

Primjena eutektičkih otapala i novih tehnologija u izolaciji lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana

Ivanov, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:824229>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018

Mia Ivanov

929/PI

**PRIMJENA EUTEKTIČKIH
OTAPALA I NOVIH
TEHNOLOGIJA U IZOLACIJI
LIGNANA I FENOLNIH KISELINA
IZ POGAČE LANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Marka Obranovića. Diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta broj 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije.

ZAHVALA:

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Marku Obranoviću na svesrdnoj pomoći, korisnim savjetima, pristupačnosti, strpljenju i svom prenesenom znanju. Svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju ulja i masti i Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije zahvaljujem na razumijevanju, pozitivnom i prijateljskom okruženju.

Veliko hvala mojoj obitelji na ljubavi, razumijevanju te pruženoj pomoći i podršci tijekom studiranja. Također, zahvaljujem se i svim svojim prijateljima i kolegama što su mi studiranje učinili lakšim i ljepšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA I NOVIH TEHNOLOGIJA U IZOLACIJI LIGNANA I FENOLNIH KISELINA IZ POGAČE LANA

Mia Ivanov, 929/PI

Sažetak: Lanena pogača, kao nusproizvod proizvodnje lanenog ulja, vrlo je bogata nutritivno vrijednim polifenolnim spojevima, što ju čini odličnom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Do sada korištene metode izolacije su vremenski zahtjevne i uz značajnu upotrebu organskih otapala. Cilj ovog rada bio je zamijeniti organska otapala s ekološki prihvatljivim eutektičnim otapalima te ubrzati proces ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana koristeći ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor. Od tri istraživana eutektička otapala najpogodnijim se pokazao kolin klorid:etilen glikol (ChClEg). Najpogodnijim tretmanom za izdvajanje fenolnih spojeva pokazao se tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH. Pri optimalnim uvjetima izolacije dobivene su koncentracije fenolnih spojeva: sekoizolarikirezinol-diglukozid ($6,55 \text{ mg g}^{-1}$), glukozid *p*-kumarinske kiseline ($8,50 \text{ mg g}^{-1}$) i glukozid ferulinske kiseline ($3,39 \text{ mg g}^{-1}$). Na taj način je uspješno ekstrahirano 48 % koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, 48 % koncentracije glukozida ferulinske kiseline i 39 % koncentracije sekoisolarikirezinol diglukozida, u odnosu na referentnu metodu.

Ključne riječi: lanena pogača, lignani, fenolne kiseline, eutektička otapala, ultrazvučno-mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 47 stranica, 25 slika, 5 tablica, 53 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Doc.dr.sc. Marko Obranović*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Doc.dr.sc. Marko Obranović
3. Doc.dr.sc. Klara Kraljić
4. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj (zamjena)

Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF EUTECTIC SOLVENTS AND NEW TECHNOLOGIES IN ISOLATION OF LIGNANS AND PHENOLIC ACIDS FROM FLAXSEED CAKE

Mia Ivanov 929/PI

Abstract: Flaxseed cake, a by-product of flaxseed oil production, is very rich in bioactive polyphenolic compounds, and is therefore a good raw material for their extraction. Standard isolation methods are time-consuming acquiring considerable amounts of organic solvents. The aim of this paper was to replace organic solvents with ecologically acceptable eutectic solvents and to speed up the extraction process of phenolic compounds from flaxseed using an ultrasonic-microwave extractor. Out of the three tested eutectic solvents, the preferred one was choline chloride: ethylene glycol (ChClEg). Optimum treatment for the isolation of phenolic compounds was at 300 W power for a period of 9 minutes with the addition of 40 % 0.1 M NaOH. At these optimal isolation conditions, obtained concentrations of phenolic compounds were secoisolariciresinol-diglucoside (6.55 mg g^{-1}), *p*-coumaric acid glucoside (8.50 mg g^{-1}) and ferulic acid glucoside (3.39 mg g^{-1}). Thus 48 % of *p*-coumaric acid glucose concentrations, 48 % ferulic acid glucose concentration and 39 % secoisolariciresinol diglucoside concentration were successfully extracted, compared to the reference method.

Keywords: flaxseed cake, lignans, phenolic acids, deep eutectic solvents, ultrasonic – microwave assisted extraction

Thesis contains 47 pages, 25 figures, 5 tables, 53 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Marko Obranović, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković Full professor
2. PhD. Marko Obranović, Assistant professor
3. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
4. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 16 July 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lan	2
2.2. Lanena pogača	3
2.3. Fenolni spojevi	4
2.3.1. Lignani	4
2.3.2. Fenolne kiseline	6
2.4. Zelena otapala	7
2.4.1. Eutektična otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES)	8
2.5. Ekstrakcijske metode	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.2. Kemikalije i standardi	12
3.1.3. Aparatura	12
3.2. Metode rada	13
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači	13
3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači	13
3.2.3. Proizvodnja ulja	13
3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru (referentna metoda)	14
3.2.5. Sinteza eutektičnih otapala	14
3.2.6. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru	15
3.2.7. Određivanje sastava fenolnih spojeva lanene pogače	16
3.2.8. Statistička obrada podataka	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Kvaliteta lanenog sjemena i pogače	18
4.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva referentnom metodom	20
4.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva pogače lana ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom	21
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Tradicionalno se uzgaja za proizvodnju sjemena i tekstilnih vlakana. Smatra se funkcionalnom hranom i bogatim izvorom fitokemikalija te je zato u posljednjem desetljeću porastao interes za konzumaciju lanenih sjemenki s ciljem poboljšanja zdravstvenog stanja.

Hladnim prešanjem sjemenki lana dobivamo laneno ulje koje ima vrlo dobar sastav masnih kiselina s više od 50 % α -linolenske masne kiseline te kruti ostatak odnosno lanenu pogaču koja sadrži dijetalna vlakna, vitamine, minerale, fenolne spojeve i koja se uglavnom koristi kao stočna hrana ili dodatak ljudskoj prehrani.

Visoka koncentracija lignana i fenolnih kiselina u lanenoj pogači, čini ju dobrom sirovinu za njihovu ekstrakciju. Izolacija lignana se uobičajeno provodi dugotrajnim ekstrakcijom organskim otapalima, štetnim za okoliš, no u novije vrijeme se postupak ekstrakcije skraćuje uporabom mikrovalnog zračenja u kombinaciji s ultrazvukom i novim, ekološki prihvatljivim, otapalima.

U ovom radu odredit će se udio fenolnih spojeva i fenolnih kiselina ekstrahiranih pomoću novih metoda ekstrakcije korištenjem mikrovalova i ultrazvuka iz laboratorijski proizvedene lanene pogače. Cilj ovog istraživanja će biti odrediti najpogodnije eutektično otapalo i parametre izolacije fenolnih spojeva iz pogače lana u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LAN

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jedna od najstarijih kultiviranih biljaka te pripada porodici *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Biljka je prilagođena za uzgoj u toplim i hladnim klimatskim uvjetima, a uzgaja se za proizvodnju sjemena i vlakana. Vrste za uzgoj sjemena razlikuju se od onih korištenih za dobivanje vlakana. Vrste za uzgoj vlakana imaju dužu stabljiku, dužine 80 do 120 cm s manje grana, manje sjemena te je i veličina sjemena manja. Uljne vrste lana imaju kraće i vrlo razgranate stabljike visine 60 do 80 cm, imaju veći broj sjemenih kapsula, te je sjeme veće od onog iz vrsta za dobivanje vlakana (Przybylski, 2005).

Prije 60 godina prosječna svjetska proizvodnja sjemena lana je bila oko 3,4 milijuna tona što je bilo više od prosječne svjetske proizvodnje sjemena suncokreta (2,5 milijuna tona) i nešto niže od proizvodnje sjemena uljane repice (3,8 milijuna tona). Zadnjih godina godišnja proizvodnja lanenog sjemena je između 2 i 3 milijuna tona, a proizvodnja ostalih uljarica je znatno porasla. Zemlje u kojima se proizvodi laneno ulje u značajnim svjetskim količinama su: Kina, kao najveći proizvođač lanenog ulja s godišnjom proizvodnjom od oko 195 000 tona, nakon koje slijede Belgija, SAD, Turska, Njemačka, Indija i Etiopija. Ove zemlje u ukupnoj svjetskoj proizvodnji čine oko 88 % godišnje proizvodnje (FAOSTAT, 2018).



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

Nutritivne komponente lanenog sjemena su ulje koje je prosječno zastupljeno u udjelu od 30 do 40 %, prehrambena vlakna zastupljena u udjelu od 20 do 28 %, proteini u udjelu od 20 do 25 %, vitamini te mineralne tvari koje se iskazuju kroz pepeo u udjelu od oko 4 %, a ostatak od 4 do 8% otpada na udio vlage u sjemenu (Herchi i sur., 2012). Oko 70 % ulja u lanenom sjemenu čine nezasićene masne kiseline od kojih je najzastupljenija α -linolenska masna kiselina koja je zastupljena u pet puta većem udjelu od onog sljedećih najbogatijih izvora , ulja uljane repice i orahovog ulja (Bloedon i Szapary, 2004).

Iz lanenog sjemena se postupkom hladnog prešanja, kao glavni proizvod, izdvaja ulje. Prema pravilniku o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2012), hladno prešana jestiva ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C. Nusproizvod proizvodnje lanenog ulja je lanena pogača koja se može koristiti kao dobra sirovina za izolaciju fenolnih spojeva i lignana kojima je bogata, a koji imaju veliku biološku važnost jer imaju antimikrobno, antikancerogeno i antioksidacijsko djelovanje (Teh i sur., 2015).

2.2. LANENA POGAČA

Lanena pogača nastala kao nusprodukt proizvodnje lanenog ulja iz sjemenki lana predstavlja jeftinu sirovinu koja se uglavnom koristi kao hrana za životinje. Zahvaljujući svom dobrom nutritivnom sastavu: polifenolima, proteinima, vlaknima te polinezasićenim masnim kiselinama koje sadrži, prikladna je i za uporabu u prehrani ljudi (Ogunronbi i sur., 2011).

Odmašćena lanena pogača sadrži nutrijente koji se zbog svoje polarnosti hladnim prešanjem ne izdvajaju s uljem nego zaostaju u pogači. Nakon prešanja lanenog sjemena i odvajanja lanenog ulja, lanena pogača sadrži oko 29% ulja i 28% proteina, 22% ugljikohidrata, 7% vlakana i 3% mineralnih tvari izraženih kao pepeo te oko 10% vlage (Gutiérrez i sur., 2010).

Vlakna u lanenom sjemenu čine prosječno 28 % sjemena te se dijele na topljiva vlakna koja čine sluz i netopljiva vlakna u koja spadaju celuloza i lignini i čine 2/3 ukupnih vlakana sjemena. Odmašćena pogača lana sadrži od 1 do 4 % lignana (Alu'datt i sur., 2017). Najzastupljeniji lignan lanenog sjemena, sekoisolarikirezinol diglukozid (SDG) je fenolni spoj koji je u sjemenu lana povezan u strukturu lignina i čini građevnu jedinicu ovojnice lanenog sjemena. Zbog svoje se polarnosti SDG većim dijelom zadržava u pogači prilikom izdvajanja ulja (Hano i sur., 2017), a izdvajanje ulja iz sjemenki lana prije ekstrakcije fenolnih

spojeva i lignana u konačnici rezultira izdvajanjem puno veće količine njihovih ekstrakata (Pag i sur., 2014).

2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji, osim što imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, su i jedni od glavnih pomoćnika u zaštiti protiv parazita, patogena i predatora (Wang i sur., 2016). Dokazana prisutnost širokog spektra fenolnih spojeva (poznato preko 8000 različitih spojeva) u uljaricama doprinosi njihovim terapijskim svojstvima, uključujući antivirusno, protuupalno, antioksidativno, antikancerogeno i hipoglikemijsko djelovanje.

Fenolni spojevi predstavljaju grupu polarnih spojeva koji sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten te se u hrani nalaze u slobodnom obliku ili vezani na neke njene komponente, zbog prirode njihove kemijske strukture. Fenolni spojevi u sjemenju lana se nalaze prvenstveno u glukozidnom obliku, povezani s jednom ili više šećernih jedinica (najčešće glukozom) ili u esterski vezanom obliku. Istraživanja su pokazala da je ukupni udio fenolnih spojeva u lanenom sjemenu 8-10 g kg⁻¹, a esterificirane fenolne kiseline obuhvaćaju 48-66 % ukupnih fenolnih spojeva (Alu'datt i sur., 2017).

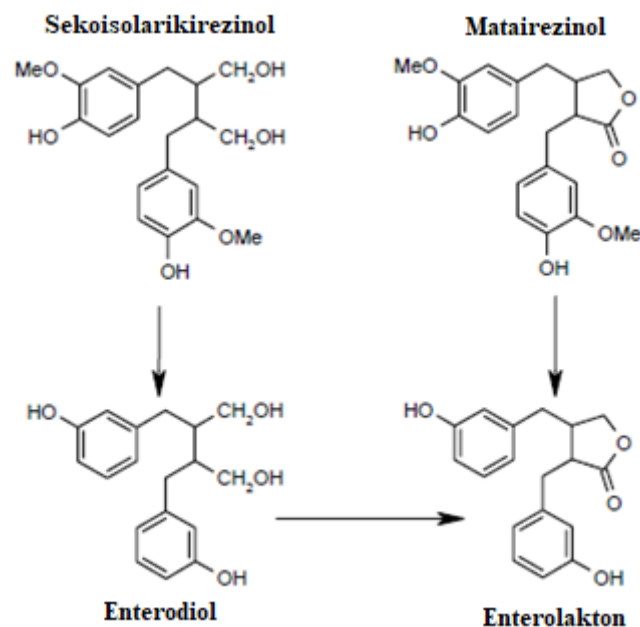
Lanene sjemenke uglavnom sadrže flavonoide koji nastaju povezivanjem više od jedne fenilpropanoidne jedinice, lignane i fenolne kiseline koji spadaju u skupinu neflavonoida. Sastav i udio fenolnih spojeva u lanenom sjemenu ovisi o agronomskim i tehnološkim čimbenicima, kao što su sorta, područje uzgoja, klima, količina padalina, omjer uzorka i otapala, priroda samog uzorka, vrijeme ekstrakcije te o svojstvima korištenog otapala za ekstrakciju (Alu'datt, 2013; Punia i Raba, 2016). Laneno sjeme je najbogatiji izvor fitoestrogena lignana sekoisolarikirezinola (SECO) i ostalih fenolnih komponenti uključujući *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu (Eliasson i sur., 2003).

2.3.1. Lignani

Lignani su biljni fenolni spojevi koji nastaju kondenzacijom dvije fenilpropanoidne jedinice povezane preko središnjeg ugljika svakog pokrajnjeg lanca na stanične stjenke (Alu'datt i sur., 2017). Otkriveni su u 19. stoljeću u drvenastim stanicama drveća te je od tada pronađeno

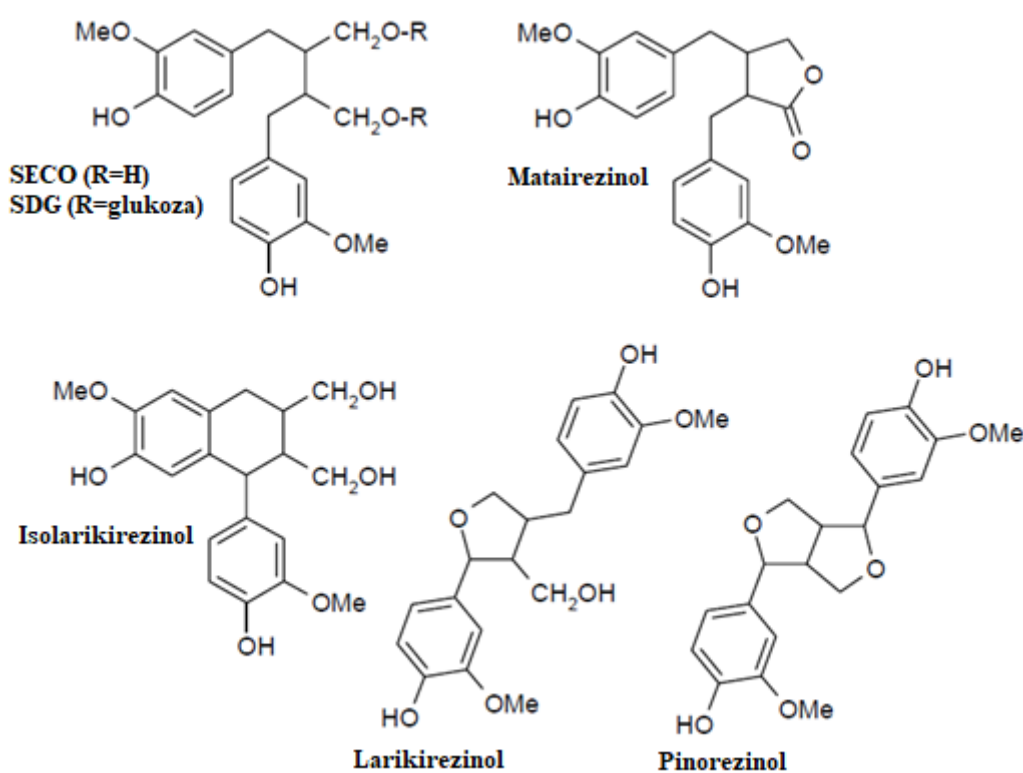
još nekoliko stotina lignana u žitaricama, uljaricama, orašastim plodovima, leguminozama i voću (Krajčova i sur., 2009). Laneno sjeme poznato je kao najbolji prirodni izvor lignana s vrijednostima 75 - 800 puta većim nego u drugim uljaricama, žitaricama, voću ili povrću (Pag i sur., 2014). Vrlo mali udio lignana sadržanog u lanenom sjemenu prelazi iz sjemena u ulje, a veći se dio zbog svoje hidrofilnosti zadržava u lanenoj pogači (Przybylski, 2005).

Biolška aktivnost lignana u sisavaca povezana je s bioaktivacijom komponenti u enterolakton (ENL) i enterodiol (END). 1980. su prvi puta iz seruma, urina i žuči ljudi i nekih životinja izolirani enterolakton i enterodiol te su klasificirani kao fitoestrogeni prema njihovom biljnom podrijetlu. Također, poznati su i kao lignani sisavaca ili enterolignani. Proizvodi ih gastrointestinalna mikrobiota te je dostupnost lignana u organizmu ovisna o prisustvu mikroorganizama potrebnih za provedbu važnih kemijskih promjena. END i ENL imaju antioksidativnu, slabu estrogenu i antiestrogenu aktivnost koje kod ljudi pružaju zaštitu od kardiovaskularnih bolesti, metaboličkih poremećaja i posebnih oblika raka. Također epidemiološka i farmakološka ispitivanja su pokazala kako su END i ENL važni u zaštiti od osteoporoze, hiperlipidemije, mnogih oblika tumora i sindroma menopauze. (Nemes i Orsat, 2012; Landete, 2012).



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

Najzastupljeniji lignan u lanenom sjemenu je sekoisolarikirezinol (SECO) u obliku sekoisolarikirezinol diglukozida (SDG) koji je esterski vezan sa 3-hidroksi-3-metilglutarinskom kiselinom (HMGA) i tvori oligomernu strukturu koja se naziva lignan makromolekula ili lignan kompleks (Nemes i Orsat, 2012). SDG je u lanenom sjemenu prisutan u udjelu od 11,7 do 24,1 mg g⁻¹ u odmašćenoj lanenoj pogači i u udjelu od 6,1 do 13,3 mg g⁻¹ u lanenom brašnu (Kajla i sur., 2014). Također su uz SDG u lanenom sjemenu prisutni i drugi lignani kao što su matairezinol (MAT), pinorezinol (PINO), larikirezinol (LARI) i isolarikirezinol (ISOLARI) (Landete, 2012), čije su strukture prikazane Slikom 3.



Slika 3. Struktura lignana prisutnih u lanenom sjemenu (Johnsson, 2004)

2.3.2. Fenolne kiseline

Druga najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u sjemenu lana su fenolne kiseline. Fenolne kiseline se mogu podijeliti u dvije glavne skupine derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline te su najvećim dijelom, oko 80 %, vezane esterskim vezama u glukoze (Johnsson, 2004). Derivati hidroksicimetne kiseline, među koje spadaju ferulinska

kiselina ($38,8 - 51,2 \mu\text{g g}^{-1}$), *p*-kumarinska kiselina ($14,7 - 17,8 \mu\text{g g}^{-1}$) i kavaska kiselina ($5,7 - 6,8 \mu\text{g g}^{-1}$) su glavne fenolne kiseline u sjemenu lana. Uglavnom su vezane esterskim vezama na strukturne komponente stanične stjenke pa se tako ferulinska kiselina nalazi $78,9 - 93,0 \%$, *p*-kumarinska kiselina $70,8 - 85,5 \%$, a kavaska kiselina oko $64,5 \%$ u vezanom obliku. S obzirom da sastav fenolnih kiselina u lanu ovisi o sortama lana, uvjetima uzgoja te razlikama u otapalima korištenim pri ekstrakciji, osim već navedenih fenolnih kiselina u sjemenu lana još su prisutne i galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska i sinapinska kiselina u slobodnom ili esterski vezanom obliku (Wang i sur., 2016).

2.4. ZELENA OTAPALA

Zelena kemija ima veliki značaj za održivi razvoj s ciljem sprječavanja i smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje. Neki od principa zelene kemije su: zaštita okoliša, ekonomičnost tehnoloških procesa, dizajniranje sigurnijih kemikalija, primjena sigurnijih otapala, učinkovito korištenje energije, korištenje obnovljivih sirovina i korištenje proizvoda koji su biorazgradivi. Smatra se da se usvajanjem navedenih načela mogu riješiti globalni ekološki problemi kao što su sve prisutnije klimatske promjene, učinkovito upravljanje energijom i raspolaganje prirodnim resursima (Kudlak i sur., 2015).

Nova otapala se razvijaju s ciljem uklanjanja i smanjenja uporabe štetnih organskih otapala te ih se pokušava zamijeniti novim, manje štetnim otapalima. Stoga su zelena otapala i ionske kapljevine vrlo važna područja kojim se zelena kemija bavi. Glavne karakteristike idealnih zelenih otapala i ionskih kapljevine su biorazgradivost, niska cijena, netoksičnost, obnovljivost i visoka dostupnost te se posljednjih godina radi na razvoju novih ekološki prihvatljivih otapala (Zhang i sur., 2012; Kudlak i sur., 2015).

Tradicionalna otapala pokušavaju se zamijeniti novim neškodljivim otapalima, ionskim kapljevinama i eutektičnim otapalima. Za otkriće ionske kapljevine zaslužan je kemičar Paul Walden, koji je 1914. godine sintetizirao etilamin nitrat $[\text{EtNH}_3]^+[\text{NO}_3]^-$. Ionske kapljevine su smjese organskih soli, sastavljene od organskih kationa i organskih ili anorganskih aniona, koje imaju točku tališta manju od $100 \text{ }^\circ\text{C}$. U većini slučajeva ionske tekućine imaju asimetrično supstituiran kation, imidazolijev, pirolidinijev, piridinijev, amonijev i fosfonijev, i raznovrsne anione, pogotovo halogene ($[\text{Cl}]$, $[\text{Br}]$, $[\text{I}]$, $[\text{BF}_4]$, $[\text{AlCl}_4]$, $[\text{PF}_6]$). Zbog veličine iona nabijeni

centri molekula međusobno djeluju, ali se ne vežu direktno te veličina molekula onemogućava čvrsto vezanje. Duljina i jačina alkalne veze utječu na nisku temperaturu taljenja ionskih kapljevina te njihovo postojanje u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi. Jedna od prednosti ionskih kapljevina je njihova laka izolacija iz reakcijskih smjesa što omogućuje njihovo recikliranje i ponovnu uporabu, ali je mana potreba za zbrinutim odlaganjem i njegovo štetno djelovanje na okoliš. Ionske kapljevine su se razvijale u četiri generacije te su prvotna očekivanja od ionskih kapljevina bila velika, no zbog parametara kao što su: slaba biokompatibilnost, problem razgradnje i odlaganja ionskih kapljevina nakon provođenja procesa, njihova toksičnost te cijena sinteze otapala, koja je 5-20 puta veća od sinteze organskih otapala, se ne uklapaju u načela zelene kemije. Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine te je razvoj alternativnih otapala posljednjih godina usmjeren prema eutektičnim otapalima (engl. Deep Eutectic Solvents, DES) koja su pokazala najveći potencijal u području zelene kemije (Cvjetko Bubalo i sur.; 2015, Kudlak i sur., 2015).

2.4.1. Eutektična otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES)

Eutektična otapala se smatraju četvrtom generacijom ionskih tekućina zbog mnogih zajedničkih fizikalno-kemijskih svojstava, no ipak treba istaknuti da su to zapravo dvije različite vrste alternativnih otapala (Cvjetko Bubalo i sur, 2018). U odnosu na konvencionalne ionske tekućine, eutektična otapala imaju veću prednost: jeftina i jednostavna su za pripremu i skladištenje te su biorazgradiva, netoksična i sigurna za okoliš (Zainal Abidin i sur., 2017).

Eutektična otapala su smjese nabijenog akceptora vodika poput netoksičnih amonijevih soli (npr. kolin klorid) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, alkohola i karboksilnih kiselina, u određenom molarnom udjelu, gdje su navedene komponente povezane jakim vodikovim vezama. DES-ovi zbog delokalizacije naboja imaju svojstvo eutektičnosti tj. sniženo im je talište u odnosu na tališta zasebnih ishodnih tvari. Klasični primjer je smjesa kolin klorida (Ch) ($T_t = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) i uree ($T_t = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) u molarnom omjeru 1:2, a temperatura tališta navedenog otapala je $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cvjetko Bubalo i sur., 2015, Kudlak i sur., 2015).

Eutektična otapala se pripremaju miješanjem lako dostupnih, jeftinih, sigurnih, netoksičnih i biorazgradivih tvari koje imaju sposobnost samoudruživanja uslijed nastalih nekovalentnih interakcija, najčešće vodikovih veza. Raznolikost DES-ova omogućena je velikim brojem

moćući kombinacija ishodnih tvari korištenih za sintezu te zato razlikujemo 4 vrste DES-a kao što je prikazano u Tablici 1. Fizikalna svojstva DES-a, njegovo ledište, provodljivost, gustoća i viskoznost, ovise o vrsti DES-a odnosno o tvarima od kojih je napravljen (Kudlak i sur., 2015).

Tablica 1. Tipovi eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

Tip	Opis	Primjer
1	Kombinacija metala i organske soli	ZnCl ₂ + kolin klorid
2	Kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	CoCl ₂ *6H ₂ O + kolin klorid
3	Kombinacija organske soli i donora vodikove veze	kolin klorid + urea
4	Kombinacija metalne soli i donora vodikove veze	ZnCl ₂ + urea

Kada su spojevi koji tvore DES primarni metaboliti, aminokiseline, polialkoholi, organske kiseline, ugljikohidrati ili derivati kolina, takve smjese nazivaju se prirodnim eutektičkim smjesama (engl. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). NADES-ovi imaju veću gustoću od vode dok viskoznost ovisi o udjelu vode u sintetiziranom DES-u i temperaturi (Kudlak i sur., 2015). NADES-ovi u potpunosti ispunjavaju kriterije idealnog zelenog otapala, jer ih karakterizira niska cijena, dostupnost, jednostavna priprema, biorazgradivost, netoksičnost i mogućnost regeneracije, a zbog različitih kombinacija NADES-a, mogućnosti koje se javljaju za njihovu primjenu su mnogobrojne (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

2.5. EKSTRAKCIJSKE METODE

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljaka je vrlo često korišten postupak u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Tradicionalne metode uključuju vremenski duge ekstrakcije i korištenje velikih količina otapala te se zato pokušavaju zamijeniti novijim ekstrakcijskim tehnikama koje skraćuju vrijeme ekstrakcije, povećavaju prinos ekstrakcije i smanjuju potrebnu količinu otapala te time smanjuju zagađenje okoliša (Wang i Weller, 2006).

Ekstrakcija lignana iz makromolekulskog kompleksa se uobičajeno provodi sekvencijskom ili istovremenom alkoholnom ekstrakcijom kruto/tekuće, metanolom ili etanolom i alkalnim tretmanom s NaOH u rasponu koncentracija od 0,1 M do 1 M. Ovisno o vrsti analiziranog

uzorka i koncentraciji lignana prisutnog u uzorku za analizu najčešće se koriste plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s odgovarajućim detektorima. Kako bi se lignani mogli analizirati na plinskom kromatografu potrebno ih je prevesti u manje polarne oblike procesom derivatizacije. Razlikujemo 3 načina derivatizacije, a to su sililacija, acilacija i alkilacija no samo se sililacija koristi prilikom analize biljnih lignana na GC-u (Fliniaux, 2014, Čukelj i sur.,2011).

Posljednjih godina povećava se interes za unaprjeđenjem ekstrakcija kruto/tekuće, a te nove metode ekstrakcije podrazumijevaju ekstrakcije potpomognute energijom mikrovalova i kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koji se sastoje od dva oscilirajuća okomita polja: električnog i magnetskog. Energija mikrovalova je neionizirajuće elektromagnetsko zračenje frekvencije u rasponu 1-300 GHz odnosno između X-zraka i infracrvenog zračenja u elektromagnetskom spektru. U suvremenoj znanosti mikrovalovi se mogu koristiti za dvije osnovne svrhe: kao nosioci informacija ili kao energetske vektore. Uloga mikrovalova kao energijskih vektora je izravno djelovanje na materiju koja ima sposobnost da apsorbirane elektromagnetske energije transformira u toplinu. Sam princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na izravnom utjecaju na polarne molekule ciljanog materijala ili otapala, a transformacija elektromagnetske energije u toplinu se odvija kroz dva mehanizma: ionskom kondukcijom i rotacijom dipola u otapalu i matriksu uzorka (Mandal i sur, 2007). Dolazi do jednakomjernog zagrijavanja cijelog volumena otapala i uzorka, što posljedično dovodi do širenja i pucanja staničnih stijenki i otpuštanja bioaktivnih komponenata u otapalo (Teh i sur., 2015). Ekstrakcija potpomognuta energijom mikrovalova se provodi pri atmosferskom tlaku te pruža poboljšanja u vidu smanjene potrošnje otapala te skraćena vremena trajanja ekstrakcije. Za ekstrakciju spojeva iz biljnih materijala potpomognutim energijom mikrovalova uzorak se podvrgava mikrovalnom zračenju snage 25-750 W i ekstrakcijskom vremenu od 30 sekundi do 10 minuta (Beejmohun i sur., 2007). Izbor otapala ovisi o topljivosti ciljanih komponenti i o interakcijama između otapala i biljnog materijala, ali također i o sposobnosti otapala za apsorpciju energije mikrovalova koja je određena dielektričnom konstantom otapala. Uglavnom se odabire otapalo s visokom dielektričnom konstantom što mu omogućava snažnu apsorpciju energije mikrovalova. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija se obično provodi s polarnim otapalima kao što su metanol, etanol i voda, istim otapalima koja se koriste i kod tradicionalne ekstrakcije te koja se dobro zagrijavaju energijom mikrovalova (Wang i Weller, 2006).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija je nova i inovativna metoda ekstrakcije koja se može koristiti u kombinaciji s mikrovalnim zračenjem te je jedna od metoda zelene ekstrakcije koja omogućuje povećanje prinosa ekstrakcije uz visoku kvalitetu proizvoda te smanjenje potrebnog vremena ekstrakcije koji rezultiraju uštedom energije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Ultrazvuk visokog intenziteta je mehanički val koji se prenosi putem elastičnog medija, frekvencije od 20 do 100 kHz te uzrokuje akustične kavitacije i druge mehaničke učinke koji mogu povećati efikasnost ekstrakcije. Akustična kavitacija razbija stanične stijenke omogućavajući otapalu penetraciju u stanični materijal i izlaz intracelularnog produkta iz stanice rezultirajući ubrzanjem ekstrakcije te većim prinosima, odnosno povećanom efikasnošću ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Dok mehanički učinci uzrokovani ultrazvukom uzrokuju miješanje otapala i povećanje kontaktne površine između otapala i staničnog materijala te time bolju ekstrakciju. Stoga su glavne prednosti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije skraćanje vremena ekstrakcije i smanjena potrošnja otapala te se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može provesti na nižoj temperaturi i tako se prevenira toplinsko uništenje uzorka i gubitak bioaktivnih komponenti (Zhang i sur., 2008).

Najvažniji parametri koji utječu na ultrazvučnu ekstrakciju su vrijeme trajanja procesa, primijenjena frekvencija, valna duljina i intenzitet ultrazvuka, odabir otapala odnosno topljivost ciljanih komponenti u primijenjenom otapalu, temperatura te prisutnost otopljenih plinova. Učinak ultrazvuka je puno veći pri nižim frekvencijama od 18 do 40 kHz jer kod nižih frekvencija dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije kao što su turbulencija i strujanje tekućine, dok je u rasponu frekvencija od 400 do 800 kHz učinak ultrazvuka praktično zanemariv (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Materijal na kojem su provedena ispitivanja u ovom radu je pogača lana, proizvedena hladnim prešanjem sjemena lana u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.1.2. Kemikalije i standardi

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

- ❖ Kolin klorid
- ❖ Etilen glikol
- ❖ Urea
- ❖ Natrij hidroksid (0,1 M i 0,3 M)
- ❖ Metanol
- ❖ Mravlja kiselina (0,1 %)
- ❖ Metanol (HPLC čistoće)
- ❖ Destilirana voda
- ❖ Sekoizolarikirezinol diglucoizid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

3.1.3. Aparatura

Pri izradi eksperimentalnog djela ovog rada korišteni su:

- ❖ Aparatura po Soxhletu (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Magnetska mješalica IKA, C-MAG HS7 s termoregulatorom IKA, ETS-D5, Staufen im Breisgau, Njemačka
- ❖ Laboratorijska pužna preša „Komet“, model CA/53 (Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka)
- ❖ Mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (Lab Kits, Hong Kong, Kina)
- ❖ Centrifuga (Falcon, Colorado, SAD)

- ❖ HPLC sustav sa binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom 1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači

Za određivanje udjela vode u lanenom sjemenu i pogači korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 665:2004) sušenja do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. U izvaganu i osušenu aluminijsku posudicu izvagano je 5 g sjemena/pogače s točnošću 0,001 g. Uzorak je sušen do postizanja konstantne mase, odnosno do trenutka kada je razlika dva uzastopna mjerenja najviše 0,005 g. Iz razlika masa prije i nakon sušenja izračuna se udio vode u sjemenu.

3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači

Za određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači korištena je standardna HRN EN ISO metoda (659:2010) ekstrakcije po Soxhletu. U čahuru za ekstrakciju je izvagano 5-10 g s točnošću 0,001 g svježe samljevenog sjemena lana/pogače. Mljevenje je provedeno u električnom mlincu za kavu pri čemu se pazilo na temperaturu zbog neželjenog pregrijavanja te na ravnomjernu samljevenost cijelog uzorka. Čahura je zatvorena vatom i stavljena u aparaturu po Soxhletu, dodan je potreban volumen petroletera, koji se koristio kao otapalo, a ekstrakt se skupljao u izvaganu tikvicu u koju su stavljene 2-3 staklene kuglice za vrenje. Ekstrakcija je trajala tokom 8 sati. Nakon završetka ekstrakcije otapalo je otpareno do suha, a ostatak je sušen u sušioniku na $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do postizanja konstantne mase.

3.2.3. Proizvodnja ulja

Lanenom sjemenu smo prije prešanja podesili postotak vlage s dodatkom vode, na približno 9,5 %. Tako pripremljeno sjeme se ručno usipava kroz lijevak preše. Okretanjem puža preše dolazi do prešanja i izdvajanja ulja iz sjemena. Izdvojeno ulje skuplja se u odgovarajuću, prethodno pripremljenu posudu, dok se pogača usitnjava i ponovno preša, kako bi se postiglo

bolje iskorištenje. Nakon drugog prešanja pogača se samelje u električnom mlinu te se čuva na -20 °C radi daljnjih analiza.

3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru (referentna metoda)

Kao referentna metoda ekstrakcije fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru korištena je metoda optimirana u radu Šrajbek (2017). U specijalnu Erlenmayer-ovu tikvicu za ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova na dnu, odvagano je 5 g lanene pogače i pomiješano s 100 mL odgovarajućeg otapala za ekstrakciju. Kao otapalo za ekstrakciju korištena je smjesa 70 % metanola i 30 % 0.1 M NaOH. Erlenmayer-ova tikvica je postavljena u ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor i spojena na hladilo. Ekstrakcija je provedena u trajanju od 9 minuta i pri snazi 300 W. Nakon provedene ekstrakcije u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru, uzorak je centrifugiran 15 minuta na 5000 okretaja min^{-1} . Dobiveni supernatant je prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjen do oznake odgovarajućim otapalom. Alikvot iz odmjerne tikvice je pomoću šprice profiltriran u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2 μm . Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje udjela fenolnih spojeva HPLC metodom.

3.2.5. Sinteza eutektičnih otapala

Eutektična otapala sintetizirana su na način da je u tikvicu s okruglim dnom dodana proračunata i na analitičkoj vagi odvagana količina komponenata prema određenim omjerima prikazanim u Tablici 2. te je dodano 10 % vode. Tikvica sa smjesom odabranih spojeva stavljena je na elektromagnetsku miješalicu te je pri temperaturi do 60 °C miješana 2-4 sata u zatvorenom sustavu sve dok nije nastala homogena, bezbojna i prozirna tekućina odnosno otapalo.

Tablica 2.: Molarni omjeri sintetiziranih eutektičnih otapala

Naziv otapala	Kratica	Omjer
Kolin kolord:etilen glikol	ChCl:Eg	1:2
Kolin kolorid: urea:etilen glikol	ChCl:U:Eg	1:2:2
Kolin klorid:urea	ChCl:U	1:2

3.2.6. Ekstrakcija fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru

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

Nakon provedene ekstrakcije u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru, uzorak je centrifugiran 15 minuta na 5000 okretaja min^{-1} . Dobiveni supernatant je prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjen do oznake odgovarajućim otapalom. Alikvot iz odmjerne tikvice je pomoću šprice profiltriran u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2 μm . Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje udjela fenolnih spojeva HPLC metodom.

Za izrađivanje plana izvođenja eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz pogače lana korišten je eksperimentalni dizajn Box Benhken prikazan u tablici kao plan i redosljed izvođenja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka .

Tablica 3. Redoslijed izvođenja eksperimenta ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije

Redni broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (minute)	Udio 0,1M NaOH (%)
1	100	6	30
2	100	3	40
3	100	6	50
4	200	6	40
5	200	3	50
6	200	6	40
7	200	6	40
8	100	9	40
9	300	9	40
10	300	6	50
11	200	9	30
12	200	9	50
13	200	3	30
14	300	6	30
15	300	3	40

3.2.7. Određivanje sastava fenolnih spojeva lanene pogače

Sastav lignana i fenolnih kiselina lanene pogače određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-om) pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Za razdvajanje i kvantifikaciju željenih fenolnih spojeva lanene pogače korištena je metoda razvijena i validirana u diplomskom radu Cvitanić (2016). U sklopu tog rada su optimirani parametri metode: brzina protoka otapala, temperatura kolone, količina injektiranog uzorka te gradijent protoka otapala u ovisnosti o vremenu (Tablica 4.). Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz lanene pogače provedeno je pri 30 °C na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å). Količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μL. Kao mobilna faza korištene su 0.1% otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0.1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok otapala bio je 0.9 mL min⁻¹. Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su DAD

detektorom pri valnoj duljini od 280 i 330 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm. Usporedbom vremena zadržavanja ekstrahiranih fenola s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom spektara dobivenih ekstrakcijom sa spektrima standarda, identificirani su fenolni spojevi. Za kvantifikaciju fenolnih spojeva lanene pogače korištene su baždarne krivulje standarda.

Tablica 4. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu (Cvitanić, 2016)

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

3.2.8. Statistička obrada podataka

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu predmet istraživanja bila je lanena pogača proizvedena postupkom hladnog prešanja sjemena lana u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Prehrambeno biotehnološkog fakulteta. Laneno sjeme je odabrano zbog vrlo visokog udjela fenolnih spojeva koji su većim dijelom, zbog svoje hidrofobnosti, zadržani u lanenoj pogači tijekom proizvodnje lanenog ulja (Przybylski, 2005). Visok udio zaostalih fenolnih spojeva čini lanenu pogaču jako dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. Ekstrakcija fenolnih spojeva se uobičajeno provodi dugotrajnom ekstrakcijom organskim otapalima, ali se u novije vrijeme postupak ekstrakcije skraćuje uporabom mikrovalnog zračenja u kombinaciji s ultrazvukom i novih ekološki prihvatljivim otapala. Postupkom ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije omogućuje se povećanje prinosa ekstrakcije uz visoku kvalitetu proizvoda te smanjenje potrebnog vremena ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Budući da se sve više organska otapala pokušavaju zamijeniti zelenim otapalima cilj rada je bio odrediti najpogodnije eutektično otapalo i parametre izolacije fenolnih spojeva iz pogače lana u ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru.

4.1. KVALITETA LANENOG SJEMENA I POGAČE

Kvaliteta lanenog sjemena i pogače obuhvaća važne parametre koji značajno utječu na kvalitetu konačnog proizvoda. Ti su parametri presudni pri otkupu i formiranju cijene sjemena, ali i konačnog proizvoda, također vrlo su bitni i pri određivanju uvjeta transporta i skladištenja (Coşkuner i Karababa, 2007). U ovom radu s ciljem utvrđivanja kvalitete lanenog sjemena i pogače provedene su analize udjela vode i udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači. Dobiveni rezultati izraženi su u postocima, kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Za određivanje vode u lanenom sjemenu i pogači korištena je standardna metoda sušenje do konstantne mase, a za određivanje ulja korištena je standardna metoda po Soxhletu.

Udio vode u sjemenu je iznimno važan parametar kod skladištenja sjemena. Povećana vlažnost sjemena uzrokuje biokemijske promjene u sjemenu te dolazi do razgradnje komponenti sjemena, klijanja, razvoja plijesni i drugih mikroorganizama čime se umanjuje kvaliteta sjemena, a ono postaje zdravstveno neispravno. Udio vode u sjemenu ovisi o stupnju zrelosti sjemena, vremenskim prilikama tijekom sazrijevanja i žetve, a tijekom skladištenja vrlo je važna relativna vlažnost zraka, kako suho sjeme ne bi apsorbiralo vodu iz zraka. Prije

skladištenja sjemena povećane vlažnosti, potrebno ga je osušiti, čime se povećavaju troškovi proizvodnje ulja (Rade i sur., 2001).

Udio ulja u sjemenu je jedan od osnovnih parametara za procjenu kvalitete sjemena. Na udio ulja u sjemenu značajno utječu klimatski faktori, naročito temperatura koja negativno korelira sa udjelom ulja te kiša koja pozitivno korelira sa sadržajem ulja. Vlažnost i temperatura tijekom skladištenja, kao i duljina skladištenja također su vrlo važni parametri o kojima ovisi udio ulja u sjemenu (Šimić i sur., 2007).

Rezultati udjela vode i ulja u lanenom sjemenu i lanenoj pogači prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Udio vode i ulja u lanenom sjemenu i lanenoj pogači

Uzorak	Udio vode (%)	Udio ulja na suhu tvar (%)
Laneno sjeme	6,49	37,26
Lanena pogača	9,57	11,90

Iz dobivenih rezultata je vidljivo kako je udio vode u lanenom sjemenu 6,49 % što je u skladu s radom Gutiérreza i suradnika (2010) koji navode kako je udio vode u lanenom sjemenu između 4 % i 8 %. Coşkuner i Karababa (2007) navode kako se udio vode u sjemenu kreće u rasponu od 6,09% do 16,81% te kako je udio vode u sjemenu u korelaciji s dimenzijama sjemena. Među sirovinama koje se koriste za proizvodnju ulja laneno sjeme sadrži sličan udio vode kao suncokret, koji ima od 6 % do 8 % vode (Litvischenko i sur., 2017) te uljana repica, koja ima od 5 % do 7,5 % vode (Ali i sur, 2009), dok druge sirovine poput soje, buče i masline sadrže veći udio vode.

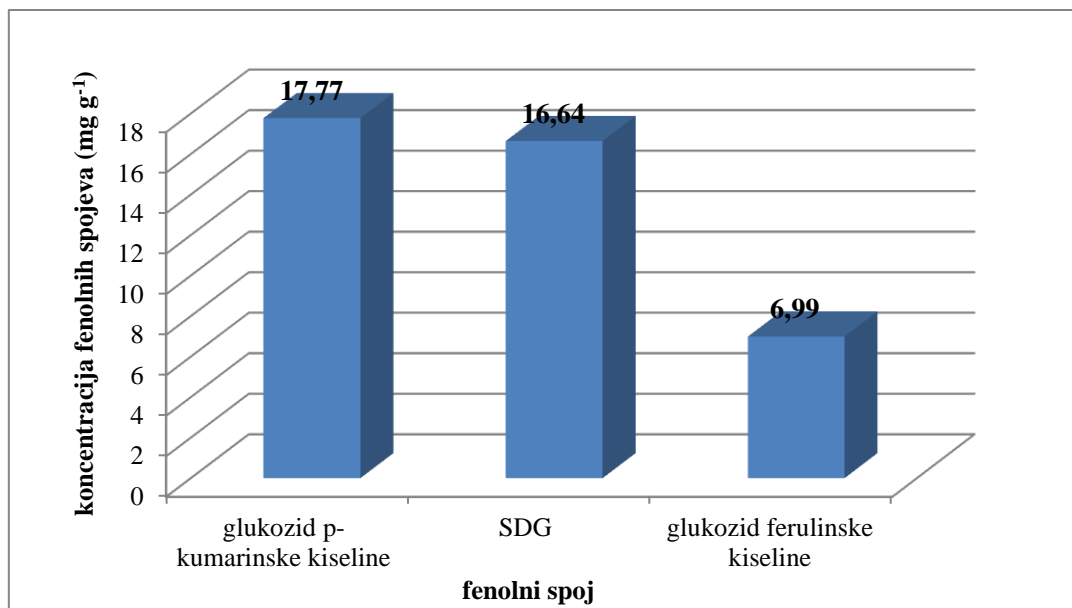
Udio ulja na suhu tvar u lanenom sjemenu iznosi 37,26 % što je u skladu s literaturnim podacima (Rade i sur., 2001), koji navode udio ulja u lanenom sjemenu od 33 % do 43 %. U radu Kajla i sur. (2014) se navodi kako se udio ulja u lanenom sjemenu kreće u rasponu od 37 % do 45 %. S obzirom na druge sirovine koje se koriste za proizvodnju ulja, lan ima sličan udio ulja kao uljana repica od 38 % do 50 % (Koubaa i sur., 2016) ili suncokret od 38 % do 48 % (Grunvald i sur., 2014), ali ima i veći udio ulja od soje koja sadrži oko 18 % (Poeta i sur., 2014) i masline koja sadrži od 20 % do 25 % (van Doosselaere, 2013).

Lanena pogača se dobiva kao nus-proizvod pri proizvodnji lanenog ulja hladnim prešanjem. Prije prešanja, sjemenu je potrebno podesiti udio vlage na 9,5-10% kako bi se smanjilo nastajanje finih čestica tijekom prešanja te kako bi se povećalo iskorištenje procesa izdvajanja ulja iz sjemena lana. Udio vode i ulja u lanenoj pogači dobivenoj nakon dvostrukog prešanja prikazani su u Tablici 5. Udio vode u pogači iznosi 9,57 %, a udio ulja na suhu tvar iznosi 11,90 %. Ogunronbi i suradnici (2011) u radu navode kako je udio vode u pogači lana u rasponu od 8,8 % do 10,4 % što je u skladu s dobivenim rezultatima. Dok Gutiérrez i suradnici (2010) navode višu vrijednost udjela vode u pogači 10,65 %. Ogunronbi i suradnici (2011) također navode i kako su mogući razlozi varijacija udjela vode u pogači lana udio vode u sjemenu u trenutku prešanja odnosno proizvodnje ulja, postupak prešanja sjemena te relativna temperatura i vlažnost u mlinu.

Gutiérrez i suradnici (2010) u svom radu navode kako je udio ulja na suhu tvar u pogači lana 29,37 %. Ogunronbi i sur. (2011) navode i kako je udio ulja u pogači u rasponu od 12,4 % do 22,5 %. Literaturne vrijednosti udjela ulja u pogači su više od dobivenih vrijednosti te su razlog tomu uvjeti i proces izdvajanja ulja iz sjemenki lana.

4.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA REFERENTNOM METODOM

Referentna metoda za određivanje fenolnih spojeva iz lanene pogače korištena je s ciljem određivanja koncentracija SDG-a, glukozida *p*-kumarinske kiseline te glukozida ferulinske kiseline u pogači, koja će biti korištena u daljnjim istraživanjima. Za referentnu metodu korišten je postupak ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije optimiran u diplomskom radu Šrajbek (2017). Korišten je tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz smjesu 7:3 metanol i 0,1 M NaOH kao otapalo. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 4)



Slika 4. Koncentracija fenolnih spojeva ekstrahiranih referentnom metodom

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je glukozid *p*-kumarinske kiseline prisutan u najvišoj koncentraciji od 17,77 mg g⁻¹, zatim slijedi SDG u koncentraciji 16,64 mg g⁻¹ te u najmanjoj koncentraciji glukozid ferulinske kiseline 6,99 mg g⁻¹.

U radu Eliasson i suradnika (2003) navode kako su direktnom alkalnom hidrolizom s 1 M NaOH ekstrahirani fenolni spojevi diglukozid *p*-kumarinske kiseline u koncentraciji od 1,2 mg g⁻¹ do 8,5 mg g⁻¹, SDG u koncentraciji od 1,9 mg g⁻¹ do 25,9 mg g⁻¹ te diglukozid ferulinske kiseline u koncentraciji od 1,6 mg g⁻¹ do 5,0 mg g⁻¹. Dobiveni rezultati koncentracije SDG-a u ovom radu (6,99 mg g⁻¹) su u skladu s navodom, dok su dobivene koncentracije diglukozida *p*-kumarinske kiseline (17,77 mg g⁻¹) i diglukozida ferulinske kiseline (6,99 mg g⁻¹) više od literaturnih navoda. Razlog tomu može se pripisati sorti lana (Eliasson i sur., 2003) te omjeru otapala i pogače lana kao i snazi i trajanju primijenjenog ultrazvučno-mikrovalnog tretmana (Teh i sur., 2015).

4.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA POGAČE LANA ULTRAZVUČNO-MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM

Ovaj rad je nastavak istraživanja provedenog u diplomskom radu Rakuljić (2017) u kojem je provedena selekcija eutektičkih otapala i pokušaj optimiranja parametara ultrazvučno-

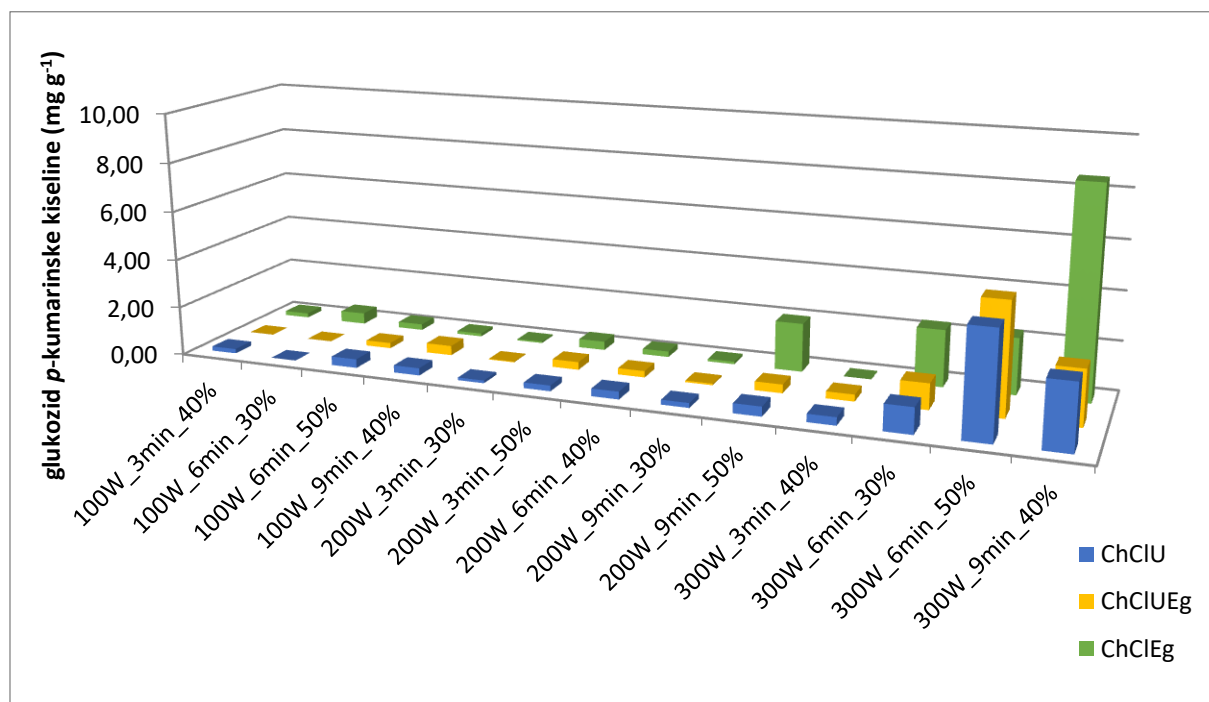
mikrovalne ekstrakcije te su dobiveni nezadovoljavajući rezultati. Stoga je u ovom radu proširen broj ispitanih eutektičkih otapala te je provedeno ponovno optimiranje parametara ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije. Ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor je uređaj koji nudi mogućnost tri načina rada, a u ovom radu korištena je kombinirana ultrazvučno-mikrovalna ekstrakcija za izolaciju fenolnih spojeva iz pogače lana. Kao otapala za ekstrakciju korištena su tri eutektična otapala, smjese kolin klorid-etilen glikol (ChClEG), kolin klorid-urea-etilen glikol (ChClUEG) i kolin klorid-urea (ChU) s različitim udjelom 0.1 M NaOH (30 %, 40 % i 50 %). Raspon snage koji se koristio je bio od 100 do 300 W, a vrijeme od 3 do 9 minuta. Nakon provedenih ekstrakcija analizirane su koncentracije SDG-a, glukozida *p*-kumarinske kiseline te glukozida ferulinske kiseline, a dobiveni rezultati su prikazani grafičkim prikazima. Statističkom analizom su uspoređeni utjecaj vremena, udjela 0,1 M NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala i snage mikrovalova na koncentraciju pojedinog detektiranog spoja. Statistički značajni odnosi prikazani su grafički ($p \leq 0.05$).

Energija mikrovalova je neionizirajuće elektromagnetsko zračenje koje uzrokuje molekularno gibanje, migracijom iona i rotacijom dipola, ali ne utječe na molekularne strukture (Chemat i sur., 2004). U prisutnosti polarnih molekula ili ionskih vrsta koje apsorbiraju zračenje, mikrovalna ekstrakcija omogućava brzu raspodjelu energije u otapalu što dovodi do brzog zagrijavanja ukupnog volumena otapala zbog međumolekulskih sudara. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks i na taj način poboljšava ekstrakciju. Ekstrakcija potpomognuta energijom mikrovalova se provodi pri atmosferskom tlaku te pruža poboljšanja u vidu smanjene potrošnje otapala te skraćanja vremena trajanja ekstrakcije (Beejmohun i sur., 2007). Izbor otapala ovisi o topljivosti ciljanih komponenti i o interakcijama između otapala i biljnog materijala, ali također i o sposobnosti otapala za apsorpciju energije mikrovalova koja je određena dielektričnom konstantom otapala. Cilj eksperimenta je bio odabir najpogodnijeg eutektičkog otapala, koje bi moglo zamijeniti štetna organska otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva te odabir najpovoljnijih parametara ekstrakcije. Odabir najboljih parametara ekstrakcije i otapala za diglukozid *p*-kumarinske kiseline, diglukozid ferulinske kiseline i SDG prikazani su Slikama 5, 6 i 7.

U svom radu Cvjetko Bubalo i suradnici (2016) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva pokožice grožđa pomoću različitih eutektičkih otapala i uz primjenu učinkovite metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Koncentracija ekstrahiranih spojeva se razlikovala ovisno o primijenjenom otapalu i primijenjenim uvjetima provedbe postupka ekstrakcije. Najviše koncentracije ukupnih fenolnih spojeva su postignute sa smjesom otapala

kolin klorid-oksalne kiseline i 25 % vode, koje se pokazalo kao najpogodnije otapalo u usporedbi s ostalim eutektičkim otapalima, vodom i metanolom, zbog toga što su DES-ovi na bazi organskih kiselina polarniji, što je važno pri ekstrakciji antocijana. Ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom postignut je najveći prinos ukupnih fenolnih spojeva, što se pokazalo kao učinkovitija metoda u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju te mnogo učinkovitija metoda od konvencionalnih metoda ekstrakcije. Također autori u radu navode kako povećana temperatura i duže vrijeme provedbe ultrazvučne ekstrakcije pogoduju ekstrakciji fenolnih spojeva.

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



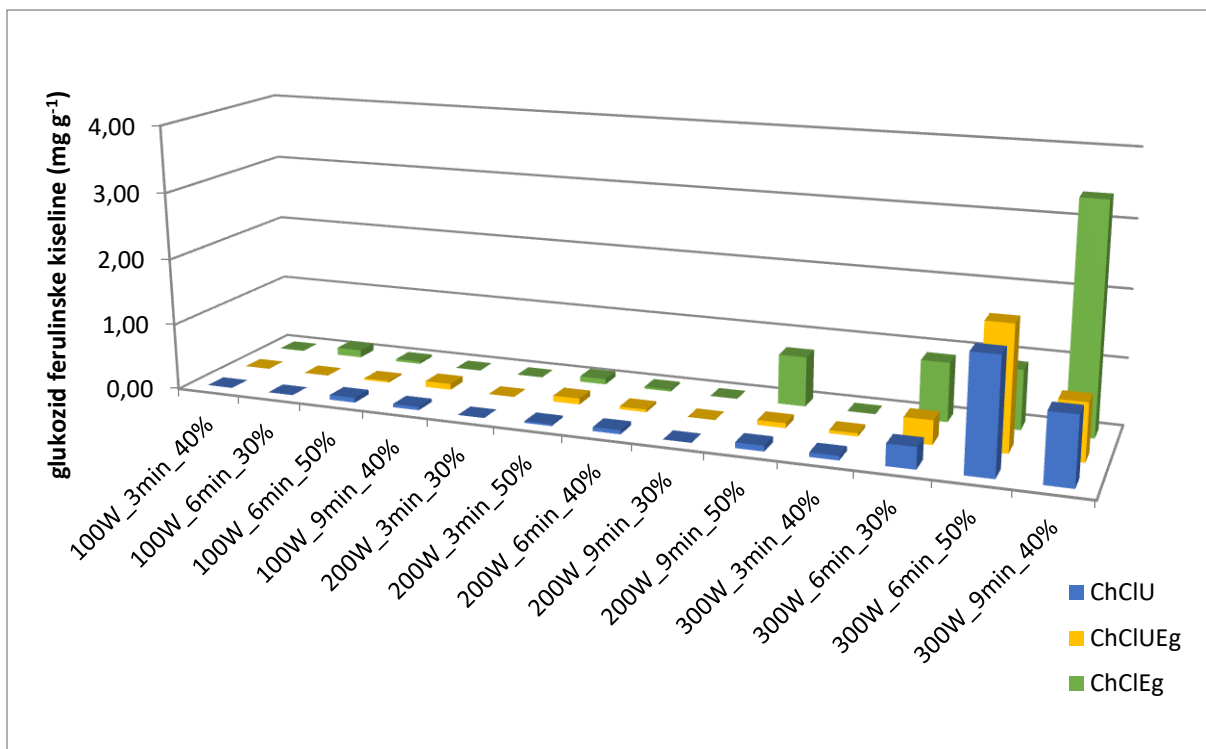
Slika 5. Koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima proizvedenim ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom uz primjenu različitih eutektičkih otapala

Koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline su prikazane grafom (Slika 5) te je vidljivo kako je najveća koncentracija ($8,50 \text{ mg g}^{-1}$) postignuta primjenom ChClEg uz tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH. Zatim slijedi ekstrakcija primjenom otapala ChClUEg i tretmanom snage 300 W u trajanju 6 minuta i uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH u kojoj je izdvojena koncentracija od $4,54 \text{ mg g}^{-1}$. Pri istom tretmanu snage 300W u trajanju 6 minuta uz primjenu otapala ChClU i dodatak 50 % 0,1 M NaOH postignuta je i koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $4,29 \text{ mg g}^{-1}$.

Također zamjetne koncentracije su postignute i tretmanima snage 300 W u trajanju 6 minuta uz dodatak 30 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChClEg ($2,31 \text{ mg g}^{-1}$), ChClUEg ($1,05 \text{ mg g}^{-1}$) i ChClU ($1,05 \text{ mg g}^{-1}$). Tretmanom snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChClUEg ($2,25 \text{ mg g}^{-1}$) i ChClU ($2,65 \text{ mg g}^{-1}$), kao i tretmanom snage 200 W u trajanju 9 uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChClEg ($1,98 \text{ mg g}^{-1}$) i tretmanom 300 W i 6 minuta uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChClEg ($2,28 \text{ mg g}^{-1}$).

Druge vrijednosti koncentracija izoliranih spojeva pri svim drugim tretmanima uz uporabu sve tri vrste otapala su zanemarive.

Sve dobivene vrijednosti su značajno niže od vrijednosti koncentracije dobivene referentnom metodom koja iznosi $17,77 \text{ mg g}^{-1}$.



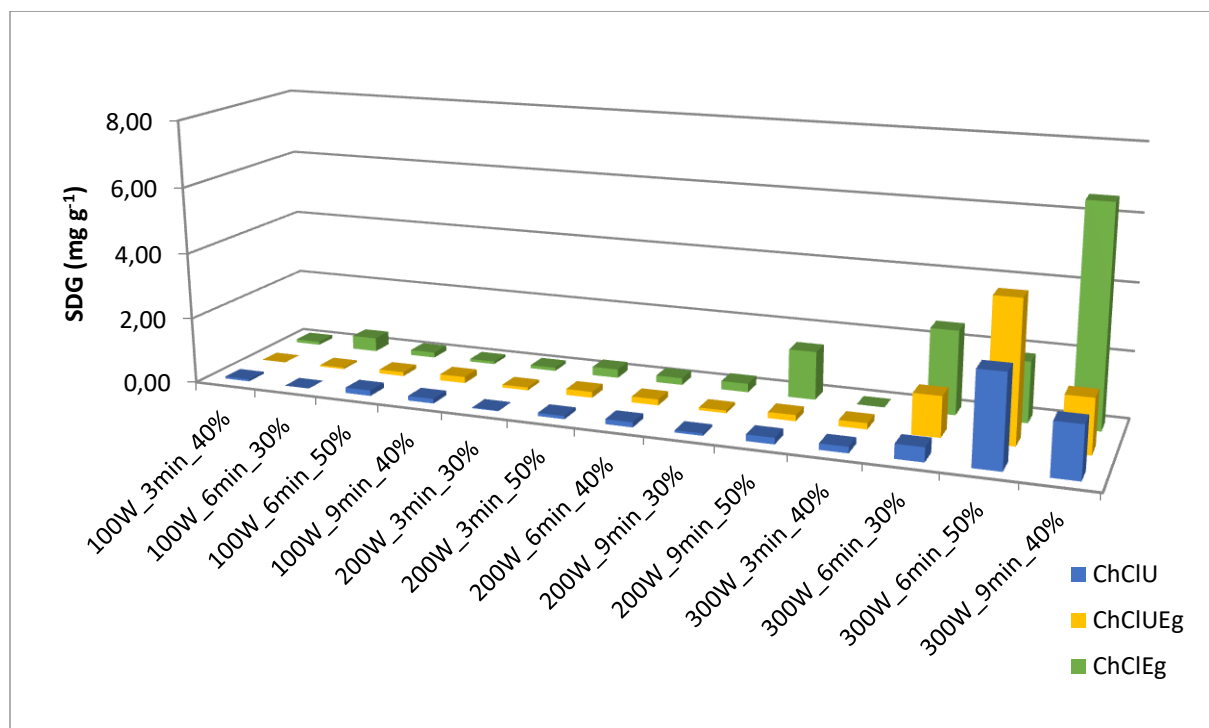
Slika 6. Koncentracija glukozida ferulinske kiseline u ekstraktima proizvedenim ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom uz primjenu različitih eutektičkih otapala

Grafičkim prikazom (Slika 6) prikazane su koncentracije glukozida ferulinske kiseline te je vidljivo kako je najveća koncentracija ($3,39 \text{ mg g}^{-1}$) izolirana primjenom ChCIEg uz tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH. Zatim slijedi ekstrakcija tretmanom snage 300 W u trajanju 6 minuta uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenom otapala ChCIUEg pomoću kojeg je izolirana koncentracija od $1,84 \text{ mg g}^{-1}$. Pri istom tretmanu uz primjenu otapala ChCIU izolirana je i koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline od $1,70 \text{ mg g}^{-1}$.

Manje koncentracije izolirane su tretmanima snage 300 W u trajanju 6 minuta uz dodatak 30 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg ($0,88 \text{ mg g}^{-1}$), ChCIUEg ($0,36 \text{ mg g}^{-1}$) i ChCIU ($0,32 \text{ mg g}^{-1}$). Tretmanom snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIUEg ($0,85 \text{ mg g}^{-1}$) i ChCIU ($1,01 \text{ mg g}^{-1}$), tretmanima snage 200 W u trajanju 9 uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg ($0,75 \text{ mg g}^{-1}$) i tretmanom 300 W i 6 minuta uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg ($0,89 \text{ mg g}^{-1}$).

Druge vrijednosti koncentracija izoliranih spojeva pri svim drugim tretmanima uz uporabu sve tri vrste otapala su zanemarive.

Sve dobivene vrijednosti su značajno niže od vrijednosti koncentracije dobivene referentnom metodom koja iznosi 6,99 mg g⁻¹.



Slika 7. Koncentracija SDG-a u ekstraktima proizvedenim ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom uz primjenu različitih eutektičkih otapala

Koncentracija SDG-a kao najzastupljenijeg fenolnog spoja u pogači lana prikazana je grafički, Slikom 7 te je vidljivo kako je najveća koncentracija (6,55 mg g⁻¹) izolirana primjenom otapala ChClEg uz tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH. Zatim slijedi ekstrakcija primjenom otapala ChClUEg i tretmanom snage 300 W u trajanju 6 minuta i uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH u kojoj je izolirana koncentracija od 4,20 mg g⁻¹. Nešto niža vrijednost koncentracije 2,74 mg g⁻¹ izolirana je pri istom tretmanu uz primjenu otapala ChClU.

Niže vrijednosti koncentracija izolirane su pri tretmanu snage 300 W u trajanju 6 minuta uz dodatak 30 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChClEg (2,52 mg g⁻¹). Također zamjetne

koncentracije su izolirane i tretmanima snage 300 W u trajanju 6 minuta uz dodatak 30 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIUEg (1,22 mg g⁻¹) i ChCIU (0,43 mg g⁻¹). Tretmanom snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIUEg (1,63 mg g⁻¹) i ChCIU (1,56 mg g⁻¹), tretmanima snage 200 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg (1,46 mg g⁻¹) i tretmanom 300 W i 6 minuta uz dodatak 50 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg (1,82 mg g⁻¹).

Pri svi drugim tretmanima uz uporabu sve tri vrstge otapala dobivene su zanemarive vrijednostima koncentracija izoliranih spojeva

Sve dobivene vrijednosti su značajno niže od vrijednosti koncentracije dobivene referentnom metodom koja iznosi 16,64 mg g⁻¹.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako se koncentracije SDG-a, glukoziida *p*-kumarinske kiseline i glukoziida ferulinske kiseline značajno razlikuju ovisno o korištenim parametrima ekstrakcije i primijenjenim otapalima. Najpogodniji tretman i otapalo za ekstrakciju sva tri fenolna spoja iz pogače lana je tretman snage 300 W u trajanju 9 minuta uz dodatak 40 % 0,1 M NaOH i primjenu otapala ChCIEg.

Lignani su kompleksni spojevi koji tvore dimerne, trimerne ili oligomerne strukture. SDG u sjemenu lana je dio oligomerne strukture, lignan makromolekula ili lignan kompleks, esterski povezan s 3-hidroksi-3-metilglutarnom kiselinom (HMGA). Uz SDG dio lignan kompleksa su i flavonoid herbacetin diglukozid (HDG), glukozid *p*-kumarinske kiseline i glukozid ferulinske kiseline (Struijs i sur., 2009). Alkalnom hidrolizom lignan kompleksa dolazi do njihovog oslobađanja, a dodatna enzimaska ili kiselinska hidroliza je potrebna za dobivanje slobodnog aglikona SECO od glukoziida SDG-a (Nemes i Orsat, 2012).

Istraživanja su pokazala kako udio NaOH koji se koristi pri ekstrakciji lignana iz pogače, a čija je uloga kidanje esterskih veza unutar lignanskog kompleksa, uvelike utječe na prinos ekstrakcije. Također korišteni udio NaOH je pokazatelj čvrstoće veza između sastavnica lignanskog kompleksa (Beejmohun i sur., 2007). S obzirom da je veliki problem standardne metode izolacije lignana dugotrajna ekstrakcija zbog vrlo složene strukture lignana, znanstvenici su se okrenuli suvremenijim metodama ekstrakcije pomoću mikrovalova.

Za razliku od lana, druge uljarice kao što su soja i maslina pokazuju visok udio slobodnih fenolnih spojeva koji se mogu ekstrahirati jednostavnijim metodama ekstrakcije vodom i metanolom (Alu'datt, 2013). Istraživanja su pokazala i kako je primjenom mikrovalne

ekstrakcije iz sjemena i pogače sezama, chia-e i suncokreta ekstrahirani veći udio fenolnih spojeva od onog ekstrahiranog referentnim metodama (Nemes i Orsat, 2012).

Nemes i Orsat (2011) navode kako vremensko trajanje i uspješnost izolacije lignana ovisi o primijenjenoj metodi. S obzirom na njihovu vrlo kompleksnu i složenu strukturu potrebno je provesti alkalnu hidrolizu kako bi popucale esterske veze između lignanskih glukozida i 3-hidroksi-3-metil glutarila (HMG) te kako bi se oslobodio SDG iz lignanskog kompleksa. Također navode kako se alkoholnom ekstrakcijom mogu izolirati velike količine lignana, ali ta metoda iziskuje dugo vrijeme ekstrakcije te su lignani izolirani alkoholnom ekstrakcijom vezani u polimerne komplekse koje je potrebno hidrolizirati. Istraživanja su pokazala kako se primjenom mikrovalne ekstrakcije znatno smanjuje trajanje te se povećavaju prinosi ekstrakcije.

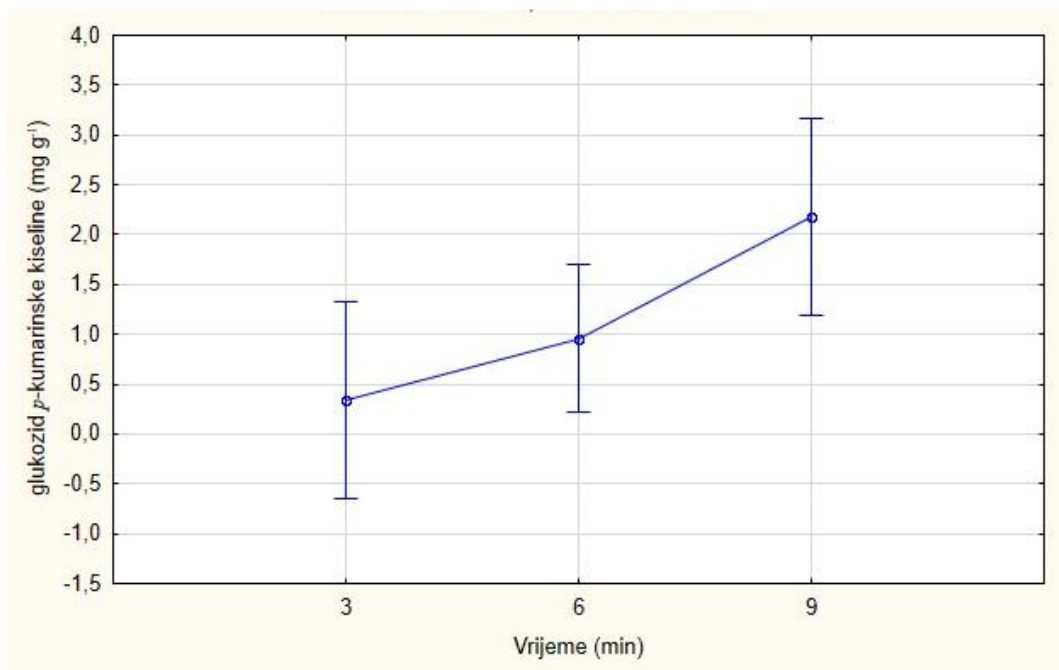
U radu Rakuljić (2017) provedena je izolacija fenolnih spojeva ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom uz primjenu eutektičkog otapala kolin klorid:urea:glicerol (ChClUGly), pri različitim parametrima (snaga, vrijeme i molarna koncentracija NaOH). U radu su dobivene sljedeće vrijednosti: najveća koncentracija SDG-a ($3,25 \text{ mg g}^{-1}$) i glukozida *p*-kumarinske kiseline ($4,34 \text{ mg g}^{-1}$) izolirana je s 40 % 0,1 M NaOH pri snazi mikrovalova 200 W tijekom 6 minuta, dok je najveća koncentracija glukozida ferulinske kiseline ($2,35 \text{ mg g}^{-1}$) izolirana s 50 % 0,1 M NaOH pri 200 W tijekom 3 minute.

U ovom radu dobivene su veće koncentracije svih izoliranih fenolnih spojeva ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom u odnosu na rad Rakuljić (2017). Dobivene su dvostruko više vrijednosti koncentracija ciljanih fenolnih spojeva pri dužem tretmanu (9 minuta) i većoj primijenjenoj snazi (300 W) te uz udjelu 0,1 M NaOH u smjesi eutektičkih otapala 40 %. U odnosu na provedenu referentnu metodu, u kojoj je korištena smjesa otapala 70 % metanola i 30 % 0,1 M NaOH, ultrazvučno-mikrovalnom metodom uz primjenu eutektičkih otapala uspješno je ekstrahirano 48 % glukozida *p*-kumarinske kiseline, 48 % glukozida ferulinske kiseline i 39 % SDG-a, uz glavnu prednost primjene za okoliš manje štetnog otapala.

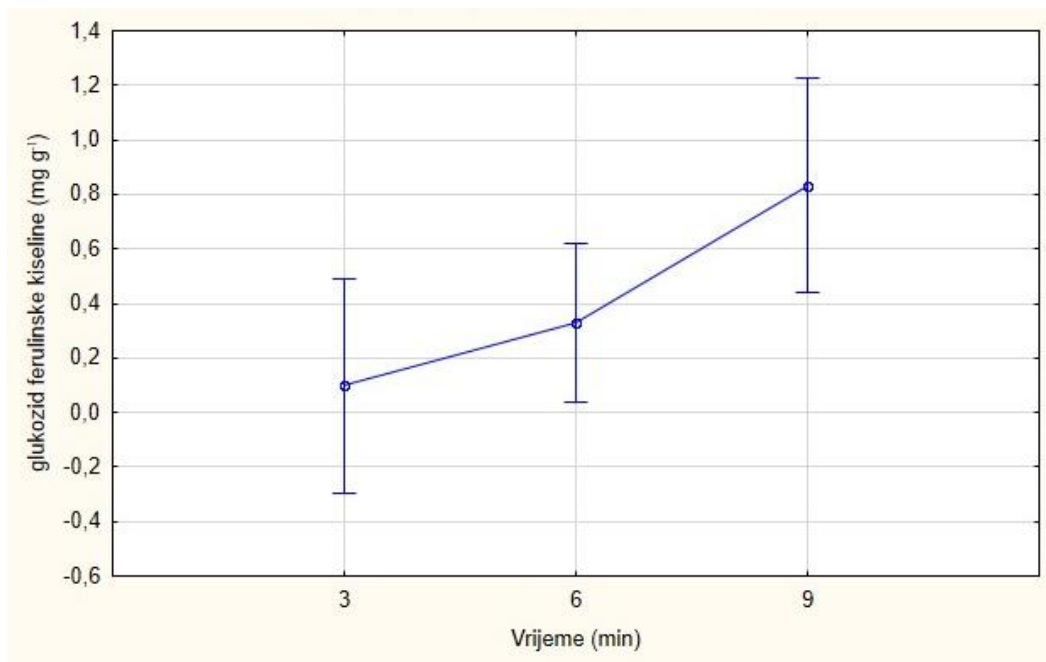
Provedenim istraživanjem nisu dobiveni željeni rezultati, odnosno dobivene koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva su manje u odnosu na koncentracije izolirane standardom metodom. Razlog nižih koncentracija fenolnih spojeva može biti prekratko vrijeme ekstrakcije pri čemu nije moglo doći do potpunog pucanja esterskih veza u makromolekulskom lignanskom kompleksu te tako niti do potpunog oslobađanja SDG-a iz kompleksa. Razlog nižih koncentracija ekstrahiranih fenolnih spojeva može biti i u toplinskoj

degradaciji fenolnih spojeva uslijed porasta temperature pod utjecajem mikrovalova (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

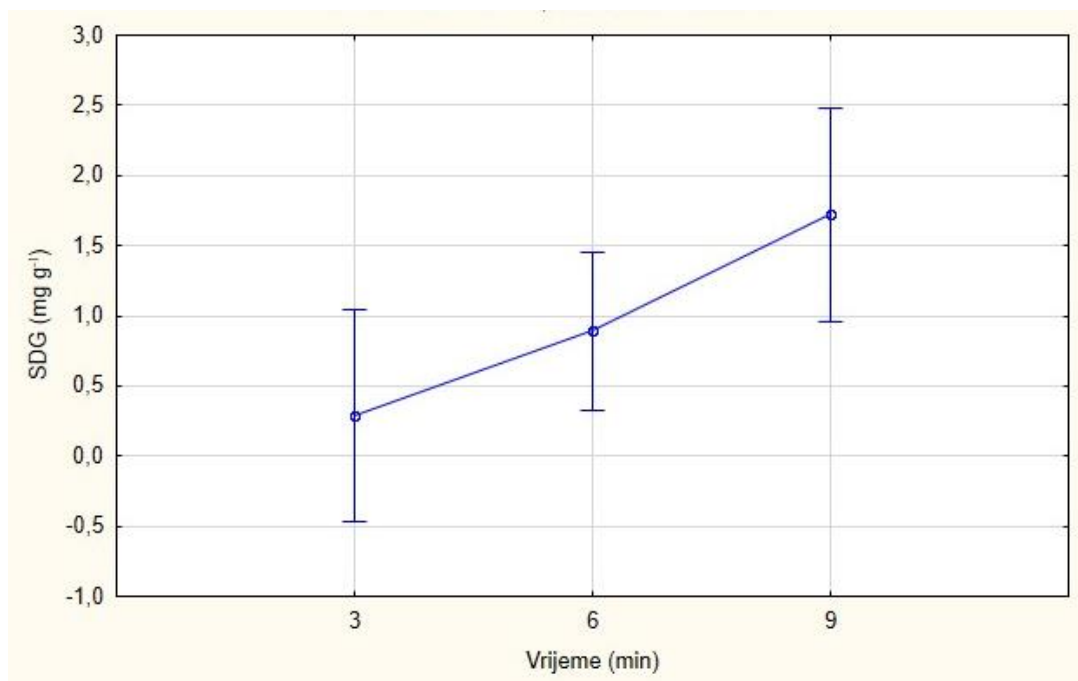
Rezultati ovog istraživanja su statistički obrađeni te je grafičkim prikazima dana statistička analiza utjecaja vremena, udjela 0,1 M NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala i snage mikrovalova na koncentraciju pojedinog detektiranog spoja. Statistički značajni odnosi prikazani su grafički ($p \leq 0.05$).



Slika 8. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)



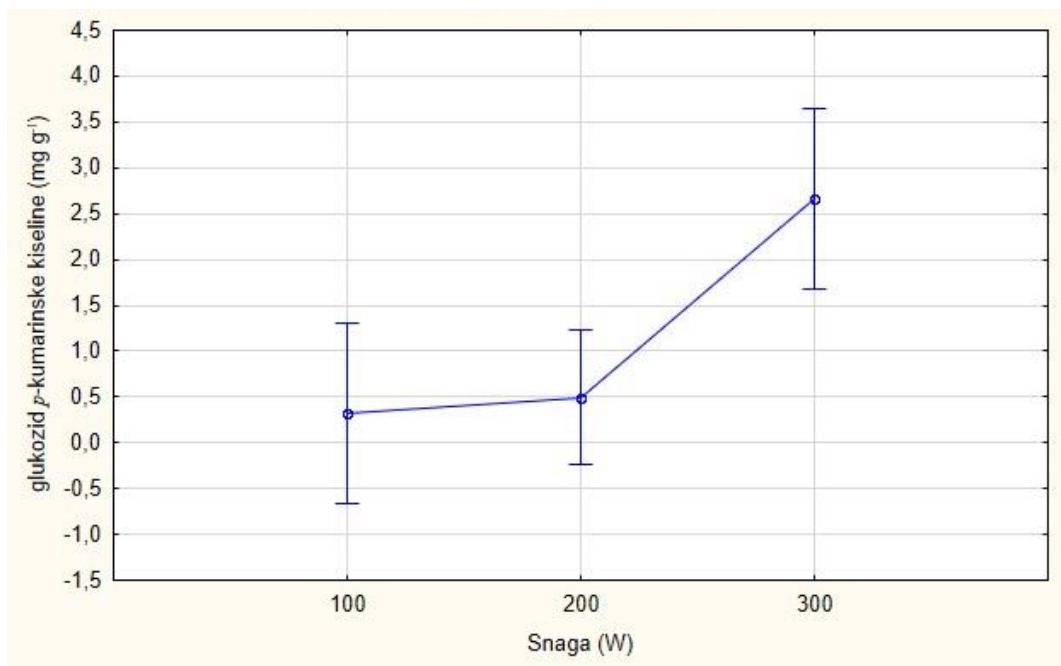
Slika 9. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)



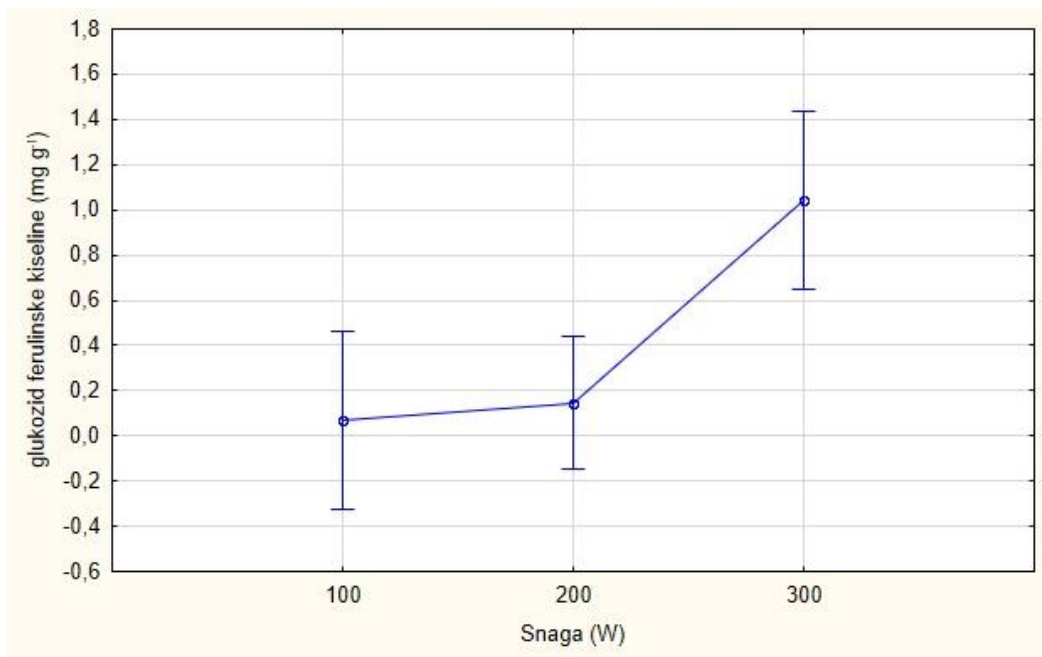
Slika 10. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)

U navedenim grafovima (Slika 8, 9 i 10) prikazana je ovisnost koncentracije, glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o vremenu trajanja ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg, koja je dobivena analizom varijance. Uočena je značajna ovisnost koncentracije ekstrahiranih spojeva o vremenu trajanja postupka. Uspoređujući koncentracije nakon 3, 6 i 9 minuta ekstrakcije vidljivo je kako koncentracije približno linearno rastu te dostižu najveće vrijednosti nakon 9 minuta tretmana.

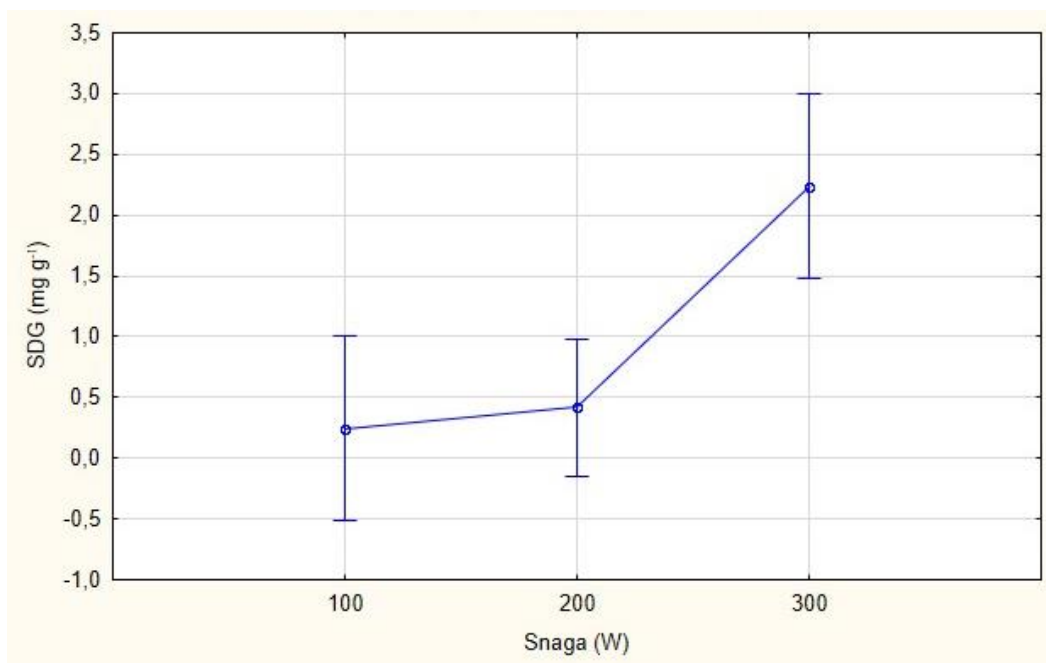
U radu Rakuljić (2017) analizom varijance ovisnosti koncentracije SDG-a, GPK-a i GFK-a o vremenu trajanja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom i uz primjenu eutektičkog otapala ChClUGly uočena je značajna ovisnost koncentracije ekstrahiranih spojeva o vremenu trajanja postupka, neovisno o snazi mikrovalova. U radu se koncentracija SDG-a povećavala s produljenjem vremena, razlike nakon 3 i 6 minuta ekstrakcije su bile beznačajne, ali je došlo do značajnog povećanja koncentracije nakon 9 minuta ekstrakcije. Koncentracije GPK-a i GFK-a se nasuprot tome smanjivala produljenjem vremena trajanja ekstrakcije uz male razlike nakon 3 i 9 minuta, ali uz značajan pad koncentracije nakon 9 minuta ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije.



Slika 11. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)

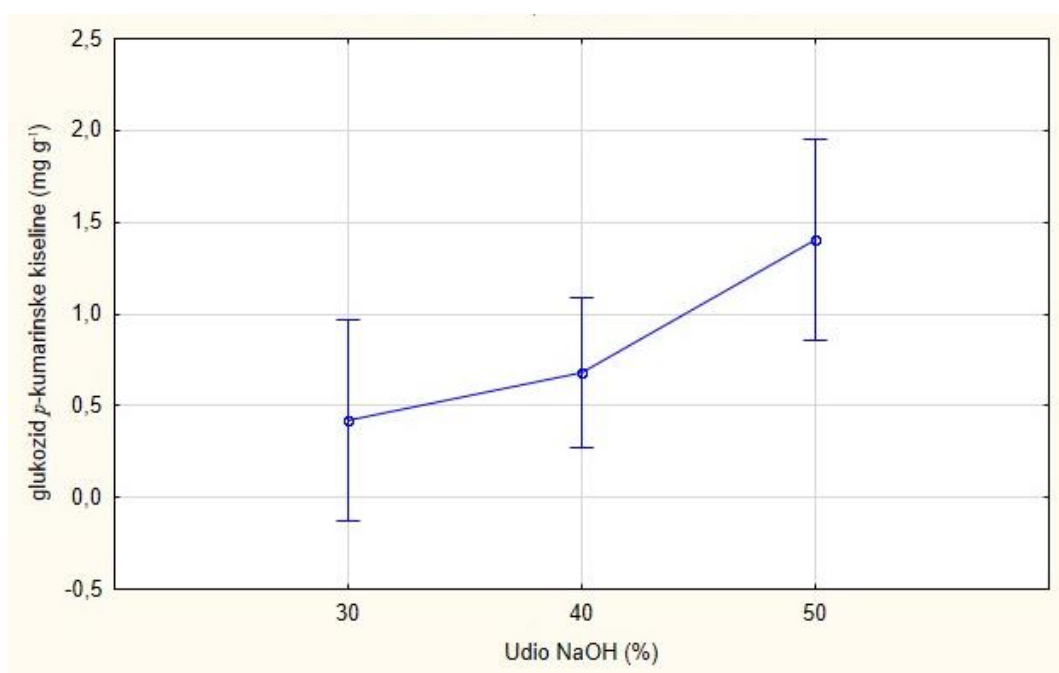


Slika 12. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)

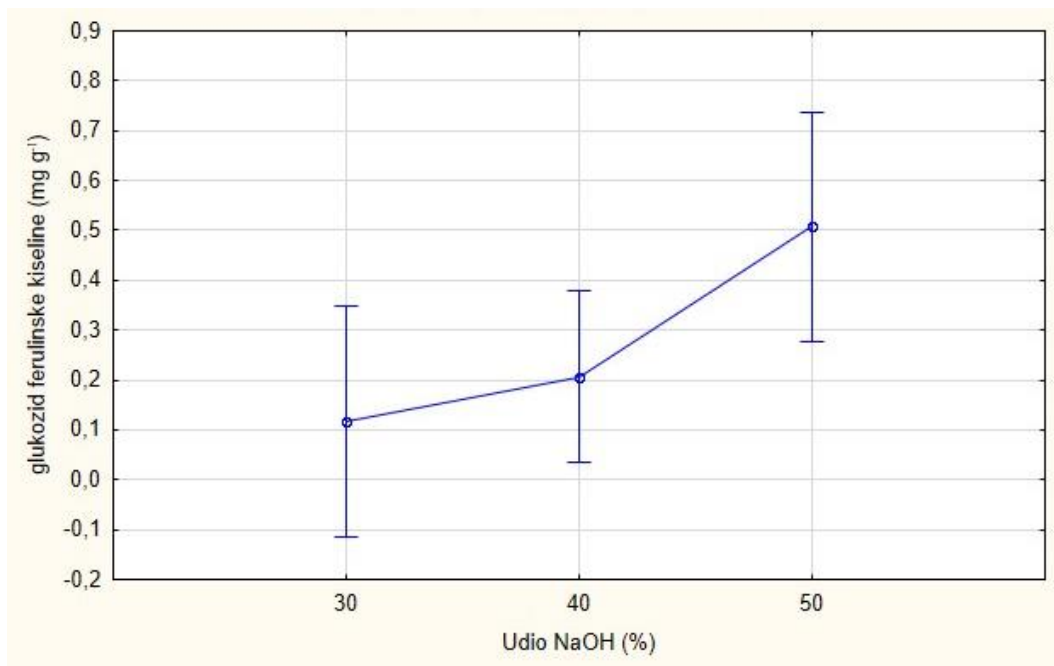


Slika 13. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg ($p \leq 0,05$)

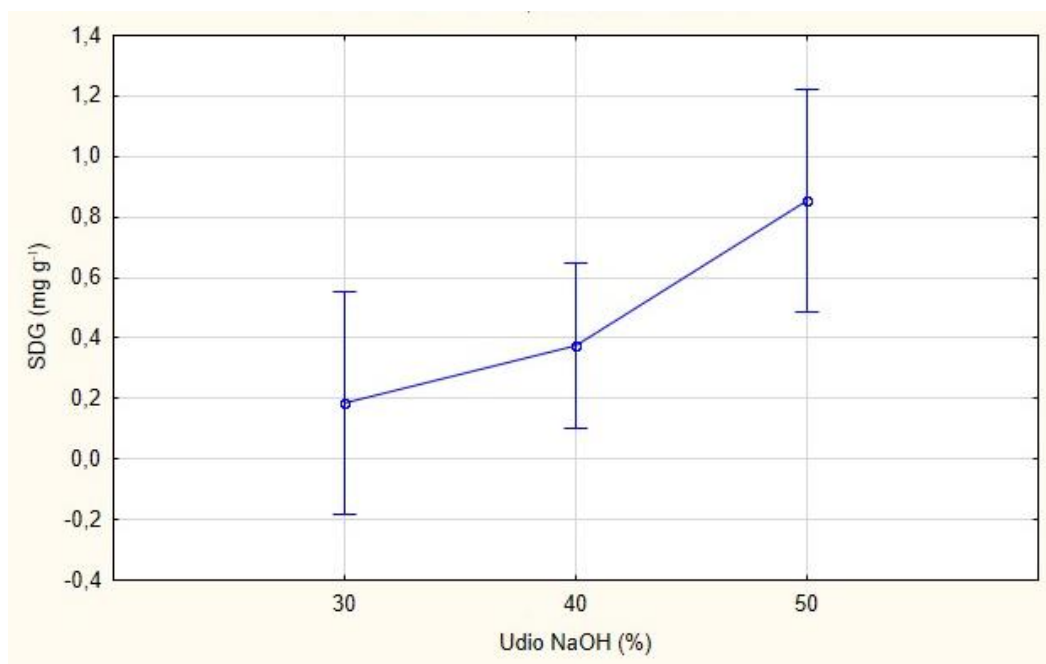
Analiza varijance (Slika 11, 12 i 13) pokazuje značajnu ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClEg korištenog pri ekstrakciji. Uočeno je kako se koncentracija sva tri spoja povećava i dostiže najveću vrijednost koncentracije tretmanom snage 300 W. Razlike u koncentracijama spojeva izoliranih pri tretmanima snage 100 W i 200 W su male, ali se značajno razlikuju od koncentracija dobivenih nakon tretmana snage 300 W.



Slika 14. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClU korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)



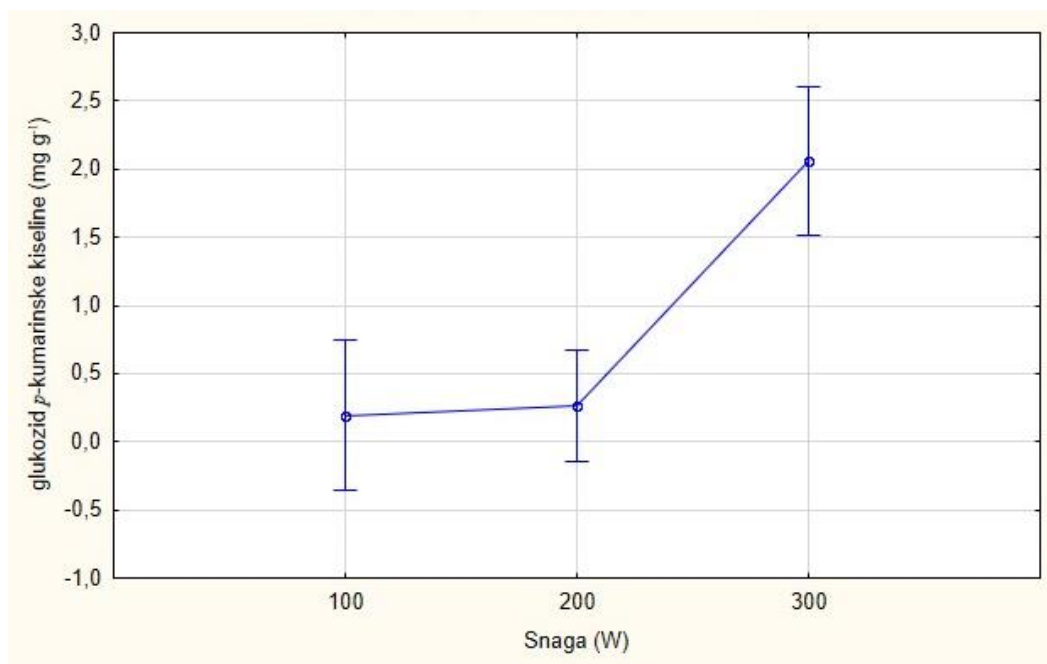
Slika 15. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClU korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)



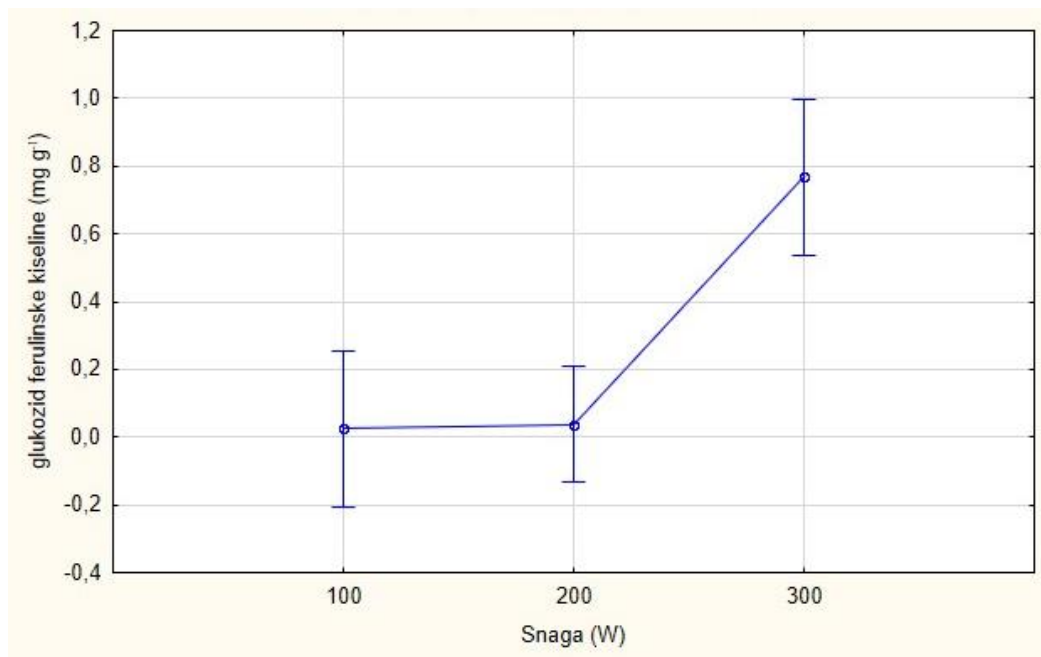
Slika 16. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClU korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)

Analiza varijance (Slika 14, 15 i 16) pokazuje ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChCIU korištenog pri ekstrakciji. Uočena je značajna ovisnost koncentracije izoliranih spojeva o udjelu NaOH u sastavu eutektičkog otapala. Usporedbom rezultata vidljivo je kako se prinos ekstrakcije ciljanih fenolnih spojeva, povećanjem udjela NaOH u sastavu eutektičkog otapala približno linearno povećava te spojevi dostižu svoju najveću koncentraciju pri udjelu NaOH od 50 %.

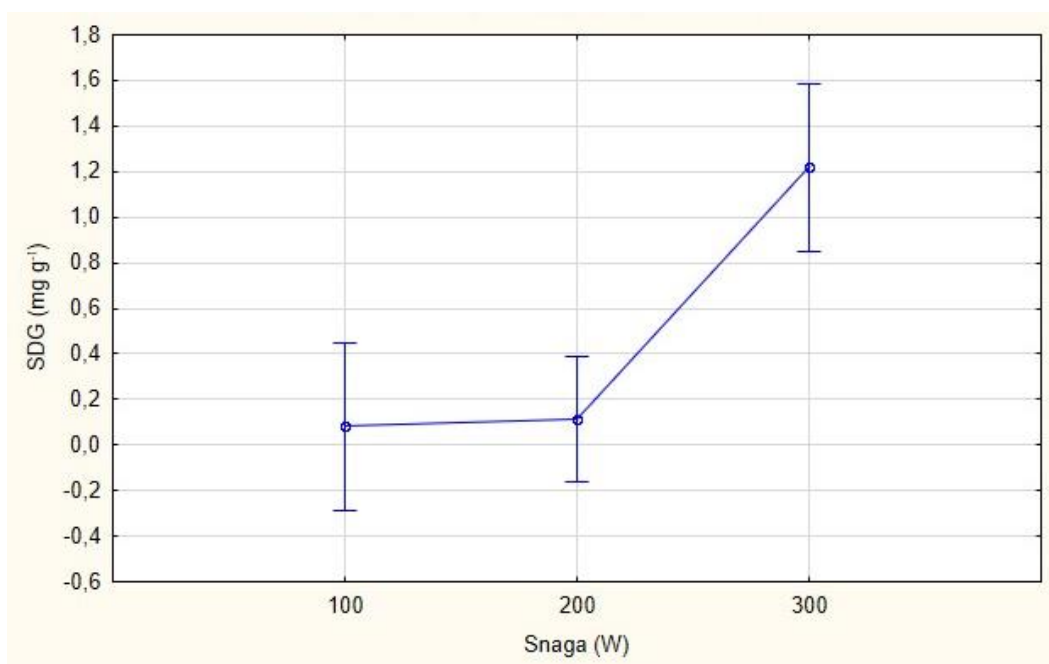
U radu Rakuljić (2017) analizom varijance ovisnosti koncentracije GPK-a i GFK-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChCIUGly korištenog pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz pogače lana, uočeno je da se koncentracija fenolnih kiselina povećava s povećanjem udjela NaOH. Najveće vrijednosti koncentracije fenolnih kiselina dobivaju se pri udjelu NaOH 50 %. Također u radu se ovisnost koncentracije SDG-a o udjelu NaOH pokazala statistički beznačajnom.



Slika 17. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu otapala ChCIU ($p \leq 0,05$)

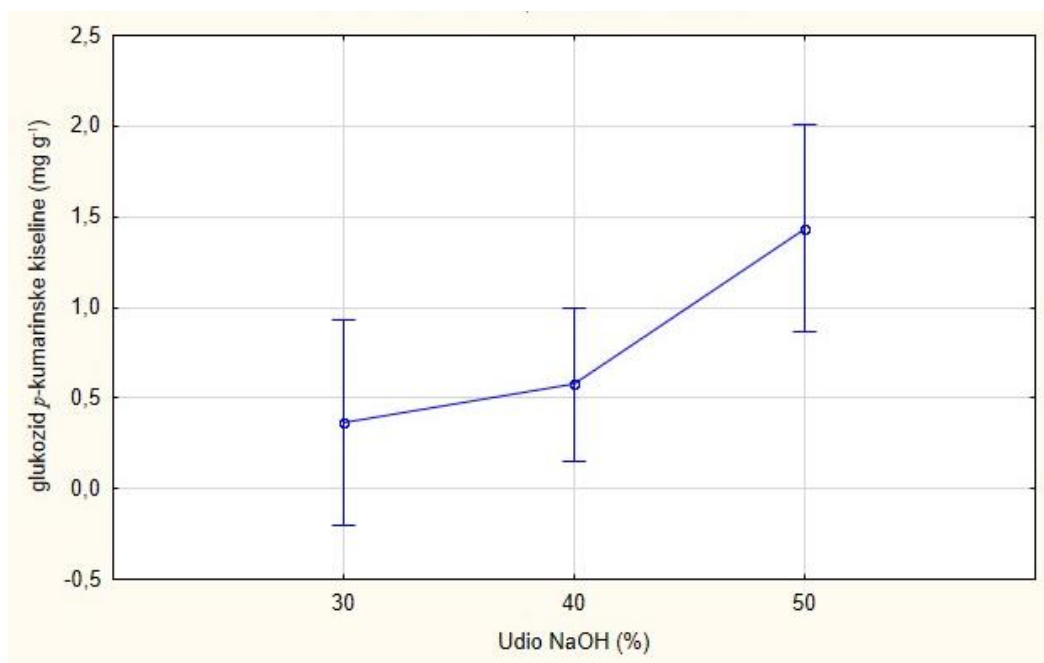


Slika 18. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu otapala ChCIU ($p \leq 0,05$)

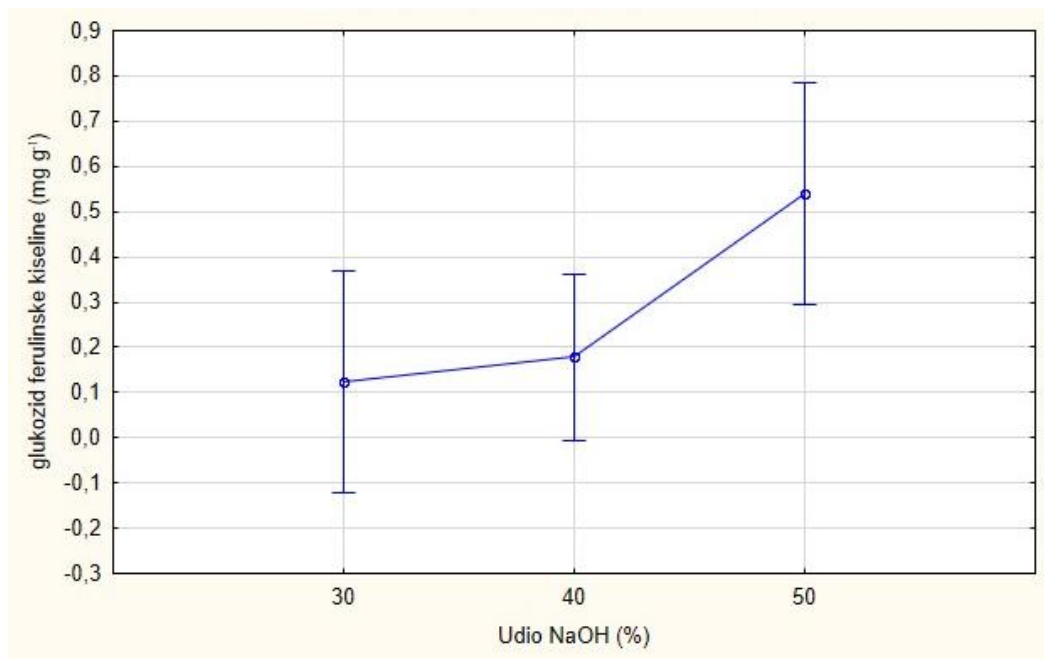


Slika 19. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu otapala ChCIU ($p \leq 0,05$)

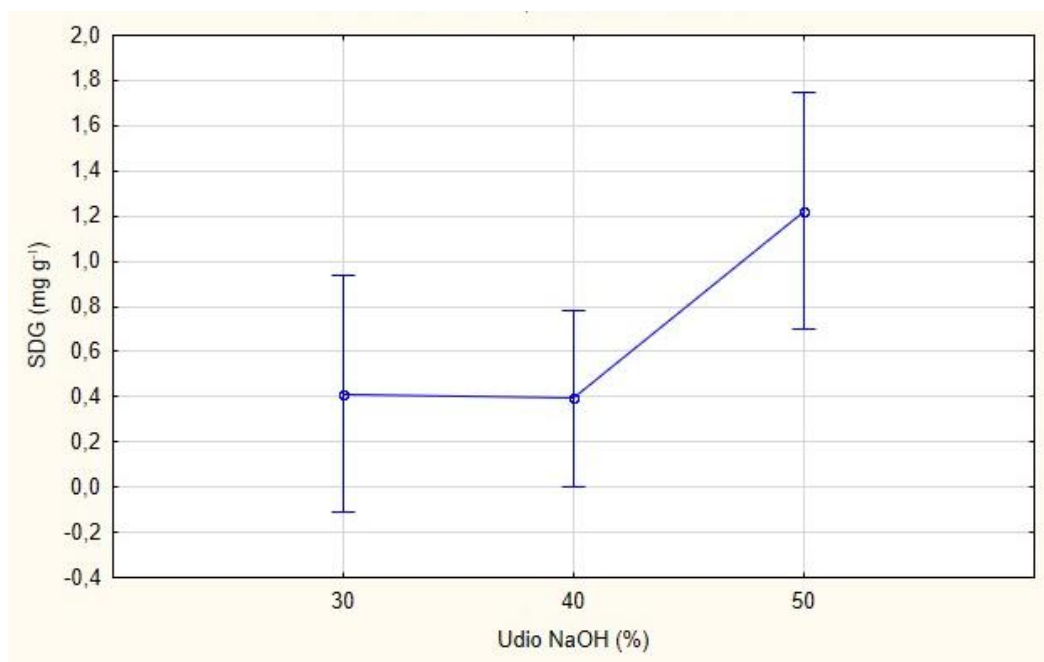
Analiza varijance (Slika 17, 18 i 19) pokazuje značajnu ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChCIU korištenog pri ekstrakciji. Uočeno je kako pri tretmanima snage 100 W i 200 W dolazi do minimalnog povećanja koncentracije sva tri spoja, dok pri tretmanu 300 W dolazi do značajnog povećanja i dostizanja najveće koncentracije izoliranih ciljanih fenolnih spojeva pogače lana



Slika 20. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChCIUEg korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)

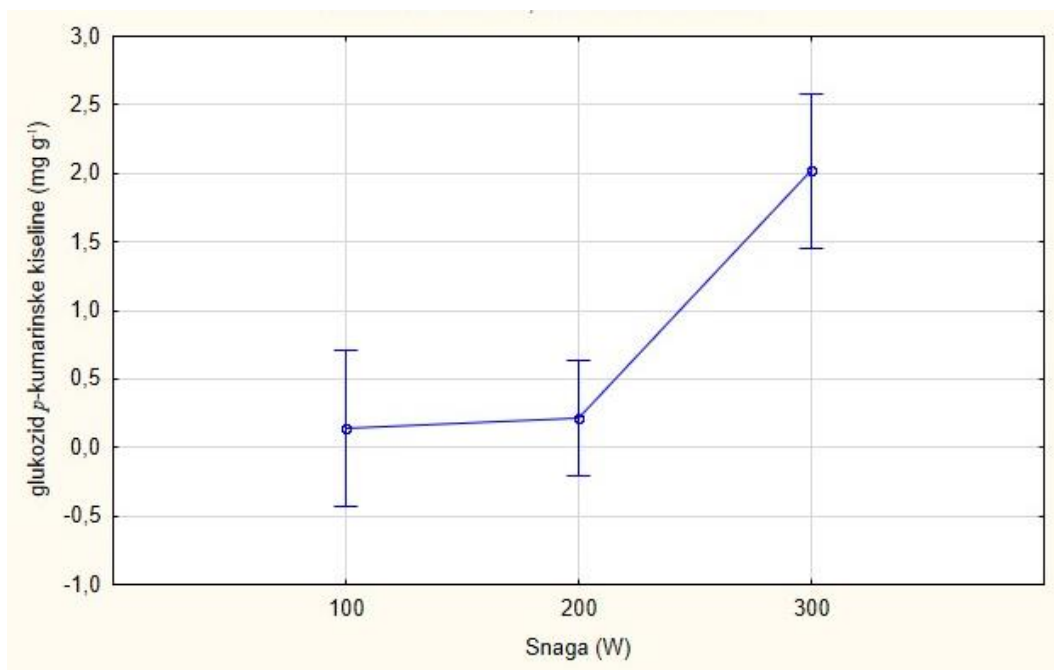


Slika 21. Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClUEg korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)

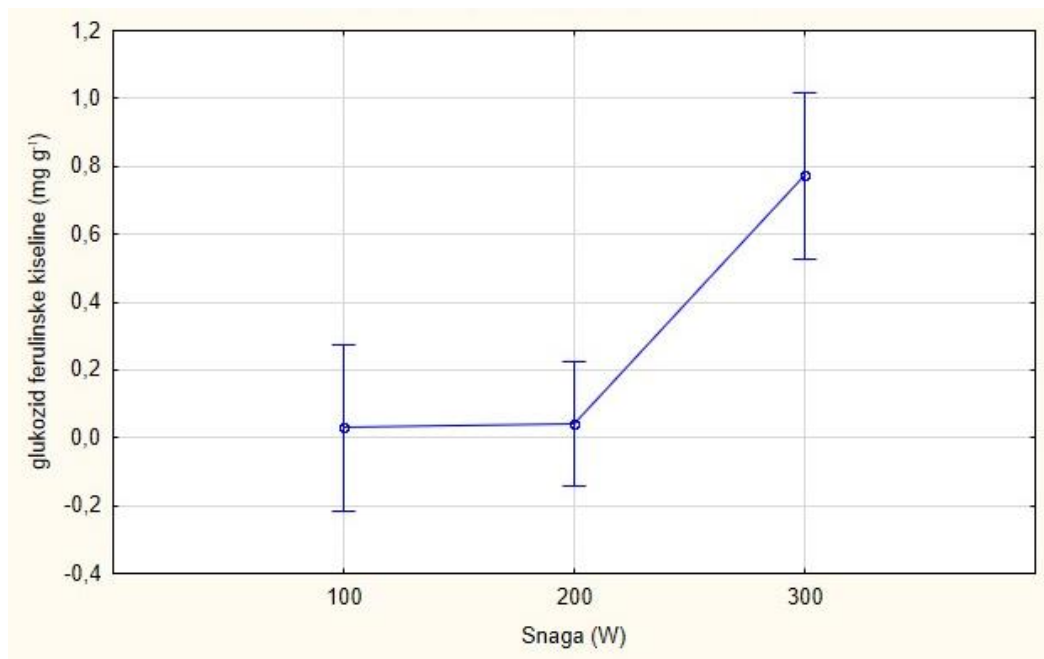


Slika 22 Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClUEg korištenog pri ekstrakciji ($p \leq 0,05$)

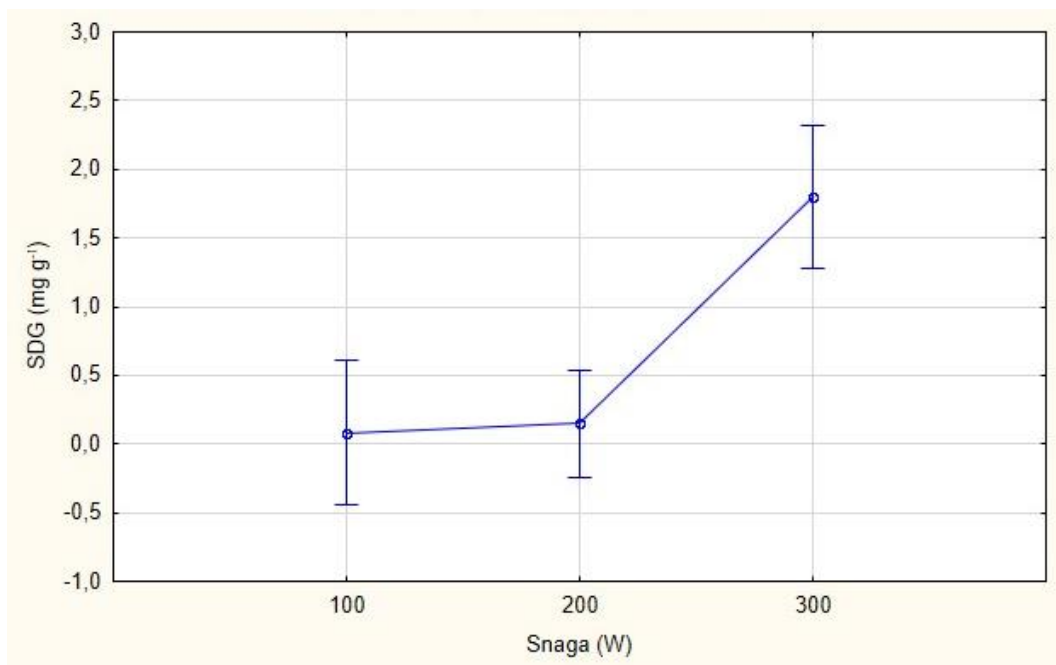
U navedenim grafovima (Slika 20, 21 i 22) prikazana je značajna ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o udjelu NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClUEg korištenog pri ekstrakciji, koja je dobivena analizom varijance. Koncentracija izoliranih fenolnih kiselina iz pogače lana raste povećanjem udjela NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala te postiže svoju najveću vrijednost pri udjelu NaOH od 50 %. Nasuprot tome koncentracija SDG-a pri udjelima NaOH u sastavu smjese eutektičkog otapala ChClUEg 30 % i 40 % stagnira te zatim počinje rasti i pri udjelu NaOH od 50 % dostiže najveću vrijednost.



Slika 23 Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClUEg ($p \leq 0,05$)



Slika 24 Analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozyda ferulinske kiseline o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClUEg ($p \leq 0,05$)



Slika 25. Analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChClUEg ($p \leq 0,05$)

Analiza varijance (Slika 23, 24 i 25) pokazuje značajnu ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, glukozida ferulinske kiseline i SDG-a o snazi tretmana ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije uz primjenu eutektičkog otapala ChCIUEg korištenog pri ekstrakciji. Uočeno je kako pri tretmanima snage 100 W i 200 W dolazi do minimalnog povećanja koncentracije sva tri spoja, dok pri tretmanu 300 W dolazi do značajnog povećanja i dostizanja najveće koncentracije izoliranih ciljanih fenolnih spojeva pogače lana

5. ZAKLJUČCI

1. Referentnom metodom, u kojoj je korištena smjesa otapala 70 % metanola i 30 % 0,1 M NaOH, u tretmanu snage 300 W nakon 9 minuta, dobivene su vrijednosti koncentracija SDG-a $16,64 \text{ mg g}^{-1}$, glukozida *p*-kumarinske kiseline $17,77 \text{ mg g}^{-1}$ i glukozida ferulinske kiseline $6,99 \text{ mg g}^{-1}$.
2. Od tri ispitivana eutektička otapala kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva pogače lana pokazalo se kolin klorid:etilen glikol u omjeru 1:2.
3. Ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom, najviše koncentracije fenolnih spojeva SDG-a ($6,55 \text{ mg g}^{-1}$), glukozida *p*-kumarinske kiseline ($8,50 \text{ mg g}^{-1}$) i glukozida ferulinske kiseline ($3,39 \text{ mg g}^{-1}$) izolirane su uz otapalo od 60 % ChClEg i 40 % 0,1 M NaOH pri snazi mikrovalova 300 W u trajanju 9 minuta.
4. Ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakcijom uz otapalo 60 % ChClEg i 40 % 0,1 M NaOH, ekstrahirano je 48 % koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, 48 % koncentracije glukozida ferulinske kiseline i 39 % koncentracije SDG-a u odnosu na koncentracije izolirane referentnom metodom

6. LITERATURA

Ali, S., Anwar, F., Ashraf, S., Talpur, F. N., Ashraf, M. (2009) Evaluation of canola seeds of different cultivars with special emphasis on the quantification of erucic acid and glucosinolates, *Grasas y aceites*. **60**, 89-95.

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

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

Anonymus 1 (2017) <https://www.google.hr/search?hl=hr&biw=1093&bih=494&tbm=isch&q=lan+biljka&sa=X&ved=0ahUKEwjbydCR1o_YAhXqBZoKHa5wCccQhyYIIg#img=c=n_li-IabLR4XjM> pristupljeno 16.12.2017.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.-A., Mesnard, F. (2007) Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochem. Anal.* **18**, 275-282.

Bloedon, L.T., Szapary, P.O., (2004) Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutr. Rev.* **62**, 18–27.

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

Coşkuner, Y., Karababa, E. (2007) Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* **78**, 1067-1073.

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

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

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

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod. Process.* **109**, 52-73.

Čukelj, N., Jakaša, I., Sarajlija, H., Novotni, D., Ćurić, D. (2011) Identification and quantification of lignans in wheat bran by gas chromatography - electron capture detection. *Talanta.* **84**, 127-132.

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

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

FAOSTAT (2018) Crops processed, FAOSTAT - Statistics Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <www.fao.org/faostat/en/#data/QD>. Pristupljeno 3. srpnja 2018.

Fliniaux, O., Corbin, C., Ramsay, A., Renouard, S., Beejmohun, V., Doussot, J., Falguieres, A., Ferroud, C., Lamblin, F., Laine, E., Roscher, A., Grand, E., Mesnard, F., Hano, C. (2014) Microwave-assisted extraction of herbacetin diglucoside from flax (*Linum usitatissimum* L.) seed cakes and Its quantification using an RP-HPLC-UV system. *Molecules* **19**, 3025-3037.

Grunvald, A. K., Carvalho, C. G. P. D., Leite, R. S., Mandarino, J. M. G., Andrade, C. A. D. B., Scapim, C. A. (2014) Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Acta Sci. Agron.* **36**, 233-237.

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

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

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

HRN EN ISO 665:2004 Uljarice -- Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

HRN EN ISO 659:2010 Uljarice -- Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).

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

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

Koubaa, M., Mhemdi, H., Vorobiev, E. (2016) Influence of canola seed dehulling on the oil recovery by cold pressing and supercritical CO₂ extraction. *J. Food Eng.* **182**, 18-25.

Krajčova, A., Schulzova, V., Hajšlova, J., Bjelkova, M. (2009) Lignans in flaxseed. *Czech J. Food Sci.* **27**, 252-255.

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

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

Litvischenko, V. L., Nikiforov, I. Y., Ershov, I. V. (2017) Remote measurement of sunflower seed moisture content by the use of microwaves. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 4880-4882.

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

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

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

Ogunronbi, O., Jooste, P.J., Abu, J.O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* **35**, 63-79.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* 41, Zagreb.

Pag, A.I., Radu, D.G., Draganescu D., Popa M.I., Sirghie C. (2014) Flaxseed cake – a sustainable source of antioxidant and antibacterial extracts. *Cell Chem. Technol.* **48**, 265-273.

Peng, X., Duan, M.H., Yao, X.H., Zhang, Y.H., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2015) Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **157**, 249-257.

Poeta, F. B., Rotundo, J. L., Borrás, L., Westgate, M. E. (2014) Seed water concentration and accumulation of protein and oil in soybean seeds. *Crop Sci.* **54**, 2752-2759.

Przybylski, R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6. izd., (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 281-301.

Punia, V.D., Raba, M. (2016) Nutritional and medicinal properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*). *Int. J. Farm Sci.* **6**, 213-226.

Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štrucelj, D. (2001) Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida, Durieux, Zagreb.

Rakujić B. (2017) Izolacija bioaktivnih spojeva iz lanene pogače pomoću novih tehnologija i eutektičkih otapala, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

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

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

Šimić, B., Popović, R., Sudarić, A., Rozman, A., Kalinović, I., Čosić, J. (2007) Influence of Storage Condition on Seed Oil Content of Maize, Soybean and Sunflower. *ACS.* **72**, 211-213.

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

- Teh, S, Niven, B.E., Bekhit, A. A., Carne, A., Birch, J (2015) Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology. *Food Sci.Biotechnol.* **24**, 1649-1659.
- van Doosselaere, P. (2013) Production of Oils. U: Edible Oil Processing, 2. izd., (Hamm, W., Hamilton, R. J., Calliauw, G., ured.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, str. 88-91.
- Zainal Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Natesan, J.S. (2017) New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents. *Anal. Chim. Acta.* **979**, 1-23.
- Zhang, Z.-S., Wang, L.-J., Li, D., Jiao, S.-S., Dong Chen, X., Mao, Z.-H. (2008) Ultrasound assisted extraction of oil from flaxseed. *Sep. Purif. Technol.* **62**, 192-198.
- Zhang, Q., Vigier, K.D., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends. Food. Sci. Technol.* **17**, 300-312
- Wang, H., Wang, J., Qiu, C., Ye, Y., Guo, X., Chen, G., Li, T., Wang, Y., Fu, X., Liu, R.H. (2016) Comparison of Phytochemical Profiles and Health Benefits in Fiber and Oil Flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.* **214**, 227-233.

IZJAVA IZVORNOSTI

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

Mia Ivanov

Mia Ivanov