

Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Mrmić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:639454>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Lucija Mrmić
1296/USH

**EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ MEDITERANSKOG
BILJA PRIMJENOM UBRZANE
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI
POVIŠENOM TLAKU**

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

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za održivi razvoj Zavoda za opće programe te Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz mentorstvo prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević i mag. nutr. Marinele Nutrizio.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na srdačnoj pomoći pri pisanju rada. Također veliko hvala mag. nutr. Marineli Nutrizio pri pomoći u izradi eksperimentalnog dijela, savjetima, vremenu i uloženom trudu. Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na stručnosti i dijeljenju znanja vezano za ASE uređaj. Također, zahvaljujem kolegici Gregorović za pomoć kod analitičkog dijela rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima, a najviše roditeljima i dečku koji su uvijek vjerovali u mene i davali mi vjetar u leđa.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ MEDITERANSKOG BILJA PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Lucija Mrmić, 1296/USH

Sažetak: Kadulja (*Salvia officinalis* L.), maslina (*Olea europaea* L.) i origano (*Origanum vulgare* L.) su mediteranske biljke bogate antioksidansima. Za potrebe ovog diplomskog rada, provedena je ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz osušenih uzoraka kadulje, lista masline i origana. Cilj rada je ispitati učinkovitost ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) pri izolaciji bioaktivnih spojeva navedenog mediteranskog bilja, korištenjem različitih parametara temperature, broja ciklusa te statičkog vremena ekstrakcije. U dobivenim ekstraktima su spektrofotometrijski određeni ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP metodom) te parametri boje prema CIE L*a*b* sistemu boja. Optimalni uvjeti provođenja ASE ekstrakcije pri kojima je određen najveći udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost te najveće promjene boje u ekstraktima kadulje, lista masline i origana ostvareni su pri parametrima temperature 50 °C, statičkog vremena od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije. Najveći udio fenolnih spojeva izoliran je iz ekstrakta kadulje (34,22 mg GAE g⁻¹), zatim origana (29,53 mg GAE g⁻¹), a najmanji udio iz lista masline (19,14 mg GAE g⁻¹). Statističkom analizom dokazan je značajan utjecaj temperature, statičkog vremena i broja ciklusa na učinkovitost ekstrakcije.

Ključne riječi: *kadulja, list masline, origano, ASE ekstrakcija, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 55 stranica, 13 slika, 18 tablica, 70 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*. i mag. nutr. *Marinela Nutrizio*, Asistent na projektu

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
2. Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
4. Doc. dr. sc. Sven Karlović (zamjena)

Datum obrane: 13. srpanj 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of General Programs
Laboratory for Sustainable Development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM MEDITERRANEAN HERBS

Lucija Mrmić, 1296/USH

Abstract: Sage (*Salvia officinalis* L.), olive (*Olea europaea* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) are Mediterranean plants rich in antioxidants. For the purposes of this thesis, the extraction of bioactive compounds from dried samples of sage, olive leaves and oregano was performed. The aim of the study was to examine the efficiency of accelerated solvent extraction (ASE) for the isolation of bioactive compounds of this Mediterranean plants, using different parameters of temperature, number of cycles and static extraction time. In the obtained extracts, total phenols, antioxidant activity (DPPH and FRAP method) and color parameters according to the CIE L*a*b* color system were determined. Optimal conditions for ASE extraction were determined at temperature of 50 °C, static time of 3 min during 3 extraction cycles, in which the highest proportion of phenolic compounds, antioxidant activity and color changes in sage, olive leaf and oregano extracts were observed. The largest proportion of phenolic compounds was isolated from sage extract (34.22 mg GAE g⁻¹), followed by oregano (29.53 mg GAE g⁻¹) and the smallest proportion from olive leaf (19.14 mg GAE g⁻¹). Statistical analysis demonstrated a significant influence of temperature, static time and number of cycles on extraction efficiency.

Keywords: *sage, olive leaf, oregano, ASE extraction, phenolic compounds, antioxidant activity*

Thesis contains: 55 pages, 13 figures, 18 tables, 70 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 *Anet Režek Jambrak*, Full professor

Technical support and assistance: PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor and MSc of nutrition *Marinela Nutrizio*, Research assistant

Reviewers:

1. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
4. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 13th 2020

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Ekstrakcija.....	2
2.1.1	Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE – accelerated solvent extraction).....	4
2.2	Kadulja (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	7
2.2.1	Kemijski sastav kadulje	8
2.3	Maslina (<i>Olea europaea</i> L.)	9
2.3.1	Kemijski sastav masline.....	10
2.4	Origano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	10
2.4.1	Kemijski sastav origana	12
2.5	Fenolni spojevi	12
2.5.1	Fenolni spojevi mediteranskog bilja	13
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1	Materijali	15
3.2	Metode rada.....	15
3.2.1	Izolacija fenolnih spojeva primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE) ...	15
3.2.2	Spektrofotometrijsko odedivanje ukupnih fenola (UF)	18
3.2.3	Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	21
3.2.4	Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	23
3.2.5	Određivanje parametara boje po CIE L*a*b* sistemu boja.....	26
3.2.6	Statistička obrada podataka.....	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1	Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	30
4.2	Određivanje antioksidacijske aktivnosti dpph metodom	34
4.3	Određivanje antioksidacijske aktivnosti frap metodom.....	37
4.4	Određivanje parametara boje po cie l*a*b* sistemu boja.....	40
4.5	Statistička obrada podataka	46
5.	ZAKLJUČCI	48
6.	LITERATURA	49

1. UVOD

Maslina, kadulja i origano su prepoznati kao jedne od najznačajnijih mediteranskih biljaka koje se redovito koriste i konzumiraju u svježem ili osušenom obliku. Često se upotrebljavaju kao komponente talijanske, grčke i bliskoistočne kuhinje. Osim što se koriste kao začini, značajnu upotrebu pronalaze i u narodnoj medicini te konzerviranju hrane obzirom na njihovu snažnu antioksidacijsku aktivnost (Vinceković i sur., 2017).

U današnje vrijeme, trendovi u prehrani podrazumijevaju konzumiranje svježih, minimalno procesirane hrane bez dodanih pojačivača okusa, boja ili konzervansa. Doduše, neke vrste prehrambenih proizvoda nužno je očuvati dodatkom konzervansa pa se to nastoji učiniti sa konzervansima prirodnog podrijetla tj. onih koji su izolirani iz biljaka. Zbog navedenog razloga provode se razne ekstrakcijske tehnike uz različita ekstrakcijska otapala, kako bi se pronašla najučinkovitija metoda za izolaciju bioaktivnih sastojaka iz biljnog materijala, uz minimalne gubitke i korištenje malog volumena otapala (koje ima FDA GRAS status - generally recognized as safe). Konvencionalne tehnike ekstrakcije poput Soxhlet ekstrakcije ili metode maceracije poželjno bi bilo zamijeniti nekim novijim metodama ekstrakcije (kao što je to ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ASE - eng. Accelerated Solvent Extraction) obzirom da su učinkovitije, brže, automatizirane (što omogućuje veću reproducibilnost) te smanjuju utrošak energije i otapala čineći ih pogodnijima za očuvanje okoliša.

Cilj rada je ispitati učinkovitost ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) pri izolaciji fenolnih spojeva kadulje, lista masline i origana korištenjem različitih parametara temperature, broja ciklusa te statičkog vremena. Obzirom da ne postoji univerzalna metoda ekstrakcije fenola, ASE ekstrakcija je provedena pri nekoliko različitih parametara temperature (22 i 50 °C), statičkog vremena ekstrakcije (3 i 9 min) te broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3) uz 25 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo. U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH i FRAP metode te određivanje parametara boje prema CIE L*a*b* sistemu boja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je tehnološka operacija na osnovu koje se potpuno ili djelomično odjeljuju smjese tvari koje imaju različitu topljivost u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o mnogim faktorima poput topljivosti komponente u otapalu, temperaturi provođenja ekstrakcije, površini namirnice izloženoj otapalu, viskoznosti i volumnom protoku otapala (Raso i sur., 1995).

Provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama ubrzava sam proces ekstrakcije zbog bržeg otapanja komponente i veće brzine difuzije komponente u volumen otapala. Usprkos tome, temperature ekstrakcije rijetko prelaze 100 °C jer u suprotnom može doći do oštećenja komponenata koje želimo ekstrahirati ili ekstrakcije nepoželjnih tvari (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Također, dugo vrijeme ekstrakcije i visoka temperatura povećavaju mogućnost oksidacije fenola, što smanjuje prinos fenola u ekstraktu (Dai i Mumper, 2010). Budući da je brzina prijenosa mase proporcionalna površini namirnice, prije provođenja ekstrakcije poželjno je homogenizirati te usitniti uzorak do određenog stupnja (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Izbor otapala ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Treba obratiti pažnju na viskoznost otapala, koja mora biti dovoljno niska kako bi otapalo lakše prošlo kroz sloj krutih čestica, dok će veći protok otapala smanjiti granični sloj između površine čestica i koncentrirane otopine te tako postići veću brzinu ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Najčešće korištena otapala koja se koriste za ekstrakcije fenola su metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat, dimetilformamid, njihove smjese te njihove smjese s vodom (Escribano-Bailon i Santos Buelga, 2003).

Jedan od glavnih uzroka kvarenja hrane je oksidacija lipida (Gordon, 1991). Lipidna oksidacija rezultira stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala, koji su usko povezani sa karcinogenozom, mutagenozom, rekombinantnim promjenama DNA molekule, starenjem i kardiovaskularnim bolestima (Shahid i sur., 2008; Siddhuraju i Becker, 2003). Korištenje antioksidansa u lipidima i hrani koja sadrži lipide je jedna od metoda za

smanjivanje ranjivosti i usporavanje stvaranja otrovnih oksidacijskih produkata te veće sposobnosti da se održi nutritivna kvaliteta hrane te produži rok trajanja prehrambenih proizvoda (Maisuthisakul i sur., 2007). Sintetski antioksidansi, poput butiliranog hidroksi-anizola (BHA), butiliranog hidroksi toluena (BHT) i tert-butil hidrokinona (TBHQ) naširoko se koriste u prehrambenoj industriji, jer su učinkoviti i jeftiniji od prirodnih antioksidansa (Pin-Der i Gow-Chin, 1997). Međutim, njihova sigurnost je dovedena u pitanje. TBHQ je zabranjen u Japanu i nekim europskim zemljama dok se za BHA i BHT navodi da su kancerogeni. Stoga se provode istraživanja za sigurniju upotrebu antioksidansa, primarno onih iz prirodnih izvora. Antioksidansi kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, tanini, kumarini, lignani i terpenoidi nalaze se u raznim biljnim dijelovima (kao npr. u plodovima, lišću, sjemenkama i ulju). Iz tog razloga, sve je veći interes za ekstrakciju ovih biljnih antioksidansa (Roby i sur., 2013).

Govoreći o ekstrakciji fenolnih spojeva, ne postoji univerzalni postupak koji bi bio pogodan za ekstrakciju svih biljnih fenola. Fenoli se mogu povezati i s drugim komponentama biljaka poput ugljikohidrata ili proteina (Dai i Mumper, 2010), a veliki utjecaj ima i topljivost fenolnih spojeva u otapalu koja ovisi o kemijskoj strukturi samog spoja (jednostavne do polimerizirane strukture) (Robards, 2003; Naczk & Shahidi, 2004).

Ekstrakcijske tehnike zauzimaju jedinstvenu ulogu u analitičkoj kemiji. I danas se u većini laboratorija, još uvijek primjenjuju uobičajeni postupci ekstrakcije stari desetljećima. Ipak, konvencionalne metode ekstrakcije moguće je zamijeniti novijim metodama koje su usredotočene na ekstrakciju sa smanjenom količinom otapala te tako postižu bolju učinkovitost, skraćuju vrijeme ekstrakcije i pogoduju očuvanju okoliša (Raynie, 2006). Stoga se sve više istražuju nove tehnike ekstrakcije polifenolnih spojeva poput ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku ASE (eng. Accelerated Solvent Extraction), ekstrakcije potpomognute visokim tlakom HPAE (eng. High pressure assisted extraction), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima MAE (eng. Accelerated solvent extraction), ekstrakcije superkritičnim fluidom SFE (eng. Supercritical Fluid Extraction) i ekstrakcije potpomognute visoko naponskim električnim pražnjenjem HVED (eng. High Voltage Electrical Discharge) (Acierno i sur.,2004; Barba i sur.,2016).

2.1.1 Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE – accelerated solvent extraction)

Klasične tehnike izolacije analita iz čvrstih uzoraka (poput Soxhlet ekstrakcije) su zamorne i dugotrajne te koriste velike količine otapala. Ubrzana ekstrakcija otapalima je u potpunosti automatizirana tehnika, pa može biti osobito korisna za rutinske analize uzoraka hrane ili zagađivača okoliša (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

U ASE sustavu se postupak ekstrakcije izvodi na temperaturama većim od točke vrenja otapala što se postiže primjenom visokog tlaka unutar ćelije za ekstrakciju kako bi se otapalo održavalo u tekućem stanju. Temperatura i tlak utječu na učinkovitost procesa (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). Dva su glavna razloga zašto upotreba tekućih otapala pri povišenim temperaturama i tlaku daju poboljšane performanse u usporedbi s ekstrakcijama pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku:

- topljivost i efekt prijenosa mase
- poremećaj površinske ravnoteže

Korištenjem viših temperatura povećava se sposobnost otapanja analita u ekstrakcijskom otapalu. Na primjer, na temelju izračuna ovisnosti topljivosti idealne otopine o temperaturi, topljivost antracena se povećava gotovo 13 puta s porastom temperature od 50 do 150 °C (Richter i sur., 1996). Također, više temperature ubrzavaju proces difuzije komponente i otapala. No, kao što je ranije spomenuto, pri izolaciji fenolnih spojeva izbjegavaju se temperature više od 100 °C zbog nepoželjnih efekata na kemijski sastav analita nakon provedene ekstrakcije.

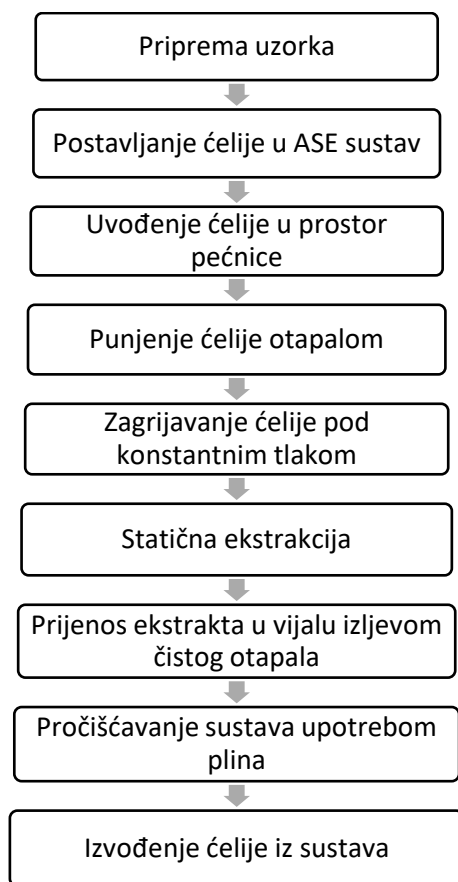
Povišene temperature mogu poremetiti snažne interakcije otapala i matriksa uzrokovane van der Waalsovima silama. Također mogu utjecati na vodikove veze i dipolno privlačenje između otopljenih molekula i aktivnog mjesta matriksa. Više temperature imaju utjecaj na viskoznost otapala, gdje se ona smanjuje te omogućava lakši prodor čestica matriksa a utječe i na smanjenje površinske napetosti otapala što pospješuje učinkovitost ekstrakcije (Richter i sur., 1996).

Primjena visokog tlaka olakšava ekstrakciju u uzorcima gdje su analiti zarobljeni u porama matriksa. Pomoću povišenog tlaka, otapalo može prodrijeti u područje matriksa koje

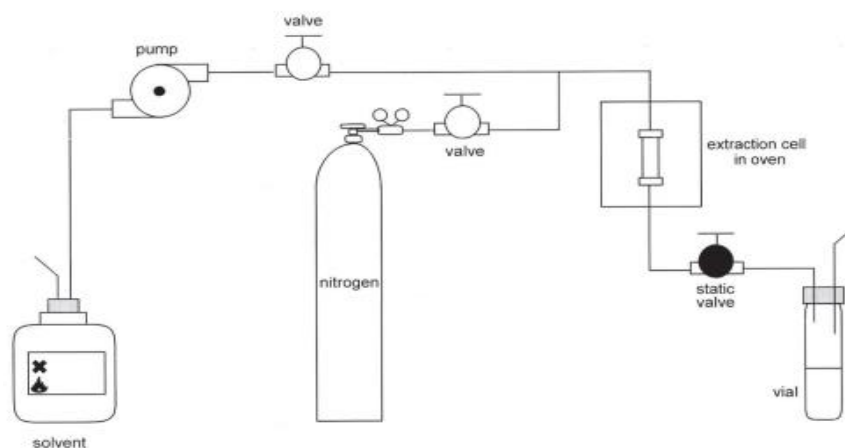
obično ne bi imalo doticaj sa otapalima pri uvjetima atmosferskog tlaka. Kada se analiti nalaze uglavnom na površini, protok otapala pri povišenom tlaku pomaže kod otapanja mjehurića zraka kako bi otapalo moglo brže doći u kontakt sa matriksom uzorka (Richter i sur., 1996).

ASE sustav može koristiti širok raspon otapala, osim onih koja su samozapaljiva pri temperaturama od 40 do 200 °C (npr. ugljikov sulfid, dietil eter i 1,4-dioksan). Općenito, treba izbjegavati jake kiseline i baze kao otapala, jer su korozivne. ASE tehnika pruža priliku za korištenje različitih vrsta otapala, čak i ona koja nisu učinkovita u konvencionalnim metodama. To se postiže podešavanjem temperature i tlaka tijekom postupka, koji generalno povećavaju moć otapala. Pri povišenoj temperaturi i tlaku postupak ekstrakcije se odvija brže, ali selektivnost opada, jer se ne otapaju samo analiti. Iako ASE omogućuje upotrebu otapala koja se ne koriste u uobičajenim tehnikama ekstrakcije, to može rezultirati otapanjem komponenata matriksa. Iz tog razloga je često teško postići selektivnost ove tehnike (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Tipični proces ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku sastoji se od faza prikazanih na Slici 1, dok se na Slici 2 nalazi shematski prikaz ASE sustava.



Slika 1. Prikaz faza ASE ekstrakcije (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).



Slika 2. Shematski prikaz ASE sustava (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

U Tablici 1 navedene su prednosti odnosno nedostaci ASE ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci ASE sustava za ekstrakciju (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Brzo vrijeme ekstrakcije (oko 15 minuta) 2. Jednostavno korištenje 3. Priprema uzorka je brza i jednostavna 4. Korištenje malog volumena otapala (oko 15-25 mL) 5. Moguće je koristiti veliki raspon otapala (osim jakih kiselina i baza ili otapala sa temperaturom samozapaljenja od 40 do 200 °C) 6. Moguće je koristiti čista otapala ili mješavinu otapala 7. Primjena visokog tlaka omogućava ekstrakciju termalno labilnih analita 8. Potpuno automatiziran proces koji omogućuje visoku reproducibilnost ekstrakcijskih parametara 9. Moguća ekstrakcija do 24 uzorka u jednom ciklusu (ovisno o konfiguraciji uređaja) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Visoka cijena aparature 2. Niska selektivnost 3. Obično je potrebno pročišćavanje ekstrakta prije provođenja daljnjih analiza

Wang i sur. (2007) ekstrahirali su policikličke aromatske ugljikovodike (PAH) i organoklorne pesticide (OCP) iz tla primjenom Soxhlet ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE). Uspoređivali su učinkovitost ekstrakcije ovih triju metoda na osnovu limita detekcije i kvantifikacije, reproducibilnosti metode, učinkovitosti oporavka, vremena ekstrakcije, potrošnje otapala i dr. U nekim aspektima, kao što su oporavak i reproducibilnost metoda, nisu bile značajne razlike između tri metode ekstrakcije PAH-ova i OCP-a. Dok su u aspektima limita detekcije i kvantifikacije utvrđene značajne razlike između navedenih metoda. Općenito, ASE je imao najbolju učinkovitost ekstrakcije u usporedbi s MAE i Soxhlet ekstrakcijom. Obzirom na druge čimbenike kao što su potrošnja otapala i vrijeme ekstrakcije, ASE i MAE su poželjniji od Soxhlet ekstrakcije.

Koch i sur. (2020) proveli su istraživanje utjecaja ekstrakcijskih otapala na sadržaj polifenola (uglavnom katehina) i antiradikalno djelovanje ekstrakta zelenog čaja primjenom tri različite metode ekstrakcije: jednostavne maceracije, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE). Najveća vrijednost ukupnih katehina otkrivena je u ekstraktima dobivenim ASE metodom ekstrakcije i jednostavnom maceracijom gdje je kao otapalo korištena mješavina etanola i vode u omjeru 1:1, a najniža u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u kojoj se kao otapalo koristio etil acetat. Što se tiče antiradikalne aktivnosti ekstrakata, ona je usko povezana sa sadržajem katehina te je uzorke dobivene ASE ekstrakcijom i maceracijom karakterizirao najveći udio polifenola.

2.2 KADULJA (*Salvia officinalis* L.)

Vrsta *Salvia officinalis* L. pripada porodici *Lamiaceae*, potporodici *Nepetoideae*, tribusu *Salviae*, subtribusu *Salviinae* i rodu *Salvia* L. (Drew i Sytsma, 2012). Kadulja je višegodišnja polugrmovita mediteranska biljka s nekoliko razgranatih stabljika koje mogu dosegnuti visinu 30 do 90 cm (Slika 3). Stariji dijelovi takvih grmova su odrvenjeli, a vršni dijelovi zeljasti s gusto skupljenim listovima. Cvjetovi su tamnoljubičaste boje, dvospolni, jednodomni i veličine oko 3 cm (Slika 4). Također su vrlo ugodna mirisa koji privlači pčele, stoga je kadulja jedna od važnih medonosnih biljaka. Cijela biljka je prekrivena dlačicama, uključujući i listove koji su srebrno-zelene boje (Ghorbani i sur., 2017; Trinajstić, 1992).

Cvjetanje počinje u svibnju i traje sve do kraja lipnja. Sjeme je okruglo, promjera 2-3 mm i tamnosmeđe boje. Dobro je klijavosti, a masa 1000 zrna je 6-8 g (Stepanović i sur., 2009). Kadulja cvjeta 4 do 6 tjedana, u razdoblju od svibnja do srpnja. Općenito smatra se pionikom vegetacije u pošumljavanju krša jer svojim jakim korijenjem veže oskudnu zemlju primorskih i dalmatinskih kamenjara (Gelenčir i Gelenčir, 1991). Samoniklo raste na kamenjarima u obalnom području i na otocima, a zbog njene višestruke gospodarske vrijednosti brojni kultivari se uzgajaju i izvan Sredozemlja (Hulina, 2011).



Slika 3. Grm kadulje (Anonymus 1, 2020)



Slika 4. Cvijet kadulje (Anonymus 2, 2020)

U narodu je kadulja poznata pod nazivima kao što su kuš, pelim, slavulja ili žalfija. Zanimljivo je da su antički pisci visoko cijenili ljekovitost te biljke. Plinije ju je nazvao „*salvia*“ što potječe od latinske riječi *salvus* što znači zdrav. Kralj Karlo Veliki je poticao uzgajanje kadulje u cijelom kraljevstvu, jer je biljka uživala veliki ugled te se smatrala sredstvom za produljenje života i protjerivanje zloduha (Toplak Galle, 2001).

2.2.1 Kemijski sastav kadulje

Za rod *Salvia* specifične su hidroksicimetne kiseline i to derivati kafeinske kiseline (ružmarinska, litosperminska, salvianolna i izosalvianolna kiselina) (Kametou i sur., 2010). Također su zastupljene su hidroksibenzojeve kiseline od kojih najčešće 4-hidroksibenzojeva kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (tzv. protokatehinska), 3-metoksi-4-hidroksibenzojeva kiselina (tzv. vanilinska) i 2,4-dimetoksibenzojeva kiselina (Topcu i sur., 1995).

Osim navedenog, kadulja sadrži i eterično ulje bogatog kemijskog sastava. Za ekstrakciju ulja najčešće se koristi list kadulje. Ulje je bistra, žuta do zelenožuta lako hlapljiva tekućina, karakteristična mirisa i okusa. Blagotvorna svojstva eteričnog ulja proizlaze iz njegovog kemijskog sastava gdje su glavni sastojci lakohlapljivi monoterpeni: α - i β -tujon, 1,8-cineol, (+)-kamfor, borneol i bornil-acetat, te seskviterpeni: humulen, (-) kariofilen i viridiflorol. Osim terpena, u mješavinama se nalaze i fenolni spojevi, ugljikovodici (alkoholi i ketoni), tanini, aminokiseline, masne kiseline i spojevi sa sumporom (Kuštrak, 2005; Okoh, 2010). Esencijalnom ulju kadulje pripisuju se mnoga antioksidacijska i antikancerogena svojstva (Tsakona i sur., 2010).

2.3 MASLINA (*Olea europaea* L.)

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzeleno stablo koje pripada obitelji *Oleaceae* i porijeklom je iz tropske i umjereno tople regije svijeta. Stablo masline može živjeti više stotina godina (Toplak Galle, 2001). Stablo, poznato po plodu, koje nazivamo maslinom, jest komercijalno važno u mediteranskoj regiji kao glavni izvor maslinovog ulja. Iako se maslina u današnje vrijeme uzgaja u raznim dijelovima svijeta, regija Mediterana i dalje predstavlja glavni prostor uzgoja maslina, koja čini oko 98 % svjetske proizvodnje (Ghanbari i sur., 2012). Stablo masline doseže 3 do 20 metara visine (Slika 5). Mlado stablo je zelenosive boje i glatkih površina, a kako stari postaje neravno uz uvijanje grana i nastanak šupljina, dok kora poprima tamnosivu boju. Listovi su uski i duguljasti, zelene boje lica te svilenkasto bijele boje naličja. Cvjetovi masline su žuto-bijele boje (Boskou, 2006). Plod masline je koštunica ovalnog oblika veličine 2–3 cm (širina i dužina) sastavljena od epikarpa, mezokarpa i endokarpa (Slika 6). Epikarp (koža) je prekriven voskom, a tijekom sazrijevanja boja kože prelazi iz svijetlo zelene u ljubičastu, smeđu ili crnu. Mezokarp (meso) predstavlja mekanu pulpu koja čini 84–90 % ukupne mase ploda, dok se tvrdi endokarp (koštica) sastoji od sjemenke ili jezgre koja čini 13–30 % ukupne mase ploda.



Slika 5. Stablo masline (Anonymus 3, 2020) **Slika 6.** Plod masline (Anonymus 4, 2020)

Drvo masline ima dugu povijest ljekovitih i prehrambenih vrijednosti. Ekstrakti lista masline stoljećima su korišteni za promicanje i očuvanje zdravlja. Na primjer, stari Egipćani su koristili listove za proces mumificiranja dok su se u narodnoj medicini koristili za liječenje groznice i nekih tropskih bolesti poput malarije (Ghanbari i sur., 2012). Činjenica je i da se nekoć, maslinovo ulje, osim za svakodnevnu pripremu hrane koristilo i kao sredstvo plaćanja (Toplak Galle, 2001).

2.3.1 Kemijski sastav masline

Lišće masline bogato je fenolnim spojevima od kojih je najzastupljeniji sekoiridoid oleuropein, koji zbog orto-difenolne (katehol) strukture ima visoku antioksidacijsku aktivnost. Ostali fenolni spojevi pronađeni u lišću masline su hidroksitirozol, verbaskozid, apigenin-7-glukozid i luteolin-7-glukozid (Benavente-Garcia i sur., 2000). Sastav ploda masline uključuje vodu (50 %), bjelančevine (1,6 %), ulje (22 %), ugljikohidrate (19,1 %), celulozu (5,8 %), anorganske tvari (1,5 %) i fenolne spojeve (1–3 %). Ostali važni spojevi prisutni u plodu masline su pektin, organske kiseline i pigmenti. Organske kiseline pokazuju metaboličku aktivnost i smatraju se intermedijarnim proizvodima koji nastaju prilikom formiranja ili razgradnje drugih spojeva (Ghanbari i sur., 2012). Detaljniji sastav fenolnih komponenti prisutnih u maslini navedeni su u poglavlju 2.5.1.

2.4 ORIGANO (*Origanum vulgare* L.)

Origano (*Origanum vulgare* L.) je aromatična biljka koja pripada obitelji *Lamiaceae*, a obično raste u Aziji, Europi i sjevernoj Africi. Samoniklo raste u područjima Mediteranske

regije, osobito na visokim lokacijama. Višegodišnja je zeljasta biljka sa razgranatim stabljikama koje su u nižem dijelu najčešće odrvenjele (Slika 7). Listovi su dlakavi, mali, ušiljeni i smješteni nasuprotno. Isprepleteni su malim žlijezdama koje sadrže hlapljivo esencijalno ulje, što biljci daje karakterističan i jak miris i aromu. Cvjetovi su dvospolni i nalaze se na kratkim peteljcima, gusto skupljeni u metličaste cvatove (Slika 8). U područjima sa umjerenom klimom razdoblje cvatnje traje od lipnja do kraja kolovoza. Svaki cvijet proizvodi četiri male sjemenke, koje su glatke, crveno-smeđe boje i dužine oko 1 mm (Kintzios, 2012).



Slika 7. Origano (Anonymus 5, 2020)



Slika 8. Origano u cvatu (Anonymus 6, 2020)

U narodnoj medicini koristi se za liječenje respiratornih poremećaja, dispepsije, bolnih mjesečnica, reumatoidnog artritisa i poremećaja mokraćnog sustava. Njegova uporaba je također široko rasprostranjena u gastronomiji (Teixeirai sur., 2013). Bio je poznat starim Egipćanima, Grcima i Rimljanima. Grci su ga smatrali simbolom sreće i ako bi izrastao na grobu, vjerovali su da će pokojnik biti vječno sretan (Roby i sur., 2013). Hansson i Foley (2008) izvijestili su o identifikaciji drevnog DNA origana iz dvije amfore starosti 2400 godina, pronađenih u vodama Sredozemlja u blizini Grčkog otoka Chiosa. Očigledno je da se origano koristio u mješavini sa uljima kako bi poboljšao aromu ali i održivost ulja.

2.4.1 Kemijski sastav origana

Iako su iz origana izolirani mnogi kemijski spojevi, najvažnija skupina, s komercijalnog i aplikacijskog stajališta, odnosi se na njegova hlapljiva ulja, u osnovi sastavljena od terpenoida. *Origanum* vrste bogate su fenolnim monoterpenoidima poput karvakrola i timola. Ostale kemijske skupine origana su aciklički monoterpenoidi poput geraniola, geranil acetata, linaloola, linalil acetata i β -mircena; spojevi poput kamfena, kamfora, borneola, i bornil i izobornil acetata; seskviterpenoidi, poput β -kariofilena, β -bisabolena, β -bourbonena, α -humulena (Kintzios, 2012).

2.5 FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi čine glavnu skupinu antioksidansa koji su široko rasprostranjeni u biljnom kraljevstvu. Sastoje se od velikog broja strukturno različitih spojeva, uključujući jednostavne i složene strukture, u kojima se nalazi barem jedan aromatski prsten gdje su jedan ili više vodikovih atoma supstituirani hidroksilnom skupinom (Pereira i sur., 2010). Iako se fenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s aromatskim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita biljaka zbog čega se u literaturi klasificiraju prema strukturi, broju ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010). Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na flavonoide i neflavonoide. U skupinu neflavonoidnih spojeva ubrajamo fenolne kiseline (hidroksicimetna kiselina i hidroksibenzojeva kiselina), kumarine, tanine te stilbene. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavanole, flavone, flavanone, antocijane, izoflavone i flavane (Whale i sur., 2010).

Na sastav polifenola utječu okolišni čimbenici, koji mogu biti pedoklimatski (količina padalina, izloženost sunčevoj svjetlosti, vrsta tla) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Konkretno, maslina se uzgaja na području mediterana gdje su nusproizvodi proizvodnje maslinovog ulja (obrezano lišće i otpadne vode) dobri nositelji antioksidacijskih fenola do samog ploda masline (Tsakona i sur., 2010). Na sadržaj polifenola može utjecati i skladištenje, ukoliko se radi o polifenolima koji su

skloni oksidaciji. Ukoliko dođe do oksidacije, može nastati jedna ili više polimernih molekula koje uzrokuju promjene u kakvoći namirnica i organoleptičkim svojstvima koje mogu biti poželjne ili nepoželjne (posmeđivanje narezanog voća). Priprema hrane također utječe na količinu polifenola prisutnih u namirnicama pa se tako guljenjem voća i povrća može ukloniti značajna količina polifenola, obzirom da su polifenoli u znatno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim. Znatan gubitak polifenola događa se i termičkom obradom hrane (Manach i sur., 2004).

Fenolni spojevi imaju sposobnost sparivanja elektrona slobodnih radikala, aktiviranja antioksidacijskih enzima, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala te inhibiranja oksidaza, od kuda proizlazi njihova zaštitna uloga u biološkim sustavima (Ky i Teissedre, 2015). Fenolne fitokemikalije koje konzumiramo prehranom, dobar su izvor prirodnih antioksidansa. Fenolni metaboliti imaju korisne učinke po ljudsko zdravlje, uključujući inhibiciju mutageneze i karcinogeneze, također neke fitokemikalije su pokazale antimikrobno i antifungalno djelovanje (Chun i sur., 2015).

2.5.1 Fenolni spojevi mediteranskog bilja

Tržišno zanimanje za aromatične biljke sa Sredozemlja kontinuirano raste, uglavnom zbog njihovih ljekovitih i bioaktivnih spojeva te drugih vrijednih sastojaka esencijalnih ulja. Ove biljke su od davnina poznate kao začini mediteranske kuhinje, a koristile su se i kao lijekovi u narodnoj medicini. Danas se zbog toga smatraju važnim čimbenicima za kvalitetu i sigurnost hrane jer sprječavaju razne procese kvarenja hrane poput oksidacije ili rasta i razvoja mikroorganizama (Giacometti i sur., 2018).

Oksidativni stres se smatra jednim od glavnih čimbenika koji izazivaju različite bolesti poput raka, starenja, raznih upala i ateroskleroza. Danas je opće prihvaćeno da se rizik od štetnog utjecaja oksidacijskog stresa može smanjiti unosom prirodnih antioksidansa, izoliranih iz biljaka. Sukladno tome, polifenoli mediteranskog bilja poput masline, kadulje i origana, imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala te tako pozitivno doprinose zdravlju (Ghanbari i sur., 2012).

U plodu i listu masline zastupljeni su lipofilni i hidrofilni fenoli. Glavni lipofilni fenoli su krezoli, dok hidrofilni fenoli uključuju fenolne kiseline, fenolne alkohole, flavonoide i sekoiridoide; prisutni su u gotovo svim dijelovima biljke, ali njihova priroda i koncentracija varira ovisno o tkivu (Ghanbari i sur., 2012). U mnogim vrstama voća i povrća mogu biti prisutni flavonoidi, alkoholi i fenolne kiseline dok su sekoiridoidi specifični za biljke koje pripadaju porodici *Oleaceae* koja uključuje i maslinu (*Olea europaea* L.) (Servili i Montedoro, 2002). Od fenolnih kiselina zastupljene su kiseline osnovne kemijske strukture C6-C1 (hidroksibenzojeva kiselina), poput vanilinske kiseline i galne kiseline; zatim C6-C3 (hidroksicimetna kiselina), poput kofeinske kiseline, ferulinske kiseline i sinapinske kiseline, te flavonoidi kemijske strukture C6-C3-C6, poput cijanidina. Glavni fenolni alkoholi maslina uključuju oleuropein β - (3,4-dihidroksifeniletanol) ili hidroksitirozol i *p*-hidroksifeniletanol ili tirozol. Oleuropein je glavni sekoiridoidni sastojak nezrelog ploda masline. Predstavlja kemijsku komponentu ploda masline koja uzrokuje gorčinu. Još jedan polifenol nazvan ligstrozid (deacetoksi-ligstrozid aglikon), koji pridonosi intenzitetu oštrog mirisa ekstra djevičanskog maslinovog ulja identificiran je u plodu masline. Lipofilni prirodni antioksidansi također su identificirani u plodu masline, od kojih su najzastupljeniji α -, β -, γ - i δ -tokoferol (Ghanbari i sur., 2012).

Bioaktivne komponente zastupljene u kadulji pripadaju skupini terpena, koji imaju antibakterijski učinak te polifenola koji su zaslužni za jaku antioksidacijsku aktivnost (Neagu i sur. 2011). Antioksidativno djelovanje kadulje pripisuje se prisutnosti polifenola, obzirom da takvi spojevi lako doniraju atom vodika slobodnim radikalima i time prekidaju lančanu reakciju oksidacije (Neagu i sur., 2011).

Ekstrakti origana imaju dokumentirana antioksidacijska i antimikrobna svojstva koja se pripisuju fenilkarboksilnim kiselinama poput cimetine, kafeinske, *p*-hidroksibenzojeve, protokatekolske i vanilinske kiseline (Kintzios, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

Istraživanje je provedeno na osušenim uzorcima biljke kadulje (Franck d.d., Zagreb, hrvatska), lista masline (lokalno sakupljenog na području Zadarske županije) i origana (Suban d.o.o., Samobor, Hrvatska) te su kao takvi korišteni za ekstrakcije fenolnih spojeva.

3.2 METODE RADA

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz uzoraka kadulje, lista masline i origana provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE) uz upotrebu 25 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala. Ekstrakcije su provedene pri sobnoj (22 °C) i povišenoj (55 °C) temperaturi, različitom vremenu trajanja ekstrakcije i broja ciklusa. U dobivenim ekstraktima kadulje, lista masline i origana provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, određivanje antioksidacijske aktivnosti (AA) putem DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) i FRAP (eng. ferric reducing antioxidant power) metoda te određivanje parametara boje po CIE L*a*b* sistemu boja.

3.2.1 Izolacija fenolnih spojeva primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE)

Ekstrakcija fenolnih spojeva kadulje, lista masline i origana provedena je pomoću ASE ekstraktora (ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350) prema planu pokusa (Tablica 2). Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 25 %-tna vodena otopina etanola pri varijabilnim parametrima temperature (22 i 55 °C), broja ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3) i statičkog vremena (3 i 9 min).

Tablica 2. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak

<i>Otapalo</i>	<i>Vrsta biljke</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Statičko vrijeme ekstrakcije (min)</i>	<i>Broj ciklusa ekstrakcije</i>	
<i>25 %-tna otopina etanola</i>	<i>Kadulja</i>	<i>K1</i>	22	3	1
		<i>K2</i>		3	2
		<i>K3</i>		3	3
		<i>K4</i>		9	1
		<i>K5</i>	50	3	1
		<i>K6</i>		3	2
		<i>K7</i>		3	3
		<i>K8</i>		9	1
	<i>List masline</i>	<i>M9</i>	22	3	1
		<i>M10</i>		3	2
		<i>M11</i>		3	3
		<i>M12</i>		9	1
		<i>M13</i>	50	3	1
		<i>M14</i>		3	2
		<i>M15</i>		3	3
		<i>M16</i>		9	1
	<i>Origano</i>	<i>O17</i>	22	3	1
		<i>O18</i>		3	2
		<i>O19</i>		3	3
		<i>O20</i>		9	1
		<i>O21</i>	50	3	1
		<i>O22</i>		3	2
		<i>O23</i>		3	3
		<i>O24</i>		9	1

Aparatura i pribor

- Uređaj za ultrazvučno odzračivanje otapala (Bandelin Sonorex Digitec, Berlin, Njemačka)
- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Celulozni filter papir (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific, 250 mL)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične lađice za vaganje
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL
- Stakleni lijevak
- Plastične kivete, volumena 50 mL

Otapala i reagensi

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, SAD)
- Destilirana voda
- 96 %-tni etanol, (p.a., Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

Postupak ekstrakcije

Na analitičkoj vagi, u plastičnoj lađici, odvažuje se 1 g ($\pm 0,0001$ g) uzorka kadulje, lista masline i origana. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika najprije se postavi celulozni filter papir, a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje (~ 2,0 g), na koju se zatim dodaje odvagani uzorak. Nakon toga se ponovno dodaje dijatomejska zemlja do 5 mm ispod gornjeg ruba ćelije te se ćelija ručno zatvori i postavi na uređaj ASE Dionex 350® (Slika 9). Kao otapalo korištena je 25 %-tna vodena otopina etanola, prethodno ultrazvučno odzračena kroz 30 minuta. Ekstrakcija je provedena pri zadanim parametrima temperature (22 i 50 °C), vremenu trajanja ciklusa (3 i 9 min) te broju ciklusa ekstrakcije (1, 2 ili 3 ciklusa).

Nakon provedene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL te se nadopune do oznake otapalom korištenom za ekstrakciju (25 %-tna vodena otopina etanola). Pripremljeni ekstrakti prenesu se u plastične kivete volumena 50 mL te se skladište na -20 °C do provođenja daljnjih analiza.



Slika 9. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Dionex (model ASE 350®) (vlastita fotografija)

3.2.2 Spektrofotometrijsko odođivanje ukupnih fenola (UF)

Princip metode

Metoda za određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka a temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Redukcija ovih kiselina tj. tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, SAD)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (NBL 254i, Adam Equipment, UK)

- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene čaše, volumena 50 mL

Reagensi

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Destilirana voda
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 % -tna)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline (5 g L^{-1})

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL adekvatno razrijeđenog ekstrakta, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, sve skupa se promiješa a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri sobnoj temperaturi. Slijepa proba se pripremi na isti način kao i uzorak, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm. Mjerenje je provedeno u dvije paralele, za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca

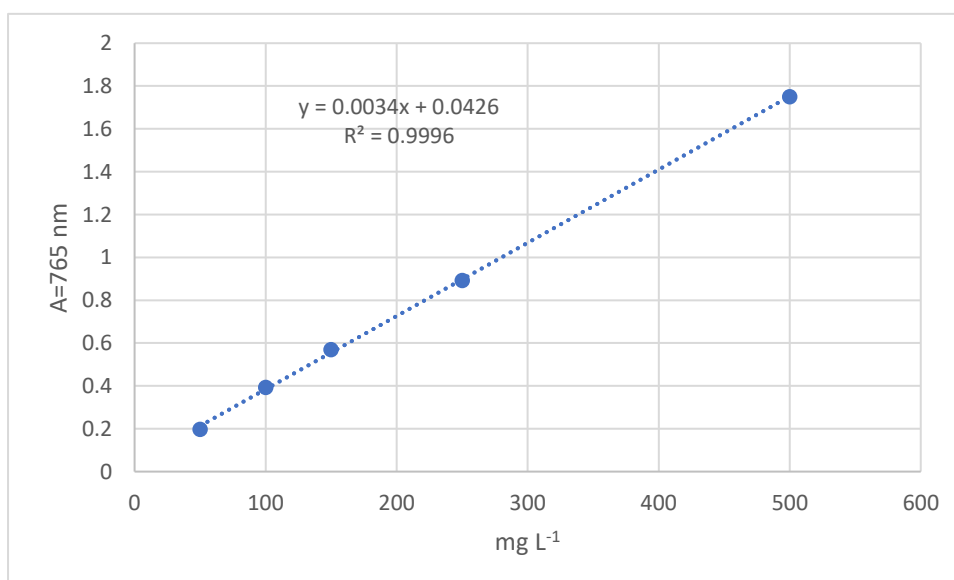
Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina galne kiseline u koncentraciji 5 g L^{-1} tako da se odvaži 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola. Otopina

se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 10 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 i 1 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹.

Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri sobnoj temperaturi. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 µL destilirane vode. Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac (Slika 10) pomoću programa Microsoft Office Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g uzorka.



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0034X + 0,0426 \quad /1/$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

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

3.2.3 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda

DPPH metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani upotrebom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Prilikom sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvara se reducirani oblik DPPH-H gdje dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Reagensi

- 100 %-tni metanol
- 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati u zatvorenoj tikvici, na tamnome.

- Standard troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina, 1 mM M)

Priprema: Odvažuje se 0,025 g Troloxa te otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μM koja se koriste za izradu baždarnog pravca.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se 0,75 mL adekvatno razrijeđenog ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se doda 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm (Shortle i sur., 2014). Mjerenje je provedeno u dvije paralele, za svaki uzorak.

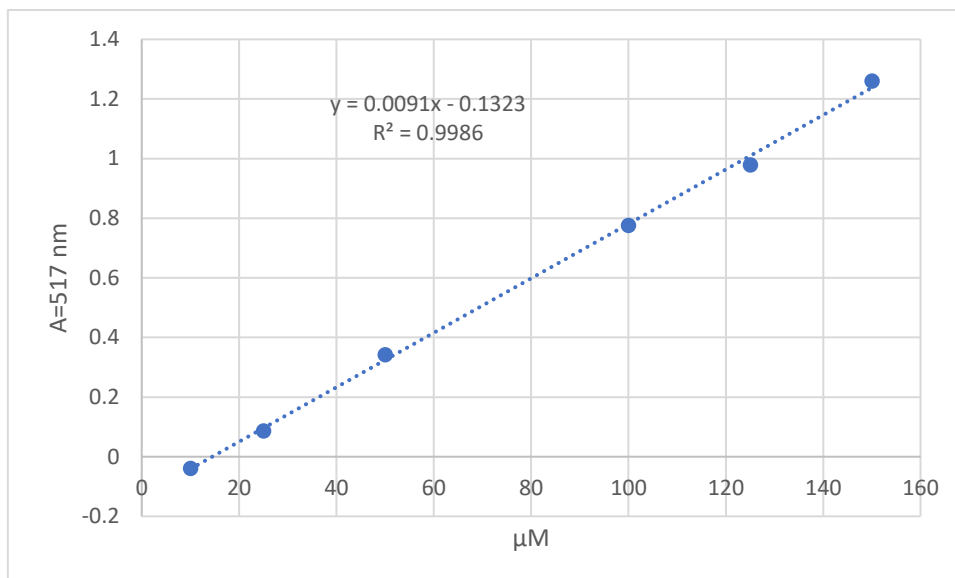
Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μM na način da se redom otpipetira: 100 μL , 250 μL , 500 μL , 1000 μL , 1250 μL i 1500 μL u odmjerne tikvice od 10 mL te se iste do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100 %-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac (Slika 11) pomoću programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije Troloxa (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost uzorka određena DPPH metodom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja u μmol ekvivalenta troloxa (TE) g^{-1} uzorka.



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0091 X - 0,1323$$

/2/

gdje je:

Y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent troloxa (TE) (μM)

3.2.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda

FRAP metodu razvili su Benzie i Strain (1996). Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju (pH=3,6) kako bi željezo održalo dobru topljivost. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi sa nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju

redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Benzie i Strain, 1996).

Princip metode

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Mjerenjem promjene apsorbancija pri 595 nm prati se redukcija iona. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ ekvivalenta po g uzorka.

Reagensi

- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl
Priprema: 330 μL 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6
Priprema: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl_3
Priprema: 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ otopi u 10 mL destilirane vode, otopina se priprema svježa.
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ
Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja.
- Standard željezo (II)-sulfat septahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$)
Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata septahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$). Odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfat septahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- FRAP reagens
Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl_3 (omjer 10:1:1).

Postupak određivanja

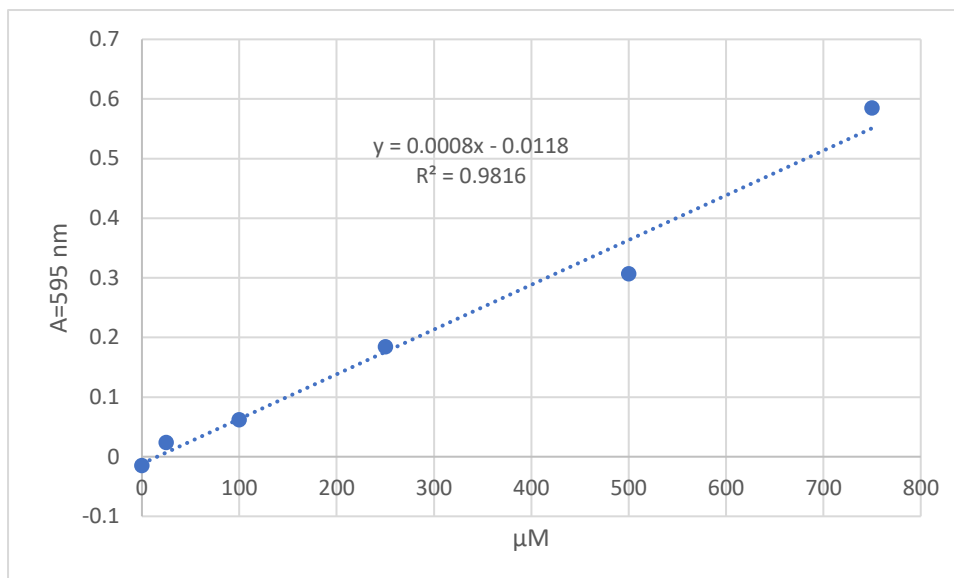
U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL adekvatno razrijeđenog uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 5 minuta termostatira na sobnoj temperaturi. Zatim se mjeri apsorbancija pri 595 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Mjerenje je provedeno u dvije paralele, za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 500 mL 1mM otopine željezo (II)-sulfata septahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0; 0,25; 1; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvot otopine željezo (II)-sulfata septahidrata te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda i 2080 μL FRAP reagensa, kratko se promiješa, te 5 minuta termostatira na sobnoj temperaturi. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac (Slika 12) pomoću programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja u μmol ekvivalenta željeza Fe^{2+} (FE) g^{-1} uzorka.



Slika 12. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0008 X - 0,0118$$

/3/

gdje je:

Y = apsorbancija pri 595 nm

X = ekvivalent Fe^{2+} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

3.2.5 Određivanje parametara boje po CIE L*a*b* sistemu boja

Boja uzoraka ekstrakata kadulje, lista masline i origana, dobivenih ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku, određivala se pomoću kolorimetra CM3500d (Konica Minolta, Japan) (Slika 13) mjereći stupanj reflektirane svjetlosti od mjerne površine u transmittance modu. Mjerile su se L*, a* i b* vrijednosti, a kontrola mjerenja obavljala se preko softvera SpectraMagic NX.

Uzorak za analizu (~ 10 mL) stavio se u plastičnu kivetu (dimenzije: v/š/d 5/3,5/1 cm) te se provelo mjerenje. Sva mjerenja bila su u SCI (Specular Component Included) modu (ASTM International (1987)) te su se provela u dvije paralele za svaki uzorak.



Slika 13. Kolorimetar CM3500d (Konica Minolta, Japan) (Anonymus 7, 2020)

Parametar L^* predstavlja mjeru svjetlosti čija se vrijednost kreće od 0 do 100, pri čemu se sa 0 označava crno, a sa 100 bijelo. Parametar a^* , ovisno o predznaku, iskazuje spektar od crvene (+ a^*) do zelene boje (- a^*), dok parametar b^* iskazuje spektar od žute (+ b^*) do plave boje (- b^*). Granice za a^* i b^* su otprilike + ili - 80. CIE preporuča prilagodbu ove ljestvice boja poznate kao CIELCH ili $L^* C^* H^\circ$. Ovaj prostor boje označava nijansu (H°) kao jednu od tri dimenzije, dok su druge dvije svjetlina (L^*) i ton boje (C^*).

Parametar H° predstavlja vizualni doživljaj boje, izražava se u stupnjevima gdje je:

- 0 – 90° crveno-narančasta
- 90 - 180° žuto-zelena
- 180 - 270° plavo-zelena
- 270 – 360° plavo-ljubičasta boja.

Nijansa boje (H°) izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$H^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad /4/$$

Ton boje (C^*) predstavlja intenzitet boje, pri čemu je zasićenost boje slabija što su niže vrijednosti. Ton boje (C^*) i razlika u tonu boje (ΔC^*) izračunati su na osnovu slijedećih formula:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad /5/$$

$$\Delta C^* = C_{uzorak} - C_{standard} \quad /6/$$

Kao C_{standard} kod određivanja tona boje u uzorcima ekstrakata kadulje, lista masline i origana koristila se vrijednost uzoraka ekstrahiranih pri 22 °C, tijekom jednog ciklusa ekstrakcije i statičkog vremena od 3 minute.

Ukupna zasićenost boje (ΔH) određivana je na osnovi formule:

$$\Delta H = \sqrt{\Delta E^2 - \Delta L^2 - \Delta C^2} \quad /7/$$

Odgovarajuća ukupna promjena boje izračunata je prema formuli:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad /8/$$

Iz izmjerenih parametara L^* , a^* , b^* i C^* izračunata promjena boje na osnovu niže navedenih formula:

$$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}} \quad /9/$$

$$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}} \quad /10/$$

$$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}} \quad /11/$$

$$\Delta C = C_{\text{uzorak}} - C_{\text{standard}} \quad /12/$$

Kod računanja ukupne promjene boje /8/ u uzorcima kadulje, lista masline i origana, kao standardi korištene su vrijednosti uzoraka ekstrahiranih pri 22 °C, tijekom jednog ciklusa ekstrakcije i statičkog vremena od 3 minute. ΔL , Δa , Δb i ΔC predstavljaju promjene u svjetlini, zeleno/crvenom spektru, žuto/plavom spektru i zasićenosti boje (Wei i sur., 2017).

Značenje dobivenih vrijednosti ukupne promjene boje:

- $+\Delta L$ - uzorak je svjetliji od standarda
- $-\Delta L$ - uzorak je tamniji od standarda
- $+\Delta a$ - uzorak je crveniji od standarda
- $-\Delta a$ - uzorak je zeleniji od standarda
- $+\Delta b$ - uzorak je žući od standarda
- $-\Delta b$ - uzorak je plavlji od standarda
- $+\Delta C$ - uzorak ima veću saturaciju od standarda
- $-\Delta C$ - uzorak ima manju saturaciju od standarda

3.2.6 Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu XLStat (MS Excel 2010). Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija. Provedena je analiza kovarijance (ANCOVA test) kako bi se utvrdio utjecaj parametara ekstrakcije na rezultate fenolnih spojeva, antioksidansa i boje. Nezavisne varijable (odnosno parametri ekstrakcije) su bile sljedeće: istraživani matriks (biljka), temperatura, statičko vrijeme i broj ciklusa ekstrakcije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pri izradi ovog diplomskog rada provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz osušenih uzoraka biljaka kadulje i origana te lista masline. Koristila se tehnika ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE).

ASE ekstrakcija provedena je pri dvije različite temperature - sobnoj (22 °C) i povišenoj (50 °C), te pri različitim uvjetima statičkog vremena ekstrakcije (3 i 9 min) i broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3), na osnovu čega je određen utjecaj navedenih parametara na efikasnost ekstrakcije fenola te antioksidacijsku aktivnost. Kao ekstrakcijsko otapalo koristila se 25 %-tna vodena otopina etanola. Veći udio mješavine otapala zauzela je voda jer nije toksična, zapaljiva i lako je dostupna, što ju čini dobrim ekološkim otapalom. Štoviše, fizikalno-kemijska svojstva vode dramatično se mijenjaju pri povišenoj temperaturi i tlaku (Bursać Kovačević i sur., 2018). U određenim procesima proizvodnje hrane i farmaceutskih proizvoda, voda može zamijeniti organska otapala, smanjujući troškove i eliminirajući probleme povezane s odlaganjem organskih otapala (Bergeron i sur., 2005). U dobivenim ekstraktima kadulje, lista masline i origana provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, određivanje antioksidacijske aktivnosti putem DPPH i FRAP metoda te određivanje parametara boje po CIE L*a*b* sistemu boja.

4.1 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Ukupni fenoli u ekstraktima kadulje, lista masline i origana dobivenih ASE ekstrakcijom određeni su spektrofotometrijski pri apsorbanciji od 765 nm. Dobiveni rezultati izraženi su kao maseni udjeli galne kiseline (mg GAE g⁻¹ uzorka) ± standardna devijacija.

Tablica 3. Ukupni fenoli u ekstraktima kadulje izraženi u mg GAE g⁻¹ uzorka

<i>Uzorak</i>	<i>mg GAE g⁻¹</i>
K1	11,70 ± 1,58
K2	17,94 ± 2,33
K3	23,29 ± 0,71
K4	25,16 ± 0,00
K5	24,60 ± 2,00
K6	28,54 ± 0,92
K7	34,22 ± 1,87
K8	30,24 ± 1,31

U Tablici 3 prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kadulje. Najveća količina ukupnih fenola određena je u uzorku K7 (34,22 mg GAE g⁻¹) koji je ekstrahirani pri temperaturi od 50 °C, vremenu ekstrakcije od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, a najmanji udio fenola izoliran je iz uzorka K1 (11,70 mg GAE g⁻¹) koji je ekstrahirani pri 22 °C, vremenu ekstrakcije od 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije. Općenito, može se vidjeti da je kod uzoraka gdje je ekstrakcija provedena pri višim temperaturama, dužem vremenu ekstrakcije i većem broju ciklusa određena veća koncentracija fenolnih spojeva. Izuzetak je kod uzoraka K7 (34,22 mg GAE g⁻¹) i K8 (30,24 mg GAE g⁻¹), gdje je uzorak K8 ekstrahirani dužim statičkim vremenom ekstrakcije (9 min) tijekom manjeg broja ciklusa (1), a uzorak K7 vremenom ekstrakcije od 3 min ali većim brojem ciklusa (3), što pokazuje da je učinkovitije povećati broj ciklusa u odnosu na vrijeme ekstrakcije kako bi se izolirala veća koncentracija fenolnih spojeva.

Tablica 4. Ukupni fenoli u ekstraktima lista masline izraženi u mg GAE g⁻¹ uzorka

<i>Uzorak</i>	<i>mg GAE g⁻¹</i>
M9	6,46 ± 0,28
M10	9,11 ± 0,33
M11	9,46 ± 0,33
M12	8,72 ± 0,52
M13	10,83 ± 0,11
M14	14,63 ± 0,14
M15	19,14 ± 0,36
M16	14,85 ± 0,35

Prema Tablici 4 najveći udio fenolnih spojeva u ekstraktima lista masline (19,14 mg GAE g⁻¹) utvrđen je u uzorku M15 koji je ekstrahirano u uvjetima reakcije gdje je temperatura iznosila 50 °C, vrijeme ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije. Najmanji udio fenola dobiven je u uzorku M9 (6,46 mg GAE g⁻¹) ekstrahirano pri 22 °C, vremenu od 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije. Također se može uočiti da se efikasnost ekstrakcije povećava sa povišenjem temperature, statičkog vremena i ciklusa ekstrakcije. Izuzetak su bili ekstrakti koji su tretirani pri istim temperaturama, ali različitog statičkog vremena tj. broja ciklusa ekstrakcije, pa je tako kod uzoraka M11 (9,46 mg GAE g⁻¹) i M12 (8,72 mg GAE g⁻¹) (ekstrahiranih pri 22 °C) te uzoraka M15 (19,14 mg GAE g⁻¹) i M16 (14,85 mg GAE g⁻¹) (ekstrahiranih pri 50 °C) pokazana bolja učinkovitost ekstrakcije kod kraćeg vremena ekstrakcije ali većeg broja ciklusa (3 min i 3 ciklusa), no što je to kod uzorka ekstrahiranih 9 min tijekom samo jednog ciklusa ekstrakcije.

Tablica 5. Ukupni fenoli u ekstraktima origana izraženi u mg GAE g⁻¹ uzorka

<i>Uzorak</i>	<i>mg GAE g⁻¹</i>
O17	8,51 ± 0,41
O18	13,08 ± 1,73
O19	16,59 ± 1,16
O20	13,09 ± 0,37
O21	17,88 ± 0,48
O22	26,91 ± 1,70
O23	29,53 ± 0,77
O24	24,07 ± 0,65

U ekstrahiranim uzorcima origana (Tablica 5), najveću količinu ukupnih fenola pokazuje uzorak O23 (29,53 mg GAE g⁻¹) koji je ekstrahirano pri 50 °C, statičkom vremenu od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije. Najmanji udio fenolnih spojeva ima uzorak O17 (8,51 mg GAE g⁻¹) ekstrahirano pri uvjetima temperature 22 °C, statičkog vremena 3 min i 1 ciklusa ekstrakcije. Povećanjem temperature, vremena i ciklusa ekstrakcije povećavala se i efikasnost izolacije fenolnih spojeva. Takav trend uočen je kod većine ekstrakata, a izuzetci su uzorci O19 (16,59 mg GAE g⁻¹) i O20 (13,09 mg GAE g⁻¹) te O23 (29,53 mg GAE g⁻¹) i O24 (24,07 mg GAE g⁻¹) koji su izolirani pri istim uvjetima temperature (O19 i O20 pri 22 °C, a O23 i O24 pri 50 °C) ali različitim vremenom ekstrakcije (3 i 9 min) i različitim broju

ciklusa ekstrakcije (3 i 1 ciklus). Veća učinkovitost se pokazala kod uzoraka ekstrahiranih kraćim vremenom ekstrakcije ali tijekom većeg broja ciklusa ekstrakcije.

Na osnovu dobivenih rezultata, kod biljnih uzoraka kadulje, lista masline i origana uočen je isti trend. Najveći prinos tj. najbolju učinkovitost pokazala je metoda ekstrakcije provedena pri temperaturi od 50 °C, statičkom vremenu ekstrakcije od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, obzirom da je najveći udio fenolnih spojeva iz uzoraka sve 3 biljke ekstrahirano metodom provedenom pri navedenim parametrima. Također je pokazano kako se kod ekstrakata kadulje, lista masline i origana veća učinkovitost postiže primjenom viših temperatura, kao i kod većeg broja ciklusa u odnosu na duže vrijeme statičke ekstrakcije. Takav rezultat u skladu je sa istraživanjem koje su proveli Putnik i sur. (2017), gdje je duže vrijeme ekstrakcije također rezultiralo smanjenim prinosom fenola. Takav ishod se i očekuje, obzirom da duže izlaganje visokim temperaturama može pojačati reakcije poput hidrolize i oksidacije te tako degradirati dio termički nestabilnih polifenola (Putnik i sur., 2017).

Istraživanjem koje su 2017. proveli Putnik i sur. procijenili su utjecaj ASE ekstrakcije na ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz lista masline Oblice. ASE ekstrakcija je provedena pri nekoliko različitih uvjeta: temperature (60 °C, 80 °C i 100 °C), statičkog vremena (5, 10 i 15 min) tijekom 1 ili 2 ciklusa ekstrakcije. Uvjeti pri kojima je ekstrahirano najveći udio polifenolnih spojeva bili su pri temperaturi od 80 °C, statičkog vremena ekstrakcije 5 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije, te je dobiven udio fenola od 53,15 mg GAE g⁻¹. Kod ekstrakcije provedene u ovom radu najveći udio fenolnih spojeva u listu masline iznosi 19,14 mg GAE g⁻¹. Na prinos fenola također utječe vrsta otapala koja se koristi za ekstrakciju (Taamalli i sur., 2012), pa se tako veći prinos fenola u navedenom istraživanju pokazao zbog upotrebe 50 %-tne vodene otopine etanola, dok se pri istraživanju u svrhu ovog rada provedla ekstrakcija sa 25 %-tnom vodenom-etanolnom otopinom kao ekstrakcijskim otapalom. Također, 50 %-tna vodena otopina etanola smatra se najučinkovitijom u smislu ubrzanje ekstrakcije fenolnih spojeva pri povišenom tlaku (Xynos i sur., 2014). Na veći prinos fenolnih spojeva utječe i temperatura ekstrakcije koja je u istraživanju iznosila 80 °C u odnosu na temperaturu od 50 °C koja se koristila pri ekstrakciji u ovom radu.

Tsakona i suradnici (2010) su proveli ispitivanje optimizacije ekstrakcije fenola u hidroetanolnim smjesama koristeći osušene uzorke biljaka: kadulje i origana (*Salvia fruticosa* i *Origanum dictamnus* L.) te listova biljaka: masline i naranče (*Olea europaeae* L. i *Citrus sinensis* L.). Proučavali su četiri uvjeta ekstrakcije (vrijeme, temperatura, omjer

uzorka i otapala i udio etanola u smjesi) praćenjem sadržaja fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata. Vrijeme i temperatura su bili primarni faktori koji utječu na prinos ekstrakcije, što se slaže sa rezultatima dobivenima u ovom radu. Sadržaj etanola također je utjecao na ekstrakciju, gdje je prinos ekstrakcije bio znatno manji koristeći čisti etanol. Kadulja je imala najveći udio fenola od 73 mg GAE g⁻¹ (pri 40 °C kroz 8 h, upotrebom 70 %-tne otopine etanola i 40 g uzorka L⁻¹), zatim slijedi origano sa 43,9 mg GAE g⁻¹ (40 °C, 2h, 70 %-tna otopina etanola i 40 g uzorka L⁻¹) te list masline sa 43,3 mg GAE g⁻¹ (40 °C, 8h, 70 %-tna otopina etanola i 40 g uzorka L⁻¹). U ovom radu je kadulja također pokazala najveći udio fenolnih spojeva gdje je udio fenola u ekstraktu iznosio 34,22 mg GAE g⁻¹ (ekstrahiranog pri 50 °C, vremenu od 3 min kroz 3 ciklusa), a najmanje fenolnih spojeva pronađeno je u ekstraktu lista masline (6,46 mg GAE g⁻¹) koji je ekstrahiran pri 22 °C, 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije. Navedeno istraživanje pokazalo je nešto veći udio fenolnih spojeva, ali takve konvencionalne metode zahtijevaju dugo vrijeme izvedbe eksperimenta te korištenje veće količine otapala u odnosu na ASE ekstrakciju.

4.2 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

U tablicama 6, 7 i 8 prikazani su rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima kadulje, lista masline i origana određene DPPH metodom. Dobiveni rezultati izraženi su u μmol TE (ekvivalent troloxa) g⁻¹ uzorka ± standardna devijacija.

Tablica 6. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata kadulje određena DPPH metodom, izražena u μmol TE (ekvivalent troloxa) g⁻¹ uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>μmol TE g⁻¹</i>
K1	121,43 ± 2,80
K2	166,75 ± 2,17
K3	175,92 ± 0,37
K4	179,75 ± 0,16
K5	178,20 ± 0,32
K6	176,44 ± 0,34
K7	177,18 ± 0,13
K8	176,92 ± 1,87

Na osnovu dobivenih rezultata u Tablici 6, možemo vidjeti kako se antioksidacijska aktivnost kreće u rasponu od 121,43 do 179,75 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka, s tim da je najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod uzorka K4 koji je ekstrahiran pri 22 °C, vremenu ekstrakcije od 9 min tijekom 1 ciklusa. Najmanji antioksidacijski kapacitet pokazuje uzorak K1, ekstrahiran pri 22 °C, statičkom vremenu od 3 min i 1 ciklusa ekstrakcije.

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista masline određena DPPH metodom, izražena u $\mu\text{mol TE}$ (ekvivalent troloxa) g^{-1} uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>$\mu\text{mol TE g}^{-1}$</i>
M9	22,71 \pm 0,04
M10	30,97 \pm 0,11
M11	32,78 \pm 0,01
M12	31,54 \pm 0,16
M13	33,17 \pm 0,02
M14	33,00 \pm 0,05
M15	91,99 \pm 0,25
M16	92,17 \pm 0,05

Iz rezultata prikazanih u tablici 7 uzorci M15 (ekstrahiran pri 50 °C, vremenu ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa) i M16 (50 °C, 9 min, 1 ciklus) izdvajaju se u odnosu na ostale rezultate, obzirom da pokazuju oko trostruko više antioksidacijske aktivnosti u odnosu na ostale ekstrakte. Antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivenih ekstrakcijom iz lista masline se tako kreće u rasponu između 22,71 i 92,17 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka. Najveću antioksidacijsku aktivnost od 92,17 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka pokazao je uzorak M16, ekstrahiran pri 50 °C, statičkog vremena od 9 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije. Najmanja antioksidacijska aktivnost potvrđena je kod uzorka M9 (22,71 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka) ekstrahiranog pri 22 °C, vremena ekstrakcije od 3 min i tijekom 1 ciklusa.

Tablica 8. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata origana određena DPPH metodom, izražena u $\mu\text{mol TE}$ (ekvivalent troloxa) g^{-1} uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>$\mu\text{mol TE g}^{-1}$</i>
O17	$35,32 \pm 0,03$
O18	$36,59 \pm 0,04$
O19	$36,34 \pm 0,03$
O20	$36,40 \pm 0,13$
O21	$83,87 \pm 0,01$
O22	$84,08 \pm 0,25$
O23	$84,00 \pm 0,03$
O24	$83,81 \pm 0,58$

U uzorcima ekstrakata origana antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom kreće se u rasponu od 35,32 do 84,01 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka (Tablica 8). Također, može se primijetiti da uzorci koji su ekstrahirani pri višim temperaturama imaju veću antioksidacijsku aktivnost. Uzorak sa najvećom AA je O22 (84,01 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka) ekstrahiran pri 50 °C, 3 min tijekom 2 ciklusa ekstrakcije, a najmanju AA pokazao je uzorak O17 (35,32 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka) ekstrahiran pri 22 °C, 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije.

Tsaksona i sur. (2010) su osim ukupnih fenola, odredili i antioksidacijsku aktivnost kadulje, lista masline i origana. Kadulja je imala najveću antioksidacijsku aktivnost (AA) od 30,6 mg DPPH g^{-1} , zatim slijedi origano sa AA od 16,1 mg DPPH g^{-1} i list masline sa AA 19,3 mg DPPH g^{-1} . U ekstraktima kojima se određivala antioksidacijska aktivnost u ovom radu, kadulja je također imala najveću antioksidacijsku aktivnost (179,75 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka). Prema Bozinu i sur. (2007) antioksidativno djelovanje esencijalnog ulja kadulje prema DPPH je posebno visoko ($\text{IC}_{50} = 1,78 \mu\text{L mL}^{-1}$) zbog sposobnosti spojeva esencijalnog ulja da djeluju kao donori atoma vodika ili elektrona. IC_{50} predstavlja količinu biljnog ekstrakta potrebnu za smanjenje inicijalnog DPPH radikala do 50 %. Obično se definira kao: molovi fenolnih spojeva podijeljenih s molovima DPPH radikala potrebnim da se apsorpcija DPPH radikala smanji za 50 %. Što je IC_{50} vrijednost niža, to je veća je antioksidativna snaga (Roby i sur., 2013). Nadalje, zabilježeno je da eterično ulje *S. officinalis* posjeduje određeni redukcijski potencijal prema ionima željeza (Viuda-Martos i sur., 2010). Nakon kadulje, vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lista masline iznosi 92,17 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka i na kraju najmanju AA imaju ekstrakti origana sa 84,01 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti kako uzorci ekstrahirani ASE ekstrakcijom pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na one ekstrahirane

konvencionalnim metodama poput ekstrakcije hidroetanolnim smjesama. Još se može primijetiti kako su najmanju antioksidacijsku aktivnost kod sve 3 biljke imali uzorci ekstrahirani pri 22 °C, statičkom vremenu 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije, te je kod takvih uzoraka pronađen i najmanji udio fenolnih spojeva. Na osnovu toga može se reći da uzorci sa većim udjelom fenolnih spojeva posjeduju i veću antioksidacijsku aktivnost.

Jiménez-Zamora i sur. (2016) odredili su antioksidacijsku aktivnost, ukupne fenole i boju 36 različitih biljaka, između ostalog i kadulje, masline i origana. Proučavali su odnos između ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog različitim metodama u biljkama koje se ne skladište. Kao rezultat su dobili statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u svim mogućim kombinacijama te je Pearsonova linearna korelacija (r) bila veća od 0,9500. Takvi podaci ukazuju na to da bi glavni dio antioksidacijskog kapaciteta ovih biljaka mogao potjecati od fenola umjesto nekih drugih spojeva poput vitamina C ili tokola. Katalinić i sur. (2006) također su primijetili povezanost između ukupne količine fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivene FRAP testom ($r = 0,9825$). Međutim, Wongsu i sur. (2012) nisu našli dobru povezanost između antioksidacijskog kapaciteta dobivenog DPPH testom i fenolnog sadržaja ($r = 0,02$), što ukazuje da fenolni spojevi određeni u ovim uzorcima vjerojatno ne pridonose antioksidacijskoj aktivnosti. Antioksidacijsko djelovanje biljnih ekstrakata nije ograničeno samo na fenolne spojeve (Javanmardi i sur., 2003). Djelovanje nekih drugih sekundarnih metabolita biljaka, poput hlapljivih ulja, karotenoida i vitamina, također doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti (Wongsu i sur. 2012).

4.3 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Ovom metodom mjerena je sposobnost antioksidansa da reduciraju željezo tripirdiltriazin kompleks (Fe^{3+}) u fero kompleks (Fe^{2+}) u otopini TPTZ pri niskom pH. U tablicama 9, 10 i 11 prikazani su rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima kadulje, lista masline i origana određene FRAP metodom. Dobiveni rezultati izraženi su u $\mu\text{mol FE}$ (ekvivalent Fe^{2+}) g^{-1} uzorka \pm standardna devijacija.

Tablica 9. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata kadulje određena FRAP metodom, izražena u $\mu\text{mol FE (ekvivalent Fe}^{2+}) \text{ g}^{-1}$ uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>$\mu\text{mol FE g}^{-1}$</i>
K1	128,10 \pm 10,35
K2	155,22 \pm 2,05
K3	198,69 \pm 8,34
K4	264,22 \pm 1,68
K5	222,86 \pm 9,27
K6	292,61 \pm 9,53
K7	387,02 \pm 1,31
K8	308,44 \pm 16,94

Antioksidacijska aktivnost u uzorcima kadulje određena je u rasponu od 128,10 do 387,02 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka (Tablica 9), gdje najveću antioksidacijsku aktivnost ima uzorak K7 ekstrahiran pri 50 °C, vremenu od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije. Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak K1, ekstrahiran pri 22 °C, vremenu statičke ekstrakcije od 3 min, tijekom 1 ciklusa.

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista masline određena FRAP metodom, izražena u $\mu\text{mol FE (ekvivalent Fe}^{2+}) \text{ g}^{-1}$ uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>$\mu\text{mol FE g}^{-1}$</i>
M9	48,23 \pm 0,30
M10	65,84 \pm 2,99
M11	79,12 \pm 0,46
M12	66,95 \pm 0,91
M13	76,92 \pm 0,44
M14	111,84 \pm 2,12
M15	155,26 \pm 8,43
M16	111,72 \pm 1,22

Iz priložene Tablice 10 vidimo kako se raspon antioksidacijske aktivnosti u uzorcima origana kreće između 48,23 i 155,26 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka. Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom pokazao je uzorak M15 ekstrahiran pri uvjetima temperature od 50 °C, vremena ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa, dok najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak M9 ekstrahiran pri 22 °C, 3 min i 3 ciklusa ekstrakcije.

Tablica 11. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata origana određena FRAP metodom, izražena u $\mu\text{mol FE (ekvivalent Fe}^{2+}) \text{ g}^{-1}$ uzorka.

<i>Uzorak</i>	<i>$\mu\text{mol FE g}^{-1}$</i>
O17	90,65 \pm 9,39
O18	119,47 \pm 0,11
O19	120,57 \pm 9,95
O20	168,65 \pm 0,09
O21	158,19 \pm 3,02
O22	240,40 \pm 5,98
O23	312,29 \pm 29,88
O24	273,39 \pm 9,30

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata origana određena je u rasponu od 90,65 do 312,29 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka (Tablica 11). Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak O23, ekstrahiran pri 50 °C, 3 min i 3 ciklusa ekstrakcije, a najmanju AA ima uzorak O17, ekstrahiran pri uvjetima temperature 22 °C, statičkog vremena 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije.

Prema dobivenim rezultatima za sve 3 biljke, najveću antioksidacijsku aktivnost izraženu pomoću FRAP metode, pokazali su uzorci ekstrahirani pri 50 °C kroz 3 min i tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, a najmanju antioksidacijsku aktivnost imali su uzorci ekstrahirani pri 22 °C, vremenu ekstrakcije 3 min tijekom 1 ciklusa ekstrakcije. Takav trend može se usporediti s udjelom izoliranih fenolnih spojeva, što pokazuje da veći udio fenolnih spojeva u ekstrahiranom uzorku pokazuje i veću antioksidacijsku aktivnost. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su ekstrakti kadulje (387,02 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka) zatim ekstrakti origana sa AA (312,29 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka), dok je u ekstraktima lista masline određena najmanja AA (155,26 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka).

Suprotno rezultatima dobivenima u ovom radu, Fernandes i sur. (2015) odredili su ukupni antioksidacijski kapacitet i fenolni sadržaj 13 različitih biljaka (ponajviše iz porodice *Lamiaceae*, među kojima su bili origano i kadulja) gdje je najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je origano (DPPH = 9,06 g TE 100 g^{-1} uzorka i FRAP = 472,32 $\mu\text{mol TE 100 g}^{-1}$ uzorka), a kadulja je imala AA određenu DPPH metodom 2.59 g TE 100 g^{-1} uzorka i FRAP metodom 231,60 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka. Takve rezultate potvrdilo je i istraživanje provedeno 2005. gdje su Shan i sur. također uočili veću AA kod ekstrakata origana (1,01 mmol TE g^{-1} uzorka) u odnosu na ekstrakte kadulje (0,52 mmol TE g^{-1} uzorka).

Kako je do sada dokazano, samo jedna metoda ne može odrediti stvarnu ukupnu antioksidacijsku sposobnost pojedinog uzorka. Tako su u ovom radu najmanju antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom imali ekstrakti origana, dok je FRAP metodom potvrđena najmanja AA u ekstraktima lista masline. Da bi se u potpunosti opisao lipofilni i hidrofilni kapacitet te pojasnio cjeloviti profil antioksidacijske aktivnosti potrebno je provesti niz metoda (Yashin i sur., 2017).

4.4 ODREĐIVANJE PARAMETARA BOJE PO CIE L*a*b* SISTEMU BOJA

U tablicama 12, 13 i 14 prikazani su rezultati boje dobiveni prema CIE L*a*b* sistemu u ekstraktima kadulje, lista masline i origana nakon provedene ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Kao referentni uzorci korištene su vrijednosti uzoraka ekstrahiranih pri 22 °C, tijekom jednog ciklusa ekstrakcije i statičkog vremena od 3 minute.

Tablica 12. Parametri boje za ekstrakte kadulje

	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>C*</i>	<i>H°</i>
K1	62,36 ± 0,04	9,91 ± 0,01	44,68 ± 0,01	45,76 ± 0,01	77,50 ± 0,01
K2	53,76 ± 0,01	10,79 ± 0,01	45,81 ± 0,01	47,06 ± 0,01	76,75 ± 0,01
K3	48,73 ± 0,02	12,79 ± 0,02	47,19 ± 0,01	48,89 ± 0,02	74,84 ± 0,02
K4	49,53 ± 0,02	8,66 ± 0,01	44,63 ± 0,02	45,46 ± 0,02	79,03 ± 0,01
K5	46,42 ± 0,01	7,48 ± 0,00	43,17 ± 0,02	43,81 ± 0,01	80,17 ± 0,01
K6	34,52 ± 0,01	10,23 ± 0,01	41,75 ± 0,01	42,98 ± 0,01	76,24 ± 0,00
K7	30,03 ± 0,01	6,95 ± 0,02	37,83 ± 0,00	38,46 ± 0,00	79,59 ± 0,02
K8	38,49 ± 0,01	10,59 ± 0,01	43,66 ± 0,01	44,93 ± 0,01	76,37 ± 0,02

Iz Tablice 12 možemo vidjeti kako uzorak K1, koji je ekstrahiran pri 22 °C, vremenu ekstrakcije od 3 min i 1 ciklusa, ima najsvjetliju nijansu boje prema pokazatelju L* (62,36). Na osnovu toga, obzirom da je korišten kao referentni uzorak, ostali uzorci su tamniji od kojih je najtamniji uzorak K7 (L*=30,03), ekstrahiran u uvjetima reakcije gdje je temperatura bila 50 °C, vrijeme ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa. Pokazatelj a* kod uzorka K3 (ekstrahiran pri 22 °C, 3 min i 3 ciklusa) ima najveću vrijednost (a*=12,79) stoga taj uzorak pokazuje najveći udio crvene boje, dok najmanji udio crvene boje ima uzorak K7 (a*=6,95). Parametar b* predstavlja udio žute boje, od kojih najveći udio boje ima uzorak K7 (b*=37,83) obzirom da ima najmanji parametar b*. Najmanji udio žute boje ima uzorak

K3 ($b^*=47,19$). Ton boje (C^*) predstavlja intenzitet boje, koji je najviše izražen kod uzorka K3 ($C^*=48,89$), a najslabiju zasićenost boje ima uzorak K7 ($C^*=38,46$). Parametar H° predstavlja vizualni doživljaj boje, i izražen je u stupnjevima. Svi uzorci kadulje pokazuju crveno-narančasti doživljaj boje od kojih najjači doživljaj boje ima uzorak K5, ekstrahiran pri $50\text{ }^\circ\text{C}$, 3 min tijekom 1 ciklusa ($H^\circ=80,17$). Najslabiji doživljaj boje ima uzorak K3 ($H^\circ=74,84$).

Tablica 13. Parametri boje za ekstrakte lista masline

	L^*	a^*	b^*	C^*	H°
M9	$86,21 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,01$	$35,20 \pm 0,02$	$35,25 \pm 0,02$	$86,96 \pm 0,01$
M10	$81,23 \pm 0,01$	$3,33 \pm 0,01$	$40,95 \pm 0,04$	$41,08 \pm 0,04$	$85,36 \pm 0,01$
M11	$78,52 \pm 0,01$	$4,27 \pm 0,02$	$45,20 \pm 0,01$	$45,40 \pm 0,01$	$84,62 \pm 0,02$
M12	$82,98 \pm 0,01$	$2,50 \pm 0,01$	$37,45 \pm 0,04$	$37,53 \pm 0,04$	$86,18 \pm 0,01$
M13	$74,72 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,01$	$47,29 \pm 0,00$	$47,53 \pm 0,00$	$84,22 \pm 0,01$
M14	$63,46 \pm 0,01$	$9,76 \pm 0,01$	$56,11 \pm 0,00$	$56,96 \pm 0,00$	$80,14 \pm 0,01$
M15	$61,44 \pm 0,01$	$9,37 \pm 0,01$	$55,71 \pm 0,03$	$56,49 \pm 0,03$	$80,45 \pm 0,02$
M16	$64,45 \pm 0,01$	$8,59 \pm 0,01$	$54,26 \pm 0,01$	$54,93 \pm 0,01$	$81,01 \pm 0,00$

Prema podacima iz Tablice 13 vidimo da uzorak M9, ekstrahiran pri $22\text{ }^\circ\text{C}$, vremenu ekstrakcije od 3 min i 1 ciklusa, ima najsvjetliju nijansu boje prema pokazatelju L^* ($86,21$). Ostali uzorci su tamniji od kojih je najtamniji uzorak M15 ($L^*=61,44$), ekstrahiran pri uvjetima reakcije gdje je temperatura bila $50\text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa. Pokazatelj a^* , koji predstavlja udio crvene boje, najizraženiji je kod uzorka M14 (ekstrahiran pri $50\text{ }^\circ\text{C}$, 3 min i 2 ciklusa) a ima vrijednost $a^*=9,76$. Najmanji udio crvene boje ima uzorak M9 ($a^*=1,87$). Parametar b^* najmanji je kod uzorka M9 ($b^*=35,20$) što znači da taj uzorak ima najveći udio žute boje. Najmanji udio žute boje ima uzorak M14 ($b^*=56,11$). Intenzitet boje (C^*) je najjači kod uzorka M14 ($C^*=56,96$), a najslabije je izražen kod uzorka M9 ($C^*=35,25$). Vizualni doživljaj boje uzoraka lista masline je crveno-narančasti, a najizraženiji je kod uzorka M9 ($H^\circ=86,96$), dok najslabiji doživljaj boje ima uzorak M14 ($H^\circ=80,14$).

Tablica 14. Parametri boje za ekstrakte origana

	L^*	a^*	b^*	C^*	H°
O17	82,54 ± 0,00	2,54 ± 0,01	29,41 ± 0,03	29,52 ± 0,03	85,07 ± 0,03
O18	75,38 ± 0,02	4,43 ± 0,01	36,44 ± 0,03	36,70 ± 0,02	83,08 ± 0,01
O19	72,30 ± 0,01	4,89 ± 0,01	38,73 ± 0,01	39,034 ± 0,01	82,81 ± 0,01
O20	75,99 ± 0,03	3,77 ± 0,01	35,97 ± 0,02	36,17 ± 0,02	84,03 ± 0,01
O21	61,86 ± 0,01	8,52 ± 0,00	46,78 ± 0,02	47,54 ± 0,01	79,68 ± 0,00
O22	50,77 ± 0,02	11,78 ± 0,01	49,17 ± 0,02	50,56 ± 0,02	76,53 ± 0,01
O23	49,02 ± 0,01	12,06 ± 0,01	49,36 ± 0,04	50,81 ± 0,04	76,27 ± 0,02
O24	54,98 ± 0,01	10,45 ± 0,01	48,54 ± 0,04	49,65 ± 0,04	77,86 ± 0,01

Iz uzoraka prikazanih u Tablici 14 najmanju vrijednost L^* parametra ima uzorak O23 ($L^*=49,02$) koji je ekstrahiran pri 50 °C, vremenu ekstrakcije od 3 min tijekom 3 ciklusa, što znači da je taj uzorak najtamniji. Najsvjetliji uzorak je O17 ($L^*=82,54$), ekstrahiran u uvjetima reakcije gdje je temperatura bila 22 °C, vrijeme ekstrakcije 3 min kroz 1 ciklus ekstrakcije. Pokazatelj a^* kod uzorka O23 ima najveću vrijednost ($a^*=12,06$) stoga taj uzorak pokazuje najveći udio crvene boje, dok najmanji udio crvene boje ima uzorak O17 ($a^*=2,54$). Parametar b^* predstavlja udio žute boje, od kojih najveći udio boje ima uzorak O17 ($b^*=29,41$) jer ima najmanji parametar b^* . Najmanji udio žute boje ima uzorak O23 ($b^*=49,36$). Zasićenost tj. ton boje (C^*) najjači je kod uzorka O23 ($C^*=50,81$), a najslabije je izražen kod uzorka O17 ($C^*=29,52$). Svi uzorci origana pokazuju crveno-narančasti doživljaj boje od kojih najjači doživljaj boje ima uzorak O17 ($H^\circ=85,07$), a najslabiji doživljaj boje ima uzorak O23 ($H^\circ=76,27$).

Dobivene rezultate možemo potkrijepiti istraživanjem Wei i sur. (2017) koji su proučavali kako tretiranje povišenom temperaturom utječe na polifenole izolirane iz drveta bagrema (*Robinia pseudoacacia*) primjenom ASE tehnike ekstrakcije. Utjecaj povišene temperature znatno je utjecao na CIE L^* a^* b^* parametre. Parametrima a^* , b^* i C^* povećala se vrijednost tijekom zagrijavanja, što ukazuje da su a^* parametri imali veći udio crvene boje, a b^* parametri veći udio žute boje. Također, saturacija boje (C^*) je izraženija kod uzoraka tretiranih višom temperaturom. Takav slučaj pokazao se i na uzorcima kadulje, lista masline i origana (parametri su izraženiji pri 50 °C). Povišenje tih parametara sugerira da su fenolni spojevi podložni promjenama u kemijskoj strukturi i boji kada se na njih djeluje povišenom temperaturom. Također su dokazali da prisutnost vode i kisika utječe na kemijske

promjene fenola formirajući nove kromoforne grupe tijekom zagrijavanja što za posljedicu ima i promjenu u boji.

Što se tiče svjetline uzoraka (L^*), pri višim temperaturama došlo je do smanjenja od 60 %, tj. uzorci tretirani povišenom temperaturom pokazali su tamniju nijansu boje. Uzorci koji se proučavaju u ovom diplomskom radu, također su pokazali tamniju nijansu boje ukoliko su ekstrahirani pri višim temperaturama, te su tamniji do 59 % u odnosu na referentni uzorak. To ukazuje da je tijekom tretiranja povišenom temperaturom iz fenola proizvedeno više spojeva koji apsorbiraju vidljivu svjetlost. Zaključeno je da su fenolni spojevi osjetljivi na visoke temperature, prisutnost vode i kisika. Kombinacija ovih parametara utječe na katalizu termokemijske kondenzacije i/ili reakcija oksidacije što se odražava na samu boju bagrema, ali i proučavanih ekstrahiranih uzoraka kadulje, lista masline i origana.

U tablicama 15, 16 i 17 prikazana je ukupna promjena boje (ΔE), zasićenosti boje (ΔH), razlike u tonu boje (ΔC) i promjene u svjetlini (ΔL) u ekstraktima kadulje, lista masline i origana nakon provedene ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Kao referentni uzorci korištene su vrijednosti uzoraka ekstrahiranih pri 22 °C, tijekom jednog ciklusa ekstrakcije i statičkog vremena od 3 minute.

Tablica 15. Ukupna promjena parametara boje ekstrakata kadulje

	ΔL	Δa	Δb	ΔC	ΔE	ΔH
K1	-	-	-	-	-	-
K2	-8,60	0,88	-0,02	1,30	8,64	12,12
K3	-13,63	2,89	1,11	3,13	13,98	19,27
K4	-12,83	-1,25	1,13	-0,31	12,94	18,23
K5	-15,94	-2,43	2,51	-1,95	16,32	22,89
K6	-27,84	0,32	2,49	-2,78	27,95	39,55
K7	-32,33	-2,96	-0,08	-7,30	32,47	46,40
K8	-23,87	0,69	-0,05	-0,84	23,87	33,77

Iz dobivenih podataka u Tablici 15 možemo vidjeti kako parametar Δa kod 3 uzorka (K4, K5 i K7) ima negativan predznak, što znači da je boja tih ekstrakata zelenija u odnosu na referentni uzorak, dok ostali ekstrakti pokazuju crveniju boju no referentni uzorak. Uzorak K4 ekstrahiran je pri temperaturi od 22 °C ali pri dužem vremenu ekstrakcije (9 min) od ostalih uzoraka tretiranih pri istoj temperaturi. Uzorci K5 i K7 ekstrahirani su pri 50 °C,

te je uočeno da je boja izraženija kod uzorka koji je ekstrahiran većim brojem ciklusa (3). Parametrom Δb određena su 3 uzorka plavlja od referentnog (K2, K7 i K8), od kojih najveću razliku od referentnog uzorka pokazuje uzorak K7 (50 °C, 3 min i 3 ciklusa). Ostali uzorci pokazuju žuću boju od referentnog uzorka, od kojih je najžući uzorak K5 (50 °C, 3 min i 1 ciklus). Razlika u tonu boje (ΔC) najveća je kod uzorka K7, koji pokazuje smanjenu saturaciju tj. zasićenost boje u odnosu na referentni uzorak, a uzorak K3 (22 °C, 3 min i 3 ciklusa) pokazuje veću saturaciju u odnosu na referentni uzorak, i najveću među ekstrahiranim uzorcima. Prema dobivenim parametrima, najveće promjene u svjetlini (ΔL), zasićenosti boje (ΔH) i ukupnoj promjeni boje (ΔE) ima uzorak K7, ekstrahiran pri uvjetima temperature od 50 °C, statičkom vremenu 3 minute tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, gdje negativan predznak parametra ΔL (-32,33) sugerira kako je K7 najtamniji uzorak.

Tablica 16. Ukupna promjena parametara boje ekstrakata lista masline

	ΔL	Δa	Δb	ΔC	ΔE	ΔH
M9	-	-	-	-	-	-
M10	-4,99	1,46	5,75	5,83	7,75	1,10
M11	-7,70	2,4	10,01	10,15	12,85	1,68
M12	-3,24	0,64	2,25	2,28	3,99	0,52
M13	-11,49	2,93	12,10	12,29	16,94	1,99
M14	-22,75	7,89	20,92	21,72	31,89	5,31
M15	-24,78	7,51	20,52	21,25	33,03	5,08
M16	-21,77	6,72	19,06	19,68	29,70	4,60

Što se tiče ekstrakata dobivenih iz lista masline, prikazanih u Tablici 16, prema parametru Δa svi uzorci su crveniji od referentnog uzorka, obzirom da sve vrijednosti imaju pozitivan predznak. Najcrveniji uzorak je M14 (50 °C, 3 min i 2 ciklusa). Parametrom Δb određeno je da su svi uzorci žući od referentnog uzorka od kojih najžuću nijansu također pokazuje uzorak M14. Razlika u tonu boje (ΔC) i zasićenosti boje (ΔH) najveća je kod uzorka M14, koji pokazuje veću saturaciju boje obzirom na referentni uzorak. Najveće promjene u svjetlini (ΔL) i ukupnoj promjeni boje (ΔE) ima uzorak M15, ekstrahiran pri temperaturi od 50 °C, statičkom vremenu 3 minute tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, ujedno je i najtamniji uzorak ($\Delta L = -24,78$).

Tablica 17. Ukupna promjena parametara boje ekstrakata origana

	ΔL	Δa	Δb	ΔC	ΔE	ΔH
O17	-	-	-	-	-	-
O18	-7,16	1,89	7,03	7,18	10,21	1,16
O19	-10,24	2,35	9,32	9,52	14,04	1,33
O20	-6,56	1,23	6,56	6,65	9,35	0,56
O21	-20,69	5,98	17,37	18,02	27,66	3,55
O22	-31,78	9,24	19,76	21,04	38,54	5,76
O23	-33,52	9,52	19,95	21,29	40,15	5,94
O24	-27,57	7,91	19,13	20,13	34,47	4,80

Iz dobivenih rezultata za promjenu boje u uzorcima origana (Tablica 17), također svi uzorci pokazuju crveniju boju u odnosu na referentni uzorak, od kojih najviše uzorak O24 (50 °C, 9 min i 1 ciklus). Parametrom Δb određeno je da su svi uzorci žući od referentnog od kojih je najžući uzorak O23 (50 °C, 3 min i 3 ciklusa). Razlika u tonu boje (ΔC) najveća je kod uzorka O23 koji ima veću saturaciju od referentnog uzorka. Najveće promjene u svjetlini (ΔL), zasićenosti boje (ΔH) i ukupnoj promjeni boje (ΔE) ima uzorak O23, ekstrahiran pri temperaturi od 50 °C, statičkom vremenu 3 minute tijekom 3 ciklusa ekstrakcije, te prema parametru ΔL (-33,52) pokazuje najtamniju nijansu boje.

Najveće promjene u boji kod sva tri uzorka pokazala su se kod ekstrakata dobivenih ASE ekstrakcijom pri 50 °C, vremenu ekstrakcije 3 min kroz 3 ciklusa. Također, navedeni ekstrakti imali su najveći udio fenolnih spojeva i najviše izraženu antioksidacijsku aktivnost. Osim što imaju zaštitni, konzervirajući učinak i djeluju na organoleptička svojstva hrane, fenolni spojevi su odgovorni i za boju (Yañez i sur., 2004). Do danas je provedeno malo istraživanja o utjecaju bioaktivnih spojeva na boju biljke. U prijašnjim studijama pokazalo se da je razina antioksidacijske aktivnosti i sadržaj ukupnih fenola, ukupnih antocijana, topivih čvrstih tvari, glukoze, fruktoze i kiselosti viši u biljkama na području Mediterana u usporedbi s onima u pustinjskoj klimi (Schwartz i sur., 2009). Sadighara i sur. (2012) su proveli istraživanje u kojem dokazuju da je antioksidacijska aktivnost povezana sa intenzitetom biljne boje. Također, pokazano je kako biljke sa dubokim, tamnim tonovima boje imaju veću antioksidacijsku aktivnost. Za to su prvenstveno zaslužni antocijani, koji su snažni antioksidansi i pridonose boji većini cvijeća, voća i povrća. Stoga postoji moguća veza između razine antocijana u biljci i njenog antioksidacijskog kapaciteta.

Zaključeno je da biljke sa izraženijim pigmentom boje posjeduju više bioloških učinaka povezanih s antioksidacijskom aktivnosti.

4.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Prema Tablici 18 možemo zaključiti kakav su utjecaj imali parametri ASE ekstrakcije na udio izoliranih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i boju uzoraka.

Tablica 18. Prikaz utjecaja nezavisnih varijabli ekstrakcije na ukupne fenole, antioksidacijsku aktivnost i parametre boje.

	Istraživani matriks (biljka)	Temperatura (°C)	Statičko vrijeme (min)	Broj ciklusa
<i>TPC</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>DPPH</i>	< 0.0001	< 0.0001	0.001	0.002
<i>FRAP</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>L*</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>a*</i>	0.006	< 0.0001	0.208	0.010
<i>b*</i>	0.318	< 0.0001	0.220	0.031
<i>C*</i>	0.252	< 0.0001	0.217	0.027
<i>h</i>	< 0.0001	< 0.0001	0.174	0.004
Δa	< 0.0001	< 0.0001	0.208	0.010
Δb	< 0.0001	< 0.0001	0.220	0.031
ΔL	0.739	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
ΔC	< 0.0001	< 0.0001	0.217	0.027
ΔE	0.014	< 0.0001	0.001	< 0.0001
ΔH	0.010	< 0.0001	0.292	0.023

*podebljano se nalaze rezultati koji su statistički značajni ($p \leq 0.05$)

Prema podacima iz Tablice 18 vidljivo je da odabir različitog matriksa, tj. vrste biljke značajno utječe na dobivene rezultate. Pa se tako pokazalo da kadulja sadrži veći udio fenolnih spojeva u odnosu na list masline i origano. Jedino se pokazalo da nema značajan utjecaj na neke parametre boje, poput ukupne svjetline uzorka, tona boje i žute odnosno plave nijanse boje, što znači da ASE ekstrakcija daje slične nijanse boje bez obzira koji se od danih biljnih materijala koristi. Temperatura kao i broj ciklusa ekstrakcije pokazali su značajan utjecaj na udio fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i boju ekstrakata. Statičko vrijeme ekstrakcije pokazalo je značajan utjecaj na udio fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Pri određivanju boje ekstrakata, statičko vrijeme se pokazalo značajno jedino za svjetlinu uzorka te odgovarajuću ukupnu promjenu boje.

5. ZAKLJUČCI

- Optimalni uvjeti provođenja ASE ekstrakcije pri kojima je određen najveći udio fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost u ekstraktima kadulje, lista masline i origana dobiveni su kod sljedećih parametara: temperatura 50 °C, statičko vrijeme ekstrakcije od 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije.
- Najveći udio fenolnih spojeva izoliran je iz ekstrakta kadulje (34,22 mg GAE g⁻¹), zatim origana (29,53 mg GAE g⁻¹), a najmanji udio iz lista masline (19,14 mg GAE g⁻¹).
- Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom pokazali su najveću antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima kadulje (179,75 μmol TE g⁻¹), zatim lista masline (92,17 μmol TE g⁻¹), dok su najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazali ekstrakti origana (84,01 μmol TE g⁻¹).
- Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom pokazali su najveću antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima kadulje (387,02 μmol FE g⁻¹) zatim origana (312,29 μmol FE g⁻¹ uzorka), a u ekstraktima lista masline određena je najmanja antioksidacijska aktivnost (155,26 μmol FE g⁻¹ uzorka).
- Najveće promjene u boji kod sva tri uzorka pokazala su se kod ekstrakata dobivenih ASE ekstrakcijom pri parametrima temperature 50 °C, vremenu ekstrakcije 3 min tijekom 3 ciklusa ekstrakcije.
- Statističkom analizom dokazano je kako temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa značajno utječu na ekstrakciju fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i boju uzoraka.

6. LITERATURA

- Acierno, D., Barba, A.A., d'Amore, M. (2004) Heat transfer phenomena during processing materials with microwave energy. *Heat Mass Transf.* **40**, 413–420.
- Anonymus 1, Anonymus 2 (2020) Kadulja, <<https://www.plantea.com.hr/ljekovita-kadulja/>>, Pristupljeno 18 lipnja 2020.
- Anonymus 3, Anonymus 4 (2020) Maslina, <<https://www.plantea.com.hr/maslina/>>, Pristupljeno 18 lipnja 2020.)
- Anonymus 5, Anonymus 6 (2020) Origano, <<https://www.plantea.com.hr/origano/>>, Pristupljeno 18 lipnja 2020.
- Anonymus 7 (2020) Kolorimetar CM3500d, <<https://www5.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/home.html>>, Pristupljeno 15 svibnja 2020.
- Barba, J.F., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, S.S.A., Orliena, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and byproducts: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **49**, 96-109.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chem.* **68**, 457 - 462.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bergeron, C., Gafner, S., Clausen, E., Carrier, D.J. (2005) Comparison of the chemical composition of extracts from *Scutellaria lateriflora* using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction versus standard hot water or 70 % ethanol extraction. *J. Agric. Food Chem.* **53**(8), 3076–3080.
- Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Samoilik, I., Jovin, E. (2007) antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7879–7885.
- Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I., (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**(7), 892-895.

- Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., Putnik, P. (2018) Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **254**, 150–157.
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., Paolicelli, P. (2017) Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chem.* **232**, 114–123.
- Chun, S. S., Vattem, D. A., Lin Y. T., Shetty, K. (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* **40**(2), 809-816.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules.* **15**,7313-7352.
- Drew B. T., Sytsma K.J (2012) Phylogenetics, biogeography and staminal evolution in the tribe Mentheae (*Lamiaceae*). *Am. J. Bot.* **9**, 933-953.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**(2), 22-33.
- Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C. (2003) Polyphenols extraction from foods. U: *Methods in Polyphenol Analysis* (Santos-Buelga, C., Williamson, G., ured.). *Roy. Soc. Chem.* Cambridge, UK, str. 1–16.
- Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G, Lima, C. G., Pugine, S. M. P., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., de Melo, M. P. (2015) Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *J. Food Sci. Technol.* **53**(1), 451-460.
- Gelenčir J. i Gelenčir J. (1991) Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb.
- Ghorbani A., Esmailizadeh E. (2016) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Comp. Med.* **4**, 433 - 440.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., Saari, N. (2012) Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(3), 3291–3340.

- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F. J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., Režek Jambrak, A., (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int.* **113**, 245-262.
- Giergielewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł., Namieśnik, J. (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples — some aspects of theory and practice. *Anal. Chem.* **31**(3), 149–165.
- Gordon, M.H. (1991) Oils, fats: taint or flavour? *Chem. Brit.* **11**, 1020–1022.
- Hansson, M.C., Foley, B.P. (2008) Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck. *J. Arch. Sci.* **35**, 1169–76.
- Hulina, N. (2011.) Više biljke- stablašice, Sistematika i gospodarsko značenje, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J. M. (2003) Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.* **83**, 547–550.
- Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A. (2016) Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chem.* **199**, 339–346.
- Kametou, P., Viljoen, A., Steenkamp, P. (2010) Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.* **119**, 684-688.
- Katalinić, V., Miloš, M., Kulišić, T., Jukić, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94**, 550–557.
- Koch, W., Kukuła-Koch, W., Czop, M., Helon, P., Gumbarewicz, E. (2020) The role of extracting solvents in the recovery of polyphenols from green tea and its antiradical activity supported by Principal Component Analysis. *Molecules.* **25**(9), 2173.
- Ky, I., Teissedre, P.-L., (2015) Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: Polyphenolic content and antioxidant activity. *Molecules.* **20**, 2190-2207.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. (2007) Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* **100**, 1409–1418.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**(5), 727-747.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 95–111.
- Neagu, E., Roman, G.P., Radu, G.L. (2011) Antioxidant capacity of some *Salvia officinalis* concentrated extract, *Rev. Roum. Chim.* **56**, 777-782.
- Pereira, C. G., Angela, M., Meireles, A., (2010) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Tech.* **3**(3), 340–372.
- Pin-Der, D., Gow-Chin, Y. (1997) Antioxidant efficacy of methanolic extracts of peanut hulls in soybean and peanut oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74** (6), 745–748.
- Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K., (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53**(10), 4290-4302.
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food Bioprod. Process.* **106**, 19–28.
- Okoh, O.O. (2010) chemical transformations and phytochemical studies of bioactive components from extracts of *Rosmarinus officinalis* L., doktorski rad, Faculty of Science and Agriculture at the University of Fort Hare, South Africa.
- Raso, J., Manas, P., Pagan, R., Sala, F.J. (1999) Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **5**, 157–162.
- Raynie, D.E., (2006) Modern Extraction Techniques. *Anal. Chem.* **78**(12), 3997–4004.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996) Accelerated Solvent Extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* **68**(6), 1033–1039.
- Robards, K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A.* **1000**, 657-691.

- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crop. Prod.* **43**, 827–831.
- Sadighara, P., Gharibi, S., Moghadam Jafari, A., Jahed Khaniki, G., Salari, S. (2012) The antioxidant and flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color. *A. J. Phytomed.* **2**(3), 113-117.
- Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Wiesman, Z., Tripler, E., Bar-Ilan, I., Fromm, H., Borochoy-Neori, H., Holland, D., Amir, R. (2009) Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9197-9209.
- Servili, M., Montedoro, G.F. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 602–613.
- Shahid, I., Saba, H., Mubeena, A., Muhammad, Z., Jamshed, A. (2008) Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Res. Int.* **41**, 194–200.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7749–7759.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**(4), 828-834.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003) Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2144– 2155.
- Stepanović, B., Radanović, D., Turšić, I., Nemčević, N., Ivanec, N. (2009) Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja, AGRO-HIT PZ, Bjelovar.
- Taamalli, A., Arraez-Roman, D., Barrajon-Catalan, E., Ruiz-Torres, V., Perez-Sanchez, A., Herrero, M., Ibanez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2012) Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from

Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1817-1825.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M. L. (2013) Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agr.* **93**(11), 2707–2714.

Topcu, G., Tan, N., Ulubelen, A., Sun, D., Watson, W.H. (1995) Terpenoids and favonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*. *Phytochem.* **40**, 501–504.

Toplak Galle, K. (2001) Hrvatsko ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb.

Trinajstić I. (1992) Endemi hrvatske flore: Ljekovita kadulja – *Salvia officinalis* L., endemična, ljekovita, medonosna i ukrasna biljka. *Priroda* 9 – 10, str. 34-36.

Tsakona, S., Galanakis, C.M., Gekas, V. (2010) Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food Bioprocess Tech.* **5**(4), 1384–1393.

Tsao, R., (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* **2**, 1231-1246.

Vinceković, M., Viskiće, M., Jurić, S., Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Donsì, F., Barba, F.J., Režek Jambrak, A. (2017) Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends Food Sci. Tech.* **69**, 1-12.

Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2010) Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.* **25**, 13-19.

Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., Tao, S. (2007) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta.* **602**(2), 211–222.

Wei, Y., Wang, M., Zhang, P., Chen, Y., Gao, J., Fan, Y. (2017) The role of phenolic extractives in color changes of locust wood (*Robinia pseudoacacia*) during heat treatment. *BioResources.* **12**(4), 7041-7055.

Wongsa, P., Chaiwarit, J., Zamaludien, A. (2012) *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chem.* **131**, 964–971.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2014) Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* **122**, 323-330.

Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benaventegarcía, O., Canteras, M., Teruel, J. L. (2004) Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr. Cancer.* **49**, 191–199.

Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B. (2017) Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A Review. *Antioxidants.* **6**(3), 70.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Lucija Momić

Ime i prezime studenta