

Izolacija bioaktivnih spojeva iz lanene pogače pomoću novih tehnologija i eutektičkih otapala

Rakuljić, Bruna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:452684>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Bruna Rakuljić

751/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ LANENE POGAČE
POMOĆU NOVIH TEHNOLOGIJA
I EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju ulja i masti, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Škevin te uz pomoć dr. sc. Marka Obranovića, višeg asistenta. Diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta broj 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije.

ZAHVALA:

Ovim putem bih se zahvalila svojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Škevin na pruženoj prilici, stručnom vodstvu i brojnim savjetima. Hvala joj na pristupačnosti i uvijek lijepoj riječi podrške. Veliko hvala asistentu dr. sc. Marku Obranoviću na bezbroj savjeta i ustupljenim materijalima kojima mi je znatno olakšao izradu i pisanje ovog rada. Hvala mu na iskazanom povjerenju, izuzetnom strpljenju i razumijevanju te uvijek pozitivnom duhu i prijateljskom okruženju. Zahvaljujem se na razumijevanju, pristupačnosti, prijateljskom okruženju pri radu svim djelatnicima Laboratorija za kemiju i tehnologiju ulja i masti i Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na financijskoj pomoći, razumijevanju i ogromnoj podršci, hvala im što su uvijek bili uz mene bez obzira je li se radilo o teškim ili sretnim trenucima, bez njih sve ovo što sam postigla ne bi bilo ostvarivo. Također, zahvaljujem i svim svojim prijateljima i kolegama na pomoći i prijateljstvu koje je ovo studiranje učinilo još ljepšim.

Veliko HVALA svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LANENE POGAČE POMOĆU NOVIH TEHNOLOGIJA I EUTEKTIČKIH OTAPALA

Bruna Rakuljić 751/PI

Sažetak: Visoka koncentracija nutritivno vrijednih polifenolnih spojeva čine pogaču lana jako dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Cilj ovog rada bilo je izolirati i odrediti bioaktivne spojeve iz pogače lana upotrebom eutektičkih otapala i novih metoda ekstrakcije, kao bržih i ekološki prihvatljivijih postupaka. Kao najoptimalnije eutektičko otapalo pokazao se kolin klorid:urea:glicerol, a najveći udio fenolnih spojeva je ekstrahirano kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Mikrovalnom ekstrakcijom detektirani su: sekoizolarikirezinol-diglukozid (SDG) (2.35 mg g^{-1}), glukozid *p*-kumarinske kiseline (GPK) (4.13 mg g^{-1}) te glukozid ferulinske kiseline (GFK) (1.94 mg g^{-1}). Uz mikrovalno-ultrazvučno potpomognutu ekstrakciju, maksimalne izolirane koncentracije za SDG bile su 3.25 mg g^{-1} , za GPK 4.34 mg g^{-1} i GFK 2.35 mg g^{-1} , odnosno uspješno je ekstrahirano 15 % SDG-a, 42 % GPK-a te 45 % GFK-a u odnosu na koncentracije dobivene referentnom metodom, ali uz značajno kraće vrijeme trajanja procesa ekstrakcije. Potrebna su daljnja istraživanja u svrhu odabira najpogodnijeg eutektičkog otapala i optimiranja procesa ekstrakcije.

Ključne riječi: lanena pogača, sekoizolarikirezinol-diglukozid, fenolne kiseline, eutektička otapala, Mikrovalno-ultrazvučna ekstrakcija

Rad sadrži: 56 stranica, 21 sliku, 6 tablica, 72 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Dubravka Škevin

Pomoć pri izradi: dr.sc. Marko Obranović, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Radovniković
2. Prof.dr.sc. Dubravka Škevin
3. Doc.dr.sc. Klara Kraljić
4. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj(zamjena)

Datum obrane: 29.rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FLAXSEED CAKE WITH NOVEL METHOD AND EUTECTIC SOLVENTS

Bruna Rakuljić 751/PI

Abstract: High concentrations of bioactive polyphenolic compounds make flaxseed cake very good raw material for their extraction. The aim of this paper was to isolate and determine bioactive compounds from flaxseed cake using eutectic solvents and new extraction methods as faster and more environmentally friendly methods. Choline chloride: urea: glycerol was found as the most optimal eutectic solvent, and the higher yield of the phenolic compounds were extracted by a combination of microwaves and ultrasound. Using only microwave extraction the highest obtained results were: secoizolariciresinol-diglucoside (SDG) (2.35 mg g^{-1}), *p*-coumaric acid glucoside (GPK) (4.13 mg g^{-1}) and ferulic acid glucoside (GFK) (1.94 mg g^{-1}). With ultrasonic microwave-assisted extraction the maximum isolated concentration of SDG was 3.25 mg g^{-1} , GPK 4.34 mg g^{-1} and GFK 2.35 mg g^{-1} . Compared with reference method, 15% SDG was successfully extracted, 42% of GPK and 46% of GFK, but with significantly shorter processing time. Further research is required to select the most suitable eutectic solvent and optimize the extraction process.

Keywords: flaxseed cake, secoizolariciresinol diglucoside, phenolic acid, deep eutectic solvents, ultrasonic-microwave assisted extraction

Thesis contains: 56 pages, 21 figures, 6 tables, 72 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. Dubravka Škevin, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Marko Obranović, senior assistant

Reviewers:

1. PhD. Ivana Radojčić Radovniković, Full professor
2. PhD. Dubravka Škevin, Full professor
3. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
4. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 29th 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LAN I LANENO ULJE	2
2.2. POGAČA LANA	4
2.3. FENOLNI SPOJEVI LANENE POGAČE	5
2.3.1. Lignani i fenolne kiseline	6
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ POGAČE LANA	9
2.5. PRIMJENA NOVIH METODA EKSTRAKCIJE	10
2.6. EUTEKTIČKA OTAPALA	12
2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorci	17
3.1.2. Reagensi i standardi	17
3.1.3. Aparatura	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva na tresilici	19
3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru	20
3.2.3. Plan pokusa za ekstrakciju fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru	20
3.2.4. Određivanje sastava lignana i fenolnih spojeva lanene pogače	23
3.2.5. Statistika	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA NA TRESILICI I ODABIR EUTEKTIČKIH OTAPALA ..	25
4.2. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	28
4.2.1. Odabir udjela NaOH	29
4.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva pogače lana potpomognuta mikrovalovima	30
4.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova	38
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Lan je najstarija kultivirana tekstilna biljka i smatra se jednom od najstarijih svjetskih kultiviranih uljarskih usjeva s tradicijom starom preko 5000 godina. Komercijalno se uzgaja zbog proizvodnje sjemena, ulja i vlakana. Plod biljke lana je sjeme, koje zbog kemijskog sastava ulja, ali i fenolnih spojeva ima izuzetno vrijedna biološka i nutritivna svojstva. Ulje sjemena lana je jedan od najboljih prirodnih izvora esencijalne α -linolenske masne kiseline, s udjelom najčešće iznad 50 % po čemu se izdvaja od drugih komercijalnih ulja. Pri proizvodnji lanenog ulja kao nusproizvod se dobije pogača koja sadrži veliki udio fenolnih spojeva, koji se zbog svoje hidrofilnosti izrazito slabo otapaju u ulju te zaostaju u pogači.

Pogača se nekad smatrala beskorisnim otpadom te koristila samo kao stočna hrana, dok danas postoji veliki interes njezine upotrebe. Visoke koncentracije fenolnih spojeva, prvenstveno lignana sekoizolarikirezinol-diglukozid (SDG) i fenolnih kiselina čine pogaču lana jako dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Lignani su u sjemenju lana prisutni u daleko većoj koncentraciji nego u bilo kojoj drugoj namirnici, a mnogobrojna istraživanja dokazala su njihova antioksidacijska, antitumorska, antibakterijska te antivirusna svojstva.

Ekstrakcija fenolnih spojeva najčešće se provodi upotrebom organskih otapala, no u novije vrijeme je njihov štetan utjecaj na okoliš i zdravlje ljudi potakao razvoj i istraživanje alternativnih metoda ekstrakcije, kojima je osnova sinteza i primjena zelenih otapala među koja spadaju i eutektička otapala (DES), kao brži i ekološki prihvatljiviji postupak. Još jedan od principa zelene kemije je smanjenje utroška energije zbog čega se sve više primjenjuju nove metode ekstrakcije, mikrovalovi i ultrazvuk, te njihove kombinacije zbog jednostavnosti, brže provedbe postupka i izolacije većih količina spojeva.

U ovom radu odredit će se udjeli fenolnih spojeva, prvenstveno lignana SDG-a i fenolnih kiselina iz laboratorijski proizvedene lanene pogače uz pomoć novih metoda ekstrakcije, mikrovalova i ultrazvuka, te kombinacije tih dviju tehnika. Također, cilj istraživanja je ispitati mogućnost izolacije fenolnih spojeva upotrebom različitih eutektičkih otapala. Krajnji cilj će biti odrediti najpogodnije otapalo i optimalne parametre izolacije fenolnih spojeva iz lanene pogače u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LAN I LANENO ULJE

Lan (*Linum usitatissimum*L.) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Linacea, rodu Linum, s više od 200 različitih vrsta, koje se pretežito javljaju u umjerenom i subtropskom području sjeverne hemisfere, a manje u južnoj hemisferi. Većinom su divlje vrste, tek nekoliko ih se uzgaja kao ukrasne biljke (Pospišil, 2013). Prije više od 60 godina, prosječna svjetska proizvodnja lana je bila oko 3.4 mil. tona, što je bilo više od suncokreta (2.5 mil. t) i nešto manje od uljane repice (3.8 mil. t). Od tada, svjetska proizvodnja lana varira između 2 i 3 mil. tona, dok je proizvodnja ostalih uljarica znatno porasla (Przybylski, 2005). Trenutno, sorte uljanog lana se prvenstveno uzgajaju u Kanadi, Kini, SAD-u, Indiji i Rusiji. Kanada je najveći svjetski proizvođač i izvoznik lanenog sjemena, izvozi 80-90 % od ukupne proizvodnje lanenog sjemenja, a minimalnu količinu sjemenja koriste za proizvodnju lanenog ulja (Hall i sur., 2016; Przybylski, 2005).



Slika 1. Lan (*Linum usitatissimum* L.) (Anonymous 1, 2017)

U početku, ista vrsta lana koristila se za proizvodnju ulja i tekstilnih vlakana dok se danas razlikuju uljane i tekstilne sorte lana koje su specijalno prilagođene krajnjoj namjeni (Przybylski, 2005), te se znatno razlikuju po lokaciji proizvodnje, klimatskim uvjetima uzgoja te morfologiji (Hall i sur., 2016). Uljani lan u Hrvatskoj nije imao do sada neku tradicionalnu i stabilnu proizvodnju. Za razliku od njega, predivi lan se tradicionalno uzgajao na području gotovo čitave Hrvatske (Šimić, 2008).

U posljednje vrijeme pokazan je sve veći interes za lan kao atraktivnu nutritivnu namirnicu zbog izuzetno visokog udjela biološki aktivnih komponenti, kao što su α -linolenska masna kiselina, prehrambena vlakna, visoko kvalitetni proteini, fitoestrogeni lignani i niz drugih antioksidanasa, koji pokazuju brojne prednosti za ljudsko zdravlje (Punia i Raba, 2016).

Sjeme lana sadrži prosječno 30-40 % ulja, 20-25 % proteina, 20-28 % prehrambenih vlakana, 4-8 % vlage, 3-4 % pepela. Ulje sjemena lana sadrži oko 73 % polinezasićenih masnih kiselina, te je jedan od najbogatijih prehrambenih izvora esencijalne α -linolenske masne kiseline (Herchi i sur., 2012; Sharav i sur., 2013). Laneno ulje se može dobiti hladnim prešanjem te se ono koristi u prehrambene svrhe, ili ekstrakcijom uz pomoć organskih otapala koje se koristi u neprehrambene industrijske svrhe, pri proizvodnji boja, lakova i linoleuma (Hall i sur., 2016). Laneno ulje je ulje dobiveno iz sjemenki lana (*Linum usitatissimum L.*), a svo ulje za prehranu ljudi na Hrvatskom tržištu spada u kategoriju hladno prešanih ulja. Prema pravilniku o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2012), hladno prešana jestiva ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranje, filtriranje i centrifugiranje.

Nusproizvod koji se dobije prilikom izdvajanja ulja iz sjemenki lana je lanena pogača. Pogača lana predstavlja jeftinu sirovinu za izolaciju fenolnih spojeva, posebice lignana čija se važnost očituje u njihovoj biološkoj aktivnosti kao što su npr. antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Cijela biljka lana pa tako i pogača lana mogla bi se koristiti kao obnovljivi izvor tekstilnih vlakana, jestivog ulja i antioksidanasa (Pag i sur., 2014). Hano i suradnici (2017) utvrdili su da je lignan sekoizolarikirezinol (SECO), koji se u velikim količinama može izdvojiti iz pogače lana, učinkovitiji antioksidans od α -tokoferola i sintetskih antioksidanasa (BHA), te zbog toga može uspješno zamijeniti sintetske antioksidanse koji se koriste u hrani i kozmetici.

2.2. POGAČA LANA

Pogača lana predstavlja jeftinu sirovinu koja se uglavnom koristi kao hrana za domaće životinje (svinje, piletinu, goveda). Osim kao stočna hrana, ima veliki potencijal da se koristi i u prehrani ljudi (žitarice za doručak, energetske pločice, palačinke, vafli te crni kruh), zbog visokog udjela nutritivno vrijednih sastojaka, kao što su polifenoli (lignani i fenolne kiseline), proteini, vlakna te polinezasićene masne kiseline (Ogunronbi i sur., 2011).

Uljne pogače, kao i pogača lana nastaju prilikom procesa prešanja odnosno izdvajanja ulja iz sjemenja, te sadrže relativno nizak udio zaostalog ulja i druge vrijedne hranjive sastojke koji se zbog svoje hidrofilnosti odnosno polarnosti ne otapaju i izdvajaju s uljem već zaostaju u pogači. Prosječni kemijski sastav pogače lana prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav lanene pogače (Gutierrez i sur., 2010)

Sastav lanene pogače	Udio (%)
Ulje	29
Proteini	28
Ugljikohidrati	22
Vlaga	11
Vlakna	7
Pepeo	3

Ukupni udio vlakana u sjemenu lana iznosi prosječno 28 %, a dijele se na topljiva vlakna koja čine sluzi (oko 1/3 ukupnih vlakana) i netopljiva vlakna u koja spadaju celuloza i lignini te čine 2/3 ukupnih vlakana sjemenja. Lignan SDG je fenolni spoj koji je u sjemenu lana povezan u strukturu lignina (Moris i Vaisey-Genser, 2003) i čini građevnu jedinicu ovojnice lanenog sjemenja, te se zbog svoje polarnosti većim dijelom zadržava u pogači prilikom izdvajanja ulja (Hano i sur., 2017). Biljna hrana općenito može sadržavati oko 0.02 mg lignana po gramu prehrambenog proizvoda, dok sjemenke lana mogu sadržavati i preko 3 mg g⁻¹ lignana (Nemes i Orsat, 2012). Ukupni udio lignana u sjemenu lana iznosi prosječno oko 3.8 mg g⁻¹. Za usporedbu, drugi najveći izvor lignana je sezam, s ukupnim udjelom od 0.4 mg g⁻¹, ali se lignani sezama razlikuju od onih u lanu (Landente, 2012).

2.3. FENOLNI SPOJEVI LANENE POGAČE

Veliki udio esencijalne omega-3 α -linolenske masne kiseline, vlakana i fenolnih spojeva, prvenstveno lignana SDG-a čine sjeme lana vrlo važnim u prevenciji mnogih bolesti te promociji zdravlja ljudi (Bravi i sur., 2011), te se zbog prisutnosti tih bioaktivnih komponenti laneno sjeme smatra funkcionalnom hranom (Kajla i sur., 2014). U ulju dobivenom iz lana se ekstrahira većina masnih kiselina i samo manji dio fenolnih spojeva, primarno zbog njihove hidrofilnosti (Obranović, 2015).

Fenoli predstavljaju grupu polarnih spojeva koji sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten te se u hrani nalaze u slobodnom obliku ili vezani na neke njene komponente, zbog prirode njihove kemijske strukture. Fenolni spojevi u sjemenju lana se nalaze prvenstveno u glukozidnom obliku, povezani s jednom ili više šećernih jedinica (najčešće glukozom) ili u esterski vezanom obliku (Alu'datt i sur., 2017). Tako SDG u lanu tvori oligomere s 3-hidroksi-3-metilglutarnom kiselinom preko esterskih veza (Eliasson i sur., 2003).

Fenolni spojevi ili polifenoli, su sekundarni biljni metaboliti koji, osim što imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, su i jedni od glavnih pomoćnika u zaštiti protiv parazita, patogena i predatora (Wang i sur., 2016). Dokazano je da prisutnost širokog raspona fenolnih spojeva (poznato je preko 8000 različitih struktura) u uljaricama doprinosi njihovim terapijskim svojstvima, uključujući antivirusnu, protuupalnu, antioksidativnu, antikancerogenu i hipoglikemijsku aktivnost. Istraživanje je pokazalo da je ukupni udio fenolnih spojeva u lanenom sjemenu 8-10 g kg⁻¹, a esterificirane fenolne kiseline obuhvaćaju 48-66 % ukupnih fenolnih spojeva (Alu'datt i sur., 2017).

Polifenolni profil pojedinih biljaka se znatno razlikuje čak i kod sorata iste vrste (Bravo, 1998). Sastav i udio fenola u lanenom sjemenu ovisi o agronomskim i tehnološkim čimbenicima, kao što su sorta, područje uzgoja, klima, količina padalina, omjer uzorak/otapalo, priroda samog uzorka, vrijeme ekstrakcije, te o svojstvima korištenog otapala za ekstrakciju (Alu'datt, 2013).

Lanene sjemenke uglavnom sadrže tri različite vrste fenolnih spojeva:

- flavonoide koji nastaju povezivanjem više od jedne fenilpropanoidne jedinice,
- lignane
- fenolne kiseline koji spadaju u skupinu neflavonoida (Punia i Raba, 2016; Alu'datt i sur., 2017).

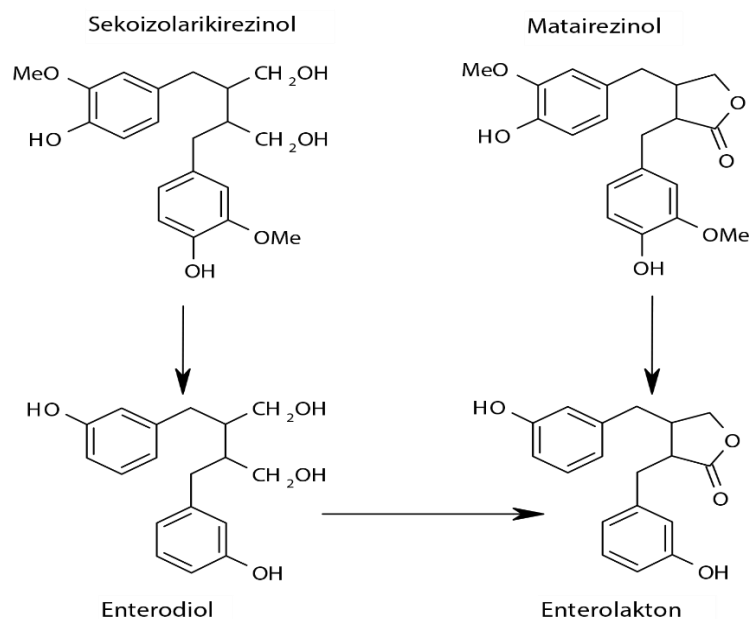
Ukupni sadržaj flavonoida u sjemenju lana varira između 0.35-0.71 mg g⁻¹, a flavon-C i flavon O-glikozid su njihovi glavni predstavnici (Herchi i sur., 2014). Lanene sjemenke su najbolji izvor fitoestrogena lignana, koji nastaju kondenzacijom dvije fenilpropanoidne jedinice povezane preko središnjeg ugljika svakog pokrajnjeg lanca na stanične stijenke biljaka (Alu'datt i sur., 2017).

2.3.1. Lignani i fenolne kiseline

Laneno sjeme poznato je kao najbolji prirodni izvor lignana s vrijednostima 75 - 800 puta većim nego u drugim uljaricama, žitaricama, voću ili povrću. Potencijalno dio lignana prelazi iz sjemena u ulje, a veći dio se zadržava u lanenoj pogači zbog svoje hidrofilnosti (Przybylski, 2005). Dokazano je da je sadržaj SDG-a u svježem lanenom ulju do tisuću puta manji od koncentracije koja se nalazi u sjemenu, što se može lako opravdati s obzirom na polaritet molekule SDG-a (Bravi i sur., 2011). Kajla i suradnici (2014) navode da je udio SDG-a u odmašćenoj pogači 11.7 - 24.1 mg g⁻¹, dok je njegov udio u samljevenim sjemenkama lana manji te iznosi 6.1 - 13.3 mg g⁻¹. Alu'datt i suradnici (2017) navode da je prosječni udio lignana u pogači lana od 1-4 %.

Lignani su u širokom rasponu prisutni u namirnicama, kao što su sjemenke lana i drugo sjemenje, žitarice (pšenica, ječam, zob), povrće (brokula, češnjak, šparoge, mrkva), voće (bobičasto) te u pićima poput kave, čaja i vina (Kajla i sur., 2014), u obliku aglikona, glukoziida, esterificiranih glukoziida ili bio-oligomera (Gerstenmeyer, 2013). Po kemijskoj strukturi lignani su spojevi sa dibenzilbutanskim kosturom (Przybylski, 2005) koji su strukturno slični steroidnim estrogenima (17β-estrodolu) te se ubrajaju u fitoestrogene, za koje se smatra da pokazuju estrogenu i antiestrogenu aktivnost kod sisavaca (Mason i sur., 2014).

Biolška vrijednost lignana povezana je s njihovom bioaktivacijom. Unosom u organizam hranom, lignani se u crijevima uz pomoć prirodno prisutne mikroflore pretvaraju u enterolaktone (lignani sisavaca) enterolakton i enterodiol (slika 2), koji imaju blagotvoran učinak na zdravlje ljudi zbog svojih protuupalnih, antioksidativnih, (protu)estrogenih, antimikrobnih, antivirusnih, antibakterijskih, antifungalnih učinaka te smanjuju rizik od nekih kardiovaskularnih i kancerogenih oboljenja (Przybylski, 2005; Landete, 2012).



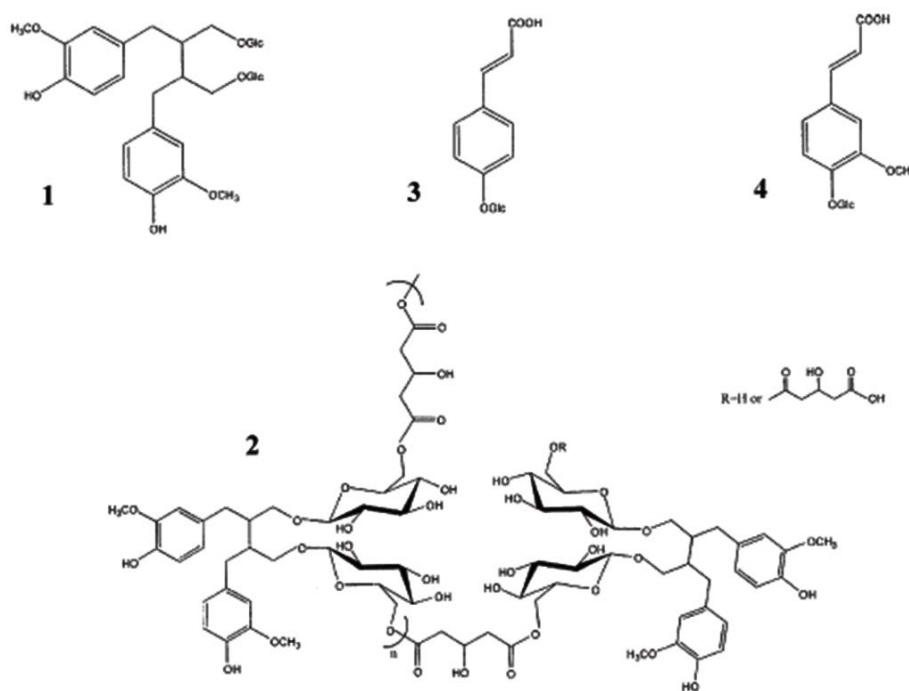
Slika 2. Metabolička pretvorba lignana sekoizolarikirezinola i matairezinola u enterodiol i enterolakton pomoću crijevne mikroflore (Johnsson, 2004)

Dominantan lignan u lanenom sjemenu je sekoizolarikirezinol (SECO), a nalazi se najčešće u obliku sekoizolarikirezinol – diglukozida (SDG) (Landete, 2012), te najčešće čini 95 % ukupnih lignana sjemenja (Mason i sur., 2014). SDG se nalazi u vanjskoj ljusci sjemenja, u znatno većem udjelu nego u cijelom sjemenu (Struijs i sur., 2009), a kao produkt njegove kiselinske hidrolize nastaje aglikonski oblik SECO (Kajla i sur., 2014).

SDG se često prikazuju u nevezanoj formi, ali u sjemenu lana je dio oligomerne strukture koja se naziva lignan makromolekula ili lignan kompleks (slika 3), esterski povezan s 3-hidroksi-3-metilglutarnom kiselinom (HMGA). Također, flavonoid herbacetin diglukozid (HDG), glukozid *p*-kumariske kiseline (GPK) i glukozid ferulinske kiseline (GFK) su dio lignan makromolekule (Struijs i sur., 2009). Alkalnom hidrolizom SDG oligomera, molekulske mase i do 4000, oslobađaju se SDG, GPK i GFK (Li i sur., 2008), a dodatna enzimaska ili kiselinska hidroliza je potrebna za dobivanje slobodnog aglikona SECO od glukozida SDG-a (Nemes i Orsat, 2012).

Druga najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u sjemenu lana su fenolne kiseline, njihov udio iznosi 8-10 g kg⁻¹ sjemenja (Herchi i sur., 2014), a nalaze se vezane esterskim ili eterskim vezama u glukozide (Barthet i sur., 2014). Esterificiranih fenolnih kiselina može biti 3-5 g kg⁻¹ sjemenja (Herchi i sur., 2014).

Fenolne kiseline se mogu svrstati u dvije glavne skupine, derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Glavne fenolne kiseline u sjemenu lana su derivati hidroksicimetne kiseline, među koje spadaju ferulinska kiselina (38.8 - 51.2 $\mu\text{g g}^{-1}$), *p*-kumarinska kiselina (14.7 - 17.8 $\mu\text{g g}^{-1}$) te kavaska kiselina (5.7 - 6.8 $\mu\text{g g}^{-1}$). One se nalaze uglavnom u vezanoj formi, vezane esterskim vezama sa strukturnim komponentama stanične stjenke, pa se tako ferulinska kiselina nalazi 78.9 - 93.0 %, *p*-kumarinska 70.8 - 85.5 % a kavaska 64.5 % u vezanom obliku. Od ostalih kiselina pronađene su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska i sinapinska, u slobodnom ili esterski vezanom obliku (Wang i sur., 2016). Fenolne kiseline imaju antioksidativno djelovanje koje se često odnosi na distribuciju hidroksilne skupine u prstenu (Berthet i sur., 2014). Razlike u sastavu fenolnih kiselina se mogu pripisati različitim sortama lana, uvjetima uzgoja te razlikama u otapalima korištenim pri ekstrakciji (Wang i sur., 2016).



Slika 3. Struktura SDG-a (1), SDG-HMG kompleksa (2), GPK (3) i GFK (4) (Beejmohun i sur., 2007).

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ POGAČE LANA

Ekstrakcija je jedna od najstarijih poznatih kemijskih postupaka i predstavlja prvi korak neophodan za izolaciju, identifikaciju, analizu i iskorištenje biološki aktivnih spojeva, kao što su fenolne tvari iz biljnih materijala (Roohinejad i sur., 2016; Zhang i sur., 2013).

Postupak ekstrakcije predstavlja kritičan korak pri izolaciji ciljanih, biološki aktivnih spojeva te je za svaku biljnu vrstu od ključne važnosti odabrati učinkoviti postupak odnosno prikladnu metodu i optimizirati uvjete same ekstrakcije, pri kojima se održava stabilnost fenolnih spojeva te postiže maksimalni ekstrakcijski kapacitet. Pri tome je važno uzeti u obzir prirodu biljnog materijala (kemijski sastav i fizikalne karakteristike uzorka), ali i prirodu samih spojeva odnosno njihovu lipofilnost/hidrofilnost te prema tome odabrati otapalo odgovarajuće polarnosti. Osim toga, efikasnost ekstrakcije ovisi i o vremenu i temperaturi ekstrakcije te omjeru uzorka i otapala (Dai i Mumper, 2010).

Ekstrakcija otapalima je postupak koji se najčešće koristi u pripremi biljnih ekstrakata zbog jednostavnosti, učinkovitosti i širokog spektra primjenjivosti. Zbog svoje polarnosti fenolni spojevi imaju mogućnost otapanja u vodeno-alkoholnim smjesama tako da su najčešće u upotrebi metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihove kombinacije, često pomiješani s vodom u različitim omjerima (Dai i Mumper, 2010).

Tradicionalne (klasične, konvencionalne) metode ekstrakcije otapalima su dugotrajne, zahtjevne, koriste velike količine skupih i ekološki neprihvatljivih, opasnih organskih otapala zbog čega su potencijalno štetne za okoliš, zahtijevaju pretjerane troškove zbrinjavanja, mogu izazvati termosenzibilne degradacije te pokazuju nisku učinkovitost (Roohinejad i sur., 2016).

Zbog svih navedenih razloga, u posljednjih nekoliko godina razvijene su i uspješno se primjenjuju nove metode ekstrakcije iz biljnih materijala u svrhu smanjenja vremena ekstrakcije i smanjenja volumena korištenog otapala, uz istovremeno zadržavanje poželjne kemijske strukture i biološke aktivnosti određenog fenolnog spoja, te da bi se smanjili troškovi izolacije spojeva i ubrzali procesi ekstrakcije pred tradicionalnim metodama (Fontana i sur., 2013). Općenito se „zelena ekstrakcija“ temelji na otkriću i konstrukciji ekstrakcijskih procesa koji bi smanjili potrošnju energije te koji dopuštaju upotrebu alternativnih otapala i osiguravaju siguran i kvalitetan ekstrakt/proizvod. Rastuće područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija posvećeno je oblikovanju novih, ekološki prihvatljivih otapala kao obećavajuće alternative tradicionalnim organskim otapalima (Chemat i sur., 2012), kao što su primjerice superkritični CO₂ i u posljednjih desetak godina sve popularnije ionske tekućine te eutektička otapala (Zhang i sur., 2012).

2.5. PRIMJENA NOVIH METODA EKSTRAKCIJE

Nove alternativne metode ekstrakcije u ovom slučaju podrazumijevaju ekstrakciju potpomognutu energijom mikrovalova, te kombinaciju mikrovalova i ultrazvuka.

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (MAE) jedna je od novih, ekoloških metoda ekstrakcije koja se naširoko koristi u analizi i ekstrakciji bioaktivnih komponenata iz prirodnih proizvoda. Glavne prednosti ove metode su znatno smanjenje vremena trajanja ekstrakcije, smanjena uporaba otapala i povećanje iskorištenja procesa te donekle selektivna ekstrakcija i niži troškovi u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom (Roohinejad i sur., 2016; Zhou i sur., 2011).

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva oscilirajuća okomita polja: električnog i magnetskog. Energija mikrovalova je neionizirajuće elektromagnetsko zračenje frekvencije u rasponu 1-300 GHz odnosno između X-zraka i infracrvenog zračenja u elektromagnetskom spektru (Mandal i sur, 2007). U suvremenoj znanosti mikrovalovi se mogu koristiti za dvije osnovne svrhe: kao nosioci informacija ili kao energetske vektori. Uloga mikrovalova kao energijskih vektora je izravno djelovanje na materiju koja ima sposobnost dio apsorbirane elektromagnetske energije transformirati u toplinu. Sam princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na izravnom utjecaju na polarne molekule ciljanog materijala ili otapala, a transformacija elektromagnetske energije u toplinu se odvija kroz dva mehanizma: ionskom kondukcijom i rotacijom dipola u otapalu i matriksu uzorka (Mandal i sur, 2007). Dolazi do jednakomjernog zagrijavanja cijelog volumena otapala i uzorka, što posljedično dovodi do širenja i pucanja staničnih stjenki i otpuštanja bioaktivnih komponenata u otapalo (Teh i sur, 2015).

U slučaju mikrovalne ekstrakcije biljnog materijala, učinak energije mikrovalova u najvećoj mjeri ovisi o prirodi otapala i matriksa uzorka te o temperaturi. Izbor otapala ovisi o topljivosti ciljanih komponenti i o interakcijama između otapala i biljnog materijala, ali također i o sposobnosti apsorpcije energije mikrovalova što diktira dielektrična konstanta otapala. U većini slučajeva, odabrano otapalo ima visoku dielektričnu konstantu što mu omogućuje da snažno apsorbira energiju mikrovalova. MAE se obično provodi sa istim otapalima kao i tradicionalna ekstrakcija, najčešće s polarnim otapalima kao što su metanol, etanol i voda koji se dobro zagrijavaju energijom mikrovalova (Wang i Weller, 2006). Temperatura je važan parametar za sve tipove ekstrakcija koji doprinosi poboljšanom učinku ekstrakcije. Međutim, kod ekstrakcije termo-labilnih sastojaka povećane temperature mogu dovesti do degradacije. Osim otapala i temperature, mikrovalna ekstrakcija je određena

frekvencijom i snagom mikrovalova, vremenom trajanja procesa ekstrakcije, količinom vode u uzorku i veličinom čestica biljnog materijala, tlakom i brojem ekstrakcijskih ponavljanja (Wang i Weller, 2006).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE) bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala predstavlja inovativnu i obećavajuću metodu ekstrakcije te je jedna od metoda zelene ekstrakcije, kao i MAE, koja omogućuje povećanje prinosa ekstrakcije uz visoku kvalitetu proizvoda te smanjenje potrebnog vremena ekstrakcije koji rezultiraju uštedom energije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Ostale prednosti su jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Ultrazvuk je mehanički val koji se prenosi putem elastičnog medija, frekvencije raspona od 20-100 kHz (Cravotto i Cintas, 2007). Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, točnije stanične stjenke biljke, dovodi do njihovog oštećenja čime se poboljšava prijenos mase i olakšava pristup otapala staničnom sadržaju rezultirajući ubrzanjem ekstrakcije te većim prinosima, odnosno povećanom efikasnošću ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Učinak ultrazvuka je puno korisniji pri nižim frekvencijama (18-40 kHz), dok je praktično zanemariv u rasponu od 400-800 kHz, jer kod nižih frekvencija dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije kao što su turbulencija i strujanje tekućine (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Najvažniji parametri koji utječu na ultrazvučnu ekstrakciju su vrijeme trajanja procesa, primijenjena frekvencija, valna duljina i intenzitet ultrazvuka, odabir otapala odnosno topljivost ciljanih komponenti u primijenjenom otapalu, temperatura te prisutnost otopljenih plinova. S ciljem povećanja stupnja iskorištenja, ultrazvuk se može primjenjivati u kombinaciji s mikrovalovima, te u sklopu zelene tehnologije ekstrakcije zajedno s ekološki prihvatljivim otapalima se može koristiti u raznim područjima (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Wang i Weller, 2006). Primjena ultrazvuka je ranije bila uglavnom ograničena na postupke čišćenja i emulgiranja dok se danas otkrivaju prednosti upotrebe ultrazvuka na različita područja, poput ekstrakcije, sušenja, kristalizacije, filtracije, zamrzavanja, homogenizacije, sterilizacije i degradacije (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

2.6. EUTEKTIČKA OTAPALA

Danas u industriji parfema, kozmetike, lijekova, hrane, bio-goriva ili finih kemikalija nema industrijskog procesa koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije u kojoj se upotrebljavaju hlapljiva organska otapala (Chemat i sur., 2012). Procjenjuje se da hlapiva organska otapala čine gotovo 60% svih industrijskih emisija širom svijeta (Cvjetko Bubalo i sur., 2015), uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš. Prema tome, rastuće područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija posvećeno je izradi novih, ekološki prihvatljivih i prilagodljivih zelenih otapala za zamjenu tradicionalnih opasnih otapala koje se opsežno koriste u industriji (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Zainal Abidin i sur., 2017).

U okviru zelene kemije, otapala zauzimaju strateško mjesto. Prema smjernicama zelene kemije, idealno otapalo treba zadovoljiti određene kriterije kao što su dostupnost, niska cijena, ne-toksičnost, nezapaljivost, biorazgradivost i mala hlapivost, te je poželjno da bude kemijski i fizički stabilno, jednostavno za upotrebu i recikliranje te mogućnost sinteze ekološki prihvatljivim metodama (Zhang i sur., 2012; Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Novu generaciju nehlapljivih i stabilnih zelenih otapala čine ionske tekućine i eutektička otapala, te se posljednjih godina intenzivno proučavaju kao zamjena za tradicionalna škodljiva otapala u različitim područjima industrije (Dai i sur., 2013a).

Prva istraživanja bila su usmjerena na primjenu ionskih tekućina (eng. Ionic Liquids, ILs) zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava. Ionske tekućine su organske soli sastavljene isključivo od iona, odnosno soli u tekućem stanju čija je točka taljenja niža od 100 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). IL se mogu reciklirati zbog niskog tlaka pare i visoke točke ključanja (Tang i sur., 2014), te pokazuju atraktivna svojstva kao što su visoka toplinska i kemijska stabilnosti, nezapaljivost (Zainal Abidin i sur., 2017), zanemariva hlapivost pri sobnoj temperaturi te podesiva fizikalno-kemijska svojstva koja im daju sposobnost otapanja spojeva širokog spektra polarnosti (Dai i sur., 2013b). Međutim, posljednja istraživanja pokazuju brojna ograničenja primjene IL-ova, kao što su toksičnost, slaba biorazgradivost i visoki troškovi njihove sinteze (Tang i sur., 2014), te da bi se prevladala ta ograničenja, na početku stoljeća dolazi do razvoja nove generacije otapala pod nazivom eutektička otapala kao alternative za ionske tekućine (Zhang i sur., 2012).

Kao „zelenija verzija“ ionskih tekućina, eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) zbog prilagodljivost svojih svojstava odabirom polaznih sirovina, privukla su pozornost u organskoj sintezi, katalizi, biokatalizi, proizvodnji polimera i nanomaterijala, elektrokemiji,

biomedicini, separacijskim postupcima, te se sve više istražuju u cilju ekstrakcije biološki aktivnih spojeva različite polarnosti iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

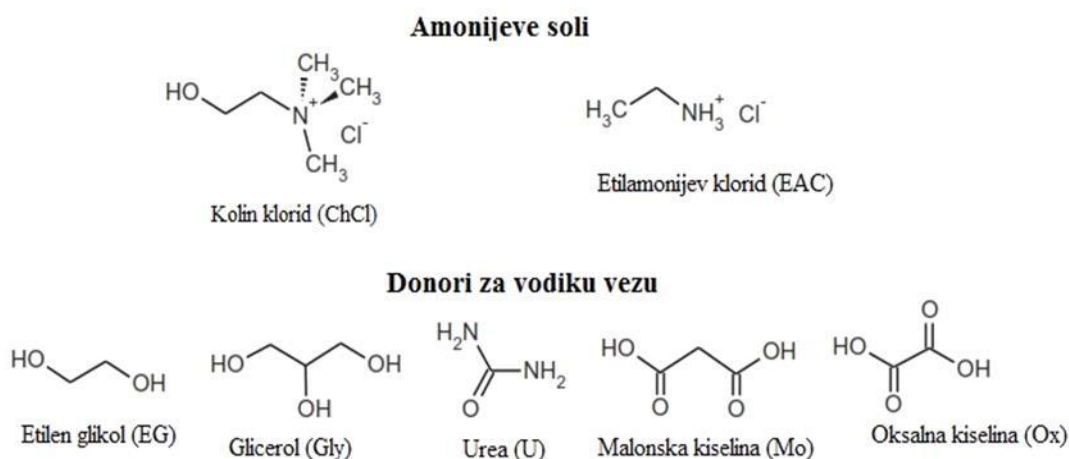
Danas su eutektička otapala poznata kao nova, četvrta generacija ionskih tekućina zbog mnogih zajedničkih fizikalno-kemijskih svojstava, no ipak treba istaknuti da su to zapravo dvije različite vrste alternativnih otapala (Paiva i sur., 2014). U odnosu na konvencionalne ionske tekućine, eutektička otapala imaju veću prednost: jeftina i jednostavna su za pripremu i skladištenje te su biorazgradiva, netoksična i sigurna za okoliš (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Zainal Abidin i sur., 2017).

DES je tekućina koja se sastoji do dvije ili više jeftinih i sigurnih komponenata u tekućem ili krutom stanju, koje su se sposobne međusobno povezati preko vodikovih veza, kako bi formirale eutektičko otapalo. Dobivena smjesa ima niže talište od točke tališta svake pojedine komponente zbog delokalizacije naboja (Zhang i sur., 2012). U tablici 2. prikazane su vrste eutektičkih otapala (Smith i sur., 2014).

Tablica 2. Tipovi eutektičnih otapala (Smith i sur., 2014)

TIP	OPIS	PRIMJER
I	Kombinacija metala i organske soli	ZnCl ₂ + kolin klorid
II	Kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	CoCl ₂ x6H ₂ O + kolin klorid
III	Kombinacija donora vodikove veze i organske soli	Urea + kolin klorid
IV	Kombinacija metalnog klorida sa donorom vodikove veze	MCl _x + urea/etilen glikol

Eutektička otapala obično se dobivaju miješanjem nabijenog akceptora vodika (najčešće organska amonijeva sol) sa metalnim solima ili donorima vodikovih veza (*eng. hydrogen bond donors* - HBD). Zbog niske cijene, biorazgradivosti i niske toksičnosti, kolin-klorid (ChCl) je široko korišten kao organska sol za pripremu eutektičkih otapala, zajedno s jeftinim i sigurnim HBD kao što su urea, glicerol, šećerni alkoholi (ksiloza, D-sorbitol) ili karboksilna kiselina iz obnovljivih izvora (malonska, oksalna, limunska, sukcinna). Stoga se mogu dobiti eutektička otapala s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su točka tališta, viskoznost, gustoća, vodljivost, pH vrijednost (Zhang i sur., 2012), koji imaju značajan utjecaj na postupak ekstrakcije i njegovo iskorištenje (Zainal Abidin i sur., 2017).



Slika 4. Amonijeve soli i donori vodika koji se najčešće koriste u pripravi eutektičkih otapala (Durand i sur., 2012)

Glavna značajka DES-a kao najboljeg ekstrakcijskog sredstva (otapala) za prirodne proizvode jest njegova mogućnost doniranja i primanja protona i elektrona, koji im omogućavaju formiranje vodikove veze između molekula i tako povećavaju njihov kapacitet otapanja (Zainal Abidin i sur., 2017; Cvjetko Bubalo i sur., 2016). To ih svojstvo čini odličnim kandidatom za otapanje širokog raspona molekula, uključujući lijekove, pojedine metalne okside, CO₂, proteine, aminokiseline, šećere i polisaharide. Eutektička otapala mogu se upotrebljavati za ekstrakciju glicerola iz biodizela te za uklanjanje ili redukciju količine štetnih aromatskih ugljikovodika iz različitih kemijskih proizvoda (Tang i sur., 2012; Zainal Abidin i sur., 2017).

Kako bih se povećao broj komponenata za pripremu DES-ova i proširile mogućnosti njegove primjene, osim sintetičkih proizvoda, pozornost je usmjerena na prirodne proizvode odnosno metabolite. U slučaju kad su spojevi koji tvore DES primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, ugljikohidrati ili derivati kolina), takve smjese nazivaju se prirodnim eutektičkim smjesama (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES), koje u potpunosti zadovoljavaju principe „zelene“ kemije (Paiva i sur., 2014). Nadalje, prirodna eutektička otapala imaju još jedan interesantan aspekt. Naime, pretpostavlja se da su eutektička otapala treći medij za odvijanje bioloških reakcija, uz vodeni i lipidni medij što objašnjava veliki broj bioloških reakcija koje se odvijaju u svakom organizmu. Pretpostavlja se da NADES igraju važnu ulogu u organizmima koji preživljavaju teške uvijete, posebno onima koji moraju preživjeti duže suše ili mraz (Kudlak i sur., 2015).

2.6.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala

Svojstva eutektičkih otapala variraju ovisno o njihovom sastavu odnosno strukturi same smjese (Tang i sur., 2014). Ovisno o odabiru donora i akceptora vodika, njihovom molarnom omjeru, molekulskoj masi, promjeni entropije, načinu povezivanja i energiji nastale rešetke razlikuju se točka tališta, gustoća, viskoznost, ionska vodljivost, polaritet i pH (Zhang i sur., 2012).

Miješanjem dviju krutih tvari nastaje smjesa čija je točka tališta znatno niža u odnosu na svaku pojedinačnu komponentu zasebno. Molarni omjer organske soli i HBD, također ima značajan utjecaj na točku tališta pripremljene eutektičke smjese. Tako na primjer, kad se ChCl pomiješa s ureom u molarnom omjeru 1:1 i 1:2, dobivene smjese pokazuju točku tališta $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ što je znatno niže od temperature tališta zasebnih komponenata ChCl ($T_t=302\text{ }^{\circ}\text{C}$) i uree ($T_t=133\text{ }^{\circ}\text{C}$). Općenito točke smrzavanja eutektičkih otapala su ispod $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zhang i sur., 2012).

Većina ispitivanih eutektičkih otapala pokazuju veću gustoću od gustoće vode te svih komponenata zasebno. Tip odnosno vrsta donora vodikove veze i upotrijebljene organske soli u pripremi DES-a te njihov međusobni molarni omjer su čimbenici koji utječu na gustoću, površinsku napetost i viskoznost. Općenito, DES-ovi su i veće vodljivosti i viskoznosti u usporedbi s drugim otapalima i IL-ovima (Zhang i sur., 2012; Zainal-Abidin i sur., 2017).

Viskoznost eutektičke smjese je važna karakteristika, ali istovremeno jedna od najvećih prepreka njihove primjene te predstavlja veliki problem. Eutektičke smjese pokazuju relativno visoku viskoznost ($> 100\text{ cP}$) na sobnoj temperaturi, što se pripisuje intermolekularnim interakcijama između pojedinih komponenata smjese koje neizbježno smanjuju pokretljivost slobodnih molekula unutar DES-a. Viskoznost smjese ovisi o udjelu vode, molarnom omjeru komponenata i temperaturi, te se dodavanjem vode i modifikacijom udjela pojedinih sastojaka u pripremi eutektičkih otapala može prevladati ovaj nedostatak. Tako na primjer, dodatkom 5 % vode u eutektičku smjesu dobivenu miješanjem kolin klorida i glukoze, viskoznost se smanjuje za 1/3 zbog postepenog slabljenja vodikovih veza, dok se povišenjem temperature s $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ viskoznost spomenute eutektičke smjese smanjila za 2/3 od početne vrijednosti, zbog povećanog gibanja molekula u otapalu čime se smanjuju intermolekularne sile te dolazi do pucanja vodikovih veza (Dai i sur., 2013a; Zhang i sur., 2012; Zainal Abidin i sur., 2017).

Većina eutektičkih smjesa ima slabu sposobnost ionske vodljivosti ($< 2 \text{ mS cm}^{-1}$), ona također ovisi o molarnom omjeru komponenata smjese, a za razliku od viskoznosti, ionska vodljivost se povećava s povećanjem temperature (Zainal Abidin i sur., 2017).

Polarnost eutektičkih otapala je također vrlo važno svojstvo budući da utječe na kapacitet topljivosti. Eutektička otapala na bazi organskih kiselina su najpolarnija, dok su najmanje polarna ona na bazi šećera i šećernih alkohola (Dai i sur., 2013a). Smatra se da polarnost DES-a ovisi o njegovoj strukturi odnosno donoru vodikove veze, te o temperaturi i udjelu vode. Povećanje temperature dovodi do smanjenja polariteta (Zainal Abidin i sur., 2017). Polarnost DES-ova može se prilagoditi, što ih čini univerzalnim otapalom za ekstrakciju različitih skupina prirodnih spojeva, bilo da su polarni ili nepolarni (Zainal Abidin i sur., 2017).

Kod ekstrakcijskih procesa važan utjecaj imaju bazična i kisela svojstva, odnosno pH eutektičke smjese. Na pH vrijednost smjese utječe kemijska priroda HBD-a (donora vodika) i promjena temperature, tako što povećanjem temperature dolazi do smanjenja kiselosti (povećanja pH vrijednosti) zbog redukcije vodikovih veza koje utječu na kiselost DES-a (Zhang i sur., 2012; Zainal Abidin i sur., 2017). Smjese koje sadrže kolin klorid i šećerne alkohole kao donore vodikove veze pokazuju $\text{pH} > 6$ dok smjese koje sadrže organske kiseline imaju niže pH vrijednost ($\text{pH} < 3$) (Bosiljkov i sur. 2016).

Tablica 3. Usporedba polarnosti organskih otapala i DES-ova (Ruesgas Ramo i sur., 2017)

Komponente otapala	Molarni omjer	$E_T \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$
Voda	-	63.1
Metanol	-	55.0
Etanol	-	51.9
ChCl/glicerol	1:1	58.5
ChCl/glicerol	1:2	58.1
ChCl/glukoza	1:1	50.4
ChCl/citratna kiselina	2:1	48.3

Kako bi se prirodna eutektična otapala našla u široj primjeni za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnog materijala, potrebno je provesti još mnoga istraživanja uvjeta ekstrakcije, odabira komponenti za pripremu otapala, metoda sinteze otapala, načina provedbe ekstrakcije te kako navedeni parametri utječu na učinkovitost procesa ekstrakcije (Dai i sur., 2013a).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Kao materijal u ovom radu korištena je pogača lana, proizvedena hladnim prešanjem sjemena u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta iz sjemenki lana uzgojenog 2016. godine u okolini Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon proizvodnje ulja dobiveni nusproizvod tj. pogača je samljevena i skladištena u zamrzivaču na -20°C .

3.1.2. Reagensi i standardi

Korišteni reagensi, otapala i standardi pri izradi ovog diplomskog rada su:

- Kolin klorid:urea (1:1),
- Kolin klorid:glicerol (1:2),
- Kolin klorid:glukoza (1:1),
- Kolin klorid:urea:glicerol (1:2:2),
- Kolin klorid:limunska kiselina (2:1),
- Natrij hidroksid (0.1 M i 0.3 M),
- Metanol,
- Destilirana voda,
- Mravlja kiselina (0.1%),
- Metanol (HPLC čistoće),
- Sekoizolarikirezinol diglucoizid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD).

3.1.3. Aparatura

Pri izradi eksperimentalnog djela ovog rada korišteni su:

- Analitička vaga (METTLER), $\pm 0,0001\text{g}$
- Planska tresilica (B. Braun Biotech International, Melsungen, Njemačka)
- Ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor/reaktor (Lab Kits, Hong Kong, Kina) (slika 5)
- Centrifuga (Falcon, Colorado, SAD)
- HPLC sustav sa binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom 1200 Series Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) (slika 6)
- Ultrazvučna kupelj (Sonorex, Belin, Njemačka).



Slika 5. Ultrazvučno – mikrovalni ekstraktor (vlastita fotografija)



Slika 6. HPLC sustav (vlastita fotografija)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva na tresilici

Odvagano je 1.25 g pogače lana u sedam plastičnih epruveta (falkonica) s čepom od 25 mL. U svaku falkonicu je dodano po 50 mL različitog otapala. Uspoređena je sposobnost ekstrakcije otapala kolin klorid:urea (1:1), kolin klorid:glicerol (1:2), kolin klorid:glukoza (1:1), kolin klorid:urea:glicerol (1:2:2), kolin klorid:limunska kiselina (2:1), sa smjesom dva organska otapala, 70 % metanol + 30 % 0.1 M NaOH i 70 % metanol + 30 % 0.3 M NaOH. Sadržaj u falkonicama je dobro promiješan i horizontalno postavljen na plansku tresilicu. Ekstrakcija na tresilici trajala je 5 sati, na 25 °C pri 150 okretaja u minuti. Nakon 5 sati ekstrakcije, ekstrakt je odvojen od pogače centrifugiranjem pri 5000 okretaja min^{-1} kroz 15 minuta. Zatim je supernatant prebačen u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjen odgovarajućim otapalom do oznake. Alikvot iz odmjerne tikvice je pomoću šprice profiltriran u vijalicu kroz PVDF filter. Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje lignana i fenolnih spojeva na HPLC sustavu.

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru

U specijalnu epruvetu za ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor odvagano je 0.5 g lanene pogače i pomiješano s 10 mL odgovarajućeg otapala za ekstrakciju. Kao otapalo za ekstrakciju korištena je smjesa pripremljenog eutektičkog otapala (kolin klorid-urea-glicerol) i 0.1 M NaOH udjela 10 %, 20 %, 30 %, 40 % i 50 %. Epruveta s uzorkom i otapalom postavljena je u ultrazvučnu kupelj napravljenu dodatkom vode u posebnu Erlenmayer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova na dnu. Ekstrakcija je provedena kombinirajući različite vrijednosti snage mikrovalova, udjela otapala i vremena trajanja ekstrakcije s ili bez ultrazvuka prema planu pokusa (Tablice 4 i 5). Raspon snage koji se koristio bio je od 100 do 300 W, a vrijeme od 3 do 9 minuta.

Nakon provedene ekstrakcije u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru, fenolni ekstrakt je odvojen od ostatka pogače centrifugiranjem kroz 15 minuta na 5000 okretaja min^{-1} . Dobiveni supernatant je prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjen do oznake destiliranom vodom. Alikvot iz odmjerne tikvice je pomoću šprice profiltriran u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0.2 μm . Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje udjela lignana i fenolnih kiselina HPLC metodom.

3.2.3. Plan pokusa za ekstrakciju fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru

Za izrađivanje plana izvođenja eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana korišten je eksperimentalni dizajn Box Benhken. U tablici 4 prikazan je plan i redosljed pokusa ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, a u tablici 5 nalazi se plan i redosljed izvođenja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka .

Tablica 4. Plan pokusa (Šarža 1- redosljed izvođenja ekstrakcije djelovanjem mikrovalova)

Redni broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (minute)	Udio NaOH (%)
1	100	3	40
2	100	9	40
3	100	6	50
4	200	6	40
5	200	6	40
6	200	3	50
7	200	6	40
8	300	3	40
9	300	9	40
10	300	6	50
11	100	6	30
12	200	3	30
13	200	9	30
14	300	6	30
15	200	9	50

Tablica 5. Šarža 2 (Redosljed izvođenja eksperimenta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom)

Redni broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (minute)	Udio NaOH (%)
1	100	6	30
2	100	3	40
3	100	6	50
4	200	6	40
5	200	3	50
6	200	6	40
7	200	6	40
8	100	9	40
9	300	9	40
10	300	6	50
11	200	9	30
12	200	9	50
13	200	3	30
14	300	6	30
15	300	3	40

3.2.4. Određivanje sastava lignana i fenolnih spojeva lanene pogače

Sastav lignana i fenolnih kiselina lanene pogače određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, tzv. HPLC sustav pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz lanene pogače provedeno je pri 30 °C na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å). Količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μL. Kao mobilna faza korištene su 0.1% otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0.1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok otapala bio je 0.9 mL min⁻¹. Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su DAD detektorom pri valnoj duljini od 280 i 330 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm.

Za razdvajanje i kvantifikaciju željenih fenolnih spojeva lanene pogače korištena je metoda razvijena i validirana u diplomskom radu Cvitanić (2016). U sklopu tog rada su optimirani parametri metode: brzina protoka otapala, temperatura kolone, količina injektiranog uzorka te gradijent protoka otapala u ovisnosti o vremenu (tablica 6). Usporedbom vremena zadržavanja ekstrahiranih fenola s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom spektara dobivenih ekstrakcijom sa spektrima standarda, indentificirani su fenolni spojevi. Za kvantifikaciju fenolnih spojeva lanene pogače korištene su baždarne krivulje standarda.

Koncentracija SDG-a (mg g⁻¹) računa se prema jednadžbi [1] dobivenoj iz baždarne krivulje:

$$y = 1,8961x + 9,6003 \quad [1]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija SDG-a (mg g⁻¹)

Ista formula korištena je za određivanje koncentracije glukozida *p*-kumarinske i ferulinske kiseline.

Koncentracija pojedinačnih lignana i fenola u pogači (mg kg⁻¹) računa se prema jednadžbi [2]:

$$c(\text{fenol}_i) = \frac{x_i \cdot 100}{m} \quad [2]$$

gdje je:

x_i = koncentracija (SDG, glukozida fenolnih kiselina) (mg g^{-1})

m= masa uzorka uzetog za analizu

Tablica 6. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu (Cvitanić, 2015)

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26.1	90	10
28	90	10

3.2.5. Statistika

Za statističku analizu i izradu grafičkih prikaza eksperimentalnih podataka korišten je program Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korišten je ANOVA test. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

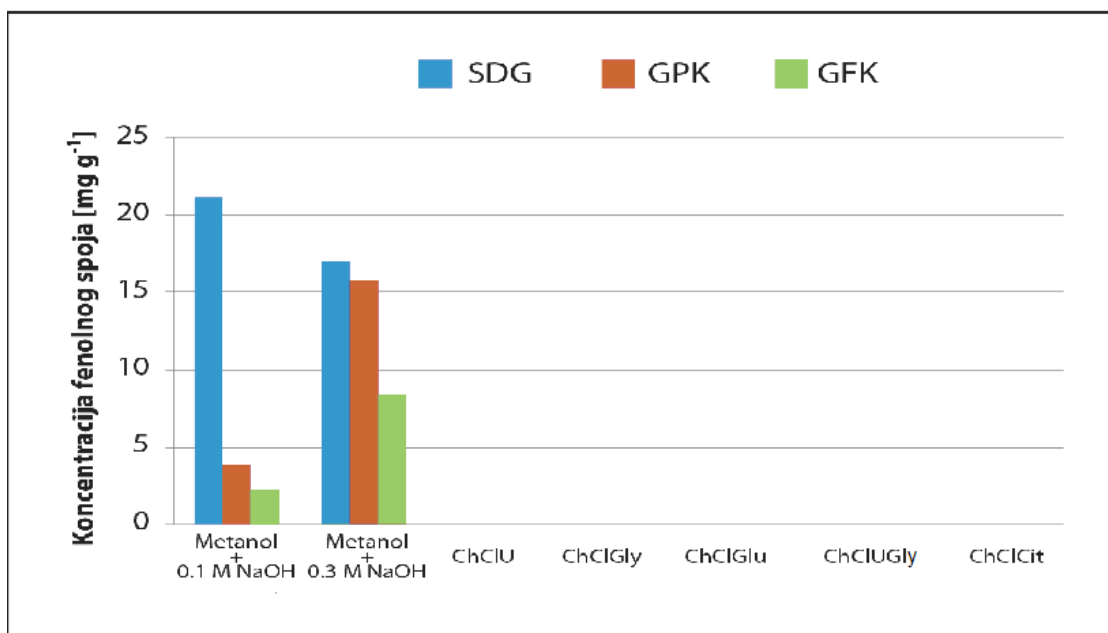
Kao predmet istraživanja ovog rada odabrana je lanena pogača, proizvedena postupkom hladnog prešanja sjemenja lana u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, zbog visokog udjela fenolnih spojeva. Fenolni spojevi su opsežno proučavani jer posjeduju značajna biološka svojstva (Ruesgas Ramo i sur., 2017), a zbog svoje hidrofilnosti zaostaju u pogači tijekom proizvodnje lanenog ulja što ju čini jako dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Cilj rada je bio ispitati utjecaj različitih parametara procesa ekstrakcije koristeći nove, brze metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i/ili ultrazvukom, te utvrditi utjecaj novih ekstrakcijskih otapala, eutektičkih otapala na mogućnost izolacije fenolnih spojeva iz pogače lana. Budući da su klasične metode ekstrakcije dugotrajne i skupe, a organska otapala zbog brojnih nedostataka ne zadovoljavaju trend zelene kemije (Ruesgas Ramo i sur., 2017), željelo se ispitati je li upotrebom alternativnih, eutektičkih otapala i ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije moguće postići slične ili veće prinose samog postupka ekstrakcije fenolnih spojeva uz puno kraće vrijeme, manje troškove te veću sigurnost za okoliš (Zainal Abidin i sur., 2017).

4.1. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA NA TRESILICI I ODABIR EUTEKTIČKIH OTAPALA

U svrhu odabira najpogodnijeg eutektičkog otapala, koje će zamijeniti štetna organska otapala pri ekstrakciji lignana SDG-a i fenolnih kiselina pogače lana, provedeno je preliminarno istraživanje, ekstrakcija na tresilici u trajanju od 5 sati, pri 150 okretaja min^{-1} na sobnoj temperaturi. U ovom dijelu eksperimenta uspoređeni su rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva pomoću 5 različitih eutektičkih otapala s konvencionalnim otapalima.

Korištena su eutektička otapala na bazi amida (kolin klorid-urea), na bazi alkohola (kolin klorid-glicerol), na bazi šećera (kolin klorid-glukoza), na bazi kiseline (kolin klorid-limunska kiselina) te kombinacija amida i alkohola (kolin klorid-urea-glicerol). Od upotrijebljenih eutektičkih otapala kolin klorid-urea-glicerol (ChClUGly) jedini posjeduje alkalna svojstava dok su svi ostali kiseli, što je važan parametar ekstrakcije fenolnih spojeva pogače lana (Yuan i sur. 2008).

Od konvencionalnih otapala korištene su smjesa 70 % metanola i 30 % 0.1 M NaOH te smjesa 70 % metanola i 30 % 0.3 M NaOH, te je osim usporedbe sposobnosti ekstrakcije različitim otapalima, cilj ovog preliminarnog istraživanja bio odrediti koja molarna koncentracija NaOH je najpogodnija za korištenje u daljnjim eksperimentima. U dobivenim ekstraktima određena je koncentracija lignana SDG-a, GPK-a te GFK-a HPLC metodom, te su dobiveni rezultati prikazani grafičkim prikazima.



Slika 7. Udio fenolnih spojeva (mg g^{-1}) u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom na tresilici

Graf (slika 7) prikazuje koncentraciju SDG-a, GPK-a i GFK-a u ekstraktima pogače lana dobivenim s različitim otapalima, ekstrakcijom na tresilici. Iz dobivenih rezultata, prikazanih na grafu, vidljivo je da ekstrakcija pomoću eutektičkih otapala na tresilici nije bila uspješna za izolaciju ciljanih fenolnih spojeva iz pogače lana. Razlog tome može biti velika gustoća i viskoznost DES-ova pri sobnoj temperaturi zbog čega je difuzija otapala otežana te je usporen prijenos mase u ekstrakciji (Hayyan i sur., 2012; Zhang i sur., 2012) i/ili odsutnost NaOH u sastavu smjese s DES-om. Naime, lignani u lanu nalaze se povezani u makromolekularni kompleks koji je potrebno razoriti da bi se izolirali fenolni spojevi pogače lana, što se postiže alkalnom hidrolizom pomoću NaOH (Yuan i sur., 2008). U istraživanju Yuan i suradnici (2008) pokazali su da koncentracija NaOH ima snažan utjecaj na energiju aktivacije reakcije alkalne hidrolize SDG-oligomera, te da je cijepanje te makromolekule ključan korak pri ekstrakciji. Također su pokazali da, osim koncentracije NaOH, važnu ulogu igra i temperatura provedbe procesa hidrolize. Navode da veća koncentracija NaOH i viša temperatura ubrzavaju reakciju hidrolize te tako skraćuju vrijeme potrebno za hidrolizu veza unutar

kompleksa, ubrzavajući oslobađanje SDG-a, GPK-a, GFK-a i HDG-a (flavonoid herbacetin diglukozid). Osim toga, Hayyan i suradnici (2012) navode da povećanje temperature rezultira povećanjem molekularne aktivnosti i pokretljivosti u otopini što dovodi do smanjenja intermolekularnih interakcija i povećanja molarnog volumena koji uzrokuju smanjenje gustoće i viskoznosti eutektičkih otapala. Kareen i suradnici (2012) navode da molarni udio soli i donora vodikove veze (HBD) također ima veliki utjecaj na gustoću i viskoznost eutektičkog otapala, te da veći udio soli rezultira njihovim povećanjem te je moguće da u našem istraživanju nije odabran optimalni omjer soli i donora vodikove veze u sastavu eutektičkog otapala.

Budući da je cilj bio odrediti najpogodnije eutektičko otapalo, na temelju rezultata prethodnih istraživanja odabrali smo ChCIUGly budući da on jedini ima alkalna svojstva koja su se pokazala boljim za ekstrakciju lignana SDG-a. Osim toga, ekstrakcijom s GhCIUGly izolirano je najviše fenolnih spojeva i dobivene su najviše koncentracije, iako su ispod razine detekcije.

Dva korištena konvencionalna otapala su smjesa 70 % metanola i 30 % 0.1 M NaOH te smjesa 70 % metanola i 30 % 0.3 M NaOH, s ciljem određivanja molariteta otopine NaOH koji je učinkovitiji za provedbu procesa ekstrakcije željenih spojeva. Ekstrakcija SDG-a je učinkovitija s 0.1 M NaOH, dok je ekstrakcija GPK-a i GFK-a učinkovitija s 0.3 M NaOH. Bez obzira što je ekstrakcija većine željenih fenolnih spojeva iz pogače lana učinkovitija s 0.3 M NaOH, za daljnje istraživanje je korišten 0.1 M NaOH budući da se s njim postiže veće izdvajanje SDG-a. Naime, SDG je lignan koji se u lanu nalazi u daleko većoj koncentraciji nego u drugim prirodnim izvorima te je primarno bilo ispitati mogućnost njegove ekstrakcije iz pogače lana.

Dobiveni rezultati istraživanja provedenog u diplomskom radu Šrajbek (2017) pokazuju da je ekstrakcija SDG-a učinkovitija s 0.1 M NaOH, dok se učinkovitija ekstrakcija GPK-a i GFK-a postiže s 0.3 M NaOH, ekstrakcijom na tresilici što se slaže s dobivenim rezultatima ovog rada. Usporedbom dobivenih rezultata ovog preliminarnog istraživanja, u radu od Šrajbek (2017) dobivene su veće koncentracije svih ekstrahiranih fenolnih spojeva pogače lana upotrebom otapala koje se sastoji od 70 % metanola i 30 % 0.1 M NaOH. Dok su prilikom ekstrakcije na tresilici s 70 % metanolom i 30 % 0.3 M NaOH dobivene niže vrijednosti koncentracije SDG-a (13.52 mg g^{-1}) i GPK-a (13.01 mg g^{-1}) te jednaka koncentracija GFK-a u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Beejmohun i suradnici (2007) su odredili koncentraciju SDG-a, GPK-a i GFK-a, tradicionalnom metodom ekstrakcije u trajanju od 6 sati pomoću dvije različite molarne koncentracije NaOH. Prilikom ekstrakcije s 70 % metanolom i 0.1 M NaOH postignuta je koncentracija SDG-a $12.7 \pm 0.8 \text{ mg g}^{-1}$, GPK-a $2.2 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ te GFK-a od $2.1 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$. Dok je prilikom ekstrakcije s 70 % metanolom i 30 % 1 M NaOH postignuta koncentracija SDG-a $12.8 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$, GPK-a $3.4 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ te GFK-a od $3.2 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$. Dakle, u navedenom istraživanju dobivene koncentracije svih ekstrahiranih fenolnih spojeva pogače lana su manje u odnosu na koncentracije izoliranih spojeva u ovom istraživanju, bez obzira na primijenjeno otapalo.

U istraživanju Nemes i Orsat (2012), uspoređujući dvije referentne metode ekstrakcije, navode kako povećanje molarne koncentracije NaOH dovodi do pada koncentracije ekstrahiranog SDG-a. Provedbom klasične ekstrakcije uz 0.3 M NaOH izolirano je 18 mg g^{-1} , dok je klasičnom referentnom metodom s 1 M NaOH izolirano 16.8 mg g^{-1} . Koncentracija izoliranog SDG-a referentnom metodom s 0.3 M NaOH u navedenom istraživanju (18 mg g^{-1}) je veća u usporedbu s koncentracijom SDG-a dobivenom ekstrakcijom na treslici s 0.3 M NaOH (17.01 mg g^{-1}) u ovom istraživanju.

4.2. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

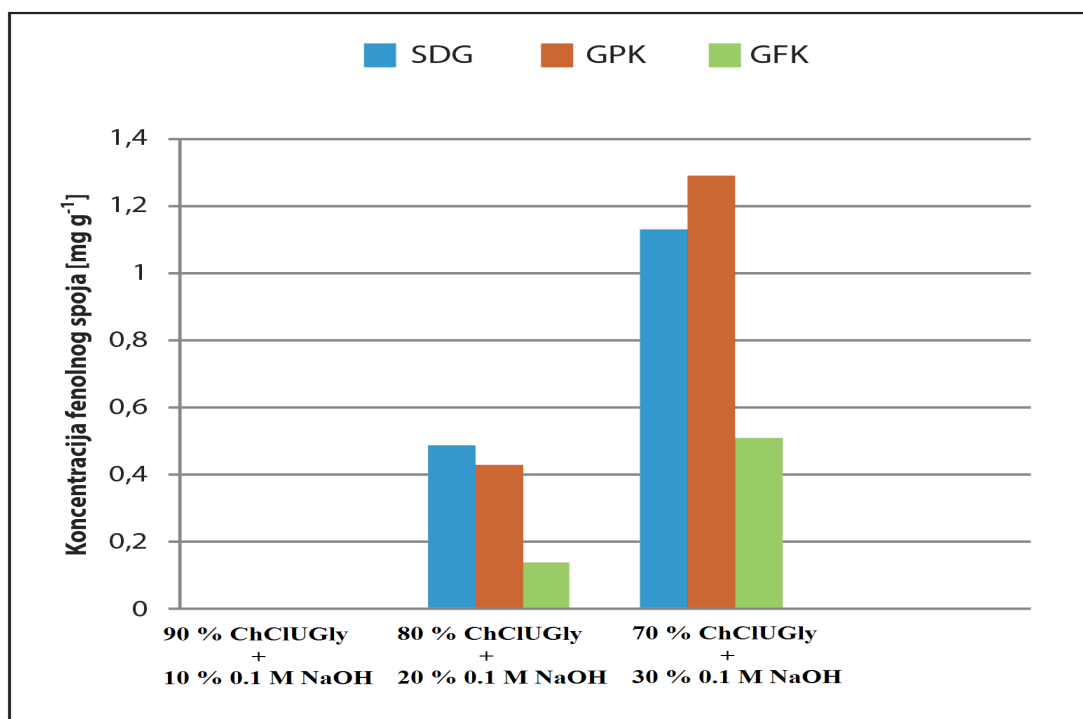
Ultrazvučno-mikrovalni ekstrakt je uređaj koji nudi mogućnost tri načina rada, u ovom radu korištena je ekstrakcija pomoću mikrovalova te kombinirana ultrazvučno-mikrovalna ekstrakcija za izolaciju fenolnih spojeva iz pogače lana. Na temelju preliminarnog istraživanja, ekstrakcije na tresilici, kao otapalo za ekstrakciju korištena je smjesa kolin klorid-urea-glicerol (ChClUGly) s različitim udjelom 0.1 M NaOH. Raspon snage koji se koristio je bio od 100 do 300 W, a vrijeme od 3 do 9 minuta. Nakon ekstrakcije analizirane su koncentracije SDG-a, GPK-a te GFK-a, a dobiveni rezultati su prikazani grafičkim prikazima. Statističkom analizom su uspoređeni utjecaj vremena, molarne koncentracije i snage mikrovalova na koncentraciju pojedinog detektiranog spoja. Statistički značajni odnosi prikazani su grafički ($p \leq 0.05$).

Cilj provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka bio je ispitati mogućnost ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana korištenjem novih metoda ekstrakcije koje su znatno brže te je smanjena potrošnja energije, i upotrebom eutektičkih otapala, kao alternativa toksičnim organskim otapalima koja predstavljaju sve veći problem zagađenja okoliša.

Plan pokusa napravljen je pomoću Box Benhken dizajn eksperimenta s ciljem redukcije broja eksperimenata koji bi trebali biti provedeni, te je napravljen plan za dvije šarže, jedna za ekstrakciju samo s mikrovalovima, a druga za ekstrakciju kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Svaka šarža sadrži po 15 eksperimenata.

4.2.1. Odabir udjela NaOH

Odabrano otapalo, ChClUGly korišteno je za daljnju provedbu postupka ekstrakcije fenolnih spojeva pogače lana. Prije samog početka provedbe pokusa provedeno je preliminarno istraživanje u cilju određivanja udjela 0.1 M NaOH u smjesi otapala koje će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Preliminarno istraživanje je provedeno u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru, pri snazi mikrovalova od 200 W u trajanju od 6 minuta. U dobivenim ekstraktima određena je koncentracija lignana SDG-a, GPK-a te GFK-a HPLC metodom, te su dobiveni rezultati prikazani grafičkim prikazima.



Slika 8. Koncentracija ispitivanih fenolnih spojeva (mg g^{-1}) u ekstraktima proizvedenim pomoću mikrovalova

Na prikazanom grafu (slika 8) vidljivo je da se koncentracija lignana SDG-a, GPK-a i GFK-a značajno razlikuje ovisno o korištenom udjelu NaOH u smjesi eutektičkog otapala. Korištene su smjese otapala 90 % ChCIUGly i 10% 0.1 M NaOH, smjesa otapala 80 % ChCIUGly i 20% 0.1 M NaOH i smjesa otapala 70 % ChCIUGly i 30% 0.1 M NaOH. Cilj je bio odrediti koji udio 0.1 M NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala je najpovoljniji za ekstrakciju fenolnih spojeva iz pogače lana pomoću ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

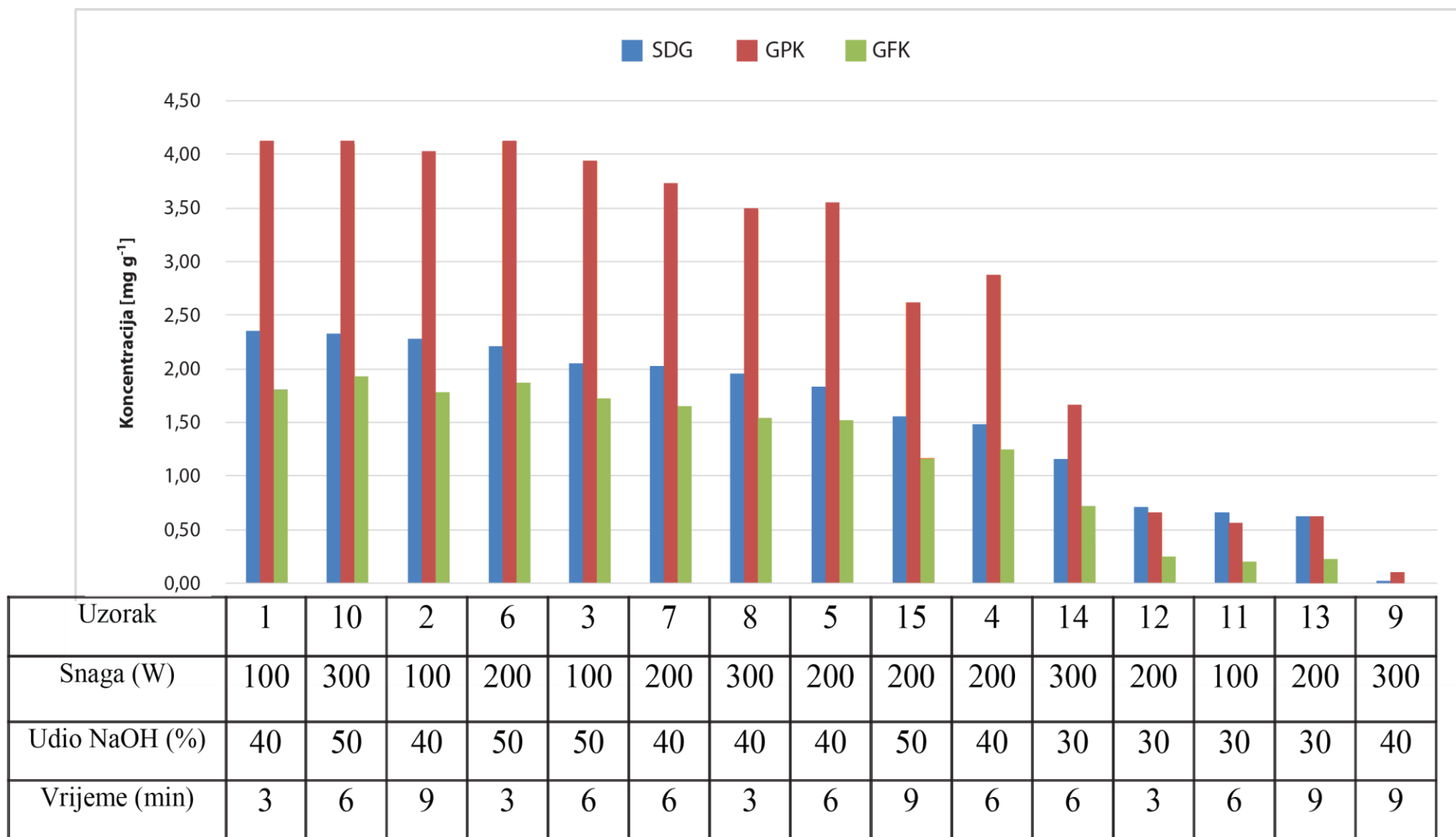
Najveća ekstrahirana koncentracija SDG-a, GPK-a i GFK-a (1.13 mg g^{-1} ; 1.29 mg g^{-1} ; 0.51 mg g^{-1}) postignuta je s 30 % 0.1 M NaOH, zatim slijedi koncentracija SDG-a, GPK-a i GFK-a ekstrahirana s 20 % 0.1 M NaOH (0.49 mg g^{-1} ; 0.43 mg g^{-1} ; 0.14 mg g^{-1}), dok ekstrakcija s 10 % 0.1 M NaOH nije dala rezultate odnosno nije bila uspješna za ekstrakciju fenolnih spojeva pogače lana te oni nisu detektirani pomoću tekućinske kromatografije. Iz dobivenih rezultata vidimo da je za ekstrakciju fenolnih spojeva iz pogače lana poželjan veći udio NaOH u sastavu smjese otapala, vjerojatno zbog složenog makromolekularnog kompleksa u kojem se nalaze povezani SDG, GPK i GFK u sjemenu lana. Iz tog razloga, u

daljnjim eksperimentima željela se ispitati učinkovitost i većeg udjela 0.1 M NaOH te je korišteno 30 %, 40 % i 50 % NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala pri ekstrakciji.

4.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva pogače lana potpomognuta mikrovalovima

Prema planu pokusa određenim Box Benhken eksperimentalnim dizajnom provedeno je 15 različitih eksperimenata kombinacijom tri različita parametra, udjela NaOH u otapalu (30 %, 40 % i 50 %), snage mikrovalova (100 W, 200 W i 300 W) te vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta). Dobiveni rezultati koncentracije ciljanih fenolnih spojeva pogače lana su prikazani na slici 9.

Energija mikrovalova je neionizirajuće elektromagnetsko zračenje koje uzrokuje molekularno gibanje, migracijom iona i rotacijom dipola, ali ne utječe na molekularne strukture (Chemat i sur., 2004). Stoga, u prisutnosti polarnih molekula ili ionskih vrsta koje apsorbiraju zračenje, mikrovalna ekstrakcija omogućava brzu raspodjelu energije u otapalu što dovodi do brzog zagrijavanja ukupnog volumena otapala zbog međumolekulskih sudara. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks i na taj način poboljšava ekstrakciju (Beejmohun i sur., 2007).



Slika 9. Koncentracija izoliranih fenolnih spojeva u ekstraktima proizvedenim pomoću mikrovalova

Koncentracija SDG-a, GPK-a i GFK-a značajno se razlikuje ovisno o korištenim parametrima provedbe postupka ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, kao što je prikazano na grafu (slika 9). Najveća koncentracija SDG-a (2.35 mg g^{-1}) i GPK-a (4.31 mg g^{-1}) izolirana je s 40 % 0.1 M NaOH pri snazi mikrovalova 100 W tijekom 3 minute, dok je najveća koncentracija GFK-a (1.94 mg g^{-1}) izolirana s 50 % 0.1 M NaOH pri 300 W tijekom 6 minuta. Najmanje koncentracije svih ekstrahiranih fenolnih spojeva su dobivene s 40 % 0.1 M NaOH pri snazi 300 W u trajanju od 9 minuta.

Ovaj diplomski rad je nastavak istraživanja provedenog u diplomskom radu, Šrajbek (2017), u sklopu HRZZ projekta broj 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije. U radu od Šrajbek (2017) provedena je izolacija SDG-a, GPK-a i GFK-a pomoću referentne metode te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pomoću konvencionalnih otapala. Prema dobivenim rezultatima referentnom metodom, navode da je dominantni spoj lanene pogače SDG, u koncentraciji od 21.98 mg g^{-1} , zatim slijedi GPK s 10.46 mg g^{-1} , dok je koncentracija GFK-a najmanja, u iznosu 5.12 mg g^{-1} . Provedbom mikrovalne ekstrakcije fenolnih spojeva s eutektičkim otapalima u ovom radu, uspješno je ekstrahirano 11 % SDG-a, 40 % GPK-a i 38 % GFK-a od mogućeg, odnosno u odnosu na dobivene koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva referentnom metodom u istraživanju Šrajbek (2017).

Provedbom mikrovalne ekstrakcije, pri različitim procesnim parametrima (snaga, vrijeme i molarna koncentracija NaOH), pomoću 70 % metanola i 30 % NaOH u radu Šrajbek (2017) izolirane su znatno veće koncentracije fenolnih spojeva pogače lana. Najviša koncentracija SDG-a postignuta je s 0.1 M NaOH kod 300 W i nakon 3 minute ekstrakcije (28.96 mg g^{-1}), dok je najviša koncentracija GPK-a (6 mg g^{-1}) i GFK-a (5 mg g^{-1}) postignuta pomoću 0.1 M NaOH pri 200 W i nakon 9 minuta. U ovom radu ekstrahirano je 8 % SDG-a, 23 % GPK-a i 22 % GFK-a u odnosu na najvišu ekstrahiranu koncentraciju fenolnih spojeva ispitivane pogače lana postignutu mikrovalnom ekstrakcijom pomoću konvencionalnih otapala u radu Šrajbek (2017).

U istraživanju kojeg su proveli Beejmohun i suradnici (2007), navode da je prilikom ekstrakcije s 70 % metanolom i 0.1 M NaOH kod 150 W i nakon 15 minuta, ekstrahirano 22 % više SDG-a, 11 % više GPK-a te 28 % više GFK-a u odnosu na koncentracije izolirane konvencionalnom metodom. Izolirane koncentracije SDG-a (16.3 mg g^{-1}), GPK-a (3.8 mg g^{-1}) te GFK-a (4.4 mg g^{-1}) su veće od koncentracija fenolnih spojeva pogače lana izoliranih upotrebom mikrovalne ekstrakcije i eutektičkih otapala, u ovom radu.

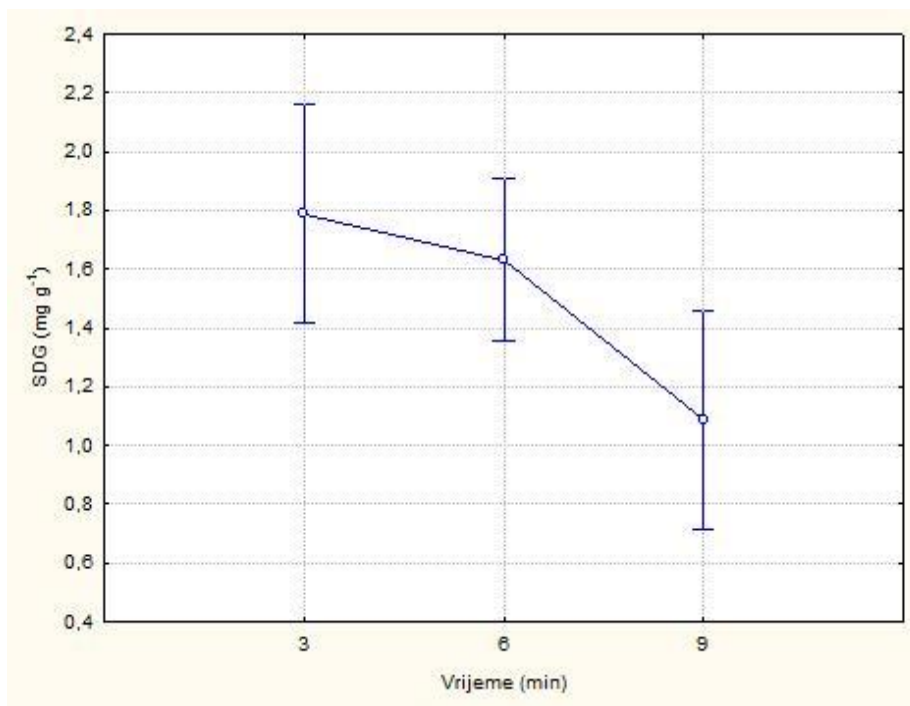
Nemes i Orsat (2012) navode da uporaba mikrovalova pri ekstrakciji SDG-a iz pogače lana daje 6 % veći ekstrakcijski prinos od konvencionalnih metoda direktne hidrolize, uz

dodatne prednosti kao što su smanjenje vremena ekstrakcije za 95 % te potrebnog udjela NaOH na pola, veća čistoća finalnog produkta za 97 %, smanjena potrošnja otapala, energije i troškova procesa. Prilikom mikrovalne ekstrakcije s 0.5 M NaOH, postignuta je koncentracija SDG-a od 10.4 mg g⁻¹ do 18.4 mg g⁻¹, ovisno o sorti lana. Stoga, navode da osim vrste otapala i primijenjenih procesnih parametara, koncentracija lignana u sjemenu ovisi i o sorti, klimatskim uvjetima i mjestu žetve.

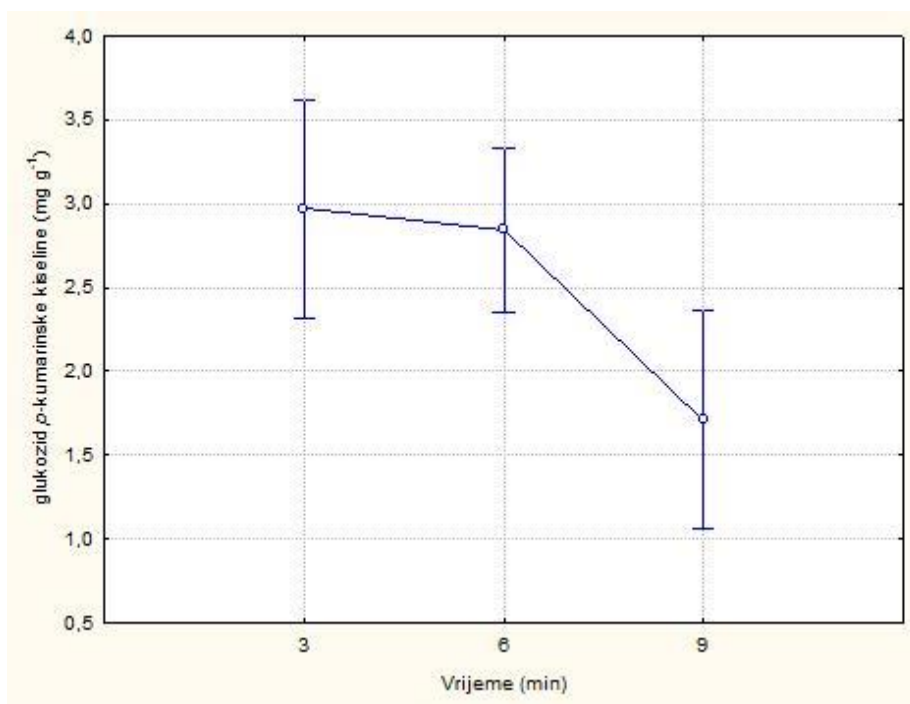
Dobiveni rezultati svih navedenih istraživanja su mnogo veći u odnosu na izolirane koncentracije ciljanih fenolnih spojeva pogače lana dobivene mikrovalnom ekstrakcijom i eutektičim otapalom, u ovom radu. Provedenim istraživanjem nisu dobiveni željeni rezultati, odnosno dobivene koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva su znatno manje u odnosu na koncentracije izolirane mikrovalnom ekstrakcijom pomoću organskih otapala. Razlog tome može biti toplinska degradacija fenolnih spojeva uslijed porasta temperature pod utjecajem mikrovalova (Cvjetko Bubalo i sur., 2016) čime je otežano njihovo detektiranje ili je pak povećanjem temperature došlo do smanjenja polariteta eutektičkog otapala (Zainal Abidin i sur., 2017) budući da efikasnost ekstrakcije uvelike ovisi o polarnosti ekstrakcijskog otapala (Dai i Mumper, 2010). Također, moguće da nije odabrano najpogodnije eutektičko otapalo odnosno molarni omjer soli i donora vodikove veze koji značajno utječu na viskoznost otapala (Kareem i sur., 2010), ili nije odabrana najpogodnija molarna koncentracija i udio NaOH u smjesi koji imaju jako veliki značaj na prinos ekstrakcije (Yuan i sur., 2008).

Istraživanjem provedenim u ovom diplomskom radu dokazano je da je moguća ekstrakcija pomoću novih, eutektičkih otapala, koja bi zamijenila štetna organska otapala uz redukciju vremena ekstrakcije za 95 %, ali je potrebno provesti još mnoga istraživanja u svrhu optimiranja samog procesa ekstrakcije i odabira najpogodnijeg otapala. Prema pregledanoj literaturi, do sada nije objavljen niti jedan rad na ovu temu te je potrebno provesti daljnje eksperimente da bi se optimirao proces mikrovalne ekstrakcije lignana i fenolnih kiselina pomoću eutektičkih otapala.

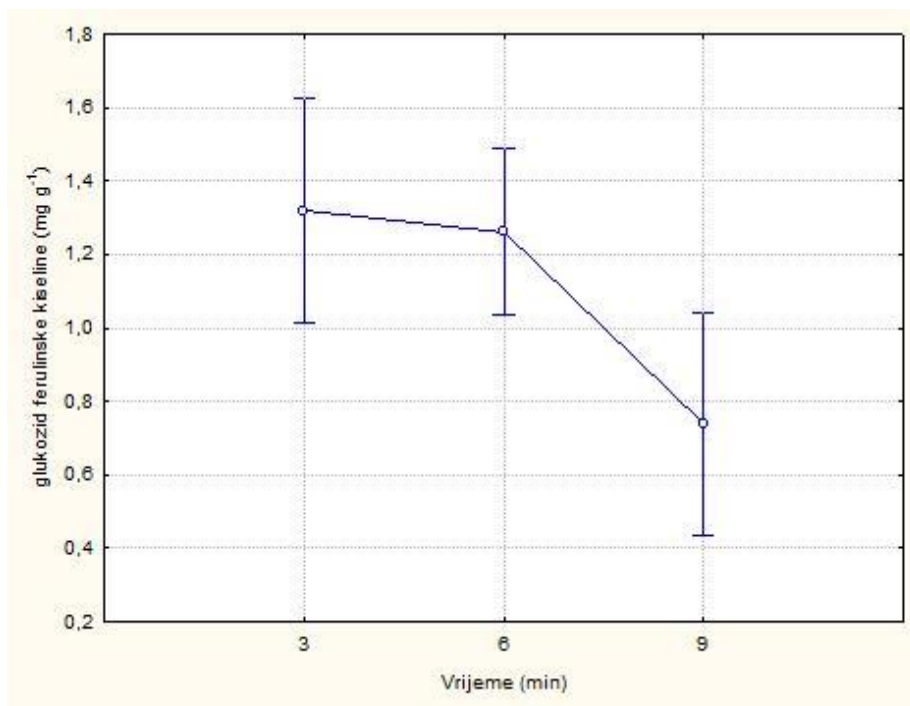
Wang i suradnici (2017b) proveli su ekstrakciju polifenola i furanokumarina iz *Ficus Carica L.* upotrebom metanola i 8 različitih eutektičkih otapala, te korištenjem ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Najbolji ekstrakcijski prinos je postignut s mikrovalnom ekstrakcijom pomoću eutektičkog otapala glicerol:ksilitol:fruktoza (3:3:3), dok je ekstrakcija mikrovalovima i ultrazvukom s metanolom kao otapalom, pokazala najmanje ekstrakcijske prinose.



Slika 10. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o vremenu trajanja mikrovalne ekstrakcije ($p \leq 0.05$)



Slika 11. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GPK-a o vremenu trajanja mikrovalne ekstrakcije ($p \leq 0.05$)



Slika 12. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GFK-a o vremenu trajanja mikrovalne ekstrakcije ($p \leq 0.05$)

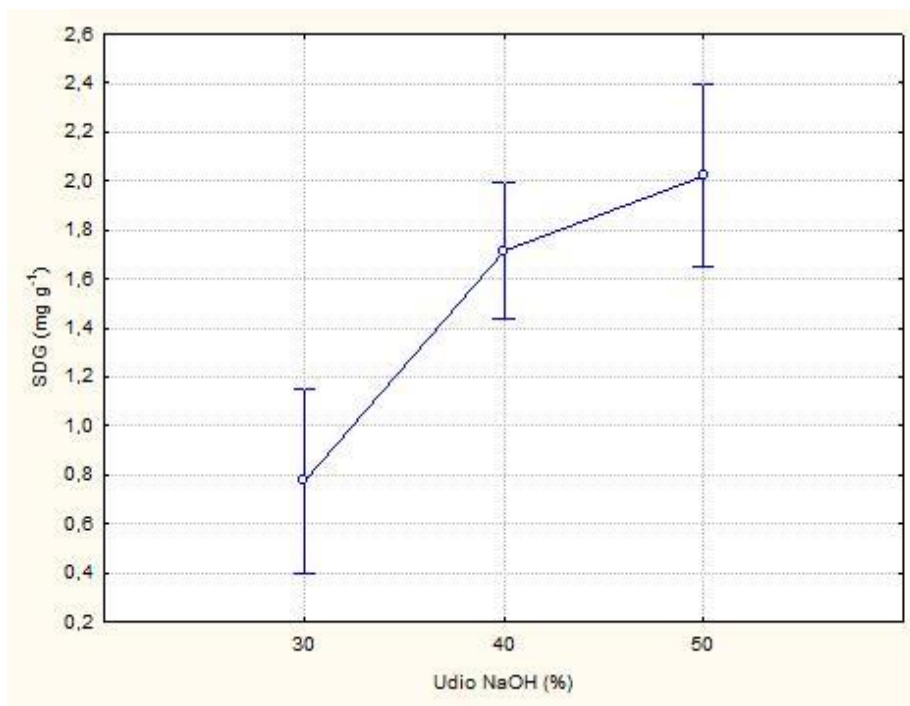
Analiza varijance (slika 10, 11 i 12) pokazala je značajnu ovisnost ($p \leq 0.05$) koncentracije SDG-a, GPK-a i GFK-a o vremenu trajanja ekstrakcije, neovisno o snazi mikrovalova. Uočeno je da se koncentracija svih ekstrahiranih fenolnih spojeva iz pogače lana smanjuje povećanjem vremena trajanja ekstrakcije, moguće zbog negativnog djelovanja mikrovalova na strukturu istraživanih fenolnih spojeva tijekom dulje provedbe procesa, zbog većeg porasta temperature. Razlike u dobivenoj koncentraciji SDG-a, GPK-a i GFK-a provedbom mikrovalne ekstrakcije u trajanju od 3 i 6 minuta su relativno male, dok se nakon 9 minuta koncentracija željenih fenolnih spojeva značajno smanjila, neovisno o primijenjenoj snazi mikrovalova.

U radu Šrajbek (2017) tijekom mikrovalne ekstrakcije s konvencionalnim otapalima, uočeno je da koncentracija SDG-a i GPK-a značajno ovisi o vremenu ekstrakcije kod različitih snaga mikrovalova, te da je koncentracija GFK-a proporcionalna s vremenom ekstrakcije. Navode da se kod viših snaga mikrovalova (200 W i 300 W) koncentracija SDG-a smanjuje s vremenom ekstrakcije, a kod snage od 100 W koncentracija ekstrahiranog SDG-a raste s produljenjem vremena ekstrakcije. Suprotno tome, dužim vremenom ekstrakcije povećava se učinkovitost ekstrakcije GPK-a i GFK-a, kod svih primijenjenih snaga mikrovalova.

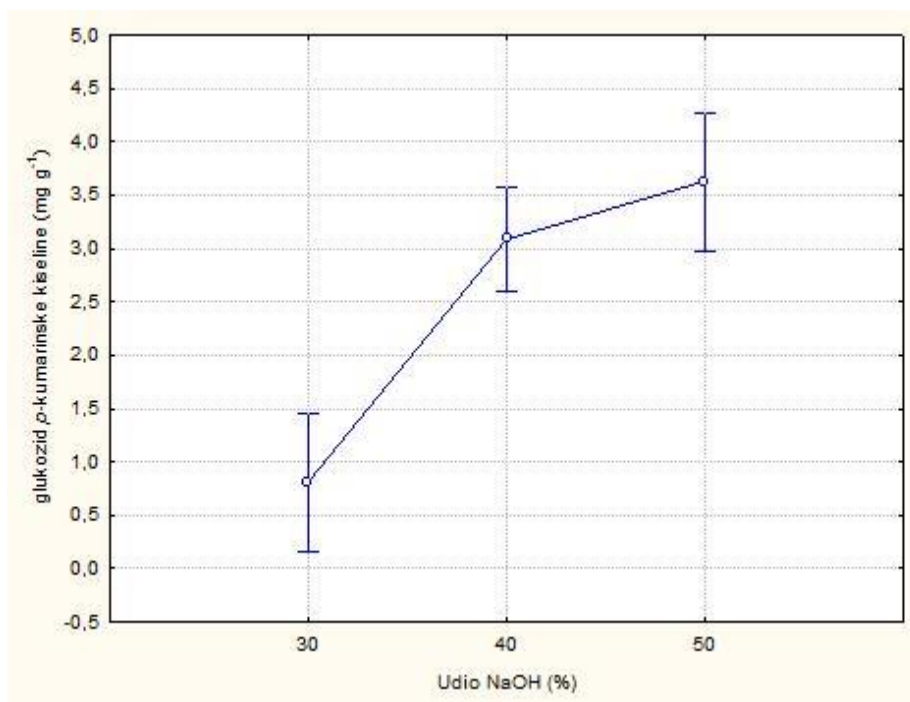
U istraživanju Beejmohun i suradnici (2007) ispitali su utjecaj vremena trajanja mikrovalne ekstrakcije na izolaciju SDG-a, GPK-a i GFK-a pomoću konvencionalnih otapala, smjese 70 % metanola i 0.1 M NaOH i smjese 70 % metanola i 1 M NaOH. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da, neovisno o primijenjenom otapalu, koncentracija ekstrahiranih spojeva značajno raste tijekom prve tri minute ekstrakcije, dok se tijekom daljnjeg produljenja vremena trajanja mikrovalne ekstrakcije (od 3-15 minuta) postignuta koncentracija značajno ne mijenja.

U svom istraživanju Nemes i Orsat (2012) navode da se prinos ekstrakcije SDG-a povećava s produljenjem vremena mikrovalne ekstrakcije od 1 do 5 minuta, dok se nasuprot tome koncentracija SDG-a smanjuje daljnjim produljenjem vremena od 5 do 25 minuta. Također navode, da dugo vrijeme trajanja ekstrakcije u kombinaciji s visokom molarnom koncentracijom NaOH i visokom snagom mikrovalnog zračenja dovodi do kuhanja, pjenjenja i izlaženja ekstrakcijske smjese u kondenzator što može biti uzrok smanjenja prinosa ekstrakcije SDG-a zbog njegove degradacije i gubitka dijela ekstrakcijske smjese u okolinu.

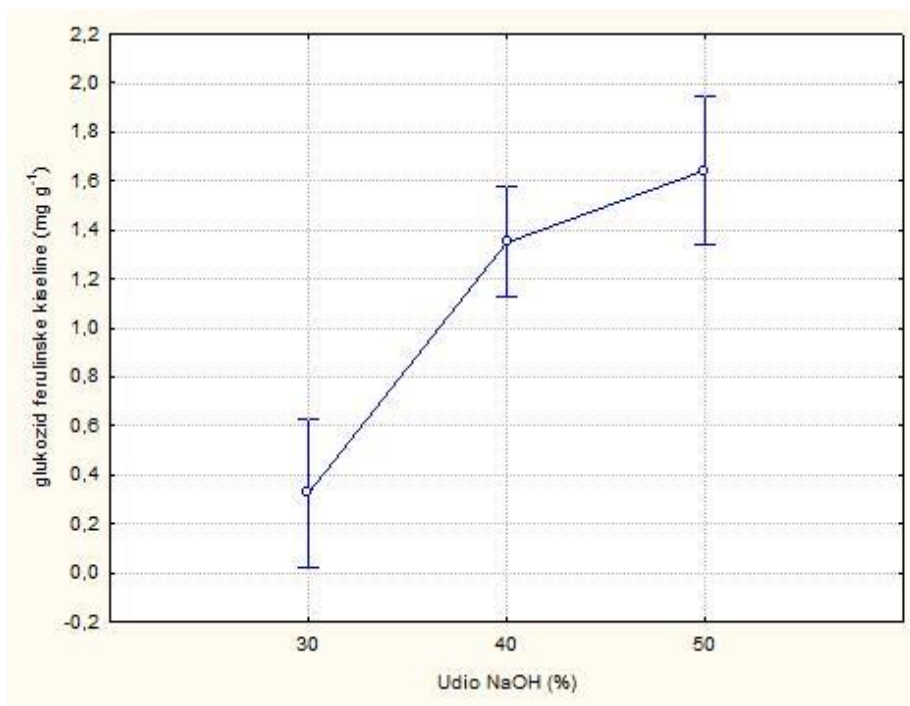
U ovom istraživanju, analiza varijance pokazala je da snaga mikrovalova ne utječe na koncentraciju lignana i fenolnih kiselina pogače lana, a produljenjem vremena trajanja mikrovalne ekstrakcije smanjuje se koncentracija svih ekstrahiranih spojeva. Moguće da je duljim djelovanjem mikrovalova došlo do promjena u strukturi molekula polifenola te je otežano njihovo detektiranje i/ili je uzrokovalo promjene fizikalno kemijskih svojstava DES-a te je tako smanjena njihova sposobnost otapanja i izolacije fenolnih spojeva iz ekstrakcijske smjese. Također, dulje vrijeme djelovanja mikrovalova na ekstrakcijsku smjesu dovelo je do većeg porasta temperature koja je vjerojatno nepovoljno djelovala na otapalo i željene spojeve.



Slika 13. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o udjelu NaOH ($p \leq 0.05$)



Slika 14. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GPK-a o udjelu NaOH ($p \leq 0.05$)



Slika 15. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GFK-a o udjelu NaOH ($p \leq 0.05$)

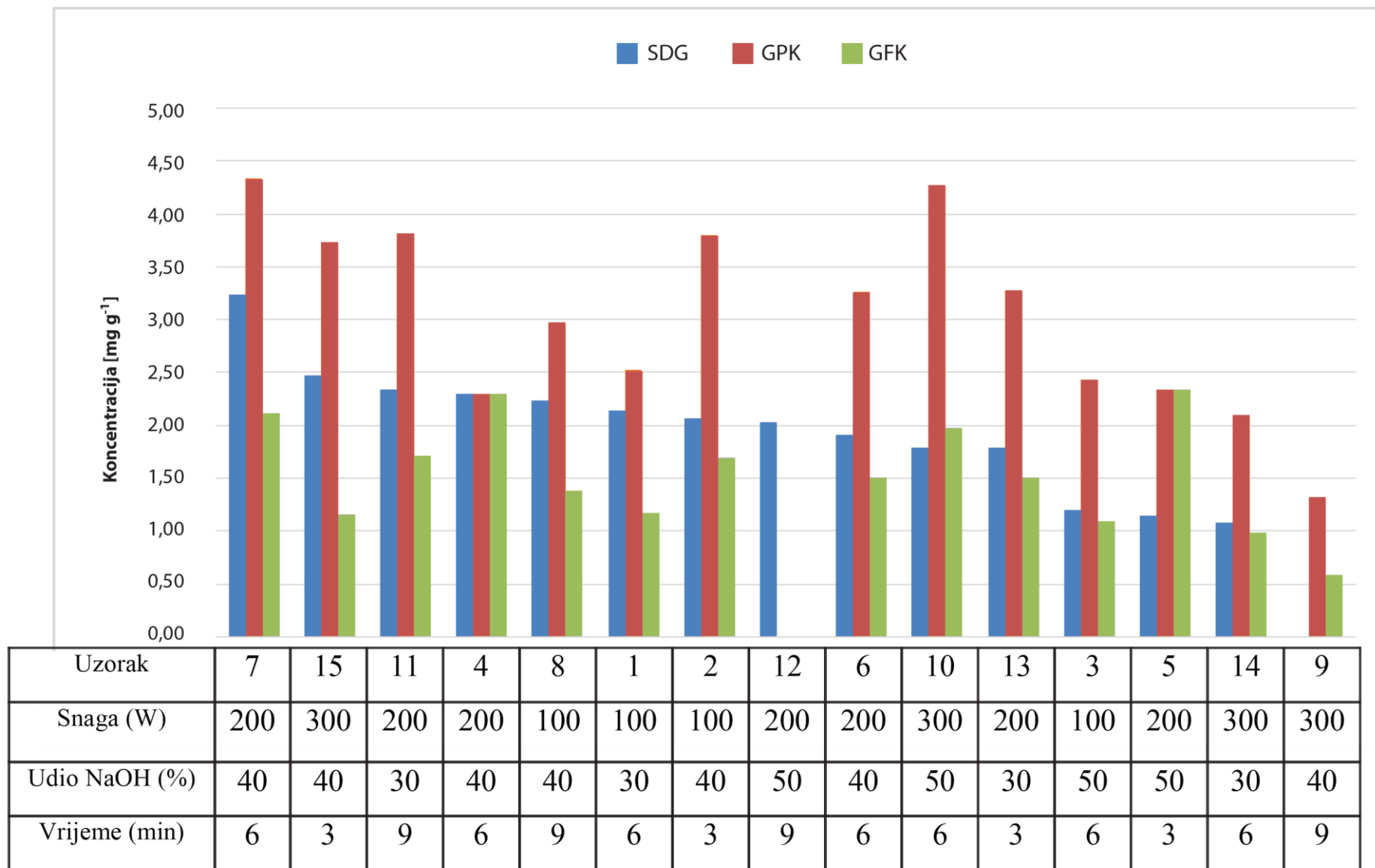
Analiza varijance, prikazana na slici 13, 14 i 15, pokazala je značajnu ovisnost koncentracije ekstrahiranog SDG-a, GPK-a i GFK-a o udjelu NaOH (30 %, 40 % i 50 %) u sastavu primijenjenog eutektičkog otapala. Najmanje koncentracije SDG-a, GPK-a i GFK-a izolirane su s najmanjim udjelom NaOH. Nasuprot tome, upotrebom većeg udjela NaOH u sastavu otapala postignuta je učinkovitija ekstrakcija ciljanih fenolnih spojeva pogače lana. Razlog toga vjerojatno leži u složenoj strukturi lignana unutar sjemena lana, te je hidroliza makromolekule ključna za ekstrakciju SDG-a.

Nemes i Orsat (2010) su proveli hidrolize SDG-a pogače lana pomoću 10, 20, 30, 40 i 50 ml NaOH pri 120 W u trajanju od 20 minuta. Uočili su da je viskoznost reakcijske smjese, zbog otpuštanja sluzi u reakcijsku smjesu, bila previsoka upotrebom manje od 50 ml NaOH potrebnog za hidrolizu. Laneno sjeme sadrži oko 8 % polisaharidnih sluzi koje tvore gel u vodenim otopinama. Viskoznost nastalog gela ovisi o pH, pri vrijednostima od 6-9 je visoka te se smanjuje kad je pH vrijednost niža od 6.

4.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova

Ekstrakcija lignana SDG-a i fenolnih kiselina kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka provedena je u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru pri različitim procesnim parametrima. Plan pokusa ekstrakcije izrađen je prema Box Benhken eksperimentalnom dizajnu. Utjecaj udjela NaOH u sastavu otapala, snage mikrovalova (W) i vremena trajanja mikrovalovima potpomognute ekstrakcije na ekstrakciju željenih fenola pogače lana određenih HPLC metodom je prikazan na slici 16.

U posljednje vrijeme, kombinirana primjena mikrovalnog i ultrazvučnog zračenja za ekstrakciju komponenata hrane dobila je ogromnu pozornost. Kombinirana primjena navedenih metoda ekstrakcije pojačava prijenos mase tijekom ekstrakcije dajući povišeni impuls i energiju za razaranje integriteta stanica te oslobađajući sastojke u ekstrakcijsko otapalo. Mikrovalna energija zagrijava materijal homogeno i trenutačno u kratkom vremenu, dok je ultrazvuk povoljan zbog kavitacije, koja destabilizira stanične stjenke povećavajući kinetiku i ravnotežu prijenosa mase. Uporaba ultrazvuka tijekom mikrovalne ekstrakcije doprinosi mehaničkom i toplinskom učinku što kumulativno povećava učinkovitost procesa ekstrakcije. Upotrebom DES-ova kao otapala pri mikrovalnoj ekstrakciji, DES apsorbira mikrovalno zračenje i dovodi do razaranja staničnih stjenki omogućavajući oslobađanje spojeva iz matriksa uzorka (Chizoba Ekezie i sur., 2017).



Slika16. Koncentracija izoliranih fenolnih spojeva u ekstraktima proizvedenim pomoću mikrovalova i ultrazvuka

Na grafu (slika 16) prikazana je ovisnost koncentracije SDG-a, GPK-a i GFK-a o korištenim procesnim parametrima ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Najveća koncentracija SDG-a (3.25 mg g^{-1}) i GPK-a (4.34 mg g^{-1}) izolirana je s 40 % 0.1 M NaOH pri snazi mikrovalova 200 W tijekom 6 minuta, dok je najveća koncentracija GFK-a (2.35 mg g^{-1}) izolirana s 50 % 0.1 M NaOH pri 200 W tijekom 3 minute. Najmanja koncentracija SDG-a je dobivena ekstrakcijom s 40 % NaOH pri 300 W tijekom 9 minuta, a pri 200 W tijekom 9 minuta i s 50 % 0.1 M NaOH je dobivena najmanja koncentracija GPK-a i GFK-a u iznosu 0, odnosno pri tim uvjetima nije došlo do njihove ekstrakcije. Razlog toga može biti degradacija i/ili potpuni gubitak fenolnih spojeva te povećanje viskoznosti otapala uslijed naglog povećanja temperature. Nemes i Orsat (2010) navode da je dugo vrijeme ekstrakcije u kombinaciji s visokom koncentracijom NaOH i visokom snagom mikrovalne ekstrakcije dovelo do ključanja, pjenjenja i širenja ekstrakcijske smjese izvan zone izloženosti mikrovalovima u kondenzator, što je dovelo do smanjenja prinosa ekstrakcije SDG-a zbog njegove degradacije.

U ovom istraživanju, dobivene su veće koncentracije svih izoliranih fenolnih spojeva ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom od koncentracija dobivenih primjenom samo mikrovalova, neovisno o primijenjenom otapalu i procesnim parametrima. Uspješno je ekstrahirano 15 % SDG-a, 42% GPK-a te 46 % GFK-a u odnosu na referentnu metodu provedenu u sklopu istraživanja u radu Šrajbek (2017), uz značajno skraćanje vremena ekstrakcije (preko 95 %) te smanjenje potrošnje otapala.

Chemat i suradnici (2004) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva primjenom ultrazvuka, mikrovalova te njihovom kombinacijom. Razloge upotrebe ultrazvuka i mikrovalova za ekstrakciju koje su autori naveli su redukcija vremena analize, pojednostavljena manipulacija i obrada uzorka, veća čistoća gotovog proizvoda, smanjenje količine otapala i kontaminacije te automatizacija procesa i više sigurnosti. Naveli su da se kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka povećava površina prijenosa mase i energije što značajno poboljšava ekstrakciju fenolnih spojeva.

U radu Alonso Carrillo i suradnici (2017) provedena je ekstrakcija ukupnog sadržaja fenola iz biljke *Satureja macrostema* koja se tradicionalno koristi kao začin i ljekovita biljka u Meksiku, pomoću različitih koncentracija etanola u vodi i vode. Uspoređene su dvije metode ekstrakcije: konvencionalna refluks ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Pokazalo se da je najveća koncentracija ukupnih fenola dobivena kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Također su pokazali da temperatura procesa ima značajni utjecaj na proces ekstrakcije. Povišena temperatura je poboljšala učinak ekstrakcije

fenolnih spojeva poboljšavajući njihovu topljivost, difuziju i prijenos mase, te smanjenje viskoznosti i površinske napetosti otapala. Ipak, dugo vrijeme izloženosti visokim temperaturama ima velik utjecaj na degradaciju fenolnih spojeva. Razlog tome može biti posljedica nekih nedostataka poput istodobne degradacije ili razgradnje fenolnih spojeva ili čak zbog povećanog gubitka otapala zbog isparavanja ili oksidacijskih reakcija.

U istraživanju od Peng i suradnici (2015) provedena je ekstrakcija fenolnih kiselina iz cvijeta biljke *Lonicerae japonica* Flos pomoću 12 različitih vrsta eutektičkih otapala. Uspoređen je prinos ekstrakcije pomoću tri različite metode, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te konvencionalne metode ekstrakcije toplinskog refleksa. Pokazalo se da su ultrazvuk i mikrovalovi efikasniji u odnosu na konvencionalnu metodu, te da ekstrakcija mikrovalovima daje veći ekstrakcijski prinos i zahtjeva manji utrošak vremena u odnosu na ultrazvuk. Također, pokazalo se da su eutektička otapala idealna za ekstrakciju fenolnih kiselina, povećavajući njihovu topljivost u otapalu.

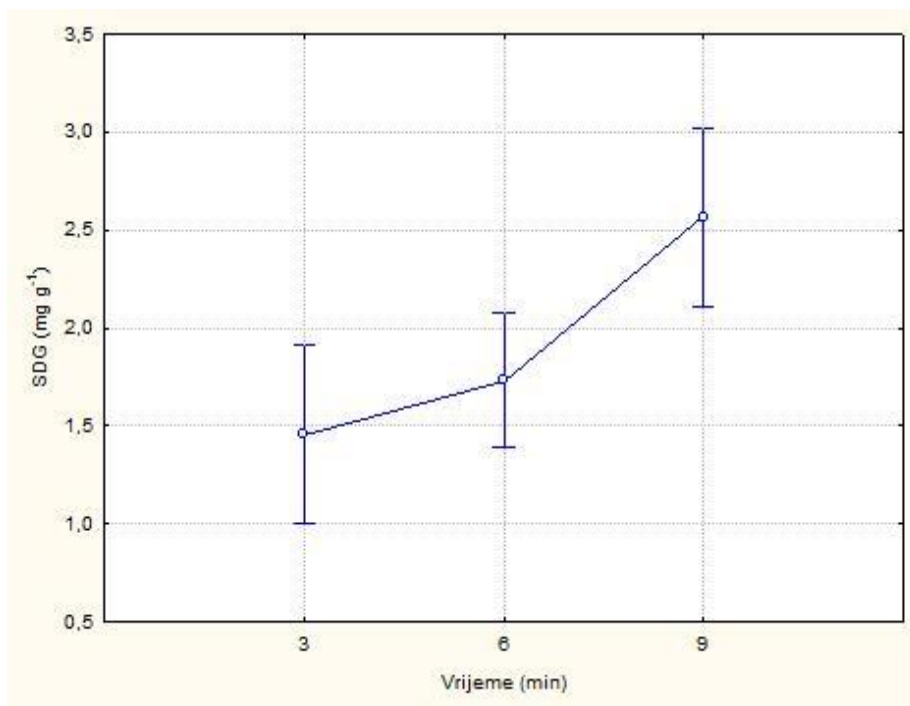
Cvjetko Bubalo i suradnici (2016) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva pokožice grožđa pomoću različitih eutektičkih otapala, kao zelene alternative konvencionalnim otapalima i s iznimno učinkovitim metodom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Koncentracija ekstrahiranih spojeva se razlikovala ovisno o primijenjenom otapalu i primijenjenim uvjetima provedbe postupka ekstrakcije. Najviše koncentracije ukupnih fenolnih spojeva su postignute sa smjesom otapala kolin klorid-oksalne kiseline i 25 % vode, koje se pokazalo kao najpogodnije otapalo u usporedbi s ostalim eutektičkim otapalima, vodom i metanolom, zbog toga što su DES-ovi na bazi organskih kiselina polarniji, što je važno pri ekstrakciji antocijana. Ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom postignut je najveći prinos ukupnih fenolnih spojeva, što se pokazalo kao učinkovitija metoda u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju te mnogo učinkovitija od konvencionalnih metoda ekstrakcije. Također navode da povećana temperatura i duže vrijeme provedbe ultrazvučne ekstrakcije pogoduju ekstrakciji fenolnih spojeva.

Corbin i suradnici (2015) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva uključenih u makromolekularni kompleks lana, ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom te uz 4 različita otapala, vodu, metanol, etanol i butanol. Primijenili su različite molarne koncentracije NaOH u sastavu smjese otapala, vrijeme trajanja i temperaturu provedbe ultrazvučne ekstrakcije. Najveće koncentracije ispitivanih fenolnih spojeva su postignute upotrebom vode s 0.2 N NaOH za hidrolizu SDG-HMA kompleksa, te pri 25 °C i frekvenciji ultrazvuka od 30 kHz nakon 60 minuta. Voda se pokazala kao najučinkovitije otapalo za ekstrakciju svih ciljanih spojeva, a nešto manje koncentracije su postignute s metanolom dok su etanol i butanol

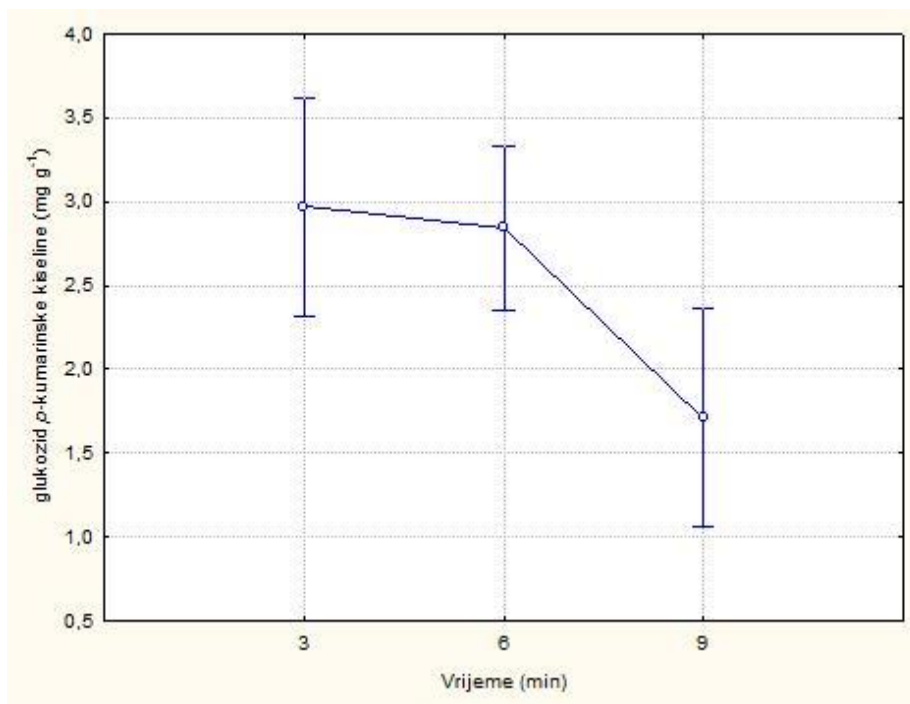
pokazali jako slabi ekstrakcijski prinos. Fizikalne karakteristike otapala uvelike utječu na pojavu kavitacije i raspadanja (kolapsa) nastalih mjehurića. Kavitacijski mjehurići se lakše formiraju upotrebom otapala s visokim tlakom pare (metanol i voda), niskom viskoznošću (metanol i voda) i malom površinskom napetošću (metanol). Drugi važni parametar koji treba uzeti u obzir je topljivost ekstrahiranih spojeva u korištenom otapalu. Ispitivani glukozidi predstavljaju u vodi topljive oblike fenola. Ekstrakcija spojeva iz biljnog materijala izravno je povezana s njegovom polarnošću, te sve navedeno može objasniti da je najbolji ekstrakcijski prinos postignut upotrebom vode i metanola kao otapala. Navode da se vrijeme ekstrakcije, neovisno o primijenjenom otapalu, pokazalo kao važan parametar ekstrakcije fenola pogače lana potpomognute ultrazvukom, te se smanjenjem vremena djelovanja ultrazvuka smanjuje i prinos ekstrakcije. Povećanjem temperature se smanjuju prinosi ekstrakcije, te su najbolji rezultati postignuti pri 25 °C. Smanjenje prinosa ekstrakcije primijećeno povećanjem temperature je najvjerojatnije posljedica degradacije fenolnih spojeva pogače lana pri visokim temperaturama.

Wang i suradnici (2017a) usporedili su ekstrakciju bioaktivnih komponenti (alkaloida, flavonoida i katehina) lišća čaja pomoću ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije refluks zagrijavanjem korištenjem metanola i različitih eutektičkih otapala. Najviše dobivene koncentracije svih ispitivanih spojeva postignute su ultrazvučnom ekstrakcijom i uz eutektičko otapalo nakon 30 minuta.

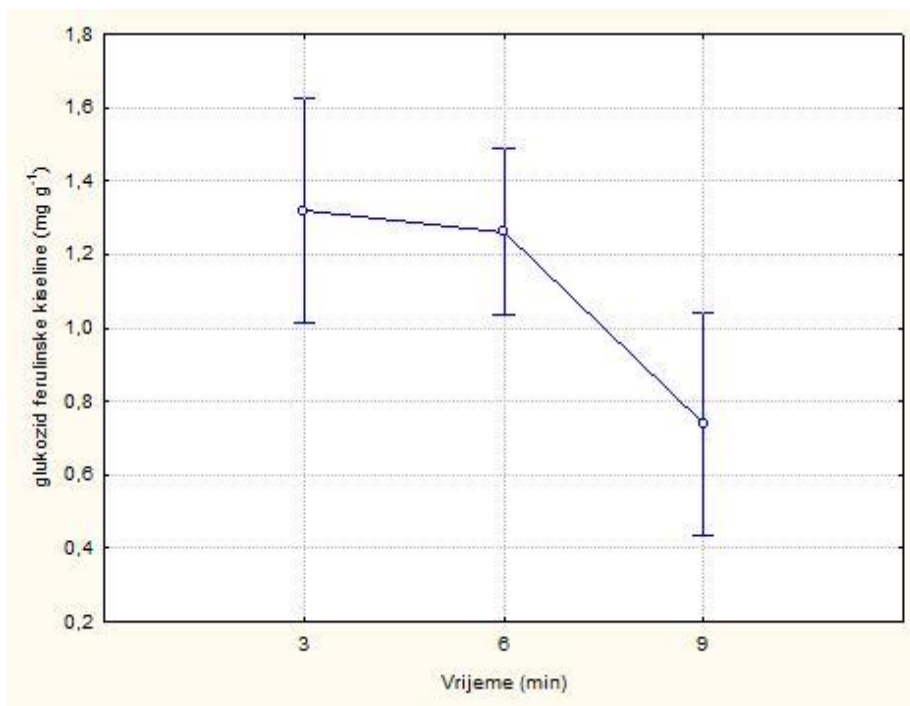
Bosiljkov i suradnici (2016) su u svom istraživanju ispitali utjecaj različitih vrsta DES-a na prinos ekstrakcije antocijana vina. Naveli su da je tip otapala vrlo važan pri ekstrakciji ciljanih spojeva iz matriksa uzorka, temeljen na fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su topljivost, viskoznost, površinska napetost, polarnost i fizikalno-kemijske interakcije. Najviše koncentracije ekstrahiranih spojeva su postignute s najpolarnijim eutektičkim otapalom na bazi šećernih alkohola (kolin klorid-malna kiselina) u kombinaciji s 25 % vode, što je razumljivo s obzirom na polarnost antocijana. Također navode da je veličina čestica uzorka važan čimbenik o kojem ovisi sposobnost ekstrakcije. Ekstrakcijski prinos je veći kod manjih veličina čestica, budući da se skraćuje duljina puta difuzije te povećava dodirna površina između otapala i čestica. Zaključili su da bi upotreba eutektičkih otapala kao zelenih otapala i ultrazvuka kao alternativnog izvora energije mogao biti dobar izbor za dizajn ekoloških metoda ekstrakcije fenolnih komponenata iz biljaka.



Slika 17. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka ($p \leq 0.05$)

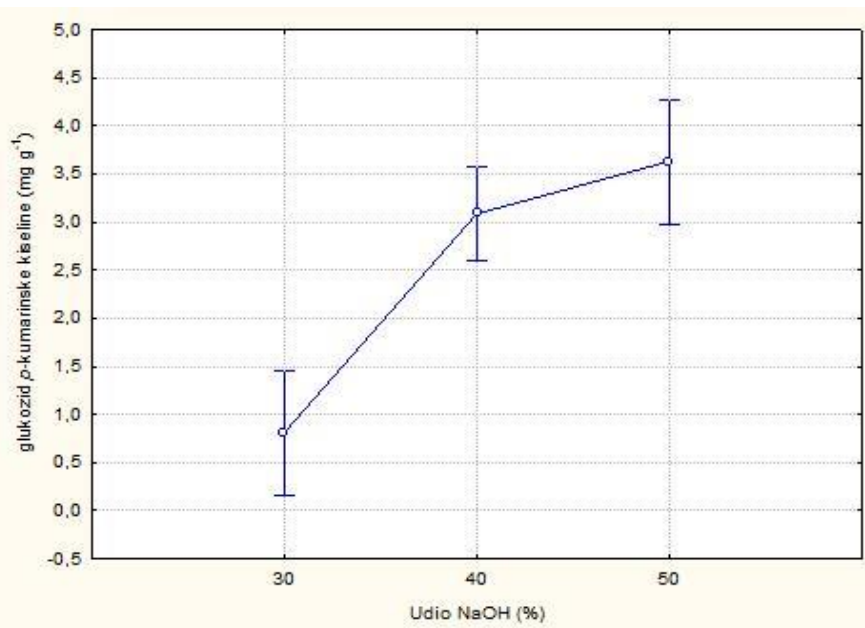


Slika 18. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GPK-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka ($p \leq 0.05$)

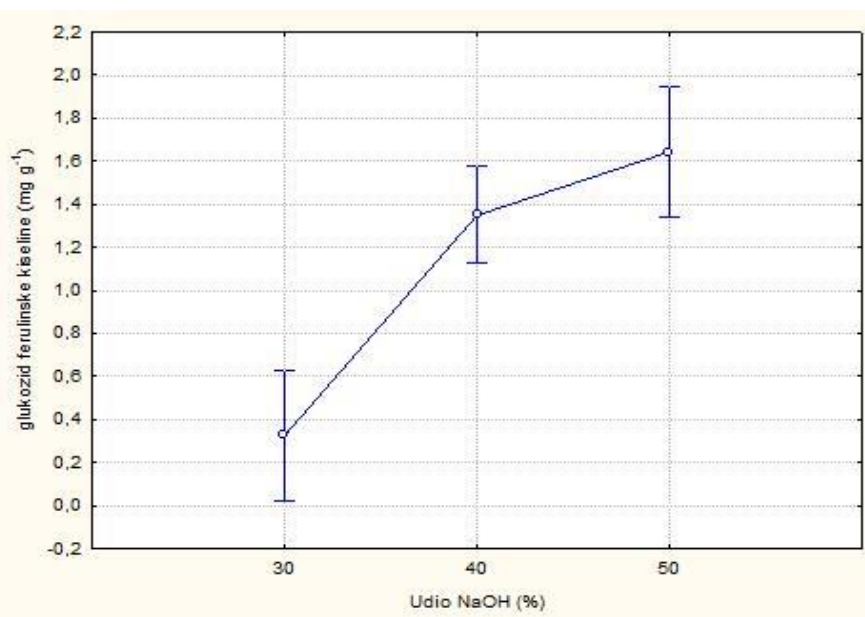


Slika 19. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GFK-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka ($p \leq 0.05$)

Na navedenim grafovima (slika 17, 18 i 19) prikazana je ovisnost koncentracije SDG-a, GPK-a i GFK-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom, dobivena analizom varijance. Uočena je značajna ovisnost koncentracije ekstrahiranih spojeva o vremenu trajanja postupka, neovisno o snazi mikrovalova. Koncentracija SDG-a se povećava s produljenjem vremena, razlike nakon 3 i 6 minuta ekstrakcije su beznačajne, ali se značajno razlikuju od koncentracije dobivene nakon 9 minuta. Nasuprot tome, koncentracije GPK-a i GFK-a se smanjuju produljenjem vremena trajanja ekstrakcije, razlike nakon 3 i 9 minuta su male, ali se značajno razlikuju od koncentracije dobivene nakon 9 minuta.



Slika 20. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GPK-a o udjelu NaOH ($p \leq 0.05$)



Slika 21. Analiza varijance ovisnosti koncentracije GFK-a o udjelu NaOH ($p \leq 0.05$)

Analiza varijance (slika 20 i 21) pokazuje značajnu ovisnost koncentracije GPK-a i GFK-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala korištenog pri ekstrakciji, dok se ovisnost koncentracije SDG-a o udjelu NaOH pokazala statistički beznačajnom. Uočeno je da se prinos ekstrakcije ciljanih fenolnih kiselina pogače lana povećava s povećanjem udjela NaOH, razlike su značajnije između koncentracija dobivenih s 30 % i 40 % NaOH nego između 40 % i 50 %.

5. ZAKLJUČCI

1. Kao najpogodnije eutektičko otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva pogače lana pokazao se kolin klorid:urea:glicerol u omjeru 1:2:2.
2. Mikrovalnom ekstrakcijom najviša koncentracija SDG-a, u iznosu od 2.35 mg g^{-1} , i najviša koncentracija GPK-a, u iznosu od 4.31 mg g^{-1} , ekstrahirane su uz otapalo od 60 % ChCIUGly i 40 % 0.1 M NaOH, kod snage mikrovalova od 100 W i nakon 3 minute ekstrakcije. Najviša koncentracija GFK-a ekstrahirana je uz otapalo od 50 % ChCIUGly i 50 % 0.1 M NaOH, kod snage mikrovalova od 200 W i nakon 6 minuta mikrovalne ekstrakcije, a iznosi 1.94 mg g^{-1} .
3. Ekstrakcijom potpomognutom kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka, najviša koncentracija SDG-a, u iznosu od 3.25 mg g^{-1} i najviša koncentracija GPK-a, u iznosu od 4.34 mg g^{-1} , postignute su uz otapalo od 60 % ChCIUGly i 40 % 0.1 M NaOH, kod snage mikrovalova od 200 W i nakon 6 minuta ekstrakcije. Najviša koncentracija GFK-a postignuta je uz otapala od 50 % ChCIUGly i 50 % 0.1 M NaOH, kod snage mikrovalova od 200 W i nakon 3 minute ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije, a iznosi 2.35 mg g^{-1} .
4. Ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom pomoću eutektičkog otapala, ekstrahirano je 15 % SDG-a, 42 % GPK-a i 46 % GFK-a u odnosu na koncentracije izolirane referentnom metodom, uz značajno skraćanje vremena trajanja ekstrakcije od 95 %.

6. LITERATURA

Alonso Carrilloa, N., Aguilar Santamariab, M.A., Vernon Carterc, E.J., Jiménez Alvaradod, R., Cruz Sosaa, F., Román Guerreroa, A. (2017) Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Ind Crop. Prod.* **103**, 213–221.

Alu'datt, M., Rababah, T., Alhamad, M., Al-Mahasneh, M., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., Alli, I. (2017) A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem.***218**, 99-106.

Alu'datt, M.H., Rababah, T., Ereifej, K., Alli I. (2013) Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chem.***139**, 93-99.

Anonymus 1

http://www.kloraneusa.com/media/catalog/product/cache/2/thumbnail/1000x1194.6902654867/3a6ed9845751693484c1f8e21f938ef3/b/o/botanical-details-flax-fiber-1_5.jpg

Pristupljeno: 1.8.2017.

Barthet, V.J., Klensporf-Pawlik, D., Przybylski, R. (2014) Antioxidant activity of flaxseed meal components. *Can. J. Plant Sci.* **94**, 593-602.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensadeek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.A., Mesnard, F. (2007) Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochem. Anal.* **18**, 275–282.

Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatić, E., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2016) Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* **102**, 195-203.

Bravi, E., Perretti, G., Marconi, O., Patrizi, E., Fantozzi, P. (2011) Secoisolariciresinol diglucoside determination in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil and application to a shelf life study. *Food Chem.***126**, 1553–1558.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Chemat, S., Lagha, A., Amar, H.A., Chemat, F. (2004) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason. Sonochem.***11**, 5-8.

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

Chizoba Ekezie, F.G., Sun, D.W., Cheng, J.H. (2017) Acceleration of microwaveassisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends Food Sci. Tech.* **67**, 160-172.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A, Renouard, S., Blondeau, J.-P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hano, C. (2015) Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* **26**, 176-185.

Cravotto, G., Cintas, P. (2007) The Combined Use of Microwaves and Ultrasound: Improved Tools in Process Chemistry and Organic Synthesis. *Chem. Eur. J.***13**, 1902-1909.

Cvitanić, M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad, Prehrambeno-Biotehnološki fakultet, Zagreb.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.***200**, 159-166.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe.* **99**, 1-12.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chem.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. (2013b) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272-6278.

Durand, E., Villeneuve, P., Lecomte, J., Baréa, B. (2013) Towards a better understanding of how to improve lipase catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 16-23.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.

Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Aman, P. (2003) High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *J. Chromatogr. A.* **1012**, 151–159.

Fontana R.A., Antonioli, A., Bottini, R. (2013) Grace pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization and biotechnological applications of phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8987-9003.

Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, H., Sontag, G. (2013) Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chem.* **138**, 1847–1855.

Gutierrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Sineiro, J., Shene, C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 454-463.

Hall, L.M., Booker, H., Siloto, R.M.P., Jhala, A.M., Weselake, R.J. (2016) Flax (*Linum usitatissimum* L.). U: Industrial Oil Crops, Elsevier Inc., str. 157-194.

Hano, C., Corbin, C., Drouet, S., Quéro, A., Rombaut, N., Savoie, R., Molinié, R., Thomasset, B., Mesnard, F., Lainé, E. (2017) The lignan (+)-secoisolariciresinol extracted from flax hulls is an effective protectant of linseed oil and its emulsion against oxidative damage. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **119**, 1-20. doi:10.1002/ejlt.201600219

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta* **541**, 70-75.

Herchi, W., Arráez-Román, D., Boukhchina, S., Kallel, H., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2012) A review of the methods used in the determination of flaxseed components. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 724-731.

Herchi, W., Arráez-Román, D., Trabelsi, H., Bouali, I., Boukhchina, S., Kallel, H., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2014) Phenolic Compounds in Flaxseed: a Review of Their Properties and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *J. Oleo Sci.* **63**, 7-14.

Johnsson, P. (2004) Phenolic compounds in flaxseed. PhD Thesis. University of agricultural sciences Uppsala.

Kajla, P., Sharma, A., Sood, D.R. (2014) Flaxseed—a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 1857-1871.

Kareem, M. A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2010) Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties. *J. Chem. Eng. Data* **55**, 4632-4637.

Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975– 11992.

Landete, J.M. (2012) Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* **46**, 410-424.

Li, X., Yuan, J.P., Xub, S. P., Wang, J.H., Liu, X. (2008) Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1185**, 223–232.

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha S. (2007) Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Phcog. Rev.* **1**, 7-18.

Mason, J.K., Thompson, L.U. (2014) Flaxseed and its lignan and oil components: they play a role in reducing the risk of and improving the treatment of breast cancer? *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **39**, 663-678.

Morris, D.H., Vaisey-Genser, M. (2003) Flaxseed, U: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, 2 izd., str. 2525-2531.

Nemes, S.M., Orsat, V. (2010) Screening the Experimental Domain for the Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed Prior to Optimization. *Food Bioprocess. Technol.* **3**, 300–307.

Nemes, S.M., Orsat, V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside—Method Development. *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 1219-1227.

Nemes, S.M., Orsat V. (2012) Evaluation of a Microwave-Assisted Extraction Method for Lignan Quantification in Flaxseed Cultivars and Selected Oil Seeds. *Food Anal. Methods* **5**, 551–563.

Obranović, M. (2015) Karakterizacija lanenog ulja inozemnih sorata uljnog lana uzgojenih na području republike Hrvatske. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

- Ogunronbi, O., Jooste, P.J., Abu, J.O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* **35**, 63-79.
- Pag, A.I., Radu, D.G., Draganescu D., Popa M.I., Sirghie C. (2014) Flaxseed cake – a sustainable source of antioxidant and antibacterial extracts. *Cell Chem. Technol.* **48**, 265-273.
- Paiva, A., Craveiro, R., Duarte, A.R.C, Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L. (2014) Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Peng, X., Duan, M.H., Yao, X.H., Zhang, Y.H., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2016) Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **157**, 249-257.
- Pospišil, M. (2013) Ratarstvo II. dio – Industrijsko bilje, Zrinski d.d., Čakovec.
- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) Narodne novine 41, Zagreb
- Przybylski, R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 2, Edible Oil and Fat Products: Edible Oils, (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 281-301.
- Punia, V.D., Raba, M. (2016) Nutritional and medicinal properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*). *Int. J. Farm Sci.* **6**, 213-226.
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., Orlie, V., Lebovka, N.I. (2016) Negative pressure cavitation extraction: A novel method for extraction of food bioactive compounds from plant materials. *Trends. Food Sci. Tech.* **52**, 98-108.
- Ruesgas Ramo, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. (2017) Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3591–3601.

Sharav, O., Shim, Y. Y., Okinyo-Owiti, D., Sammynaiken, R., Reaney J. T. (2013) Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 88-96.

Smith, E.L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.

Struijs, K., Vincken, J.P., Doeswijk, T.G., Voragen, A.G.J., Gruppen, H. (2009) The chain length of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides. *Phytochemistry***70**, 262–269.

Šimetić, S. (2008) Lan u proizvodnji i upotrebi. *Sjemenarstvo***25**, 217-221.

Šrajbek, M. (2017) Izolacija bioaktivnih spojeva iz pogače lana. Diplomski rad, Prehrambeno-Biotehnološki fakultet, Zagreb.

StatSoft Inc. (2008) STATISTICA (data analysis software system), verzija 8. <http://www.statsoft.com/>.

Tang, B., Zhang, H., Row, K. (2014) Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.***38**, 1053-1064

Teh, S., Niven, B., Bekhit, A., Carne, A., Birch, J. (2015) Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake (*Linum usitatissimum* L.) using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.***24**, 1649-1659.

Wang, H., Wang, J., Qiu, C., Ye, Y., Guo, X., Chen, G., Li, T., Wang, Y., Fu, X., Liu, R.H. (2016) Comparison of Phytochemical Profiles and Health Benefits in Fiber and Oil Flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.***214**, 227-233.

Wang, L., Weller, L.C. (2006) Recent advances in extraction of nutraceutical from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312.

Wang, M., Wang, J., Zhou, M., Xia, Q., Bi, W., Yong Chen, D.D. (2017a) Eco-friendly mechanochemical extraction of bioactive compounds from plants with deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **5**, 6297-6303.

Wang, T., Jiao, J., Gai, Q.Y., Wang, P., Guo, N., Nui, L.L., Fu, Y.J. (2017b) Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica L.*) leaves using deep eutectic solvents. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **145**, 339-345.

Yuan, J.P., Li, X., Xu, S.P., Wang, J.H., Liu, X. (2008) Hydrolysis kinetics of Secoisolariciresinol diglucoside oligomers from flaxseed. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10041–10047.

Zainal Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Natesan, J.S. (2017) New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents. *Anal. Chim. Acta.* **979**, 1-23.

Zhang, Q., Vigier, K.D., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.

Zhou, T., Xiao, X.H., Wang, J.Y., Chen, J.L., Xu, X.F., He, Z.F., Li, G.K. (2011) Evaluation of microwaveassisted extraction for aristolochic acid from *Aristolochiae Fructus* by chromatographic analysis coupled with nephrotoxicity studies. *Biomed. Chromatogr.* **26**, 166–171.

Zhang, Z., Li, D., Zhang, L., Liu, Y., Wang, X. (2013) Heating effect on the DSC melting curve of flaxseed oil. *J. Therm. Anal. Calorim.* **115**, 2129-2135.