini su neizostavan sastojak ljudske prehrane s brojnim strukturnim i funkcionalnim ulogama te su sve zastupljeniji kao temelj funkcionalnih proizvoda (Fasolin i sur., 2019). Biljka dobričica kao potencijalni izvor proteina mogla bi pronaći svoju primjenu upravo u takvim vrstama proizvoda. Kako bi se dodatno istražio potencijal dobričice kao biljke visokog udjela proteina potrebno je odrediti aminokiselinski sastav te bioraspoloživost proteina dobričice.

Osim proteinima, dobričica obiluje i prehrambenim vlaknima. Udio vlakana u uzorcima varira od 37,74 % s.tv. za uzorak D1 do 55,23 % s.tv. za uzorak D5, od kojih većinu čine netopljiva vlakna (oko 85 % ukupnog udjela). Dobričica ima znatno veći udio prehrambenih vlakana od biljaka koje se smatraju bogatim izvorima vlakana u prehrani, kao što su žitarice i povrće. Na primjer, prema podacima navedenim u radu Dhingra i suradnika (2012) pšenica sadrži 12,6 % s.tv., ječam 17,3 % s.tv., a bijeli grah 17,7 % s.tv. prehrambenih vlakana. Također, dobričica je bogatija prehrambenim vlaknima od chia sjemenki, koje su danas vrlo popularan izvor vlakana te sadrže 18 – 30 % s.tv. prehrambenih vlakana (Knez Hrnčić i sur, 2019).

Udio pepela u analiziranih uzorcima bio je u rasponu od 9,20 % s.tv. (uzorak D6) do 10,98 % s.tv. (uzorak D3). S obzirom na visok udio pepela u uzorcima, provedena je analiza mikro- i makroelemenata čiji su rezultati prikazani u tablici 10 (Poglavlje 4.2.2).

Udio masti u uzorcima je nizak te iznosi od 1,10 % do 2,80 % s.tv. Sastav masnih kiselina prikazan je u tablici 11 (Poglavlje 4.1.3.).

Varijacije u udjelima određenih komponenti osnovnog makromolekulskog sastava među uzorcima vjerojatno su posljedica različitih lokacija i uvjeta rasta biljaka, različitih varijeteta, vremena sakupljanja uzoraka, zrelosti biljaka u trenutku berbe te uvjeta skladištenja (Kowalska, 2012; Shakeri i sur., 2018; Sik i sur., 2021).

4.1.2. Određivanje sastava mineralnih tvari

Sastav mikro- i makroelemenata dobričice prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Udio makro- i mikroelemenata dobričice

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Makroelementi (mg kg⁻¹ s.tv.*)							
Na	58,11±2,21	97,73±4,02	72,16±1,66	81,04±0,96	61,71±2,65	73,39±6,90	62,24±3,19
Mg	3289±85,78	2043±19,18	5500±80,76	2835±30,11	6671±139	3358±26,40	3695±32,45
Al	1862±94,31	1612±54,09	669±15,49	693±55,87	219±14,60	666±104	668±73,96
K	14448±355	20289±294	28373±568	29794±340	27528±303	26020±259	27800±445
Ca	9763±198	7783±104	14800±218	12254±125	13115±277	10803±96,02	12072±77,62
Fe	1430±62	1322±62	498±16,20	616±68,94	187±8,85	476±77,73	443±43,77
P	1705±31	2187±35	2409±52	2065±22	2961±45	2877± 25	2822±23
Mikroelementi (mg kg⁻¹ s.tv.*)							
S	1579±43	1554±18	1807±39	2185±23	2662±49	2334±19	2479±15
V	3,38±0,1	3,79±0,13	1,10±0,02	1,47±0,13	0,38±0,02	1,13±0,19	1,06±0,11
Mn	48,41±1,53	58,56±1,15	214±2,92	57,02±1,58	185±7,36	43±1,04	65,92±1,24
Cr	3,29±0,10	2,87±0,09	2,07±0,02	1,98±0,18	0,37±0,02	1,55±0,09	1,12±0,14
Co	0,52±0,02	0,59±0,00	0,27±0,01	0,314±0,03	0,13±0,01	0,17±0,02	0,18±0,01
Ni	2,03±0,07	1,64±0,02	2,01±0,01	1,67±0,11	1,55±0,05	3,28±0,16	2,65±0,07
Cu	8,22±0,18	13,58±0,10	9,05±0,13	8,74±0,13	9,90±0,13	11,11±0,45	9,86±0,06
Zn	25,94±0,18	28,86±0,31	53,16±0,68	30,02±0,98	62,56±0,61	55,41±0,91	44,15±0,37
As	0,37±0,01	0,46±0,00	0,21±0,00	0,19±0,06	0,06±0,00	0,15±0,02	0,13±0,01
Se	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00

Mo	1,23±0,02	1,36±0,02	0,34±0,00	1,23±0,02	0,83±0,01	0,64±0,05	0,48±0,00
Cd	0,01±0,00	0,02±0,00	0,09±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
Sn	0,11±0,00	0,11±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,07±0,02	0,04±0,00
Sb	0,04±0,00	0,05±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00
Hg	0,02±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
Tl	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Pb	0,96±0,01	1,32±0,02	0,42±0,01	0,37±0,05	0,26±0,01	0,47±0,07	0,33±0,04
I	0,10±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00	0,01±0,00	0,02±0,01	0,08±0,01	0,10±0,01

*s.tv.=suha tvar uzorka

Iz dobivenih vrijednosti prikazanih u tablici 10, može se uočiti da su mikro- i makroelementi za većinu uzoraka dobričice (D3, D4, D5, D6 i D7) zastupljeni prema redoslijedu: K > Ca > Mg > P > Al > Fe > Na. Sličan redoslijed uočen je za uzorke D1 i D2, no s drukčijim poretkom za Mg, Al i P (D1: K > Ca > Mg > Al > P > Fe > Na; D2: K > Ca > P > Mg > Al > Fe > Na). Najzastupljeniji makroelement jest kalij čije se vrijednosti kreću od 14448 mg g⁻¹ s.tv. za uzorak D1 do 29794 mg kg⁻¹ s.tv. za uzorak D4. Slijede ga kalcij koji je najzastupljeniji u uzorku D3 (14800 mg kg⁻¹ s.tv.) i magnezij najzastupljeniji u uzorku D5 (6671 mg kg⁻¹ s.tv.). Najzastupljeniji mikroelement jest sumpor čija je koncentracija najviša u uzorku D5 (2662 mg kg⁻¹ s.tv.).

Pravilnikom o dodacima prehrani (NN 46/2011) određene su preporučene i maksimalne dozvoljene dnevne doze unosa određenih mineralnih tvari u ljudski organizam. Preporučena dnevna doza kalija iznosi 2 000 mg, dok maksimalna nije definirana. Unosom 100 g suhe tvari dobričice može se osigurati unos od ~1 500 - 3 000 mg kalija u organizam. Također, 100 g suhe tvari dobričice može sadržavati ~ 800 - 1 500 mg kalcija, čija preporučena dnevna doza iznosi 800 mg, a maksimalna dozvoljena 1 500 mg dnevno. Sadržaj magnezija također zadovoljava granice preporučene i maksimalne dnevne doze (375 mg; 700 mg), dok sadržaj željeza može prijeći preporučene dnevne količine. Preporučeni dnevni unos bakra i cinka iznosi redom 1 i 10 mg, a 100 g suhe tvari dobričice sadrži 0,8-1,4 te 2,6 – 6,3 mg.

Osim bioaktivnih spojeva, biljke mogu akumulirati i toksične spojeve poput teških metala, koji konzumirani u količinama višim od dopuštenih mogu izazvati izrazito negativne posljedice na ljudski organizam. Iz tog razloga, potrebno ih je odrediti te kvantificirati u uzorcima biljaka namijenjenih za ljudsku prehranu (Kowalska, 2012). Primjerice, prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA, 2004), prihvatljivi tjedni unos žive iznosi 1,6 µg kg⁻¹ tjelesne mase za metil-živu te 0,4 µg kg⁻¹ tjelesne mase za anorganski oblik žive.

Analizirani uzorci dobričice sadrže 0,1 do 0,3 mg kg⁻¹ žive u suhoj tvari. Unosom 100 g suhe tvari dobričice prosječna osoba mase 70 kg unijela bi 0,02 – 0,04 μg kg⁻¹, što odgovara prihvatljivom tjednom unosu. Također, udio kadmija znatno je niži od najveće dopuštene koncentracije u drugim biljkama za ljudsku prehranu. Dobivene vrijednosti usporedive su s udjelima teških metala dobričice prikazanih u istraživanju Kowalska (2012): 0,01 mg kg⁻¹ za Hg, 0,4 mg kg⁻¹ za Pb, 0,2 mg kg⁻¹ za Cd te <0,1 mg kg⁻¹ za As, pri čemu je u ovom istraživanju određena niža koncentracija kadmija (0,01 – 0,09 mg kg⁻¹) i viša koncentracija arsena (0,06 – 0,5 mg kg⁻¹).

Sadržaj mikro- i makroelemenata te varijacije njihovih koncentracija među uzorcima mogu ovisiti o uvjetima rasta, varijetetima biljke i slično. Prisutnost teških metala često je posljedica zagađenosti okoliša emisijama industrije i prometa te uporabe različitih insekticida, gnojiva i herbicida koji ih sadrže (Kowalska, 2012).

4.1.3. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina dobričice prikazan je u tablici 11 i iskazan je kao % ukupnih masnih kiselina.

Tablica 11. Prikaz sastava masnih kiselina ispitivanih uzoraka dobričice

Uzorak	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Miristinska (C14:0) (%)	0,18±0,02	nd	4,54±0,48	0,18±0,05	nd	nd	1,25±0,32
Palmitinska (C16:0) (%)	7,34±0,09	7,70±0,23	13,33±2,28	7,14±0,14	10,24±0,82	11,68±0,86	7,68±0,42
Palmitoleinska (C16:1) (%)	0,93±0,03	nd	nd	0,14±0,01	nd	nd	1,07±0,03
Heptadekaenska (C17:0) (%)	0,19±0,01	nd	nd	0,07±0,01	nd	nd	0,39±0,02
Stearinska (C18:0) (%)	2,28±0,50	4,40±1,25	15,46±0,50	1,60±0,00	16,33±0,30	5,89±0,05	1,88±0,05
Oleinska (C18:1) (%)	28,88±0,31	33,85±1,76	18,19±0,81	39,01±0,09	nd	21,64±0,03	8,70±0,41
Linolna (C18:2) (%)	24,51±0,12	22,63±0,22	19,48±0,44	21,71±1,49	24,95±0,48	32,35±0,43	14,92±0,29

α -linolenska

kiselina 29,45±0,14 24,13±0,81 18,25±0,55 20,27±0,51 37,92±1,44 21,96±0,14 27,15±0,38
(C18:3n3) (%)

Arahidska 0,34±0,16 nd nd 0,25±0,09 nd 2,15±0,13 0,63±0,04
(C20:0) (%)

Behenijska nd nd nd nd nd nd 6,52±0,19
(C22:0) (%)

Lignocerinska 2,46±0,13 nd nd 3,22±0,42 nd nd 13,73±0,21
(C24:0) (%)

Iz rezultata prikazanih u tablici 11 vidljiv je različiti sastav masnih kiselina u različitim uzorcima dobričice. Najzastupljenije masne kiseline u uzorcima su oleinska, α -linolenska i linolna kiselina. Unatoč tomu, oleinska kiselina nije detektirana u uzorku D5. Oleinska kiselina najzastupljenija je u uzorku D4 (39,01 %), α -linolenska u uzorku D5 (37,92 %), a linolna kiselina u uzorku D6 (32,35 %). Slijede ih palmitinska (najzastupljenija u uzorku D3; 13,33 %) te stearinska kiselina (najzastupljenija u D5, 16,33 %). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Barros i suradnika (2011) gdje je najzastupljenija masna kiselina u dobričici bila oleinska (~ 35 %), potom linolenska (~ 27 %), palmitinska (12,23 %), linolna (8,15 %) te stearinska kiselina (4,53 %).

Oleinska kiselina neesencijalna je mononezasićena masna kiselina koja se u većim količinama nalazi u maslinovom ulju (56-85 %) i orašastim plodovima. Oleinska kiselina, kao najzastupljenija masna kiselina u maslinovom ulju, povezuje se s zdravstvenim benefitima mediteranske prehrane poput prevencije dijabetesa tipa 1 i koronarnih bolesti (Barros i sur., 2011; Granado-Casas i Mauricio, 2019). α -Linolenska i linolna kiselina esencijalne su masne kiseline te prekursori za višestruko nezasićene masne kiseline, stoga ih je potrebno unositi prehranom. Unesene u povoljnom omjeru povezuju se s brojnim zdravstvenim benefitima poput snižavanja kolesterola u krvi, sprječavanja kardiovaskularnih bolesti i protuupalnih svojstava. Povoljan omjer n-6/n-3 jest 1:1 do 1:2, no u zapadnjačkoj dijeti može doseći čak 16,7:1. (Barros i sur., 2011; Saini i Keum, 2011). Uzorci biljke dobričice pokazuju povoljan omjer n-6/n-3 od otprilike 1:1, osim uzorka D5 kojemu je omjer 1,5:1.

U manjim udjelima detektirane su miristinska, palmitoleinska, heptadekaenska i arahidska kiselina. Behenijska masna kiselina detektirana je samo u uzorku D7, dok je lignocerinska kiselina detektirana samo u uzorcima D1, D4 i D7.

4.2. ODREĐIVANJE UDJELA PIGMENATA U SAKUPLJENIM UZORCIMA DOBRIČICE

Biljni pigmenti važni su bioaktivni spojevi, koji osim fizioloških uloga u biljkama, imaju i antioksidacijsku i protektivnu ulogu u ljudskom organizmu te su izvori esencijalnih vitamina. Mogu se podijeliti u različite skupine poput: flavonoida (antocijani), karotenoida (beta-karoten, lutein), betalaina, klorofila i drugih (Šircelj i sur., 2018; Shakeri i sur., 2018). Pojedini pigmenti određeni u uzorcima dobričice prikazani su u tablici 12. Ukupni klorofili izraženi su kao zbroj klorofila a i klorofila b, dok su ukupni karotenoidi izraženi kao zbroj likopena i beta-karotena.

Tablica 12. Udio pojedinih pigmenata u ispitivanim uzorcima dobričice

Uzorak	Klorofil a [mg g ⁻¹ s.tv.*]	Klorofil b [mg g ⁻¹ s.tv.]	Ukupni klorofili [mg g ⁻¹ s.tv.]	Likopen [mg g ⁻¹ s.tv.]	Beta-karoten [mg g ⁻¹ s.tv.]	Ukupni karotenoidi [mg g ⁻¹ s.tv.]	Antocijani [mg g ⁻¹ s.tv.]
D1	1,57±0,03	0,67±0,04	2,23±0,07	0,08±0,08	0,51±0,12	0,59±0,03	8,14±0,38
D2	1,20±0,06	0,55±0,02	1,76±0,09	nd	0,47±0,01	0,47±0,01	29,88±0,94
D3	1,41±0,08	0,76±0,04	2,17±0,12	0,04±0,00	0,18±0,01	0,22±0,02	2,34±0,15
D4	2,84±0,02	1,26±0,01	4,10±0,03	nd	0,85±0,10	0,85±0,10	3,54±0,52
D5	2,72±0,12	0,77±0,49	3,49±0,37	nd	0,69±0,01	0,69±0,02	10,90±1,51
D6	1,54±0,11	1,24±0,47	2,78±0,36	nd	0,71±0,02	0,71±0,02	12,81±0,05
D7	1,57±0,01	0,71±0,00	2,28±0,01	nd	0,67±0,02	0,67±0,02	2,61±0,03

*s.tv.=suha tvar uzorka

Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi zaslužni za crvena, ljubičasta i plava obojenja biljaka te se smatraju snažnim antioksidansima (Krga i Milenkovic, 2019). Iz navedenih rezultata vidljivo je da su antocijani najzastupljeniji pigmenti u uzorcima dobričice. Varijacije u udjelu antocijana među uzorcima su značajne pri čemu najveći udio ima uzorak D2 (29,88 mg g⁻¹ s.tv.), a najmanji uzorak D3 (2,34 mg g⁻¹ s.tv.). Udio antocijana u svježoj dobričici iznosio bi ~ 210 - 2 700 mg u 100 g, što je usporedivo sa sadržajem antocijana u plodovima bazge koji iznosi 664 -1816 mg u 100 g svježih plodova. Varijacije u udjelima antocijana među uzorcima mogu biti posljedica okolišnih uvjeta, ali i vremena i načina skladištenja s obzirom da su antocijani spojevi osjetljivi na toplinu, svjetlost i kisik (Krga i Milenkovic, 2019).

Drugi pigmenti po zastupljenosti jesu klorofili. Klorofili su zajedno s karotenoidima najvažnije molekule za fotosintezu. Udjeli klorofila u uzorcima dobričice kreću se od 1,76 (uzorak D3) do 4,10 mg g⁻¹ s.tv. (uzorak D4). Najveći udio klorofila a i klorofila b zasebno ima uzorak 4 (2,84 mg g⁻¹ s.tv.; 1,26 mg g⁻¹ s.tv.), dok najniže vrijednosti ima uzorak D2 (1,20 mg g⁻¹ s.tv.; 0,55 mg g⁻¹ s.tv.). Klorofil a obično je 2 do 3 puta zastupljeniji u odnosu na klorofil b (Šircelj i sur., 2018). Taj se trend može uočiti i u predstavljenim vrijednostima udjela klorofila a i b za dobričicu, osim u slučaju uzorka D6 gdje je taj omjer nešto manji. Razlog tomu može biti rast biljke u hladu, s obzirom da biljke koje rastu u hladu imaju niži omjer klorofila a i b (Šircelj i sur., 2018). Istraživanjem udjela pigmenata u jestivim divljim travama u radu Šircelj i suradnika (2018) dobivene su vrijednosti udjela klorofila a i b za biljku dobričicu 40,43 mg u 100 g svježe dobričice te 20,55 u 100 g svježe dobričice, odnosno ukupno oko 61 mg u 100 g. Udio ukupnog klorofila u svježoj dobričici dobiven ovim istraživanjem iznosi ~ 160 - 370 mg u 100 g, što je znatno više od rezultata dobivenih u radu Šircelj i suradnika (2018).

Najmanje zastupljeni pigmenti u uzorcima jesu karotenoidi, od kojih je u značajnijoj mjeri prisutan beta-karoten, dok je likopen određen u dva uzorka (uzorci D1 i D3) u vrlo malim količinama. Karotenoidi su prirodni pigmenti topljivi u uljima te daju žutu, narančastu i crvenu boju biljkama i životinjama (Shakeri i sur., 2018). Beta-karoten kao predstavnik skupine prekursor je esencijalnog vitamina A te ima antioksidativno djelovanje. Nizak udio pigmenata topljivih u mastima može se povezati s niskim sadržajem masti dobričice. Uzorci s višim udjelom masti imaju i veće udjele ukupnih karotenoida, no postoje odstupanja, zbog čega vrijednosti nisu proporcionalne. Najveći udio karotenoida određen je u uzorku D4 (0,85 mg g⁻¹ s.tv.) koji je drugi po udjelu masti (2,63 % s.tv.), dok uzorak s najviše masti D1 (2,80 % s.tv.) sadrži manji udio karotenoida (0,59 mg g⁻¹ s.tv.). Najmanji udio ukupnih karotenoida sadrži uzorak D3 (0,22 mg g⁻¹ s.tv.), koji također sadrži i najmanje masti (1,10 % s.tv.). Varijacije u udjelima karotenoida u uzorcima mogu biti posljedica uvjeta rasta, vremena berbe, ali i uvjeta skladištenja s obzirom da su nestabilni spojevi osjetljivi na svjetlost, toplinu i kisik (Shakeri i sur., 2018). Također, udio karotenoida u 100 g biljke iznosio bi 19,8 – 76,5 mg, što je znatno više od rezultata dobivenih u istraživanju Šircelj i suradnika (2018) (4,55 mg u 100 g).

4.3. OPTIMIRANJE PARAMETARA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA DOBRIČICE

Razvoj optimalne metode ekstrakcije fenolnih spojeva zahtjevan je proces zbog velike raznolikosti kemijskih struktura polifenola, a time i njihovih svojstava, te zbog mogućih

reakcija s drugim komponentama matriksa (Radojković i sur., 2018). U ovom radu optimiranje HAE, MAE i SWE metoda ekstrakcije provedeno je u programu Design Expert pomoću metode odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology* – RSM) i centralno kompozitnog (CCD) plana pokusa s tri numerička faktora na tri razine. Plan pokusa sastojao se od 16 nasumičnih proba s dva ponavljanja središnje točke. Optimiranje ekstrakcijskih parametara provedena je na uzorku D3, a kasnije su definirani optimalnih parametri ekstrakcija primijenjeni na preostale uzorke.

4.3.1. Optimiranje parametara za konvencionalnu metodu ekstrakcije (HAE)

U tablici 13 prikazane su vrijednosti za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata dobričice dobivenih provođenjem eksperimenata pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli (vremena, temperature i omjera uzorak/otapalo). Najniža vrijednost za udjel ukupnih polifenola određena je u eksperimentu broj 10 (30 min, 80 °C, 1 g/25 mL) te iznosi 27,5 mg GAE g⁻¹ s.tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom 9 (10 min, 100 °C, 1 g/100 mL) te iznosi 40,6 mg GAE g⁻¹ s.tv. Najviši antioksidacijski kapacitet (0,220 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.) određen ABTS metodom utvrđen je za ekstrakt eksperimenta broj 1 (30 min, 100 °C, 1 g/100 mL). Za isti ekstrakt određena je i druga po redu najviša vrijednost za udjel ukupnih polifenola (38,9 mg GAE g⁻¹ s.tv.). Najviši antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom utvrđen je za eksperiment 9 (10 min, 100 °C, 1 g/100 mL) te iznosi 0,209 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. Također, eksperimentom 9 određen je drugi po redu najviši antioksidacijski kapacitet ABTS metodom od 0,209 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.

Tablica 13. HAE: Eksperimentalni dizajn i rezultati za udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama

Redni broj eksperimenta	Nezavisne varijable			Eksperimentalni podaci		
	X ₁ : Vrijeme (min)	X ₂ : Temperatura (°C)	X ₃ : Omjer uzorak/otapalo (g mL ⁻¹)	Udio ukupnih polifenola (mg GAE g ⁻¹ s.tv.)	ABTS (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)	DPPH (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)
1	30	100	0,01	38,9±0,6	0,220±0,008	0,201±0,005
2	30	80	0,01	37,8±0,3	0,190±0,003	0,168±0,001

3	20	80	0,025	32,4±0,6	0,161±0,003	0,092±0,000
4	10	100	0,04	31,3±0,3	0,107±0,000	0,088±0,000
5	20	100	0,025	35,8±0,4	0,180±0,004	0,168±0,002
6	20	90	0,025	34,9±0,6	0,171±0,003	0,155±0,005
7	10	90	0,025	37,1±0,5	0,182±0,003	0,168±0,001
8	30	90	0,025	35,2±0,8	0,176±0,005	0,158±0,002
9	10	100	0,01	40,6±0,9	0,209±0,005	0,209±0,006
10	30	80	0,04	27,5±0,2	0,109±0,000	0,046±0,000
11	10	80	0,04	27,6±0,4	0,111±0,000	0,047±0,000
12	20	90	0,04	30,1±0,6	0,091±0,000	0,080±0,000
13	10	80	0,01	36,0±0,5	0,180±0,005	0,165±0,002
14	30	100	0,04	30,9±0,7	0,110±0,000	0,090±0,000
15	20	90	0,025	34,6±1,0	0,162±0,000	0,161±0,002
16	20	90	0,01	38,2±0,7	0,198±0,007	0,187±0,003

Eksperimentalni podaci opisani su kvadratnim modelom. Primjenom višestruke regresijske analize na eksperimentalne podatke dobivene su kvadratne jednadžbe [15], [16] i [17], kojima se može izraziti model za zavisne varijable.

$$\text{Udjel ukupnih polifenola (mg GAE g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 35.33 - 0.2473 X_1 + 1.62 X_2 - 4.42 X_3 - 0.4639 X_1X_2 - 0.0927 X_1X_3 + 0.1822 X_2X_3 + 0.8585 X_1^2 - 1.21 X_2^2 - 1.15 X_3^2 \quad [15]$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.1560 - 0.0014 X_1 + 0.0237 X_2 - 0.0579 X_3 - 0.0010 X_1X_2 + 0.0009 X_1X_3 + 0.0012 X_2X_3 + 0.0107 X_1^2 - 0.0223 X_2^2 - 0.0186 X_3^2 \quad [16]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.1708 + 0.0016 X_1 + 0.0075 X_2 - 0.0470 X_3 + 0.0008 X_1X_2 - 0.0027 X_1X_3 - 0.0077 X_2X_3 + 0.0086 X_1^2 + 0.0003 X_2^2 - 0.0253 X_3^2 \quad [17]$$

Kako bi se evaluirao model s obzirom na zavisne varijable provedena je analiza varijance (ANOVA) sa 95 %-tnom sigurnošću. Rezultati su prikazani u tablici 14. Prihvatljivost modela određena je s obzirom na koeficijent determinacije (R^2), p -vrijednost regresijskog modela i p -vrijednost neuklopljenosti modela (engl. *lack-of-fit*) te ostale važne parametre.

R^2 predstavlja omjer varijance opisane modelom i ukupne varijance. Približavanjem R^2 vrijednosti 1, empirijski model bolje opisuje eksperimentalne podatke. Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9775; DPPH: 0,9806; ABTS: 0,9858), što ukazuje na prikladnost modela (Arruda i sur., 2017). Dobivene vrijednosti R^2 ukazuju na postotak varijacija koje nisu opisane modelom, a iznose 2,25 % (udjel ukupnih polifenola), 1,94 % (DPPH) i 1,42 % (ABTS). Ovaj pokazatelj nije dovoljan za određivanje prikladnosti modela,

već je važna i razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 , koja mora biti niža od 0,1, što je utvrđeno za ovaj model. Prilagođeni R^2 predstavlja R^2 nakon izbacivanja beznačajnih komponenti iz modela, a razlika između njih manja od 0,1 ukazuje na održanje kvalitete modela nakon njegove redukcije (Arruda i sur., 2017).

Osim toga, vrijednost adekvatne preciznosti određuje omjer signala i šuma odziva te mora biti veća od 4 kako bi signal bio adekvatan, što je uočeno kod svih rezultata (udjel ukupnih polifenola: 18,979; DPPH: 19,755; ABTS: 22,2878). Niske vrijednosti koeficijenta varijacije (udjel ukupnih polifenola 2,56; DPPH: 7,98; ABTS: 4,48) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata.

Također, p -vrijednost modela niža od 0,5 ukazuje na važnost modela i njegovu prikladnost u opisivanju eksperimentalnih podataka te je u ovom slučaju niža od 0,0001 za sve rezultate. Prikladnost modela određuje se i pomoću testa neusklađenosti, čija p -vrijednost mora biti viša od 0,05 kako bi neusklađenost bila beznačajna u odnosu na čistu pogrešku (Arruda i sur, 2017). U ovom radu, p -vrijednost testa neusklađenosti za sve odzive viša je od 0,05 (udjel ukupnih polifenola: 0,7612; DPPH: 0,2048; ABTS: 0,8317), što ukazuje na prikladnost modela za opis eksperimentalnih podataka. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate su niski (udjel ukupnih polifenola: 1,18; DPPH: 0,0000; ABTS: 0,0001), što također ukazuje na prikladnost modela.

Tablica 14. HAE: Analiza varijance (ANOVA) odabranog kvadratnog modela

a) Odziv: Ukupni sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	235,82	9	26,20	33,82	< 0,0001
Ostatak	5,42	7	0,7747		
Nedostatak uklopljenosti	3,06	5	0,6116	0,5173	0,7612
Čista pogreška	2,36	2	1,18		
Ukupna korelacija	241,24	16			
$R^2=0,9775$; $R^2_{\text{prilagođen}}=0,9486$; $R^2_{\text{predviden}}=0,7993$; CV=2,56; adekvatna preciznost=18,979					

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

Model	0,0431	9	0,0048	39,38	< 0,0001
Ostatak	0,0009	7	0,0001		
Nedostatak uklopljenosti	0,0008	5	0,0002	4,17	0,2048
Čista pogreška	0,0001	2	0,0000		
Ukupna korelacija	0,0439	16			

$R^2=0,9806$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9557$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8613$; $CV=7,98$; adekvatna preciznost=19,755

c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

Model	0,0253	9	0,0028	53,90	< 0,0001
Ostatak	0,0004	7	0,0017		
Nedostatak pristajanja	0,0002	5	0,0000	0,3847	0,8317
Čista pogreška	0,0002	2	0,0001		
Ukupna korelacija	0,0253	16			

$R^2=0,9858$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9675$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,9315$; $CV=4,48$; adekvatna preciznost=22,2878

Značajnost svakog koeficijenta determinacije određena pomoću p - i F -vrijednosti prikazana je u tablici 15. Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da dvije nezavisne varijable (X_2 - temperatura i X_3 - omjer uzorak/otapalo) značajno utječu ($p < 0,05$) na udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom značajan utjecaj imaju kvadratni utjecaj temperature (X_2^2) i omjera uzorak/otapalo (X_3^2). Značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom imaju kvadratni utjecaj omjera uzorak/otapalo (X_3^2) te međusobna interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo (X_2X_3).

Tablica 15. HAE: Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni model

a) Odziv: Ukupan sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
X₁ (vrijeme)	0,6116	1	0,6116	0,7894	0,4038
X₂ (temperatura)	26,11	1	26,11	33,70	0,0007
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	195,26	1	195,26	252,06	< 0,0001
X₁X₂	1,72	1	1,72	2,22	0,1797
X₁X₃	0,0688	1	0,0688	0,0888	0,7744
X₂X₃	0,2655	1	0,2655	0,3427	0,5766
X₁²	1,97	1	1,97	2,55	0,1544
X₂²	3,90	1	3,90	5,04	0,0597
X₃²	3,54	1	3,54	4,57	0,0699

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

X₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,1600	0,7011
X₂ (temperatura)	0,0056	1	0,0056	46,31	0,0003
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0335	1	0,0335	275,92	< 0,0001
X₁X₂	8,213 x 10 ⁻⁶	1	8,213 x 10 ⁻⁶	0,0676	0,8023
X₁X₃	6,030 x 10 ⁻⁶	1	6,030 x 10 ⁻⁶	0,0496	0,8301
X₂X₃	0,0000	1	0,0000	0,0983	0,7630
X₁²	0,0003	1	0,0003	2,50	0,1577
X₂²	0,0013	1	0,0013	10,96	0,0129
X₃²	0,0009	1	0,0009	7,67	0,0277

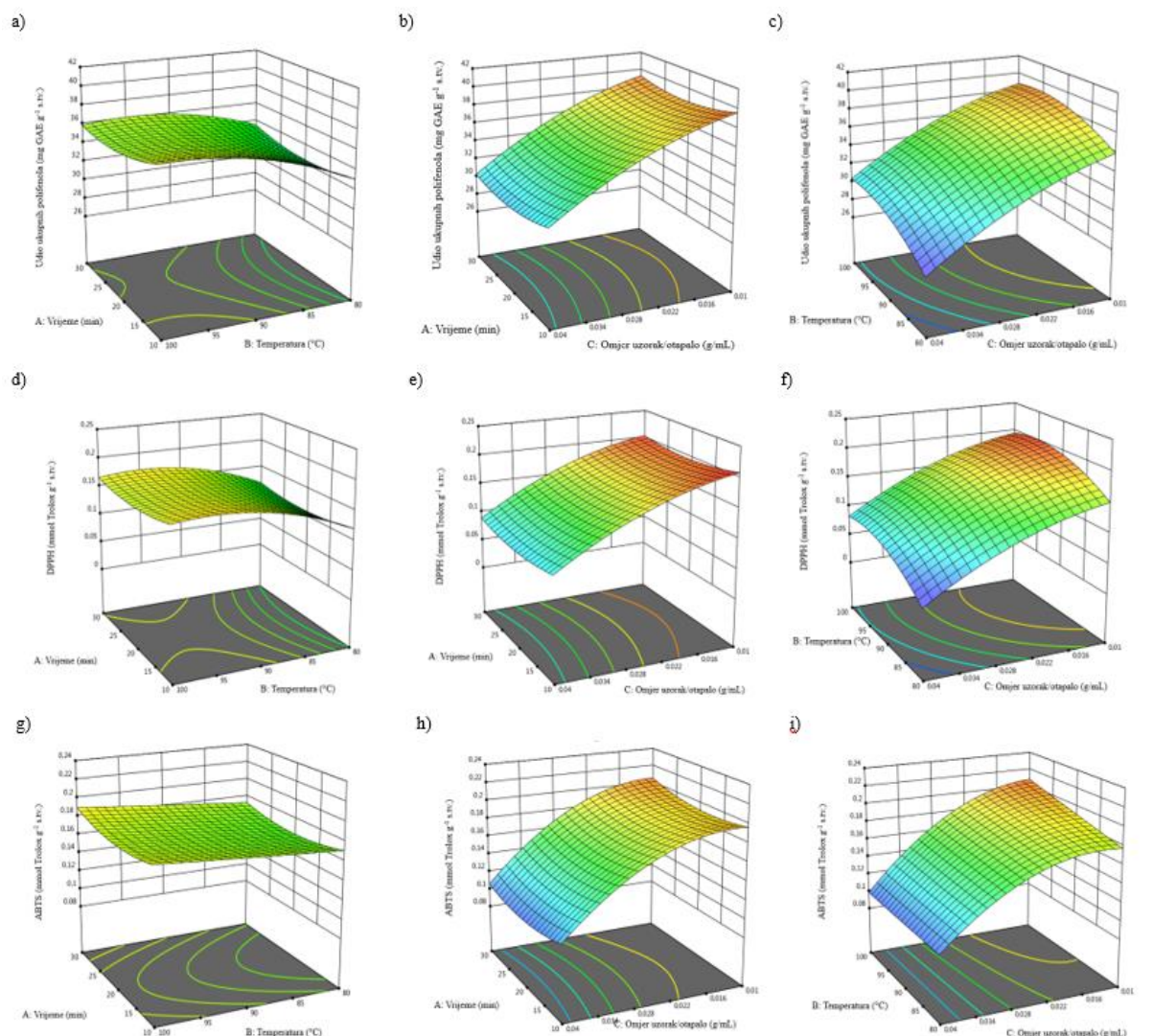
c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

X₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,4887	0,5071
X₂ (temperatura)	0,0006	1	0,0006	10,82	0,0133

X₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0221	1	0,0221	425,05	< 0,0001
X₁X₂	5,612 x 10 ⁻⁶	1	5,612 x 10 ⁻⁶	0,1078	0,7523
X₁X₃	0,0001	1	0,0001	1,10	0,3291
X₂X₃	0,0005	1	0,0005	9,15	0,0193
X₁²	0,0002	1	0,0002	3,83	0,0914
X₂²	2,508 x 10 ⁻⁷	1	2,508 x 10 ⁻⁷	0,0048	0,9466
X₃²	0,0017	1	0,0017	32,95	0,0007

Najznačajniji utjecaj na sve tri zavisne varijable ima omjer uzorak/otapalo ($p < 0,0001$), što se može uočiti i na 3D dijagramima odzivnih površina (grafičkim prikazima regresijskih jednadžbi) prikazanim na slikama 9a-i. Na 3D dijagramima može se uočiti povećanje svih odziva približavanjem omjera uzorak/otapalo vrijednosti od 0,01 g mL⁻¹ (1 g u 100 mL). Također, povećanje temperature do maksimalnih 100 °C dovodi do povećanja odzivnih vrijednosti.

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli (uvjeta ekstrakcije) u svrhu dobivanja što viših vrijednosti za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određene su pomoću 3D odzivnih površina i matematičkih modela. Određeni optimalni uvjeti HAE su 10 min za vrijeme, 100 °C za temperaturu i 0,01 g mL⁻¹ za omjer uzorak/otapalo. Dobivene eksperimentalne vrijednosti za udio ukupnih polifenola (40,6 mg GAE g⁻¹ s.tv.) i antioksidacijski kapacitet (0,209 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. za obje metode) vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: 40,3 mg GAE g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,209 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; ABTS: 0,212 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.), pri čemu relativne pogreške iznose redom 2,49, 0,00 i 1,44 %. To ukazuje na prikladnost modela za predviđanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u realnim sustavima. Prema istraživanju Arrude i suradnika (2017) temperature iznad 75 °C mogu uzrokovati degradaciju fenolnih spojeva ili njihovu interakciju s drugim spojevima matriksa usporavajući njihovu ekstrakciju. U ovom radu optimalna temperatura iznosi 100 °C, no ekstrakcija se provodila pri kratkom vremenu (10 min), što je očigledno nedovoljno za izazivanje degradacije polifenola.



Slika 9a-i. Konvencionalna metoda ekstrakcije: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; d) temperature i vremena; na udio ukupnih polifenola; d) vremena i temperature; e) vremena i omjera uzorak/otapalo; f) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom

4.3.2. Optimiranje parametara za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MAE)

U tablici 16 prikazane su vrijednosti za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata dobričice dobivenih provođenjem ekstrakcija potpomognutih mikrovalovima pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli (vremena, temperature i omjera uzorak/otapalo). Najniža vrijednost za udio ukupnih polifenola dobivena je u

eksperimentu broj 3 (9 min, 50 °C, 1 g/25 mL) te iznosi 28,6 mg GAE g⁻¹ s.tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom 1 (3 min, 90 °C, 1 g/100 mL) te iznosi 48,6 mg GAE g⁻¹ s.tv. Najviši antioksidacijski kapacitet (0,302 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.) određen ABTS metodom dobiven je eksperimentom broj 1. Također, istim eksperimentom određen je drugi po redu najviši antioksidacijski kapacitet DPPH metodom od 0,218 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. Najviši je antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom za eksperiment broj 12 (9 min, 90 °C, 1 g u 100 mL) te iznosi 0,236 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. Za isti ekstrakt određena je i druga po redu najviša vrijednost za udjel ukupnih polifenola (47,4 mg GAE g⁻¹ s.tv.).

Tablica 16. MAE: Eksperimentalni dizajn i rezultati za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama

Redni broj eksperimenta	Nezavisne varijable			Eksperimentalni podaci		
	X ₁ : Vrijeme (min)	X ₂ : Temperatura (°C)	X ₃ : Omjer uzorak/otapalo(g mL ⁻¹)	Udio ukupnih polifenola (mg GAE g ⁻¹ s.tv.)	ABTS (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)	DPPH (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)
1	3	90	0,01	48,6±0,2	0,302±0,034	0,218±0,009
2	3	70	0,025	35,4±1,0	0,209±0,005	0,174±0,005
3	9	50	0,04	28,6±0,2	0,171±0,006	0,137±0,002
4	3	90	0,04	38,1±0,6	0,207±0,003	0,172±0,002
5	9	70	0,025	35,1±0,3	0,220±0,001	0,173±0,005
6	6	50	0,025	33,4±0,7	0,210±0,007	0,167±0,005
7	6	90	0,025	44,4±1,9	0,250±0,005	0,221±0,008
8	6	70	0,025	35,4±0,4	0,219±0,005	0,180±0,003
9	9	90	0,04	41,3±1,3	0,227±0,003	0,179±0,001
10	3	50	0,01	36,9±0,4	0,202±0,005	0,194±0,002
11	6	70	0,025	35,8±0,6	0,179±0,010	0,181±0,004
12	9	90	0,01	47,4±1,4	0,226±0,006	0,236±0,007
13	6	70	0,04	32,0±0,5	0,199±0,009	0,165±0,004
14	3	50	0,04	29,6±1,1	0,179±0,004	0,151±0,004
15	6	70	0,01	39,4±0,5	0,209±0,006	0,196±0,008
16	9	50	0,01	35,8±0,4	0,202±0,009	0,194±0,009

Ekperimentalni podaci za udio ukupnih polifenola opisani su kvadratnim modelom [18], dok su podaci za antioksidacijski kapacitet određeni ABTS i DPPH metodama opisani linearnim modelima ([19], [20]).

$$\text{Udio ukupnih polifenola (mg GAE g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 35.70 - 0.0458 X_1 + 5.54 X_2 - 3.84 X_3 + 0.5081 X_1 X_2 + 0.5665 X_1 X_3 - 0.2707 X_2 X_3 - 0.4968 X_1^2 + 3.13 X_2^2 - 0.0371 X_3^2 \quad [18]$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.1835 + 0.0010 X_1 + 0.0182 X_2 - 0.0235 X_3 \quad [19]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.2178 - 0.0022 X_1 + 0.0278 X_2 - 0.0197 X_3 \quad [20]$$

Analiza varijance prikazana je u tablici 17. Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9948; DPPH: 0,8907; ABTS: 0,8008). Postotak varijacija koje nisu opisane modelom iznose za udio ukupnih polifenola iznosi 0,52 %, dok je za antioksidacijsku vrijednost određen DPPH i ABTS metodama taj postotak viši te iznosi redom: 10,93 % (DPPH) i 19,92 % (ABTS). Razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 niža je od 0,1. Ovi pokazatelji ukazuju na prikladnost modela za opisivanje eksperimentalnih podataka. Adekvatna preciznost veća od 4 (udjel ukupnih polifenola: 36,3732; DPPH: 17,9428; ABTS: 12,7930) te niske vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) (udjel ukupnih polifenola: 1,76; DPPH: 5,18; ABTS: 7,14) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata.

p -Vrijednost modela niža je od 0,5 za sve rezultate (udjel ukupnih polifenola: <0,0001; DPPH: <0,0001; ABTS: 0,0002). Za test neusklađenosti p -vrijednost viša je 0,05 te iznosi 0,3116 za udjel ukupnih polifenola, 0,0527 za DPPH i 0,2908 za ABTS. Iz navedenih rezultata, vidljivo je da je p -vrijednost testa neusklađenosti za DPPH na granici značajnosti. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate su niski (udjel ukupnih polifenola: 0,0904; DPPH: $4,514 \times 10^{-7}$; ABTS: 0,0000). S obzirom na vrlo niski srednji kvadrat čiste pogreške, značajnost neusklađenosti može se zanemariti (Arruda i sur., 2017). Navedeni podaci ukazuju na kvalitetu modela i prikladnost modela za opisivanje eksperimentalnih podataka.

Tablica 17. MAE: Analiza varijance (ANOVA) odabranog kvadratnog modela ekstrakcije polifenolnih spojeva

a) Odziv: Ukupan sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p -vrijednost
Model	492,32	9	54,70	126,68	< 0,0001

Ostatak	2,59	6	0,4318		
Nedostatak	2,50	5	0,5001	5,53	0,3116

uklopljenosti

Čista pogreška	0,0904	1	0,0904		
Ukupna	494,91	15			

korelacija

$R^2=0,9948$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9869$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8830$; $CV=1,76$; adekvatna preciznost=36,3732

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

Model	0,0088	3	0,0029	32,60	< 0,0001
--------------	--------	---	--------	-------	----------

Ostatak	0,0011	12	0,0001		
----------------	--------	----	--------	--	--

Nedostatak	0,0011	11	0,0001	218,32	0,0527
-------------------	--------	----	--------	--------	--------

uklopljenosti

Čista pogreška	$4,514 \times 10^{-7}$	1	$4,514 \times 10^{-7}$		
-----------------------	------------------------	---	------------------------	--	--

Ukupna	0,0099	15			
---------------	--------	----	--	--	--

korelacija

$R^2=0,8907$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,8634$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8082$; $CV=5,18$; adekvatna preciznost=17,9428

c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

Model	0,0117	3	0,0039	16,08	0,0002
--------------	--------	---	--------	-------	--------

Ostatak	0,0029	12	0,0002		
----------------	--------	----	--------	--	--

Nedostatak	0,0029	11	0,0003	6,83	0,2908
-------------------	--------	----	--------	------	--------

uklopljenosti

Čista pogreška	0,0000	1	0,0000		
-----------------------	--------	---	--------	--	--

Ukupna	0,0146	15			
---------------	--------	----	--	--	--

korelacija

$R^2=0,8008$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,7510$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,5704$; $CV=7,14$; adekvatna preciznost=12,7930

Značajnost koeficijenta determinacije određena pomoću *p*- i *F*-vrijednosti prikazana je u tablici 18. Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da kod MAE nezavisne varijable X_2 (temperatura) i X_3 (omjer uzorak/otapalo) značajno utječu na udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Na udio ukupnih polifenola također značajno utječe i kvadrat

temperature (X_2^2), a interakcija vremena i omjera uzorak/otapalo (X_1X_3) nalazi se na granici značajnosti. p -vrijednosti za temperaturu manje su od 0,0001 za sva tri odziva, dok za omjer uzorak/otapalo iznose $p < 0,0001$ za udio ukupnih polifenola i DPPH te 0,0018 za ABTS, što znači da na udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom najveći utjecaj ima temperatura (X_2), dok na antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom najveći utjecaj ima omjer uzorak/otapalo (X_3). Povećanje vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta s povišenjem temperature i smanjenjem omjera uzorak/otapalo potvrđen je i 3D prikazima regresijskih krivulja.

Tablica 18. MAE: Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni model

a) Odziv: Ukupan sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p -vrijednost
X_1 (vrijeme)	0,0210	1	0,0210	0,0486	0,8328
X_2 (temperatura)	307,43	1	307,43	711,97	< 0,0001
X_3 (omjer uzorak/otapalo)	147,83	1	147,83	342,35	< 0,0001
X_1X_2	2,07	1	2,07	4,78	0,0714
X_1X_3	2,57	1	2,57	5,95	0,0506
X_2X_3	0,5864	1	0,5864	1,36	0,2881
X_1^2	0,6506	1	0,6506	1,51	0,2656
X_2^2	25,78	1	25,78	59,71	0,0002
X_3^2	0,0036	1	0,0036	0,0084	0,9300

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

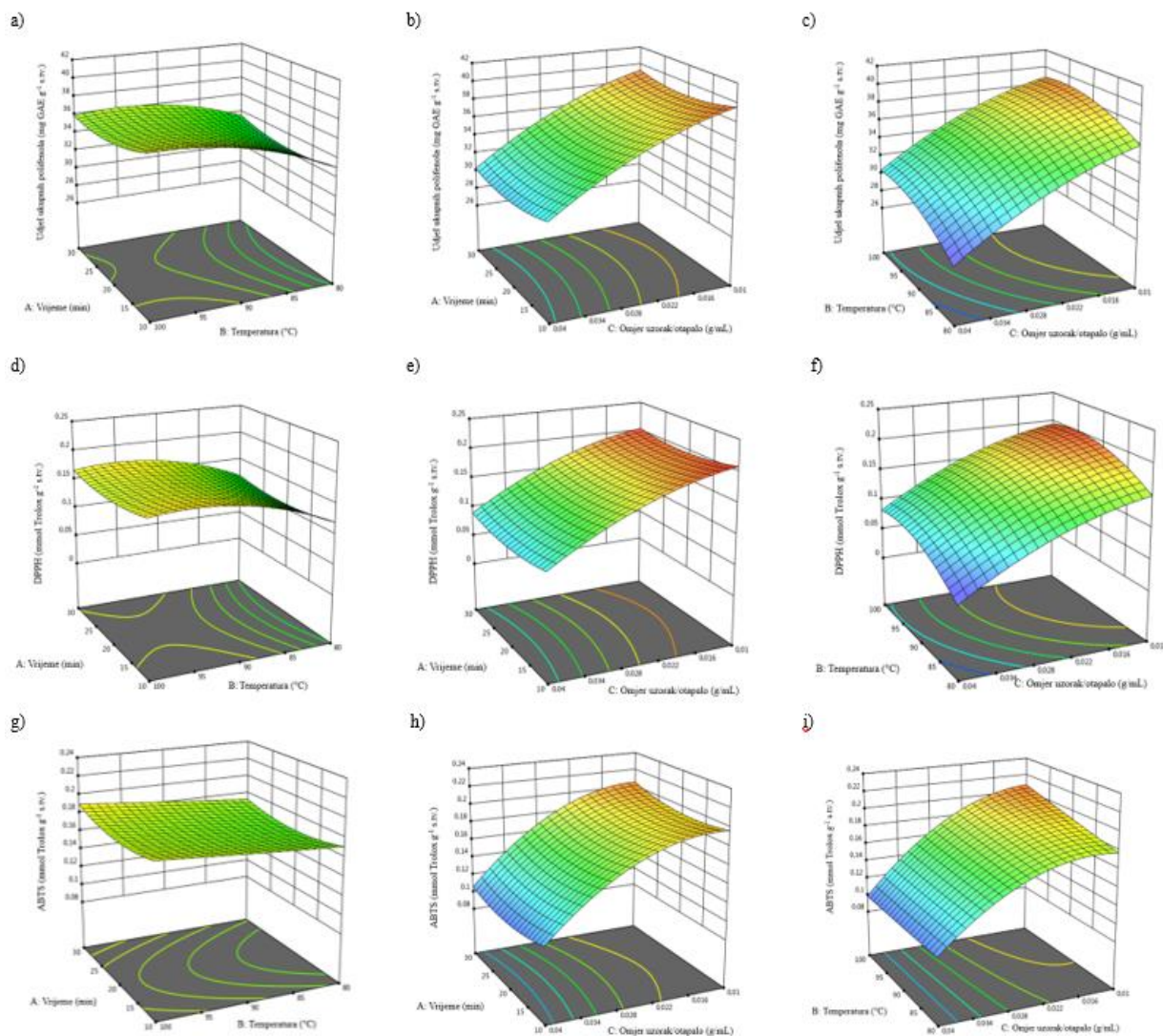
X_1 (vrijeme)	9,266 x 10 ⁻⁶	1	9,266 x 10 ⁻⁶	0,1025	0,7543
X_2 (temperatura)	0,0033	1	0,0033	36,50	< 0,0001
X_3 (omjer uzorak/otapalo)	0,0055	1	0,0055	61,20	< 0,0001

c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

X_1 (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,2055	0,6584
-----------------	--------	---	--------	--------	--------

X₂ (temperatura)	0,0078	1	0,0078	32,05	0,0001
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0039	1	0,0039	16,00	0,0018

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli određene su pomoću 3D odzivnih površina prikazanih na slikama 10a-i i matematičkih modela ([18], [19] i [20]). Određeni optimalni uvjeti MAE su 4,93 min za vrijeme, 90 °C za temperaturu i 0,01 g mL⁻¹ za omjer uzorak/otapalo. Odzivne vrijednosti određene pri definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije iznosile za udio ukupnih polifenola (42,9 mg GAE g⁻¹ s.tv.) te antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (0,263 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.) i DPPH metodom (0,243 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.) vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: 48,4 mg GAE g⁻¹ s.tv.; ABTS: 0,266 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,225 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.), pri čemu relativne pogreške iznose redom 12,82, 0,14 i 7,41 %. Definirani optimalni uvjeti vremena i temperature ekstrakcije slični su optimalnim uvjetima MAE ekstrakcije (80 °C tijekom 5 min) ružmarinske kiseline iz uzoraka limunske trave i ružmarina, biljaka iz porodice *Lamiaceae*, definiranim u radu Sik i suradnika (2020).



Slika 10a-i. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; d) temperature i vremena; na udio ukupnih polifenola; d) vremena i temperature; e) vremena i omjera uzorak/otapalo; f) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom

4.3.3. Optimiranje parametara za ekstrakciju subkritičnom vodom (SWE)

U tablici 19 prikazane su vrijednosti za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata dobričice dobiveni provođenjem ekstrakcija subkritičnom vodom pri 16 različitih kombinacija nezavisnih varijabli (vremena, temperature i omjera uzorak/otapalo).

Najniža vrijednost za udio ukupnih polifenola dobivena je u eksperimentu broj 11 (5 min, 120 °C, 1 g/25 mL) te iznosi 18,4 mg GAE g⁻¹ s.tv., dok je najviša vrijednost dobivena eksperimentom broj 9 (15 min, 200 °C, 1 g/100 mL) te iznosi 62,6 mg GAE g⁻¹ s.tv. Eksperimentom broj 9 određeni su i najviši antioksidacijski kapaciteti za obje metode (ABTS: 0,358 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,293 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.).

Tablica 19. SWE: Eksperimentalni dizajn i rezultati za ukupne polifenole i antioksidacijski kapacitet određen ABTS I DPPH metodama

Redni broj eksperimenta	Nezavisne varijable			Zavisne varijable		
	X ₁ : Vrijeme (min)	X ₂ : Temperatura (°C)	X ₃ : Omjer uzorak/otapalo (g mL ⁻¹)	Udio ukupnih polifenola (mg GAE g ⁻¹ s.tv.)	ABTS (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)	DPPH (mmol Trolox g ⁻¹ s.tv.)
1	10	160	0,01	43,9±0,8	0,234±0,001	0,188±0,002
2	15	200	0,04	27,4±0,0	0,188±0,001	0,276±0,001
3	15	160	0,025	28,8±0,6	0,169±0,000	0,128±0,001
4	5	120	0,01	35,7±0,4	0,190±0,003	0,164±0,000
5	10	120	0,025	21,2±0,6	0,117±0,000	0,097±0,003
6	5	200	0,01	60,1±2,6	0,349±0,017	0,280±0,004
7	10	160	0,025	27,7±0,2	0,159±0,002	0,121±0,001
8	10	160	0,025	30,9±0,6	0,167±0,003	0,131±0,001
9	15	200	0,01	62,6±1,5	0,358±0,002	0,293±0,001
10	10	160	0,04	22,8±0,3	0,131±0,001	0,095±0,002
11	5	120	0,04	18,4±0,3	0,102±0,001	0,082±0,000
12	15	120	0,04	21,1±0,0	0,123±0,003	0,093±0,000
13	5	160	0,025	31,7±0,9	0,184±0,006	0,142±0,000
14	10	200	0,025	34,7±0,1	0,201±0,000	0,159±0,002
15	15	120	0,01	34,0±0,4	0,185±0,006	0,150±0,001
16	5	200	0,04	30,8±0,0	0,209±0,001	0,283±0,000

Niže navedenim jednadžbama ([21], [22], [23]) izražen je kvadratni model za zavisne varijable udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i ABTS metodama.

$$\text{Udio ukupnih polifenola (mg GAE g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 23.39 - 0.2800 X_1 + 8.51 X_2 - 11.58 X_3 - 0.2455 X_1 X_2 - 0.1685 X_1 X_3 - 4.29 X_2 X_3 + 2.32 X_1^2 + 0.0205 X_2^2 + 5.42 X_3^2 \quad [21]$$

$$\text{DPPH (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.1123 - 0.0012 X_1 + 0.0705 X_2 - 0.0246 X_3 + 0.0011 X_1 X_2 + 0.0004 X_1 X_3 + 0.0156 X_2 X_3 + 0.0294 X_1^2 + 0.0294 X_2^2 + 0.0366 X_3^2 \quad [22]$$

$$\text{ABTS (mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.)} = 0.1574 - 0.0010 X_1 + 0.0589 X_2 - 0.0563 X_3 - 0.0037 X_1 X_2 - 0.0005 X_1 X_3 - 0.0200 X_2 X_3 + 0.0220 X_1^2 + 0.0047 X_2^2 + 0.0283 X_3^2 \quad [23]$$

Analiza varijance prikazana je u tablici 20. Vrijednosti R^2 za sve odzive više su od 0,80 (udjel ukupnih polifenola: 0,9855; DPPH: 0,9255; ABTS: 0,9819), postotak varijacija koje nisu opisane modelom iznose 1,42 % (udjel ukupnih polifenola), 7,45 % (DPPH) i 1,09 % (ABTS), razlika između vrijednosti R^2 i prilagođenog R^2 niža je od 0,1, što ukazuje na prikladnost modela pri opisivanju eksperimentalnih podataka. Adekvatna preciznost veća je od 4 (udjel ukupnih polifenola: 21,458; DPPH: 8,5245; ABTS: 20,3617), što ukazuje na adekvatan signal, a niske vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) (udjel ukupnih polifenola: 7,27; DPPH: 19,15; ABTS: 8,05) ukazuju na dobru preciznost i pouzdanost eksperimentalnih rezultata.

p -vrijednost modela niža je od 0,5 za sve rezultate (udjel ukupnih polifenola: <0,0001; DPPH: 0,0091; ABTS: 0,0002). Za test neusklađenosti p -vrijednost viša je 0,05 te iznosi 0,6053 za udjel ukupnih polifenola, 0,1497 za DPPH i 0,2671 za ABTS. Srednji kvadrati čistih pogreški za sve rezultate su niski (udjel ukupnih polifenola: 5,17; DPPH: 0,000; ABTS: 0,0000).

Tablica 20. SWE: Analiza varijance (ANOVA) odabranog kvadratnog modela ekstrakcije polifenolnih spojeva

a) Odziv: Ukupni sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p -vrijednost
Model	2387,63	9	265,29	45,47	< 0,0001
Ostatak	35,01	6	5,83		
<i>Nedostatak uklopljenosti</i>	29,84	5	5,97	1,15	0,6053

<i>Čista pogreška</i>	5,17	1	5,17
Ukupna	2422,64	15	

korelacija

$R^2=0,9855$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9639$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,8114$; $CV=7,27$; adekvatna preciznost=21,458

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

Model	0,0768	9	0,0085	8,28	0,0091
Ostatak	0,0062	6	0,0010		
<i>Nedostatak uklopljenosti</i>	0,0061	5	0,0012	25,31	0,1497

<i>Čista pogreška</i>	0,0000	1	0,0000
Ukupna	0,0830	15	

korelacija

$R^2=0,9255$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,8138$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,3691$; $CV=19,15$; adekvatna preciznost=8,5245

c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

Model	0,0776	9	0,0086	36,12	0,0002
Ostatak	0,0014	6	0,0002		
<i>Nedostatak uklopljenosti</i>	0,0014	5	0,0003	7,68	0,2671

<i>Čista pogreška</i>	0,0000	1	0,0000
Ukupna	0,0790	15	

korelacija

$R^2=0,9819$; $R^2_{\text{prilagodeni}}=0,9547$; $R^2_{\text{predvideni}}=0,7788$; $CV=8,05$; adekvatna preciznost=20,3617

Značajnost koeficijenta determinacije određena pomoću p - i F -vrijednosti prikazana je u tablici 20. Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da na sve odzive značajno utječe nezavisna varijabla X_2 (temperatura). p -vrijednosti za temperaturu manje su od 0,0001 za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom, dok za antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom iznosi 0,0004. Na odziv udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom također značajno utječe omjer uzorak/otapalo ($p < 0,0001$), dok je za DPPH iznad granice značajnosti ($p = 0,0516$). Na udio ukupnih polifenola značajan utjecaj imaju i interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo

(X_2X_3) te kvadrat omjera uzorak/otapalo (X_3^2). Na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom značajan utjecaj ima interakcija temperature i omjera uzorak/otapalo.

Tablica 21. SWE: Procijenjene vrijednosti regresijskih koeficijenata i test njihove značajnosti za kvadratni model

a) Odziv: Ukupan sadržaj polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-vrijednost	p-vrijednost
X₁ (vrijeme)	0,7838	1	0,7838	0,1343	0,7266
X₂ (temperatura)	724,47	1	724,47	124,16	< 0,0001
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	1339,86	1	1339,86	229,63	< 0,0001
X₁X₂	0,4822	1	0,4822	0,0826	0,7834
X₁X₃	0,2273	1	0,2273	0,0390	0,8501
X₂X₃	147,29	1	147,29	25,24	0,0024
X₁²	14,13	1	14,13	2,42	0,1706
X₂²	0,0011	1	0,0011	0,0002	0,9895
X₃²	77,31	1	77,31	13,25	0,0108

b) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (DPPH)

X₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,0140	0,9096
X₂ (temperatura)	0,0496	1	0,0496	48,18	0,0004
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0061	1	0,0061	5,87	0,0516
X₁X₂	0,0000	1	0,0000	0,0102	0,9227
X₁X₃	1,532 x 10 ⁻⁶	1	1,52 x 10 ⁻⁶	0,0015	0,9705
X₂X₃	0,0020	1	0,0020	1,90	0,2175
X₁²	0,0023	1	0,0023	2,21	0,1879
X₂²	0,0013	1	0,0013	1,30	0,2969
X₃²	0,0035	1	0,0035	3,42	0,1138

c) Odziv: Antioksidacijski kapacitet (ABTS)

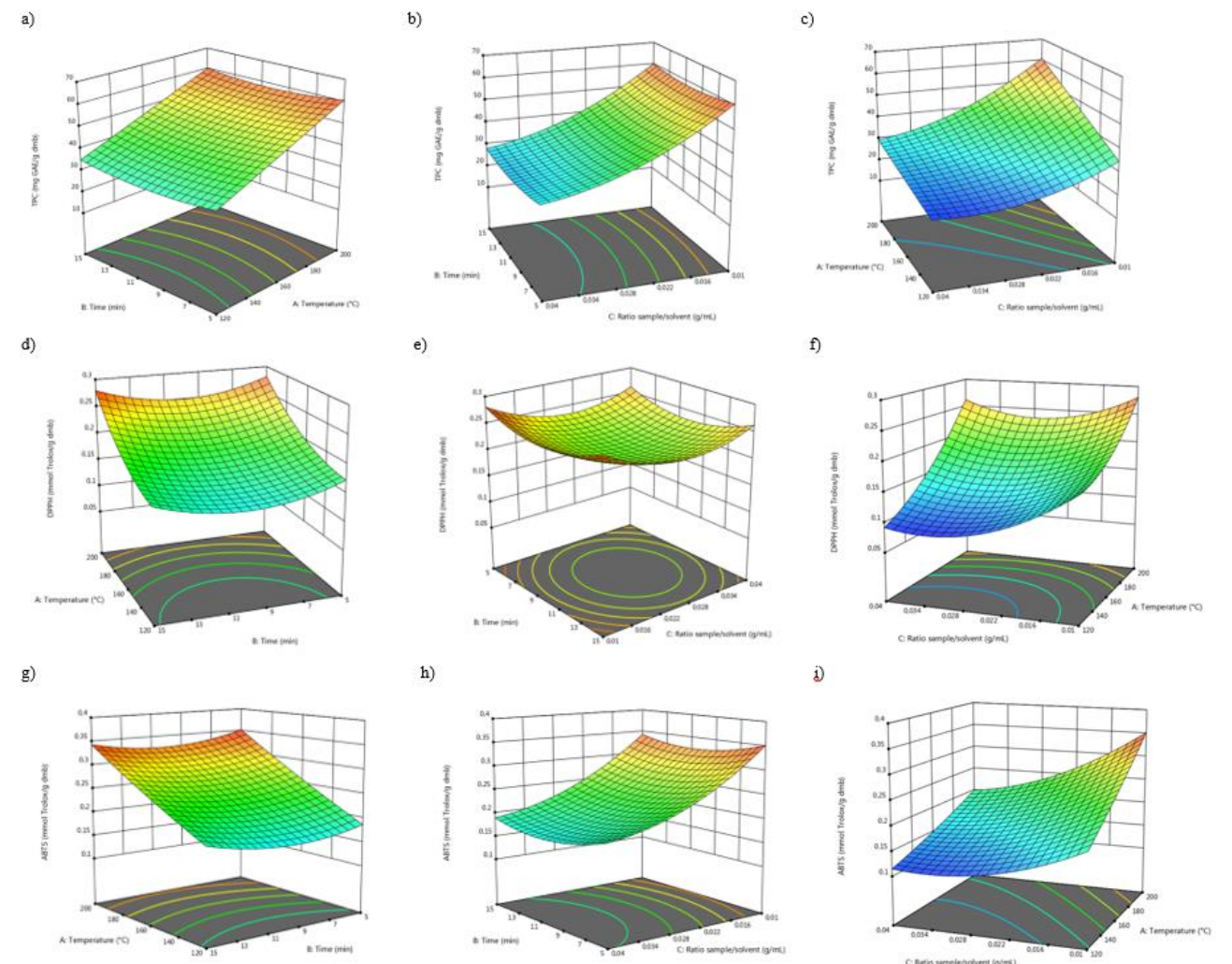
X₁ (vrijeme)	0,0000	1	0,0000	0,0450	0,8391
--------------------------------	--------	---	--------	--------	--------

X₂ (temperatura)	0,0347	1	0,0347	145,32	< 0,0001
X₃ (omjer uzorak/otapalo)	0,0317	1	0,0317	132,72	< 0,0001
X₁X₂	0,0001	1	0,0001	0,4688	0,5191
X₁X₃	1,797 x 10 ⁻⁶	1	1,797 x 10 ⁻⁶	0,0075	0,9337
X₂X₃	0,0032	1	0,0032	13,45	0,0105
X₁²	0,0013	1	0,0013	5,34	0,0602
X₂²	0,0001	1	0,0001	0,2396	0,6419
X₃²	0,0021	1	0,0021	8,85	0,0248

Optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli određene su pomoću 3D odzivnih površina prikazanih na slikama 11a-i i matematičkih modela ([21], [22], [23]). Određeni optimalni uvjeti SWE su 5 min, 200 °C te 1g/100 mL. Pri definiranim optimalnim uvjetima dobivene su eksperimentalne vrijednosti za udio ukupnih polifenola 60,1 mg GAE g⁻¹ s.tv., antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom 0,349 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. te DPPH metodom 0,280 mmol Trolox g⁻¹ s.tv. Navedene vrijednosti vrlo su slične predviđenim vrijednostima (udjel ukupnih polifenola: 60,9 mg GAE g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,281 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; ABTS: 0,325 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.), pri čemu su relativne pogreške za udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom niske te iznose 1,33 % i 0,001%, dok je relativna pogreška između predviđene i dobivene vrijednosti za antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom nešto viša te iznosi 19,48 %. To ukazuje na bolju prikladnost modela za predviđanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u realnim sustavima u odnosu na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom.

Dobiveni rezultati usporedivi su s onima dobivenim u radu Vladić i suradnika (2017), gdje je provedeno optimiranje ekstrakcijskih uvjeta SWE ekstrakcije polifenolnih spojeva Primorskog vriska (*Satureja montana* L.) biljke iz porodice *Lamiaceae*. Temperatura ekstrakcije određena je kao najznačajniji parametar ekstrakcije, dok je vrijeme imalo zanemariv utjecaj na promatrane zavisne varijable. Najviši udio ukupnih polifenola ekstrahirani je pri temperaturi od 150 °C, dok je povećanje temperature dovelo do smanjivanja navedene vrijednosti. Unatoč smanjenju vrijednosti udjela ukupnih polifenola pri višim temperaturama, najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena je kod ekstrakata dobivenih pri 220,5 °C. Razlog tomu vjerojatno je neformacija spojeva reakcijama karamelizacije i Maillardovim reakcijama,

koje započinju pri temperaturama 140 – 160 °C (Plaza i sur., 2010; Cvetanović i sur., 2018). Definirana optimalna vrijednost temperature ekstrakcije ista je kao ona definirana u radu Vladić i suradnika (2017), dok je vrijeme ekstrakcije znatno dulje. U radu Cvetanović i suradnika (2018) SWE ekstrakti kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) pokazali su najvišu antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS i DPPH metodama pri ekstrakcijskoj temperaturi od 150 °C u odnosu na više temperature ekstrakcije (210 °C), što je suprotno od rezultata dobivenih u ovome radu.



Slika 11a-i. Ekstrakcija subkritičnom vodom: 3D prikaz odzivnih površina za utjecaje a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; d) temperature i vremena; na udio ukupnih polifenola; d) vremena i temperature; e) vremena i omjera uzorak/otapalo; f) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom; a) temperature i vremena; b) omjera uzorak/otapalo i vremena; c) temperature i omjera uzorak/otapalo; na antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom

4.4. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNIH EKSTRAKATA DOBRIČICE DOBIVENIH POD OPTIMALNIM UVJETIMA EKSTRAKCIJA

Optimalni parametri za istraživane ekstrakcijske tehnike – HAE (100 °C, 10 min, 1g/100 mL), MAE (90 °C, 4,93 min, 1g/100 mL) i SWE (200 °C, 5 min, 1 g/100 mL) određeni su na uzorku D3 te su potom primijenjeni na preostale sakupljene uzorke dobričice (D1, D2, D4, D5, D6 i D7). Dobivenim ekstraktima određen je ekstrakcijski prinos, udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet te udio pojedinačnih polifenolnih spojeva.

4.4.1. Određivanje ekstrakcijskog prinosa

Ekstrakcijski prinos, određen kao postotak ekstraktibilne suhe tvari, za sakupljene uzorke dobričice prikazan je u tablici 22.

Tablica 22. Ekstrakcijski prinos različito pripremljenih ekstrakata dobričice

Ekstrakcijski prinos (%)	HAE	MAE	SWE
D1	0,48±0,01	0,38±0,01	0,53±0,01
D2	0,48±0,02	0,44±0,01	0,42±0,01
D3	0,36±0,01	0,25±0,01	0,43±0,02
D4	0,41±0,00	0,36±0,00	0,54±0,01
D5	0,39±0,02	0,36±0,01	0,46±0,00
D6	0,41±0,03	0,34±0,02	0,51±0,00
D7	0,42±0,005	0,32±0,007	0,51±0,01

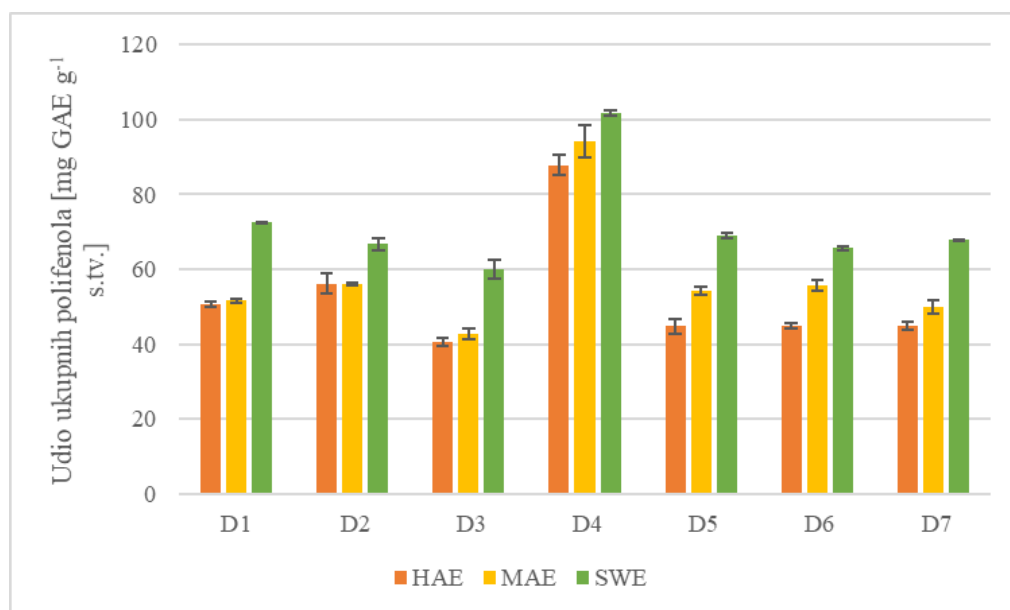
HAE – konvencionalna metoda ekstrakcije; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom

Iz navedenih vrijednosti vidljivo je da je najviši ekstrakcijski prinos određen u ekstraktima dobivenim SWE (0,42 za uzorak D2 do 0,54 % za uzorak D4), zatim HAE (0,36 za uzorak D3 do 0,48 % za uzorak D2) pa MAE (0,25 za uzorak D3 do 0,44 % za uzorak D2). Ekstrakcijski uvjeti metoda razlikuju se u trajanju i temperaturi ekstrakcije. SWE metoda ekstrakcije podrazumijeva ekstrakciju pri najvišoj temperaturi (200 °C), stoga je očekivan najviši prinos, dok MAE metoda koja ima najniži prinos podrazumijeva ekstrakciju pri najnižoj temperaturi (90 °C). Prinos SWE metode viši je od prinosa HAE i MAE, što se podudara s podacima u literaturi. S obzirom na viši koeficijent difuzije, nižu viskoznost i površinsku napetost, subkritična voda bolje penetrira u matriks i pogoduje boljem transferu mase. Također, SWE metoda ima bolju selektivnost od konvencionalnih te time daje i veću čistoću ekstrakta (Azmir i sur., 2013; Zhang i sur., 2020).

4.4.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata

Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata dobričice provedena je određivanjem udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva.

Na slici 12 prikazan je udio ukupnih polifenola određenih u ekstraktima dobričice dobivenim HAE, MAE i SWE metodama ekstrakcije.



Slika 12. Udjel ukupnih polifenola različito pripremljenih ekstrakata dobričice sakupljenih sa različitim lokacija (HAE – konvencionalna metoda ekstrakcije; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom)

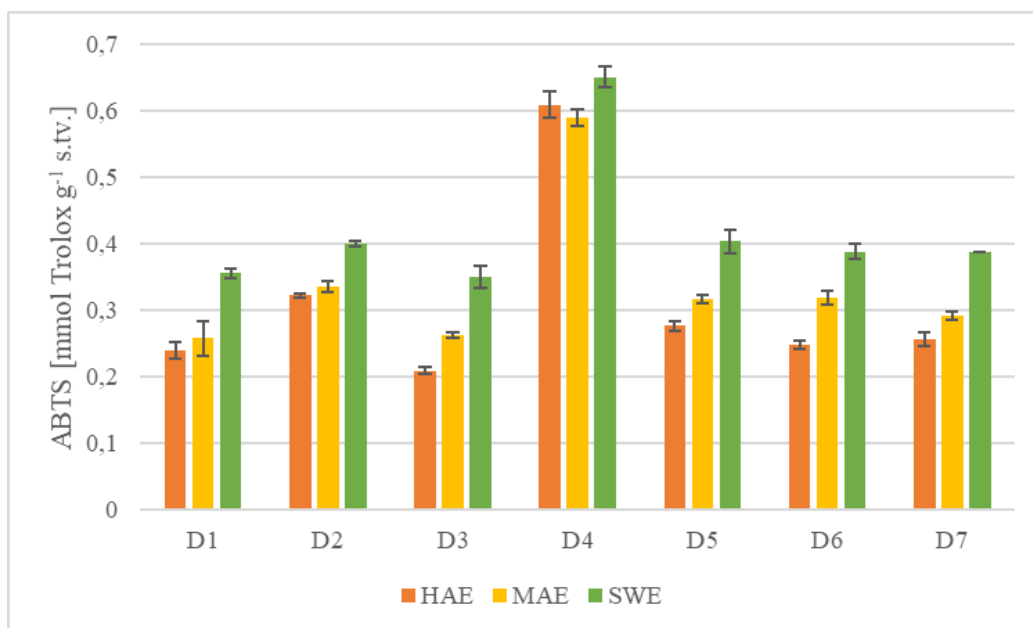
Iz navedenih rezultata vidljivo je da je SWE metodom ekstrakcije ekstrahiran najviši udio polifenolnih spojeva u svim uzorcima te iznosi od 60,09 mg GAE g⁻¹ s.tv. za uzorak D3 do 101,71 mg GAE g⁻¹ s.tv. za uzorak D4. HAE metoda ekstrakcije rezultirala je najnižim udjelom polifenola (44,60 mg GAE g⁻¹ s.tv. za uzorak D3 do 87,87 mg GAE g⁻¹ s.tv. za uzorak D4), u svim uzorcima osim uzorka D2 gdje je niži udio postignut metodom MAE. MAE metodom ekstrahiran je viši udio polifenola u odnosu na HAE, unatoč nižem ekstrakcijskom prinosu MAE metode. Također, može se uočiti kako najviši udio polifenola sadrži uzorak D4 (87,87 mg GAE g⁻¹ s.tv. za HAE do 101,71 mg GAE g⁻¹ s.tv. za SWE), a najniži uzorak D3 (40,60 mg GAE g⁻¹ s.tv. za HAE do 60,09 mg GAE g⁻¹ s.tv. za SWE).

Navedeni podaci za udio ukupnih polifenola određen u ekstraktima dobivenim konvencionalnom metodom za 1,5 do 3 puta su viši od podataka navedenih u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2013), gdje je u ekstraktima dobivenim sličnim ekstrakcijskim parametrima (10 min, 80 °C, 0,1 g mL⁻¹) određen udio ukupnih polifenola od 27,55 mg GAE g⁻¹ s.tv. Razlog različitog udjela ukupnih polifenola mogu biti svjetlost, lokacija i period berbe uzoraka (Varga i sur., 2016).

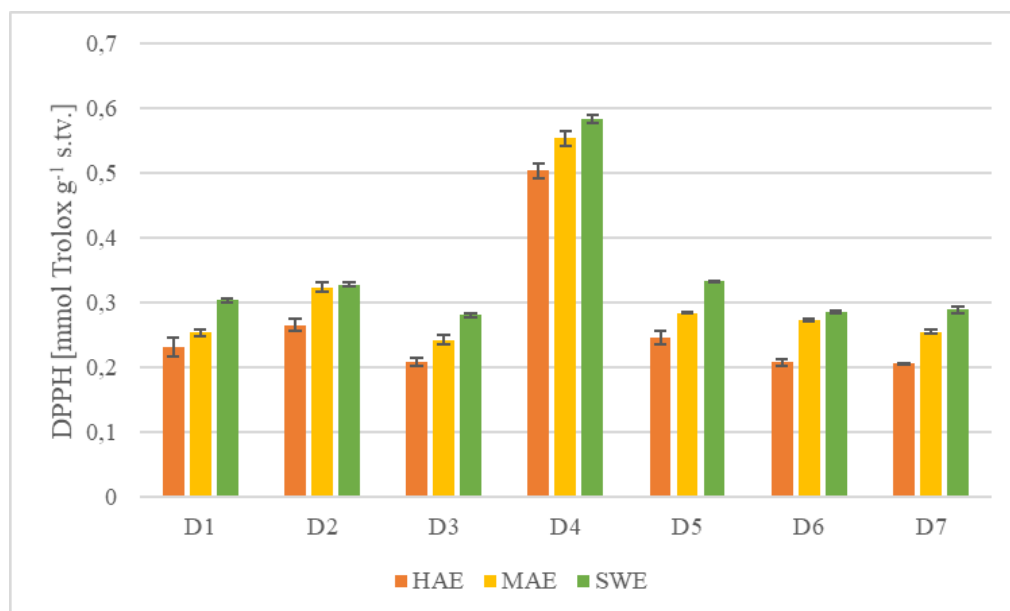
U usporedbi s konvencionalnom metodom, gdje se ekstrakcija odvija mehanizmom zagrijavanja otapala i njegove difuzije u stanice te otapanjem analita u otapalu i difuzije iz stanice, MAE podrazumijeva jednoliko zagrijavanje cijelog volumena uzorka te rupturu staničnih stijenki pri čemu dolazi do izlaska sadržaja iz stanice i učinkovitije ekstrakcije (Galan i sur., 2017). S obzirom na navedene činjenice, ekstrakcijom pomoću mikrovalova ekstrahiran je viši udio ukupnih polifenola kod svih analiziranih uzoraka nego konvencionalnom metodom. Isti trend uočen je u radu Galan i suradnika (2017), gdje su ekstrakti dobiveni MAE sadržavali 162 mg GAE g⁻¹ s.tv., a konvencionalnom metodom 150 mg GAE g⁻¹ s.tv.

SWE metodom postignuti su najviša vrijednost udjela ukupnih polifenola u ekstraktima. Uvjeti ekstrakcije poput povišenog tlaka i temperature dovode vodu u subkritično stanje pri čemu se smanjuje polarnost vode. Time dolazi i do otapanja manje polarnih fenolnih spojeva u vodi, što može biti jedan od razloga višeg udjela polifenola u ekstraktima. Također, pri visokim temperaturama ekstrakcije može doći i do fragmentacije fenolnih spojeva pri čemu mogu nastati novi fenolni spojevi, čije hidroksilne skupine također ulaze u reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom (Rodrigues i sur., 2020). Viši udio ukupnih polifenola ekstrakata dobivenih SWE u odnosu na MAE uočen je i u radu Rodrigues i suradnika (2020), gdje se ispitala učinkovitost SWE i MAE metode za ekstrakciju polifenolnih spojeva biljke *Cnidoscopus Aconitifolius* Mill.

Na slikama 13 i 14 prikazan je antioksidacijski kapacitet određen pomoću ABTS i DPPH metode za iste uzorke.



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet različito pripremljenih ekstrakata dobričice sakupljenih sa različitih lokacija (HAE – konvencionalna metoda ekstrakcije; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom)



Slika 14. Antioksidacijski kapacitet različito pripremljenih ekstrakata dobričice sakupljenih sa različitih lokacija (HAE – konvencionalna metoda ekstrakcije; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; SWE – ekstrakcija subkritičnom vodom)

Iz navedenih rezultata vidljivo je da ekstrakti dobiveni SWE metodom imaju najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS i DPPH metodama, zatim ih slijede MAE pa HAE ekstrakti. Iznimka je uzorak D4 kojemu je antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom nešto viši kod HAE metode u odnosu na MAE metodu. Sukladno dobivenim vrijednostima za udio ukupnih polifenola, uzorak D4 pokazao je najviši antioksidacijski kapacitet (ABTS: 0,589 – 0,650 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,504 – 0,644 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.), dok je najniži pokazao uzorak D3 (ABTS: 0,209 – 0,349 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,209 – 0,333 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.).

Razlika antioksidacijskih kapaciteta određenih ABTS i DPPH metodama vjerojatno je posljedica različitih reakcija između polifenola i dva različita radikala. Polifenoli, s obzirom na široki spektar kemijskih struktura, ulaze u različite reakcije sa slobodnim radikalima. U radu Platzer i suradnika (2021) uočeno je da određeni dihidrokalkoni i flavanoni ne reagiraju s DPPH radikalom, što dovodi do značajnih razlika antioksidacijskih kapaciteta određenih ovim dvama metodama. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka bogatih dihidrokalkonima i flavanonima učinkovitije je ABTS metodom. Za sve ekstrakte antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom viši je od onoga određenog DPPH metodom, što upućuje na različit sastav polifenola u ekstraktima. Ova pojava posebice je izražena za SWE ekstrakte, čiji je ABTS metodom određeni antioksidacijski kapacitet značajno viši u odnosu na onaj određen DPPH metodom. Slični rezultati prikazani su u radu Cvetanović i suradnika (2018), gdje su promatrani SWE ekstrakti kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) dobiveni pri različitim temperaturama ekstrakcije (65 – 210 °C) pokazali višu antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom u odnosu na DPPH.

Unatoč nižem ekstrakcijskom prinosu ekstrakti dobiveni pomoću MAE imaju viši udio polifenola i višu antioksidacijsku aktivnost (TPC: 48,6 mg GAE g⁻¹ s.tv., ABTS: 0,302 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,218 mmol Trolox g⁻¹ s.tv..) od konvencionalne metode (TPC: 40,3 mg GAE g⁻¹ s.tv.; DPPH: 0,209 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.; ABTS: 0,212 mmol Trolox g⁻¹ s.tv.), što ukazuje na veću čistoću ekstrakata dobivenih MAE metodom. Slični rezultati dobiveni su u radu Galan i suradnika (2017) gdje je ekstrakcijom polifenola iz pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) MAE i konvencionalnom metodom, dobiven jednak prinos ekstrakcije, ali ekstrakti dobiveni konvencionalnom metodom imali su niži udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet.

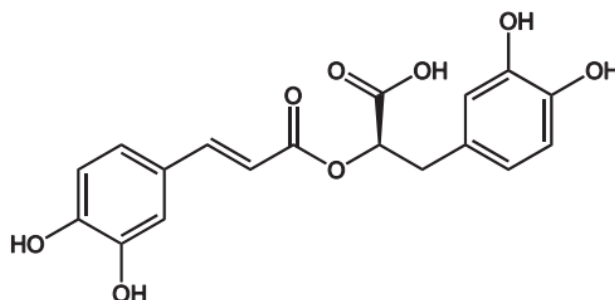
HPLC-DAD metodologijom identificirani su i kvantificirani pojedinačni polifenolni spojevi u različito pripremljenim ekstraktima dobričice (HAE, MAE i SWE). Rezultati su prikazani u tablici 23.

Tablica 23. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u različito pripremljenim ekstraktima dobričice sakupljenih sa različitih lokacija

Uzorak	Metoda ekstrakcije	Fenolne kiseline (mg g ⁻¹ s.tv.)			Flavanoidi (mg g ⁻¹ s.tv.)
		<i>Klorogenska kiselina</i>	<i>Kafeinska kiselina</i>	<i>Ružmarinska kiselina</i>	<i>Rutin</i>
D1	HAE	5,53±0,03	0,48±0,02	0,96±0,06	4,69±0,02
	MAE	6,10±0,01	0,47±0,01	1,33±0,02	5,61±0,03
	SWE	1,73±0,00	0,10±0,00	0,17±0,03	1,01±0,00
D2	HAE	6,42±0,03	0,73±0,00	0,75±0,00	6,89±0,15
	MAE	7,15±0,06	0,65±0,01	3,00±0,01	8,83±0,09
	SWE	2,20±0,00	0,13±0,00	0,17±0,00	1,09±0,21
D3	HAE	1,13±0,02	0,38±0,00	4,80±0,02	1,53±0,01
	MAE	1,10±0,02	0,45±0,00	5,56±0,04	1,64±0,03
	SWE	0,47±0,00	0,14±0,00	0,40±0,00	0,40±0,00
D4	HAE	1,65±0,05	0,84±0,01	11,03±0,15	3,89±0,02
	MAE	1,78±0,01	0,60±0,00	18,69±0,14	4,38±0,03
	SWE	0,99±0,02	0,24±0,00	1,07±0,00	1,01±0,12
D5	HAE	1,76±0,06	0,47±0,02	0,94±0,33	0,58±0,01
	MAE	2,31±0,03	0,47±0,02	4,14±0,08	1,03±0,02
	SWE	1,17±0,00	0,42±0,00	0,24±0,00	0,26±0,00
D6	HAE	3,14±0,11	0,62±0,03	0,40±0,03	1,88±0,00
	MAE	4,98±0,01	0,71±0,00	3,54±0,01	3,95±0,02
	SWE	1,52±0,00	0,11±0,00	0,21±0,00	0,82±0,00
D7	HAE	3,12±0,02	0,72±0,01	1,27±0,00	3,29±0,02
	MAE	3,33±0,07	0,76±0,01	2,37±0,06	3,87±0,05
	SWE	1,14±0,00	0,13±0,00	0,12±0,00	1,07±0,00

U ekstraktima dobričice identificirani su četiri polifenolna spoja: klorogenska, kafeinska i ružmarinska kiselina iz grupe fenolnih kiselina te flavonoid rutin. Iz navedenih rezultata vidljivo je kako su različite metode ekstrakcije rezultirale različitim udjelima pojedinačnih polifenolnih spojeva. Najviši udjeli pojedinačnih polifenolnih spojeva određeni su većinom u MAE ekstraktima, a zatim u HAE ekstraktima. SWE metoda ekstrakcije rezultirala je najnižim udjelima pojedinačnih polifenolnih spojeva. Razlog tomu vjerojatno jest termalna degradacija termolabilnih spojeva te ekstrakcija manje polarnih komponenti (Gbashi i sur., 2016).

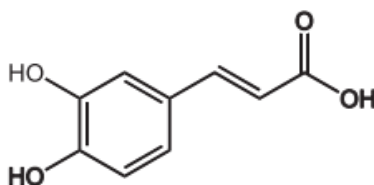
Najviši udio ružmarinske kiseline određen je u uzorku D4 (HAE: 11,03 mg g⁻¹ s.tv.; MAE: 18,69 mg g⁻¹ s.tv.; SWE: 1,07 mg g⁻¹ s.tv.), koji ujedno ima i najviši udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Ružmarinska kiselina (slika 15) ester je kafeinske i 3,4-dihidrofenillaktatne kiseline. Snažan je antioksidans te ima protuupalno djelovanje, zbog čega ima terapijski potencijal kod liječenja autoimunih bolesti. Osim toga, *in vitro* istraživanja pokazala su antikancerogeno djelovanje, posebice kod stanica raka pluća, prostate i kronične mijeloične leukemije te preventivno i terapijsko djelovanje na neurodegenerativne poremećaje i dijabetes melitus (Chao i sur., 2019; Luo i sur., 2020; Sik i sur., 2021).



Slika 15. Ružmarinska kiselina (Chou i sur., 2019)

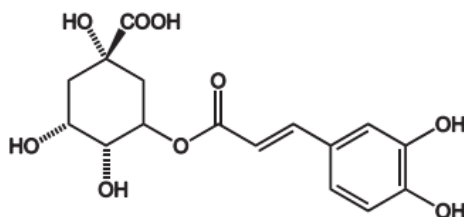
Kafeinska kiselina je hidroksicimetna kiselina zastupljena u voću, povrću, kavi i začinima (slika 16). U radu Sik i suradnika (2021) uočen je porast koncentracije kafeinske kiseline u etanolnim ekstraktima različitih biljaka porodice *Lamiaceae* kao posljedica degradacije ružmarinske kiseline. Kafeinska kiselina sastavni je dio mnogih polifenolnih spojeva pa njeno prisustvo u višim koncentracijama može biti posljedica degradacije spojeva visokom temperaturom (Chou i sur., 2019). U HAE ekstraktima uzoraka D1, D2 i D4 uočena je viša koncentracija kafeinske kiseline u odnosu na MAE ekstrakte, što potencijalno može ukazati na očuvanje polifenolnih spojeva MAE metodom, zbog blažih ekstrakcijskih uvjeta. Također, do degradacije ružmarinske kiseline dolazi i tijekom skladištenja, pri čemu se povećava količina

kafeinske, što može upućivati i na svježinu početnih uzoraka, odnosno različito vrijeme berbe (Sik i sur., 2021).



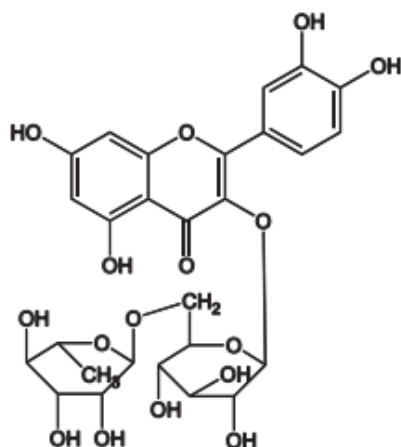
Slika 16. Kafeinska kiselina (Chou i sur., 2019)

Klorogenska kiselina (slika 17) najzastupljenija je fenolna kiselina u većini ekstrakata, izuzev HAE, MAE i SWE ekstrakata uzoraka D3, D4 i MAE ekstraktu uzorka D5. Nastaje esterifikacijom kafeinske i kininske kiseline te je zastupljena u mnogim biljkama, npr. u jabukama i zrnima kave. Različita *in vivo* i *in vitro* istraživanja ukazuju na različite potencijalne biološke funkcije klorogenske kiseline, kao što su antioksidacijska, antikancerogena i hepatoprotektivna funkcija (Chou i sur., 2019).



Slika 17. Klorogenska kiselina (Chou i sur., 2019)

Flavanol rutin (slika 18), glikon kvercetina, poznat je po snažnim protuupalnim, antioksidacijskim i protektivnim svojstvima kardiovaskularnog sustava. Nalazi se u brojnom voću i povrću. U ekstraktima dobričice u najvećem je udjelu određen u MAE ekstraktu uzorka D2 uzorka (8,83 mg g⁻¹ s.tv.).



Slika 18. Rutin (Chou i sur., 2019)

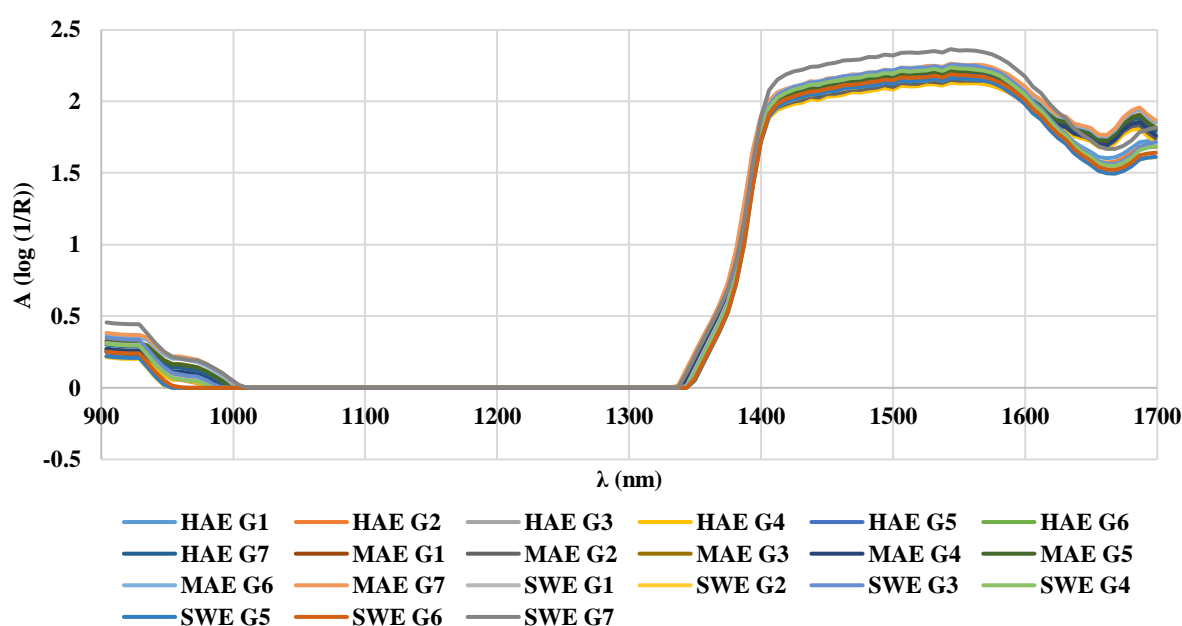
Rezultati ovog rada u skladu su sa istraživanjem Chou i suradnika (2019) koji su identificirali 12 polifenolnih spojeva dobričice u ekstraktima dobivenim infuzijom. U najvećem udjelu detektirana su ista četiri spoja kao u ovom radu: ružmarinska kiselina (0,62 – 13,98 mg g⁻¹ ekstrakta), klorogenska kiselina (0,18 – 2,50 mg g⁻¹ ekstrakta), kafeinska kiselina (0,08 – 1,82 mg g⁻¹ ekstrakta) te rutin (0,16 – 0,94 mg g⁻¹ ekstrakta), i u nešto nižim koncentracijama genistin, ferulinska kiselina, daidzin, genistein, galna kiselina, katehin i kvercetin.

4.4.3. NIR i PCA analiza

NIR spektroskopija nedestruktivna je analitička metoda, koja omogućava analizu velikog broja uzoraka bez prethodne pripreme i predtretmana te omogućuje mjerenje u realnom vremenu. Temelji se na apsorpciji ili refleksiji elektromagnetskog zračenja bliskog infracrvenog dijela spektra te analizi spektra pomoću različitih kemometrijskih metoda. Snimljeni spektri predstavljaju 'otisak prsta' (engl. *fingerprint*) snimanog uzorka. Interakcija uzorka i svjetlosti mjeri se vibracijama kemijskih veza komponenti uzorka (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016; Bittner i sur., 2013). Vibracija molekule ima određenu frekvenciju/valnu duljinu te seriju overtona. Oblik spektra za određeni uzorak rezultat je karakterističnih temeljnih vibracija i overtona kemijskih veza, primarno C-H, N-H, O-H i C=O veza. Kompleksnost molekularne struktura rezultira preklapajućim signalima na spektrima. Iz tog razloga potrebno je analizirati NIR spektre statističkim metodama (Badr Eldin, 2011).

Ekstrakti dobiveni inovativnim i konvencionalnom metodom ekstrakcije analizirani su NIR spektroskopijom. Spektri su snimljeni u području valnih duljina 904 do 1699 nm za sve uzorke, a usporedbe spektara snimljenih za ekstrakte dobivene različitim metodama za pojedine uzorke prikazane su na slici 19. Apsorpcija u području od 900 do 1000 nm odgovara drugom i

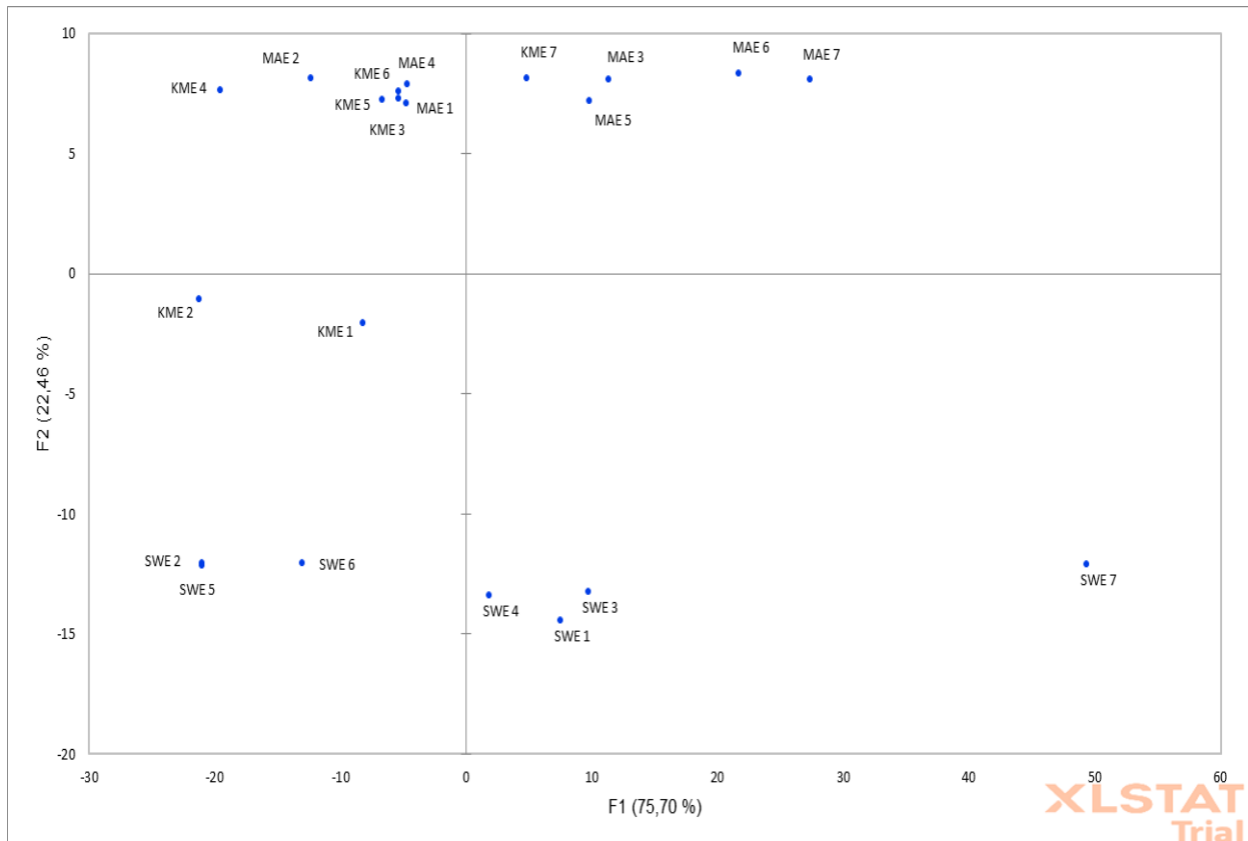
trećem overtoneu C-H i O-H veza te uključuje povezanost s trećim overtoneom C-H₃ istežanjem ili s aromatskim skupinama. Apsorpcija u području 1340 – 1700 nm odgovara prvom i drugom overtoneu C-H i drugom overtoneu O-H veza te također njihovu povezanost s aromatskim grupama. Navedene veze i skupine očekivane su u fenolnim spojevima i antioksidansima, što ukazuje na njihovu prisutnost u uzorku, a razlike u spektrima upućuju na razlike u sastavu i količini polifenola (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). Najznačajnije razlike uočene na NIR spektrima svih uzoraka nalaze se u području apsorpcije od 1600 do 1700 nm, gdje se posebno ističe krivulja SWE ekstrakata, koja ima nižu apsorpciju od preostale dvije, osim za uzorak D1 gdje je vrlo slična krivulji HAE ekstrakata. Također, do izražaja dolazi odstupanje SWE ekstrakta uzorka D7, koji ima znatno višu apsorpciju od svih preostalih ekstrakata u navedenom području. Ovo područje apsorpcije odgovara prvom overtoneu C-H veza povezanih s aromatskim skupinama, što može ukazivati na različitu količinu i sastav fenolnih spojeva. S obzirom da udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet navedenih ekstrakata ne odstupaju značajno od ostatka, razlog odstupanja na NIR spektru vjerojatno je različit sastav polifenolnih spojeva.



Slika 19. Usporedba NIR spektara za ekstrakte dobivene HAE, MAE i SWE metodama ekstrakcije za uzorke dobričice D1-D7.

Na NIR spektrima svih uzoraka određeni su dijelovi spektra koji upućuju na specifične razlike među uzorcima, stoga je napravljena redukcija spektra za daljnju obradu podataka. Za

PCA analizu korištene su vrijednosti apsorbancija u rasponu 900 – 1000 nm i 1400 – 1700 nm. Rezultati PCA analize prikazani su na slici 20. PCA analiza je kemometrijska metoda koja prepoznaje ponavljajuće obrasce u podacima te ih grupira na način da se istaknu njihove sličnosti i razlike. Cilj je izlučiti važne informacije iz dobivenih podataka te ih prikazati kao nove ortogonalne varijable, odnosno glavne komponente (Jolliffe, 2002; Saporta i Niang, 2010).



Slika 20. Prikaz prva dva faktora PCA analize HAE, MAE i SWE ekstrakata svih 7 uzoraka dobričice

Slika 20 prikazuje prva dva faktora PCA analize, koji zajedno opisuju 98,16 % podataka (75,70 % faktor 1; 22,46 % faktor 2). Faktor 1 ima veću značajnost za razlike među uzorcima, što ukazuje na značajnije razlike između uzoraka raspodijeljenih po x-osi. Uzorci su većinom grupirani prema metodama ekstrakcije, pri čemu se SWE ekstrakt uzorka D7 značajno razlikuje od ostalih SWE ekstrakata, što je očekivano s obzirom na odstupanje na NIR spektru (slika 19). MAE i HAE ekstrakti grupirani su vrlo blizu. To potencijalno ukazuje na viši udio i različit sastav polifenolnih spojeva u SWE ekstraktima u odnosu na HAE i MAE ekstrakte. HAE i MAE metoda ekstrakcije provedene su pri sličnim temperaturama (HAE: 100 °C i

MAE: 90 °C), što je potencijalno dovelo do ekstrakcije sličnih polifenolnih spojeva u HAE i MAE ekstraktima. Također, promatrajući pozicije HAE, MAE i SWE ekstrakata uzorka D4 kojem je određen najviši udio ukupnih polifenola, može se uočiti sličnost HAE i MAE ekstrakta koji se nalaze u gornjem lijevom kvadrantu, u odnosu na SWE ekstrakt pozicioniran u donjem desnom kvadrantu. Ovakve razlike potencijalno upućuju na različit sastav polifenolnih spojeva u ekstraktima.

5. ZAKLJUČCI

1. Iako kemijski sastav dobričice značajno ovisi o prirodnom staništu, svi analizirani uzorci pokazali su se bogatim izvorima prehrambenih vlakana, naročito onima netopljivima, i proteinima.
2. Među mineralnim tvarima najzastupljeniji elementi u svim analiziranim uzorcima dobričice bili su K, Ca, Mg, P, Al, Fe i Na.
3. Metoda odzivnih površina i centralno-kompozitni dizajn uspješno su primijenjeni za optimiranje parametara konvencionalne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva potpomognute toplinom, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te ekstrakcije subkritičnom vodom.
4. Eksperimentalne vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata blisko su odgovarale predviđenim vrijednostima što znači da dobiveni matematički modeli na ispravan način opisuju ponašanje ovih parametara u stvarnim sustavima.
5. Optimalni parametri određeni za konvencionalnu ekstrakciju su – 100 °C, 10 min, 1g/100 mL; ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima – 90 °C, 4,93 min, 1g/100 mL i ekstrakciju subkritičnom vodom – 200 °C, 5 min, 1 g/100 mL.
6. Ekstrakcija subkritičnom vodom pod definiranim optimalnim uvjetima rezultirala je ekstraktom s najvišim udjelom ukupnih polifenola i antioksidacijskim kapacitetom, dok se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala najprikladnijom za ekstrakciju ciljanih polifenolnih spojeva: klorogenska, kafeinska i ružmarinska kiselina te rutin.
7. PCA analiza je, na temelju NIR spektara ekstrakata dobričice, grupirala uzorke više prema metodi ekstrakcije, nego prema mjestu sakupljanja - odnosno prirodnom staništu, što znači da na konačan polifenolni profil ekstrakta veći utjecaj ima odabrana metoda ekstrakcije.

6. LITERATURA

- Abbas, Y. i Ahmad, A. (2018) Impact of Processing on Nutritional and Antinutritional Factors of Legumes: a Review. *Annal Food Sci Technol.* **19** (2): 199-215.
- AOAC (1990) Fat (crude) or ether extract in animal feed - AOAC method 920.39. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.
- AOAC (1990) Moisture in animal feed - AOAC method 930.15. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.
- AOAC (2012) Insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods - AOAC- method 2011.25. Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Ireland.
- Arruda, H.S., Pereira, G.A., Pastore, G.M. (2017) Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Anal Methods* **10**:100–110.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426–436.
- Azwanida, N.N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* **4**:3.
- Badr Eldin, A. (2011). Near Infra Red Spectroscopy U: Wide Spectra of Quality Control, (Dr. Isin Akyar, ured.), ISBN: 978-953-307-683-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-qualitycontrol/near-infra-red-spectroscopy>
- Bagade, S.B., Patil, M. (2021) Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review. *Crit Rev Anal Chem* . **51**:2, 138-149.
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., Ghosh, C. (2012) Recent Developments on Polyphenol–Protein Interactions: Effects on Tea and Coffee Taste, Antioxidant Properties and the Digestive System. *Food Funct.* **3**, 592–605.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011) From famine plants to tasty and fragrant spices: Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT - Food Sci. Technol.* **44**: 543-548.

- Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas- Boas, M. Ferreira, I. C. F. R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* **111**, 61-66.
- Baş, D., Boyacı, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78** (3), 836-845.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Bušić, A., Franekić, J., Komes, D. (2013) Phytochemical Attributes of Four Conventionally Extracted Medicinal Plants and Cytotoxic Evaluation of Their Extracts on Human Laryngeal Carcinoma (HEp2) Cells. *J med food.* **17**.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (Galanakis, C. M., ured.), Woodhead Publishing, str. 3-44. ISBN 9780128135723. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>.
- Belščak-Cvitanović, A., Valinger, D., Benković, M., Jurinjak Tušek, A., 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**(3) S2463-S2480.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76** (5), 965-977.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Microwave extraction of bioactive compounds. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (1) 32-47.
- Bittner, L.K., Schönbichler, S.A., Bonn, G.K., Huck, C.W. (2013) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool to Analyze Phenolic Compounds in Plants. *Current Analytical Chemistry.* **9**: 417-423.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**: 25 - 30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and , and nutritional significance. *Nutr Rev.* **56**(11):317-33.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. U: *Methods in Enzymology*, 2.izd. (Packer, L., Glazer, A.N.; ured.), vol. 186. Academic Press, San Diego, CA, str. 343–355.
- Botanički vrt (2021) Croatian Flora. <<https://botanickivrt.biol.pmf.hr/en/croatian-flora/>>. Pristupljeno 31. srpnja 2021.

- Cajner, H. (2011) *Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa* (Doctoral dissertation, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje).
- Calow, G. (2007) Ground-ivy - *Glechoma hederacea*. <https://www.naturespot.org.uk/species/ground-ivy>. Pristupljeno: 20.1.2021.
- Chan, C.-H., Yeoh, H. K., Yusoff, R., Ngoh, G. C. (2016). A first-principles model for plant cell rupture in microwave-assisted extraction of bioactive compounds. *J. Food Eng.*, **188**, 98-107.
- Chao, W.W., Liou, Y.J., Ma, H.T., Chen, Y.H., Chou, S.T. (2020) The Antitumor Mechanism of the Polyphenol-enriched Ethyl Acetate 1 Fraction Extract of *Glechoma hederacea* (*Lamiaceae*) against HepG2 2 Cells Involves Apoptosis Pathways. Research square. DOI: 10.21203/rs.3.rs-117496/v1.
- Chou, S.T., Lin, T.H., Peng, H.Y., Chao, W.W. (2019) Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Scs.* **231**:116519.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Zeković, Z., Jerković, J., Zengin, G., Gašić, U., Đurović, S. (2019). The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* **271**, 328–337.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90** (9): 1631-1639.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2018). “New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents”. *Food Bioprod. Process.* **109**: 52-73.
- Daglia, M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 174–181.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R.T. (2012) Dietary fibre in foods: a review. *J Food Sci Technol.* **49**(3):255–266.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M. (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* **62**, 599–603.
- EFSA (2004) Mišljenje Znanstvenog odbora za kontaminante u prehrambenom lancu Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) na zahtjev Komisije u pogledu žive i metil-žive u hrani (usvojeno 24. veljače 2004.), http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam_opinions/259/opinion_contam_01_en1.pdf.

- Fasolin, L.H., Pereira, R.N., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Andrade, C.C.P., Ramos, O.L., Vicente, A.A. (2019) Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Res Int.* **125**:108586.
- FCD (2018) Vascular Plants Taxonomy and Bibliography of Croatian Flora. FCD - Flora Croatica Database. <<https://hirc.botanic.hr/fcd/>>. Pristupljeno: 31.srpnja 2021.
- Ferreira, S.L., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N. (2007) Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* **597**(2):179-86.
- Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) NIR Analysis of Berry Fruit Extracts. *Food Technol Biotechnol.* **54** (2) 236–242.
- Galan, A.M., Calinescu, I., Trifan, A., Winkworth-Smith, C., Calvo-Carrascal, M., Dodds, C., Binner, E. (2017) New insights into the role of selective and volumetric heating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compounds from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction. *Chemical Engineering and Processing.* DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.cep.2017.03.006>
- Gbashi, S., Adebo, O.A., Piater, L., Madala, N.E., Njobeh, P.B. (2017) Subcritical Water Extraction of Biological Materials. *Sep. Purif. Rev.* **46** (1) 21-34.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev.* **18**:241–272.
- Granado-Casas, M. i Mauricio, D. (2019). Oleic Acid in the Diet and What It Does: Implications for Diabetes and Its Complications. U: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (Watson, R., Preedy, V., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, United States, str. 211-229. Doi:10.1016/B978-0-12-813822-9.00014-X.
- Grlić, L.J. (1980) *Samoniklo jestivo bilje*. Prosvjeta Zagreb, str. 248-249.
- Haghighi Asl, A. and Khajenoori, M. (2013). Subcritical Water Extraction, Mass Transfer. U: *Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling* (Nakajima, H., ured.), IntechOpen, London, United Kingdom. DOI: 10.5772/54993.
- Handa, S. S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D., ured.), ICS-UNIDO, Trieste, Italy, str. 22

- Hollman, P. C. H., Katan, M. B. (1999) Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **37**: 937-942.
- HR EN ISO 12966-2:2017, Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids
- HRN EN ISO 20483:2014 ICC 105/2, Crude Protein – Kjeldahl Method, Boric Acid Modification, AACC Method 46-12, 9. izd., Vol.2.
- Huang, Y., Sheng, J., Yang, F., Hu, Q. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *J. Food Eng.* **78**, 687-692.
- Jokić, S., Aladić, K., Šubarić, D. (2018) Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Annu. Croat. Acad. Eng.* **21**, 247–258.
- Jolliffe, I. T. *Principal Component Analysis*; Springer-Verlag: New York, USA, 2002.
- Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.
- Knez Hrnčič, M., Ivanovski, M., Cör, D., Knez, Ž. (2019) Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An Overview—Phytochemical Profile, Isolation Methods, and Application. *Molecules*. **25** (11).
- Kowalska, G. (2012) The Safety Assessment of Toxic Metals in Commonly Used Herbs, Spices, Tea, and Coffee in Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **18**, 5779.
- Krga, I., Milenkovic, D. (2019) Anthocyanins: From Sources and Bioavailability to Cardiovascular Health Benefits and Molecular Mechanisms of Action. *J. Agric. Food Chem.* **67**: 1771–1783.
- Kumar, N., Goel, N. (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst).* **24**: e00370.
- Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D. (2002) Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia.* **73**, 721-723.
- Leonelli, C., Veronesi, P., Cravotto, G. (2013) Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Food Engineering Series (Hemat F., Cravotto, G., ured.), Springer Science+Business Media, New york, str. 15-53. DOI 10.1007/978-1-4614-4830-3_2.
- Luo, C., Zou, L., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L., Ji, R., Jin, Y., Sun, S. (2020) A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology.* **11**: 153.

- Milovanović, M., Žiković, D., Vučelić Radović, B. (2010) Antioxidant Effects of *Glechoma hederacea* as a Food Additive. *Nat Prod Commun.* **5** (1): 61-63.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta.* **703** (1): 8-18. ISSN 0003-2670.
- Nikolić, T. i Rešetnik, I. (2007) Plant Use sin Croatia. *Phytol Balc.* **13** (2): 229–238.
- Nikolić., T. (2001) The diversity of Croatian vascular flora based on the Checklist and CROFlora database. *Acta Bol. Croat.* **60** (1), 49-67.
- Ough C. S., Amerine M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc. str. 196 – 221.
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Miesbauer, O., Eisner, P. (2021) Article Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules* **26**, 1244.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction, *Food Res Int.* **43** (10): 2341-2348.
- Radojković, M., Moreira, M. M., Soares, C., Barroso, F., Cvetanović, A., Švarc Gajić, J., Morais, S., Delerue-Matos (2018) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Morus nigra* leaves: optimization and characterization of the antioxidant activity and phenolic composition. *J Chem Technol Biotechnol.* **93**: 1684–1693
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. i sur. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal Chem.* **68**: 1033-1039.
- Rodrigues, L.G.G., Mazzutti, S., Siddique, I., da Silva, M., Vitali, L., Salgado Ferreira, S.R. (2020) Subcritical Water Extraction and Microwave-Assisted Extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidocolus aconitifolius* Mill.). *J Supercrit Fluids*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104976>.
- Saini, R.K., Keum, Y.S. (2011) Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.* **203**: 255-267.
- Santos Fernandes, S., Silveira Coelho, M., de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019) Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New. U: Bioactive Compounds - Health Benefits and Potential Applications [online] (Segura Campos, M. R., ured.), Woodhead Publishing,

str. 129-142, ISBN 9780128147740, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00007-4>.

- Saporta, G.; Niang, N. Principal Component Analysis: Application to Statistical Process Control. In *Data Analysis* (Govaert, G., ured.), London, UK, 2010; 1–23.
- Shakeri, A., Soheili, V., Karimi, M., Hosseininia, S.A., Bazzaz, B.S.F. (2018) Biological activities of three natural plant pigments and their health benefits. *J. Food Meas. Charact.* **12**:356–361.
- Sik, B., Lakatos Hanczné, E., Kapcsándi, V., Ajtony, Z. (2020) Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six *Lamiaceae* plants as determined by HPLC-DAD measurement. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **184**, 113-173.
- Sik, B., Hanczné Lakatos, E., Kapcsándi, V., Székelyhidi R., Ajtony, Z. (2021) Investigation of the long-term stability of various tinctures belonging to the lamiaceae family by HPLC and spectrophotometry method. *Chem. Pap.* <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01755-z>
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol.* **299**: 1179.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymol.* **299**: 152.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* **16**: 144 - 158.
- Šircelj, H., Mikulic-Petekovsek, M., Veberič, R., Hudina, M., Slatnar, A. (2018) Lipophilic antioxidants in edible weeds from agricultural areas. *Turk J Agric For.* **42**: 1-10.
- UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani
- Uzel, R.A. (2018) Microwave-Assisted Green Extraction Technology for Sustainable Food Processing. U: *Emerging Microwave Technologies in Industrial, Agricultural, Medical and Food Processing* (Yeow You, K., ured.), IntechOpen, London, United Kingdom, str. 160-178. DOI: 10.5772/intechopen.76140.
- Varga, L., Engel, R., Szabó, K., Abrankó, L., Gosztola, B. Németh, É., Sárosi, S. (2016). Seasonal Variation in Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Glechoma Hederacea* L. Harvested from Six Hungarian Populations. *Acta Aliment.* **45**. 268-276.

- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, A.A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Food Engineering Series (Hemat F., Cravotto, G., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 1-15. DOI 10.1007/978-1-4614-4830-3_2.
- Vinatoru, M., Mason, T., Calinescu, I. (2017) Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials. *Trends Analyt Chem* . 97. 10.1016/j.trac.2017.09.002.
- Vladić, J., Canli, O., Pavlić, B., Zeković, Z., Vidović, S., Kaplan, M. (2017). Optimization of *Satureja montana* subcritical water extraction process and chemical characterization of volatile fraction of extracts. *J Supercrit Fluids*. **120**, 86–94.
- Vulcain, E., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., Dangles, O. (2005) Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. Lipid phase. *Free Radic Res*. **39**, 547–563.
- Xu, C.C., Wang, B., Pu, Y.Q., Tao, J.S., Zhang, T. (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Med.* **15** (10): 721-731.
- Yolmeh, M., Jafari, S. M. (2017) Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioproc Tech*. **10**: 413–433.
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. (2020) Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends Food Sci Technol*. **95**: 183-195.
- Žuna Pfeiffer, T., Krstin, Lj., Špoljarić Maronić, D., Hmura, M., Eržić, I., Bek, N., Stević, F. (2020) An ethnobotanical survey of useful wild plants in the north-eastern part of Croatia (Pannonian region), *Plant Biosyst*. **154**:4, 463-473.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Nataša Boršac

Ime i prezime studenta