

Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Šain, Adela

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:159:491416>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Adela Šain
1120/PI

**OPTIMIRANJE UVJETA
EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI
AKTIVNIH KOMPONENATA IZ
INDUSTRIJSKE KONOPLJE
(*Cannabis sativa* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Tamare Jurina te uz pomoć doc.dr.sc. Ane Jurinjak Tušek i doc.dr.sc. Maje Benković.

Neizmjerno se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Tamari Jurini na iskazanoj pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc.dr.sc. Maji Benković i doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na pomoći prilikom izvedbe ovog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, prijateljima i dečku na potpori tijekom čitavog mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENATA IZ INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

Adela Šain, 1120/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj temperature, otapala, brzine miješanja, vremena ekstrakcije i omjera tekuće i krute faze na fizikalna (vodljivost, TDS, pH, suha tvar) i kemijska (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodama) svojstva ekstrakata industrijske konoplje. Optimiranje procesa klasične ekstrakcije provedeno je metodom odzivnih površina (RSM), zajedno sa Box-Behnken dizajnom (BBD). Prema metodi odzivnih površina, optimalni uvjeti ekstrakcije bili su sljedeći: temperatura 45 °C, omjer tekuće i krute faze 30 mL g⁻¹, vrijeme ekstrakcije 25 min, brzina miješanja 500 rpm, udio etanola u vodi 25 %. Razvijeni su modeli višestruke linearne regresije, nelinearne regresije i lokalne linearne regresije, kao i umjetne neuronske mreže, za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata konoplje, na temelju procesnih parametara klasične ekstrakcije. Na temelju dobivenih koeficijenata determinacije, utvrđeno je kako se modeli lokalne linearne regresije mogu primijeniti za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata konoplje, za razliku od modela linearne i nelinearne regresije. Rezultati dobiveni primjenom umjetnih neuronskih mreža pokazali su se najpouzdanijim za predviđanje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ($R^2 = 0,978$).

Ključne riječi: industrijska konoplja, biološki aktivne komponente, ekstrakcija, optimiranje, modeliranje

Rad sadrži: 77 stranice, 20 slika, 13 tablica, 111 literaturnih 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. Tamara Jurina

Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek, doc.dr.sc. Maja Benković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
2. Doc.dr.sc. Tamara Jurina
3. Doc.dr.sc. Maja Benković
4. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* L.)

Adela Šain 1120/PI

Summary: The aim of this study was to investigate the influence of temperature, solvent, mixing speed, extraction time and liquid to solid ratio on physical (conductivity, total dissolved solids, pH, dry matter) and chemical (total polyphenols, antioxidant activity determined by DPPH and FRAP methods) properties of hemp extracts. Classical extraction process was optimized using Response Surface Methodology (RSM) coupled with Box-Behnken design (BBD). According to RSM, the optimal extraction conditions were as follows: $T = 45$ °C, liquid to solid ratio 30 mL g^{-1} , extraction time 25 min, mixing speed 500 rpm, ethanol content 25 %. Based on the extraction process parameters, multiple linear regression, nonlinear regression, piecewise linear regression and artificial neural networks models were developed for prediction of physical-chemical characteristics of hemp extracts. According to calculated determination coefficients, piecewise regression could be applied for prediction of physical and chemical characteristics of hemp extracts, unlike linear and nonlinear models. The results obtained using artificial neural networks have proven to be the most reliable for the prediction of antioxidant activity determined by DPPH method ($R^2 = 0.978$).

Keywords: industrial hemp, biologically active compounds, extraction, optimization, modelling

Thesis contains: 77 pages, 20 figures, 13 tables, 111 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. *Tamara Jurina*, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor, PhD. *Maja Benković*, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
2. PhD. *Tamara Jurina*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23 September, 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (<i>CANNABIS SATIVA</i> L.).....	2
2.1.1. Taksonomija i botanički pregled vrste <i>Cannabis sativa</i> L.....	2
2.1.2. Morfologija i primjena industrijske konoplje	4
2.2. OKSIDATIVNI STRES I ULOGA ANTIOKSIDANSA	6
2.3. FENOLNI SPOJEVI	8
2.3.1. Kemijski sastav industrijske konoplje.....	9
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	11
2.4.1. Ekstrakcija kruto-tekuće.....	12
2.5. METODA ODZIVNIH POVRŠINA.....	13
2.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci.....	17
3.1.2. Aparatura i pribor.....	17
3.1.3. Kemikalije	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenata.....	19
3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata	21
3.2.2.1. Mjerenje pH vrijednosti	21
3.2.2.2. Mjerenje vodljivosti (<i>S</i>) i ukupne otopljene tvari (<i>TDS</i>)	21
3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja	21
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom.....	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	24
3.2.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	24
3.2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	26
3.2.6. Statistička analiza i matematičko modeliranje.....	27
3.2.6.1. Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenata	27
3.2.6.2. Analiza varijance (ANOVA)	28
3.2.6.3. Analiza glavnih komponenata (eng. <i>Principal Component Analysis, PCA</i>)	28
3.2.6.4. Modeli višestruke linearne, nelinearne i lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje, pripremljeni postupkom klasične ekstrakcije	29
3.2.6.5. Umjetne neuronske mreže (<i>Artificial Neural Networks, ANN</i>).....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE DOBIVENIH POSTUPKOM KLASIČNE EKSTRAKCIJE	31
4.2. STATISTIČKA OBRADA MJERENIH PODATAKA.....	36
4.2.1. Rezultati optimiranja uvjeta pokusa klasične ekstrakcije s obzirom na kemijska i fizikalna svojstva	36
4.2.2. ANALIZA VARIJANCE (ANOVA).....	40
4.3. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA (ENG. <i>PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS</i> ,.....)	43

PCA)	43
4.4. MODELI LINEARNE, NELINEARNE I LOKALNE LINEARNE REGRESIJE ZA ODREĐIVANJE FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE, PRIPREMLJENI POSTUPKOM KLASIČNE EKSTRAKCIJE.....	45
4.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE (ANN).....	58
5. ZAKLJUČCI.....	65
6. LITERATURA.....	67

1. UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) se smatra jednom od najstarijih kultiviranih biljaka te je prisutna u svjetskoj civilizaciji i prati njezin napredak unazad 6 000 godina (Small i Cronquist, 1976; Obranović i Ozmec, 2014). Također, jedna je od prvih biljaka kojom se čovjek počeo služiti i za druge namjene, osim prehrambenih. Konoplja je zeljasta jednogodišnja biljka čijem rastu pogoduju različiti klimatski uvjeti diljem svijeta. Značajna antioksidacijska aktivnost konoplje dolazi od fenolnih spojeva odnosno flavonoida. Njezini se metaboliti mogu podijeliti na kanabinoidne (fitokanabinoidi) i nekanabinoidne (terpeni, ugljikohidrati, masne kiseline i njihovi esteri, amidi, amini, fitosteroli, fenolni spojevi) spojeve (Gazdek, 2014). Mnogi od navedenih spojeva imaju široki raspon ljekovitih karakteristika među kojima su protuupalna, antitrombotična, antiaritmička i antioksidacijska.

S obzirom na to da ekstrakcija predstavlja značajan korak u izolaciji i identifikaciji fenolnih spojeva te očuvanju njihove bioaktivnosti, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj procesnih parametara kao što su temperatura ekstrakcije, vrijeme trajanja ekstrakcije, omjer otapala i materijala koji se ekstrahira, brzine miješanja te udjela etanola u smjesi etanol/voda na učinkovitost klasične ekstrakcije bioaktivnih komponenata podrijetlom iz industrijske konoplje. Određena su fizikalna (vodljivost, ukupne otopljene tvari, pH, suha tvar) te kemijska (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost) svojstva ekstrakata konoplje. Primjenom metode odzivnih površina, zajedno sa Box-Behnken eksperimentalnim dizajnom dobiveni su optimalni uvjeti za provedbu procesa klasične ekstrakcije kruto-tekuće, s obzirom na analizirana fizikalna i kemijska svojstva dobivenih ekstrakata. Analiza varijance je korištena za procjenu utjecaja procesnih parametara na fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata konoplje, te je provedena analiza glavnih komponenata na prikupljenom skupu podataka. Razvijeni su modeli višestruke linearne regresije, nelinearne regresije i lokalne linearne regresije, kao i umjetne neuronske mreže, kako bi se predvidjela fizikalna i kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata na temelju različitih parametara procesa klasične ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je zeljasta jednogodišnja biljka čijem rastu pogoduju različiti klimatski uvjeti diljem svijeta. Vjeruje se da je porijeklom iz Centralne Azije (Kina, Iran, Indija), odakle se uzgojem proširila po cijeloj Europi (Kuštrak, 2005; Obranović i Ozmec, 2014; Andre i sur., 2016). Vrijednost i kvalitetu konoplje kao kultivirane biljke prepoznali su još drevni Egipćani unazad 6 000 godina, a dobro mišljenje o toj biljci se zadržalo sve do danas. Pretpostavlja se da bi industrijska konoplja mogla zadovoljiti većinu čovjekovih potreba za hranom, odjećom, obućom i energijom, no ne možemo je u potpunosti odvojiti od *Cannabis indica* Lam. koja u svom sastavu sadrži znatno veći postotak psihoaktivne tvari tetrahidrokanabinola (THC) (Obranović i Ozmec, 2014; Božić-Ostojić i sur., 2015).

Kultivacija konoplje kao jedinim predstavnikom roda *Cannabis*, porodice *Cannabaceae* je našla široku primjenu u različitim industrijskim granama. Osim toga, postoji veliki broj istraživanja koja upućuju na činjenicu da je radi svog kemijskog sastava korištena i u ljekovite svrhe. S obzirom na primjenu, razlikujemo industrijsku konoplju s udjelom THC-a manjim od 0,2 %, od medicinske konoplje s udjelom THC-a većim od 0,2 %. (Kriese i sur., 2004; Farag i Kayser, 2015).

2.1.1. Taksonomija i botanički pregled vrste *Cannabis sativa* L.

Botanički predak konoplje naziva se *Cannabis ruderalis* Janisch koji i danas raste u području oko Aralskog i Kaspijskog jezera (Obranović i Ozmec, 2014; Božić-Ostojić i sur., 2015). Tisućljeće kultiviranja i križanja, rezultirali su izuzetnom raznolikošću ove vrste s trima glavnim predstavnicima: *Cannabis ruderalis*, definiranu početkom 20. stoljeća te *Cannabis sativa* L. i *Cannabis indica* Lam. koje su botaničari definirali prije otprilike 250 godina (Obranović i Ozmec, 2014). Taksonomska klasifikacija vrste *Cannabis sativa* L. prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija *Cannabis sativa* L. prema integriranom taksonomskom informacijskom sustavu (ITIS, 2018)

Carstvo	<i>Plantae</i>
Odjeljak	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred	<i>Rosanae</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Cannabaceae</i>
Rod	<i>Cannabis</i> L.
Vrsta	<i>Cannabis sativa</i> L.

Carl Linnaeus 1753. godine prvi put opisuje vrstu *Cannabis sativa* L. kao jedinog predstavnika svoje vrste. Međutim, 1783. godine Lamarck prepoznaje biljku s drugačijim biološkim osobinama nego što je opisao Linnaeus te imenuje novu vrstu *Cannabis indica* Lam. Početkom 20. stoljeća ruski botaničar Janischevski definira niski samonikli ruski varijetet *Cannabis ruderalis* Janisch. kao treći oblik konoplje. Sve tri vrste konoplje dolaze iz geografski različitih područja. Smatra se da je *Cannabis sativa* L. uzgajana u Europi, *Cannabis indica* Lam. donesena iz Indije, a *Cannabis ruderalis* Janisch. obitava u jugoistočnim dijelovima Rusije (Schultes i sur., 1974; Dubreta, 2006). Do sada je predloženo nekoliko klasifikacija konoplje te se smatra da podjela konoplje na niže sistematske jedinice nije jedinstvena, no autori Small i Cronquist (1976) predlažu podjelu roda na tri vrste : *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* Lam. i *Cannabis ruderalis* Janisch. (Schultes i sur., 1974; Hazekamp, 2007), a morfološke razlike među njima prikazane su na slici 1.



Slika 1. Podvrste *Cannabis sativa* L., *C. indica* Lam. i *C. ruderalis* Janisch. (Anonymous 1, 2018)

Kemijski sastav konoplje karakteriziran je omjerom dva glavna predstavnika kanabinoida: tetrahidrokanabinola (THC) i kanabidiola (CBD), od kojih samo THC ima halucinogeno djelovanje (Kuštrak, 2005). S obzirom na određeni omjer ovih kanabinoida u biljci, one se pridružuju određenom kemijskom fenotipu (kemotipu). Fetterman i Turner (1971) razlučili su dva kemotipa: jednom pripadaju biljke čiji je omjer THC/CBD > 1 i takve biljke se koriste u medicinske i rekreativne svrhe, a drugom pripadaju biljke čiji je omjer THC/CBD < 1 , te se ovaj kemotip spominje kao "industrijski kemotip".

Za forenzičke i zakonodavne svrhe vrlo je bitno da se razlikuju dva tipa konoplje, onaj za proizvodnju droge ili lijeka i tip za industrijske svrhe (Hazekamp, 2007; HAH, 2015). U Republici Hrvatskoj i ostalim državama EU smiju se uzgajati sorte koje sadrže $< 0,2\%$ THC-a u suhoj tvari biljke (HAH, 2015).

2.1.2. Morfologija i primjena industrijske konoplje

Cvjetovi konoplje (slika 2) su dvodomni i smješteni na odvojenim biljkama, muškim i ženskim. Razlikuju se po morfološkoj građi, biološkim osobinama i ekonomskom značaju. Muška biljka nosi prašnike, a ženska plodne listove koji se na kraju pretvaraju u plodove ili sjemenke (Small i Cronquist, 1974; Gagro, 1998; Paić, 2012).

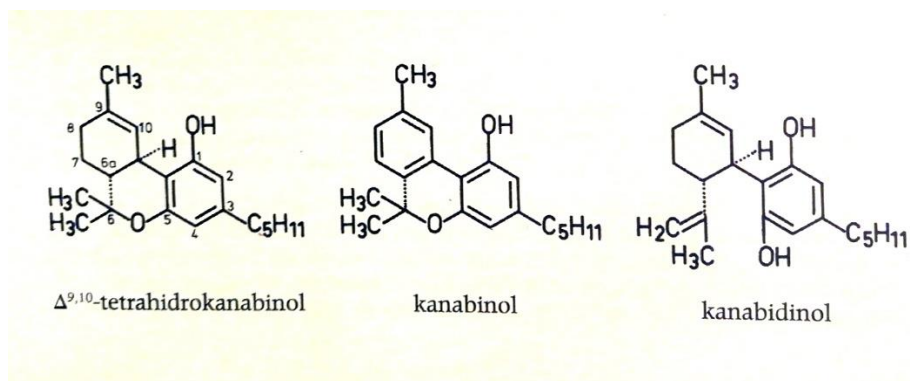


Slika 2. Muški cvat (lijevo) i ženski cvat (desno) (Anonymous 2, 2019)

Glavna karakteristika konoplje je prepoznatljiv oblik listova te uspravna zelena stabljika koja je u svojim počecima zeljasta i nježna, a kasnije odrveni. List je dlanast, podijeljen na nekoliko suličastih lisaka, po obodu nazubljen, dlakav, s gornje strane točkast od žljezdica koje imaju sposobnost izlučivanja sekundarnih metabolita poput kanabinoida (Mahlberg i Kim, 2004; Kuštrak, 2005). Cvjetovi su skupljeni u gornjoj trećini biljke i čine cvat. U usporedbi sa ženskim cvjetovima, muški cvjetovi imaju manje THC-a, stoga se oni odstranjuju (ElSohly, 2017).

THC je skraćenica za Δ^9 -tetrahidrokanabinol, psihoaktivnu komponentu koja se javlja u smoli neoplođenih vrhova ženskog cvijeta, koja može utjecati na svijest, emociju i ponašanje te se zbog toga nalazi na popisu opojnih droga (Obranović i Ozmec, 2014).

Do početka cvatnje biljke prevladava kanabidiolska kiselina i tetrahidrokanabinolska kiselina, a tijekom cvatnje dođe do pregradnje i nastaju kanabidiol, kanabinol i Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Kuštrak, 2005).



Slika 3. Prikaz kemijskih struktura kanabinola (Kuštrak, 2005)

Cvate oko 20 dana u razdoblju od srpnja do kolovoza. Plod konoplje ujedno je i sjeme, orašastog oblika veličine oko 4 mm s lomljivom sjemenom lupinom te sadrži između 25-38 % ulja, oko 25 % proteina, značajan udio dijetalnih vlakna i mineralnih tvari (Šimić i sur., 1980; Kuštrak, 2005). Ulje industrijske konoplje dobiva se mehaničkim prešanjem iz sjemenki te je jedno od rijetkih ulja koja imaju omjer omega-6/omega-3 masnih kiselina koji iznosi 3-5:1. Neke od poznatijih su linolna (omega-6) te alfa-linolenska (omega-3) masna kiselina (Obranović i Ozmec, 2014). Ravnoteža ovih dviju masnih kiselina je jedan od temelja pravilne prehrane, prevencije pretilosti i razvoja kroničnih bolesti (Obranović i Ozmec, 2014).

Biljka može narasti od 2 do 5 metara, ovisno o sorti i klimatskim uvjetima (HAH, 2015). Njezina višenamjenska uloga čini ju za današnje potrebe izrazitom važnom biljkom. Uzgaja se radi vlakana od kojih se izrađuju različita tkanja, te u tom smislu čini konoplju nezamjenjivim resursom u proizvodnji tkanina, hrane i papira. Industrijska konoplja ima široku primjenu u svim industrijskim granama te postoji podatak da se od cijele biljke može izraditi više od 25 000 različitih proizvoda (Small i Marcus, 2002).

Za dobivanje konopljinog vlakna potrebna je što kvalitetnija stabljika. Morfološka svojstva biljke kao što su visina, debljina te tehnička dužina stabljike, važan su pokazatelj njezine kvalitete (Butorac, 2009). Na debljinu stabljike utječe vegetacijski prostor i gnojidba, posebice

dušikom. Ako se konoplja gnoji sa velikom količinom dušika rezultat je povećanje debljine stabljike no smanjenje njezine kvalitete (Ranalli, 1999).

Konopljino vlakno odlikuje se velikom čvrstoćom, elastičnošću i dugotrajnosti na vodu, pa je tako našlo primjenu u proizvodnji konopca, jedra, platna, izradi odjeće, ribarskih mreža sve do cijevi, vreća i tako dalje. Muške biljke imaju veći postotak vlakna bolje kvalitete od ženskih biljaka. Drvenasti dio stabljike koristi se za izradu papira, celuloze, izolacijskog materijala te se upotrebljava kao ogrjev (Gagro, 1998). Osim toga svoju primjenu našla je i u kozmetičkoj industriji te medicini zbog velikog broja djelatnih supstanca. Modernim kliničkim ispitivanjima potvrđene su spoznaje o ljekovitosti konoplje, poznate još od tradicionalne kineske medicine. Uglavnom se ovo pozitivno djelovanje na ljudski organizam pripisuje visokim razinama esencijalnih masnih kiselina, fitosterola, karotena i antioksidansa (Callaway, 2004). Ulje konoplje učinkovito je u zacjeljivanju rana na koži i sluznici te povoljno djeluje i na dermatitis (HAH, 2015). Farmaceutske tvrtke proizvode linije kozmetičkih preparata za osobnu njegu na bazi konopljinog ulja poput sapuna, šampona, kupki i krema. Svoju primjenu, konopljino ulje, pronašlo je i u proizvodnji boja, lakova, brtvila, maziva za strojeve i tiskarskih boja (Pospišil, 2013).

2.2. OKSIDATIVNI STRES I ULOGA ANTIOKSIDANSA

Oksidativni stres se definira kao neuravnoteženo stanje između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih vrsta kisika (ROS - reactive oxygen species) i njihovo uklanjanje zaštitnim mehanizmima antioksidansa. Za razliku od atmosferskog kisika, ROS kao nusprodukti enzimskih reakcija ili kao rezultat okolišnog utjecaja poput različitih vrsta zračenja, sposobni su za neograničenu oksidaciju različitih staničnih komponenata i mogu dovesti do oksidacijskog uništenja organizma (Mittler, 2002; Reuter i sur., 2010).

Slobodni radikali i oksidativni stres se često dovode u vezu. Slobodni radikali su kemijski spojevi s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci te posjeduju veliku kemijsku reaktivnost i nisku specifičnost za reaktante (Lovrić, 2001).

Proizvodnja slobodnih radikala u određenoj koncentraciji nužna je za funkcioniranje imunološkog sustava, no kada je koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama znatno viša od fiziološke te nadmaši antioksidativnu obranu, dolazi do stanja koje se naziva oksidativni stres (Prior i Xu, 2013). Takvo stanje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula

(polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što za posljedicu ima oksidativna oštećenja staničnih struktura, tkiva i organa i samim time mogu dovesti do bolesti (Halliwell i Gutteridge, 1990; Sies, 1991). Oksidativni stres smatra se odgovornim u razvoju kroničnih degenerativnih bolesti uključujući koronarnu bolest srca, rak i starenje (Dai i Mumper, 2010).

Antioksidansi štite stanične komponente tako što neutraliziraju štetne učinke slobodnih radikala i reaktivnih molekula. Stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima donirajući im proton ili elektron i na taj način ih inaktiviraju, a da istodobno sami ne postanu nestabilni (Badarinath i sur., 2010; Singh i sur., 2013). U posljednje vrijeme raste interes za istraživanjem biljnih antioksidansa zbog njihovog povoljnog učinka na zdravlje.

Antioksidansi mogu biti enzimi ili različite male neenzimske molekule kao što su fenoli, glutation, askorbinska kiselina. Ti aktivni sastojci najčešće su sekundarni metaboliti koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Razvijene metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta mogu se podijeliti na metode temeljene na prijenosu elektrona (eng. electron transfer-ET) i metode temeljene na prijenosu vodika (eng. hydrogen atom transfer- HAT) (Apak i sur., 2013).

U HAT-metode ubrajamo: ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) i TRAP metoda (Total Reactive Antioxidant Potential). Pomoću reakcije (1) možemo prikazati mehanizam antioksidacijskog djelovanja u kojem se vodikov atom (H) fenolnih spojeva (Ar-OH) prenosi na slobodni radikal (ROO·), a fenoksil radikal, nastao reakcijom fenola i peroksid radikala, je stabilan zahvaljujući rezonanciji (Apak i sur., 2013).



ET-metode se većinom temelje na simulaciji antioksidacijske aktivnosti s probom odgovarajućeg redoks potencijala. Antioksidans reagira s florescentnom probom (oksidirajućim sredstvom) umjesto s peroksidnim radikalom. Spektrofotometrijske metode mjere kapacitet antioksidansa tijekom redukcije oksidansa koji mijenja boju kada je reduciran. Stupanj promjene boje (bilo porast ili smanjenje apsorbancije probe pri određenoj valnoj duljini) u korelaciji je s koncentracijom antioksidansa u uzorku. Metode bazirane na prijenosu elektrona imaju određeno vrijeme trajanja za određene redoks reakcije i mjere termodinamičku pretvorbu, odnosno oksidaciju, u tom vremenskom razdoblju. U takve metode spadaju: FCR (Folin-Ciocalteu reagens) (Singleton i sur., 1999), FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant

Power), DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom), CUPRAC (Cupric Iron Reducing Antioxidant Capacity) (Apak i sur., 2013), TEAC metoda (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity) te ABTS+ metoda (radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (Apak i sur., 2013).

U ovom radu antioksidacijska aktivnost je određena DPPH metodom koja se temelji na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini te FRAP metodom koja se temelji na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje, ujedno i najpopularnijom metodom za određivanje ukupnih fenola (Benzie i Strain, 1996).

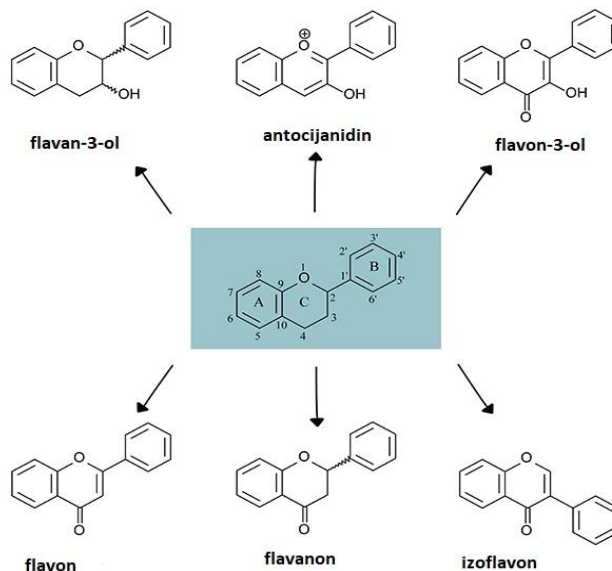
2.3. FENOLNI SPOJEVI

Bioaktivne komponente u biljkama mogu se podijeliti u tri grupe: terpeni i terpenoidi, alkaloidi i fenolni spojevi (Azmir i sur., 2013). Fenolni spojevi ili polifenoli čine najrašireniju skupinu sekundarnih biljnih metabolita i najzastupljenije prirodne antioksidanse u prehrani (Scalbert i sur., 2005). Kemijsku strukturu polifenola čini aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Ignat i sur., 2011).

Danas je identificirano više od 8000 polifenolnih spojeva različitih struktura i funkcija (Bravo, 1998), a zbog izrazito velikog broja poznatih spojeva svrstavaju se u nekoliko podgrupa. Osnovna podjela polifenola je na fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavoni), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) i ostale polifenolne spojeve kao što su kumarini i lignani (Naczki i Shahidi, 2006). Zbog svoje složene kemijske strukture i antioksidacijske aktivnosti te zdravstvenog učinka na ljudsko zdravlje, fenolni spojevi su i dalje predmet istraživanja (Scalbert i sur., 2005). Antioksidacijsko djelovanje polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres. Pokazuju protuupalno, antialergijsko i antikancerogeno djelovanje (Scalbert i sur., 2005; Jakobek i sur., 2008).

Flavonoidi predstavljaju skupinu polifenola koji su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Ovi spojevi imaju nisku molekularnu masu i sastoje se od 15C atoma organiziranih u C6-C3-C6 konfiguraciji. Osnovnu strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena povezana heterocikličkim prstenom (slika 4). Prema supstituciji spomenutog vezivnog prstena dijelimo ih na flavonole, flavone, flavanone, flavanole, antocijanine i izoflavone. Zbog visokog redoks potencijala, flavonoidi su jako dobri antioksidansi (Ignat i sur., 2011).

Naime, veliki broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost te im se pripisuje antibakterijsko, antialergijsko, antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Kazazić, 2004; Sandhar i sur., 2011).



Slika 4. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Anonymous 3, 2005)

2.3.1. Kemijski sastav industrijske konoplje

Konoplja je jedna od prvih biljaka kojima se čovjek počeo služiti, uz prehrambene, i u druge svrhe. Osim celuloznih i drvenih vlakana, u biljci je identificirano više od 480 kemijskih spojeva kao što su: ugljikohidrati, masne kiseline i njihovi esteri, amidi, amini, fitosteroli, fenolni spojevi i kanabinoidi (Andre i sur., 2016; Pollastro i sur., 2018).

Kanabinoidi su ciklički terpeniski spojevi s 21 ugljikovim atomom u strukturi. U tu se skupinu ne ubrajaju samo spojevi izolirani iz vrste *Cannabis sativa* L., već i njihovi derivati i metaboliti (Pertwee i Cascio, 2014). Mogu se razvrstati u tri grupe s obzirom na mjesto njihovog nastanka: endogeni kanabinoidi ili endokanabinoidi, fitokanabinoidi i sintetski kanabinoidi (Pertwee i Cascio, 2014). Fitokanabinoidi najviše su zastupljeni u ženskim cvjetovima i u nadzemnim dijelovima biljke, a manje u ostalim dijelovima biljke, odnosno u sjemenu i korijenju (Ross i sur., 2000). Pokazalo se da starenjem biljke smanjuje se njihova koncentracija u lišću i duž osi stabljike (Pacifico i sur., 2008).

Δ^9 -THC odnosno Δ^9 -tetrahidrokanabinol predstavlja najzastupljeniju i glavnu psihoaktivnu komponentu indijske konoplje, dok ostali fitokanabinoidi uglavnom ne pokazuju psihoaktivna

svojstva, a među njima se biološkom aktivnošću i udjelom ističe kanabidiol (CBD) koji je karakterističan za industrijsku konoplju (Pertwee i Cascio, 2014).

Najvažniji fitokanabinoidi uz Δ^9 -THC i CBD su: tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabigerol (CBG), kanabigerolna kiselina (CBGA), kanabinol (CBN), kanabikromen (CBC) te tetrahidrokanabivarin (THCV) (Russo i Taming, 2011). Δ^9 -THC se u biljci ne nalazi u svom aktivnom obliku, već u obliku tetrahidrokanabinolinske kiseline (THCA) koja u reakciji dekarboksilacije pod djelovanjem topline prelazi u aktivni oblik (Gieringer i sur., 2008.). Dokazano je da THC djeluje kao psihoaktivno sredstvo, analgetik, mišićni relaksant i antispazmodik (Pacher i sur., 2006). Uz to Evans (1991) ističe da ima dvadeset puta veću protuupalnu snagu nego aspirin, dok Hampson i suradnici (1998) dokazuju njegovo neuroprotektivno antioksidacijsko djelovanje.

Istraživači Russo i Guy (2006) su otkrili biljnu sinergiju između psihoaktivne i nepsihoaktivne komponente te dokazali sposobnost CBD-a u smanjivanju nuspojave THC-a poput anksioznosti. Wagner i Ulrich (2009) predlažu četiri osnovna mehanizma njihove sinergije: (1) multi-ciljani učinak, (2) farmakokinetičke učinke, (3) interakcije agensa koji utječu na otpornost bakterija i (4) modulacija štetnih događaja u organizmu. Promatran zasebno, CBD, ima potencijalna antioksidacijska svojstva, a nedavne studije na životinjama pokazale su da se može koristiti u prevenciji dijabetesa, nekih vrsta raka i reumatoidnog artritisa (Gieringer i sur., 2008).

Terpeni čine drugu najveću skupinu sekundarnih metabolita konoplje te su ujedno i odgovorni za karakterističnu aromu i miris (Pellati i sur., 2018). U konoplji je pronađeno više od 100 različitih terpena, u obliku mono- i seskviterpena najviše u cvjetovima, korijenju i lišću, a glavno mjesto njihovog nastanka su sekretorne žljezdane dlačice. Najzastupljeniji monoterpeni su D-limonen, β -mircen, α - i β -pinen, terpinolen i linalool, dok su najzastupljeniji seskviterpeni β -kariofil te α -humulen koji se pojavljuje u velikim količinama u ekstraktima konoplje (Brenneisen, 2007; Fishedick i sur., 2010). Terpeni su lipofilne komponente koje lagano prolaze kroz stanične membrane u ljudskom organizmu. D-limonen nalazi se u sastavu mnogih medicinskih preparata za smanjivanje tjeskobe u ljudi. Dokazana su mu i antikancerogena, anksiolitička i imunostimulirajuća svojstva (Sun, 2007). β -mircen, terpen koji se uglavnom nalazi u cvijetu konoplje, prepoznat je kao snažni protuupalni i analgetski čimbenik (Rufino i sur., 2015). U biljci *Cannabis sativa*, oko 20 flavonoida je identificirano, a uglavnom pripadaju skupinama flavona i flavonola. Neki od zastupljenih spojeva su O-glikozidne verzije aglikona apigenin, luteolin, kempferol, kvercetin, kanflavin A i B koji su metilirani izoprenoidni flavoni

jedinstveni za konoplju (Ross i sur, 2005). Cheng i suradnici (2008) su izolirali apigenin iz lišća te grančica konoplje koristeći ekstrakciju metanolom. U biljkama, fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi u određenim fiziološkim uvjetima i na taj način štite biljke od oksidativnog stresa. Kod čovjeka se dokazala korelacija između povećanog unosa hrane bogate fenolnim spojevima i smanjene pojave kroničnih bolesti kao što su karcinomi, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, ali ovi pozitivni učinci ne mogu se u potpunosti objasniti prisustvom fenolnih sastavnica, jer se nalaze u manjim količinama u biljkama (Arts i Hollman, 2005). Flavoni i flavonoli pronađeni u konoplji imaju široki raspon bioloških učinaka, uključujući svojstva koja dijele terpeni i kanabinoidi. Oni pokazuju protuupalna, antikancerogena i neuro-zaštitna svojstva (Andre i sur., 2010).

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je brza i učinkovita tehnološka operacija koja se temelji na razdvajanju i koncentriranju tvari na osnovu njene različite topljivosti u različitim otapalima. Najčešće je prvi korak u izolaciji fenolnih spojeva iz biljnih materijala, a može se provoditi primjenom različitih otapala i metoda. Fenoli se mogu izdvojiti iz svježih, smrznutih ili osušenih biljnih materijala (Lianfu i Zelong, 2008; Dai i Mumper, 2010).

Općenito je poznato da prinos ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru uzorka prema otapalu, kao i o kemijskim i fizikalnim karakteristikama uzorka (Dai i Mumper, 2010). Otapala koja se najviše koriste su etanol, metanol te njihove vodene otopine, ali također se mogu koristiti aceton, etil acetat i sl. Odabir otapala utječe na količinu i brzinu izlučivanja polifenola (Xu i Chang, 2007). Metanol se smatra učinkovitim otapalom u ekstrakciji polifenola niže molekulske mase, dok se flavanoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju pri pH vrijednostima nižim od 7. Osim toga, etanol se pokazao isto kao dobro otapalo za ekstrakciju polifenola i manje je toksičan (Dai i Mumper, 2010; Ignat i sur., 2011). Također, kao ekstrakcijsko otapalo koristi se i voda zbog smanjenja korištenja organskih otapala te troškova ekstrakcije (Cacace i Mazza, 2002).

Ekstrakcija polifenola je zahtjevan proces radi njihove složene kemijske strukture i interakcije s drugim kemijskim spojevima. Prema tome, važno je razviti optimalne metode ekstrakcije kako bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet iz različitih uzoraka biljnih materijala (Garcia-Salas i sur., 2010).

Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na konvencionalne i ne-konvencionalne. Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su: direktna destilacija, destilacija vodenom

parom ili destilacija vodom i parom, ekstrakcija otapalima, maceracija te ekstrakcija uljima i hladno prešanje (Eskilsson i Bjorklund, 2000). Njihov glavni nedostatak je dugo vrijeme postupka ekstrakcije i velik utrošak otapala (Mutalib, 2015). Napretkom tehnologije i zbog navedenih nedostataka, dolazi do razvoja novih i modernijih metoda ekstrakcije s ciljem smanjenja utroška količine otapala, poboljšanja energetske učinkovitosti, prinosa i skraćivanja vremena ekstrakcije. Takve modernije metode nazivamo ne-konvencionalnim tehnikama, a neki od primjera su ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalnim zračenjem i visokonaponskim pražnjenjem (hladna plazma) (Mutalib, 2015).

2.4.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Operacija prijenosa mase, kojom se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog otapala, naziva se ekstrakcija kruto-tekuće. Organske molekule mogu biti uklopljene unutar čvrste faze ili mogu biti vezane međumolekulskim silama. Oslobođanje tih molekula iz čvrste faze postiže se prodiranjem otapala u blizini molekula (Rapić, 1994). Ovaj proces se može ubrzati usitnjavanjem materijala zbog proporcionalnog odnosa brzine difuzije i površine namirnice te se po potrebi homogenizira (Jerman i sur., 2010). Međutim, kod preusitnjenog materijala može se postići i suprotni učinak što dovodi do sporijeg kretanja otapala (Takeuchi i sur., 2009; Herceg, 2011).

Ekstrakcija kruto-tekuće uobičajeno se koristi kao metoda izolacije fenolnih spojeva iz biljnih materijala te u mnogim kemijskim, biokemijskim i farmaceutskim industrijama za obnavljanje bioaktivnih spojeva (Veljković i Milenković, 2002; Naczk i Shahid, 2004; Vardanega i sur., 2014).

Klasične metode ekstrakcije obuhvaćaju ekstrakciju otapalima, perkolaciju, maceraciju i Soxhlet ekstrakciju. Ekstrakcija otapalima je najčešći postupak pripreme ekstrakata iz biljnih materijala zbog svoje jednostavne upotrebe, učinkovitosti i široke mogućnosti primjene. Za optimalnu ekstrakciju potrebno je osigurati dobro miješanje otapala i materijala koji se ekstrahira (Herceg, 2011). Pri odabiru otapala treba uzeti u obzir polarnost polifenola i samog otapala. Otapala kao što su metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije koriste se za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala i često se miješaju s vodom u različitim omjerima. Odabirom pravog otapala utječe se na količinu i udjel ekstrahiranih polifenola (Dai i Mumper, 2010).

Prema dosadašnjim istraživanjima više temperature mogu ubrzati proces ekstrakcije što rezultira i većim koncentracijama određenih fenolnih skupina, ali također može doći do razgradnje poželjnih biološki aktivnih komponenata te ekstrakcije nepoželjnih molekula poput šećera, organskih kiselina i proteina. Time se smanjuje čistoća ekstrakata (Castaneda-Ovando i sur., 2009; Ignat i sur., 2011). Stoga je važno poznavati fizikalno-kemijske karakteristike uzorka kako bi se postigli optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva. Također, dugo vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura mogu povećati vjerojatnost oksidacije fenolnih kiselina čime se smanjuje prinos fenolnih kiselina u ekstraktima (Dai i Mumper, 2010).

Konvencionalna metoda ekstrakcije uključuje zagrijavanje reakcijske smjese preko izmjenjivača topline ili nekog drugog grijaćeg izvora. Takav način prijenosa toplinske energije je spor i neučinkovit jer ovisi o toplinskoj vodljivosti materijala. Nedostatak je i upotreba organskih otapala radi toksičnih ostataka, kemijskih transformacija ekstrakata te toksičnog djelovanja na ljudsko zdravlje i okoliš (Kormin i sur., 2010; Vardanega i sur., 2014).

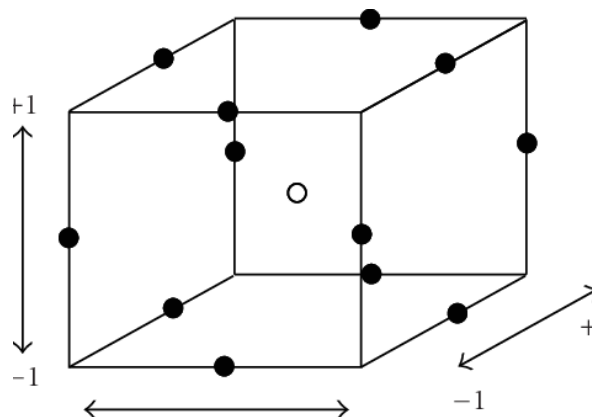
2.5. METODA ODZIVNIH POVRŠINA

Kako bi se unaprijedila učinkovitost sustava, procesa ili proizvoda, potrebno ga je optimirati. Optimiranje podrazumijeva unapređivanje svojstava nekog sustava ili procesa u svrhu postizanja maksimalnog prinosa uz što manje troškove, a može se provesti empirijskim ili statističkim metodama. Tradicionalno se ovaj postupak provodi radi praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na eksperimentalni odziv, gdje bi jedan faktor bio podložan promjeni, a drugi konstantan (Bezerra i sur., 2008). U novije vrijeme se u optimiranju procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a jedna od njih je i metoda odzivnih površina (eng. Response Surface Methodology, RSM) (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

Box i suradnici 50-tih godina prošlog stoljeća, razvili su metodologiju odzivnih površina za planiranje eksperimenata. Metoda odzivnih površina (RSM) predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika korisnih za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa u kojima je cilj definirati odnos između varijable odziva i neovisnih varijabli (Bezerra i sur., 2008). RSM ima važnu ulogu u dizajnu, razvoju i formiranju novih proizvoda, kao i u unaprjeđivanju postojećih proizvoda. Metoda definira utjecaj neovisnih varijabli, samih ili u kombinaciji, na procese. Uz analizu efekata neovisnih varijabli, ova eksperimentalna metodologija također razvija matematički model (Baş i Boyacı, 2007).

Metoda odzivnih površina sastoji se od nekoliko faza: potrebno je izabrati nezavisne varijable koje imaju glavni učinak na promatrani sustav, odabrati eksperimentalni dizajn i provesti pokus prema odabranoj eksperimentalnoj matrici, matematičko-statistička obrada dobivenih podataka eksperimenta, procjena prihvatljivosti modela, provjera mogućnosti provođenja pomaka u pravcu optimalnog područja i dobivanje optimalnih vrijednosti za svaku ispitivanu varijablu (Bezerra i sur, 2008). Prije primjene metode potrebno je izabrati odgovarajući eksperimentalni dizajn pomoću kojeg definiramo plan eksperimenta. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta dobiva se odzivna ploha. Odzivna ploha je kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti te ju opisujemo odzivnom funkcijom. Ona prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: faktorski plan pokusa na tri razine, centralno kompozitni plan pokusa, plošno centrirani kompozitni plan te Box-Behnken plan pokusa koji je ujedno korišten i u ovom radu (Bezerra i sur., 2008; Cajner, 2011). Navedeni planovi pokusa se razlikuju s obzirom na broj pokusa koji su potrebni, razinu ispitivanih varijabli i prema odabiru eksperimentalnih točaka (Bezerra i sur., 2008).

Box-Behnken plan pokusa predstavlja skupinu nezavisnih kvadratnih planova pokusa te zahtjeva minimalno tri parametra za eksperimentalni dizajn. Koristi se kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost učinkovite procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Prednost takvog plana je u mogućnosti ispitivanja više varijabli (3-10) te manjeg broja potrebnih pokusa. Na slici 5. možemo vidjeti da su sve razine faktora svedene na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina (Bezerra i sur., 2008). Također kao prednost možemo istaknuti i smanjen broj pokusa, što štedi vrijeme i novac.



Slika 5. Box-Behnken plan pokusa (Kandananond, 2010)

Ideja metode odzivnih površina je dobiti uvid utjecaja nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu. Najčešće se koristi polinom nižeg reda u odgovarajućim područjima nezavisnih varijabli. Npr. funkcija modela prvog reda (jed.2) ili funkcija modela drugog reda (jed.3) u slučaju da postoji nelinearnost (Anderson-Cook i sur., 2009):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon \quad [2]$$

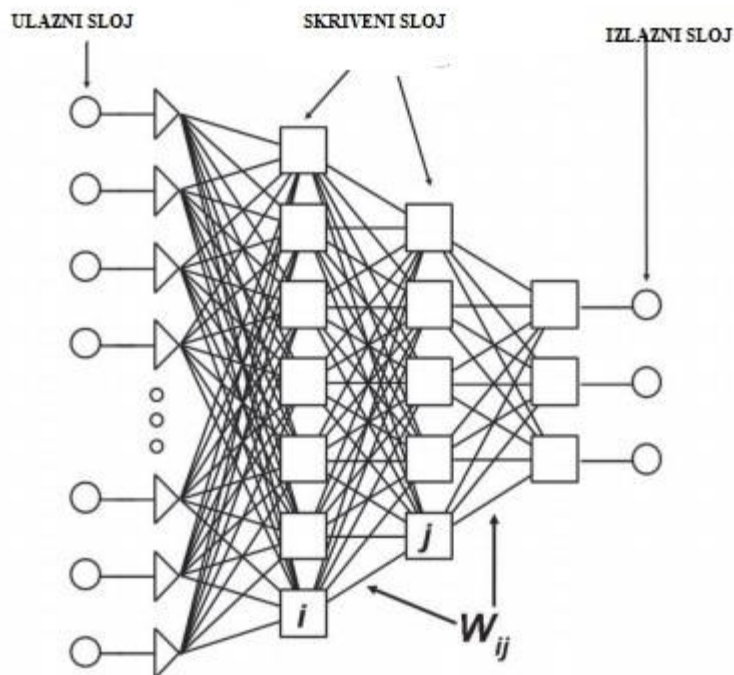
gdje Y predstavlja zavisnu varijablu, x nezavisne varijable, β koeficijente modela, a ε pogrešku koja se javlja u odzivu. Koeficijenti modela određuju se metodom minimiziranja sume kvadrata odstupanja, nakon čega se radi validacija odzivne površine na nezavisnom setu podataka.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2} \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \quad [3]$$

2.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Ljudski mozak sastoji se od velikog broja živčanih stanica (neurona), koji pri obradi različitih vrsta informacija rade paralelno. Umjetna neuronska mreža umjetna je replika ljudskog mozga kojom se nastoji simulirati postupak učenja. Neuronske mreže rješavaju probleme klasifikacije i predviđanja, odnosno općenito sve probleme kod kojih postoji odnos između ulaznih ("input") i izlaznih ("output") varijabli, bez obzira na visoku složenost te veze (nelinearnost) (Tačković i sur., 2008).

Pojam umjetne neuronske mreže (eng. Artificial Neural Networks, ANN) obuhvaća skup tehnologija povezanih s umjetnom inteligencijom kojima se nastoji simulirati uloga i funkcije ljudskog mozga. Neuronske mreže uspješno se primjenjuju u brojnim tehničkim disciplinama poput forenzičke analize, kontrole procesa, klimatoloških promjena i prognoze vremena te investicijskih analiza (Huang i sur., 2007). Rad neuronskih mreža zasniva se na pokušaju reprodukcije načina na koji funkcionira ljudski mozak kojemu je osnovna gradivna jedinica neuron. Struktura neuronske mreže je formirana ulaznim slojem (eng. input layer), jednim ili više skrivenih slojeva (eng. hidden layer) i izlaznim slojem (eng. output layer). Broj neurona u sloju i broj slojeva ovisi o složenosti proučavanog sustava (Amato i sur., 2013). Primjer izgleda neuronske mreže prikazan je na slici 6.



Slika 6. Prikaz strukture umjetne neuronske mreže sa dva skrivena sloja (Amato i sur., 2013)

Prije postupka obrade podataka umjetnu neuronsku mrežu je potrebno naučiti ili trenirati preko primjera koji su postavljeni u bazi podataka za treninge. Pod postupkom učenja kod neuronskih mreža podrazumijeva se učestali postupak predočavanja ulaznih primjera i eventualno očekivanog izlaza (Tačković i sur., 2008). Kod umjetnih neuronskih mreža razlikujemo dva načina učenja, učenje pod nadzorom i učenje bez nadzora. Tokom postupka učenja pod nadzorom, neuronska mreža dobiva "input-e" i "output-e" te može prilagoditi težinu veze podudarajući svoj "output" sa stvarnim "output-om". Kod učenja bez nadzora, osigurana je samo "input-ima", bez poznavanja odgovora (Amato i sur., 2013). Skup primjera za učenje dijelimo na tri odvojena skupa: skup za učenje, skup za testiranje i skup za provjeru (validacija). Primjeri skupa za učenje služe za podešavanje težinskih faktora te pomoću primjera iz skupa za treniranje vrši se provjera rada mreže s trenutnim težinskim faktorima kako bi se postupak zaustavio u trenutku smanjenja učinkovitosti mreže. Moguće je neuronsku mrežu pretrenirati, nakon određenog broja ponavljanja, te tada ona gubi svojstvo generalizacije i može doći do loše obrade podataka. Točnost i preciznost obrade podataka moguće je provjeriti na kraju skupom primjera za validaciju (Tačković i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za pripremu ekstrakata korištena je smjesa cvijeta, lista, sjemenaka i stabljike osušene biljke industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) koja je ručno brana i osušena u Međimurju, od proizvođača OPG Levačić (Prelog, Hrvatska, berba 2018.).

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab, ST60T, Hrvatska)
- Vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- Konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska)
- Uljna kupelj s integriranom miješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)

Pribor:

- plastične kivete
- staklene čaše (100, 200 mL)
- aluminijska posudica s poklopcem
- stakleni štapić
- Kivete od kvarcnog stakla
- Staklene epruvete
- Menzure, volumena (100 mL i 1 L)
- Stakleni lijevci za filtraciju

- Celulozni filter papir (veličina pora 5-13 μm) (LLG Labware Meckenheim, Njemačka)
- Pipete (1, 2, 5 mL)
- Automatska pipeta (100-1000 μL)
- Odmjerna tikvica volumena 250 i 500 mL

3.1.3. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištena su sljedeća otapala i reagensi:

- Destilirana voda
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 96%-tni, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Hrvatska
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Galna kiselina ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$), Sigma-Aldrich, Njemačka
- 1,1,-difetil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Metanol (CH_3OH), Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$), Sigma-Aldrich, Rusija
- Klorovodična kiselina (HCl), Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska
- Natrijev acetat-trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Gram-Mol, Hrvatska
- Koncentrirana octena kiselina (CH_3COOH), T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- 2,4,6,-tripridil-1,3,5-triazina (TPTZ, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_6$), Sigma-Aldrich, Švicarska
- Željezo(III)-klorid-heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Gram Mol, Hrvatska
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sigma Aldrich, Njemačka
- Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm

3.2. METODE

3.2.1. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenata

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, a temelji se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Lianfu i Zelong, 2008; Kaushik i sur., 2010).

Eksperimenti ekstrakcije su provedeni prema uvjetima definiranim planom pokusa primjenom metode odzivnih površina (tablica 2). U staklenu čašu volumena 50 mL odvažuje se određena masa usitnjenog osušenog bilja industrijske konoplje te se prelije s određenim volumenom otapala etanol/voda, prethodno zagrijanog na unaprijed definiranoj temperaturi. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na definiranoj temperaturi u uljnoj kupelji (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka) pri određenoj brzini miješanja kroz zadano vrijeme. Nakon isteka vremena ekstrakcije uzorak se filtrira kroz celulozni filter papir veličine pora 5-13 μm (LLG Labware Meckenheim, Njemačka) kako bi se odvojila tekuća faza od krute faze. U pripremljenim ekstraktima određuju se fizikalna svojstva (pH, vodljivost, ukupne otopljene tvari, suha tvar) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodama).

Tablica 2. Plan eksperimenata za provedbu klasične ekstrakcije kruto-tekuće

Broj pokusa	omjer otapala i uzorka (mL g ⁻¹)	udio etanola (%)	temperatura (°C)	vrijeme (min)	brzina miješanja (min ⁻¹)
1	10	0	45	25	500
2	50	0	45	25	500
3	10	50	45	25	500
4	50	50	45	25	500
5	30	25	30	5	500
6	30	25	60	5	500
7	30	25	30	45	500
8	30	25	60	45	500
9	30	0	45	25	250
10	30	50	45	25	250
11	30	0	45	25	750
12	30	50	45	25	750
13	10	25	30	25	500
14	50	25	30	25	500
15	10	25	60	25	500
16	50	25	60	25	500
17	30	25	45	5	250
18	30	25	45	45	250
19	30	25	45	5	750
20	30	25	45	45	750
21	30	25	45	25	500
22	30	25	45	25	500
23	30	25	45	25	500
24	30	0	30	25	500
25	30	50	30	25	500
26	30	0	60	25	500
27	30	50	60	25	500
28	10	25	45	5	500
29	50	25	45	5	500
30	10	25	45	45	500
31	50	25	45	45	500
32	30	25	30	25	250
33	30	25	60	25	250
34	30	25	30	25	750
35	30	25	60	25	750
36	10	25	45	25	250
37	50	25	45	25	250
38	10	25	45	25	750
39	50	25	45	25	750
40	30	0	45	5	500
41	30	50	45	5	500
42	30	0	45	45	500
43	30	50	45	45	500
44	30	25	45	25	500
45	30	25	45	25	500
46	30	25	45	25	500

3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata

3.2.2.1. Mjerenje pH vrijednosti

pH-vrijednost je broj koji služi kao mjera za kiselost, odnosno lužnatost vodenih otopina. U ovom radu izmjerene su pH vrijednosti pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje pomoću pH metra (Jenco 601A, SAD).

Za određivanje pH vrijednosti ekstrakata korištena je staklena elektroda spojena na pH metar (Jenco 601A, SAD), koji je prethodno kalibriran koristeći standarde s vrijednostima pH = 4 i pH = 7.

3.2.2.2. Mjerenje vodljivosti (*S*) i ukupne otopljene tvari (*TDS*)

Prema Dadiću (2012) električna vodljivost je sposobnost otopine da prenosi struju i ovisi o ukupnoj količini iona u otopini te je direktno proporcionalna udjelu ukupnih otopljenih tvari. Ukupne otopljene tvari (eng. Total Dissolved Solids – TDS) predstavljaju soli ili spojeve koji disociraju u vodi te formiraju ione koje je moguće mjeriti preko električne vodljivosti (Sigler i Bauder, 2015).

Korišten je konduktometar (SevenCompact, Mettler Toledo, Švicarska) sa sondom za mjerenje vodljivosti i udjela otopljenih čvrstih tvari. Sonda se uronila u uzorak te su se očitale vrijednosti vodljivosti ($\mu\text{S cm}^{-1}$) i TDS-a (mg L^{-1}). Prije svakog mjerenja uzorci su homogenizirani upotrebom vorteksa (BiosanVortex V1 Pus, Latvija).

3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1995).

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se kvarcni pijesak veličine 0,1 - 0,6 mm (u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice). Posudica se suši u sušioniku s automatskom regulacijom temperature (InkoLab ST60T, Hrvatska) sa skinutim poklopcem pri $T = 105$ °C.

Nakon sušenja koje traje sat vremena od trenutka kada je postignuta temperatura od 105 °C, poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru (Normax, Portugal), a zatim se važu s točnošću $m = \pm 0,0002$ g. U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom otpipetira se 3 mL ekstrakta. Sušenje uzorka traje 4 sata pri temperaturi 105 °C u sušioniku, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi:

$$\% \text{ vode} = (a-b) \cdot 100/m \quad [4]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [5]$$

gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g).

Na istom ispitnom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2 % obzirom na udio vode odnosno udio suhe tvari.

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom

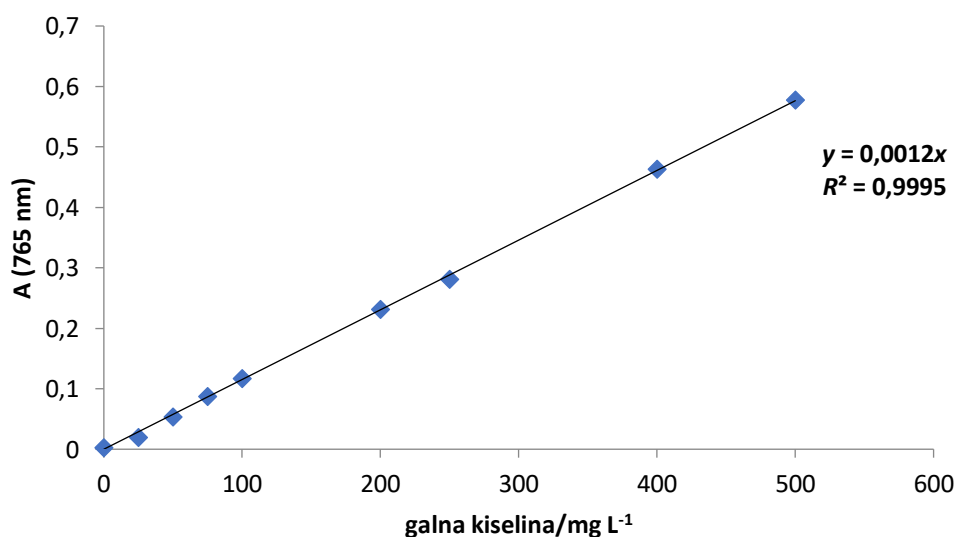
Spektrofotometrijska metoda temeljena na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koristi se za određivanje udjela ukupnih polifenola (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri 765 nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Lachman i sur., 1998).

U staklenu epruvetu doda se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa te 1,5 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3

započinje reakcija te uzorci stoje na sobnoj temperaturi 2 sata, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska) na valnoj duljini 765 nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke, samo što se, umjesto uzorka, dodaje 100 μL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500 \text{ mg L}^{-1}$) (slika 7), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca ovisnosti apsorbanacije o masenoj koncentraciji polifenola, potrebno je pripremiti polaznu otopinu galne kiseline u koncentraciji $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Odvaje se $0,005 \text{ g}$ galne kiseline u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Iz tako pripremljene otopine naprave se razrjeđenja koja odgovaraju koncentracijama otopine galne kiseline $0 - 400 \text{ mg L}^{-1}$. Reakcijska smjesa umjesto ekstrakta industrijske konoplje sadrži $100 \mu\text{L}$ otopine galne kiseline poznatih koncentracija. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija napravi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel 2017 pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm (slika 7). Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenola.



Slika 7. Baždarni pravac za galnu kiselinu

pri čemu je:

x – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

y – apsorbancija (A) pri 765 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Danas postoje mnoge metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti, no u ovom radu korištene su sljedeće metode:

DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom) (Brand-Williams i sur., 1995);

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1996);

3.2.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora – AH, antioksidans, dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona i do promjene tamno ljubičaste boje u žutu, što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducansom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995). Primjenom DPPH metode slobodnih radikala, antioksidacijska aktivnost mjeri se pri sobnoj temperaturi i tako eliminira rizik toplinske razgradnje ispitivanih molekula (Bondet i sur., 1997).

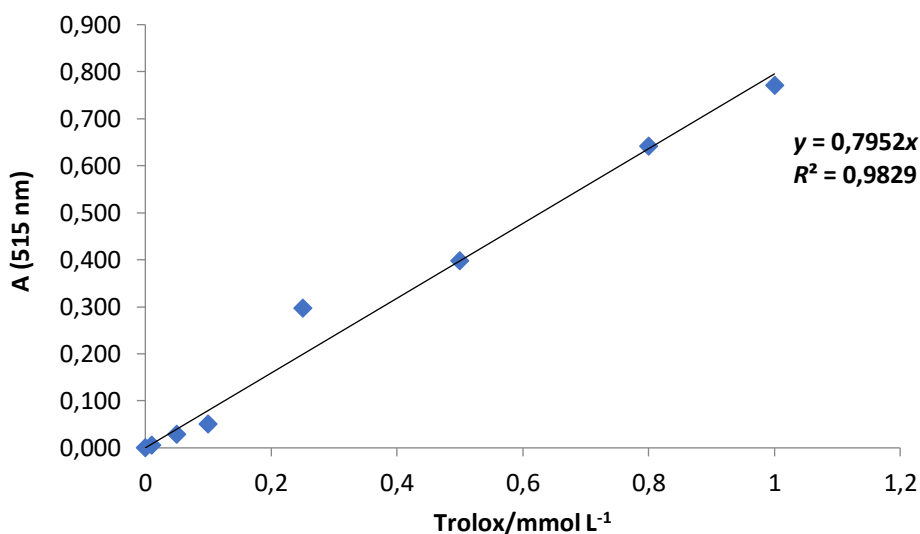


Nakon pripreme 0,094 mM otopine DPPH radikala u metanolu, u staklenu eprvetu doda se 100 μL uzorka i 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH radikala te dobro homogenizira na vorteksu. Reakcija se odvija u mraku 30 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu, koja umjesto uzorka sadržava jednaku količinu metanola. Iz dobivenog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija Trolox-a

($c(\text{Trolox}) = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 8), određuje se antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Postupak izrade baždarnog dijagrama je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 100 μL uzorka dodaje 100 μL otopine Troloxa poznate koncentracije ($c = 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,8, 1 \text{ mmol L}^{-1}$). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbancije (ΔA) računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka sa Trolox-om od apsorbancije slijepe probe. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac dobiven pomoću programa Microsoft Excel 2017 pri čemu su na apscisi nanese koncentracije Troloxa (mmol L^{-1}), a na ordinati izračunate vrijednosti ΔA (slika 8).



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

gdje je:

x –ekvivalent Trolox-a (mmol L^{-1})

y –razlikaslijepe probe i apsorbancije uzorka pri 515 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

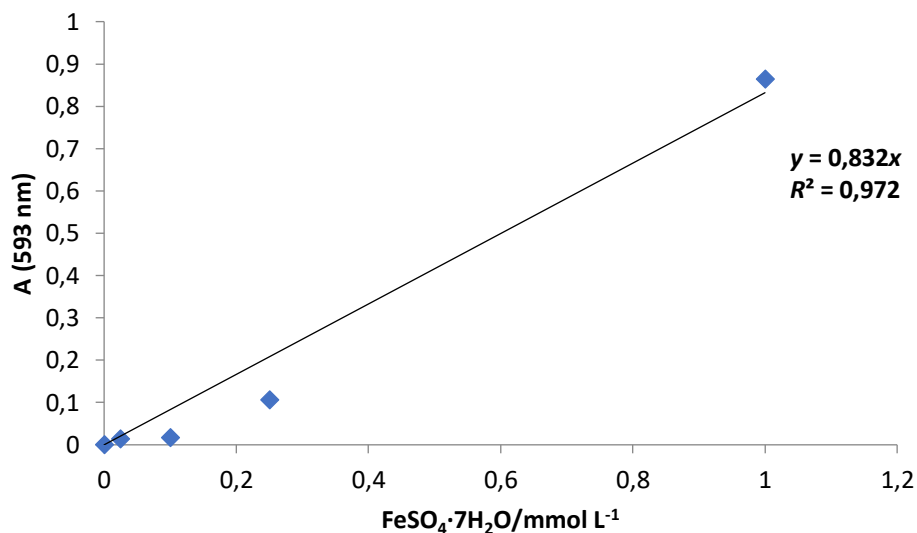
3.2.5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo (III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 593 nm.

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je dobro izmiješati 25 mL acetatnog pufera koncentracije 300 mmol L^{-1} , 2,5 mL TPTZ-a koncentracije 10 mmol L^{-1} i 2,5 mL vodene otopine željezo(III)-klorid-heksahidrata koncentracije 20 mmol L^{-1} . Doda se 50 μL ispitivanog uzorka i 950 μL FRAP reagensa u staklenu epruvetu te se izmjeri apsorbancija reakcijske smijese nakon 4 minute. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen FRAP reagensa. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednostima poznatih koncentracija $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($c_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 9), određuje se antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ po gramu suhe tvari uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Postupak izrade baždarnog dijagrama je jednak protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 50 μL uzorka dodaje 50 μL otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) poznate koncentracije ($c = 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,75, 1 \text{ mmol L}^{-1}$). Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Promjena apsorbancije (ΔA) računa se oduzimanjem apsorbancije slijepa probe od apsorbancije uzorka koje sadrži $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel 2017 pri čemu su na apscisi nanese koncentracije $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmol L^{-1}), a na ordinati izračunate vrijednosti ΔA (slika 9).



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

gdje je:

x – ekvivalent FeSO₄·7H₂O (mmol L⁻¹)

y – razlika uzorka i apsorbancije slijepe probe pri 593 nm

R^2 – koeficijent determinacije.

3.2.6. Statistička analiza i matematičko modeliranje

3.2.6.1. Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenata

U ovom istraživanju korištena je metoda odzivnih površina (RSM) primjenom programa Statistica 13.0. (Statsoft, Tulsa, SAD) za određivanje optimalnih uvjeta klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponenata industrijske konoplje koristeći Box-Behnken eksperimentalni dizajn kako bi se ispitalo utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, brzine miješanja, omjera tekuće i krute faze te udjela etanola u otapalu etanol/voda na fizikalna (TDS, vodljivost, pH i suha tvar) i kemijska (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom) svojstva dobivenih ekstrakata. Svaki procesni faktor analiziran je na tri razine ($T = 30, 45, 60$ °C, $t = 5, 25, 45$ min, *volumni udio etanola u otapalu* = 0, 25, 50 %, *omjer tekuće i krute faze* = 10, 30, 50 mL g⁻¹ i *brzina miješanja* = 250, 500, 750 rpm). Za 5 faktora na 3 razine algoritam predlaže 46 eksperimenata. Uvjeti pri kojima su provedeni eksperimenti prikazani su u tablici 2.

3.2.6.2. Analiza varijance (ANOVA)

Kako bi se ispitaio učinak pojedinih faktora (procesnih parametara) na pojedine odzive (fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata) u procesu klasične ekstrakcije industrijske konoplje, primijenjena je analiza varijance (ANOVA) u programu Statistica 13.0. (StatSoft, Tulsa, SAD), sa razinom značajnosti $p < 0,05$.

Analiza varijance (ANOVA) predstavlja glavnu statističku metodu za testiranje međuovisnosti procesnih parametara odnosno računa razlikuju li se dvije ili više grupa nezavisnih varijabli (NV) s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (ZV). Tim postupkom je moguće raščlaniti i procijeniti varijabilnosti uvjetovane različitim čimbenicima (Pfaff i Salopek, 2004).

Analiza varijance omogućuje definiranje razlika u odstupanjima rezultata od srednjih vrijednosti, što omogućuje testiranje nul-hipoteze (H_0). Nul-hipoteza podrazumijeva, da su srednje vrijednosti unutar tretmana (iste razine čimbenika) jednake, te pripadaju istoj populaciji, a varijacija je posljedica pogreške. Granična razina statističke značajnosti (α) je mjerilo za osjetljivost statističkog testa te označava postotak u kojem je dozvoljena greška odbacivanja nul-hipoteze. U ovom radu iznosi 0,05 te s tim tvrdimo da je nul-hipoteza ispravna s vjerojatnošću od 95 %, odnosno vjerojatnost da nul-hipoteza nije ispravna iznosi 5 %. Preporučljivo je da se navodi iznos p -vrijednosti, a ne samo odnos s razinom značajnosti ($p < \alpha$, $p > \alpha$), jer se na taj način kvantificira mjera značajnosti (Ukrainczyk, 2010).

3.2.6.3. Analiza glavnih komponenata (eng. *Principal Component Analysis, PCA*)

Prema autorima Jednačak i Novak (2013), analiza glavnih komponenata je najjednostavnija metoda multivarijantne statistike. Analiza glavnih komponenata je alat za lakše izdvajanje specifičnih informacija iz velike baze podataka i za pronalaženje sličnosti ili različitosti između podataka (Holmin i sur., 2001; Abdi i Williams, 2010). Primjenjuje se za brzu procjenu strukture podataka prije detaljne analize procesa, te omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se u slučajevima opsežnog broja varijabli (Kim, 2002).

Dobiveni podaci mogu se prikazati u koordinatnom sustavu. Uvođenjem glavnih komponenti (engl. Principal Components, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavljuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3...). Glavne komponente su međusobno ortogonalne. Ono što je nužno kada se radi s više varijabli jest pronaći nešto što je zajedničko svim promatranim varijablama (Jednačak i Novak, 2013).

U ovom radu analiziran je utjecaj procesnih parametara na fizikalna i kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje pomoću PCA metode koristeći programski paket Statistica 13.0. (StatSoft, Tulsa, SAD).

3.2.6.4. Modeli višestruke linearne, nelinearne i lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje, pripremljeni postupkom klasične ekstrakcije

Za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije, na temelju procesnih parametara razvijeni su modeli višestruke linearne (jed. 8) (Multiple Linear Regression, MLR), nelinearne (jed. 9) (Nonlinear Regression, NLR) i lokalne linearne regresije (jed. 10) (Piecewise Linear Regression, PLR). Parametri modela (regresijski koeficijenti) procijenjeni su korištenjem programa Statistica 13.0. (StatSoft, Tulsa, SAD).

$$Y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_3 \cdot X_3 \quad [8]$$

$$Y = b_0 \cdot X_1^{b_1} \cdot X_2^{b_2} \cdot X_3^{b_3} \quad [9]$$

$$Y = (b_{01} + b_{11} \cdot X_1 + b_{21} \cdot X_2 + b_{31} \cdot X_3) \cdot (Y \leq b_n) + (b_{02} + b_{12} \cdot X_1 + b_{22} \cdot X_2 + b_{32} \cdot X_3) \cdot (Y > b_n) \quad [10]$$

3.2.6.5. Umjetne neuronske mreže (*Artificial Neural Networks, ANN*)

Umjetne neuronske mreže korištene su kako bi se na temelju procesnih varijabli (ulazne varijable) predvidjele vrijednosti vodljivosti, ukupnih otopljenih tvari, pH, ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP metode) (izlazne varijable). Razvijene su višeslojne perceptronske mreže u softveru Statistica 13.0. (StatSoft, Tulsa, USA) koje su sadržavale 3 – 10 neurona u skrivenom sloju. Podaci su bili raspodijeljeni na učenje, testiranje i validaciju prema omjeru 60:20:20 koji se pokazao prikladnim za predviđanje vrijednosti fizikalnih svojstava te prema omjeru 70:15:15 koji se pokazao prikladnim za predviđanje vrijednosti kemijskih svojstava. Odabrano je po pet neuronskih mreža koje su imale najviše koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata industrijske konoplje dobivenih postupkom klasične ekstrakcije

Polifenoli, biološki aktivne komponente, sveprisutni su u biljkama koje se koriste u ljudskoj prehrani. Posljednjih 15-tak godina detaljno se istražuju zbog svojih antioksidacijskih svojstava i potencijalno blagotvornog učinka na zdravlje (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Značajna antioksidacijska aktivnost industrijske konoplje potječe od polifenola, točnije flavanoida koji djeluju kao antioksidansi (Panche i sur., 2016). Klasična ekstrakcija kruto-tekuće uobičajeno se koristi kao metoda izolacije fenolnih spojeva iz biljnih materijala zbog svoje jednostavne, učinkovite i široke primjene u mnogim kemijskim, biokemijskim i farmaceutskim industrijama (Veljković i Milenković, 2002; Dai i Mumper, 2010).

U ovom radu proveden je postupak klasične ekstrakcije kruto-tekuće biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje. U svrhu definiranja parametara procesa klasične ekstrakcije koji bi osigurali optimalne vrijednosti fizikalnih (vodljivost, ukupne otopljene tvari, pH, suha tvar) i kemijskih (ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodom) svojstava ekstrakata konoplje, definiran je plan eksperimenata primjenom metodologije odzivnih površina (RSM). Pomoću Box-Behnken eksperimentalnog dizajna analiziran je utjecaj pet varijabli (parametara procesa) kao što su temperatura ekstrakcije, vrijeme trajanja ekstrakcije, omjer otapala i materijala koji se ekstrahira, brzina miješanja te udio otapala etanola u smjesi etanol/voda na tri razine. Prema planu eksperimenta provedeno je 46 pokusa sa različitim zadanim uvjetima, a dobivenim ekstraktima određivala su se fizikalna i kemijska svojstva. Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka (tablica 3) vidljivo je da su pH vrijednosti približno jednake za svaki ekstrakt konoplje, odnosno variraju između vrijednosti pH 6 i pH 8. U usporedbi sa pH vrijednosti ukupna otopljena tvar (TDS) i vodljivost (S) ekstrakata značajno variraju od uzorka do uzorka pri čemu su najniže vrijednosti izmjerene kod eksperimenta broj 4 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, rpm = 500 min⁻¹, udio etanola 50 % te omjer otapala i uzorka 50 mL g⁻¹) te iznose $TDS = 171,6$ mg L⁻¹ i $S = 343$ μS cm⁻¹. Također, njihove su najviše vrijednosti izmjerene za eksperiment broj 1 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, rpm = 500 min⁻¹, udio etanola 0 % i omjer otapala i uzorka 10 mL g⁻¹) te iznose $TDS = 2170$ mg L⁻¹ i $S = 4620$ μS cm⁻¹. Električna vodljivost (S) očekivano je proporcionalna izmjerenim vrijednostima TDS-a kod svih ekstrakata. Rezultati suhe tvari također variraju; najniža vrijednost zabilježena je kod eksperimenta broja 20 ($t = 45$ min, $T = 45$ °C, rpm = 750 min⁻¹, udio etanola 25 % te omjer

otapala i uzorka 30 mL g⁻¹) i iznosi 0,097 % dok je najviša vrijednost zabilježena kod eksperimenta broja 46 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, rpm = 500 min⁻¹, udio etanola 25 % te omjer otapala i uzorka 30 mL g⁻¹) i iznosi 2,156 % (tablica 3).

Tablica 3. Fizikalna svojstva ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije

Eksp.	S/ $\mu\text{S cm}^{-1}$	TDS/ mg L^{-1}	pH	suha tvar/ %
1	4620	2170	6,89	1,207
2	983	511	7,03	0,248
3	968	484	6,52	0,913
4	343	171,6	6,6	0,277
5	630	311	6,77	0,247
6	818	414	7,05	0,366
7	918	455	7,00	0,446
8	1796	904	8,11	0,830
9	1576	776	7,15	0,457
10	476	238	6,72	0,451
11	1946	971	7,31	0,539
12	484	242	6,72	0,545
13	2460	1226	7,01	1,222
14	951	470	7,32	0,787
15	3550	1770	8,12	1,820
16	761	384	7,53	0,188
17	784	395	6,99	0,245
18	904	447	7,45	0,541
19	955	477	6,83	0,325
20	1177	589	7,63	0,097
21	1156	578	7,10	0,435
22	593	300	6,86	0,222
23	1151	569	7,05	0,356
24	1258	643	7,40	0,461
25	409	203	6,50	0,121
26	1669	811	7,92	0,756
27	707	352	6,69	0,692
28	1323	661	6,93	0,345
29	500	250	6,98	0,111
30	3480	1738	7,38	1,601
31	1115	558	7,64	0,438
32	775	391	6,87	0,331
33	1685	845	7,61	0,628
34	3250	1671	7,48	0,766
35	1724	856	7,76	0,732
36	1502	751	7,26	1,093
37	542	271	7,27	0,280
38	2050	1025	7,26	1,078
39	809	405	7,60	0,363
40	1763	856	7,07	0,539
41	636	318	6,81	0,406
42	1406	703	7,57	0,476
43	365	182,3	6,51	0,372
44	1156	578	7,54	0,566
45	1094	547	7,37	0,487
46	915	458	7,18	2,156

Analiza rezultata kemijskih karakteristika ekstrakata konoplje prikazana u tablici 4. pokazala je da je najveća količina ukupnih polifenola ekstrahirana u eksperimentu broj 39 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, rpm = 750 min^{-1} , udio etanola 25 % i omjer otapala i uzorka 50 mL g^{-1}); $UF = 36,160 \pm 1,295 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ što je 4 puta više u odnosu na eksperiment 38 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, rpm = 750 min^{-1} , udio etanola 25 % i omjer otapala i uzorka 10 mL g^{-1}); $UF = 9,154 \pm 0,000 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Navedeni eksperimenti se razlikuju samo u omjeru tekuće i krute faze te možemo zaključiti da kod veće količine uzorka industrijske konoplje, ekstrahirat će se veća količina ukupnih polifenola, što je i prema očekivanom. Sifaoui i sur. (2016) proveli su proces klasične ekstrakcije polifenola iz lista masline. Pratili su učinak omjera krute i tekuće faze (10:1, 20:1, 40:1 i 80:1) na količinu ekstrahiranih fenola i flavonoida, pri uvjetima $T = 50$ °C i $t = 30$ min, te su dokazali da postoji statistički značajna razlika između promatranih omjera. Upotrebom većeg omjera tekuće i krute faze, ekstrakcija polifenola je bila uspješnija jer je molekularna difuzija između dvije faze bila je poboljšana.

Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata konoplje DPPH metodom uočeno je da je najviša vrijednost dobivena u eksperimentu broj 16 ($\text{DPPH} = 0,361 \pm 0,001 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$) dok je najniža vrijednost dobivena u eksperimentu broj 28 ($\text{DPPH} = 0,062 \pm 0,001 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Vidljivo je udio ukupnih polifenola te kako antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom također prati trend antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u eksperimentima 16 i 28: najviša vrijednost iznosi $\text{FRAP} = 0,041 \pm 0,003 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te $UF = 16,936 \pm 3,237 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ (eksp. 16) dok najniža vrijednost iznosi $\text{FRAP} = 0,016 \pm 0,000 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te $UF = 5,218 \pm 0,777 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ (eksp. 28). Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata konoplje FRAP metodom najviša vrijednost je postignuta u eksperimentu broj 37 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, brzina miješanja = 250 min^{-1} , udio etanola 25 % i omjer otapala i uzorka 50 mL g^{-1}); $\text{FRAP} = 0,059 \pm 0,004 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je najniža vrijednost dobivena u eksperimentu broj 9 ($t = 25$ min, $T = 45$ °C, brzina miješanja = 250 min^{-1} , udio etanola 0 % i omjer otapala i uzorka 30 mL g^{-1}).

Tablica 4. Kemijska svojstva ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije

Eksp.	UF/ mg _{GAE} g _{s.t.} ⁻¹	DPPH/ mmol _{Trolox} g _{s.t.} ⁻¹	FRAP/ mmol FeSO ₄ ·7H ₂ O g _{s.t.} ⁻¹
1	5,767±0,130	0,065±0,002	0,010±0,001
2	13,274±0,647	0,324±0,002	0,021±0,025
3	8,331±0,388	0,069±0,002	0,022±0,003
4	21,055±0,000	0,32±0,006	0,036±0,003
5	7,141±1,554	0,19±0,001	0,009±0,005
6	12,633±1,554	0,196±0,002	0,017±0,006
7	7,690±0,777	0,199±0,002	0,017±0,009
8	15,380±0,000	0,201±0,004	0,043±0,008
9	14,556±4,272	0,192±0,001	0,001±0,008
10	16,203±0,388	0,201±0,002	0,043±0,007
11	9,887±1,554	0,196±0,008	0,017±0,007
12	15,654±0,388	0,198±0,002	0,037±0,001
13	8,422±0,518	0,067±0,001	0,012±0,001
14	16,478±1,295	0,32±0,003	0,024±0,002
15	13,732±0,000	0,073±0,003	0,047±0,004
16	16,936±3,237	0,361±0,001	0,041±0,003
17	6,317±1,165	0,205±0,001	0,013±0,000
18	12,633±2,330	0,204±0,002	0,041±0,006
19	7,690±0,777	0,201±0,005	0,022±0,001
20	17,302±0,388	0,203±0,004	0,037±0,010
21	9,887±1,554	0,19±0,009	0,020±0,001
22	7,141±0,000	0,205±0,019	0,015±0,002
23	10,985±1,554	0,196±0,002	0,005±0,000
24	11,260±1,942	0,191±0,001	0,0198±0,002
25	12,908±1,942	0,190±0,004	0,047±0,012
26	12,633±1,165	0,184±0,002	0,038±0,003
27	22,520±0,777	0,194±0,001	0,055±0,002
28	5,218±0,777	0,062±0,001	0,016±0,000
29	29,294±1,424	0,300±0,006	0,025±0,003
30	10,99±0,000	0,065±0,000	0,022±0,000
31	30,21±0,000	0,312±0,018	0,042±0,004
32	13,732±6,473	0,182±0,001	0,022±0,001
33	16,753±3,107	0,190±0,005	0,043±0,002
34	15,654±2,719	0,188±0,002	0,042±0,005
35	20,598±0,388	0,189±0,002	0,035±0,005
36	11,352±5,826	0,067±0,001	0,032±0,001
37	22,886±0,777	0,304±0,015	0,059±0,004
38	9,154±0,000	0,065±0,004	0,028±0,002
39	36,160±1,295	0,299±0,004	0,050±0,026
40	12,633±0,647	0,167±0,004	0,022±0,001
41	21,696±0,000	0,171±0,001	0,045±0,002
42	10,711±2,719	0,179±0,001	0,023±0,006
43	16,203±1,165	0,173±0,002	0,023±0,001
44	17,302±4,272	0,174±0,001	0,035±0,002
45	17,302±6,603	0,161±0,002	0,034±0,001
46	17,027±7,768	0,207±0,010	0,030±0,001

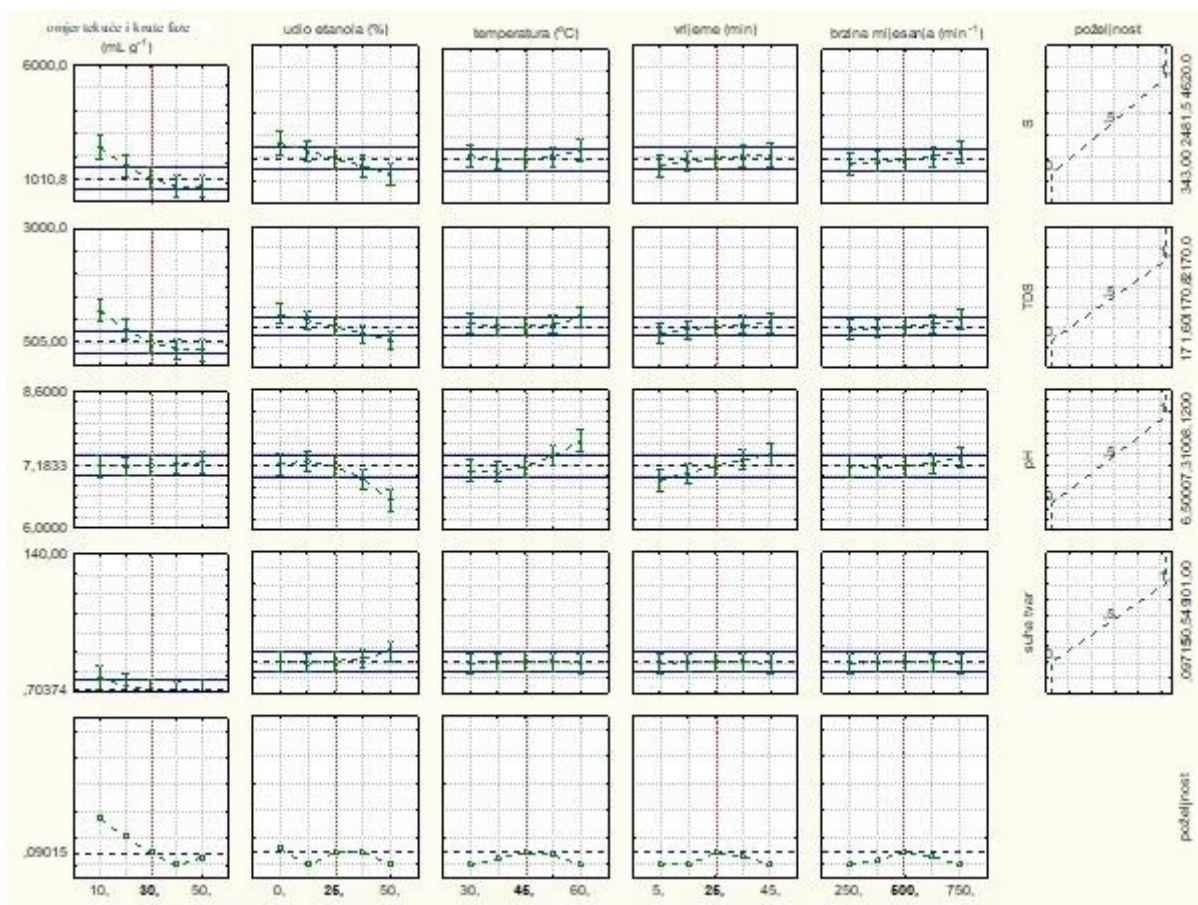
Jokić i sur. (2010) su ispitivali utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih polifenola (UF) iz mljevene soje sorte Ika. Rezultati pokazuju da je najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta primjenom 50 %-tne vodene otopine etanola pri $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $t = 60\text{ min}$ ($\text{UF} = 3,045\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$) u odnosu na udio ukupnih polifenola dobiven korištenjem vode kao otapala ($\text{UF} = 1,119\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Slični rezultati dobiveni su, u ovom radu, u eksperimentu 26 pri $t = 25\text{ min}$, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 0 % udjela etanola ($\text{UF} = 12,633\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$) te eksperimentu 27 pri $t = 25\text{ min}$, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 50 % udjela etanola ($\text{UF} = 22,520\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Iz navedenog zaključujemo da je vodena otopina etanola uspješnije otapalo u odnosu na vodu.

Dent i suradnici (2013) su, u svom radu, također ispitivali utjecaj vremena ekstrakcije, temperature i vrste otapala na ekstrakciju ukupnih polifenola porijeklom iz lista kadulje. Najveći udio ukupnih polifenola ($\text{UF} = 6278,12 \pm 109,08\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ odn. $\text{UF} = 5496 \pm 100,24\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$) dobiven je pri $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, tijekom 30 minuta, primjenom 30 %-tnih vodenih otopina etanola i acetona u odnosu na udio ukupnih polifenola dobiven korištenjem vode kao otapala ($\text{UF} = 5170,62 \pm 110,52\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Raznim istraživanjima pokazalo se da je izbor otapala bitan parametar ekstrakcije koji ovisi o svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Budući da se upotrebom vode kao otapala dobiva ekstrakt sa visokim sadržajem nečistoća (šećer, proteini, organske kiseline), a čista otapala (alkohol) smanjuju učinkovitost ekstrakcije, najbolje rješenje je kombinacija vode s drugim organskim otapalom. Takva kombinacija čini umjereno polarni medij koji će osigurati optimalne uvjete za ekstrakciju polifenola iz različitih biljnih materijala (Rafiee i sur., 2011).

4.2. Statistička obrada mjerenih podataka

4.2.1. Rezultati optimiranja uvjeta pokusa klasične ekstrakcije s obzirom na kemijska i fizikalna svojstva

Cilj korištenja metode odzivnih površina bio je definirati optimalne uvjete klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje.

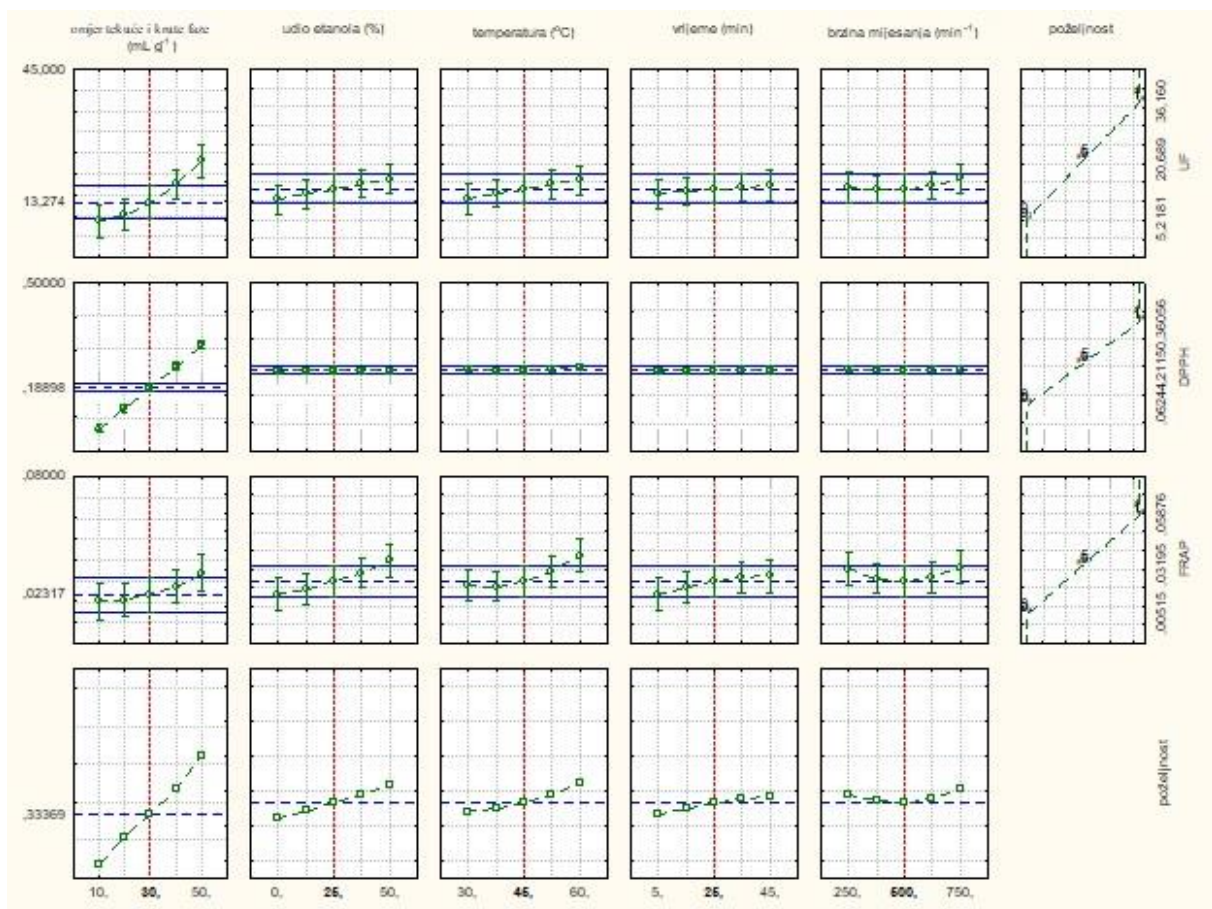


Slika 10. Rezultati optimiranja uvjeta pokusa klasične ekstrakcije s obzirom na fizikalna svojstva

Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti procesa klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje primijenjena je metoda odzivnih površina (RSM) na svakoj grupi svojstava zasebno. Metoda se temelji na definiranju minimuma odzivne površine koji predstavlja optimalne procesne uvjete. Rezultati su prikazani na slikama 10. i 11. kao dvodimenzionalni prikazi ovisnosti izlaznih varijabli i parametara procesa.

Na slici 10. vidimo prikaz zavisnosti izlaznih varijabli (fizikalna svojstva) i procesne parametre te procijenjene optimalne procesne parametre. Iz dobivenih pokusnih rezultata vidljivo je da optimalna vrijednost za vodljivost iznosi $1010,8 \mu\text{S cm}^{-1}$ dok je modelom predviđena vrijednost $S = 2481,5 \mu\text{S cm}^{-1}$. Za ukupne otopljene tvari optimalna vrijednosti iznosi $505,0 \text{ mg L}^{-1}$. (modelom previđena vrijednost je $170,82 \text{ mg L}^{-1}$). Povećanjem omjera tekuće i krute faze, te udjela etanola smanjuju se vrijednosti vodljivosti i TDS-a dok povećanjem temperature, vremena ekstrakcije i brzine miješanja ne dolazi do značajnog porasta njihovih vrijednosti. Dobiveni rezultati nam pokazuju da se pH nalazi u granicama od 6,00 do 8,60, dok optimalna vrijednost iznosi 7,18 (modelom dobivena vrijednost 7,31). Povećanjem omjera tekuće i krute

faze, brzine miješanja te vremena ekstrakcije ne dolazi do značajne promjene pH. Povećanjem udjela etanola u smjesi etanol/voda te temperature dolazi do značajnog smanjenja odnosno porasta pH vrijednosti. Optimalna vrijednost za suhu tvar iznosi 0,7037 % (dobivena vrijednost modelom iznosi 0,5490 %). Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da povećanjem vrijednosti ispitivanih procesnih parametara ne dolazi do značajne promjene vrijednosti postotka suhe tvari. Izračunati optimalni uvjeti procesa klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponenata porijeklom iz industrijske konoplje s obzirom na fizikalna svojstva su: $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 25\text{ min}$, brzina miješanja 500 rpm, omjer krute i tekuće faze 30 mL g^{-1} te udio etanola u smjesi etanol/voda 25 %.



Slika 11. Rezultati optimiranja uvjeta pokusa klasične ekstrakcije s obzirom na kemijska svojstva

Iz rezultata, prikazanih na slici 11, vidljivo je da se u pripremljenim ekstraktima industrijske konoplje prema planu pokusa udio ukupnih polifenola nalazi u intervalu od $\text{UF} = 0\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $\text{UF} = 45\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $\text{UF} = 13,274\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ (modelom predviđena vrijednost je $20,689\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Iz slike 11 uočava se da povećanje

vremena ekstrakcije, temperature i brzine miješanja nema značajnog utjecaja na porast udjela ukupnih polifenola, dok povećanje omjera otapala i uzorka te udjela etanola znatno utječe na porast udjela ukupnih polifenola. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom nalazi se u intervalu od $\text{DPPH} = 0 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $\text{DPPH} = 0,5 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je optimalna vrijednost $\text{DPPH} = 0,19 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ (modelom predviđena iznosi $0,21 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Povećanje udjela etanola u smjesi etanol/voda, temperature, brzine miješanja i vremena ekstrakcije ne utječe na porast antioksidacijske aktivnosti dok povećanje omjera otapala i tekuće faze znatno utječe na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom. Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom iznosi $\text{FRAP} = 0,02 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ (modelom dobivena vrijednost $0,03 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$). Povećanje vrijednosti parametara kao što su omjer otapala i uzorka, udio etanola, temperatura ekstrakcije i brzina miješanja znatno utječe na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu FRAP metodom. Izračunati optimalni uvjeti procesa klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponenata porijeklom iz industrijske konoplje s obzirom na kemijska svojstva: $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 25 \text{ min}$, brzina miješanja 500 rpm , omjer tekuće i krute faze 30 mL g^{-1} te udio etanola u smjesti etanol/voda 25 \% .

Wissam i sur. (2016) su ispitivali optimalne parametre procesa klasične ekstrakcije polifenolnih spojeva iz lista masline. Na temelju dobivenih rezultata optimalni uvjeti procesa iznosili su: $t = 2 \text{ h}$, udio etanola u smjesi etanol/voda $= 40 \text{ \%}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri navedenim optimalnim uvjetima udio ukupnih polifenola iznosio je $6,63 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$.

Cao i sur. (2016) ispitali su optimalne uvjete mikrovalne ekstrakcije ukupnih flavonoida (TF) iz lišća konoplje. Ispitan je utjecaj svakog parametra zasebno (udio etanola u smjesi etanol/voda: 40, 50, 60, 70, 80 %, omjer krute i tekuće faze: 20:1, 25:1, 30:1, 35:1 i 40:1, vrijeme ekstrakcije: 5, 10, 20, 30 i 40 min i temperatura: 40, 50, 60, 70 i 80 °C) na prinos ukupnih flavonoida. Sadržaj ukupnih polifenola je znatno porastao s povećanjem vremena ekstrakcije s 5 na 20 min, dok se preko 20 min sadržaj lagano smanjivao. To bi moglo biti posljedica raspada aktivnih spojeva tijekom produženog vremena ekstrakcije. Na temelju provedenog eksperimenta i primjene metode odzivnih površina (RSM), dobiveni optimalni uvjeti iznosili su: udio etanola $= 69,15 \text{ \%}$, omjer krute i tekuće faze $= 31,69 \text{ mL g}^{-1}$, $t = 25,14 \text{ min}$ i $T = 69,96 \text{ }^\circ\text{C}$. U tim uvjetima, maksimalni prinos TF bio je $3,04 \pm 0,62\%$. U ovom radu primjena RSM metodologije pokazala se uspješnom u modeliranju i optimiziranju postupka ekstrakcije TF-a iz lišća konoplje. Isto se pokazalo u ovom radu, gdje je RSM metodologija

uspješno primjenjena kako bi se definirali optimalni uvjeti klasične ekstrakcije: omjer krute i tekuće faze = 30 mL g⁻¹, udio etanola u otapalu = 25 %, vrijeme ekstrakcije = 25 min i temperatura ekstrakcije = 45 °C, a optimalni udio ukupnih polifenola iznosi UF = 13,274 mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹.

4.2.2. Analiza varijance (ANOVA)

Kako bi se ispitaio utjecaj ulaznih varijabli (parametara procesa klasične ekstrakcije) na izlazne varijable (fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata industrijske konoplje) primijenjena je analiza varijance (ANOVA). Rezultati su prikazani tabelarno, pomoću regresijskih koeficijenata i koeficijenata determinacije (R^2).

Tablica 5. Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenata za fizikalna svojstva ekstrakata industrijske konoplje

Analizirano svojstvo	Parametar	Odsječak ± standardna pogreška	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni) ± standardna pogreška	P	R ²	R ² adj.
S (μS cm ⁻¹)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	1578,944 ± 221,180	-871,813 ± 145,960(L) -265,625 ± 98,815(Q)	0,000(L) 0,011(Q)	0,680	0,588
	Udio etanola (%)		-667,062 ± 145,960(L) -1,125 ± 98,815(Q)	0,000(L) 0,991(Q)		
	Temperatura (°C)		128,688 ± 145,960(L) -157,458 ± 98,815(Q)	0,384(L) 0,120(Q)		
	Vrijeme (min)		234,500 ± 145,960(L) 42,167 ± 98,815(Q)	0,117(L) 0,672(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		259,438 ± 145,960(L) -44,042 ± 98,815(Q)	0,084(L) 0,659(Q)		
TDS (mg L ⁻¹)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	783,996 ± 107,998	-425,275 ± 71,219(L) -128,818 ± 48,249(Q)	0,000(L) 0,011(Q)	0,681	0,590
	Udio etanola (%)		-328,131 ± 71,219(L) 5,086 ± 48,249(Q)	0,000(L) 0,917(Q)		
	Temperatura (°C)		60,375 ± 71,219(L) -81,334 ± 48,249(Q)	0,403(L) 0,101(Q)		
	Vrijeme (min)		118,394 ± 71,219(L) 20,653 ± 48,249(Q)	0,106(L) 0,671(Q)		

	Brzina miješanja (min ⁻¹)		132,625±71,219 (L) -24,834±48,249(Q)	0,071(L) 0,610(Q)		
pH	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	7,180 ± 0,089	0,037±0,059(L) -0,018±0,039(Q)	0,527(L) 0,659(Q)	0,742	0,669
	Udio etanola (%)		-0,329±0,059 (L) 0,146±0,039 (Q)	0,000(L) 0,001(Q)		
	Temperatura (°C)		0,277±0,059 (L) -0,092±0,039 (Q)	0,000(L) 0,026(Q)		
	Vrijeme (min)		0,241± 0,059 (L) 0,008±0,039 (Q)	0,000(L) 0,839(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		0,079± 0,059 (L) -0,041±0,039 (Q)	0,185(L) 0,304(Q)		
Suha tvar (%)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	4,674 ± 5,539	-6,667±5,539(L) -3,207±2,474(Q)	0,077(L) 0,203(Q)	0,242	0,025
	Udio etanola (%)		6,198±3,655(L) -3,061±2,474(Q)	0,099(L) 0,224(Q)		
	Temperatura (°C)		0,101±5,539(L) 1,028±2,474(Q)	0,978(L) 0,680(Q)		
	Vrijeme (min)		0,138±5,539(L) 1,154±2,474(Q)	0,970(L) 0,644(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		0,026±5,539(L) 1,108±2,474(Q)	0,994(L) 0,657(Q)		

Rezultati iz tablice 5. pokazuju da omjer krute i tekuće faze (omjer otapala i materijala) zajedno sa udjelom etanola u smjesi etanol/voda imaju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na TDS i vodljivost, što je i očekivano, budući da su ova dva parametra međusobno povezana, odnosno mjerenjem električne vodljivosti možemo procijeniti količinu ukupnih otopljenih tvari. Omjer tekuće i krute faze te udio etanola pokazuju obrnuto proporcionalnu ovisnost, što znači da njihovim povećanjem dolazi do smanjenja vrijednosti električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari.

Statističkom analizom eksperimentalnih podataka pokazalo se da suha tvar ne ovisi niti o jednom promatranom parametru.

Izmjerene pH vrijednosti ekstrakata industrijske konoplje pokazuju statistički značajnu ovisnost o udjelu etanola u smjesi etanol/voda, temperaturi i vremenu ekstrakcije s time da udio etanola pokazuje obrnuto proporcionalnu ovisnost, dok temperatura i vrijeme ekstrakcije pokazuju linearnu ovisnost.

Na temelju izračunatih koeficijenata determinacije možemo zaključiti kako dobiveni predikcijski modeli ne opisuju dobro utjecaj ispitivanih parametara na suhu tvar ($R^2 = 0,242$). Vrijednost koeficijenta determinacije za pH iznosi 0,742, za vodljivost 0,680 i za TDS 0,681,

što znači da postoji čvrsta veza između pH vrijednosti i promatranih parametara procesa ekstrakcije.

Tablica 6. Regresijski koeficijenti i koeficijenti determinacije dobiveni analizom primijenjenog Box-Behnken dizajna eksperimenata za kemijska svojstva ekstrakata industrijske konoplje

Analizirano svojstvo	Parametar	Odsječak ± standardna pogreška	Regresijski koeficijenti (L-linearni, Q-kvadratni) ± standardna pogreška	P	R ²	R ² adj.
UF (mg _{GAE} g _{s.t.} ⁻¹)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	15,719 ± 1,763	7,083 ± 1,164(L) -1,342±0,788(Q)	0,000(L) 0,097(Q)	0,603	0,490
	Udio etanola (%)		2,741±1,164(L) 0,074±0,788(Q)	0,024(L) 0,926(Q)		
	Temperatura (°C)		2,3687±1,164(L) 0,108±0,788(Q)	0,049(L) 0,892(Q)		
	Vrijeme (min)		1,156±1,164(L) 0,138±0,788(Q)	0,327(L) 0,862(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		1,104±1,164(L) -0,812±0,788(Q)	0,349172(L) 0,310083(Q)		
DPPH (mmol _{Trolox} g _{s.t.} ⁻¹)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	0,193 ± 0,005	0,125±0,003(L) -0,001±0,002(Q)	0,000(L) 0,634(Q)	0,976	0,970
	Udio etanola (%)		0,001±0,003(L) 0,001±0,002(Q)	0,750(L) 0,525(Q)		
	Temperatura (°C)		0,004±0,003(L) -0,003±0,002(Q)	0,247(L) 0,233(Q)		
	Vrijeme (min)		0,003±0,003(L) 0,001±0,002(Q)	0,419(L) 0,707(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		-0,000±0,003(L) -0,001±0,002(Q)	0,899(L) 0,526(Q)		
FRAP (mmol _{FeSO4x7H2O} g _{s.t.} ⁻¹)	Omjer tekuće i krute faze (mL g ⁻¹)	0,035 ± 0,004	0,007±0,003(L) -0,002±0,002(Q)	0,012(L) 0,293(Q)	0,540	0,409
	Udio etanola (%)		0,009±0,003(L) -0,001±0,002(Q)	0,001(L) 0,514(Q)		
	Temperatura (°C)		0,008±0,003(L) -0,003±0,002(Q)	0,004(L) 0,098(Q)		
	Vrijeme (min)		0,0050±0,003(L) 0,0010±0,002(Q)	0,059(L) 0,578(Q)		
	Brzina miješanja (min ⁻¹)		0,000±0,003(L) -0,004±0,002(Q)	0,914(L) 0,040(Q)		

Analiziran je utjecaj omjera krute i tekuće faze, udjela etanola u smjesi etanol/voda, temperature, vremena ekstrakcije i brzine miješanja na kemijska svojstva dobivenih ekstrakata konoplje. Rezultati prikazani u Tablici 6. pokazuju statistički značajnu ovisnost ukupnih polifenola (UF) o omjeru krute i tekuće faze, udjelu etanola i temperaturi ekstrakcije dok vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja nemaju učinka na UF.

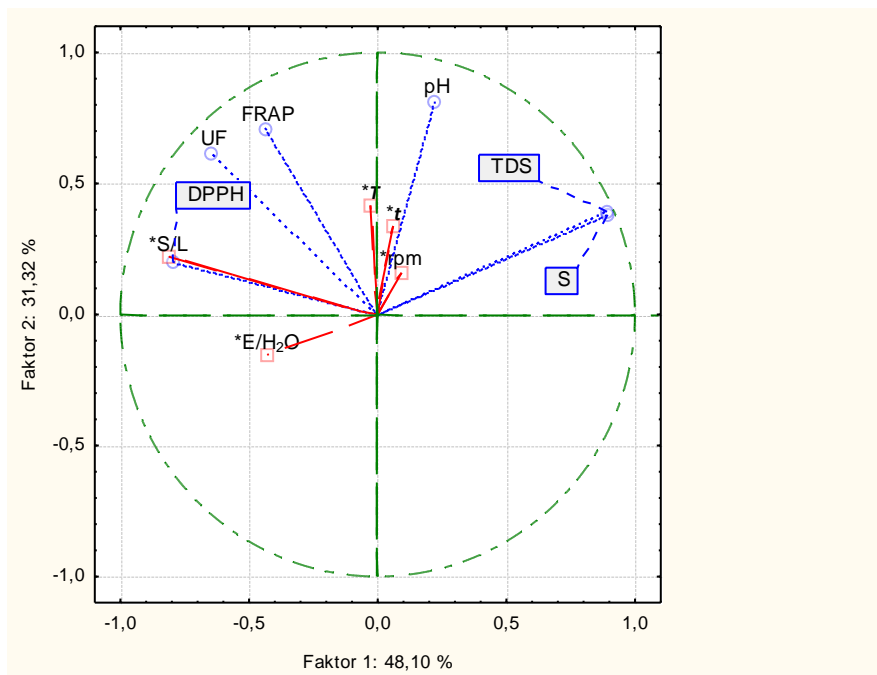
Što se tiče antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom, omjer krute i tekuće faze imao je statistički značajan učinak na promatrano kemijsko svojstvo, bez utjecaja drugih procesnih varijabli. Omjer krute i tekuće faze, udio etanola, temperatura i brzina miješanja značajno su utjecali na antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom pri čemu brzina miješanja pokazuje obrnuto proporcionalnu zavisnost dok preostala tri parametra pokazuju linearnu ovisnost.

Na temelju izračunatog koeficijenta determinacije možemo zaključiti kako dobiveni predikcijski modeli ne opisuju dobro utjecaj ispitivanih parametara na FRAP ($R^2 = 0,540$). Vrijednost koeficijenta determinacije za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom iznosi 0,976 što znači da postoji čvrsta između DPPH vrijednosti i promatranih parametara procesa ekstrakcije. Što se ukupnih polifenola tiče, predikcijski modeli dobro opisuju utjecaj ispitivanih procesnih parametara na vrijednosti UF-a ($R^2 = 0,603$).

4.3. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA (eng. Principal Component Analysis, PCA)

U ovom radu korištena je analiza glavnih komponenata (eng. Principal Component Analysis, PCA) za prikaz sličnosti i različitosti uzoraka ekstrakata industrijske konoplje, ovisno o mjerenim fizikalnim (vodljivost, TDS, pH) i kemijskim svojstvima (UF i antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH i FRAP metodom). PCA omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljnije analize fizikalnog ili kemijskog procesa. Primjenom PCA analize možemo vidjeti utjecaj promatranih varijabli procesa klasične ekstrakcije na fizikalna i kemijska svojstva dobivenih ekstrakata industrijske konoplje. Iz rezultata je vidljivo kako prva dva faktora opisuju 79,42 % varijance u promatranom skupu podataka ($PC1+PC2 = 79,42\%$). Ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH i FRAP metodom smjestili su se u drugom kvadrantu. Parametri koji opisuju fizikalna svojstva ekstrakata konoplje (vodljivost, ukupne otopljene tvari i pH) smjestili su se uprvom kvadrantu. Varijable procesa

kao što su brzina miješanja (rpm) i vrijeme ekstrakcije (t) smještene su u prvom kvadrantu, temperatura ekstrakcije (T) te omjer tekuće i krute faze (S/L) u drugom kvadrantu dok je udio etanola u smjesi etanol/voda (E/H_2O) smješten u trećem kvadrantu (slika 12). Povećanjem temperature ekstrakcije i omjera tekuće i krute faze povećat će se udio ukupnih polifenola a posljedično tome i antioksidacijska aktivnost ekstrakata konoplje određena DPPH i FRAP metodom. Povećanje udjela etanola u smjesi etanol/voda imat će za posljedicu smanjenje vrijednosti vodljivosti (S), ukupnih otopljenih tvari (TDS) i pH (slika 12)



Slika 12. Analiza glavnih komponentata i promatranih varijabli procesa klasične ekstrakcije biološki aktivnih komponentata iz industrijske konoplje

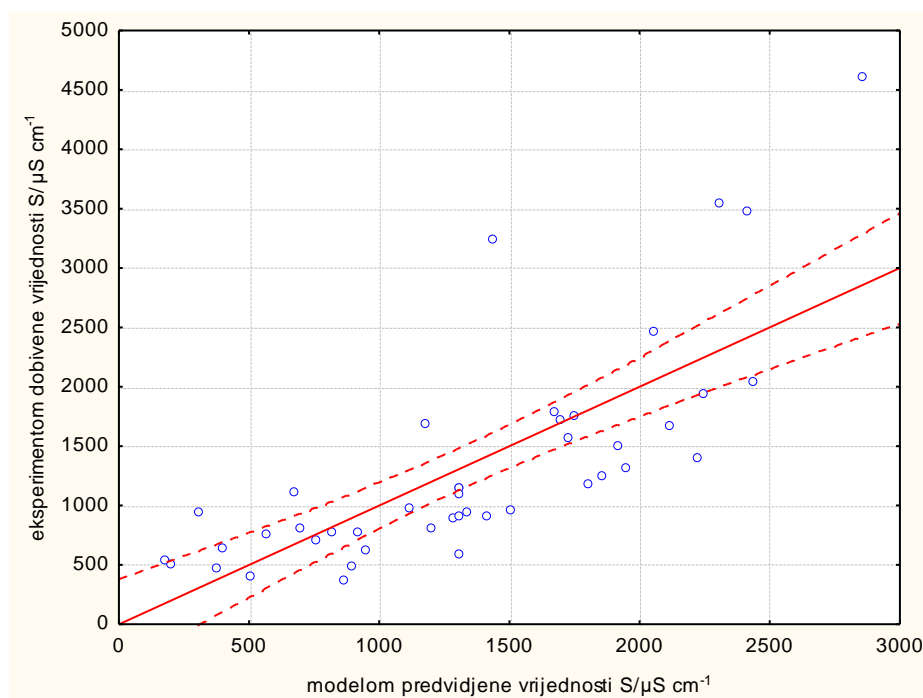
4.4. MODELI LINEARNE, NELINEARNE I LOKALNE LINEARNE REGRESIJE ZA ODREĐIVANJE FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE, PRIPREMLJENI POSTUPKOM KLASIČNE EKSTRAKCIJE

U ovom radu primijenjeni su modeli višestruke linearne regresije (Multiple Linear Regression, MLR), nelinearne regresije (Nonlinear Regression, NLR) i lokalne linearne regresije (Piecewise Linear Regression, PLR) za predviđanje fizikalnih (*TDS*, *S* i *pH*) i kemijskih (ukupni polifenoli, antioksidacijsko djelovanje određeno DPPH i FRAP metodom) svojstava ekstrakata industrijske konoplje dobivenih procesom klasične ekstrakcije kruto-tekuće, uzimajući u obzir procesne parametre (vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, omjer otapala i materijala, brzina miješanja i udio etanola u otapalu). Procijenjene vrijednosti parametara MLR, NLR i PLR modela za šest izlaznih varijabli prikazane su u tablicama 7-9 (parametar b_1 vezan je uz omjer krute i tekuće faze (omjer otapala i uzorka), parametar b_2 uz udio etanola u otapalu etanol/voda, parametar b_3 uz temperaturu ekstrakcije, parametar b_4 uz vrijeme ekstrakcije te parametar b_5 uz brzinu miješanja). Na slikama 13-18 prikazane su usporedbe eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti dobivenih pomoću primijenjenih modela za fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata konoplje. Koeficijent determinacije (R^2) označava udio protumačenog dijela zbroja kvadrata odstupanja od zbroja kvadrata ukupnih odstupanja zavisne varijable od srednje vrijednosti, te je stoga relativni pokazatelj reprezentativnosti regresije. Što je koeficijent determinacije bliži jedan, promatrani model je reprezentativniji (Ukrainczyk, 2010).

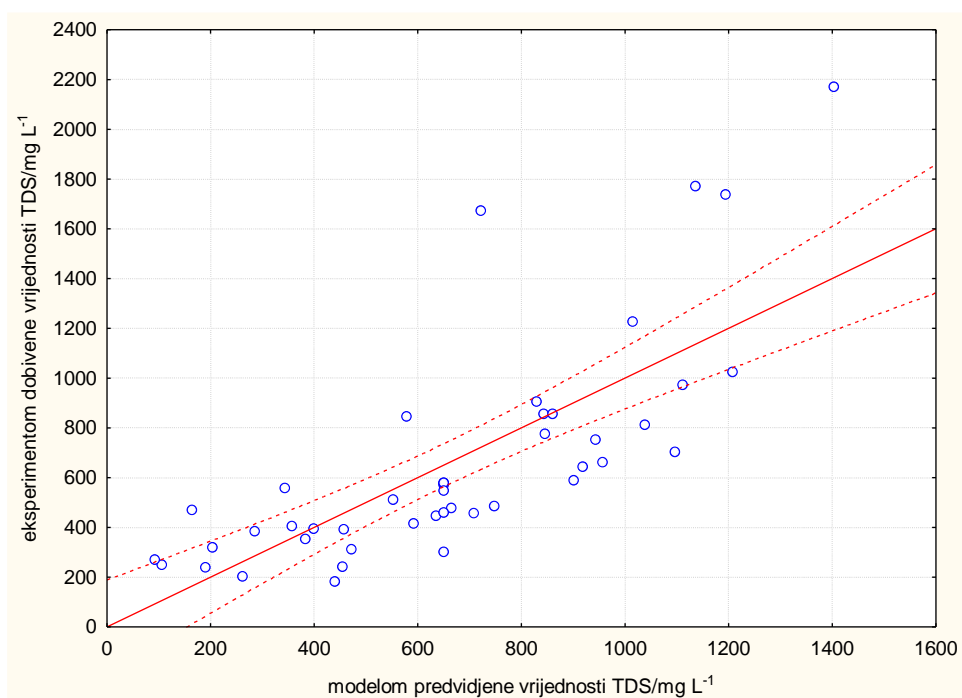
Tablica 7. Koeficijenti modela višestruke linearne regresije za predviđanje fizikalnih (*S*, TDS i pH) i kemijskih (UF, DPPH i ABTS) svojstava i koeficijenti determinacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (podebljane vrijednosti su statistički značajne za $p < 0,05$)

Zavisna varijabla	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	R^2
TDS	1022,240± 325,578	-21,264± 3,820	-13,125± 3,056	4,025± 5,093	5,920± 3,820	0,530± 0,306	0,581
S	2093,958± 664,237	-43,591± 7,794	-27,083± 6,235	8,579± 10,391	11,725± 7,794	1,038± 0,624	0,583
pH	6,162± 0,314	0,002± 0,004	-0,013± 0,003	0,019± 0,005	0,012± 0,004	0,000± 0,000	0,537
UF	-9,575± 4,932	0,354± 0,058	0,110± 0,046	0,158± 0,077	0,058± 0,058	0,004± 0,005	0,551
DPPH	-0,012± 0,014	0,006± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000	-0,000± 0,000	0,974
FRAP	-0,021± 0,011	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,001± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,430

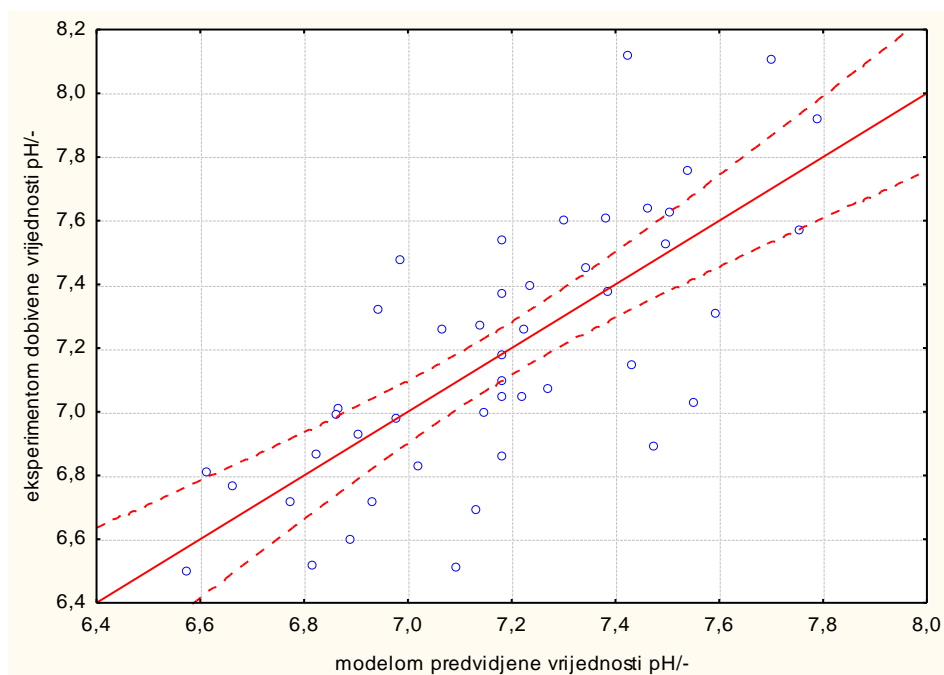
(a)



(b)

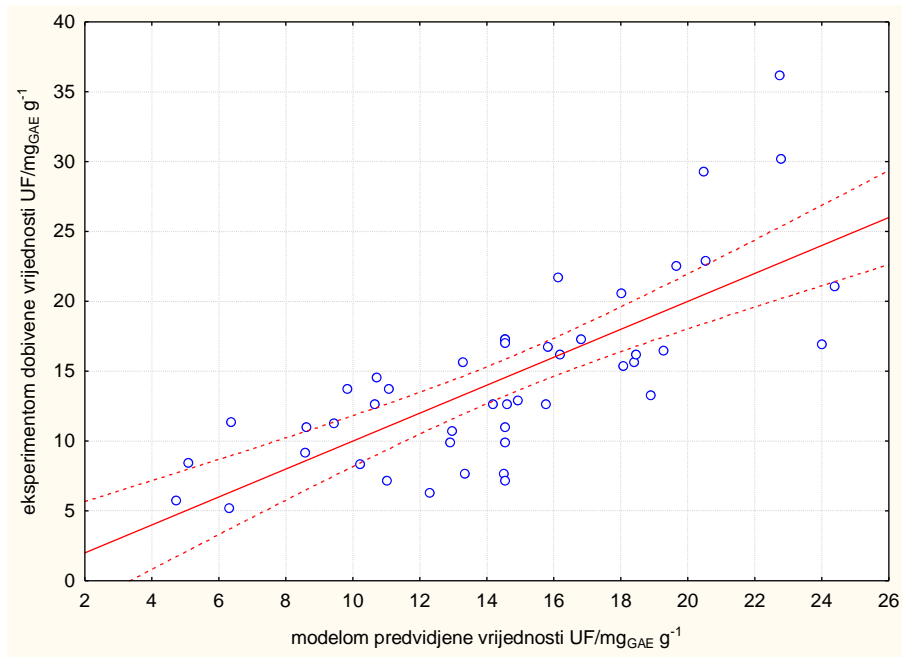


(c)

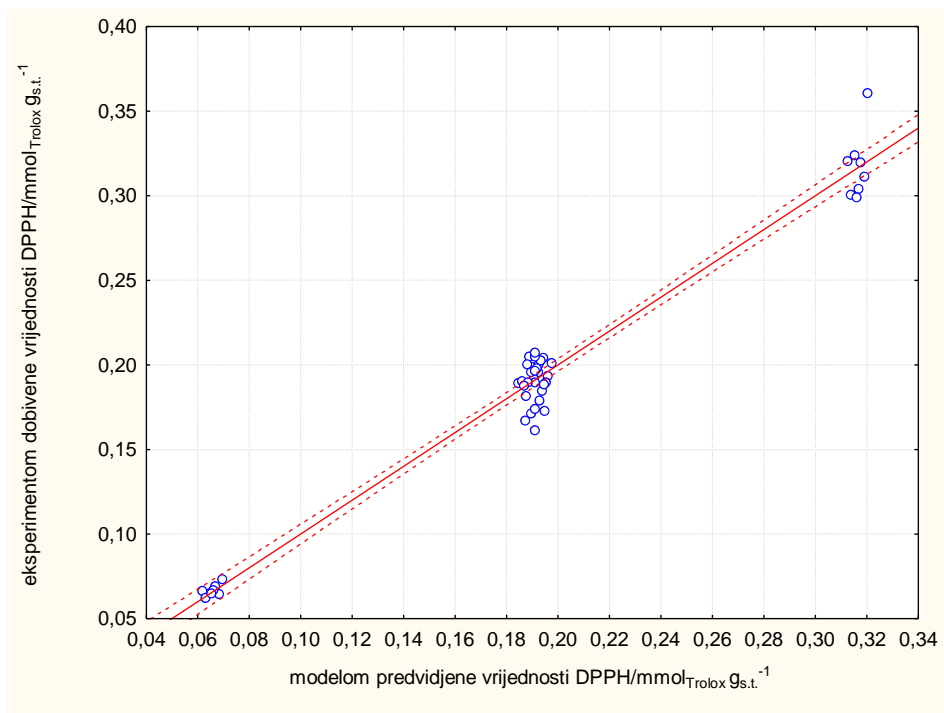


Slika 13. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (fizikalna svojstva) modela višestruke linearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije: (a) S, (b) TDS, (c) pH

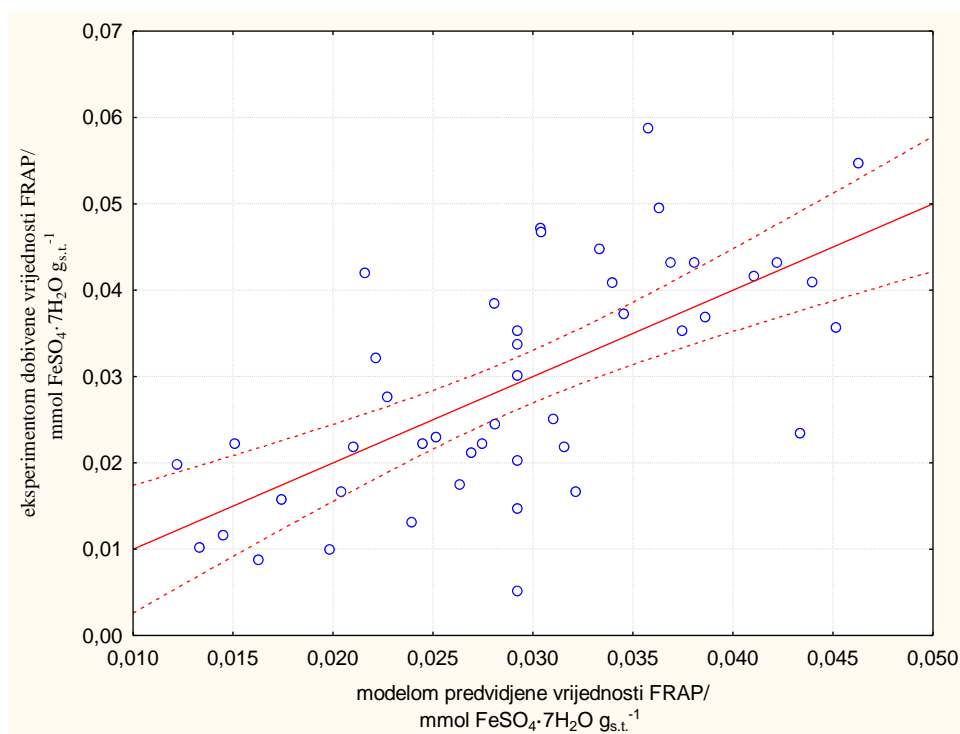
(a)



(b)



(c)



Slika 14. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (kemijska svojstva) i modela višestruke linearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije: (a) UF, (b) DPPH, (c) FRAP

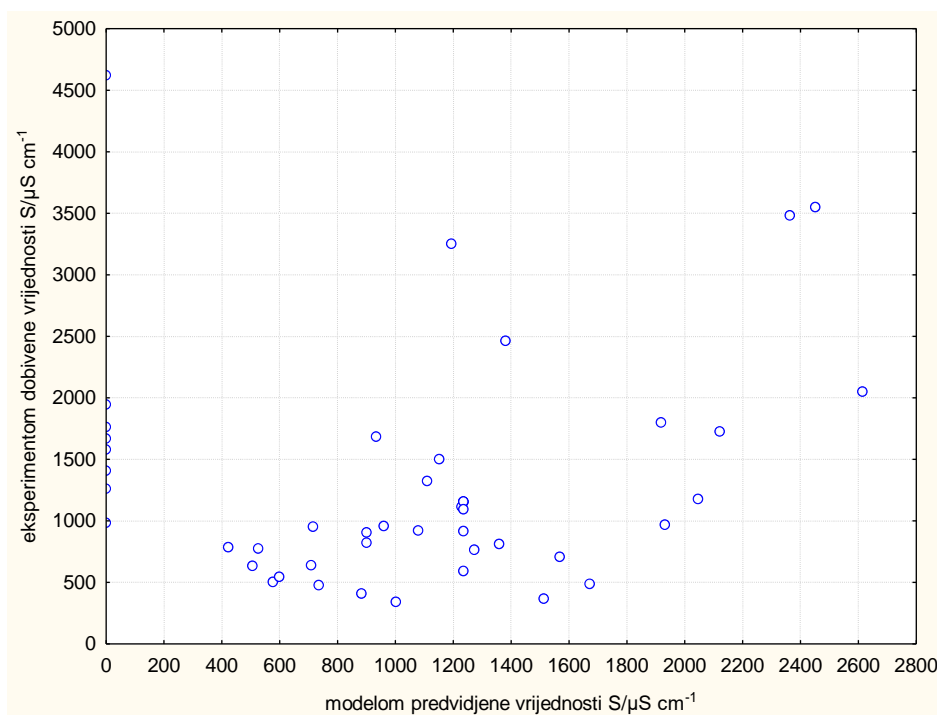
Model višestruke linearne regresije najbolje opisuje slaganje između eksperimentalno dobivenih i modelom predviđenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene DPPH metodom ($R^2 = 0,974$) (tablica 7) (slika 14b). Što se tiče ostalih fizikalno-kemijskih svojstava, koeficijent determinacije kreće se u rasponu od 0,430 do 0,583 što znači da primijenjeni model ne opisuje dobro eksperimentalno određene vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, te vodljivosti, TDS-a i pH (tablica 7).

Iz slika 13. (a, b, c) i 14. (a i c) također se vidi raspršenje eksperimentalnih točaka (S , TDS, pH, UF te FRAP) odn. eksperimentalne točke prelaze granice intervala pouzdanosti. Na temelju dobivenih rezultata zaključujemo da se model višestruke linearne regresije ne može primijeniti za predikciju fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje, osim u slučaju antioksidacijske aktivnosti dobivene DPPH metodom.

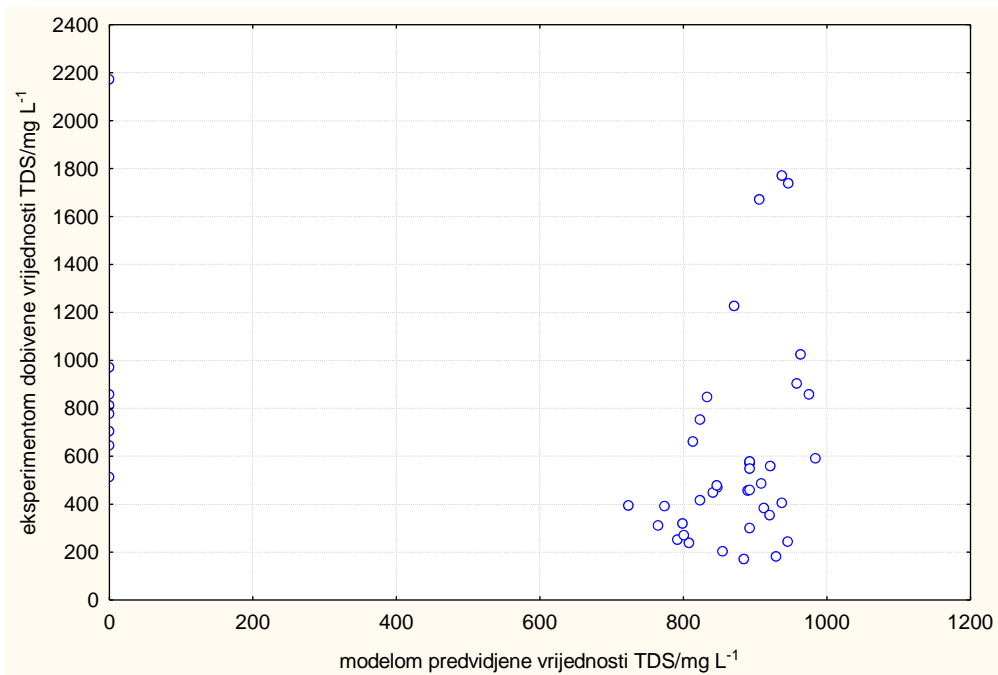
Tablica 8. Koeficijenti modela nelinearne regresije za predviđanje fizikalnih (*S*, TDS i pH) i kemijskih (UF, DPPH i ABTS) svojstava i koeficijenti determinacije (podebljane vrijednosti su statistički značajne za $p < 0,05$)

Zavisna varijabla	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	R^2
TDS	207,441	-0,0169	0,000	0,106	0,069	0,143	0,05
S	0,671	-0,407	0,00	0,829	0,344	0,746	0,02
pH	5,063	0,009	0,000	0,061	0,024	0,014	0,01
UF	0,027	0,762	0,131	0,449	0,070	0,225	0,39
DPPH	0,022	0,645	0,000	0,049	0,007	-0,027	0,28
FRAP	0,000	0,260	0,307	0,720	0,195	-0,139	0,31

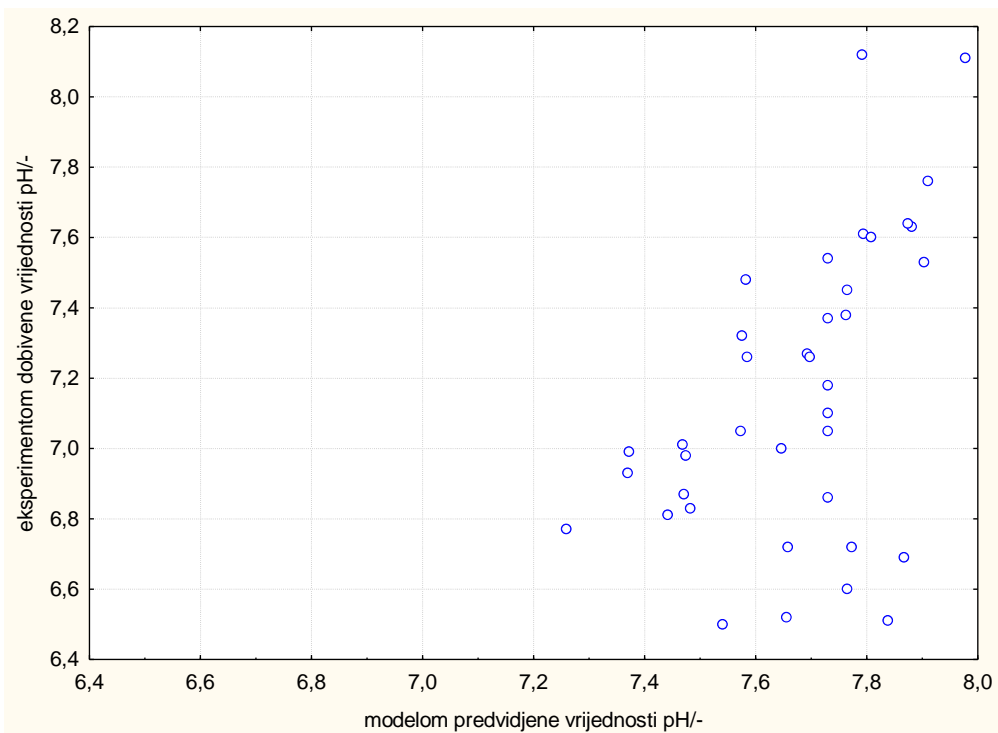
(a)



(b)

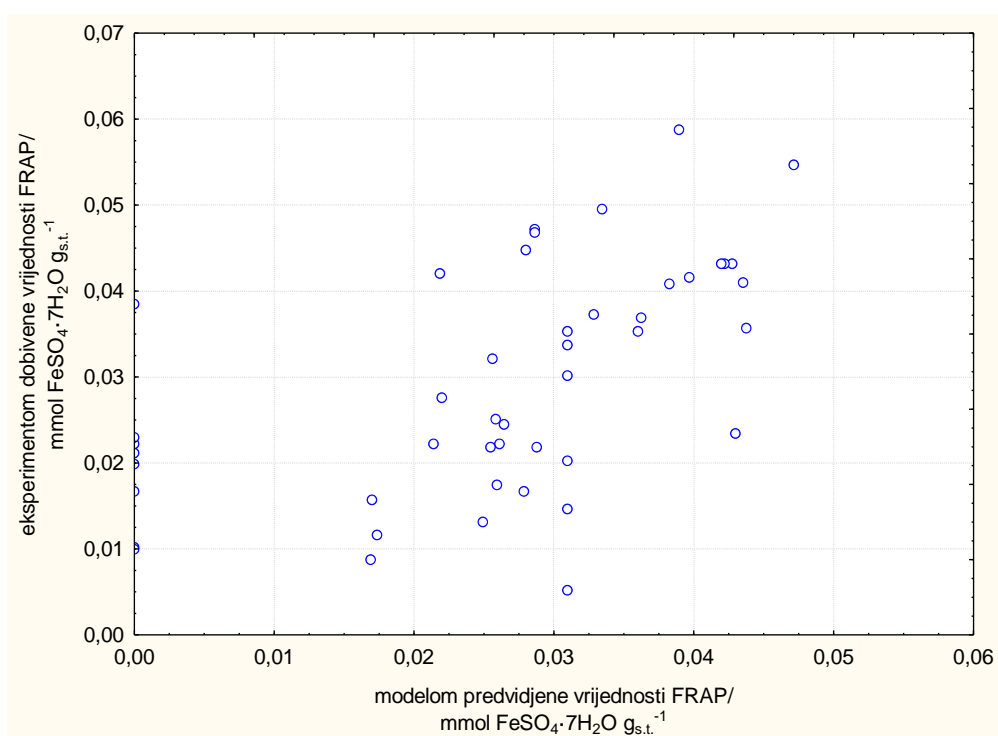


(c)



Slika 15. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (fizikalna svojstva) i modela nelinearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije: (a) S, (b) TDS, (c) pH

(c)



Slika 16. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (kemijska svojstva) i modela nelinearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije:

(a) UF, (b) DPPH, (c) FRAP

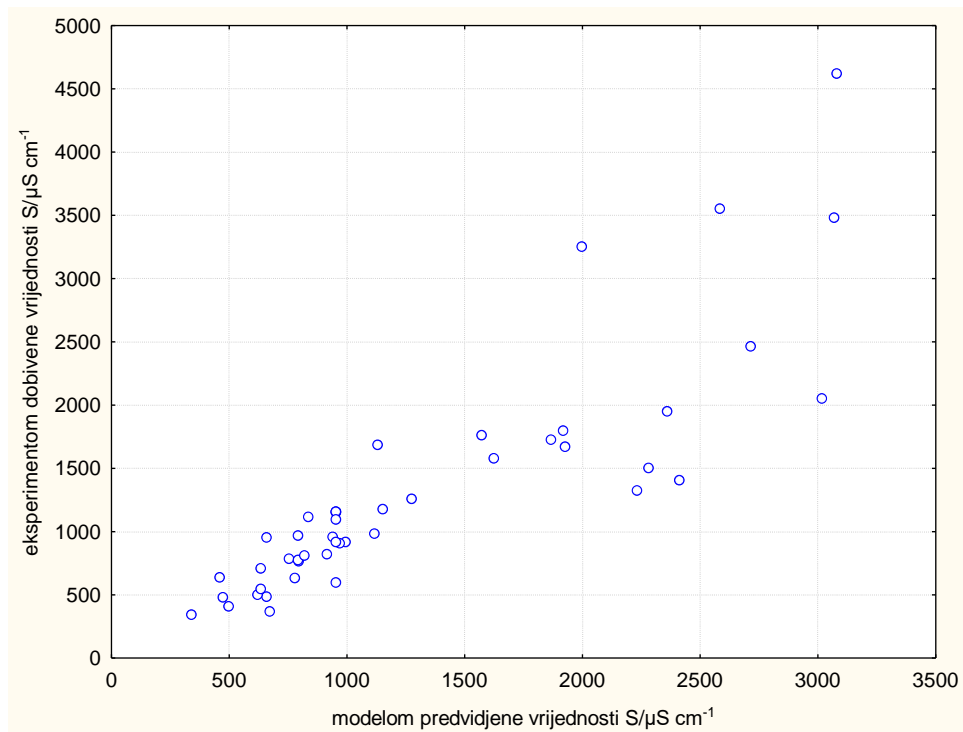
Na temelju rezultata prikazanih u tablici 8. te slikama 15 (a, b i c) i 16 (a, b i c) vidljivo je kako se model nelinearne regresije ne može primijeniti za opisivanje fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata konoplje. Vrijednosti koeficijenata determinacije kreću se u rasponu od 0,010 (pH) do 0,392 (UF).

Tablica 9. Koeficijenti modela lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih (*S*, TDS i pH) i kemijskih (UF, DPPH i ABTS) svojstava i koeficijenti determinacije

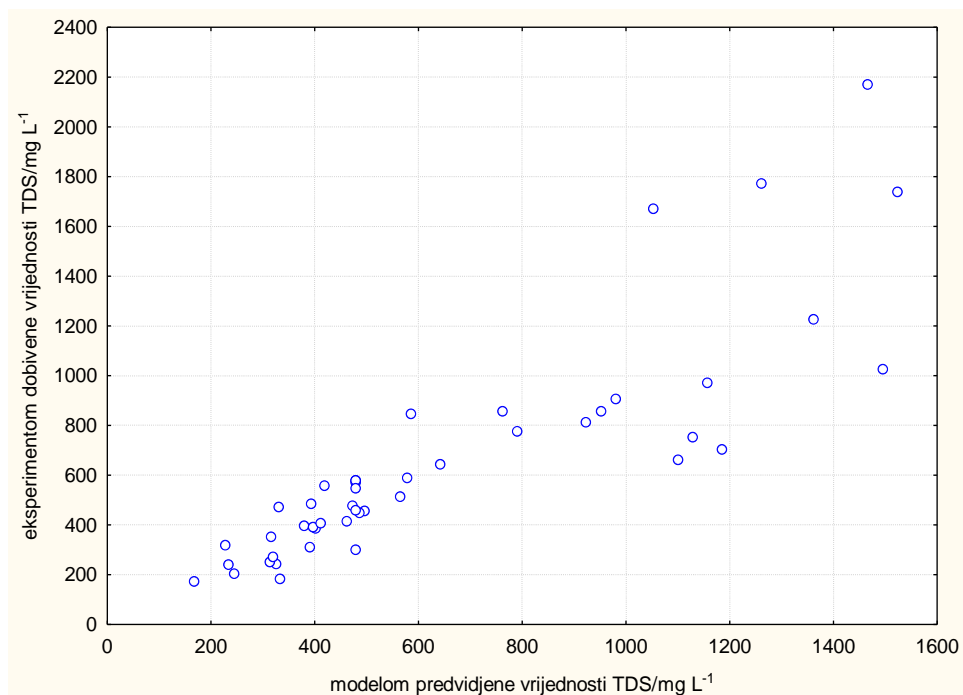
Zavisna varijabla	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_n	R^2
TDS	582,778	-5,657	-7,954	2,377	2,643	0,184	650,563	0,742
	1233,933	-24,631	-6,176	-3,366	10,587	0,732		
S	1159,137	-11,309	-15,505	4,534	5,358	0,369	1307,239	0,736
	2559,246	-54,316	-17,145	-4,378	20,971	1,472		
pH	7,061	0,001	-0,009	0,003	-0,001	-0,000	7,182	0,867
	6,365	0,000	-0,002	0,018	0,006	0,000		
UF	3,840	0,093	0,008	0,095	0,063	-0,004	14,550	0,763
	-2,657	0,381	0,010	0,121	-0,085	0,009		
DPPH	0,010	0,006	-0,000	-0,000	0,000	0,000	0,191	0,984
	0,002	0,006	-0,000	0,000	0,000	-0,000		

FRAP	-0,000 0,031	0,000 0,000	0,000 0,000	0,000 0,000	0,000 -0,000	0,000 -0,000	0,029	0,819
-------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------	-------	-------

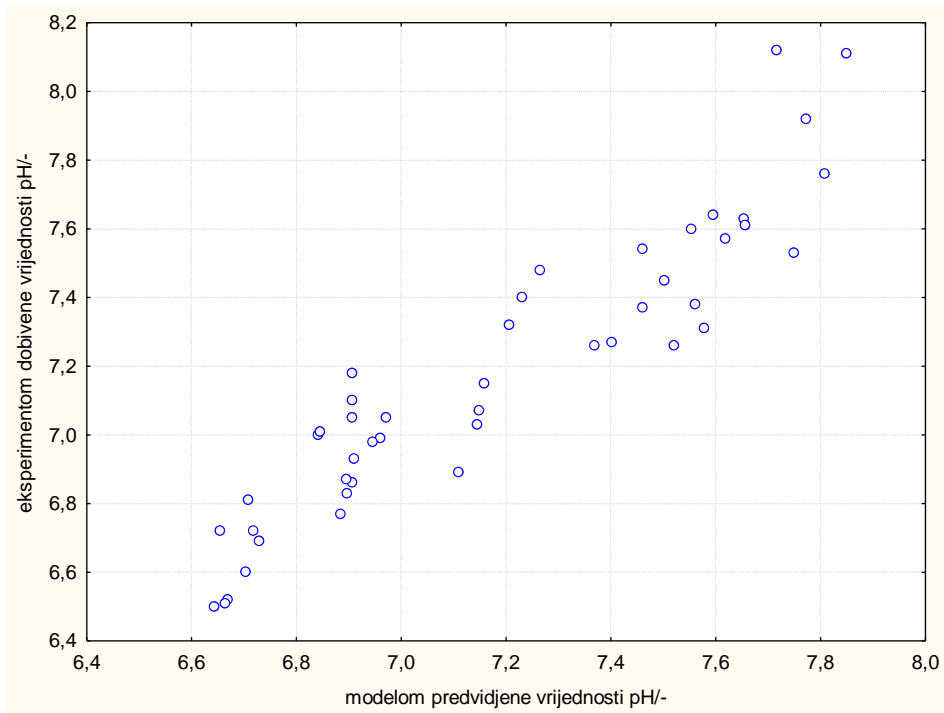
(a)



(b)

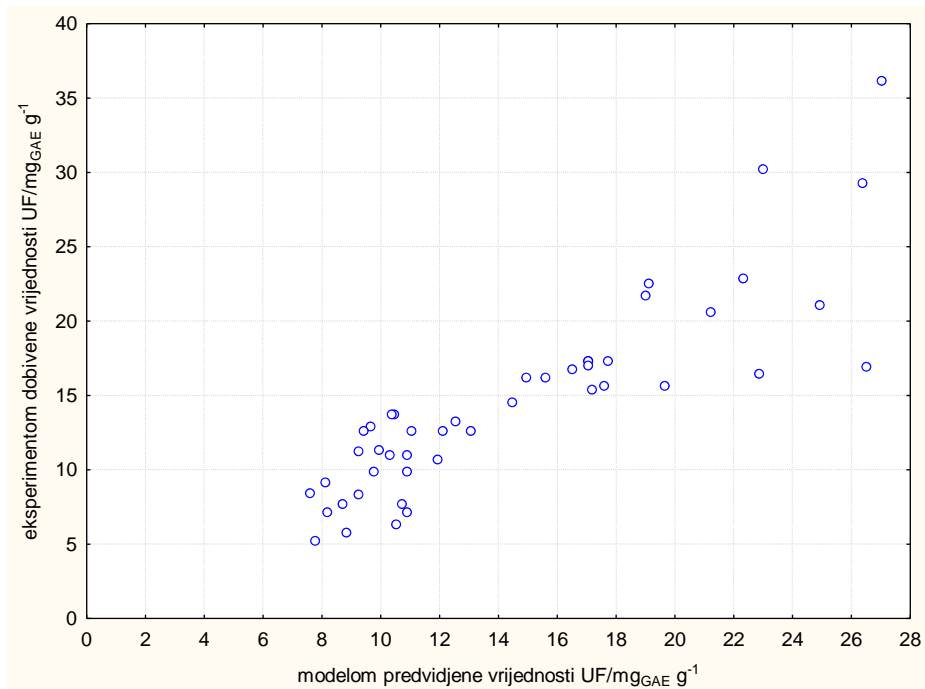


(c)

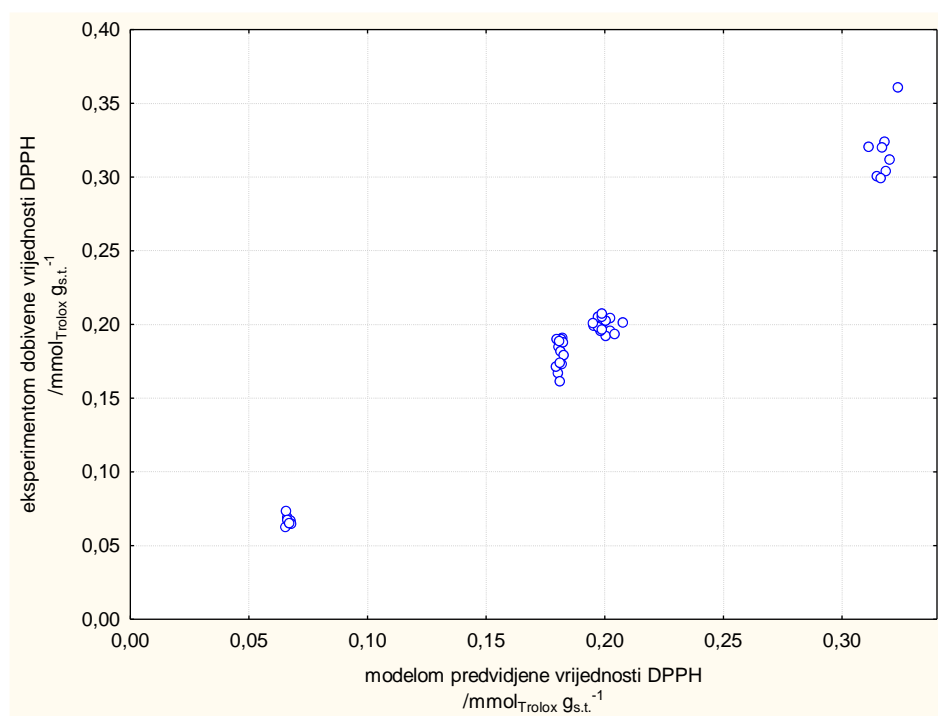


Slika 17. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (fizikalna svojstva) i modela lokalne linearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije: (a) S, (b) TDS, (c) pH

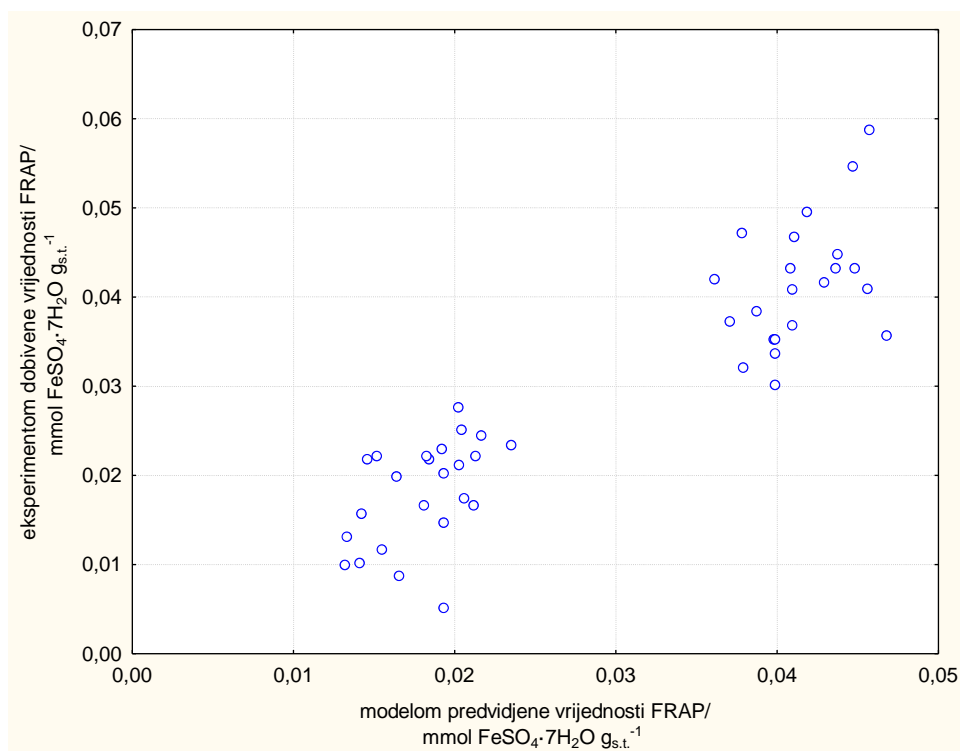
(a)



(b)



(c)



Slika 18. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti (kemijska svojstva) i modela lokalne linearne regresije ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije: (a) UF, (b) DPPH, (c) FRAP

Zbog niskih vrijednosti koeficijenta determinacije koji su dobiveni primjenom modela nelinearne regresije, razvijeni su modeli lokalne linearne regresije kako bi se predvidjela fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata na temelju promatranih parametara procesa klasične ekstrakcije. Lokalna linearna regresija omogućuje prilagodbu modela višestruke linearne regresije eksperimentalnim podacima, za različit raspon ulaznih varijabli. Glavna karakteristika modela lokalne linearne regresije je točka prijeloma (eng. breakpoint). Točke prijeloma su vrijednosti ulaznih varijabli gdje dolazi do promjene nagiba linearne funkcije. Regresijska funkcija na mjestu točke prijeloma može biti diskontinuirana ali se model može napisati na takav način da je funkcija kontinuirana u svim točkama, uključujući i točku prekida (Jurinjak Tušek i sur., 2018).

Na temelju izračunatih koeficijenta determinacije (tablica 9) možemo zaključiti kako model lokalne linearne regresije najbolje opisuje slaganje između eksperimentalno dobivenih i modelom predviđenih vrijednosti promatranih fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje. Numerički gledano, najveća vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je za antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom ($R^2 = 0,984$) (slika 18b) dok je najmanja vrijednost dobivena za vodljivost ($R^2 = 0,736$) (slika 17a).

Silva i sur. (2007) provodili su ekstrakciju fenolnih spojeva iz lišća *Inga edulis*. Analizirali su utjecaj temperature, vrijeme i udjela etanola na učinkovitost ekstrakcije ukupnih polifenola pomoću metodologije odzivnih površina (RSM). Također su u svom radu primijenili modele linearne i nelinearne regresije za predikciju udjela ukupnih polifenola na temelju promatranih parametara procesa. Na temelju dobivenih koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,85$ za višestruku linearnu i $R^2 = 0,991$ pri $T = 40$ °C za nelinearnu regresiju) autori su zaključili da se modeli mogu uspješno primijeniti za predikciju učinkovitosti ekstrakcije ukupnih polifenola iz lišće *Inga edulis*.

Jurina i sur. (2018) proveli su proces klasične ekstrakcije kruto-tekuće polifenolnih spojeva iz lavande, melise i metvice u šaržnom reaktoru uz kontinuirano miješanje i kontroliranu temperaturu. U svom radu primijenili su modele višestruke linearne regresije, nelinearne regresije, lokalne linearne regresije te umjetne neuronske mreže kako bi se analizirao utjecaj biljnih vrsta, vremena i temperature ekstrakcije na fizikalno-kemijska svojstva vodenih ekstrakata lavande, melise i metvice. Na temelju izračunatih koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,748$ za višestruku linearnu, $R^2 = 0,955$ za nelinearnu te $R^2 = 0,956$ za lokalnu linearnu regresiju), zaključili su da se regresijski modeli mogu uspješno primijeniti za predikciju fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata istraživanih biljaka.

4.5. UMJETNE NEURONSKE MREŽE (ANN)

Rezultati arhitektura izabranih mreža za predikciju fizikalnih (S , TDS, pH) i kemijskih (UF, antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodom) svojstava ekstrakata konoplje su prikazani u tablicama 10-13, dok su na slikama 19. i 20. prikazane usporedbe eksperimentalno dobivenih vrijednosti i ANN modelom predviđene vrijednosti izlaznih varijabli.

Tablica 10. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje S , TDS i pH ekstrakata industrijske konoplje dobivenih procesom klasične ekstrakcije

mreža	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
MLP 5-6-3	0,9804	0,6780	0,7980	0,0037	0,0557	0,0747	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
MLP 5-10-3	0,9706	0,7789	0,7580	0,0055	0,0515	0,0825	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
MLP 5-3-3	0,9496	0,7165	0,8187	0,0093	0,0557	0,0317	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
MLP 5-8-3	0,9599	0,6704	0,8984	0,0075	0,0628	0,0290	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
MLP 5-4-3	0,9665	0,8277	0,9056	0,0064	0,0409	0,0370	Tanh	Logistička funkcija

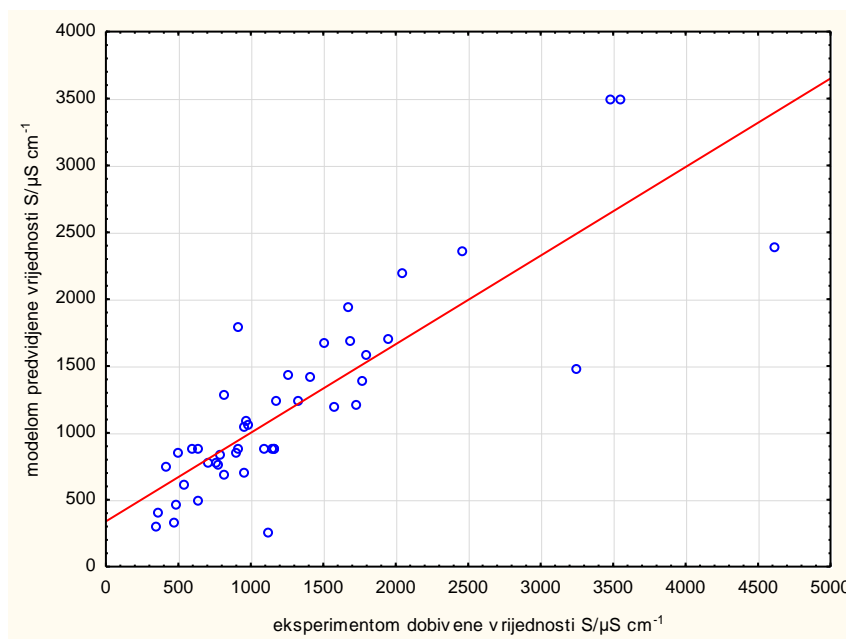
Tablica 11. Rezultati predviđanja S , TDS i pH ekstrakata idnustrijske konoplje pripremljenih klasičnom ekstrakcijom na temelju odabrane neuronske mreže MLP 5-10-3 (Tablica 10.)

	R^2		
	učenje	testiranje	Validacija
S	0,9857	0,7237	0,7565
TDS	0,9853	0,7459	0,7450
pH	0,9408	0,8669	0,7723

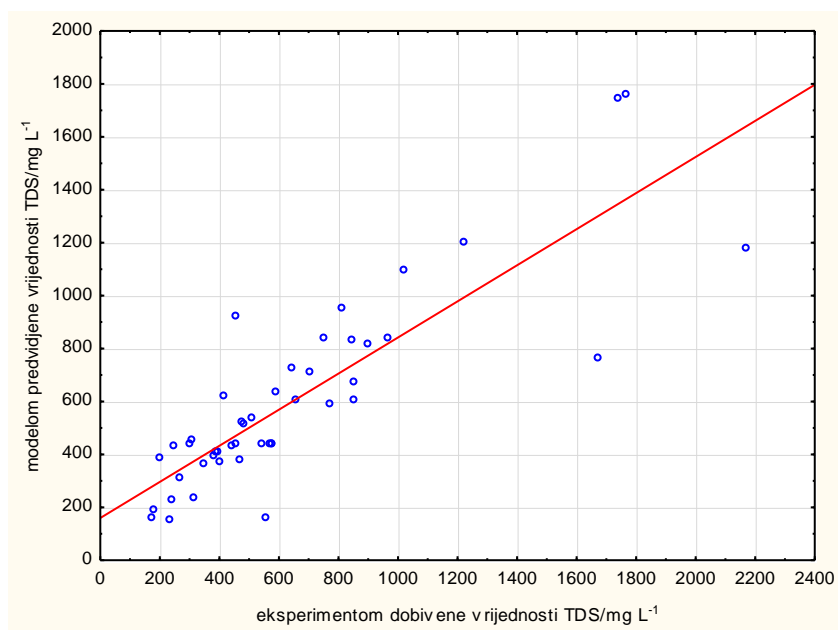
U tablici 10 su prikazane arhitekture izabranih mreža za predikciju fizikalnih svojstava ekstrakata konoplje. Podaci su bili raspodijeljeni na učenje, testiranje i validaciju prema omjeru 60:20:20, a broj neurona u skrivenom sloju bio je postavljen u rasponu od 3 do 10. Odabrano je po pet neuronskih mreža koje su imale najviše koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama. Za predviđanje fizikalnih svojstava pripremljenih

ekstrakata odabrana je mreža MLP 5-10-3 sa Eksponecijalnom funkcijom kao skrivenom aktivacijskom funkcijom i Funkcijom identiteta kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za ovaj model iznose $R^2 = 0,9706$, $R^2 = 0,7789$ odnosno $R^2 = 0,7580$. Rezultati predviđanja S , TDS i pH ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih klasičnom ekstrakcijom na temelju odabrane neuronske mreže MLP 5-10-3 (Tablica 11) pokazuju da su vrijednosti R^2 neuronskih mreža za električnu vodljivost vrlo slične onima za TDS, što je i očekivano. Što se tiče predikcije pH, vrijednosti koeficijenta determinacije za testiranje ($R^2 = 0,8669$) i validaciju ($R^2 = 0,7723$) su veće od R^2 vrijednosti koje su dobivene za TDS (0,7459 za testiranje odn. 0,7450 za validaciju) i S (0,7237 za testiranje odn. 0,7565 za validaciju) dok su dobivene veće R^2 vrijednosti za učenje za predikciju S (0,9857 za učenje) i TDS (0,9853), u odnosu na pH (0,9408 za učenje) (tablica 11). Iz dobivenih rezultata zaključujemo da je model neuronske mreže uspješno primjenjiv za predikciju fizikalnih svojstava ekstrakata industrijske konoplje.

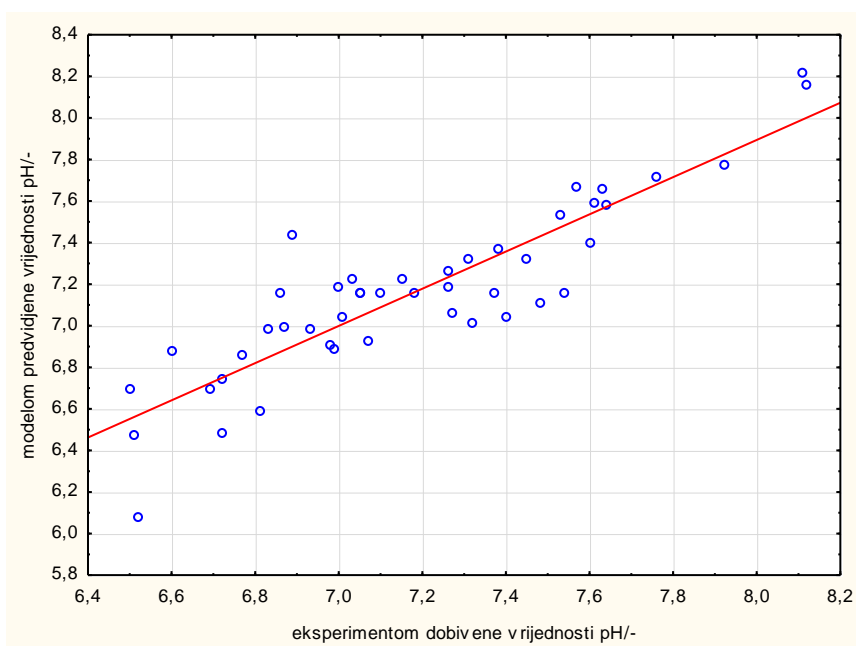
(a)



(b)



(c)



Slika 19. Usporedba između eksperimentalno dobivenih podataka i ANN modelom predviđenih vrijednosti za (a) S (b) TDS i (c) pH ekstrakata industrijske konoplje dobivenih procesom klasične ekstrakcije

Tablica 12. Karakteristike modela odabranih umjetnih neuronskih mreža (ANN) razvijenih za predviđanje UF i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom ekstrakata industrijske konoplje dobivenih procesom klasične ekstrakcije

mreža	Preciznost učenja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Pogreška učenja	Pogreška testiranja	Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
MLP 5-11-3	0,8539	0,7495	0,8333	0,0214	0,0349	0,0534	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
MLP 5-11-3	0,8426	0,7139	0,8757	0,0223	0,0393	0,0629	Tanh	Funkcija identiteta
MLP 5-10-3	0,8651	0,7532	0,8680	0,0202	0,0332	0,0522	Eksponecijalna funkcija	Tanh
MLP 5-9-3	0,8962	0,7624	0,8317	0,0169	0,0330	0,0619	Logistička funkcija	Logistička funkcija
MLP 5-9-3	0,8918	0,7413	0,8108	0,0163	0,0362	0,0612	Tanh	Logistička

Tablica 13. Rezultati predviđanja UF i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom ekstrakata idnustrijske konoplje pripremljenih klasičnom ekstrakcijom na temelju odabrane neuronske mreže MLP 5-9-3 (Tablica 12.)

	R^2		
	učenje	testiranje	validacija
UF	0,8863	0,8150	0,8725
DPPH	0,9765	0,9515	0,9781
FRAP	0,8258	0,5208	0,6446

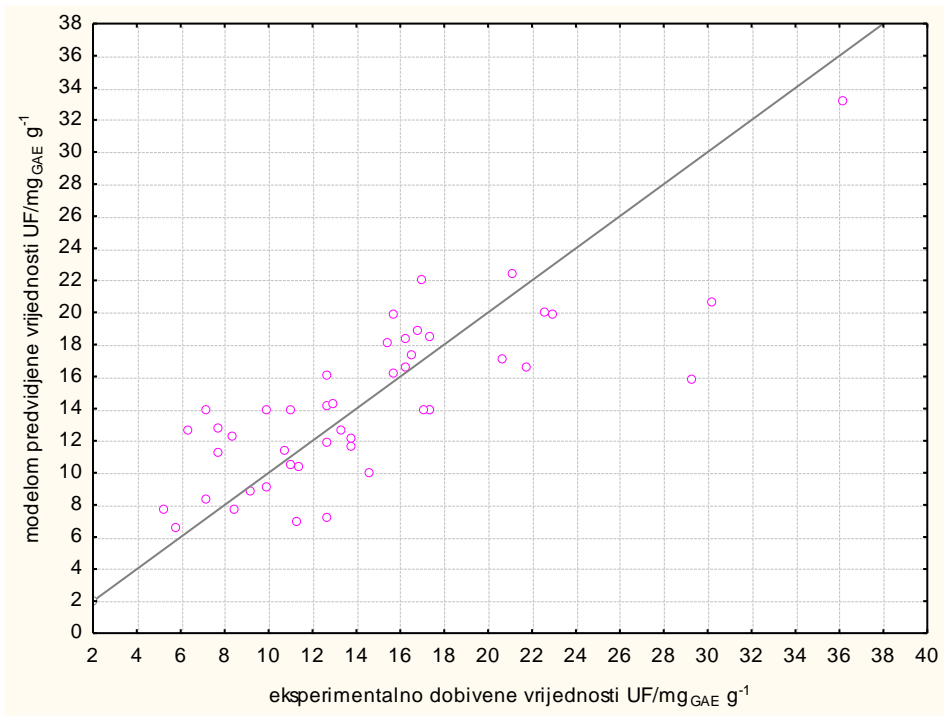
Tablica 12 prikazuje arhitekture izabranih mreža za predikciju kemijskih svojstava (UF, antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodama) ekstrakata konoplje. Podaci su bili raspodijeljeni na učenje, testiranje i validaciju prema omjeru 70:15:15, a broj neurona u skrivenom sloju bio je postavljen u rasponu od 3 do 10. Odabrano je po pet neuronskih mreža koje su imale najviše koeficijente determinacije za učenje, testiranje i validaciju s najmanjim pogreškama. Za predviđanje kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata odabrana je mreža MLP 5-9-3 sa Logističkom funkcijom kao skrivenom aktivacijskom te Logističkom funkcijom kao izlaznom aktivacijskom funkcijom. Preciznosti učenja, testiranja i validacije za ovaj model iznosile su $R^2 = 0,8962$, $R^2 = 0,7624$ te $R^2 = 0,8317$.

Na temelju dobivenih koeficijenata determinacije (Tablica 13.) za učenje, testiranje i validaciju može se zaključiti da je metoda za predikciju ukupnih polifenola (0,8863 za učenje, 0,8150 za testiranje i 0,8725 za validaciju) i antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom (0,9765 za učenje, 0,9515 za testiranje i 0,9781 za validaciju), uspješna. Uočen je pad vrijednosti koeficijenta determinacije kod antioksidacijske aktivnosti određenom FRAP metodom (0,8258 za učenje, 0,5208 za testiranje i 0,6466 za validaciju).

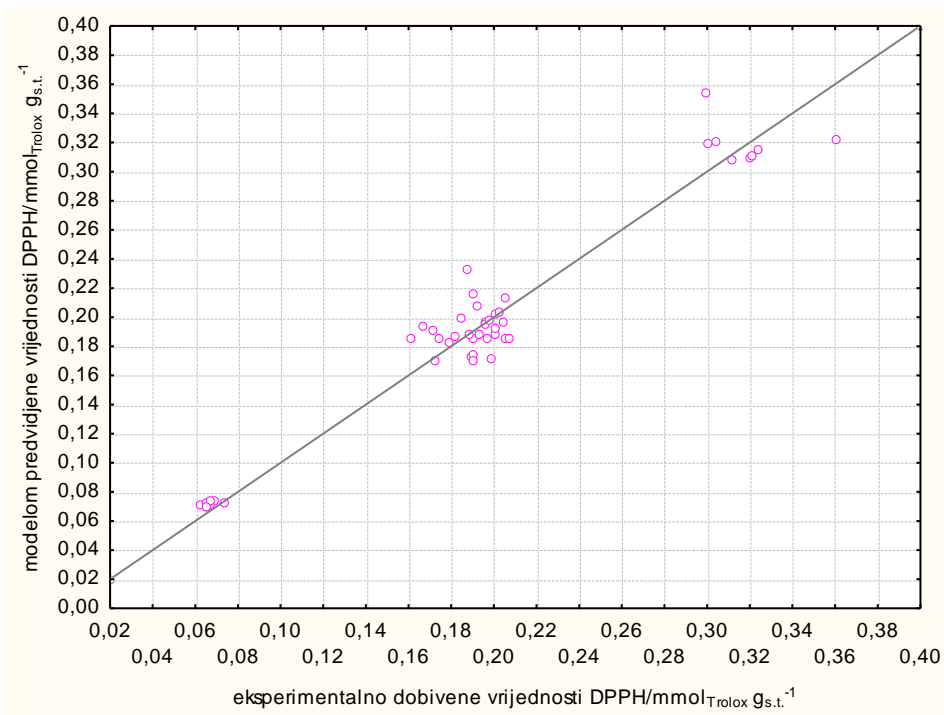
Na temelju rezultata prikazanih na slici 20 (a, b, c), vidljivo je da pojedine eksperimentalne točke odstupaju od modelom predviđenih vrijednosti. Ukoliko bi se ponovilo konstruiranje umjetne neuronske mreže bez točaka koje odstupaju, dobile bi se nove vrijednosti koeficijenata determinacije za učenje, testiranje i validaciju kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje. To ne znači nužno kako bi nova ANN mreža bila uspješnija u predviđanju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom.

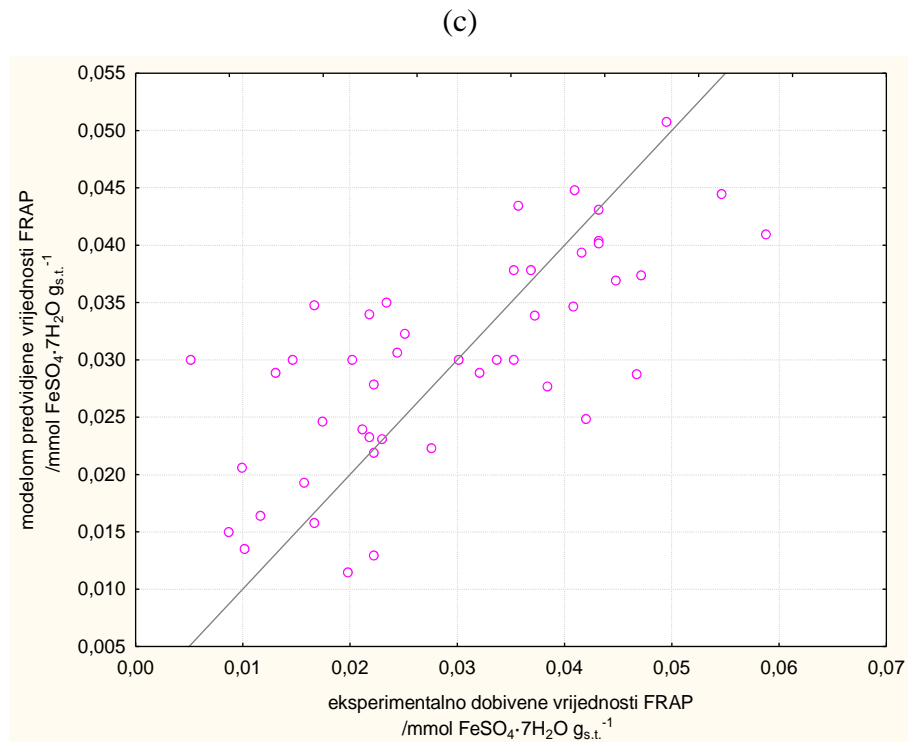
Xi i sur. (2013) su u svom radu primjenom procesa ekstrakcije pod visokim tlakom ekstrahirali polifenole iz zelenog čaja. Koristeći troslojnu umjetnu neuronsku mrežu, procijenili su učinak tlaka, omjera krute i tekuće faze i udjela etanola (ulazne varijable) na udio ukupnih fenola ekstrakata zelenog čaja (izlazna varijabla). Na temelju kombinacije neuronske mreže i genetskih algoritama određeni su optimalni ekstrakcijski uvjeti za najveći prinos polifenola zelenog čaja: 498,8 MPa za tlak, 20,8 mL g⁻¹ za omjer krute i tekuće faze i 53,6 % za koncentraciju etanola. Ukupni fenolni sadržaj stvarnog mjerenja pri optimalnim predviđenim uvjetima ekstrakcije bio je 582,4 ± 0,63 mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹, što se dobro podudara s predviđenom vrijednošću (597,2 mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹). Koeficijent determinacije ($R^2 = 0,9571$) ukazuje na odličnu povezanost između eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka što dovodi do zaključka da se model umjetne neuronske mreže može uspješno primijeniti za predviđanje ukupnog fenolnog sadržaja u ekstraktu zelenog čaja.

(a)



(b)





Slika 20. Usporedba između eksperimentalno dobivenih podataka i ANN modelom predviđenih vrijednosti za (a) UF i antioksidacijsku aktivnost mjerenu (b) DPPH i (c) FRAP metodama ekstrakata industrijske konoplje dobivenih procesom klasične ekstrakcije

5. ZAKLJUČCI

1. Najveća koncentracija polifenola u ekstraktima industrijske konoplje, dobivenih klasičnom ekstrakcijom, izmjerena je pri uvjetima procesa: omjer tekuće i krute faze = 50 mL g⁻¹, udio etanola u otapalu = 25 %, vrijeme ekstrakcije = 25 min, temperatura ekstrakcije = 45 °C i brzina miješanja = 750 rpm te iznosi UF = 36,160 mg_{GAE} g_{s.t.}⁻¹.
2. Optimalni uvjeti klasične ekstrakcije kruto-tekuće s obzirom na eksperimentalno određena fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata industrijske konoplje su: omjer tekuće i krute faze = 30 mL g⁻¹, udio etanola u otapalu = 25 %, vrijeme ekstrakcije = 25 min, temperatura ekstrakcije = 45 °C i brzina miješanja = 500 rpm
3. Udio etanola u otapalu etanol/voda ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na fizikalna svojstva kao što su vodljivost, ukupne otopljene tvari i pH. Omjer tekuće i krute faze (omjer otapala i materijala) ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom. Udio etanola u otapalu etanol/voda i temperatura ekstrakcije također imaju statistički značajan utjecaj na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom.
4. PCA analizom možemo zaključiti da povećanjem brzine miješanja dolazi do povećanja udjela ukupnih polifenola, a posljedično tome i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata konoplje. Povećanjem omjera tekuće i krute faze smanjit će se udio ukupnih polifenola, što će dovesti do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, dok povišenjem temperature udio ukupnih polifenola raste.
5. Na temelju koeficijenata determinacije može se zaključiti da višestruki linearni i nelinearni regresijski modeli nisu pouzdani za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata konoplje; iznimka je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom pri čemu koeficijent determinacije dobiven za višestruki linearni regresijski model iznosi $R^2 = 0,974$. Model lokalne linearne regresije najbolje opisuje slaganje između eksperimentalno dobivenih i modelom predviđenih vrijednosti promatranih fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata industrijske konoplje. Najveća vrijednost

koeficijenta determinacije dobivena je za antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom ($R^2 = 0,984$) dok je najmanja vrijednost dobivena za vodljivost ($R^2 = 0,736$).

6. Primjena umjetnih neuronskih mreža u predikciji fizikalnih (vodljivost, TDS i pH) i kemijskih (UF, DPPH i FRAP) svojstava industrijske konoplje na temelju procesnih parametara (omjer tekuće i krute faze, udio etanola u otapalu, temperatura, vrijeme ekstrakcije, brzina miješanja) pokazali su se pouzdanijima u odnosu na primijenjene linearne, nelinearne i lokalne linearne regresijske modele, što je vidljivo na temelju dobivenih koeficijenata determinacije. Koeficijenti determinacije za validaciju, za promatrana fizikalna svojstva, kretali su se u rasponu $R^2 = 0,7450 - 0,7723$, dok su se koeficijenti determinacije za validaciju, za promatrana kemijska svojstva, kretali u rasponu $R^2 = 0,6446 - 0,9781$. Umjetne neuronske mreže pokazale su se najpouzdanijima za predviđanje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ($R^2 = 0,9781$ za validaciju).

6. LITERATURA

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis *Wiley interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2** (4), 433-459.

Amato, F., López, A., Peña-Méndez, E. M., Vaňhara, P., Hampel, A., Havel, J. (2013) Artificial neural networks in medical diagnosis. *J. Appl. Biomed.* **11** (2), 47–58.

Andre, C. M., Hausman, J. F., Guerriero, G. (2016) Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.* **7**, str. 19.

Andre, C. M., Larondelle, Y., Evers, D. (2010) Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6** (1), 2–12.

Anderson-Cook, C.M., Borror, C.M., Montgomery, D.C. (2009) Response surface design evaluation and comparison. *J. Stat. Plan. Infer.* **139** (2), 629-641.

Anonymous 1 (2018) Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) <http://zdravljezasve.hr/html/zdravlje09_aktualno-c.html> Pristupljeno 26. kolovoza 2019.

Anonymous 2 (2019) <<https://eternalplants.com.au/resources/part-1-beginners-guide-cannabis-plant-classification/>> Pristupljeno 2. rujna 2019.

Anonymous 3 (2005) < <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> > Pristupljeno 26. kolovoza 2019.

AOAC (1995) Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, 16. izd., Arlington VA, USA.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957–998

Arts, I. C., Hollman, P. C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1), 317–325.

Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., Gnanaprakash, K. (2010) A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech Res.* **2** (2), 1276-1285.

Baş, D., Boyacı, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78** (3), 836-845.

Benzie, I. 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.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* **76** (5), 965-977.

Bondet, V., Brand-Williams, W. , Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**, 609–615.

Božić-Ostojić, Lj., Antunović, S., Vujčić, B., Martić, M. (2015) Industrijska konoplja – biljka prošlosti i budućnosti. 8th International scientific/professional conference „Agriculture in nature and environment protection, Vukovar, Hrvatska, str. 133-137.

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.

Brenneisen, R. (2007) Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *cannabis* constituents. U: Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine (ElSohly, M. A. ured.), Humana Press Inc., Totowa, New Yersey, str. 17–49.

Butorac, J. (2009) *Predivo bilje*, Kugler d.o.o., Zagreb, str. 22.

Cacace, J. E., Mazza, G. (2002) Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5939-5946.

Cajner, H. (2011) *Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa* (Doctoral dissertation, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje).

Callaway, J.C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica.* **140** (1-2), 65-72.

Cao, J., Hao, L., Zhang, L., Xu, M., Ge, H., Kang, C., Yu, J., Wang, Z. (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of Total flavonoids from China-hemp leaves and evaluation of its antioxidant activities. U: International Conference on Applied Biotechnology (Liu, H, Song, C., Ram, A., ured.), Springer, Singapore, str. 555-567.

Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113** (4), 859-871.

Cheng L., Kong D., Hu G. (2008) Study on hemp I. Chemical constituents from petroleum ether and n -butanol portions of the methanol extract. *Chin. J. of Pharm.* **39**, 101 – 103.

Dadić, Ž. (2012) Priručnik o temeljnoj kvaoci vode u Hrvatskoj. <http://www.waterline.hr/Prirucnik_za_vodu.pdf> Pristupljeno 26. srpnja 2019.

Dai, J. and Mumper, R. J., (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15** (10), 7313-7352.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na sastav i maseni udjel polifenola u ekstraktima samonikle dalmatinske kadulje (*Salvia officinalis* L.). *Food Technol. Biotech.* **51** (1), 84-91.

Dubreta, N. (2006.): Konoplja – sociološki aspekti uzgoja i upotrebe. Fakultet strojarstva i brodogradnje u Zagrebu.

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. U: Phytocannabinoids (Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J.) Springer, Switzerland, str. 1-36.

Eskilsson, S., Bjorklund E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A.* **902**, 227–250

Evans, F.J. (1991) Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Med.* **57**, 60–67.

Farag, S., Kayser, O. (2015) Cultivation and breeding of *Cannabis sativa* L. for preparation of Standardized Extracts for medicinal purposes. U: A. Mathe, Medicinal and aromatic plant of the world, str. 165-186.

Fishedick, J. T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2010) Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry.* **71** (17-18), 2058–2073.

Gagro, M. (1998.) Industrijsko i krmno bilje. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules.* **15** (12), 8813-8826.

Gazdek D. (2014) Marihuana u medicinske svrhe - javnozdravstveni apsekt, Liječnički vijesnik **236**, 192 – 199.

Gieringer, D., Rosenthal, E. (2008) *Marijuana medical handbook: practical guide to therapeutic uses of marijuana.* Quick Trading Company.

HAH (2015) Hrvatska agencija za hranu. <https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=44> Pristupljeno 26. kolovoza 2019.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.* **186**, 1–85.

Hampson, A. J., Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 8268–8273.

Hazekamp, A. (2007) *Cannabis; extracting the medicine*. Department of Pharmacognosy, (IBL), Faculty of Science, Leiden University.

Herceg, Z. (2011) *Procesi u prehrambenoj industriji, Plejada doo*, Zagreb.

Hsu, K.L., Gupta, H.V., Sorooshian, S. (1995) Artificial neural network modeling of the rainfall-runoff process. *Water Resour. Res.* **31** (10), 2517–2530.

Huang, Y., Kangas, L. J., Rasco, B. A. (2007) Applications of Artificial Neural Networks (ANNs) in Food Science. *Crit. Rev. Food Sci.* **47** (2) 113–126.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821–1835

ITIS (2018) ITIS – Integrated Taxonomic Information System, <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null> Pristupljeno 16.kolovoza 2019.

Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., Lukačević, I. (2008) Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologia Croatica.* **14**, 13–26.

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line. *Kem. Ind.* **62**, 71–80.

Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea Europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* **123** (1), 175-182.

Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010) Modelling of solid-liquid extraction process of total polyphenols from soybeans. *Czech J. Food Sci.* **28** (3), 206-212.

Jurina, T., Cvetković, A.M., Benković, M., Tušek, A.J., Valinger, D., Kljusurić, J.G. (2018) January. Application of linear, nonlinear and artificial neural network modeling for description of the medical plants extraction process. In *3rd Natural resources, green technology and sustainable development*, GREEN2018, Zagreb, 45-50.

Kandananond, K. (2010) Using the response surface method to optimize the turning process of AISI 12L14 steel. *Adv. Mech. Eng.* **2**, 362406.

Kaushik, R., Pradeeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci.Tech.* **47**, 27-33.

Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

Kormin, F., Ahmed, I., Yunus, R. M., Yusof, Z. A. M. (2010) The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *Inter. J. Eng. Technol.* **10**, 7-21.

Kriese U., Schumann E., Weber W. E., Beyer M., Brühl L., Matthäuse B. (2004) Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica.* **137**,339-351.

Kuštrak, D. (2005) *Farmakognozija: fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.

Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec V., Orsak, M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. Proceedings of Cereals for Human Health and Preventive. *Nutrition*. **7**, 118–125

Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*. **15** (5), 731-737.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem*. **93** (1), 47-56.

Lovrić J. (2001) Slobodni radikali i oksidativni stres. U: Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa, (Bradamante V, Lacković Z. ured.) Medicinska naklada, Zagreb, str. 1-12.

Mahlberg, P.G., Kim, E.S. (2004) Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *J. Ind. Hemp*. **9** (1), 15-36.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. **7** (9), 405-410.

Montgomery, D. C. (1997) Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons., NewYork

Mutalib, L.Y. (2015) Comparison between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* leaves. *Zanco J. Med. Sci*. **19** (2), 1029-1034.

Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed*. **41** (5), 1523-1542.

Pacher P, Batkai S, Kunos G (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev*. **58**, 389–462.

Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., Mandolino, G. (2008) Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*. **160**, 231–240.

Paić, A.T. (2012) Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Med Vjesn.* **44** (1-4), 147-162.

Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, 1-15.

Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., Benvenuti, S. (2018) New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*. **23** (10), 2639.

Pertwee R. G., Cascio M. G. (2014) Known Pharmacological Action of Delta-9Tetrahydrocannabinol and of Four Other Chemical Constituents of Cannabis that activate Cannabinoid Receptors. U: Handbook of Cannabis, Oxford University Press, New York ,str. 148 – 152.

Pfaff, S., Salopek, B. (2004) Primjena planiranja eksperimenata u oplemenjivanju mineralnih sirovina. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*. **16** (1), str. 97-106.

Pollastro, F., Minassi, A., Fresu, L.G. (2018) Cannabis phenolics and their bioactivities. *Curr. Med. Chem.* **25** (10), 1160-1185.

Pospišil, M. (2013) Ratarstvo, II. dio - industrijsko bilje, Zrinski d.d., Čakovec, str. 370.

Prior, R. L., Xu, X. (2013) Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am. J. Biomed. Sci.* **5** (2), 126-139.

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.

Ranalli, P. (1999) Agronomical and physiological advances in hemp crops (ed. Ranalli, P.). Advances in hemp research, The haworth press, str. 61-84.

Rapić V. (1994) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Bio. Med.* **49** (11), 1603-1616.

Ross, S. A., ElSohly, M. A., Sultana, G. N., Mehmedic, Z., Hossain, C. F., Chandra, S. (2005) Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochem. Analysis.* **16** (1), 45–48.

Ross, S. A., Mehmedic, Z., Murphy, T. P., ElSohly, M. A. (2000) GC-MS analysis of the total Δ^9 -THC content of both drug- and fiber-type *Cannabis* seeds. *J. Anal. Toxicol.* **4**, 715–717.

Rufino A. T., Ribeiro M., Sousa C., Judas F., Salgueiro L., Cavaleiro C., Mendes A. F. (2015) Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of Ecaryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **750**, 141 – 150.

Russo, E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Brit. J. Pharmacol.* **163** (7), 1344-1364.

Russo, E., Guy, G.W. (2006) A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med. Hypotheses.* **66** (2), 234-246.

Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (1), 215-217.

Schultes, R. E., Klein, W. M., Plowman, T., Lockwood, T. E. (1974) *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University.* **23** (9), 337-367.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods.* **18**, 820-897.

Sies H. (1991) Oxidative stress: introduction. U: Sies H (ur.), Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, CA, str. 15-22.

Sifaoui, I., Chammem, N., Abderrabba, M., Mejri, M. (2016) Optimization of phenolic compounds extraction from olive leaves using experimental design methodology. *J. Mater. Environ. Sci.* **7**, 1119-1127.

Sigler, W.A., Bauder, J. (2015) TDS Fact Sheet. *Montana State University*. Archived from the original on, 4-29.

Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007) Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* **55** (3), 381-387.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–179

Singh, N., Niyogi, R.G., Mishra, D., Sharma, M., Singh, D. (2013) Antioxidants in Oral Health and Diseases: Future Prospects. *J. Dental Med. Sci.* **10** (3), 36-40

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16** (3), 144-158.

Small E., Cronquist A. (1976) A practical and natural taxonomy for cannabis. *Taxon.* **25**, 405 – 435.

Small E., Marcus D. (2002) Hemp: A new crop with new uses for North America. U: Trends in new crops and new uses, (Janick J., Whipkey A., ured.), ASHS Press, Alexandria , str. 284-326.

Šimić, F., Katalinić, J., Babić, B. (1980) *Naše medonosno bilje*. Znanje.

Obranović, M., Ozmec, N.(2014) Konoplja: Praktični savjeti za zdravlje i ljepotu, Planetopija, Zagreb.

Tačković, K., Boras, V., Nikolovski, S. (2008) Kratkoročno prognoziranje opterećenja primjenom modela umjetne neuronske mreže. *Energija*. **57** (5), 560-579.

Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M. A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: *Extracting bioactive compounds from food products* (Meireles, M. A.A., ured.), Crc press, Taylor& Francis group, New york, str. 137-218.

Ukrainczyk, M. (2010) Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. **5** (3-4), 96-105.

Vardanega, R., Santos, D.T., Meireles, M.A.A. (2014) Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy Rev.* **8** (16), str. 88.

Veljković, V.B., Milenković, D.M. (2002) *Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (Hypericum perforatum L.): II. poređenje modela kinetike ekstrakcije.*

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. **16** (2-3), 97-110.

Wissam, Z., Ali, A., Rama, H. (2016) Optimization of extraction conditions for the recovery of phenolic compounds and antioxidants from Syrian olive leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **5**, 390-394.

Xu, B.J., Chang, S. K. (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* **72**, 159-166.

Xi, J., Xue, Y., Xu, Y., Shen, Y. (2013) Artificial neural network modeling and optimization of ultrahigh pressure extraction of green tea polyphenols. *Food Chem.* **141** (1), 320–326.

Izjava o izvornosti

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


Ime i prezime studenta