

# Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti dobivenih ekstrakata lista masline nakon visokonaponskog pražnjenja

---

Poljanec, Andreja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:206544>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Andreja Poljanec

1100/PI

**ODREĐIVANJE FENOLNIH  
SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNE  
AKTIVNOSTI DOBIVENIH  
EKSTRAKATA LISTA MASLINE  
NAKON VISOKONAPONSKOG  
PRAŽNENJA**

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „*Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa "zelenim otapalima" primjenom visokonaponskog pražnjenja*“ (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak uz pomoć prof. dr. sc. Jasenke Gajdoš Kljusarić, dr. sc. Predraga Putnika, mag. nutr. Marinele Nutrizio te na Odsjeku zajedničke analitičke tehnike na Zdravstveno-ekološkom odjelu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije uz pomoć dr. sc. Igora Dubrovića.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na svoj njezinoj pomoći, prenesenim znanstvenim i stručnim savjetima, strpljenju, razumijevanju i izuzetnoj suradnji tijekom izrade rada. Također, veliko hvala prof. dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na izdvojenom vremenu i pristupačnosti te dr. sc. Igoru Dubroviću i dr. sc. Predragu Putniku na pomoći u tehnološkoj izvedbi diplomskog rada. Hvala Pauli Žurga i Renati Fajfer koje su određivale metale.

Hvala najboljem bratu Karlu koji me podržavao i svojim osobnim uspjesima dodatno motivirao.

Hvala Viktoru koji je uvijek bio uz mene, na pruženoj podršci, prijateljstvu i ljubavi tijekom studiranja.

Najveće hvala mojim roditeljima, Jasminki i Zdravku, koji su mi ovo omogućili i bez kojih sve što sam dosad postigla ne bi bilo moguće. Hvala vam što nikad niste prestali vjerovati u moj uspjeh!

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI DOBIVENIH EKSTRAKATA LISTA MASLINE NAKON VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA

*Andreja Poljanec, 1100/PI*

**Sažetak:** Listovi masline smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visokovrijednih bioaktivnih spojeva, s potencijalnom primjenom u prehrambenoj industriji. Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi učinak visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED), kao zelene metode ekstrakcije, na efikasnost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline te usporediti HVED metodu s konvencionalnom metodom ekstrakcije. HVED tretman provodio se kroz različito vrijeme (3 i 9 min), u različitim zelenim otapalima (voda, etanol), radnim plinovima (dušik, argon) i pri različitim naponima (15, 20, 25 kV). Fenolni spojevi određeni su pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s detekcijom masene spektrometrije (UPLC-MS/MS), dok su udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost određeni spektrofotometrijski. Prikazani su i rezultati blisko-infracrvene (NIR) spektroskopije i veličine čestica ekstrakta lista masline. Najveći prinos fenolnih spojeva uočen je u uzorku tretiranom argonom, 9 min, 20 kV i u 50 %-tnoj otopini etanola. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom bila je veća u HVED tretiranim uzorcima, dok DPPH i ORAC metoda nisu pokazale značajnu razliku nakon HVED tretmana. Razvijeni su i regresijski modeli za predviđanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti sličnih uzoraka na temelju analitičkih podataka i NIR spektroskopije.

**Ključne riječi:** visokonaponsko pražnjenje, list masline, antioksidacijska aktivnost, zelena otapala, održivost

**Rad sadrži:** 80 stranica, 19 slika, 15 tablica, 84 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** *prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić*  
*dr. sc. Igor Dubrović, dipl. ing.*  
*dr. sc. Predrag Putnik*  
*Marinela Nutrizio, mag.nutr.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. Prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*
3. Prof. dr. sc. *Mara Banović*
4. Doc. dr. sc. *Marija Badanjak Sabolović* (zamjena)

**Datum obrane:** 20. rujan 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM OLIVE LEAVES BY MEANS OF HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES

*Andreja Poljanec, 1100/PI*

**Abstract:** Olive leaves are considered as a cheap raw material which can be used as a source of valuable bioactive compounds, with potential application in food industry. The aim of this study was to evaluate high voltage electrical discharges (HVED) as a green technology, in order to establish the effectiveness phenolic extraction from olive leaves and compare HVED method with conventional extraction. HVED processing parameters were: treatment time (3 and 9 min), different green solvents (water, ethanol), working gases (nitrogen, argon) and voltages (15, 20, 25 kV). Individual phenolic compounds were characterized by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS), while the content of total phenolics and antioxidant activity were determined spectrophotometrically. Results for Near infrared (NIR) spectroscopy and particle size of olive leaves extract were also reported. The highest yield of phenolic compounds was obtained for the sample treated with argon, 9 min, 20 kV and 50 % solution of ethanol. Antioxidant activity determined by FRAP method was higher in HVED treated samples, while DPPH and ORAC method showed no significant difference upon the HVED treatment. Regression models were developed for prediction total phenolic content and antioxidant activity of similar samples based on analytical data and NIR spectroscopy.

**Keywords:** highvoltage electrical discharge, olive leaf, antioxidative activity, green solvents, sustainability

**Thesis contains:** 80 pages, 19 figures, 15 tables, 84 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:** *Ph.D. Anet Režek Jambrak, Full professor*

**Technical support and assistance:** *Ph.D. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full Professor*

*Ph.D. Igor Dubrović, MSc*

*Ph.D. Predrag Putnik*

*Marinela Nutrizio, MSc*

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. Ph.D. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. Ph.D. *Mara Banović*, Full professor
4. Ph.D. *Marija Badanjak Sabolović*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 20<sup>th</sup> September 2019

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Maslina ( <i>Olea europea</i> L.).....	2
2.1.1. Kemijski sastav lista masline .....	3
2.2. Fenolni spojevi.....	3
2.2.1. Fenolni spojevi masline .....	4
2.3. Antioksidacijska aktivnost.....	6
2.3.1. Reaktivni spojevi kisika i dušika.....	7
2.4. Konvencionalna i nekonvencionalna ekstrakcija .....	8
2.4.1. Ekstrakcija „zelenim otapalima“ .....	9
2.5. Visokonaponsko električno pražnjenje.....	11
2.5.1. Fenomen elektroporacije.....	12
2.6. Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija.....	13
2.7. Analiza glavnih komponenti – PCA analiza .....	15
2.8. Regresija glavnih komponenti – PCR analiza.....	15
2.9. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s detekcijom masene spektrometrije (UPLC-MS/MS, ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.1.1. Uzorci .....	17
3.1.2. Aparatura i pribor .....	17
3.1.3. Kemikalije i reagensi.....	18
3.2. Metode rada .....	21
3.2.1. Priprema ekstrakata .....	21
3.2.2. Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem (HVED) i konvencionalna ekstrakcija.....	23
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola.....	24
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	26
3.2.5. Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija.....	31
3.2.6. UPLC-MS/MS metoda .....	32
3.2.7. Određivanje veličine čestica i indeksa polidisperzije DLS metodom.....	36
3.2.8. Određivanje prinosa ekstrakcije .....	36
3.2.9. Statistička obrada podataka.....	37
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	38
4.1. Određivanje ukupnih fenola.....	39
4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	42
4.2.1. FRAP metoda.....	42
4.2.2. DPPH metoda .....	44



4.2.3. ORAC metoda.....	46
4.3. Prinos ekstrakcije.....	47
4.4. UPLC-MS/MS metoda.....	49
4.5. NIR spektroskopija.....	54
4.6. PCA analiza – analiza glavnih komponenti.....	57
4.7. PCR analiza – regresija glavnih komponenti.....	63
4.8. Veličina čestica i indeks polidisperzije.....	66
4.9. Statistička obrada podataka.....	67
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>71</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>73</b>

# 1. UVOD

Maslina je mediteranska biljka koja raste na suhim i sunčanim mjestima te je široko rasprostranjena u Hrvatskoj. Listovi masline su nusproizvod proizvodnje maslinovog ulja zbog čega predstavljaju bogat i jeftin izvor fenolnih spojeva, odnosno polifenola. Pripisuju im se brojna ljekovita svojstva koja potječu od raznovrsnih polifenola od kojih je najznačajniji oleuropein. Polifenoli djeluju antioksidativno na način da neutraliziraju slobodne radikale koji imaju štetno djelovanje, donirajući im atom vodika ili prenoseći jedan elektron da bi reducirali metalne ione i radikale. Neki polifenoli u ekstraktu lista masline inhibiraju rast patogenih bakterija (npr. *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) te imaju mnoga pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje. Iz tih razloga postoji veliki interes za ekstrakcijom polifenola iz lista masline. Danas postoje različite metode ekstrakcije koje se koriste za izolaciju polifenola iz lista masline, a trenutni glavni način uključuje klasične metode koje su dugotrajne, koriste visoke temperature i organska otapala štetna po okoliš. Kako bi se prevladali nedostaci ovih metoda, razvijaju se nove metode ekstrakcije koje karakterizira kratko trajanje te korištenje niskih temperatura (do 35 °C) i zelenih otapala. Upravo takva nova metoda je hladna plazma, odnosno visokonaponsko električno pražnjenje. Plazma predstavlja četvrto agregatno stanje materije te se definira kao djelomično ili potpuno ionizirajući plin, sastavljen od nabijenih čestica (elektrona, iona) i neutralnih čestica (atoma, molekula), slobodnih radikala i fotona UV zračenja.

Cilj istraživanja bio je odrediti kako tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem utječe na antioksidacijsku aktivnost i polifenolni sastav ekstrakata lista masline, pri čemu su se kao radni plinovi koristili argon i dušik. Da bi se utvrdile promjene u strukturi ispitivanih ekstrakata, provedena je blisko-infracrvena spektroskopija, a za ispitivanje točne koncentracije određenih polifenolnih spojeva korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s detekcijom masene spektrometrije (UPLC-MS/MS). Krajnji cilj bio je usporediti ekstrakciju potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem, kao nekonvencionalnu metodu ekstrakcije, s konvencionalnom metodom, odnosno maceracijom te utvrditi prednosti i nedestruktivan učinak visokonaponskog električnog pražnjenja na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista masline.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MASLINA (*Olea europaea* L.)

Maslina (*Olea europaea* L.) (Slika 1.) je dugogodišnja zimzelena biljka iz porodice Oleaceae (Vogel i sur., 2015). Pojavljuje se kao zeleni grm s trnovitim granama, može narasti do 8 metara (Ašič, 1999), a kora stabla je sivkaste boje (Yaseen Khan i sur., 2007). Iako se maslina danas uzgaja u različitim dijelovima svijeta, 98 % svjetskog usjeva raste u mediteranskim zemljama gdje joj pogoduje mediteranska klima s toplim, suhim ljetima te hladnim i kišovitim zimama. Glavni proizvod dobiven iz stabla masline je maslinovo ulje. Godišnje se proizvede oko 11 milijuna tona maslinovog ulja (Vogel i sur., 2015).

U priobalnom području Hrvatske najraširenija voćna kultura je upravo maslina i zauzima površinu od oko 27000 ha (Strikić i sur., 2007). Iako je u uzgoju prisutan veliki broj sorta, najzastupljenija sorta je Oblica koja čini 75 % ukupnih stabala masline u Hrvatskoj (Strikić, 2015).



Slika 1. Maslina (*Olea europaea* L.) (Joles, 2018).

Listovi masline su kožasti, s donje su strane zbog malih ljuskica srebrnasti ili lagano smečkasti, a s gornje strane plavo-zeleni. Cvjetovi su bijeli i zvonasti, a rastu u grozdastom obliku. Boja ploda ovisi o vrsti pa tako imamo zelenu, smeđu, tamnocrvenu, ljubičastu i crnu maslinu (Ašič, 1999). Listovi masline su nusproizvod u proizvodnji maslinovog ulja te na njih otpada 10 % od ukupne ubrane mase masline. Koriste se za prevenciju i liječenje hipertenzije te se smatra da imaju antiseptička i diuretička svojstva (Ferreira i sur., 2007). List je primarno mjesto biljnog metabolizma zbog čega predstavlja potencijalni izvor biološki aktivnih komponenti (Abaza i sur., 2015). Ekstrakti lista masline imaju sve veću primjenu u medicini, farmaceutskoj i

kozmetičkoj industriji te u prehrambenoj industriji gdje se koriste za produljenje trajnosti hrane i u razvoju funkcionalnih proizvoda. Tijekom proizvodnje ulja, listovi masline se miješaju s prezrelim maslinama kako bi se dobilo ulje boljeg okusa (Talhaoui i sur., 2014). Ekstrakt lista masline pokazao je antimikrobna svojstva protiv različitih patogena koji uzrokuju intestinalne i respiratorne infekcije kod ljudi, od kojih su najznačajniji *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* i *Escherichia coli* (Khan i sur., 2007).

### 2.1.1. Kemijski sastav lista masline

Kemijski sastav lista masline varira ovisno o podrijetlu, udjelu grančica, uvjetima skladištenja, klimatskim uvjetima, sadržaju vlage, stupnju onečišćenja tla te o primijenjenim procesima prerade (sušenje i ekstrakcija) (Vogel i sur., 2015).

List masline čine ugljikohidrati, ulja, sirovi proteini, vlakna, anorganski spojevi te drugi sekundarni biljni metaboliti (Skaltsounis i sur., 2015). Udio sirovih proteina kreće se od 9,5 do 12,9 %. Listovi masline bogati su aminokiselinama argininom, leucinom, prolinom, glicinom, valinom i alaninom, a siromašni cisteinom, metioninom i lizinom. Najveći udio hemiceluloznih vlakana čine ona arabinoznog tipa, dok je u grančicama pretežito zastupljena manoza (Vogel i sur., 2015). Za biološku vrijednost zaslužni su fenolni spojevi. Od ostalih spojeva prisutni su pentaciklički triterpeni, hidroksiterpenske kiseline, palmitinska kiselina, skvaleni, steroli,  $\alpha$ -tokoferol i beta-karoten, alkoholi, voskovi te triacilgliceroli (Skaltsounis i sur., 2015). Alcázar Román i sur. (2014) proveli su istraživanje u kojem su dokazali da su od mineralnih tvari najzastupljeniji kalcij i kalij, a osim njih i željezo, mangan, fosfor i sumpor.

## 2.2. FENOLNI SPOJEVI

Odavno su biljke ljudima služile kao izvor tvari koje imaju ljekovito djelovanje. U prošlom stoljeću prirodna se medicina proširila i provedena su brojna istraživanja aktivnih sastojaka bilja. Te su komponente poznate kao sekundarni biljni metaboliti i posjeduju visoka antioksidativna, antimikrobna, antivirusna i protuupalna svojstva. Spomenuti sekundarni metaboliti, zbog visoke antioksidativne aktivnosti, služe za uklanjanje štetnih slobodnih radikala koji se metaboliziraju u ljudskom organizmu zbog izloženosti kemijski raznovrsnim zagađivačima okoliša, uključujući pesticide, toksične kemijske otpade, zračenje i fizički stres. Slobodni radikali smatraju se primarnim uzrokom određenih ljudskih bolesti kao što su npr.

bolesti srca i kardiovaskularne bolesti, rak, starenje i bolesti povezane s imunološkim sustavom (Altiok i sur., 2008).

Fenolni spojevi ili polifenoli čine jednu od najbrojnijih skupina sekundarnih biljnih metabolita te su sastavni dio ljudske prehrane. Mogu se sastojati od jednostavnih molekula (npr. fenolne kiseline) do visokopolimeriziranih spojeva (npr. tanini). Kemijsku strukturu fenolnih spojeva čini barem jedan aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. U prirodi se uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, odnosno u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilne skupine, a vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida i oligosaharida. Najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza (Bravo, 1998). Prema kemijskoj strukturi fenolni spojevi se dijele na flavonoide i neflavonoide.

U skupinu neflavonoidnih spojeva ubrajaju se fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), kumarini, tanini i stilbeni. Flavonoidi su jedni od najznačajnijih polifenolnih spojeva čija se struktura sastoji od difenilpropanskog kostura (C6-C3-C6) građenog od dva aromatska prstena (A i B) povezana s 3 ugljikova atoma koji tvore oksidirani heterociklički prsten (prsten C). Flavonoidi se dijele na flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine, izoflavone, flavane itd. (Bravo, 1998).

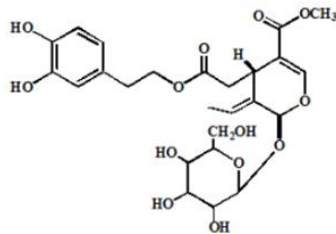
### 2.2.1. Fenolni spojevi masline

Zbog toga što su nusproizvod proizvodnje maslinovog ulja, listovi masline se smatraju jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visoko vrijednih fenolnih spojeva. Zbog prisutnosti brojnih fenolnih spojeva, ekstrakti listova masline imaju antitumorsko, antioksidativno, antimikrobno, antivirusno, protuupalno i hipolipidemijsko djelovanje. Fenolni spojevi prisutni u listu masline su brojni i različite prirode. Glavne fenolne skupine prisutne u listu masline su oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid), flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin), flavonoli (rutin), flavan-3-oli (katehin) i supstituirani fenoli (tirosol, hidroksitirosol, vanilin, vanilinska kiselina i kafeinska kiselina) (Putnik i sur., 2018). Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline izražen u ekvivalentu troloxa (TEAC, engl. trolox equivalent antioxidant capacity) (prema Benavente-Garcia i sur., 2000).

<b>Fenolni spojevi</b>	<b>TEAC (mmol L<sup>-1</sup>)</b>
Rutin	2,75 ± 0,05
Katehin	2,28 ± 0,04
Luteolin	2,25 ± 0,11
Hidroksitirozol	1,57 ± 0,12
Diosmetin	1,42 ± 0,07
Kafeinska kiselina	1,37 ± 0,08
Verbaskozid	1,02 ± 0,07
Oleuropein	0,88 ± 0,09
Luteolin-7-glukozid	0,71 ± 0,04
Vanilinska kiselina	0,67 ± 0,09
Diosmetin-7-glukozid	0,64 ± 0,09
Apigenin-7-glukozid	0,42 ± 0,03
Tirosol	0,35 ± 0,05
Vanilin	0,13 ± 0,01

Koncentracija polifenolnih spojeva u listovima maslina mijenja se ovisno o kvaliteti, podrijetlu i sorti masline (Campeol i sur., 2003), a najzastupljeniji polifenol u listovima masline je oleuropein (Benavente-García i sur., 2000; Sabry, 2014), iza kojeg slijede hidroksitirozol, luteolin, apigenin i verbaskozid (Sabry, 2014). Oleuropein (Slika 2.) je sekoiridoidni spoj u kojem su zastupljene monoterpenska i orto-difenolna struktura. Hidrolitičkim cijepanjem oleuropeina nastaje elenolna kiselina čije kalcijeve soli posjeduju antivirusno djelovanje. Smatra se da je upravo oleuropein jedan od važnijih spojeva koji su odgovorni za gorak okus masline i lišća masline. Zaslužan je i za hipotenzivno i antimikrobno djelovanje ekstrakta masline te sprječava oksidaciju štetnog LDL-a (Khan i sur., 2007). Oleuropein i njegovi derivati imaju različite biokemijske uloge, uključujući antiaritmičko djelovanje (Salah i sur., 2012).



Slika 2. Kemijska struktura oleuropeina (Sabry, 2014).

### 2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi su spojevi koji imaju važnu ulogu u zaštiti od štetnog djelovanja slobodnih radikala na način da neutraliziraju već nastale slobodne radikale ili sprječavaju njihovo nastajanje. To mogu biti enzimi ili neenzimske molekule kao što su npr. fenoli, glutation i askorbinska kiselina koji mogu biti važni u prevenciji različitih bolesti (Shi i sur., 2001).

Antioksidansi mogu ugasiti slobodne radikale na dva načina, HAT i SET mehanizmom. HAT (engl. hydrogen atom transfer) mehanizam uključuje transfer vodika, odnosno antioksidansi hvataju slobodne radikale donirajući atom vodika, dok SET (engl. single electron transfer) podrazumijeva transfer jednog elektrona, tj. antioksidansi prenose jedan elektron da bi reducirali metalne ione, radikale i karbonile. SET i HAT mehanizam razlikuju se u kinetici, a krajnji rezultat je isti. Glavni čimbenici koji određuju koji od ova dva mehanizma će se odvijati, su energija veze vodik-donorske skupine i ionizacijski potencijal. Oba se mehanizma gotovo uvijek pojavljuju zajedno, a njihov omjer je određen strukturom antioksidansa i pH vrijednošću. SET reakcija ovisi o deprotoniranju i ionizacijskoj energiji reaktivne funkcionalne skupine. Elektron-donorski kapacitet funkcionalne skupine raste povećanjem pH, čime raste i zastupljenost SET mehanizma (Prior i sur., 2005).

Najčešće metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti hrane, pića i drugih kompleksnih uzoraka su spektrofotometrijske metode koje se temelje na spektrofotometrijskom praćenju promjene koncentracije reaktanata ili produkata u reakciji antioksidanasa sa slobodnim radikalima. Primjer spektrofotometrijskih metoda koje se baziraju na SET mehanizmu, su FRAP (engl. fluorescence recovery after photobleaching), TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FCR (Folin-Ciocalteu reagent) metoda. One mjere redoks reakciju, odnosno redukciju fluorescentne probe koja označava kraj reakcije. ORAC (engl. oxygen radical absorbance capacity) i TRAP (engl. total

radical-trapping antioxidant parameter) metode su dvije standardizirane metode temeljene na HAT reakcijskom mehanizmu. Iako se DPPH i TEAC metoda svrstavaju pod metode koje se baziraju na SET mehanizmu, mogu se temeljiti i na HAT mehanizmu (Prior i sur., 2005).

### 2.3.1. Reaktivni spojevi kisika i dušika

Slobodni radikali u vanjskoj ljusci sadrže nespareni elektron te su zbog toga vrlo reaktivni. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Reaktivni spojevi kisika (ROS, engl. reactive oxygen species) i reaktivni spojevi dušika (RNS, engl. reactive nitrogen species) jedni su od najznačajnijih skupina slobodnih radikala. Štetne reaktivne kisikove čestice (ROS) u maloj količini nastaju u svim aerobnim organizmima, a pojačano se stvaraju u uvjetima stresa. Velike količine ili nedovoljno učinkovito uklanjanje ROS-a, dovodi do oksidacijskog stresa koji može uzrokovati metaboličke poremećaje i oštetiti biološke makromolekule. Iako niske koncentracije ROS-a imaju važnu ulogu u procesima poput unutarstanične signalizacije, proliferacije, apoptoze, imunološkog odgovora i obrane od mikroorganizama (Štefan i sur., 2007), kisikovi radikali mogu uzrokovati i lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina te oksidirati skoro svaku organsku molekulu (McCord, 2000). Isto tako, slobodni radikali uzrokuju mutacije, kromosomske aberacije i kancerogenezu. Antioksidansi, koji mogu neutralizirati slobodne radikale, od velike su važnosti u prevenciji spomenutih bolesti. Izravnom reakcijom sa slobodnim radikalima, antioksidansi štite lipidne molekule od oksidacijskoga oštećenja (Štefan i sur., 2007).

Reaktivni spojevi kisika su ioni ili vrlo male molekule koje uključuju ione kisika, slobodne radikale, perokside te druge anorganske i organske spojeve. Najčešći ROS su superoksid ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HClO$ ) i hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ). Uz reaktivne kisikove spojeve, vrlo su važni reaktivni dušikovi spojevi, od kojih su najznačajniji dušikov monoksid ( $NO\cdot$ ) i dušikov dioksid ( $NO_2\cdot$ ).  $NO\cdot$  radikal može reagirati sa superoksidnim radikalom te na taj način stvarati peroksinitrite ( $ONOO^-$ ).  $ONOO^-$  su vrlo jaki oksidansi te se pri kiselome pH-u razgrađuju do hidroksilnih radikala (Štefan i sur., 2007).



## 2.4. KONVENCIONALNA I NEKONVENCIONALNA EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari na osnovu njene topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Predstavlja brzu i učinkovitu metodu razdvajanja i koncentriranja tvari (Dai i Mumper, 2010; Talhaoui i sur., 2015).

Gotovo svi industrijski procesi proizvodnje zahtijevaju neku vrstu ekstrakcije tijekom koje se koriste velike količine organskih otapala. Većina organskih otapala je zapaljiva, hlapljiva i često toksična te odgovorna za stvaranje efekta staklenika i onečišćenje okoliša. Konvencionalne metode ekstrakcije koriste organska otapala, dugotrajne su, troše puno energije i provode se pri visokoj temperaturi (Chemat i sur., 2012). Hlapljiva organska otapala čine gotovo 2/3 svih industrijskih emisija u cijelom svijetu, a njihovo recikliranje i ponovna uporaba povezana je s energetski zahtjevnom destilacijom uz značajne gubitke (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Uobičajene metode ekstrakcije, kao što su primjerice Soxhlet ekstrakcija ili maceracija koja je korištena kao kontrolna metoda ekstrakcije u ovom istraživanju, pokazale su nisku učinkovitost i potencijalno zagađenje okoliša jer ih karakterizira dugo vrijeme ekstrakcije i korištenje organskih otapala (Dai i Mumper, 2010). Zbog navedenih razloga, potrebna je zamjena organskih otapala zelenim otapalima, kao što su npr. ionske kapljevine koje bi svojim svojstvima mogle biti dobra zamjena konvencionalnim otapalima.

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala najčešće je prvi korak u izolaciji polifenolnih spojeva, koji se zatim upotrebljavaju u pripremi funkcionalne hrane, dodataka prehrani te farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Polifenoli se mogu ekstrahirati iz svježeg, smrznutog ili sušenog biljnog uzorka. Prije ekstrakcije, biljke se obično obrađuju mljevenjem, drobljenjem i homogenizacijom, kojima može prethoditi sušenje na zraku ili sušenje zamrzavanjem (liofilizacija). Sušenje zamrzavanjem rezultira boljom ekstrakcijom polifenola u biljnim uzorcima, u usporedbi sa sušenjem na zraku (Dai i Mumper, 2010). Asami i sur. (2003) provedli su istraživanje koje je pokazalo da su kukuruz, kupine i jagode, koje su prije ekstrakcije liofilizirane, imale veću koncentraciju ukupnih polifenolnih spojeva, za razliku od onih koje su sušene na zraku.

Budući da su polifenolni spojevi u pravilu termolabilni, ekstrakcija koja se provodi pri nižim temperaturama, odnosno nekonvencionalna ekstrakcija, poželjna je za njihovu daljnju uporabu u farmaceutskoj, prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji. Isto tako, važno je optimizirati i parametre koji utječu na proces ekstrakcije. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakte lista masline je potrebno pročititi, budući da u biljnim ekstraktima mogu postojati mnogi drugi

spojevi, kao što su npr. šećeri, proteini ili metali (Altiok i sur., 2008). Neki od primjera nekonvencionalnih netoplinskih metoda ekstrakcije su procesiranje hrane visokim tlakom, ultrazvukom, pulsirajućim električnim poljem, supektritičnim fluidima te visokonaponskim električnim pražnjenjem (Putnik i sur., 2018).

#### 2.4.1. Ekstrakcija „zelenim otapalima“

Zelena ekstrakcija se definira kao proces koji se bazira na pronalaženju i dizajniranju procesa ekstrakcije kojima će se omogućiti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda, smanjiti potrošnja energije te osigurati ekološki prihvatljiv i visoko kvalitetan ekstrakt (Chemat i sur., 2012).

Kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije, utvrđena su tri glavna rješenja za dizajniranje i vođenje laboratorijskih i industrijskih procesa zelene ekstrakcije, a to su:

1. poboljšanje i optimizacija postojećih procesa
2. korištenje nenamjenske opreme
3. inovacije u procesima i postupcima te inovacije u otkrivanju novih otapala (Chemat i sur., 2012).

Osmišljeno je šest principa zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda koji predstavljaju smjernice za industrijsku uspostavu zelene ekstrakcije. Principi su nabrojani u Tablici 2. i objašnjeni u nastavku.

Tablica 2. Principi zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2012).

1	Pronalazak novih izvora biljnih materijala i uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala.
2	Uporaba alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora.
3	Smanjenje potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija.
4	Proizvodnja nusprodukata, umjesto otpada, kako bi se obuhvatila bio- i agroindustrija prerade.
5	Smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa.
6	Usmjerenje k proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata.

Kod procesa zelene ekstrakcije, preporučuje se upotreba potpuno obnovljivih izvora kojima je omogućen intenzivan *in vivo* ili *in vitro* uzgoj. Zelena otapala trebala bi biti kemijski i fizikalno stabilna, laka za upotrebu, niske hlapljivosti te bi se trebala moći jednostavno reciklirati, a isto tako bi trebala biti sigurna za radnike i okoliš. Iz tog se razloga, voda, superkritični CO<sub>2</sub>, otapala iz prirodnih izvora (npr. etanol, glicerol, terpeni) i otapala na bazi organskih soli (npr. ionske tekućine) smatraju zelenim otapalima. Optimizacijom postojećih procesa, ponovnom upotrebom energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, poboljšanjem postojećih procesa i primjenom potpuno inovativnog izvora energije značajno se smanjuje potrošnja energije (npr. upotreba topline oslobođene tijekom kondenzacije para). Zelenom ekstrakcijom proizvodi se niz ciljanih produkata iz određenog izvora, za razliku od tradicionalnog pristupa koji je dizajniran tako da se dobije samo jedan proizvod. Ekstrakcija prirodnih produkata sastoji se od nekoliko procesa, a smanjenje broja operacija u procesnom lancu dovodi do smanjenja troškova. Industrije koje koriste spomenutu ekstrakciju (npr. industrija hrane, parfema, kozmetike, lijekova) trebale bi poboljšati postojeće procese sa sigurnijim i čistijim protokolom ekstrakcije (razvoj nove opreme, smanjen broj operacija, štednja energije i sirovina, kontrola sigurnosti procesa, smanjenje otpada i učinka na okoliš). Ekstrakt mora zadovoljiti niz kriterija kvalitete kako bi zadovoljio zahtjeve tržišta i propise. Ekstrakti moraju biti dobiveni iz precizno utvrđenih sirovina, moraju imati točna fizikalno-kemijska svojstva, moraju biti pravilno skladišteni te ne smiju sadržavati zagađivače kao što su ostatci pesticida, teški metali, mikotoksini itd. (Chemat i sur., 2012).

Najčešće „zeleno otapalo“ je etanol, koji se dobiva fermentacijom biljnih materijala bogatih šećerom, poput šećerne repice ili žitarica. Etanol je jeftin, potpuno biorazgradiv, lako dostupan i visoke čistoće, pa se, bez obzira na to što je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, često koristi kao otapalo za ekstrakciju. Također, etanol dobro ekstrahira polarne komponente iz biljnog materijala (Chemat i sur., 2012).

Voda je najrasprostranjenija molekula i univerzalno otapalo, sigurna je i ne predstavlja opasnost za ljude i okoliš, zbog čega se koristi kao otapalo u različitim procesima (Anastas i Eghbali, 2010). Zbog svoje polarnosti često se upotrebljava za ekstrakciju spojeva koji su topljivi u vodi, poput proteina, šećera i organskih kiselina, a isto tako i anorganskih tvari. Ubrzana ekstrakcija vrućom vodom (PHWE, engl. pressurized hot water extraction) jedna je od najperspektivnijih metoda zelene ekstrakcije, a bazira se na jednostavnoj manipulaciji dielektrične konstante vode. Pri sobnoj temperaturi i tlaku, voda ima dielektričnu konstantu otprilike 80, što je čini iznimno polarnim otapalom te su iz tog razloga u njoj slabo topljive organske tvari. Ta se vrijednost

može značajno smanjiti podizanjem temperature pod umjerenim tlakom, pa tako voda pri 250 °C i tlaku nešto višem od 4 MPa ima vrijednost 27, što je vrlo blizu dielektrične konstante etanola, te je kao takva prikladna za ekstrakciju tvari niske polarnosti, tj. topljivost organskih tvari se povećava (Chemat i sur., 2012; Teo i sur., 2010).

## **2.5. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE**

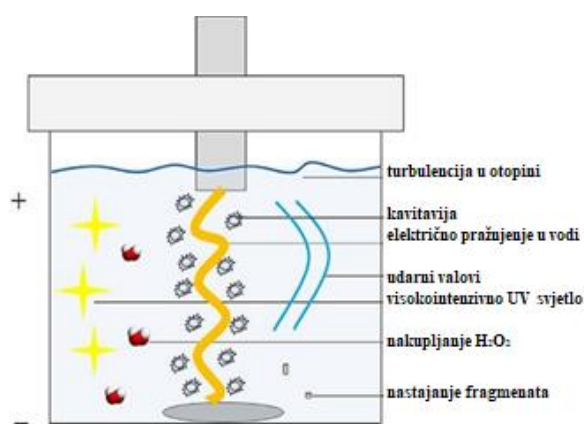
Čvrsto, tekuće, plinovito i plazma stanje tvari, četiri su agregatna stanja na koja se dijeli materija u svemiru, a razlikuju se po jačini veza koje drže čestice zajedno na okupu. Tako su kemijske sile najjače u krutom stanju, u tekućem su nešto slabije, dok su kod plinova one najslabije. U kojem će se agregatnom stanju materija naći, ovisi o kinetičkoj (toplinskoj) energiji njenih atoma ili molekula. Dovođenjem topline, odnosno zagrijavanjem krutine, tekućine ili plina, povećava se kinetička energija atoma ili molekula, što dovodi do faznih prijelaza koji se javljaju pri konstantnoj temperaturi i određenom tlaku. Ukoliko se osigura dovoljna količina energije, molekularni plin će postupno disocirati (razdvajati se na atome koji ga sastavljaju) u atomizirani plin. Pri dovoljno visokim temperaturama, sve veći dio atoma imat će dovoljno kinetičke energije, a kao rezultat nastaju intenzivni sudari između čestica te dolazi do oslobađanja elektrona, nastanka negativno nabijenih elektrona i pozitivno nabijenih iona što dovodi do nastanka elektromagnetskih polja, tj. stvaranja plazme (Bittencour, 2004).

Plazma se definira kao djelomično ili potpuno ionizirajući plin, kvazineutralan, a sastoji se od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona UV zračenja (Misra i sur., 2016). Da bismo stvorili hladnu plazmu, najprije česticama moramo osigurati energiju iz vanjskog izvora, što se postiže električnim pražnjenjem plina koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije. Nastalo električno polje uzrokuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anoda), dok je pozitivna jezgra privučena od strane negativne elektrode (katoda). Povećanjem napona, kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode, stvara se iskra. Kada plazmu generiramo u laboratorijskim uvjetima, najprije se energija iz električnog polja prenosi na elektrone koji su puno lakši, a potom na ostale teže čestice (Fridman, 2008). Elektroni prihvaćaju energiju od električnog polja te se ubrzavaju, što dovodi do velikog broja sudara između elektrona i atoma i molekula u plinu. Zbog različitih masa elektrona i atoma te molekula, tijekom sudara ne dolazi do razmjene energije. Razmjena energije između dviju čestica različite mase ovisi o omjeru njihovih masa pa tako kod sudara iona, koji imaju približno

jednaku masu kao neutralne molekule, dolazi do potpune raspodjele energije, dok elektroni imaju puno manju masu te kod sudara s neutralnim molekulama neće doći do izmjene energije. Iz tog se razloga elektroni zagrijevaju više nego ioni, i u prisutnosti električnog polja, temperatura elektrona brzo postaje puno viša nego temperatura plina (Turner, 2016). U hladnoj plazmi elektroni mogu doseći temperature od 10 000 do 100 000 K (1 – 10 eV), dok temperatura plina može ostati niska kao sobna temperatura (Petitpas i sur., 2007). To dovodi do stvaranja termodinamičke neravnoteže pa takvu plazmu nazivamo neravnotežnom netoplinskom plazmom, odnosno hladnom plazmom. Boja plazme nastaje kao rezultat povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje, pri čemu se emitira energija u vidljivom dijelu spektra, a ovisi o vrsti plina koji se koristi. U laboratorijskim uvjetima najčešće korišteni plinovi su argon, dušik, helij i ugljikov dioksid (Fridman, 2008).

### 2.5.1. Fenomen elektroporacije

Kada se stanica nađe u električnom polju, javlja se fenomen elektroporacije, tj. otvaraju se pore stanične membrane pri čemu se iz stanice oslobađaju biomolekule. Visokonaponsko električno pražnjenje između dviju elektroda u otopini prikazano je na Slici 3. Električni izboji nastali uslijed visokonaponskog električnog pražnjenja izazivaju oštećenje strukture stanica i fragmentaciju čestica te dovode do stvaranja turbulencije u otopini, UV svjetla visokog intenziteta, vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), kavitacijskih mjehurića i sekundarnih udarnih valova. Slika 3. prikazuje visokonaponsko pražnjenje između dviju elektroda u otopini.



Slika 3. Visokonaponsko pražnjenje između dviju elektroda u otopini (Rajha i sur., 2015).

Formiranje električnog pražnjenja sastoji se od dvije različite faze - prve „streamer“ i druge „arc“ faze. Elektrovodljivi kanal ioniziranog plina formira se tijekom prve faze, a pri prelasku iz prve u drugu fazu naglo raste jačina struje, nakon čega dolazi do električnog pražnjenja, odnosno pada jačine struje pri čemu se oslobađa energija. Za vrijeme „arc“ faze dolazi do stvaranja lokalizirane plazme te formiranja udarnih valova visokog tlaka (90-100 bar) koji mogu dovesti do oštećenja stanica biološkog materijala te nastanka hidroksilnih radikala. Nakon formiranja udarnih valova dolazi do formiranja refrakcijskih valova koji su odgovorni za nastajanje kavitacijskih mjehurića. Nastali kavitacijski mjehurići ispunjeni su plinom te njihovim pucanjem dolazi do stvaranja sekundarnih udara i turbulencije te slabljenja tj. rupture staničnih struktura zbog električnog pražnjenja. Isti fenomeni mogu dovesti do fragmentacije tretiranog materijala na makroskopskom nivou (Boussetta i Vorobiev, 2014).

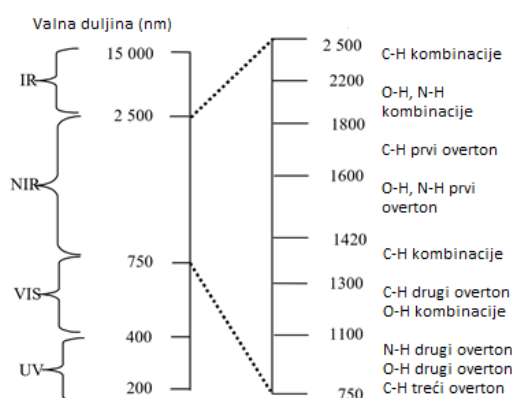
Plazma, odnosno HVED tretman (engl. high voltage electrical discharge) ima široku primjenu u prehrambenoj industriji pa se tako koristi u preradi žitarica, voća i povrća, mesa, mlijeka itd. Uzrokuje inaktivaciju mikroorganizama pri čemu, zbog niskih temperatura, nema toksičnog djelovanja na proizvod te ne dolazi do narušavanja nutritivnih i senzorskih svojstava proizvoda (Mir i sur., 2016). Ekonomična je i s ekološke strane prihvatljiva te se kao takva upotrebljava za inaktivaciju enzima, dekontaminaciju hrane, uklanjanje toksina, pročišćavanje otpadnih voda i za sterilizaciju ambalaže (Pankaj i sur., 2018).

## **2.6. BLISKO-INFRACRVENA (NIR) SPEKTROSKOPIJA**

Blisko-infracrvena (NIR, engl. near-infrared) spektroskopija je metoda koja se u prehrambenoj industriji koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu te procjenu kvalitete prehrambenih proizvoda. Razvojem tehnologije, sve se češće primjenjuje pa se tako koristi u različitim granama prehrambene industrije: za procjenu kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, vina, voća, mesa, ribe, ulja, kukuruza, bezalkoholnih pića itd. (Cen i He, 2007). NIR spektroskopija je vrsta vibracijske spektroskopije koja se bazira na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina od 750 do 2500 nm, što odgovara energijama fotona od  $2,65 \times 10^{-19}$  do  $7,96 \times 10^{-20}$  J (Pasquini, 2003). U ovom području apsorpcijske se vrpce uglavnom podudaraju s overtonovima i kombinacijama vibracija molekula.

Vibracijska se spektroskopija u infracrvenom (IR) području bazira na svojstvu molekula da apsorbiraju zračenje valnih duljina koje odgovaraju energiji potrebnoj za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razina (Metrohm, 2013). Intenzitet NIR vrpce ovisi o

promjeni u dipolnom momentu. Ukoliko za vrijeme vibracije dolazi do dipolnog momenta, molekula može apsorbirati infracrveno zračenje. Vodikov atom je najlakši pa pokazuje najjače vibracije i najveće odskakanje od usklađenosti, zbog čega se većinom promatraju veze s vodikom ili drugim laganim atomima (C-H, N-H, O-H, S-H) (Blanco i Villarroya, 2002). NIR spektri nam pokazuju fizikalne i kemijske informacije o uzorku i njegovom sastavu (Metrohm, 2013). Sadrže velik omjer signala i šuma, a položaj i intenzitet vrpce mogu se točno odrediti, što je od izuzetne važnosti za kvantitativnu analizu. Zbog slabe apsorpcije vode i stakla, mogu se koristiti za snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala. Međutim, ukoliko se vrpce preklapaju, daju nam manje informacija, zbog čega je potrebna dodatna obrada multivarijatnim metodama analize (Jednačak i Novak, 2013), tj. kemometrijom. Kemometrija uključuje primjenu matematike i statistike u kemijskoj analizi (Cen i He, 2007). Na preklapanje vrpca utječu fizikalne i kemijske strukturne karakteristike svih tvari koje su prisutne u uzorku (Metrohm, 2013). Slika 4. prikazuje položaje apsorpcijskih vrpca NIR spektra za određene funkcijske skupine.



Slika 4. Položaj najvažnijih apsorpcijskih vrpca u NIR spektru (prema Osborne, 2006).

NIR metoda je jednostavna, brza (jedna minuta ili manje po uzorku), nedestruktivna, neinvazivna (Pasquini, 2003), ekološki prihvatljiva metoda, koju karakterizira točnost i preciznost. NIR metoda ne zahtijeva posebnu pripremu uzoraka i utrošak kemikalija, otapala i reagensa (Metrohm, 2013), čime se smanjuje količina otpada i troškovi analiza. Također, velika prednost NIR metode je mogućnost istovremenog mjerenja nekoliko sastojaka tvari (Osborne, 2006).

## **2.7. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI – PCA ANALIZA**

Analiza glavnih komponentata (PCA, engl. principal component analysis) je metoda multivarijatne statističke analize koja se upotrebljava u obradi NIR spektara s ciljem smanjenja dimenzionalnosti podataka. Kako NIR spektri daju jako veliku količinu podataka o jednom uzorku, glavna svrha PCA analize je smanjenje količine podataka i prepoznavanje najbitnijih informacija iz izmjerenih spektara (Abdi i Williams, 2010).

Princip PCA analize temelji se na grupiranju seta podataka u određene manje odjeljke koji najbolje opisuju njihovu povezanost. Na taj je način omogućena brza i pouzdana interpretacija dobivenih rezultata, a da se pritom zadrži većina informacija iz prvotnog velikog skupa. Dobiveni podatci mogu se prikazati kao točke u n-dimenzijskom prostoru, pri čemu svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak, 2013), odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini. Linearnom kombinacijom izvornih varijabli formiraju se nove varijable koje nazivamo glavnim komponentama (engl. PC, principal components). Uvođenjem glavnih komponenti smanjuje se dimenzionalnost. Prvoj glavnoj komponenti, PC-1, pripada najveći dio varijacije uzoraka te ona predstavlja linearnu kombinaciju podataka koji imaju najveću varijancu (Abdi i Williams, 2010), a nakon nje redom slijede PC-2, PC-3 itd., od kojih svaka sljedeća obuhvaća sve manji iznos varijacija u setu podataka koji se analiziraju. Glavne komponente međusobno su ortogonalne i orijentirane na način da predstavljaju sljedeću najveću varijaciju u podacima (Metrohm, 2013). Dobiveni koordinatni sustav sastavljen je od vektora PC-1 i PC-2 te sadrži točke koje su projicirane iz originalnog n-dimenzijskog prostora, a koordinate tih točaka nazivaju se faktorskim bodovima. Vrijednosti faktorskih bodova odvojene su za spektre koji se razlikuju, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, a upravo je to razlog njihova grupiranja (Jednačak i Novak, 2013).

## **2.8. REGRESIJA GLAVNIH KOMPONENTI – PCR ANALIZA**

Regresija glavnih komponenti (PCR, engl. principal component regression) jedna je od metoda multivarijatne analize koja se koristi za izradu kalibracijskih modela. Temelji na principu smanjenja broja dimenzija u linearnoj regresiji te također pretvara skup kolinearnih varijabli u manji broj novih nekoreliranih (Mishra i Vanli, 2015). Provodi se u tri osnovna koraka: 1. pokretanje analize glavnih komponenti (PCA) u tablici varijabli, 2. pokretanje regresije najmanjih kvadrata (OLS regresija, linearna regresija na odabranim komponentama), 3. računanje parametara modela koji odgovaraju ulaznim varijablama.



PCR metoda reducira velik broj varijabli do skromnog modela, što može biti korisno za modeliranje i predviđanje budućih opažanja, s obzirom da se dobiveni rezultati glavnih komponenti koriste kao regresijske varijable za izgradnju predikcijskih modela.

## **2.9. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI S DETEKCIJOM MASENE SPEKTROMETRIJE (UPLC-MS/MS, ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY)**

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s detekcijom masene spektrometrije (UPLC-MS/MS, engl. ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) je osjetljiva i brza metoda koja služi za određivanje rezidua u hrani. To je sofisticirana tehnika koja omogućuje vrlo učinkovitu izolaciju iona analita iz šuma koji stvara matriks uzorka. Karakterizira je poboljšana rezolucija i viši pik (Tamošiūnas i Padarauskas, 2008). Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti koristi se za razdvajanje spojeva, odnosno polifenola iz smjese, a dvojna masena spektrometrija za identifikaciju i kvantifikaciju polifenola na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nabijenih čestica koji nastaju nakon ionizacije (Pedreschi i sur., 2013). Kod tandemske masene spektrometrije (MS/MS) kombinira se masena spektrometrija u dva koraka s analizatorom iste ili različite vrste, a fragmentacija molekula odvija se između dva masena razdvajanja (Hoffman, 1996).

Spektrometar mase sastoji se od ionizatora, analizatora mase i detektora. Najčešće korišteni dvojni maseni spektrometar podrazumijeva trostruki kvadropol (QQQ) u kojem su dva kvadropola analizatori iona, dok treći predstavlja kolizijsku ćeliju (Agilent Technologies, 2012). Pije ulaska u kvadropol (promjenjivo električno polje) neutralna molekula se uvodi u ionizator pod atmosferskim tlakom (Hoffman, 1996), a prije same ionizacije odvija se uparavanje mobilne faze sa strujom vrućeg zraka, tako da se ionizira samo analit. Zatim ioni idu na prvi kvadropol (Q1) koji odabire ione određene vrijednosti  $m/z$  te takvi ioni prolaze dalje na drugi kvadropol (Q2). Drugi kvadropol predstavlja kolizijsku ćeliju koja fragmentira ione (engl. precursor) te u putanju odabranih iona uvodi kolizijski plin, dok treći kvadropol analizira fragmente iona (engl. product) koji su generirani u kolizijskoj ćeliji. Nakon što je prekursor ion odabran u MS1 analizatoru i nakon što je fragmentiran u kolizijskoj ćeliji, MS2 analizator postavljen je na način da snima više određenih produkt iona, tj. da prati višestruke reakcije ili MRM (engl. multiple reaction monitoring) (Agilent Technologies, 2012).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju korišteni su osušeni listovi masline (*Olea europaea* L.), ubrani 2018. godine na području Zadarske županije (Hrvatska). Listovi masline, osušeni na zraku, čuvani su u polietilenskim vrećicama na tamnom i suhom mjestu sve do ekstrakcije. Prije procesa visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED tretmana), listovi masline usitnjeni su u mlincu za mljevenje (Grindomix GM 300 – RETSCH, Retsch GmbH, Haan, Njemačka).

#### 3.1.2. Aparatura i pribor

- spektrofotometar, Secomam Uviline 9400, Secomam, Ales, Francuska
- analitička vaga, Sartorius GMBH, Göttingen, Njemačka
- tehnička vaga, Axis, Spolka z o.o., Gdansk, Poljska
- generator hladne plazme, IMP-SSPG-1200, Impel grupa, Zagreb, Hrvatska
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m s instaliranim Control Development softverom SPEC 32
- spektrofluorimetar, Varian, Cary Eclipse, USA
- uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC), Eksigent Ekspert Ultra LC 110
- tandemski maseni detektor (MS/MS), SCIEX 4500 QTRAP
- Zetasizer Nano ZS instrument, Malvern, UK
- mlinac za mljevenje, Grindomix GM 300 – RETSCH, Retsch GmbH, Haan, Njemačka
- Büchnerov lijevak
- odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL, 500 mL i 1 L
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- vodena kupelj
- staklene kivete
- mikropipete, volumena 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- staklene čaše volumena 50 mL, 250 mL i 500 mL
- falkonice od 50 mL
- menzure, volumena 100 mL, 250 mL i 1 L

- staklene epruvete
- termometar
- plastična lađica za vaganje
- stalak za epruvete
- štoperica

### 3.1.3. Kemikalije i reagensi

Sve korištene kemikalije i reagensi bili su visoke analitičke čistoće.

- otapalo: destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska); etanol 96 %-tni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) i destilirana voda (25 %-tna vodena otopina etanola, 50 %-tna vodena otopina etanola)

#### *Za određivanje ukupnih fenola*

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)  
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, nakon čega se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata se filtrira.
- standard galne kiseline  
Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA) u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Nakon toga se nadopuni do oznake destiliranom vodom.

#### *Za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom*

- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl  
Priprema: 330  $\mu$ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %, Carlo-Erba, Peypin, Francuska) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.

- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6  
Priprema: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska) u odmjernej tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl<sub>3</sub>  
Priprema: 0,0541 g FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O otopi u 10 mL destilirane vode, otopina se priprema svježa.
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ  
Priprema: 0,0312 g TPTZ (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA) otopi se u odmjernej tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja.
- standard željezo (II)-sulfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O)  
Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata heptahidrata (FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O). Odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfat heptahidrata (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD) u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- FRAP reagens  
Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl<sub>3</sub> (omjer 10:1:1).

*Za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom*

- 100 %-tni metanol (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)  
Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka) se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. DPPH je potrebno čuvati na tamnom mjestu u zatvorenoj tikvici.
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)  
Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje, kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernej tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnom mjestu u zatvorenoj tikvici.

- 0,02 M otopina troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina)  
Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu troloxa u koncentraciji 0,02 mol L<sup>-1</sup>. 500 mg troloxa (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA) odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u 100 %-tnom metanolu te se tikvica nadopuni do oznake metanolom. Otopinu troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) te se uvijek koristi svježe pripremljena otopina standarda.

*Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom*

- 0,2 M fosfatni pufer, pH 7  
Priprema: 6,242 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O (Fisher chemical, Loughborough, UK) otopi se u 200 mL destilirane vode. 5,687 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Acros Organics, New Jersey, SAD) otopi se u 200 mL destilirane vode. Zatim se u odmjernu tikvicu od 200 mL doda 61 mL 0,2 M otopine Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 39 mL 0,2 M otopine NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- 0,075 M fosfatni pufer, pH 7  
Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Uvijek se koristi svježe pripremljena otopina standarda.
- fluorescein (BioReagent, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)  
Priprema: otopina 1 = 15 mg fluoresceina otopi se u 100 mL 0,075 M fosfatnom puferu; otopina 2 = 100 μL otopine 1 nadopuni se s 10 mL 0,075 M fosfatnog pufera; otopina 3 = 50 μL otopine 2 nadopuni se s 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Uvijek se koristi svježe pripremljena otopina standarda.
- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid)  
Priprema: otopi se 0,207 g AAPH (Acros Organics, New Jersey, SAD) u 5 mL 0,075 M fosfatnom puferu. Uvijek se koristi svježe pripremljena otopina standarda.
- 0,5 mM otopina troloxa  
Priprema: 6,26 mg troloxa otopi se u u 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera.

### *Za određivanje koncentracije određenih polifenolnih spojeva UPLC-MS/MS metodom*

- acetonitril, ACN, za LC-MS (LiChrosolv Acetonitril hypergrade, Merck, Darmstadt, Njemačka)
- mravlja kiselina, HCOOH, za LC/MS (Fischer Chemical, Finska)
- destilirana voda (UPLC čistoće)
- metanol, CH<sub>3</sub>OH, za LC-MS (LiChrosolv Methanol hypergrade, Merck, Darmstadt, Njemačka)

## **3.2. METODE RADA**

Kako bi se odabrali optimalni uvjeti, provedena su preliminarna istraživanja koja su uključivala različite parametre tretiranja (masa uzorka, frekvencija, napon, udaljenost između elektroda). Masa osušenih listova masline iznosila je 1 g, 3 g, 5 g, 10 g i 20 g, volumen otapala koji je korišten za ekstrakciju 50 mL, vrijeme tretiranja 3, 6 i 9 minuta, a frekvencija 50, 100 i 150 Hz. Na temelju preliminarnih istraživanja i provedenih više od 100 eksperimenata, odabrani su optimalni uvjeti tretiranja koji su uzeti za daljnje analize – 1 g osušenog lista masline, 50 mL otapala za ekstrakciju, vrijeme tretiranja 3 i 9 minuta, frekvencija od 100 Hz te napon od 15 kV i 20 kV za argon i 20 kV i 25 kV za dušik. Odabrani naponi dovoljno su visoki da dođe do električnog pražnjenja.

### 3.2.1. Priprema ekstrakata

Za potrebe istraživanja pripremljeni su ekstrakti lista masline na način da su netretirani uzorci pripremljeni stajanjem u otapalu, odnosno maceracijom, bez visokonaponskog električnog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog električnog pražnjenja u struji dušika ili argona.

Prije ekstrakcije izvaži se 1 g osušenog i usitnjenog lista masline koji se pomiješa s 50 mL otapala za ekstrakciju (destilirana voda, 25 %-tna otopina etanola ili 50 %-tna otopina etanola) na sobnoj temperaturi (22 °C). Tako pripremljen uzorak podvrgnut je tretmanu visokonaponskog električnog pražnjenja koji generira hladnu atmosfersku plazmu u uzorku, određeno vrijeme (3 i 9 min) pri odgovarajućim uvjetima napona (argon - 15 i 20 kV, dušik - 20 i 25 kV) i frekvencije (100 Hz). Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Büchnerovog lijevka i prikuplja u falcon epruvete za daljnje analize. U Tablici 3. prikazani su parametri klasične ekstrakcije i ekstrakcije u struji dušika i argona te su u nastavku objašnjene kratice i parametri.

Tablica 3. Parametri klasične ekstrakcije i ekstrakcije u struji dušika i argona.

<b>UZORAK</b>	<b>VRIJEME TRETIRANJA (min)</b>	<b>NAPON (kV)</b>	<b>UDIO ETANOLA (%)</b>	<b>VRIJEME STAJANJA U OTAPALU (min)</b>
<b>3NL0/1</b>	0	0	0	3
<b>3NL25/1</b>	0	0	25	3
<b>3NL50/1</b>	0	0	50	3
<b>9NL0/1</b>	0	0	0	9
<b>9NL25/1</b>	0	0	25	9
<b>9NL50/1</b>	0	0	50	9
<b>LN1</b>	3	20	50	/
<b>LN2</b>	9	20	0	/
<b>LN3</b>	3	20	0	/
<b>LN4</b>	3	25	0	/
<b>LN5</b>	9	25	25	/
<b>LN6</b>	9	20	25	/
<b>LN7</b>	9	20	50	/
<b>LN8</b>	9	25	50	/
<b>LN9</b>	3	25	25	/
<b>LN10</b>	9	25	0	/
<b>LN11</b>	3	25	50	/
<b>LN12</b>	3	20	25	/
<b>LA1</b>	3	15	50	/
<b>LA2</b>	9	15	0	/
<b>LA3</b>	3	15	0	/
<b>LA4</b>	3	20	0	/
<b>LA5</b>	9	20	25	/
<b>LA6</b>	9	15	25	/
<b>LA7</b>	9	15	50	/
<b>LA8</b>	9	20	50	/
<b>LA9</b>	3	20	25	/
<b>LA10</b>	9	20	0	/
<b>LA11</b>	3	20	50	/
<b>LA12</b>	3	15	25	/

NL je kratica za netretirani list masline, L je kratica za list masline, N koje stoji iza L u tretiranim uzorcima je kratica za dušik, dok je A kratica za argon. Za HVED ekstrakciju, brojevi od 1 do 12 označavaju redoslijed provedenog tretmana. Kod konvencionalne ekstrakcije, 3 i 9 označavaju vrijeme stajanja u otapalu, dok 0, 25 i 50 označavaju udio (%) etanola u otapalu.

### 3.2.2. Ekstrakcija visokonaponskim pražnjenjem (HVED) i konvencionalna ekstrakcija

HVED ekstrakcija provodila se pomoću generatora IMP-SSPG-1200 (Slika 5.a) koji generira visoki napon, a putem ionizacije plina (argon ili dušik) dolazi do formiranja hladne atmosferske plazme u uzorku.

Smjesa listova masline i otapala za ekstrakciju prenesena je u reaktor oblika kruškolike tikvice (Slika 5.b) volumena 100 mL. Reaktor je bio otvoren s obje strane i opremljen silikonskim vrhovima (promjera 1 cm) koji su služili za jednostavnu montažu elektrode s vrha i igle s dna. Kroz iglu se u sustav upuhivao plin koji se ionizirao pod naponom od 15 ili 20 kV za argon i 20 ili 25 kV za dušik, a protok plinova iznosio je od 5 L min<sup>-1</sup>. Razmak između elektroda bio je 15 mm. Postavljanje generatora i reaktora prikazano je na Slici 5.

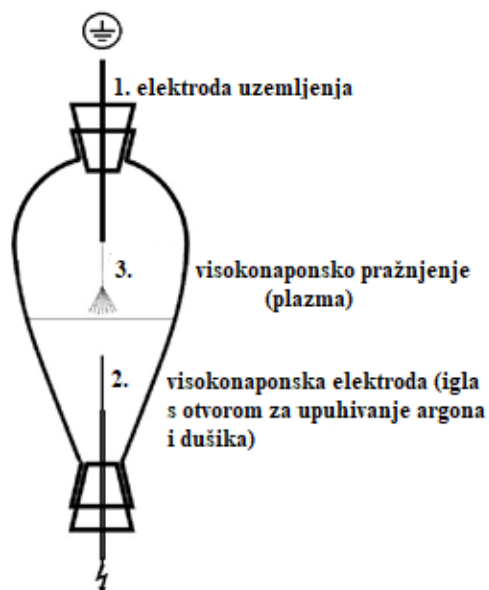
Tehnički parametri plazma generatora IMP-SSPG-1200:

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





(a)



(b)

Slika 5. Postavljanje generatora i reaktora za HVED ekstrakciju: (a) HVED i plazma generator IMP-SSPG-1200 (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska); (b) reaktor

Konvencionalna (klasična) ekstrakcija korištena je kao kontrolna metoda te je provedena kako bi se usporedila učinkovitost ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED ekstrakcija). I ona se, kao i HVED ekstrakcija, provodila u istom otapalu te istom vremenu tretiranja, odnosno miješanja. Tako je klasična ekstrakcija provedena variranjem tipa otapala (0, 25 i 50 %-tna otopina etanola) i vremena miješanja (3 i 9 min) na sobnoj temperaturi 22 °C. Kako bi se postigla bolja učinkovitost miješanja biljke i otapala za ekstrakciju, tijekom konvencionalne metode, korištena je magnetska miješalica.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Princip metode temelji se kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa, koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, s nekim reducirajućim reagensom (fenolni spojevi). Prilikom reakcije Folin-Ciocalteu reagensa s fenoksidnim ionom iz uzorka (ekstrakt), fenoksidni ion se oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira u blago alkalnim uvjetima do volframovog i molibdenovog oksida koji su plavo obojeni. Što je prisutan veći broj oksidirajućih grupa ili hidroksilnih skupina u fenolnim spojevima, tvorba plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se na valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

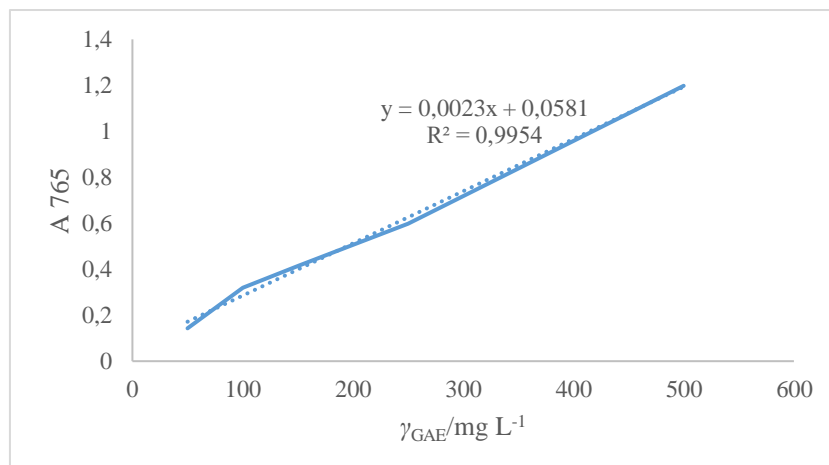
### Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) na valnoj duljini od 765 nm pomoću spektrofotometra. Potrebno je pripremiti i slijepu probu na isti način, samo što se umjesto ekstrakta dodaje otapalo za ekstrakciju.

### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca potrebno je izvagati 500 mg galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku odmjernu tikvicu i potom se tikvice nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  otopine standarda u staklene epruvete, a zatim se dodaje redom 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta na temperaturi od 50 °C u vodenoj kupelji od rotavapora. Potrebno je pripremiti i slijepu probu na isti način, samo što se umjesto standarda dodaje 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) na valnoj duljini od 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac (Slika 6.) pomoću računala (program Microsoft Office Excel 2010), pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije na valnoj duljini od 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca, gdje y predstavlja apsorbanciju pri 765 nm, a x koncentraciju galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Shortle i sur., 2014.) Određivanje udjela ukupnih fenola provedeno je u dva paralelna mjerenja, a rezultati su izraženi i preračunati kao srednje vrijednosti u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka. Za razrijeđene uzorke, rezultate je potrebno pomnožiti s faktorom razrjeđenja.

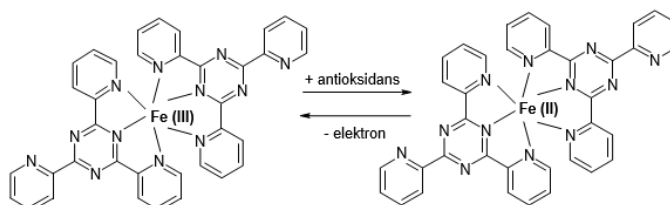


Slika 6. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih fenola.

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

#### Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip ove kolorimetrijske, FRAP metode (engl. ferric reducing antioxidant power) bazira se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-striazina (TPTZ) u  $\text{Fe}^{2+}$  oblik koji je intenzivno plave boje (Slika 7.). Kako bi se očuvala dobra topljivost željeza i povećao redoks potencijal, reakcija se odvija pri  $\text{pH}=3,6$ , u kiselom mediju. Redoks potencijal reakcije  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  iznosi 0,77 V. Spojevi s nižim redoks potencijalom ulaze u reakciju redukcije željeza i na taj način doprinose konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Spektrofotometrijsko mjerenje intenziteta plave boje prati se pri valnoj duljini od 593 nm, a intenzitet boje proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Benzie i Strain, 1996).



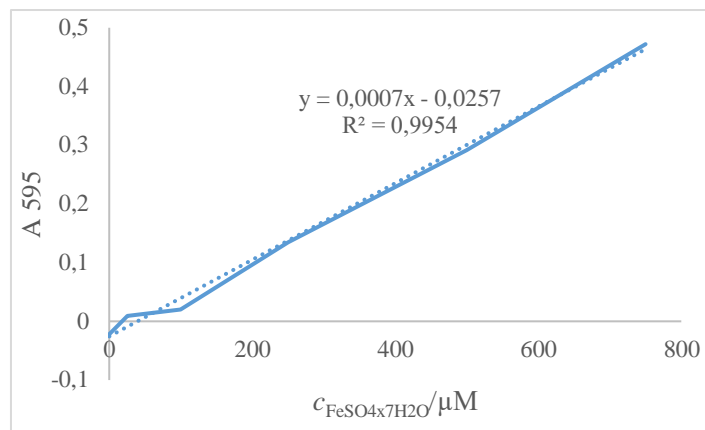
Slika 7. FRAP metoda, redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) s antioksidansom (Benzie i Strain, 1996).

### Postupak određivanja:

U staklene epruvete otpipetira se redom 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  ekstrakta (prethodno adekvatno razrijeđenog) i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Sve se zajedno dobro promiješa te se 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbanacija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbanacije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbanacije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 500 mL 1 mM otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750  $\mu\text{M}$ , na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0; 0,25; 1; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvota otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata te se tikvice do oznake nadopune destiliranom vodom. U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine standarda i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, kratko promiješa na vortex uređaju te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C u kupelji od rotavapora. Nakon toga, mjeri se apsorbanacija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije nacrtava se baždarni pravac (Slika 8.) pomoću računala (program Microsoft Office Excel 2010) s vrijednostima koncentracije  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbanacije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom, gdje je y apsorbanacija pri 593 nm, a x ekvivalent  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\mu\text{M}$ ) (Benzie i Strain, 1996). Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću FRAP metode provedeno je u dva paralelna mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti u  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta željeza  $\text{Fe}^{2+}$  (FE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka. Za razrijeđene uzorke, rezultate je potrebno pomnožiti s faktorom razrjeđenja.



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode.

### Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom prati se reakcija između radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH•) i uzorka u kojem se mjeri antioksidacijska aktivnost. DPPH radikal ima nespareni elektron zbog kojeg pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm) i daje otopinu ljubičaste boje. U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala i stabilizacije pri čemu nastaje reducirani oblik DPPH-H. Dodatkom antioksidansa otopina mijenja boju u žutu, što se spektrofotometrijski prati mjerenjem apsorbanacije u opadanju, u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

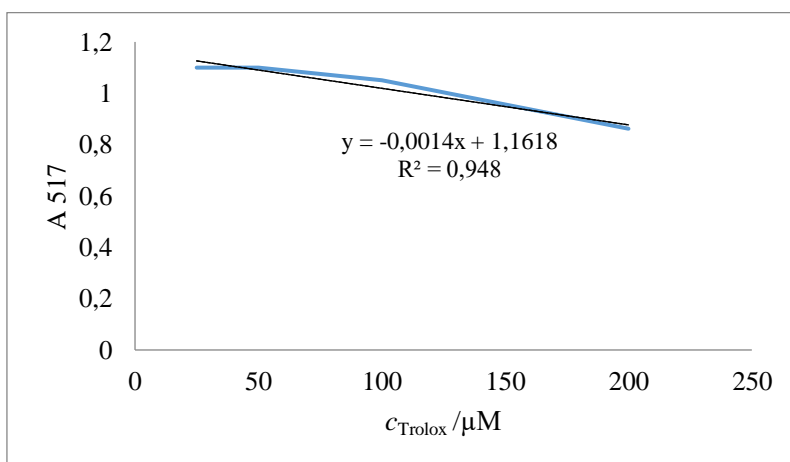
### Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbanacije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanaciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Ukoliko izmjerene apsorbanacije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzorka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbanacije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 500 mg troloxa. Odvaga se otopi u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te se nadopuni metanolom do oznake. Od 0,02 M otopine troloxa pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL otopine u svaku odmjernu tikvicu i potom se tikvice nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije troloxa u tim tikvicama iznose 25, 50, 100 i 200  $\mu\text{M}$ . Iz svake tikvice otpipetira se 0,75 mL otopine standarda u staklene epruvete te se u svaku epruvetu doda 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtat će baždarni pravac (Slika 9.) pomoću računala (program Microsoft Office Excel 2010) s vrijednostima koncentracije troloxa ( $\mu\text{M}$ ) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen DPPH metodom, pri čemu je y apsorbancija uzorka pri 517 nm, a x ekvivalent troloxa (TE) ( $\mu\text{M}$ ) (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005). Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH metode također je provedeno u dva paralelna mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti u  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta troloxa (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka. Za razrijeđene uzorke, rezultate je potrebno pomnožiti s faktorom razrjeđenja.



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode.

### Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

ORAC metoda (engl. oxygen radical absorbance capacity) je antioksidacijska metoda kojom se mjeri inhibicija AAPH peroksil radikala, pri čemu je izvor radikala, najčešće, azo-spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid), koji se raspada na temperaturi od 37 °C konstantnom brzinom te tako generira peroksil radikale. Reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksidnih radikala, fluorescentnu probu i standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Tijekom reakcije fluorescentne probe i slobodnih radikala, proba se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje kao pad intenziteta fluorescencije. Ako se u reakcijsku smjesu dodaju antioksidansi koji reagiraju sa slobodnim radikalima, spomenuta reakcija se usporava (Prior i sur., 2003). U testu se kao standardna otopina koristi antioksidans trolox.

#### Postupak određivanja:

Mjerenja se provode spektrofluorimetrom pri  $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$  pri temperaturi 37 °C. U kivetu se doda 2,25 mL fluoresceina i 0,375 mL ekstrakta (0,075 M fosfatnog pufera ili troloxa ili razrijeđenog uzorka). Tako pripremljene otopine se inkubiraju 30 minuta pri 37 °C. Zatim se nakon 30 minuta dodaje se 0,375 mL AAPH te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije.

#### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,5 mM otopina troloxa te se iz tako pripremljene otopine napravi 6 razrjeđenja u koncentracijama od 6,25 do 100 mM (Prior i sur., 2003).

#### Račun:

Relativna ORAC vrijednost izračuna se prema jednadžbama:

$$AUC = 0,5 + \frac{R_2}{R_1} + \frac{R_3}{R_1} + \dots + 0,5 \times \frac{R_n}{R_1} \quad /1/$$

u kojoj su:

AUC = razlika površine ispod krivulja za uzorak i slijepu probu

$R_1$  = vrijednost fluorescencije prvog mjerenja

$R_n$  = vrijednost fluorescencije posljednjeg mjerenja

$$\text{relativna ORAC vrijednost} = [(AUC_U - AUC_{SP}) / (AUC_{TRX} - AUC_{SP})] \times k \times a \times h \text{ (}\mu\text{mol TE/g uzorka)} \quad /2/$$

u kojoj su:

$AUC_U$  = antioksidacijski kapacitet uzorka

$AUC_{SP}$  = antioksidacijski kapacitet slijepe probe

$AUC_{TRX}$  = antioksidacijski kapacitet troloxa

$k$  = faktor razrjeđenja

$a$  = molarna koncentracija troloxa

$h$  =  $V_{\text{ekstrakta}}/g_{\text{uzorka}}$

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću ORAC metode provedeno je u dva paralelna mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti u  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta troloxa (TE)  $\text{g}^{-1}$  uzorka.

### 3.2.5. Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija

Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija provedena je pomoću NIR spektrofotometra Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  koji služi za snimanje spektra uzorka pomoću instaliranog SPEC 32 Control Development softvera. NIR spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm.

U kivetu se, prije snimanja, otpipetiraju uzorci ekstrakta, nakon čega se kiveta stavlja u držač. Držač je povezan s dva optička kabela; jedan od njih povezan je s izvorom svjetlosti, a drugi s računalom. Da bi se spriječio utjecaj vanjskog okolnog svjetla i osiguralo pravilno osvjetljenje, držač je potrebno poklopiti poklopcem. Potom se uključi izvor svjetlosti te se na računalu pokrene SPEC 32 - program za snimanje apsorpcijskog spektra. Svaki uzorak snimljen je tri puta, a zatim je od ta tri spektra izračunata srednja vrijednost za pojedini uzorak koja predstavlja prosječan spektar korišten za daljnju obradu. Budući da NIR spektri pružaju veliku količinu podataka za jedan uzorak, korištena je PCA analiza koja služi za prepoznavanje i izdvajanje najvažnijih informacija iz provedenih mjerenja, čime se smanjuje količina podataka (Williams i sur., 2012).



### 3.2.6. UPLC-MS/MS metoda

Za određivanje koncentracije određenih polifenola u ekstraktima lista masline korišten je sustav tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti – spektrometrija masa (UPLC-MS/MS). UPLC-MS/MS metoda kombinira tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti i spektrometriju masa. Ovim sustavom moguće je odvojiti određene polifenole iz ekstrakta lista masline tekućinskom kromatografijom te ih detektirati na masenom spektrometru. Kromatografijom se odvajaju komponente koje se nalaze u uzorku između dvije faze, pokretne ili mobilne i nepokretne ili stacionarne. Kod tekućinske kromatografije pokretna faza je tekuća, a nepokretna je kruta (kromatografska kolona). Odvajanje komponenti iz uzorka moguće je zbog različitog vremena zadržavanja komponente (retencijsko vrijeme-RT, eng. retention time) na stacionarnoj fazi, a ono ovisi o trajanju interakcije komponente s nepokretnom fazom. U masenom spektrometru, uzorak se najprije ionizira djelovanjem snopa elektrona te se tako nastali ioni nazivaju prekursor ioni. Nakon toga, prekursor ioni se pod djelovanjem energije kolizije cijepaju na dva ili više fragmenata, a tako nastali ioni nazivaju se produkt ionima. Princip rada MS/MS uređaja prikazan je na Slici 10. Gradijent otapala za UPLC analizu polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktima u različitim vremenskim intervalima prikazan je u Tablici 4., a analiti s uvjetima MRM (engl. multiple reaction monitoring) određivanja su prikazani u Tablici 5.

Standard polifenola koji služi za izradu kalibracijske krivulje dobiven je otapanjem u metanolu pojedinačnih standarda polifenola da bi se na kraju dobila metanolna otopina polifenola koncentracije od  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Za izradu kalibracijske krivulje korištena je navedena metanolna otopina polifenola, a točke kalibracije su u rasponu od  $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$  do  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ . Fenolni spojevi određeni su pomoću softvera Multiquant 3.6 (SCIEX, Darmstadt, Njemačka). Kromatogrami UPLC-MS/MS analize netretiranih uzoraka listova masline prikazani su na Slikama 11.a i 11.b koje prikazuju sljedeće fenolne spojeve: apigenin, hidroksitirosol, oleanolnu kiselinu i oleuropein. Najzastupljenija ionizacija u LC-MS veznom sustavu je ESI (engl. electrospray ionization) te ona može biti, ovisno o naponu, pozitivna ili negativna (Agilent Technologies, 2012). ESI koristi električnu energiju kako bi se potaknuo prijenos iona iz otopine u plinovitu fazu prije odvijanja masene spektrometrije. Tijekom određivanja sadržaja pojedinih polifenola u ekstraktima lista masline koristila se API-ESI ionizacija, pri čemu API (engl. atmospheric pressure ionization mode) predstavlja kraticu za ionizaciju pri atmosferskom tlaku, dok je temperatura ionizacije temperatura plinova koji uparavaju mobilnu fazu prilikom izlaska iz kapilare prije ionizacije.

#### Kromatografski uvjeti određivanja na UPLC-u:

- kromatografska kolona: Luna Omega 3 $\mu$ m Polar C18 100Å, 100 x 4,6 mm
- temperatura termostata kolone: 40 °C
- temperatura autosamplera: 4 °C
- volumen injektiranja: 10  $\mu$ L
- mobilna faza A: 100 % H<sub>2</sub>O sa 0,1 % HCOOH (v/v)
- mobilna faza B: 100 % ACN sa 0,1 % HCOOH (v/v)
- protok mobilne faze: 0,40 mL min<sup>-1</sup>

Tablica 4. Gradijent otapala za UPLC analizu polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktima u različitim vremenskim intervalima.

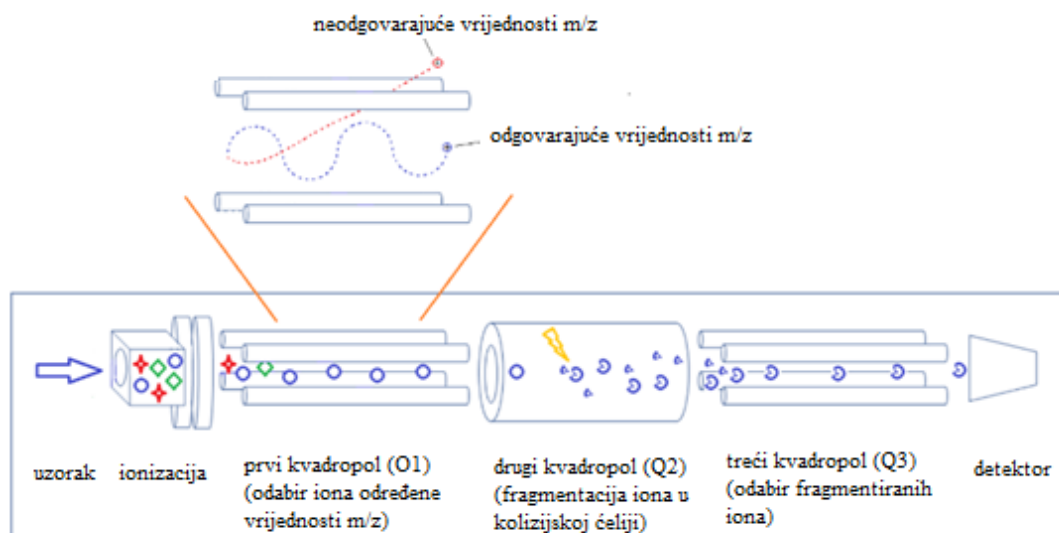
<b>Vrijeme (min)</b>	<b>otapalo A (%)</b>	<b>otapalo B (%)</b>
00:01	90	10
02:00	90	10
15:00	10	90
25:00	10	90
27:00	90	10
30:00	90	10

#### Uvjeti određivanja na MS/MS detektoru:

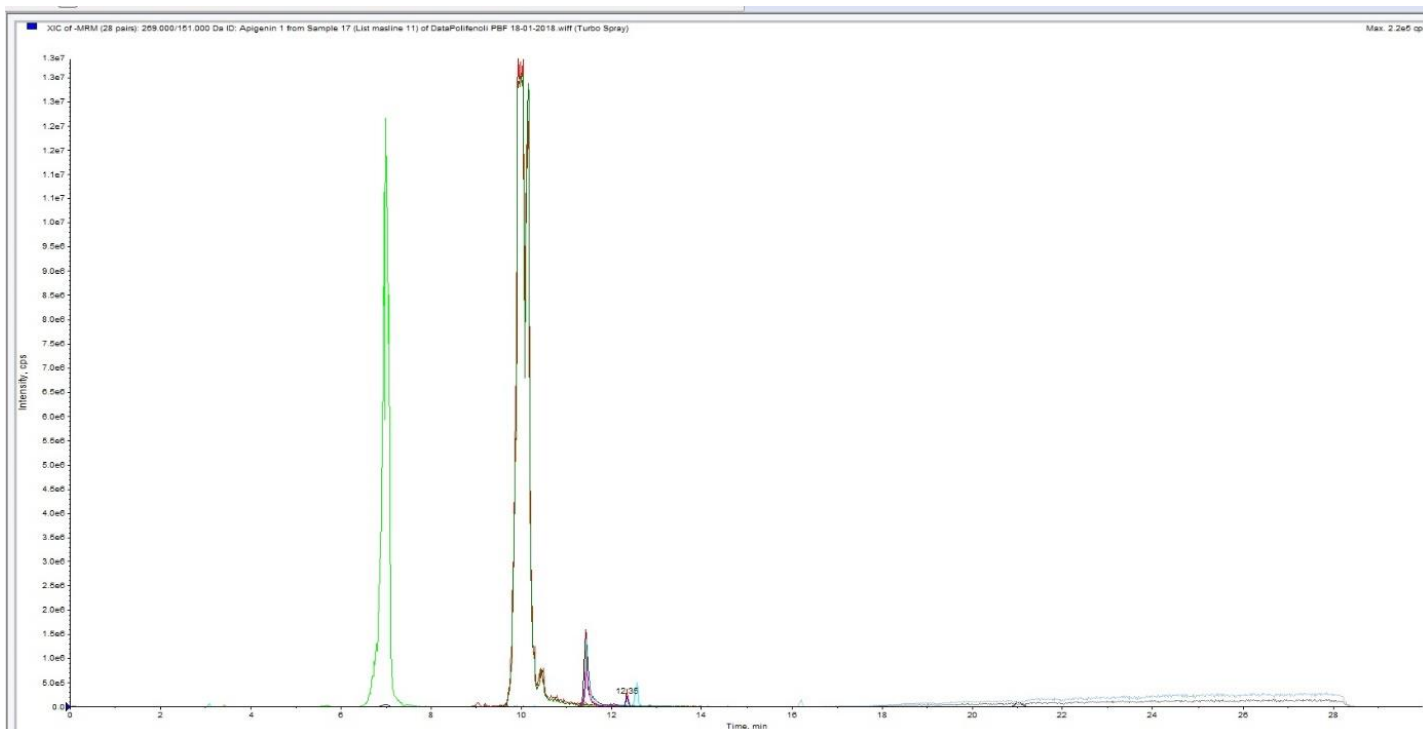
- ionizacija: negativna API
- temperatura ionizacije : 500 °C
- napon na elektrodi nakon kapilare gdje se vrši ionizacija: -4500 V
- temperatura plina za sušenje: 190 °C
- protok plina za sušenje: 9,0 L min<sup>-1</sup>

Tablica 5. Tablica analita s uvjetima MRM (engl. multiple reaction monitoring) određivanja.

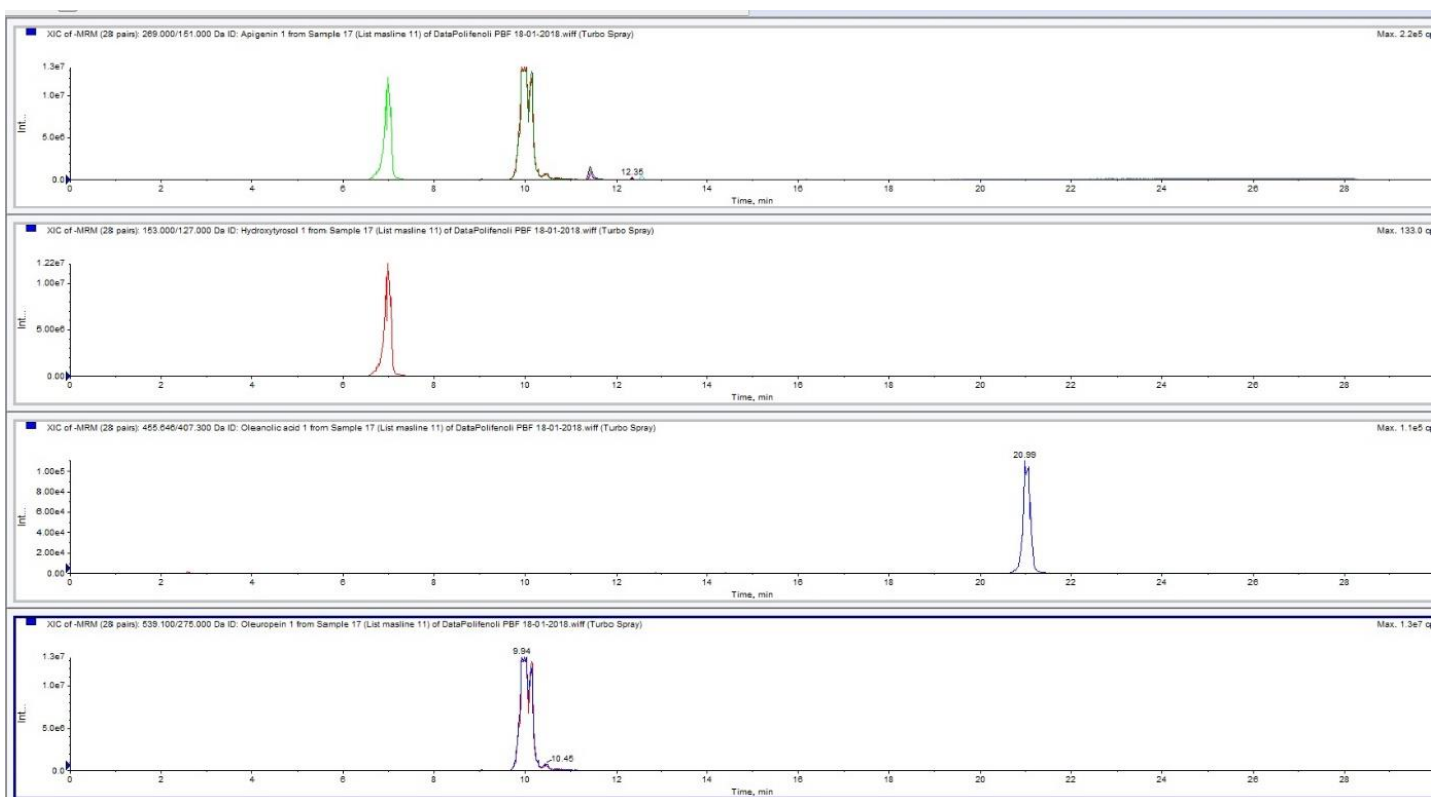
Masa Q <sub>1</sub> (Da)	Masa Q <sub>3</sub> (Da)	Analit	Vrijeme zadržavanja RT (min)	Kolizijska energija (V)
269,0	151,0	Apigenin 1	12,56	-34,0
269,0	117,0	Apigenin 2		-34,0
299,0	284,0	Diosmetin 1	12,61	-30,0
299,0	227,0	Diosmetin 2		-40,0
153,0	127,0	Hidroksitirosol 1	6,89	-17,0
153,0	122,9	Hidroksitirosol 2		-20,0
153,0	80,0	Hidroksitirosol 3		-30,0
285,0	133,0	Luteolin 1	11,70	-42,0
285,0	64,8	Luteolin 2		-64,0
455,6	407,3	Oleanonska kiselina 1	20,68	-64,0
455,6	96,9	Oleanonska kiselina 2		-120,0
539,1	275,0	Oleuropein 1	9,96	-30,0
539,1	307,0	Oleuropein 2		-30,0
301,0	179,1	Kvercetin 1	11,51	-26,0
301,0	151,1	Kvercetin 2		-26,0



Slika 10. Princip rada MS/MS uređaja (prema Anonymous, 2019)



Slika 11.a Prikaz kromatograma LC/MS analize netretiranog lista masline (3NL50/1) – ukupni ionski kromatogram (TIC, engl. total ion chromatogram).



Slika 11.b Prikaz kromatograma LC/MS analize netretiranog lista masline (3NL50/1) – iona karakterističnih za pojedini polifenol (XIC, engl. extracted ion chromatogram).

### 3.2.7. Određivanje veličine čestica i indeksa polidisperzije DLS metodom

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, engl. dynamic light scattering) je neinvazivna, analitička, fizikalna metoda koja se koristi za određivanje distribucije veličina malih čestica u suspenziji. Svjetlost se raspršuje kada prolazi kroz medij koji je polarizabilan ili nema jedinstvenu dielektričnu konstantu te je u interakciji s elektronima vezanim u materijalima koji ponovno zrače tu svjetlost kao raspršenu. DLS metoda mjeri Brownovo gibanje, nasumično kretanje čestica zbog sudara s molekulama otapala i preračunava ga na veličinu čestica. Brzina gibanja čestica ovisi o njihovoj veličini. Sudari s molekulama otapala imaju veći utjecaj na male čestice nego na velike, pa će brzina biti veća što je čestica manja. Također, brzina ovisi i o temperaturi jer ona utječe na viskoznost tekućine, pa je tako potrebno znati točnu temperaturu tijekom mjerenja. Brzina Brownovog gibanja je definirana svojstvom poznatim kao translacijski koeficijent difuzije. Veličina čestica, tj. hidrodinamički promjer izračunava se korištenjem Stokes-Einsteinove jednadžbe:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad /3/$$

u kojoj su:  $d(H)$  = hidrodinamički promjer,  $D$  = translacijski koeficijent difuzije,  $k$  = Boltzmannova konstanta,  $T$  = apsolutna temperatura i  $\eta$  = viskoznost. Hidrodinamički promjer,  $d(H)$ , je vrijednost koja pokazuje kako čestica difundira unutar tekućine (Malvern Instruments, 2004). Ovom metodom određuje se i indeks polidisperzije (PDI) koji govori o širini raspodjele veličine čestica (Wu i sur., 2011).

Određivanje veličine čestica i PDI svih ekstrakta DLS metodom provedeno je korištenjem Zetasizer Nano ZS instrumenta (Malvern, UK), u jednokratnim presavijenim kapilarnim stanicama, termostatiranim na 25 °C. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutom od 173°.

### 3.2.8. Određivanje prinosa ekstrakcije

Prinos ekstrakcije tretiranih i netretiranih uzoraka lista masline određen je pomoću formule:

$$\text{prinos ekstrakcije (\%)} = \frac{\text{sadržaj ukupnih fenola (mg GAE)}}{\text{masa uzorka}} \times 100 \quad /4/$$

pri čemu je masa uzorka (lista masline) 1000 mg, odnosno 1 g.

### 3.2.9. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je u softveru STATGRAPHICS Centurion (StatPoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA). Dizajn se sastojao od 12 eksperimentalnih pokusa za svaki plin, argon i dušik. Tri odabrane nezavisne varijable bile su:

1. koncentracija etanola (0 %, 25 % ili 50 %),
2. primijenjeni napon (15 kV ili 20 kV za argon i 20 kV ili 25 kV za dušik) i
3. vrijeme obrade (3 i 9 min).

Za svaki uzorak za ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost izmjerene su dvije apsorbancije te je od izračunatih koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određena srednja vrijednost i standardna devijacija. Srednja vrijednost i standardna devijacija određena je i za veličinu čestica i indeks polidisperzije.

Kako bi se ispitaio utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable, provedena je multivarijantna analiza varijance (MANOVA) s razinom pouzdanosti od 95 %. Multivarijantna analiza varijance testira razlike između dviju ili više nezavisnih varijabli i dviju ili više zavisnih varijabli. Također, provedene su multivarijantne analize – analiza glavnih komponenti (PCA) i regresija glavnih komponenti (PCR) u XLStatu (Microsoft Office Excel 2010). PCA analiza provedena je na dijelu spektra koji je pokazao razliku između uzoraka, u području valnih duljina od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm. Kvantifikacija fenolnih spojeva napravljena je pomoću softvera Multiquant 3.6 (SCIEX, Darmstadt, Njemačka).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju ispitivana je učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline primjenom tretmana visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED tretman). Cilj je bio odrediti kako HVED tretman, s argonom i dušikom kao radnim plinovima, utječe na antioksidacijsku aktivnost i polifenolni sastav ekstrakta lista masline. Također, jedan od ciljeva rada bio je usporediti ekstrakciju potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem s konvencionalnom ekstrakcijom, tj. maceracijom. Krajnja svrha istraživanja bila je ekstrahirati fenolne komponente koje sadrže visoku antioksidacijsku aktivnost, kako bi se ostvarila njihova uloga.

HVED tretmanu podvrgnuto je ukupno 24 uzoraka, a konvencionalnoj metodi ekstrakcije 6. Uzorci koji su obrađeni HVED tretmanom imali su različite parametre ekstrakcije pa je tako svaki od njih imao različito vrijeme trajanja tretmana, različito otapalo za ekstrakciju te različit primijenjeni napon i radni plin. Konvencionalna metoda ekstrakcije također je podrazumijevala različito otapalo i različito vrijeme stajanja u otapalu za svaki uzorak.

U ovom su poglavlju prikazani rezultati mjerenja ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti određene FRAP, DPPH i ORAC metodom za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline. Isto tako, prikazan je udio pojedinih fenolnih spojeva u  $\text{ng mL}^{-1}$  određen pomoću UPLC/MS-MS metode, kao i rezultati veličine čestica i indeksa polidisperzije. Matrica podataka sadržavala je podatke o sadržaju ukupnih fenola, antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP, DPPH i ORAC metodom te podatke o NIR spektrima. Svaki je uzorak snimljen 3 puta, pa je tako dobivena matrica za NIR spektre sadržavala 796 stupca i 30 redaka. Na temelju rezultata NIR spektroskopije, provedena je PCA analiza koja je omogućila grupiranje uzoraka prema strukturnim promjenama. Razvijeni su i regresijski modeli za predviđanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti sličnih uzoraka na temelju analitičkih podataka i NIR spektroskopije. Za navedene rezultate provedena je statistička analiza u programu STATGRAPHICS Centurion, a određivan je učinak svake varijable (vremensko trajanje tretmana, udio etanola u otapalu, primijenjeni napon) i njihovih kombinacija na konačne rezultate.

#### 4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

U tablici u nastavku prikazani su rezultati mjerenja ukupnih fenola za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline izraženi u GAE g<sup>-1</sup> uzorka.

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola u netretiranim i HVED tretiranim uzorcima lista masline izražen u mg GAE (ekvivalent galne kiseline) g<sup>-1</sup>.

uzorak	netretirani uzorci		tretirani uzorci		
	mg GAE g <sup>-1</sup> uzorka	uzorak	mg GAE g <sup>-1</sup> uzorka	uzorak	mg GAE g <sup>-1</sup> uzorka
3NL0/1	5,32 ± 0,02	LN1	49,21 ± 0,10	LA1	39,56 ± 0,08
3NL25/1	13,35 ± 0,08	LN2	29,82 ± 0,07	LA2	32,69 ± 0,05
3NL50/1	14,06 ± 0,09	LN3	18,08 ± 0,08	LA3	9,82 ± 0,04
9NL0/1	15,85 ± 0,11	LN4	33,12 ± 0,12	LA4	26,69 ± 0,02
9NL25/1	16,04 ± 0,10	LN5	24,17 ± 0,05	LA5	36,17 ± 0,04
9NL50/1	20,61 ± 0,14	LN6	26,95 ± 0,08	LA6	31,21 ± 0,09
-	-	LN7	45,47 ± 0,06	LA7	53,64 ± 0,14
-	-	LN8	47,21 ± 0,09	LA8	65,99 ± 0,06
-	-	LN9	29,99 ± 0,07	LA9	30,77 ± 0,05
-	-	LN10	28,95 ± 0,11	LA10	21,21 ± 0,04
-	-	LN11	45,82 ± 0,16	LA11	42,60 ± 0,11
-	-	LN12	35,03 ± 0,10	LA12	26,43 ± 0,01

Udio ukupnih fenola u netretiranim i HVED tretiranim biljnim ekstraktima lista masline prikazan je u Tablici 6. i izražen kao mg GAE g<sup>-1</sup> biljke. Važno je naglasiti da tijekom tretmana kod 3 i 9 min, temperatura nije prelazila 30 °C. Koncentracija ukupnih fenola bila je veća u HVED tretiranim uzorcima, u usporedbi s netretiranim, pa tako HVED metodu ekstrakcije možemo smatrati učinkovitom metodom za ekstrakciju pri sobnoj temperaturi. Fenomen koji se javlja kod HVED tretmana je spomenuta elektroporacija, kod koje je jakost električnog polja izravno proporcionalna poroznosti stanične membrane biljke (Putnik i sur., 2018). Udio ukupnih fenola u tretiranim uzorcima masline kreće se u rasponu od 9,82 ± 0,04 do 65,99 ± 0,06 mg GAE g<sup>-1</sup>. Najveći udio ukupnih fenola u tretiranim uzorcima iznosi 65,99 ± 0,06 mg



GAE g<sup>-1</sup> te je određen u ekstraktu lista masline kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, naponu od 20 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola, tretiran u struji argona. Kod uzorka lista masline koji su tretirani u struji dušika, najveći udio ukupnih fenola je nešto niži i iznosi 49,21 ± 0,10 mg GAE g<sup>-1</sup>, a postignut je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, naponu od 20 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola. Netretirani uzorci majčine dušice imaju značajno niži udio ukupnih fenola pa je tako najniža vrijednost zabilježena kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, pri čemu se kao otapalo koristila voda i iznosi 5,32 ± 0,02 mg GAE g<sup>-1</sup>, što je 12,4 puta manje u odnosu na HVED tretirani uzorak lista masline s najvećim udjelom fenola, dok je najviša vrijednost ukupnih fenola u netretiranim uzorcima, 20,61 ± 0,14 GAE g<sup>-1</sup>, određena kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 minuta, u 50 %-tnoj otopini etanola.

Možemo primijetiti da se fenolni spojevi bolje otapaju u otopini etanola, u usporedbi s vodom, te da duže vrijeme ekstrakcije i veći napon također utječu na povećanje količine ukupnih fenola u ekstraktu. Fenolni spojevi se općenito lakše otapaju u polarnim otapalima kao što su alkoholi (etanol i metanol), dok su galna, cimetna i kumarinska kiselina topljivije u vodi, diklormetanu i acetonu (Rahmanian i sur., 2014). Istraživanje koje su proveli Lee i sur. (2009) pokazalo je da je sadržaj flavonoida i fenola bio značajno viši kad su se kao otapala za ekstrakciju lista masline koristili etanol (80 %-tna otopina), butanol i etil-acetat, u usporedbi s korištenjem heksana, kloroforma i vode kao otapala. Također, Garcia-Castello i sur. (2015) su otkrili da veća koncentracija etanola, u omjeru etanol:voda, rezultira većom koncentracijom flavonoida iz krutih ostataka grejpfruta, čime se dobivaju ekstrakti s višim sadržajem ukupnih fenola. Autori smatraju da smanjena dielektrična konstanta otapala uzrokovana dodatkom etanola dovodi do povećane topljivosti i difuzije polifenola iz biljne stanice. Neka druga istraživanja pak pokazuju suprotno, tj. da su veće količine polifenolnih spojeva identificirane u vodenom ekstraktu (Pereira i sur., 2007).

Talhaoui i suradnici (2014) određivali su udio polifenolnih spojeva u listu masline španjolskog kultivara Sikita primjenom HPLC-DAD-TOF-MS metode. Kao otapalo za ekstrakciju koristili su 80 %-tnu otopinu metanola, a koncentracije fenolnih spojeva kretale su se u rasponu od 52,13 do 60,64 mg GAE g<sup>-1</sup>. Budući da je u tom istraživanju primijenjena veća koncentracija etanola, u omjeru etanol:voda, rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Chanioti i sur. (2016) istraživali su izvedivost ekstrakcije pomoću mikrovalova (MAE, engl. microwave assisted extraction) te nakon provedene ekstrakcije odredili sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu koštica masline i ekstraktu lista masline. Istraživanje je pokazalo da su primjenom

MAE na 60 °C tijekom 30 minuta, ekstrakti dobiveni iz koštica masline imali sadržaj fenola 10,61 mg GAE g<sup>-1</sup>, a ekstrakti lista maslina 28,00 mg GAE g<sup>-1</sup>. Paralelno su radili i konvencionalnu ekstrakciju koja se provodila 1 sat pri 60 °C, a ekstrakti su imali sljedeći udio ukupnih fenola: ekstrakti koštica masline 11,41 mg GAE g<sup>-1</sup>, a ekstrakti lista masline 34,53 mg GAE g<sup>-1</sup>. Kada uspoređujemo taj rezultat s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, možemo zaključiti da je prosječni udio ekstrahiranih fenolnih spojeva kod HVED tretmana viši, u odnosu na MAE tretman, uz kraće vrijeme tretiranja i primijenjene niže temperature. Abaza i sur. (2011) ispitali su utjecaj vrste otapala na udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista masline. Proveli su klasičnu, konvencionalnu ekstrakciju na sobnoj temperaturi, tijekom 24 sata, a kao otapala su koristili deioniziranu vodu, 80 %-tni metanol, 70 % etanol i 80 %-tni aceton. Najveći udio ukupnih fenolnih spojeva određen je u 80 %-tnom acetonu te je iznosio 24,93 ± 0,77 mg GAE g<sup>-1</sup>, a najmanji u deioniziranoj vodi, 16,52 ± 0,62 mg GAE g<sup>-1</sup>. Kad je kao otapalo za ekstrakciju korišten 70 %-tni etanol, udio fenolnih spojeva iznosio je 24,36 ± 0,85 mg GAE g<sup>-1</sup>, što je u skladu s provedenim istraživanjem, budući da se klasična ekstrakcija provodila vremenski duže (1h, u usporedbi s 3 i 9 min) te je korišteno otapalo s većim udjelom etanola. Nadalje, Salah i sur. (2012) određivali su polifenolni sastav u ekstraktima lista tuniških maslina koristeći 30 %-tnu vodenu otopinu etanola i maceraciju tijekom 7 dana pri sobnoj temperaturi. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kretao se u rasponu od 56,57 ± 6,0 mg CTE (ekvivalent katehina) g<sup>-1</sup> do 125,64 ± 3,36 mg CTE g<sup>-1</sup>. Rezultate ne možemo usporediti s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, budući da se radi o različitim ekvivalentima (ekvivalent galne kiseline i ekvivalent katehina). Goldschmidt Lins i sur. (2018) proveli su konvencionalnu Soxhlet ekstrakciju, koristeći 80 %-tni metanol kao otapalo za ekstrakciju te su odredili da je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima lista masline iznosio 131,7 ± 9,4 mg GAE g<sup>-1</sup>, što je više u odnosu na rezultate dobivene u ovom istraživanju, budući da je korišten veći udio etanola u otapalu. Nedavno provedeno istraživanje pokazalo je kako ekstrakcija pod visokim pritiskom (PLE, engl. pressurized liquid extraction), kao inovativna zelena tehnologija koja je učinkovita za izolaciju fitokemikalija iz nusproizvoda prehrambene industrije, utječe na ekstrakte lista masline. Pri optimalnim uvjetima PLE ekstrakcije (2 ciklusa, 80 °C, 5 min) udio ukupnih fenola iznosio je 53,15 mg GAE g<sup>-1</sup> (Putnik i sur., 2017), što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

## 4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

U tablicama u nastavku prikazani su rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti (FRAP, DPPH i ORAC metoda) za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline.

### 4.2.1. FRAP metoda

Tablica 7. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline izraženi u  $\mu\text{mol FE}$  (ekvivalent  $\text{Fe}^{+2}$ )  $\text{g}^{-1}$ .

uzorak	netretirani uzorci		tretirani uzorci		
	$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka
3NL0/1	63,36 ± 2,24	LN1	266,21 ± 7,53	LA1	234,07 ± 2,66
3NL25/1	150,50 ± 4,57	LN2	208,36 ± 4,28	LA2	145,50 ± 2,87
3NL50/1	159,79 ± 5,42	LN3	197,64 ± 2,00	LA3	97,64 ± 1,15
9NL0/1	146,93 ± 3,54	LN4	199,79 ± 5,22	LA4	169,07 ± 5,92
9NL25/1	179,07 ± 6,09	LN5	374,79 ± 6,74	LA5	315,50 ± 4,00
9NL50/1	221,93 ± 6,99	LN6	308,36 ± 4,45	LA6	321,21 ± 6,38
-	-	LN7	209,79 ± 2,01	LA7	443,36 ± 5,21
-	-	LN8	229,79 ± 5,82	LA8	237,64 ± 3,73
-	-	LN9	301,21 ± 4,68	LA9	326,21 ± 2,16
-	-	LN10	256,21 ± 5,74	LA10	196,21 ± 2,97
-	-	LN11	561,93 ± 9,11	LA11	343,36 ± 3,01
-	-	LN12	284,07 ± 3,21	LA12	354,07 ± 5,36

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u netretiranim i HVED tretiranim ekstraktima lista masline prikazani su u Tablici 7. i izraženi kao  $\mu\text{mol FE g}^{-1}$  uzorka pri različitim uvjetima ekstrakcije u struji dušika i argona. List masline pokazuje različitu antioksidacijsku aktivnost pri različitim uvjetima ekstrakcije, a ona se kreće u rasponu od  $97,64 \pm 1,15$  do  $561,93 \pm 9,11 \mu\text{mol FE g}^{-1}$  kod uzoraka koji su podvrgnuti HVED tretmanu. Najveća antioksidacijska aktivnost,  $561,93 \pm 9,11 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ , određena je kod uvjeta ekstrakcije u

trajanju od 3 min, naponu od 25 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola, kod tretmana dušikom. Kod uzorka lista masline koji su tretirani u struji argona, najveći udio ukupnih fenola je nešto niži i iznosi  $443,36 \pm 5,21 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ , a postignut je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, naponu od 15 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola. Kod konvencionalne ekstrakcije, odnosno tzv. netretiranih uzoraka lista masline, najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom zabilježena je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, u otopini vode te iznosi  $63,36 \pm 2,24 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ , što je 8,87 puta manje u odnosu na HVED tretirani uzorak lista masline s najvećom antioksidacijskom aktivnošću određenom FRAP metodom, dok je najviša vrijednost,  $221,93 \pm 6,99 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ , zabilježena kod vremenski najdužeg tretmana i najvećeg udjela etanola u otapalu, odnosno kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 minuta i u 50 %-tnoj otopini etanola. Na temelju dobivenih rezultata možemo primijetiti da veći udio etanola značajno utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom te da uzorci kod kojih se kao otapalo za ekstrakciju koristila voda rezultiraju manjom antioksidacijskom aktivnošću.

U nedavno provedenom istraživanju, autori su ispitivali antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom u ekstraktima lista masline, a dobiveni ekstrakti bili su podvrgnuti Soxhlet ekstrakciji. Odredili su da antioksidacijska aktivnost u dobivenim ekstraktima lista masline iznosi  $281,8 \pm 22,8 \text{ mg TE g}^{-1}$  (Goldschmidt Lins i sur., 2018). Kada uspoređujemo taj rezultat s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, možemo zaključiti da je antioksidacijska aktivnost ekstrahiranih fenolnih spojeva kod HVED tretmana uglavnom viša.

#### 4.2.2. DPPH metoda

Tablica 8. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  (ekvivalent troloxa)  $\text{g}^{-1}$ .

uzorak	netretirani uzorci		tretirani uzorci		
	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka
<b>3NL0/1</b>	27,06 ± 0,01	<b>LN1</b>	31,49 ± 0,07	<b>LA1</b>	30,78 ± 0,15
<b>3NL25/1</b>	24,78 ± 0,05	<b>LN2</b>	28,60 ± 0,05	<b>LA2</b>	26,53 ± 0,08
<b>3NL50/1</b>	32,71 ± 0,06	<b>LN3</b>	25,96 ± 0,06	<b>LA3</b>	29,71 ± 0,11
<b>9NL0/1</b>	31,10 ± 0,08	<b>LN4</b>	27,46 ± 0,08	<b>LA4</b>	25,53 ± 0,08
<b>9NL25/1</b>	30,46 ± 0,07	<b>LN5</b>	31,31 ± 0,04	<b>LA5</b>	29,60 ± 0,17
<b>9NL50/1</b>	33,31 ± 0,08	<b>LN6</b>	30,14 ± 0,09	<b>LA6</b>	30,64 ± 0,02
-	-	<b>LN7</b>	30,49 ± 0,10	<b>LA7</b>	29,85 ± 0,12
-	-	<b>LN8</b>	31,81 ± 0,08	<b>LA8</b>	31,53 ± 0,01
-	-	<b>LN9</b>	28,35 ± 0,01	<b>LA9</b>	26,81 ± 0,08
-	-	<b>LN10</b>	29,99 ± 0,08	<b>LA10</b>	29,67 ± 0,05
-	-	<b>LN11</b>	27,96 ± 0,07	<b>LA11</b>	32,53 ± 0,10
-	-	<b>LN12</b>	31,53 ± 0,02	<b>LA12</b>	30,03 ± 0,08

U Tablici 8. prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u netretiranim i HVED tretiranim ekstraktima lista masline, izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  uzorka, odnosno biljke. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom iznosi  $33,31 \pm 0,08 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ , a primijećen je kod uzorka koji je podvrgnut konvencionalnoj ekstrakciji (maceraciji) u trajanju od 9 min i u 50 %-tnoj otopini etanola. Kod uzoraka koji su podvrgnuti HVED tretmanu, antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom kreće se u rasponu od  $25,53 \pm 0,08$  do  $32,53 \pm 0,10 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . Najveća antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom kod uzoraka koji su podvrgnuti HVED tretmanu određena je kod tretmana argonom i uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, naponu od 20 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola i iznosi  $32,53 \pm 0,10 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . Kod uzoraka lista masline koji su tretirani u struji dušika, najveći udio ukupnih fenola određen DPPH metodom iznosi  $31,81 \pm 0,08 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ , a određen je

kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, naponu od 25 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola. Najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline određena DPPH metodom iznosi  $24,78 \pm 0,05 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ , što je 1,34 puta manje u odnosu na HVED tretirani uzorak s najvećom antioksidacijskom aktivnošću određenom DPPH metodom, te je primijećen kod uzorka koji je podvrgnut konvencionalnoj ekstrakciji pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 3 min i u 25 %-tnoj otopini etanola. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom uglavnom raste ako su uzorci ekstrahirani u otopini etanola, u ovom slučaju najbolje vrijednosti daje otopina s najvećim postotkom etanola, dakle 50 %-tna otopina etanola, u usporedbi s vodom koja daje najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Ne može se zaključiti da je prethodni tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem olakšao ekstrakciju i doveo do viših vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom jer su rezultati netretiranih i tretiranih uzoraka veoma slični.

U nedavno provedenom istraživanju, autori su ispitivali antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom u ekstraktima koštice masline i ekstraktima lista masline, a ekstrakcija se provodila pomoću mikrovalova (MAE, engl. microwave assisted extraction). Odredili su da je antioksidacijska aktivnost u dobivenim ekstraktima koštice masline iznosila  $10,40 \text{ mg trolox-a g}^{-1}$ , a u ekstraktima lista masline  $23,40 \text{ mg trolox-a g}^{-1}$ . Kao usporednu metodu, koristili su konvencionalnu ekstrakciju koja se provodila 1 sat pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , a ekstrakti su imali sljedeću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom: ekstrakti koštice masline  $9,69 \text{ mg trolox-a g}^{-1}$  uzorka i ekstrakti lista masline  $27,94 \text{ mg trolox-a g}^{-1}$  uzorka (Chanioti i sur., 2016). Kada taj rezultat uspoređujemo s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, možemo zaključiti da je prosječni udio antioksidacijske aktivnosti kod HVED tretmana viši, u odnosu na MAE tretman, uz kraće vrijeme tretiranja i primijenjene niže temperature. Shalaby i sur. (2018) istraživali su antioksidacijsku aktivnost ekstrakta lista masline koji su bili obrađeni gama zračenjem pomoću DPPH metode te dobili da su svi zračeni ekstrakti imali veću antioksidacijsku aktivnost, u usporedbi s onima koji nisu bili zračeni. Došli su do tvrdnje da povećanje antioksidacijske aktivnosti može biti posljedica gama zračenja koje omogućuje lakše oslobađanje aktivnih sastojaka zaslužnih za povećanje koncentracije ukupnih fenola.

#### 4.2.3. ORAC metoda

Tablica 9. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene ORAC metodom za netretirane i HVED tretirane uzorke lista masline izraženi u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  (ekvivalent troloxa)  $\text{g}^{-1}$ .

uzorak	netretirani uzorci		tretirani uzorci		
	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka	uzorak	$\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka
<b>3NL0/1</b>	28,05 ± 3,75	<b>LN1</b>	270,99 ± 13,03	<b>LA1</b>	179,89 ± 10,19
<b>3NL25/1</b>	75,51 ± 4,75	<b>LN2</b>	66,12 ± 20,98	<b>LA2</b>	34,45 ± 6,33
<b>3NL50/1</b>	117,85 ± 2,48	<b>LN3</b>	24,47 ± 3,43	<b>LA3</b>	1,84 ± 1,60
<b>9NL0/1</b>	59,04 ± 3,83	<b>LN4</b>	81,95 ± 5,86	<b>LA4</b>	2,74 ± 1,88
<b>9NL25/1</b>	85,37 ± 7,46	<b>LN5</b>	73,21 ± 6,98	<b>LA5</b>	115,98 ± 8,26
<b>9NL50/1</b>	247,81 ± 19,47	<b>LN6</b>	87,08 ± 11,56	<b>LA6</b>	84,46 ± 0,98
-	-	<b>LN7</b>	230,84 ± 5,82	<b>LA7</b>	267,32 ± 16,29
-	-	<b>LN8</b>	260,67 ± 26,76	<b>LA8</b>	245,48 ± 1,66
-	-	<b>LN9</b>	78,29 ± 15,37	<b>LA9</b>	86,46 ± 5,23
-	-	<b>LN10</b>	78,66 ± 0,73	<b>LA10</b>	17,87 ± 1,61
-	-	<b>LN11</b>	139,92 ± 48,18	<b>LA11</b>	243,86 ± 16,13
-	-	<b>LN12</b>	303,66 ± 13,07	<b>LA12</b>	134,66 ± 4,15

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene ORAC metodom u netretiranim i HVED tretiranim biljnim ekstraktima lista masline prikazani su u Tablici 9. te su izraženi kao  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  biljke. Kod uzoraka koji su podvrgnuti HVED tretmanu antioksidacijska aktivnost određena ORAC metodom različita je kod različitih uvjeta ekstrakcije te se kreće u rasponu od  $1,84 \pm 1,60$  do  $303,66 \pm 13,07 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . Najveći antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom u ekstraktu lista masline,  $303,66 \pm 13,07 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ , određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, naponu od 20 kV, u 25 %-tnoj otopini etanola, tretiran u struji dušika, dok je maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti lista masline tretiranog u struji argona primijećena kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, naponu od 15 kV, u 50 %-tnoj otopini etanola i iznosi  $267,32 \pm 16,29 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . Najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline određena ORAC metodom također je određena u uzorku koji je podvrgnut HVED tretmanu, i to tretiranom u struji argona, te iznosi samo  $1,84 \pm 1,60 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ .

TE g<sup>-1</sup>, a određena je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, naponu od 15 kV, u otopini vode. Moguće da su u uzorcima LA3 i LA4 nastali slobodni radikali, uslijed djelovanja HVED tretmana, koji su izazvali „gašenje“ fenolnih spojeva budući da je u tim uzorcima, osim malog prinosa, primijećen i mali udio fenolnih spojeva. Kod netretiranih uzoraka najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti je 10,83 puta manja od najveće antioksidacijske aktivnosti određene kod HVED tretiranih uzoraka. Možemo primijetiti da kod uzoraka koji su podvrgnuti konvencionalnoj, odnosno klasičnoj ekstrakciji, antioksidacijska aktivnost raste s porastom udjela etanola, pa je tako ona najveća kad se kao otapalo za ekstrakciju koristila 50 %-tna otopina etanola (3NL50/1, 9NL50/1), a najmanja kad se koristila voda (3NL0/1, 9NL0/1). Slično je i kod HVED tretiranih uzoraka, pa tako oni uzorci koji su otopljeni u 50 %-tnoj otopini etanola (LN1, LN7, LN8, LN11, LA1, LA7, LA8, LA11), rezultiraju većom antioksidacijskom aktivnošću u usporedbi s uzorcima kod kojih se koristila voda.

#### 4.3. PRINOS EKSTRAKCIJE

Tablica 10. Rezultati prinosa ekstrakcije (%) netretiranih i HVED tretiranih uzoraka lista masline.

uzorak	netretirani uzorci		tretirani uzorci		
	prinos ekstrakcije (%)	uzorak	prinos ekstrakcije (%)	uzorak	prinos ekstrakcije (%)
3NL0/1	0,53 ± 0,00	LN1	4,92 ± 0,01	LA1	3,96 ± 0,01
3NL25/1	1,33 ± 0,01	LN2	2,98 ± 0,01	LA2	3,27 ± 0,00
3NL50/1	1,41 ± 0,01	LN3	1,81 ± 0,01	LA3	0,98 ± 0,00
9NL0/1	1,58 ± 0,01	LN4	3,31 ± 0,01	LA4	2,67 ± 0,00
9NL25/1	1,60 ± 0,01	LN5	2,42 ± 0,01	LA5	3,62 ± 0,00
9NL50/1	2,06 ± 0,01	LN6	2,69 ± 0,01	LA6	3,12 ± 0,01
-	-	LN7	4,55 ± 0,01	LA7	5,36 ± 0,01
-	-	LN8	4,72 ± 0,01	LA8	6,60 ± 0,01
-	-	LN9	3,00 ± 0,01	LA9	3,08 ± 0,01
-	-	LN10	2,89 ± 0,01	LA10	2,12 ± 0,00
-	-	LN11	4,58 ± 0,02	LA11	4,26 ± 0,01
-	-	LN12	3,50 ± 0,01	LA12	2,64 ± 0,00



Prema prikazanim rezultatima u Tablici 10. najveći prinosi određeni u ekstraktima lista masline koji su bili tretirani strujom dušika primijećeni su kod uzoraka LN1, LN7, LN8 i LN11, a kod ekstrakta koji su bili tretirani strujom argona ističu se LA7, LA8 i LA11. Svi navedeni uzorci bili su otopljeni u 50 %-tnom etanolu, iz čega vidimo da udio etanola kao otapala za ekstrakciju značajno utječe na prinos ekstrakcije. Najveći prinos određen je kod uzorka koji je podvrgnut HVED tretmanu u struji argona (LA8) i iznosi  $6,60 \pm 0,01$  %, što je tretman u trajanju od 9 minuta, otapalo 50 %-tni etanol i napon od 20 kV, što je 3,20 puta više u odnosu na uzorak koji je podvrgnut konvencionalnoj ekstrakciji u istim uvjetima tretiranja, bez napona (9NL50/1). Kod tretmana u struji dušika najveći prinos pokazao se u uzorku LN1 ( $4,92 \pm 0,01$  %) i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, 50 %-tnoj otopini etanola i naponu od 20 kV. U usporedbi s HVED tretiranim uzorcima, netretirani uzorci rezultiraju značajno nižim prinosom ekstrakcije te se može primijetiti da kod takvih uzoraka prinos raste s porastom vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu. Najviša vrijednost prinosa ekstrakcije kod netretiranih uzoraka iznosi  $2,06 \pm 0,01$  % te je određena u uzorku lista masline gdje je ekstrakcija trajala 9 minuta, u 50 %-tnoj otopini etanola. Kada gledamo čistu vodu kao ekstrakcijsko otapalo, možemo primijetiti da su za HVED ekstrakciju utvrđene 2-6 puta veće vrijednosti udjela ukupnih fenola (LN2, LN3, LN4, LN10, LA2, LA3, LA4 i LA10) u odnosu na uzorke koji su podvrgnuti konvencionalnoj ekstrakciji.

Istraživanja koja su nedavno provedena, potvrdila su HVED metodu ekstrakcije kao tehniku koja može biti vrlo učinkovita za ekstrakciju prirodnih spojeva (polifenola) te tehniku koja rezultira značajnim porastom prinosa zbog poremećaja stanica u uzorku koji je uzrokovan električnim pražnjenjem i poboljšanim prijenosom mase (Xi i sur., 2017).

Prinos ekstrakcije ovisi o vrsti i polarnosti otapala, vremenu ekstrakcije i temperaturi, omjeru uzorka i otapala te o kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama uzoraka. Topljivost fenola također ovisi o vrsti biljke i polarnosti korištenog otapala (Dai i Mumper, 2010). Mnogi se fenolni spojevi lako oksidiraju i hidroliziraju, pa tako dugo vrijeme ekstrakcije i visoke temperature povećavaju mogućnost oksidacije fenola te smanjuju prinos ekstrakcije. Tako se npr. konvencionalna ekstrakcija, u slučaju kada želimo izolirati antocijane, provodi pri temperaturi od 20 do 50 °C, jer se pokazalo da temperature iznad 70 °C uzrokuju brzu degradaciju antocijana (Dai i Mumper, 2010; Havlikova i Mikova, 1985). Iz tog razloga, vrlo je važno odabrati učinkovitu metodu ekstrakcije kako bismo održali stabilnost fenolnih spojeva.

#### 4.4. UPLC-MS/MS METODA

Tablica 11. Koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) za uzorke lista masline tretirane u struji dušika i argona te uzorke lista masline koji nisu podvrgnuti tretmanu.

Uzorak	Apigenin	Diosmetin	Hidroksitirosol	Luteolin	Oleanolna kiselina	Oleuropein	Kvercetin
3NL0/1	156	124	9,17	2356,6	4,45	50,4	N/A
3NL25/1	125	112	494	550	0,66	3959	0,140
3NL50/1	31,9	14,5	4120	154	3918	23485	247
9NL0/1	172	121	11,6	71,5	2,12	56,2	0,054
9NL25/1	144	132	125	580	0,79	825	0,124
9NL50/1	193	154	13,0	80,8	8,37	108	3,01
LN1	58,6	47,0	3016	353	3386	17646	9,07
LN2	157	118	86,6	138	8,84	99,3	N/A
LN3	109	101	97,5	96,3	3,65	76,1	0,048
LN4	127	98,1	96,5	122	N/A	74,2	0,042
LN5	116	119	80,4	361	1,83	163	0,109
LN6	134	127	67,5	424	2,92	165	0,115
LN7	38,9	30,0	3090	255	2803	17311	7,17
LN8	44,3	33,0	3294	265	2705	18413	9,0
LN9	149	159	108	375	8,57	168	0,179
LN10	111	94,2	192	252	3,76	178	0,103
LN11	106	106	97,5	403	2,00	424	0,121
LN12	56,8	49,2	3426	386	2851	17388	8,54
LA1	53,6	59,9	2964	357	2004	16103	5,27
LA2	198	76,6	10,1	29,8	5,74	57,4	0,043
LA3	124	130	112	215	2,41	97,9	0,032
LA4	113	100	64,0	113	N/A	52,5	0,021
LA5	110	123	128	487	N/A	247	0,146
LA6	115	122	145	457	N/A	315	0,218
LA7	60,1	60,6	3660	431	1844	17127	6,43
LA8	48,2	41,5	3682	334	2043	17895	15,6
LA9	111	116	149	480	6,22	465	0,189
LA10	94,2	85,3	139	166	N/A	102	0,061
LA11	51,4	51,0	2967	372	2193	16695	5,79
LA12	142	141	77,2	459	7,51	166	0,191

Iz Tablice 11. možemo vidjeti da je UPLC-MS/MS analiza pojedinačnih fenolnih spojeva pokazala da su glavni fenolni spojevi u ekstraktu lista masline apigenin, diosmetin, hidroksitirosol, luteolin, oleanolna kiselina, oleuropein i kvercentin. S povećanjem koncentracije etanola u otapalu dolazi do povećanja količine fenolnih spojeva u ekstraktu, što je posljedica bolje topljivosti fenolnih spojeva u takvim otapalima (Bellumori i sur., 2016, Rafiee i sur., 2011). Oleuropein je glavni spoj ekstrakta lista masline. Iz dobivenih rezultata primjećujemo da je kod HVED tretmana, gdje se kao otapalo za ekstrakciju koristila 50 %-tna otopina etanola, opažena veća koncentracija oleuropeina i hidroksitirosola. Hidroksitirosol uklanja superoksidne anione te je inhibitor neutrofila i radikala koji potječu od derivata hipoklorične kiseline (Batista Napotnik i Miklavčič, 2018). Najveće vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva u ekstraktima lista masline koji su bili podvrgnuti HVED tretmanu, zastupljene su u uzorcima LN1 i LA8. Uzorak LN1 tretiran je u struji dušika, a kao otapalo za ekstrakciju korištena je 50 %-tna otopina etanola, u trajanju tretmana od 3 minute pri naponu od 20 kV, dok je kod LA8 korišten argon, kao otapalo za ekstrakciju 50 %-tna otopina etanola, a tretman je trajao 9 minuta pri naponu od 20 kV. Ekstrakcija podvrgnuta visokonaponskom električnom pražnjenju pri najvišem naponu (25 kV) i pri vremenu ekstrakcije 9 minuta rezultirala je razgradnjom oleanolne kiseline u ekstraktu lista masline.

Visokonaponsko električno pražnjenje, čiji se intenzitet električnog polja kreće od 20 do 80 kV/cm, temelji se na fenomenu električnog raspada u tekućinama koji potiče fizičke i kemijske procese te takvi procesi utječu na staničnu stijenkku i membranu i oslobađaju komponente koje se nalaze unutar stanice (Boussetta i Vorobiev, 2014). Nadalje, HVED stvara vruću lokaliziranu plazmu za vrijeme disocijacije vode na fotone, pri čemu emitira UV svjetlo visokog intenziteta te dolazi do stvaranja OH radikala. U isto vrijeme, HVED stvara udarne valove i pirolizu uzrokovanu elektrohidrauličkom kavitacijom (El Kantar i sur., 2018). Nedavna istraživanja pokazala su da je HVED metoda učinkovita za prethodnu obradu pektina iz pulpe šećerne repe bez promjene strukture i kemijskog sastava pektina (Almohammed i sur., 2017) te da je brža za ekstrakciju proteina i polifenola iz koštice masline, u usporedbi s UAE (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom) i PEP (pulsirajuće električno polje) metodom (Roselló-Soto i sur., 2015). HVED metoda pokazala se efikasnom i obećavajućom kod proizvodnje esencijalnih ulja iz uljarica i bilja, jer se tijekom prerade zadržava više proteina i polifenola (Sarkis i sur., 2015). Stvaranjem električnih polja i električnih pražnjenja do 25 kV, dolazi do formiranja slobodnih radikala kao što su reaktivni spojevi kisika (ROS) i reaktivni spojevi dušika (RNS). Takve čestice mogu imati negativno djelovanje na bioaktivne spojeve,

naročito pri vremenski duljem HVED tretmanu (Režek Jambrak i sur., 2019). Međutim, stvaranje slobodnih radikala možemo izbjeći optimizacijom i kraćim vremenskim trajanjem HVED tretmana, kao i izborom odgovarajućeg plina kako bismo smanjili oksidaciju fenolnih i drugih spojeva koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost.

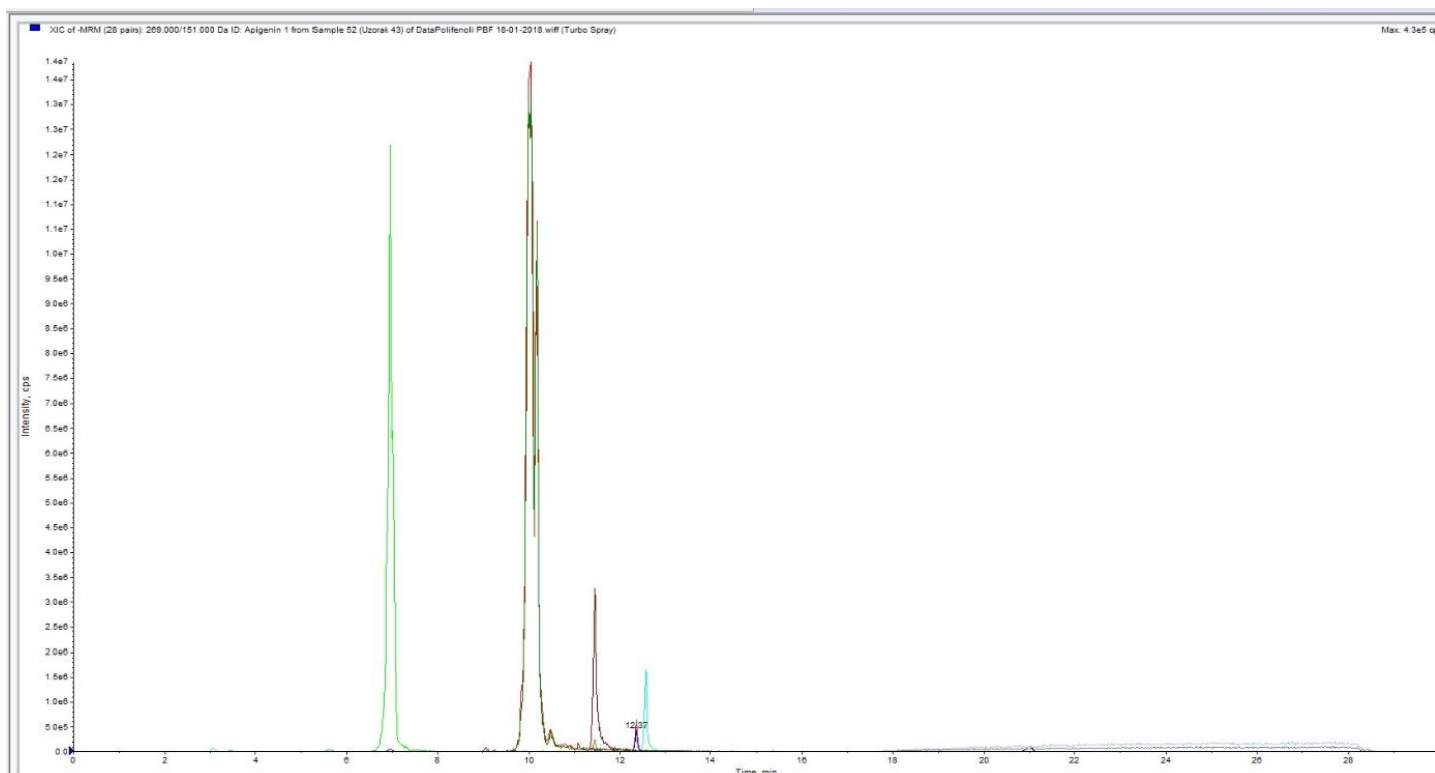
UPLC-MS/MS kromatogrami za HVED tretirane uzorke lista masline prikazani su na Slici 12.a, 12.b, 13.a i 13.b. Slike 12.a i 13.a prikazuju ukupne ionske kromatograme (TIC, engl. total ion chromatogram) određenog ekstrakta i u tim kromatogramima je uključeno višestruko praćenje reakcija MRM (engl. multiple reaction monitoring). Na osi x je intenzitet, a os y vrijeme zadržavanja tR (retencijsko vrijeme, engl. retention time) određenog analita. Slike 12.b i 13.b prikazuju ekstrahirani ionski kromatogram određenog ekstrakta te je i u tim kromatogramima uključeno MRM višestruko praćenje reakcija. Na osi x je intenzitet, a os y vrijeme zadržavanja tR. Na slici 12.b prikazani su apigenin, hidroksitirozol, oleanolna kiselina, oleuropein i luteolin, a na Slici 13.b apigenin, hidroksitirozol, diosmetin, oleuropein i luteolin.

Pereira i sur. (2007) identificirali su sedam fenolnih spojeva u ekstraktima lista masline: kafeinsku kiselinu, verbaskozid, oleuropein, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, rutin i luteolin-4-glukozid, koji su u niskim koncentracijama pokazali antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Glavni spojevi u vodenom i metanolnom ekstraktu bili su flavonoidi, pri čemu je najveći postotak, oko 73 %, pripao oleuropeinu (u vodenom ekstraktu), a najmanji, oko 1 %, kafeinskoj kiselini. Istraživanje koje su proveli Lee i sur. (2009) pokazalo je da je glavni fenolni spoj u dobivenim ekstraktima oleuropein. Kako je najveći udio pripao oleuropeinu, možemo zaključiti da su rezultati istraživanja u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

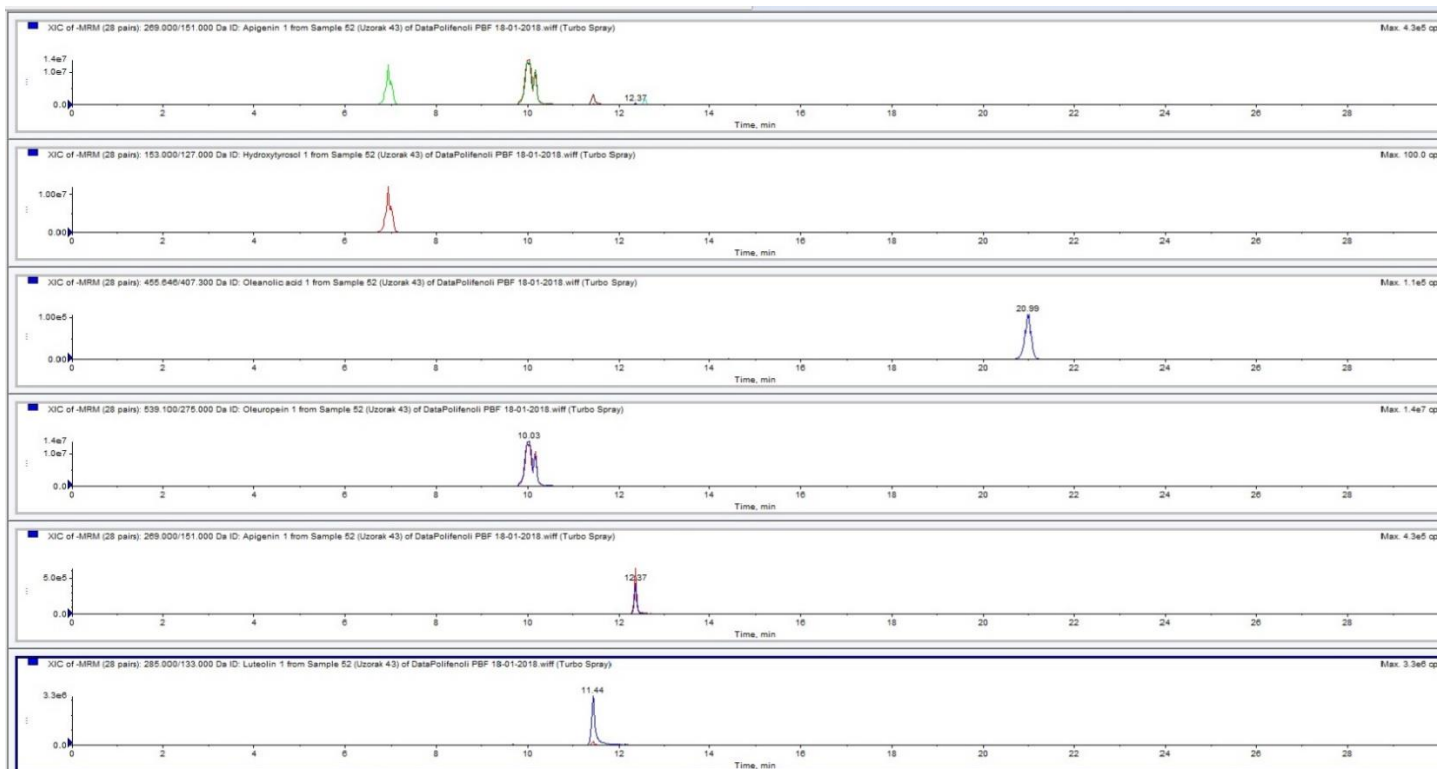
Vogel i sur. (2015) dokazali su da su oleuropein i verbaskozid, ekstrahirani iz lista masline, uglavnom rezistentni na želučanu probavu, no da tijekom intestinalne probave dolazi do degradacije njihove degradacije te da je da je luteolin-7-glukozid najstabilniji fenolni spoj u humanom gastrointestinalnom traktu.

Altioik i sur. (2008) ispitali su utjecaj uvjeta ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom ekstrakta lista masline. Odredili su da se ekstrakt s visokom antioksidacijskom aktivnošću i visokim sadržajem oleuropeina (13,4 %) i rutina (0,18 %) može dobiti korištenjem 70 %-tnog etanola kao otapala za ekstrakciju, što je u skladu s provedenim istraživanjem, budući da je otopina za ekstrakciju s najvećim udjelom

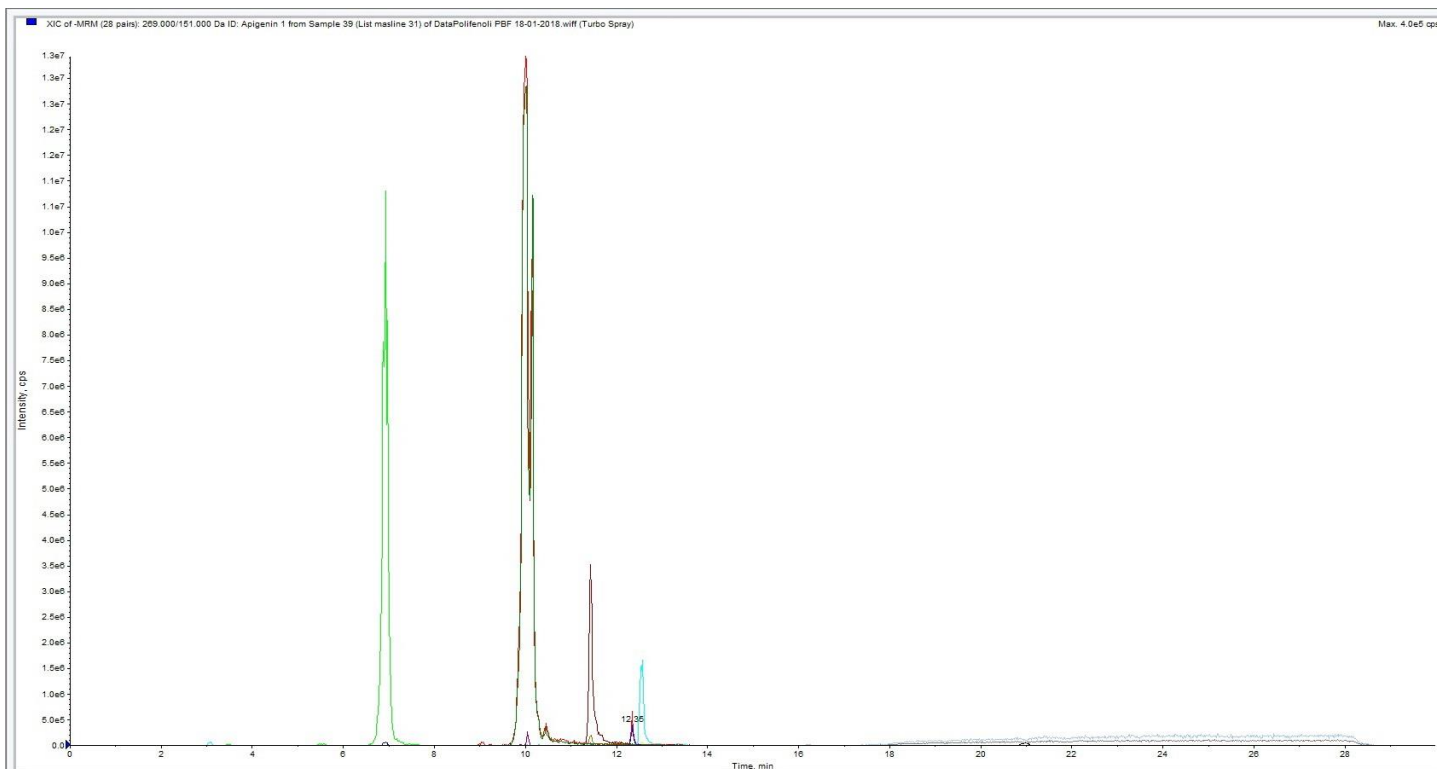
etanola dala i najbolje rezultate. Goldschmidt Lins i sur. (2018) određivali su sadržaj oleuropeina u ekstraktima lista masline te su odredili da on iznosi bio  $25,5 \pm 5,2 \text{ mg g}^{-1}$ , što je više nego pokazuju rezultati u ovom istraživanju, no autori su koristili 80 %-tnu otopinu metanola, pa je takav rezultat i očekivan. Sahin i sur. (2017) istraživali su utjecaj mikrovalne ekstrakcije bez korištenja otapala (SFME, engl. solvent-free microwave extraction) na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta lista masline. Maksimalan prinos oleuropeina iznosio je  $0,060 \pm 0,012 \text{ ppm}$ , a sadržaj ukupnih fenola  $2,480 \pm 0,060 \text{ ppm}$ . Uspoređujući te rezultate s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, možemo uočiti da je dobiveni prinos oleuropeina kod HVED tretmana u većini uzoraka iznad  $60 \text{ ng mL}^{-1}$ , pa je u skladu s tim HVED metoda rezultirala boljim prinosom oleuropeina od SFME metode.



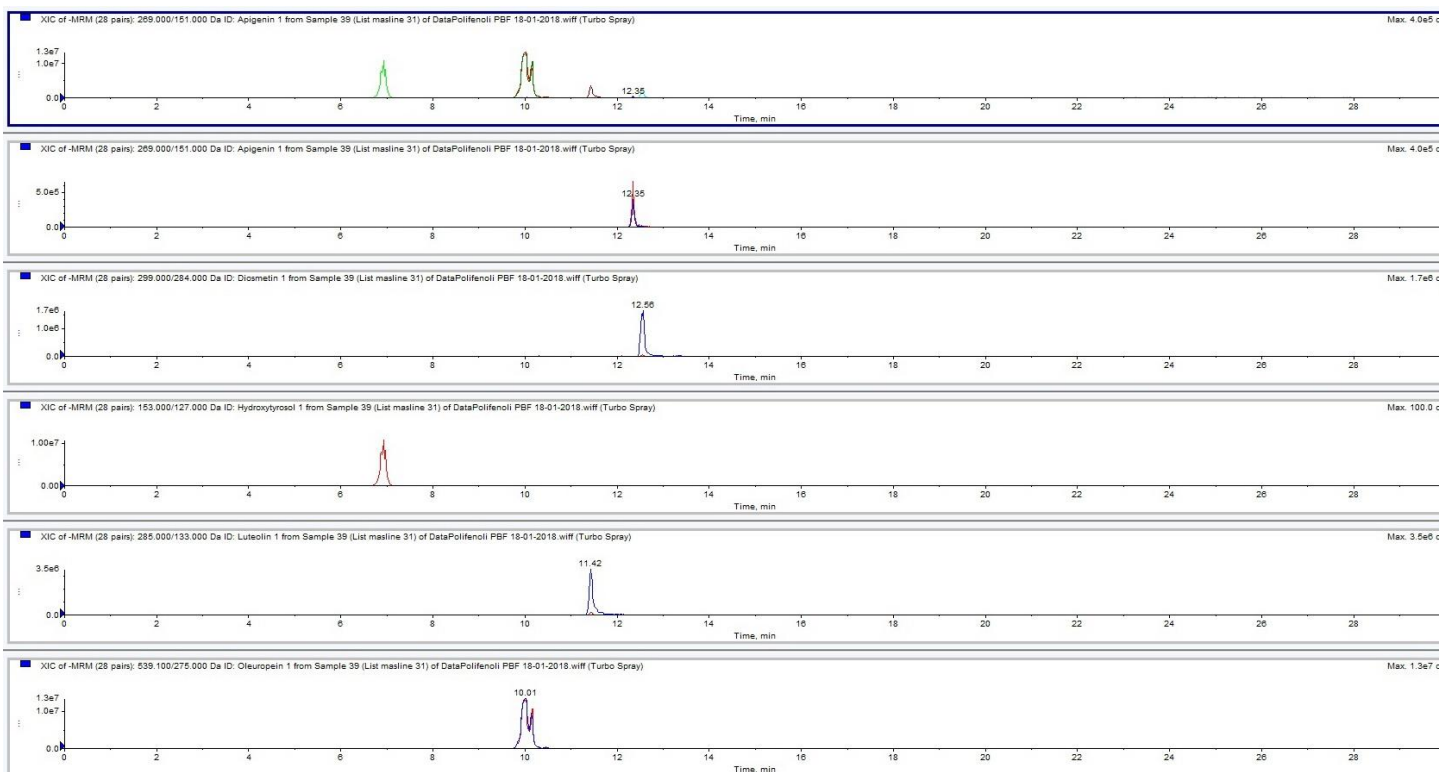
Slika 12.a Prikaz kromatograma LC/MS analize lista masline tretiranog dušikom (LN1) – ukupni ionski kromatogram (TIC, engl. total ion chromatogram).



Slika 12.b Prikaz kromatograma LC/MS analize lista masline tretiranog dušikom (LN1) – iona karakterističnih za pojedini polifenol (XIC, engl. extracted ion chromatogram).



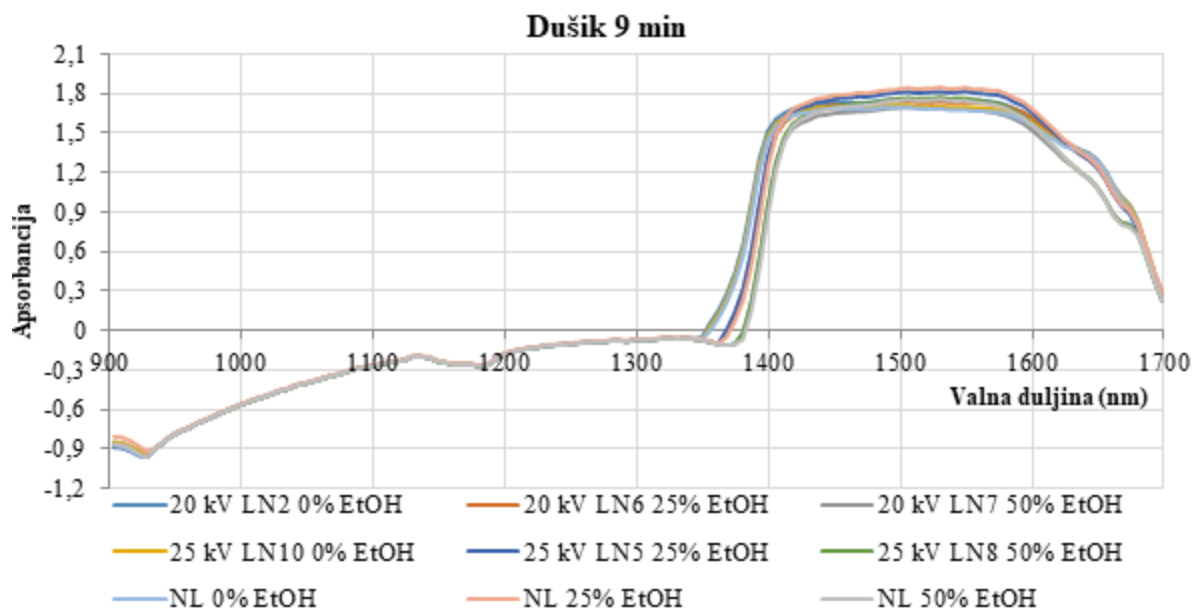
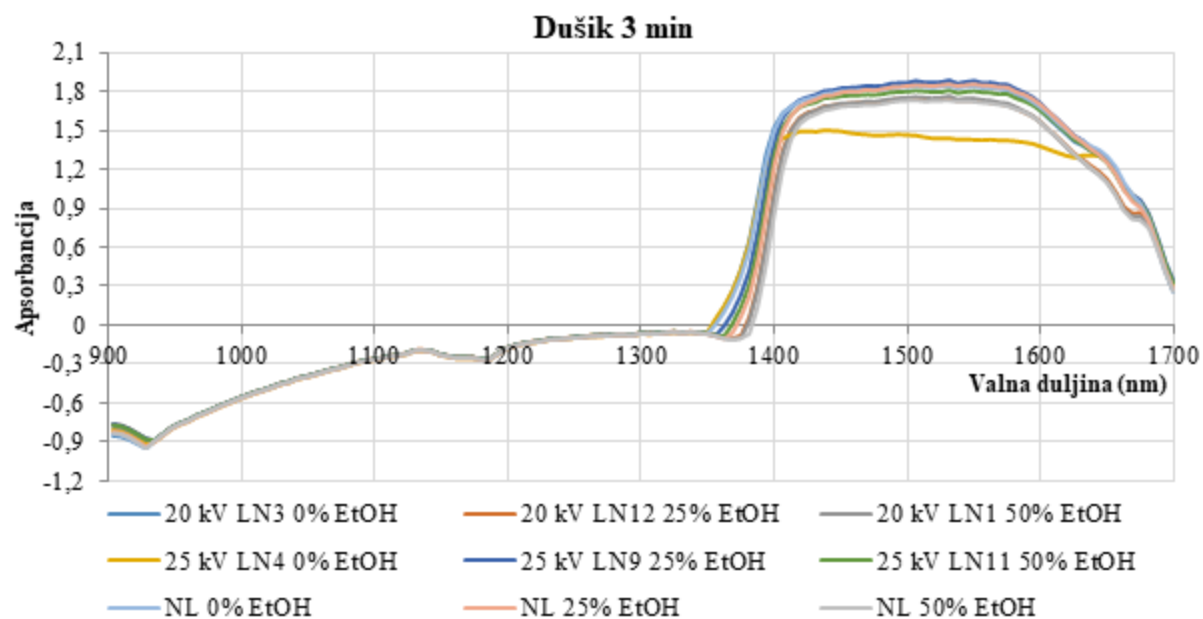
Slika 13.a Prikaz kromatograma LC/MS analize lista masline tretiranog argonom (LA1) – ukupni ionski kromatogram (TIC, engl. total ion chromatogram).



Slika 13.b Prikaz kromatograma LC/MS analize lista masline tretiranog argonom (LA1) – iona karakterističnih za pojedini polifenol (XIC, engl. extracted ion chromatogram).

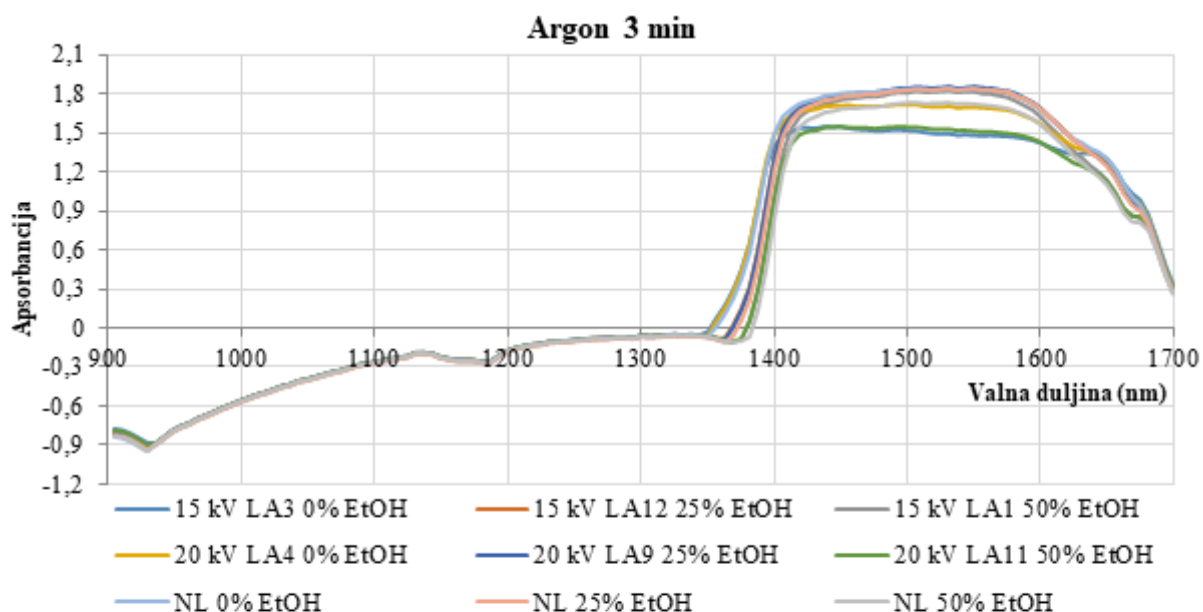
#### 4.5. NIR SPEKTROSKOPIJA

NIR spektroskopija korištena je za otkrivanje bioaktivnih spojeva (proteina, aminokiselina, ugljikohidrata, polisaharida, ukupnih fenola, flavona i flavonola, antioksidacijskog kapaciteta itd.) koji se u ljekovitim biljnim ekstraktima (ekstrakt lista masline) mogu uočiti u području valnih duljina od 904 nm do 1699 nm. U tom rasponu valnih duljina uzorak apsorbira svjetlost na frekvencijama koje odgovaraju karakterističnim vibracijama, uključujući one koje su dobivene iz detektiranih C-H, O-H, N-H, C=O i ostalih funkcijskih skupina (Belščak-Cvitanović i sur., 2017). Za daljnu analizu NIR spektra koriste se različite kemometrijske metode (Jednačak i Novak, 2013), a u ovome radu korištene su Analiza glavnih komponenti ili PCA analiza i Regresija glavnih komponenti ili PCR analiza.



Slika 14. Blisko-infracrveni (NIR) spektri snimljeni u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm za uzorke lista masline tretirane u struji dušika 3 minute i 9 minuta pri 20 kV i 25 kV te uzorke lista masline koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu.





Slika 15. Blisko-infracrveni (NIR) spektri snimljeni u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm za uzorke lista masline tretirane u struji argona 3 minute i 9 minuta pri 15 kV i 20 kV te uzorke lista masline koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu.

Slika 14. i Slika 15. prikazuju blisko-infracrvene (NIR) spektre snimljene u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm netretiranih uzoraka lista masline, odnosno onih koji su podvrgnuti konvencionalnoj metodi ekstrakcije te uzoraka lista masline tretiranih u struji dušika (Slika 14.) i argona (Slika 15.) pri različitim parametrima HVED tretmana. Na prikazanim grafovima nema značajnijih razlika u promatranom NIR području te je vidljivo preklapanje vrpca različitih

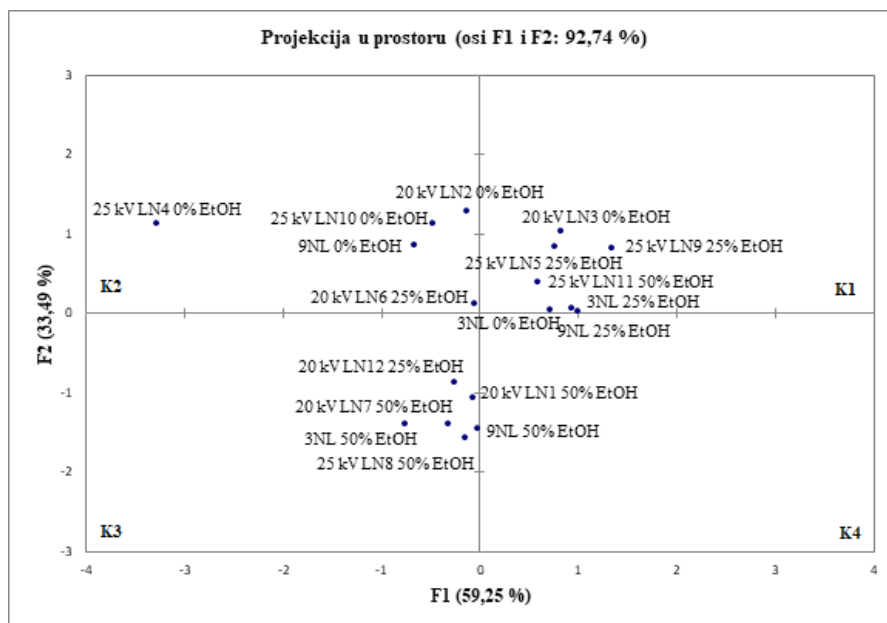
spojeva na većem dijelu spektra. Međutim, na obje slike, u rasponima valnih duljina od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm vidljivi su pomaci, odnosno promjene valnih duljina, što upućuje na strukturne promjene fenolnih spojeva, odnosno na promjene u drugom i trećem overtonu C-H i O-H veza. Također, te su promjene povezane s hidroksilnom skupinom (-OH) koja je izravno vezana na aromatsku ugljikovodičnu skupinu.

Raspon valnih duljina od 1434 do 1635 nm povezan je s vibracijama C-H veza (prvi overton), a vibracije u rasponu od 904 do 928 nm odgovaraju trećem CH overtonu, drugom overtonu istezanja i kombinacijama O-H veza u vodi, a to su ujedno kemijske veze i grupe karakteristične za fenolne spojeve i antioksidanse (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). Zatim, područje od 1360 nm do 1550 nm odgovara rasteznim vibracijama grupa koje sadrže atom dušika, RNH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, ali i vibracijama O-H veza koje potječu iz molekula alkohola. S obzirom na činjenicu da je voda važna kemijska komponenta biljaka, u skladu s time ona dominira spektrom, a to je vidljivo po spektru koji pokriva signale rastezljivosti za molekule vode, tj. overtone O-H u području od 1400 nm do 1500 nm.

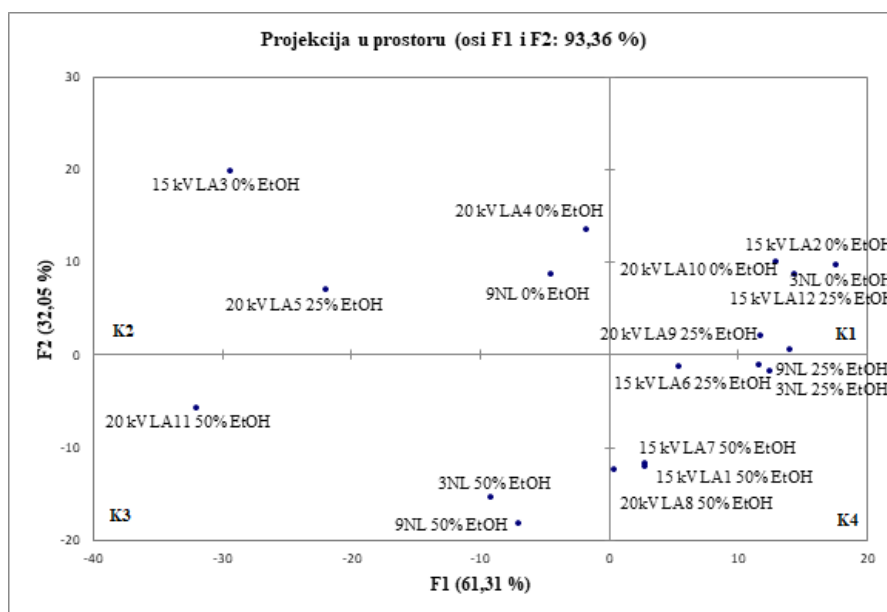
Stoga, i kod netretiranih, kao i kod uzoraka tretiranih u struji dušika i argona, uočeni su dijelovi NIR spektra koji upućuju na specifične razlike između uzoraka. Zbog tog je razloga za daljnju obradu podataka u obzir uzet dio spektra u kojem su uočene promjene valnih duljina (od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm) te je na taj način napravljena redukcija. Upravo su ti reducirani podatci korišteni za PCA analizu.

#### **4.6. PCA ANALIZA - ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI**

Na temelju dobivenih NIR spektara nisu se mogle utvrditi razlike između uzoraka te je bilo potrebno provesti daljnje kemometrijske metode. Kako bi se objasnio velik broj varijabli, upotrebom što manjeg broja komponenti, primijenjena je analiza glavnih komponenti ili PCA analiza u programu XLStat (Microsoft Office Excel 2010).



Slika 16. Analiza glavnih komponenti (PCA analiza) za uzorke lista masline tretirane dušikom i netretirane uzorke lista masline.



Slika 17. Analiza glavnih komponenti (PCA analiza) za uzorke lista masline tretirane argonom i netretirane uzorke lista masline.

PCA analiza je kemometrijska metoda koja u nekoliko dimenzija pojednostavljuje složen skup podataka te se dobiveni podatci nakon toga mogu lakše razumijeti (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016). U ovom istraživanju, PCA analiza korištena je za identificiranje uzoraka, koji su se

grupirali te nam na taj način omogućili procjenu sličnosti i razlika između njih (Belščak-Cvitanović i sur., 2017). Cilj PCA analize bio je izvući najvažnije podatke iz tablice podataka i izraziti ih kao skup novih ortogonalnih varijabli, koje se nazivaju glavnim komponentama ili faktorima. Slike 16. i 17. prikazuju projekcije uzoraka u prostoru određene prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 za netretirane uzorke i HVED tretirane uzorke. Iako je odabran određen broj ulaznih varijabli kako bi se opisala varijabilnost cijelog sustava, često je velik dio tog varijabiliteta opisan malim brojem varijabla koje predstavljaju glavne komponente. Ako je to ispunjeno, glavne komponente sadrže jednaku količinu informacija kao ulazne varijable. U ovom slučaju, na Slici 16., koja prikazuje PCA analizu za uzorke lista masline tretirane dušikom i netretirane uzorke lista masline, glavne komponente F1 i F2 obuhvaćaju 92,74 % varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke lista masline, dok na Slici 17., koja prikazuje PCA analizu za uzorke lista masline tretirane argonom i netretirane uzorke lista masline, glavne komponente F1 i F2 obuhvaćaju 93,36 % varijance. Analiza glavnih komponenti otkriva povezanost među varijablama i omogućuje tumačenje i interpretaciju podataka. Kad bismo proveli samo NIR spektroskopiju, do takvih podataka bez provedene PCA analize, ne bismo mogli doći.

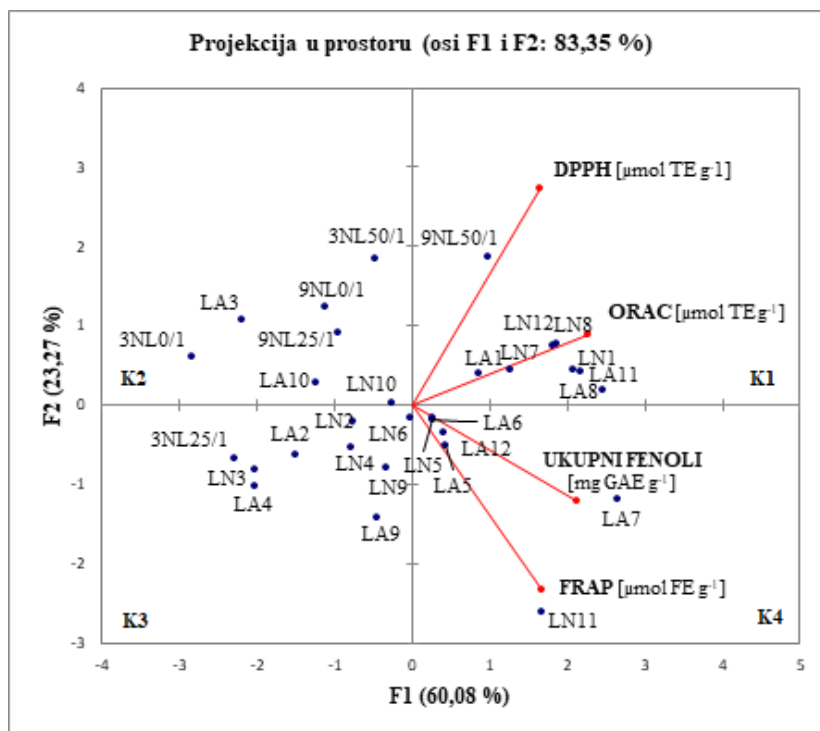
PCA analiza podrazumijeva pronalaženje svojstvenih vrijednosti matrice kovarijanci uzoraka, gdje ulazni podatci čine  $p$  varijabli i  $n$  opažaja (individua) te imaju oblik matrice  $p \times n$ . Te linearne kombinacije su, geometrijski, koordinatne osi novog koordinatnog sustava, koji je dobiven rotacijom oko starog, s glavnim komponentama kao koordinatnim osima (Jednačak i sur., 2013). Analiza započinje s podacima o  $p$  varijabli za  $n$  broja mjerenja (opažaja) koristeći  $k$  glavne komponente ( $k < p$ ), bez gubitka informacija o sustavu. Glavne komponente predstavljaju smjer maksimalnog varijabiliteta i daju jednostavniji opis strukture skupa podataka. Svojstvena vrijednost je najveća u prvoj komponenti te je u svakoj sljedećoj sve manja, a suma svih svojstvenih vrijednosti jednaka je ukupnoj varijanci. Na Slici 16. prva glavna komponenta, F1, je linearna kombinacija s najvećom varijancom te sadrži 59,25 % varijance, a druga, F2, sadrži 33,49 % varijance, dok na Slici 17. F1 obuhvaća 61,31 % varijance, a F2 32,05 %.

Slika 16. prikazuje raspodjelu uzoraka s obzirom na parametre ekstrakcije za netretirane uzorke i uzorke tretirane dušikom, dok Slika 17. prikazuje raspodjelu netretiranih uzoraka i uzoraka tretiranih argonom. Veći udio etanola u otapalu i duže vrijeme obrade imaju veći utjecaj na kemijske spojeve i izazivaju promjene koje se mogu detektirati NIR analizom (3 i 4. kvadrant).

Za obje PCA analize vrijedi da se u 1. i 2. kvadrantu nalaze uzorci koji su imali blagi tretman, ekstrahirani čistom vodom (0 %-tnim etanolom) ili 25 %-tnim etanolom, kraće vrijeme tretiranja hladnom plazmom te niži napon ili pak bez tretmana hladnom plazmom. Može se uočiti trend kretanja uzoraka po „jačini“ tretmana u smjeru kazaljke na satu.

Dakle, na Slici 16., u 1. kvadrantu nalaze se uzorci kod kojih se kao otapalo za ekstrakciju koristila čista voda (0 %-tna otopina etanola) ili 25 %-tna otopina etanola, tretirani 3 minute, pri naponu od 20 ili 25 kV. U 4. kvadrantu smjestili su se uzorci ekstrahirani 25 %-tnim ili 50 %-tnim etanolom, tretirani 3 ili 9 minuta, pri naponu od 20 ili 25 kV, dok su u 3.kvadrantu prisutni oni uzorci koji su ekstrahirani 25 %-tnim ili 50 %-tnim etanolom, netretirani (podvrgnuti konvencionalnoj ekstrakciji) ili HVED tretirani 3 ili 9 minuta, pri naponu od 20 ili 25 kV. Možemo primijetiti da udio etanola u vodi i primijenjeni napon u HVED tretmanu imaju veliku ulogu kod ekstrakcije i promjena u biljnom materijalu. Kad se etanol kombinira s vodom, on razara veze između fenolnih spojeva i komponenata biljnog materijala na kojima su oni vezani.

Na Slici 17. u 4. kvadrantu zastupljeni su uzorci ekstrahirani u 25 %-toj ili 50 %-tnoj otopini etanola, tretirani 3 ili 9 minuta, pri naponu od 15 ili 20 kV, dok su u 3.kvadrantu prisutni oni uzorci koji su imali „jači“ tretman što podrazumijeva ekstrakciju u 50 %-tnoj otopini etanola, netretirani (podvrgnuti konvencionalnoj ekstrakciji u trajanju od 3 ili 9 minuta) ili podvrgnuti HVED tretmanu u trajanju od 3 minute, pri naponu od 20 kV. U 1. kvadrant smjestili su se uzorci ekstrahirani čistom vodom (0 %-tna otopina etanola) ili 25 %-tnom otopinom etanola, tretirani 3 ili 9 minuta pri naponu od 15 ili 20 kV te su takvi tretmani uzrokovali drugačije promjene u kemijskoj strukturi za razliku od onih u 3. kvadrantu, s obzirom da bi suprotni kvadranti po dijagonali trebali pokazati razlike u uzorcima.



Slika 18. Analiza glavnih komponenti na temelju rezultata ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene FRAP, DPPH i ORAC metodom za tretirane i netretirane uzorke lista masline.

Slika 18. daje prikaz korelacije rezultata ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivene FRAP, DPPH i ORAC metodom za sve uzorke lista masline, a projekcija u prostoru određena je prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 83,35 % varijance originalnih podataka za sve uzorke lista masline. Možemo primijetiti da su se u 4. kvadrantu smjestili uzorci koji pokazuju visoku vrijednost ukupnih fenola, a isto tako i visoku vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Uzorci smješteni u 2. kvadrantu pokazuju suprotno te kod njih nije određena visoka vrijednost ukupnih fenola niti visoka antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom. Kao primjer možemo uzeti uzorke LN11 i LA7 smještene u 4. kvadrantu, tretirane u 50 %-tnoj otopini etanola, pri tretmanu u trajanju od 3 minute i naponu od 25 kV u struji dušika te 9 minuta i naponu od 15 kV u struji argona, koji pokazuju visok udio ukupnih fenola;  $45,82 \pm 0,16 \text{ mg GAE g}^{-1}$  za LN11 i  $53,64 \pm 0,14 \text{ mg GAE g}^{-1}$  za LA7. Kad te vrijednosti uspoređujemo s uzorcima koji se nalaze u suprotnom, odnosno 2. kvadrantu, primjerice uzorci LN10 ( $28,95 \pm 0,11 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ) i LA10 ( $21,21 \pm 0,04 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ), koje karakterizira tretman ekstrakcije u čistoj vodi (0 %-tna otopina etanola) u trajanju od 9 minuta, u struji argona pri naponu od 20 kV, odnosno dušika pri naponu od 25 kV, vidimo da su te vrijednosti udjela ukupnih fenola puno niže. Ovo je još jedan

pokazatelj važnosti odabira otapala za ekstrakciju te da se više fenolnih spojeva ekstrahira u otapalu koje nije čista voda, već smjesa vode i etanola u omjeru 1:1. Isti trend prati i antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom. Uzmemo li opet za primjer uzorke LN11 i LA7 smještene u 4. kvadrantu, koji su pokazali visoke vrijednosti ukupnih fenola, možemo primijetiti da je u njima izmjeren i viši antioksidacijski kapacitet u vrijednostima od  $561,93 \pm 9,11 \mu\text{mol FE g}^{-1}$  i  $443,36 \pm 5,21 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ , u odnosu na uzorke LN10 i LA10 koji se nalaze u 2. kvadrantu te pokazuju niži antioksidacijski kapacitet u vrijednostima od  $256,21 \pm 5,74 \mu\text{mol FE g}^{-1}$  i  $196,21 \pm 2,97 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ . Stoga, ukoliko želimo iz lista masline ekstrahirati visok udio fenola, visoke antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, možemo odabrati tretmane koje posjeduju uzorci grupirani u 4. kvadrantu. Uzorci koji su pokazali visoku antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH i ORAC metodom smješteni su u 1. kvadrantu, a u suprotnom, odnosno 3. kvadrantu, nalaze se uzorci koji pokazuju nisku antioksidacijsku aktivnost. Tako npr. uzorci LN1 i LA1 smješteni u 1. kvadrantu, kod kojih se kao otapalo za ekstrakciju koristila 50 %-tna otopina etanola, a vrijeme tretmana bilo je 3 minute pri nižim vrijednostima napona, pokazuju veću vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom;  $31,49 \pm 0,07 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  za LN1 i  $30,78 \pm 0,15 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  za LA1, u usporedbi s uzorcima koji se nalaze u 3. kvadrantu, npr. LN4 ( $27,46 \pm 0,08 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) i LA4 ( $25,53 \pm 0,08 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) koji su ekstrahirani čistom vodom, tj. 0 %-tnom otopinom etanola, 3 minute, pri nižim vrijednostima napona. Isti trend prati i antioksidacijska aktivnost određena ORAC metodom, odnosno uzorci koji pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, imaju i veću antioksidacijsku aktivnost određenu ORAC metodom. Tako uzorci LN1 i LA1 imaju antioksidacijsku aktivnost određenu ORAC metodom  $270,99 \pm 13,03 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  i  $179,89 \pm 10,19 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ , za razliku od suprotno smještenih uzoraka LN4 i LA4, kod kojih ona iznosi  $81,95 \pm 5,86 \mu\text{mol TE g}^{-1}$  i  $2,74 \pm 1,88 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ . I u ovom slučaju, kao i kod ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, možemo primijetiti da je veća antioksidacijska aktivnost ekstrahiranih fenola dobivena u otapalu koje čini smjesa vode i etanola u omjeru 1:1.

Iz dobivenih rezultata možemo primijetiti da udio etanola u vodi ima najvažniju ulogu u ekstrakciji fenolnih spojeva iz uzoraka lista masline te se kao najbolje otapalo pokazala otopina s najvećim udjelom etanola, odnosno 50 %-tna otopina etanola. Dulje vremensko trajanje ekstrakcije i primijenjeni napon u HVED tretmanu također doprinose većoj koncentraciji ukupnih fenola. Odabir vrijednosti napona ovisi o odabiru ostalih parametara, odnosno o njihovoj kombinaciji.

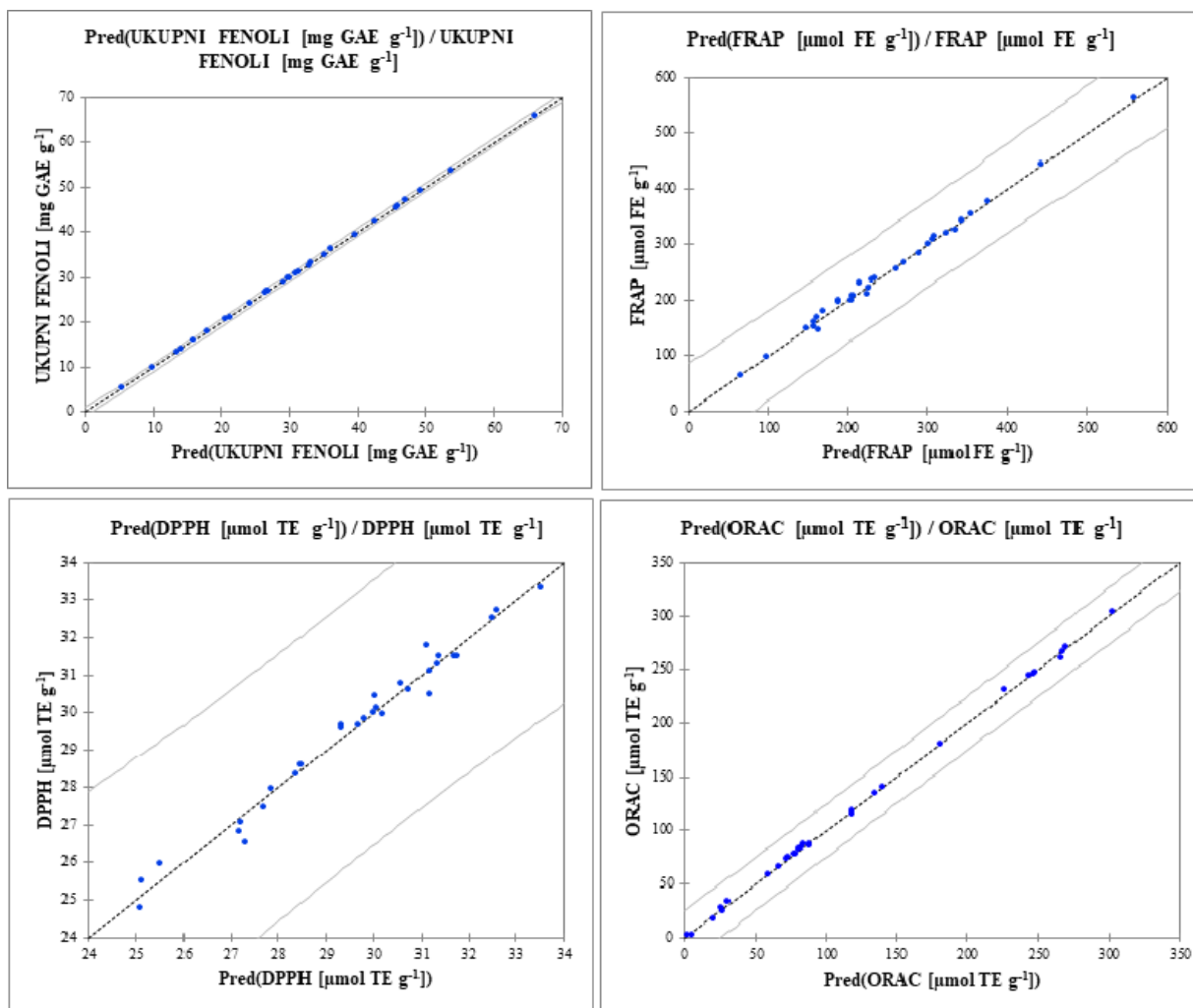
#### 4.7. PCR ANALIZA - REGRESIJA GLAVNIH KOMPONENTI

Za razvijanje predikcijskih modela i za analizu odnosa NIR spektra i sadržaja bioaktivnih sastojaka u ekstraktima lista masline, primijenjena je regresija glavnih komponenti (PCR analiza). Cilj PCR analize bio je ispitati primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu predikcije udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti (FRAP, DPPH i ORAC), u netretiranim i HVED tretiranim ekstraktima lista masline uz upotrebu vode, 25 %-tnog i 50 %-tnog etanola kao otapala. PCR analiza provedena je u programu XLStat (Microsoft Office Excel 2010), a modeli su dobiveni korištenjem izvornih spektara bez pred procesiranja.

Tablica 12. Statistički pokazatelji razvijenih PCR modela za predikciju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (FRAP, DPPH i ORAC) za uzorke lista masline.

Broj modela	Valna duljina (nm)		R <sup>2</sup>	Prilagođeni R <sup>2</sup>	RMSE	RPD	RER
MODEL 1	904-1699	UF	0,999	0,999	0,393	35,480	154,186
		FRAP	0,996	0,870	37,620	2,769	13,253
		DPPH	0,980	0,421	1,698	1,314	5,027
		<b>ORAC</b>	<b>0,999</b>	<b>0,983</b>	<b>11,856</b>	<b>7,750</b>	<b>25,457</b>
MODEL 2	1350-1699	UF	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,125</b>	<b>112,128</b>	<b>487,276</b>
		FRAP	0,979	0,379	82,100	1,269	6,073
		DPPH	0,951	-0,433	2,671	0,835	3,196
		ORAC	0,997	0,899	29,163	10,350	3,151
MODEL 3	904-932,1350-1699	UF	0,999	0,999	0,394	35,426	153,951
		<b>FRAP</b>	<b>0,996</b>	<b>0,871</b>	<b>37,455</b>	<b>2,782</b>	<b>13,311</b>
		<b>DPPH</b>	<b>0,980</b>	<b>0,422</b>	<b>1,696</b>	<b>1,316</b>	<b>5,033</b>
		ORAC	0,998	0,928	24,681	3,723	12,229
MODEL 4	904-932	UF	0,397	0,125	13,056	1,069	4,647
		FRAP	0,623	0,453	77,022	1,353	6,473
		DPPH	0,539	0,331	1,825	1,223	4,677
		ORAC	0,984	0,534	62,706	4,813	1,465





Slika 19. Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke za uzorke lista masline za sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom.

U Tablici 12. prikazane su vrijednosti parametara PCR analize koji su dobiveni razvijanjem četiri modela s različitim rasponom valnih duljina za ekstrakt lista masline, uključujući vrijednosti za ukupne fenole (UF), antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom, DPPH metodom te ORAC metodom. Svaki od njih ima pripadajući koeficijent determinacije za model ( $R^2$ ), prilagođeni koeficijent determinacije (prilagođeni  $R^2$ ), korijen srednje standardne pogreške (RMSE), omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD) te omjer raspona pogrešaka (RER). Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) pokazuje koliko se dobro podatci uklapaju u model, a njegova se vrijednost može kretati između 0 i 1 te što je taj broj bliži jedinici, to je model reprezentativniji, dok je prilagođeni  $R^2$  korekcija za  $R^2$ , te u obzir uzima broj korištenih varijabli u modelu. RMSE mjeri prosječnu točnost predikcije i ima interval

pouzdanosti 95 % pa tako npr. ako neki model predviđa udio glukana 40 %, a vrijednost RMSE iznosi 1 %, postoji 95 % šanse da sadržaj glukana u tom uzorku bude između 38 i 42 %. Što je veća RPD vrijednost, to je model precizniji, a RER vrijednost obično je oko četiri do pet puta veća od RPD vrijednosti (Celignis Analytical, 2018). Za izvrsne modele koeficijent determinacije ( $R^2$ ) trebao bi biti veći od 0,95, dok bi omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD) trebalo imati vrijednost veću od 6,5. Visoko prihvatljivi modeli imaju  $R^2$  veći od 0,8 i RPD veći od 3 te niže vrijednosti RMSE, dok izvrsni modeli imaju visoku vrijednost  $R^2$ , veću od 0,9, i RPD preko 5. Prema međunarodnim odobrenim metodama, upotreba RPD-a kao pokazatelja procjene modela predviđanja je sljedeća: ako je RPD veći ili jednaki 2,5, model je prikladan za kontrolu procesa, ako je veći ili jednaki 5, model je prihvatljiv za kontrolu kvalitete te ako je vrijednost RPD-a veća ili jednaka 8, model je dobar za kontrolu procesa, razvoj i primijenjena istraživanja (Belščak-Cvitanović i sur., 2017).

U prvom modelu (model 1) korišten je cijeli spektar valnih duljina, od 904 do 1699 nm, dok je u ostalim modelima pri modeliranju korišten dio spektra gdje su prethodnom NIR spektroskopijom uočene promjene, pa je tako u modelu 2 raspon valnih duljina od 1350 do 1699 nm, u modelu 3 od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm, a u modelu 4 od 904 do 932 nm te su na taj način odvojene vrijednosti parametara modela. Koeficijent determinacije se u dobivenim modelima kretao između 0,397 i 0,999, dok se prilagođeni koeficijent determinacije kretao između -0,433 i 0,999. Model 1 pokazao je visoke vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) za promatrane uzorke, veće od 0,980, što nam govori o dobroj linearnoj povezanosti između vrijednosti NIR spektra snimljenih uzoraka i fenolnih spojeva, a slične vrijednosti pokazao je i model 3 u kojem su također dobivene visoke vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ).

Najbolja predikcija za ukupne fenola (UF) i antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom postignuta je pri različitim valnim duljinama te je prikazana na Slici 19. Dobiveni model za ukupne fenole izvrsni je za predviđanje, s vrijednostima parametara 0,99 za  $R^2$  ( $R^2$  je veći od 0,95) i 112,128 za RPD (RPD je veći od 6,5) te 487,276 za RER, te je dobiven korištenjem dijela spektra, točnije pri valnim duljinama od 1350 do 1699 nm. Također, izvrsni modeli za predviđanje ukupnih fenola dobiveni su korištenjem cijelog spektra valnih duljina i korištenjem spektra valnih duljina u rasponu od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm, dok je za antioksidacijsku aktivnost određenu ORAC metodom izvrsni model dobiven korištenjem cijelog NIR spektra (od 904 do 1699 nm), s vrijednostima parametara  $R^2$  0,999, RPD 7,750 te RER 25,457. Prikazani modeli za antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP i DPPH metodom

dobiveni su korištenjem dijela spektra pri valnim duljinama od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm. Model koji je dobiven za antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom, prema dobivenim parametrima ( $R^2$  0,996, RPD 2,782 i RER 13,311) spada u skupinu visoko prihvatljivih modela za predviđanje, dok model dobiven za DPPH zbog preniske RPD i RER vrijednosti ( $R^2$  0,980, RPD 1,696 i RER 5,033) nije prikladan za predviđanje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za ekstrakte lista masline. Korištenjem valnih duljina u rasponu od 904 do 932 nm dobiveni su manje reprezentativni modeli. U tim modelima primijećene su niže vrijednosti  $R^2$ , većinom niže od 0,623, osim za ORAC gdje  $R^2$  iznosi 0,984, a vrijednosti RPD kreću se između 1,069 i 4,813 pa u skladu s dobivenim vrijednostima, takvi modeli ne bi bili prikladni za kvantitativnu analizu ekstrakata lista masline s obzirom na sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom.

#### 4.8. VELIČINA ČESTICA I INDEKS POLIDISPERZIJE

Tablica 13. Vrijednosti veličine čestica i indeksa polidisperzije.

uzorak	netretirani uzorci			tretirani uzorci				
	$d_H$ (nm)	PDI	uzorak	$d_H$ (nm)	PDI	uzorak	$d_H$ (nm)	PDI
3NL0/1	541,55 ± 6,38	0,62 ± 0,01	LN1	394,60 ± 3,81	0,41 ± 0,06	LA1	452,90 ± 6,74	0,60 ± 0,06
3NL25/1	270,45 ± 3,65	0,63 ± 0,11	LN2	672,00 ± 7,83	0,48 ± 0,04	LA2	1551,50 ± ± 16,63	0,85 ± 0,13
3NL50/1	333,10 ± 4,56	0,54 ± 0,00	LN3	751,35 ± 9,64	0,73 ± 0,04	LA3	318,20 ± 3,74	0,42 ± 0,05
9NL0/1	370,60 ± 4,57	0,69 ± 0,06	LN4	1545,50 ± 15,01	0,65 ± 0,04	LA4	846,95 ± 8,72	0,71 ± 0,15
9NL25/1	303,25 ± 4,56	0,68 ± 0,08	LN5	139,30 ± 2,45	0,32 ± 0,04	LA5	177,25 ± 1,53	0,43 ± 0,04
9NL50/1	166,50 ± 2,92	0,56 ± 0,06	LN6	203,70 ± 3,65	0,53 ± 0,05	LA6	183,25 ± 1,74	0,26 ± 0,00
-	-	-	LN7	653,15 ± 6,83	0,95 ± 0,14	LA7	447,40 ± 2,82	0,50 ± 0,11
-	-	-	LN8	378,15 ± 3,63	0,59 ± 0,07	LA8	369,40 ± 2,76	0,63 ± 0,06
-	-	-	LN9	279,15 ± 3,72	0,28 ± 0,01	LA9	198,45 ± 1,34	0,31 ± 0,03
-	-	-	LN10	952,40 ± 9,43	0,71 ± 0,10	LA10	506,95 ± 5,45	0,69 ± 0,06
-	-	-	LN11	193,50 ± 1,23	0,36 ± 0,08	LA11	522,55 ± 6,28	0,48 ± 0,10
-	-	-	LN12	304,05 ± 4,72	0,32 ± 0,04	LA12	164,70 ± 1,28	0,46 ± 0,00

Odmah nakon elektroporacije, biljne stanice nabubre u četiri stupnja te propuštaju ione u vanjsko područje stanice. Tada dolazi do ekstrakcije različitih molekula, uključujući i polifenole, a ekstrakcija ovisi o veličini pora. HVED tretman uzrokuje oštećenje stanične membrane do kojeg dolazi uslijed pojave udarnih valova karakterističnih za visokonaponsko pražnjenje. Dakle, HVED tretman ima važan doprinos u mehaničkom oštećenju stanične membrane, raspadu stanične stijenke, homogenizaciji i agregaciji stanica. Rezultati veličine čestica i indeksa polidisperzije (PDI) u netretiranim i HVED tretiranim ekstraktima lista masline prikazani su u Tablici 13. Istraživanja su pokazala da se stabilnost povećava s padom veličine čestica (Rahn-Chique i Urbina-Villalba, 2016).

Rezultati pokazuju mogućnost upotrebe HVED tehnologije u industriji u svrhu proizvodnje stabilnih emulzijskih sustava. Prosječni promjer čestica u uzorcima podvrgnutima konvencionalnoj ekstrakciji s etanolom kao otapalom kreće se iznad 300 nm te takvi uzorci nisu pogodni za stvaranje stabilnih emulzijskih sustava. Međutim, možemo primijetiti da se u HVED tretiranim uzorcima, gdje je kao otapalo korišten 25 %-tni etanol (LN5, LN6, LN9, LN12 i LA5, LA6, LA9, LA12), hidrodinamički promjer čestica smanjuje pa je pomoću takvih sustava moguće proizvesti stabilne emulzijske sustave.

Od fizičkih svojstava dobivenih ekstrakta ispitivan je i PDI, koji pokazuje mjeru za homogenost, odnosno širinu raspodjele veličine čestica. Vrijednost PDI u rasponu od 0,1 do 0,25 ukazuju na usku, a iznad 0,5 na široku raspodjelu veličine čestica (Wu i sur., 2011). U ovom istraživanju, vrijednosti PDI kreću se iznad 0,3, dok bi u idealnom slučaju PDI trebao biti manji od 0,3, upravo zbog razloga što vrijednosti veće od 0,3 podrazumijevaju širu raspodjelu veličine čestica te takve čestice nisu monodisperzne, odnosno nisu jednake veličine.

#### **4.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Multivarijantna analiza varijance (MANOVA) provedena je da bi se ispitaio utjecaj ulaznih varijabli na izlazne. Tablica 14. i Tablica 15. pokazuju utjecaj vremena trajanja tretmana, primijenjenog napona, udjela etanola u vodi te njihovih međusobnih interakcija (vrijeme tretiranja i primijenjeni napon, vrijeme tretiranja i udio etanola u vodi, primijenjeni napon i udio etanola u vodi) na ekstrakciju ukupnih fenola, prinos ekstrakcije, antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom te na dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) i indeks

polidisperzije (PDI). U prikazanoj tablici, p-vrijednost < 0,05 pokazuje značajan utjecaj određenog parametra na količinu ekstrahiranih fenola, prinos ekstrakcije, antioksidacijski kapacitet te na dinamičko raspršenje svjetlosti i indeks polidisperzije.

Tablica 14. Statistička značajnost za dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), indeks polidisperzije (PDI), ukupne fenole, antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom i prinos ekstrakcije za uzorke tretirane dušikom.

	Izvor	GLAVNI UČINCI			INTERAKCIJE		
		A: vrijeme tretiranja	B: napon	C: udio etanola	AB	AC	BC
<b>p-vrijednost</b>	Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)	0,4132	0,3820	0,0277	0,3044	0,1810	0,0969
	Indeks polidisperzije (PDI)	0,2785	0,4608	0,2353	0,7913	0,3141	0,5596
	Ukupni fenoli	0,7034	0,8342	0,0652	0,7084	0,5300	0,5030
	FRAP	0,5573	0,2974	0,3888	0,6255	0,3050	0,6206
	DPPH	0,1798	0,8050	0,1974	0,1946	0,6913	0,4720
	ORAC	0,7050	0,3692	0,1477	0,2985	0,4078	0,4346
	Prinos ekstrakcije	0,7026	0,8341	0,0650	0,7089	0,5312	0,5062

Tablica 15. Statistička značajnost za dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), indeks polidisperzije (PDI), ukupne fenole, antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, DPPH i ORAC metodom i prinos ekstrakcije za uzorke tretirane argonom.

	Izvor	GLAVNI EFEKTI			INTERAKCIJE		
		A: vrijeme tretiranja	B: napon	C: udio etanola	AB	AC	BC
<b>p-vrijednost</b>	Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)	0,6704	0,1982	0,3177	0,3569	0,6945	0,8880
	Indeks polidisperzije (PDI)	0,4634	0,1982	0,2114	0,9126	0,7919	0,9259
	Ukupni fenoli	0,1972	0,1982	0,1067	0,6437	0,6604	0,9387
	FRAP	0,6781	0,1982	0,1791	0,4250	0,8373	0,7394
	DPPH	0,7467	0,1982	0,2450	0,2872	0,6684	0,4903
	ORAC	0,5049	0,9521	0,0342	0,8851	0,6926	0,8592
	Prinos ekstrakcije	0,1982	0,4710	0,1072	0,6450	0,6633	0,9392

Vrijednosti statističke analize pokazuju da udio etanola u otapalu za ekstrakciju ima statistički značajan utjecaj kod tretmana lista masline u struji dušika kod određivanja dinamičkog raspršenja svjetlosti (Tablica 14.), gdje je p-vrijednost  $< 0,05$  te iznosi 0,0277. Osim toga, udio etanola u otapalu ima statistički značajan utjecaj kod tretmana lista masline u struji argona za određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom (Tablica 15.), gdje je p-vrijednost također  $< 0,05$  i iznosi 0,0342.

Za ekstrakciju je vrlo važno odabrati pogodno otapalo, a otapalo ovisi o vrsti i karakteristikama spojeva koje želimo ekstrahirati. Zbog prisutnosti OH skupine na aromatskom prstenu, polifenoli su uglavnom polarni spojevi pa jako polarna otapala, kao što je npr. voda, i nepolarna otapala, kao što su npr. kloroform i heksan, nisu pogodni za njihovu ekstrakciju. Korištenje čistog alkohola kao otapala za ekstrakciju smanjilo bi učinak ekstrakcije, dok bi se korištenjem čiste vode mogao dobiti ekstrakt s visokim sadržajem nečistoća (npr. organskih kiselina, šećera, topljivih proteina) te bi takve nečistoće mogle utjecati na identifikaciju i kvantifikaciju ukupnih fenolnih spojeva. Upravo kombinacija vode i alkohola rezultira umjereno polarnim medijem koji osigurava optimalne uvjete za ekstrakciju fenolnih spojeva, te osim toga, takva kombinacija dovodi do povećanog bubrenja biljnog materijala što uzrokuje jače prodiranje otapala, povećava se kontaktna površina između uzorka i otapala pa je i učinak ekstrakcije bolji (Rafiee i sur., 2011).

Iako ne pokazuje statistički značajan utjecaj (p-vrijednost nije  $< 0,05$ ), primijenjeni napon i vremensko trajanje tretmana u visokonaponskom električnom pražnjenju također utječu na ekstrakciju. Što je napon veći, to su jači strujni udari i električni izboji koji povećavaju efikasnost procesa elektroporacije i izlazak bioaktivnih komponenti iz biljnih stanica. Međutim, reaktivni spojevi koji nastaju kod HVED tretmana pri višim naponima ne bi smijeli smanjiti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata, zbog čega je vrlo važno optimirati primijenjeni napon za uspješnu ekstrakciju. Također, važno je odrediti optimalno trajanje tretmana koje će dovesti do ekstrakcije veće koncentracije fenolnih spojeva, kao i do njihove veće antioksidacijske aktivnosti.

Iz dobivenih rezultata možemo uočiti da različiti parametri tretmana visokonaponskog pražnjenja utječu na fenolne spojeve i njihovu antioksidacijsku aktivnost. Kakva će biti koncentracija ukupnih fenola i njihova antioksidacijska aktivnost, ovisi o izboru radnog plina, vremenu izloženosti hladnoj plazmi, primijenjenom naponu, kao i o udjelu etanola u otapalu. Etanol u kombinaciji s HVED-om kida vezu između fenolnih spojeva i biljnog materijala na koji su oni vezani. Kod električnog pražnjenja plazme u tekućini, odnosno ekstraktu, plazma se najprije razvija u mjehurićima dušika i argona koji se upuhuju te se nakon toga širi u tekućini.

Nakon provedenog istraživanja, iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da koncentracija ukupnih fenola raste povećanjem vremena tretiranja, povećanjem napona u HVED tretmanu te povećanjem udjela etanola u otapalu za ekstrakciju. Primjećujemo i porast ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom, u usporedbi s konvencionalnom metodom ekstrakcije (smjesa otapala pod istim uvjetima kao i tretirani uzorci).

HVED metodu možemo definirati kao efikasnu, ali skupu s obzirom na troškove opreme. Moguća primjena HVED tehnologije kao metode za ekstrakciju u industriji, na početku bi zahtijevala veću potrošnju kapitala te veću potrošnju energije, a pozornost bi trebalo obratiti i na učestalu koroziju elektroda, naročito ako kupujemo jeftine elektrode od nehrđajućeg čelika. Međutim, dugoročno ova netoplinska metoda pokazuje potencijal u smanjenju potrošnje električne energije te, zbog toga što se odvija pri sobnoj temperaturi, omogućuje da se denaturacija spojeva izbjegne ili smanji. Stoga postoji dugoročna i održiva primjena HVED metode u prehrambenoj, kao i farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline uspješno je provedena pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja korištenjem zelenih otapala - čiste vode i smjese vode i etanola.
2. Svi HVED tretirani uzorci imali su veće vrijednosti koncentracije ukupnih fenola od netretiranih uzoraka pri istoj temperaturi. Najveći prinos fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline postignut je upotrebom 50 %-tne vodene otopine etanola, kod tretmana u struji argona u trajanju od 9 minuta i pri naponu od 20 kV te iznosi  $6,60 \pm 0,01$  %, što je 3,20 puta više u odnosu na uzorak koji je obrađen konvencionalnom ekstrakcijom u istim uvjetima tretiranja. Najveći prinos kod tretmana u struji dušika postignut je upotrebom 50 %-tne vodene otopine etanola, pri tretmanu u trajanju od 3 minute i naponu od 20 kV te iznosi  $4,92 \pm 0,01$  %.
3. UPLC/MS-MS metoda pokazala je da je najzastupljeniji spoj u ekstraktu lista masline oleuropein te da je HVED tretman pri najvišem naponu i vremenu tretmana od 9 minuta rezultiralo razgradnjom oleanolne kiseline u ekstraktima lista masline.
4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom pokazalo je povećanje antioksidacijskog kapaciteta tretiranih uzoraka u odnosu na netretirane, dok DPPH i ORAC metoda nisu pokazale značajne razlike.
5. Strukturne promjene izazvane visokonaponskim električnim pražnjenjem u ekstraktima lista masline uočene su primjenom blisko-infracrvene spektroskopije u rasponu valnih duljina od 904 do 932 nm te od 1350 do 1699 što upućuje na strukturne promjene fenolnih spojeva.
6. Metoda regresije glavnih komponenti (PCR) pokazala je primjenjivost NIR spektroskopije u predikciji udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Na temelju razvijenih modela vidljivo je da se analizom cijelog spektra, od 904 do 1699 nm, dobio najbolji model za antioksidacijsku aktivnost određenu ORAC metodom; dok su korištenjem dijela spektra, gdje su uočene promjene na kemijskim grupama fenolnih komponenti, dobiveni najbolji modeli za predikciju sadržaja ukupnih fenola (od 1350 do 1699 nm) i antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom (od 904 do 932 nm i od 1350 do 1699 nm). Model dobiven za DPPH metodu nije prikladan za predviđanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima lista masline.



7. Prosječni promjer čestica u uzorcima koji su obrađeni HVED tretmanom s 25 %-tnim etanolom kao otapalom kreće se oko ili ispod 300 nm te su takvi uzorci pogodni za stvaranje stabilnih emulzijskih sustava.
8. Parametri HVED tretmana, koji su pokazali utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost su udio etanola u vodi, vrijeme tretiranja, vrsta plina te primijenjeni napon, dok statistički značajan utjecaj pokazuje udio etanola u vodi.
9. Ekstrakti lista masline dobiveni pomoću zelenih otapala, u skladu s principima zelene ekstrakcije i održivosti omogućavaju uštedu energije, manji utrošak otapala, brže dobivanje rezultata te ekološki pristup okolišu. Takvi ekstrakti imaju visoku nutritivnu vrijednost te su bogati antioksidansima i fenolnim spojevima.

## 6. LITERATURA

- Abaza, L., Manai Djebali, H., Youssef, N. B., Faouzia, H., Zarrouk, M., Methenni, K. (2011) Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas Acetias*. **62**, 96-104.
- Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*. **4**, 682-698.
- Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2**, 433-459.
- Agilent Technologies (2012) Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS Concepts Guide, <[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335-90135\\_QQQ\\_Concepts.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf)>. Pristupljeno 27.8.2019.
- Alcázar Román, R., Amorós, J. A., Pérez de los Reyes, C., García Navarro, F. J., Bravo, S. (2014) Major and trace element content of olive leaves. *Olivæ*. **119**, 1-7.
- Almohammed, F., Koubaa, M., Khelfa, A., Nakaya, M., Mhemdi, H., Vorobiev, E. (2017) Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food Bioprod. Process.* **103**, 95-103.
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., Ulkü, S. (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.* **62**, 342-348.
- Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301-312.
- Anonymous (2019) Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Analysis, <<https://emerypharma.com/chemistry/lcms-services/>>. Pristupljeno 27.8.2019.
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., Mitchell, A. E. (2003) Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1237-1241.
- Ašič, S. (1999) Ljekovito bilje, Dušević & Kršnikov d.o.o., Rijeka, str. 84

- Batista Napotnik, T., Miklavčič, D. (2018) *In vitro* electroporation detection methods-An overview. *Bioelectrochemistry*. **120**, 166-182.
- Bellumori, M., Innocenti, M., Binello, A., Boffa, L., Mulinacci, N., Cravotto, G. (2016) Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound- and microwave-assisted extraction procedures. *C. R. Chim.* **19**, 699-706.
- Belščak-Cvitanović, A., Valinger, D., Benković, M., Tušek, A. J., Jurina, T., Komes, D., Gajdoš Kljusurić, J. (2017) Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using HPLC-DAD, spectrophotometric, near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Int. J. Food Prop.* **20**, 2463-2480.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J. A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* **68**, 457-462.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bittencourt, J. A. (2004) *Fundamentals of Plasma Physics*, 3. izd., Springer, New York, str. 1-2.
- Blanco, M., Villarroya, I. (2002) NIR Spectroscopy: A rapid response analytical tool. *Trends Analyt. Chem.* **21**, 240-250.
- Braca, A., Tommasi, N. D., Bari, L. D., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *C. R. Chimie.* **17**, 197-203.
- Campeol, E., Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Cremonini, R., Ceccarini, L. (2003) Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* (L.) collected in two different seasons. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1994-1999.
- Celignis Analytical (2018) Near Infrared Spectroscopy, <<https://www.celignis.com/NIR.php#>>. Pristupljeno 10.8.2019.

- Cen, H., He, Y. (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Tech.* **18**, 72-83.
- Chanioti, S., Siamandoura, P., Tzia, C. (2016) Evaluation of extracts prepared from olive oil by-products using microwave-assisted enzymatic extraction: Effect of encapsulation on the stability of final products. *Waste Biomass Valori.* **7**, 831-842.
- Chemat, F., Vian, M., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: Concept and principle. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615-8627.
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furač, J., Gaurina Srček, V. (2014) Ionske kapljevine-razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63**, 163-171.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.
- El Kantar, S., Boussetta, N., Rajha, H. N., Maroun, R. G., Louka, N., Vorobiev, E. (2018) High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels. *Food Res. Int.* **107**, 755-762.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Soares, M. E., Bastos, M. L., Pereira, J. A. (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food. Chem.* **103**, 188-195.
- Fridman, A. (2008) Plasma Chemistry, Cambridge University Press, Cambridge, str. 1-11.
- Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) Near-infrared spectroscopic analysis of total phenolic content and antioxidant activity of berry fruits. *Food Technol. Biotechnol.* **54**, 236-242.
- Garcia-Castello, E. M., Rodriguez Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. (2015) Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *Food Sci. Technol.* **64**, 1114-1122.
- Goldschmidt Lins, P., Piccoli Pugine, S. M., Scatolini, A. M., Pires de Melo, M. (2018) *In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon.* **4**. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00805

- Havlikova, L., Mikova, K. (1985) Heat stability of anthocyanins. *Z. Lebensm. Unters. For.* **181**, 427-432.
- Hoffmann, E. (1996) Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* **31**, 129-137.
- Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.
- Joles, J. (2018) Olive, <<https://unsplash.com/photos/-8nbY8W2YEE>>. Pristupljeno 14.7.2019.
- Khan, Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., Kumar, V. (2007) *Olea europaea*: A phyto-pharmacological review. *Phcog Rev.* **1**, 112-116.
- Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., Shetty, K., Kim, Y. C. (2009) Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour. Technol.* **100**, 6107-6113.
- Malvern Instruments (2004) Zetasizer Nano Series User Manual, <<http://www.lacbio.ufsc.br/images/stories/Zetasizer%20Manual%20LaCBio.pdf>>. Pristupljeno 10.6.2019.
- McCord, J. M. (2010) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652-659.
- Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes. Metrohm Ltd., Herisau.
- Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M. (2016) Understanding the role of plasma technology in food industry. *Food Bioprocess. Tech.* **9**, 734-750.
- Mishra, S., Vanli, A. O. (2015) Remaining useful life estimation with lamb-wave sensors based on wiener process and principal components regression. *J. Nondestruct. Eval.* **35**, 11-24.
- Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J. (2016) Plasma in food and agriculture. U: Cold plasma in food and agriculture fundamentals and applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 1-17.
- Osborne, B. G. (2006) Near infrared spectroscopy in food analysis. U: Encyclopedia of Analytical Chemistry (Meyers, R. A., ured.), John Wiley & Sons, Ltd., New York, str. 1-14.

- Pankaj, S. K., Wan, Z., Keener, K. M. (2018) Effects of cold plasma on food quality: A Review. *Foods*. **7**, 4-25. doi: 10.3390/foods7010004
- Pasquini, C. (2003) Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Brazil. Chem. Soc.* **14**, 198-219.
- Pedreschi, F., Mariotti, M. S., Granby, K. (2013) Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 9-20.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J. A. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. **12**, 1153-1162.
- Petitpas, G., Rollier, J. D., Darmon, A., Gonzalez-Aguilar, J., Metkemeijer, R., Fulcheri, L. (2007) A comparative study of non-thermal plasma assisted reforming technologies. *Int. J. Hydrogen Energ.* **32**, 2848-2867.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3273-3279.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.
- Putnik, P., Lorenzo, J., Barba, F. J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., Bursać Kovačević, D. (2018) Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*. **7**, 106-122. doi: 10.3390/foods7070106
- Putnik, P., Lorenzo, J., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food Bioprod. Process.* **106**, 19-28.
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**, 738-745.
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., Galanakis, C. M. (2014). Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 1-18.

- Rahn-Chique, K., Urbina-Villalba, G. (2016) Dependence of emulsion stability on particle size: Relative importance of drop concentration and destabilization rate on the half lifetimes of O/W nanoemulsion. *J. Disper. Sci. Technol.* **38**, 167-179.
- Rajha, H., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., Vorobiev, E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emerg.* **31**, 60-66.
- Režek Jambrak, A., Donsì, F., Paniwnyk, L., Djekic, I. (2019) Impact of novel non thermal processing on food quality: Sustainability, modelling, and negative aspects. *J. Food Quality.* **2019**, 1-2. doi: 10.1155/2019/2171375
- Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., Vorobiev, E. (2015) High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food Bioprocess. Tech.* **8**, 885-894.
- Sabry, O. (2014) Review: Beneficial health effects of olive leaves extracts. *J. Nat. Sci. Res.* **41**, 1-9.
- Sahin, S., Samli, R., Birteksöz Tan, A. S., Barba, F. J., Chemat, F., Cravotto, G., Lorenzo, J. M. (2017) Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules.* **22**, 1056-1069.
- Salah, M. B., Abdelmelek, H., Abderraba, M. (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med. Chem.* **2**, 107-111.
- Sarkis, J. R., Boussetta, N., Tessaro, I. C., Marczak, L. D. F., Vorobiev, E. (2015) Application of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges for oil extraction from sesame seeds. *J. Food Eng.* **153**, 20-27.
- Shalaby, A. R., Anwar, M. M., Sallam, E. M. (2018) Improving quality and shelf life of minced beef using irradiated olive leaf extract. *J. Food Process. Pres.* **42**, 1-10. doi: 10.1111/jfpp.13789
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001) Antioxidants in food, Practical application. U: Introducing natural antioxidants, (Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge, str. 147-158.

- Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.
- Skaltsounis, A. L., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Xynos, N. (2015) Recovery of high added value compounds from olive tree products and olive processing byproducts. U: Olive and olive oil bioactive constituents, (Boskou, D., ured.), AOCS Press, Urbana, Illinois, str. 333-357.
- Strikić, F. (2015) Maslina. U: Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije, (Ozimec, R., Mihinica, S., ured.), Tiskara Zelina, Zagreb, str. 88-131.
- Strikić, F., Čmelik, Z., Šatović, Z., Perica, S. (2007) Morfološka raznolikost masline (*Olea europaea* L.) sorte Oblica. *Polmologia Croatica.* **13**, 77-86.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina.* **43**, 84-93.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2014) Determination of phenolic compounds of „Sikitita“ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents „Arbequina“ and „Picual“ olive leaves. *Food Sci. Technol.* **58**, 28-34.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.* **77**, 92-108.
- Tamošiūnas, V., Padaruskas, A. (2008) Comparison of LC and UPLC coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. *Chromatographia.* **67**, 783-788.
- Teo, C. C., Tana, S. N., Yong, J. W., Hew, C. S., Ong, E. S. (2010) Pressurized hot water extraction (PHWE). *J. Chromatogr. A.* **1217**, 2484-2494.
- Turner, M. (2016) Physics of cold plasma. U: Cold plasma in food and agriculture fundamentals and applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Press, London, str. 17-52.
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Terezinha Zani, V., Souza, D., Morelo Dal Bosco, S. (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr. Hosp.* **31**, 1427-1433.



- Williams, P. J., Geladi, P., Britz, T. J., Manley, M. (2012) Near-infrared (nir) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1759-1769.
- Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 456-469.
- Xi, J., He, L., Yan, L.G. (2017) Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chem.* **230**, 354-361.
- Yaseen Khan, M. D., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., Vimal, K. (2007) *Olea europaea*: A phyto-pharmacological review. *Phcog Rev.* **1**, 114-118.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Andreja Bjanco

Ime i prezime studenta