

# Fitokemijski profil, antioksidacijska aktivnost i fizikalno-kemijski parametri ekstrakta koprive (*Urtica dioica* L.) i industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

---

Preis, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:159:110366>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2025.

Matija Preis

FITOKEMIJSKI PROFIL,  
ANTIOKSIDACIJSKA  
AKTIVNOST I FIZIKALNO-  
KEMIJSKI PARAMETRI EKSTRAKTA  
KOPRIVE (*Urtica dioica* L.) I  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE  
(*Cannabis sativa* L.)

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Damira Stanzera te uz pomoć dr. sc. Karle Hanousek Čiča.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

FITOKEMIJSKI PROFIL, ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI  
EKSTRAKTA KOPRIVE (*Urtica dioica* L.) I INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

Matija Preis, univ. bacc. nutr. 0058215857

**Sažetak:** Kopriva (*Urtica dioica* L.) i industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) su dvije biljke s dugom poviješću upotrebe u ljudskoj civilizaciji, poznate po svojim brojnim ljekovitim i industrijskim svojstvima jer sadrže širok spektar bioaktivnih spojeva. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj postupka ekstrakcije na fitokemijski profil, antioksidacijsku aktivnost i fizikalno-kemijske parametre ekstrakta koprive i industrijske konoplje. Na ekstraktima je provedena klasična maceracija i tretman ultrazvukom te su ispitivane koncentracije ukupnih fenola i flavonoida; antioksidacijska aktivnost je definirana primjenom ABTS i FRAP metode; od fizikalno-kemijskih parametra određeni su: pH, ukupni suhi ekstrakt i kromatski parametri. Istraživanje je pokazalo da su trajanje, vrsta tretmana i odabir otapala ključni za uspješnu ekstrakciju fenolnih spojeva. Ultrazvučni tretman u kombinaciji s manjim udjelom biljnog materijala (1:50) pokazao je potencijal za optimizaciju ekstrakcije flavonoida i drugih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem, dok je maceracija općenito osigurala stabilnije kromatske parametre zbog duljeg kontakta s otapalom. Konoplja je bila bogatiji izvor flavonoida od koprive te se istaknula većom antioksidacijskom aktivnošću.

**Ključne riječi:** kopriva, konoplja, ekstrakt, maceracija, fenoli

**Rad sadrži:** 45 stranica 18 slika, 5 tablica, 43 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Damir Stanzer

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Karla Hanousek Čiča

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Damir Stanzer (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 14. veljače 2025.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Safety Management

FITOCHEMICAL PROFILE, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF EXTRACTS FROM NETTLE (*Urtica dioica* L.) AND INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* L.)

*Matija Preis, univ. bacc. nutr. 0058215857*

**Abstract:** Nettle (*Urtica dioica* L.) and industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) are two plants with a long history of use in human civilization, known for their numerous medicinal and industrial properties as they contain a wide range of bioactive compounds. The aim of this study was to investigate the effect of the extraction process on the phytochemical profile, antioxidant activity, and physicochemical parameters of nettle and industrial hemp extracts. The extracts underwent classical maceration and ultrasound treatment, and the concentrations of total phenols and flavonoids were examined; antioxidant activity was defined using the ABTS and FRAP methods; the physicochemical parameters determined were pH, total dry extract, and chromatic parameters. The study revealed that the duration, type of treatment, and choice of solvent are crucial for the successful extraction of phenolic compounds. Ultrasound treatment in combination with a lower proportion of plant material (1:50) showed potential for optimizing the extraction of flavonoids and antioxidant compounds, while maceration generally provided more stable chromatic parameters and better results due to longer solvent contact time. Hemp was a richer source of flavonoids compared to nettle and demonstrated higher antioxidant activity.

**Keywords:** nettle, hemp, ekstrakt, maceration, phenols

**Thesis contains:** 45 pages, 18 figures, 5 tables, 43 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Name, Surname, PhD, Full professor/Associate professor/Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD Karla Hanousek Čiča

### Reviewers:

1. PhD Jasna Mrvčić, Full professor (president)
2. PhD Damir Stanzer, Full professor (mentor)
3. PhD Marko Obranović, Associate professor (member)
4. PhD Sandra Balbino, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 14 February 2025

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. KOPRIVA .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Botanička svojstva .....	2
2.1.2. Fitokemijski sastav koprive.....	3
<b>2.2. INDUSTRIJSKA KONOPLJA.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Botanička svojstva .....	6
2.2.2. Fitokemijski sastav industrijske konoplje .....	7
<b>2.3. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI.....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Maceracija.....	9
2.3.2. Tretman ultrazvukom.....	9
<b>2.4. GLICEROL .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. OCAT .....</b>	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>12</b>
3.1.1. Biljni materijali .....	12
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Laboratorijska oprema i uređaji .....	13
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>14</b>
3.2.1. Priprema ekstrakta industrijske konoplje i obične koprive .....	14
3.2.1. Metode određivanja biološki aktivnih spojeva .....	18
3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti.....	21
3.2.3. Fizikalno-kemijski parametri .....	24
3.2.4. Obrada podataka .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Određivanje ukupnih flavonoida.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....</b>	<b>33</b>

<b>4.4. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara.....</b>	<b>35</b>
4.4.1. pH vrijednost.....	35
4.4.2. Ukupni suhi ekstrakt.....	37
4.4.3. Kromatski parametri .....	38
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>43</b>



# 1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) i industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) ističu se kao biljke bogatog izvora flavonoida, koji su grupa fenolnih spojeva s izraženim antioksidacijskim svojstvima. Obje biljke tradicionalno se koriste u prehrani i medicini, a njihov kemijski sastav pruža osnovu za daljnje istraživanje kako bi se optimizirala njihova uporaba.

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala ključan je korak u istraživanju njihovih funkcionalnih svojstava i potencijalne primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Fenolni spojevi, kao jedna od skupina bioaktivnih tvari, poznati su po svojim snažnim zdravstvenim učincima, uključujući antikancerogena, protuupalna i antimikrobna svojstva (Laganà i sur., 2019). U posljednjem desetljeću povećava se interes za primjenu suvremenih tehnika ekstrakcije poput ultrazvučnog tretmana koji omogućuje bržu i učinkovitiju ekstrakciju uz smanjenu potrošnju otapala i energije. Ipak, tradicionalne metode poput maceracije i dalje imaju značajnu primjenu zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti, posebno kod termolabilnih spojeva. Kombinacija tradicionalnih i modernih metoda predmet je brojnih istraživanja s ciljem optimizacije ekstrakcije u skladu s principima održivosti i ekološke prihvatljivosti (Anaya-Esparza i sur., 2023).

Cilj rada je odrediti fitokemijski profil, antioksidacijsku aktivnost i fizikalno kemijske parametre ekstrakta koprive i industrijske konoplje te ih međusobno usporediti. Također se i određuje učinkovitost ultrazvučnog tretmana nasuprot klasične maceracije u ekstrakciji fenolnih spojeva i drugih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem iz koprive i konoplje u različitim otapalima. Pripremljena su 32 uzoraka s različitim omjerima bilja te različitim vrstama i udjelima otapala (ocat, glicerol i etanol). Uzorci su prošli postupak klasične maceracije ili ultrazvučni tretman. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta je mjerena spektrofotometrijski primjenom ABTS i FRAP metode. Od fizikalno-kemijskih parametara određeni su pH, ukupni suhi ekstrakt i kromatski parametri.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOPRIVA

Kopriva (*Urtica dioica* L.) pripada porodici Urticaceae koja ima dugu povijest primjene kao biljni lijek i hranjivi dodatak ljudskoj prehrani. Tradicionalno se čaj od listova upotrebljavao kao tonik za pročišćavanje krvi (Bhusal i sur., 2022). Sukladno tome, ekstrakti koprive potvrđuju logičnu osnovu za tradicionalnu primjenu u liječenju različitih zdravstvenih problema kao što je reumatizam, anemija, nekih bubrežnih problema te hipertenzije. Također je poznata po neugodnosti koju izaziva pri dodiru, uzrokuje iritaciju kože, crvene prištiće i otekline, ubrizgavanjem peckajuće tekućine na način sličan hipodermičkoj igli (Grauso i sur., 2020).

#### 2.1.1. Botanička svojstva

*Urtica dioica* složena je taksonomska skupina unutar koje se prepoznaje nekoliko infraspecifičnih vrsti u raznim nacionalnim ili lokalnim florama, a ponekad se mogu pronaći i prijelazni oblici. *Urtica dioica* L. (slika 1) je višegodišnja zeljasta biljka koja raste na vlažnim tlima, livadama, zapuštenim poljima i često na mjestima s djelomičnom sjenom te se nalazi na nadmorskim visinama do 1800 metara. Stabljike ove vrste (crvenkaste ili žućkaste) mogu narasti do 120 cm visine, imaju četverokutni presjek i negranate su. Listovi su pričvršćeni na stabljiku peteljka kraćima od polovice duljine lisne plojke, a svaki list ima dva pubescentna (dlakava) palistića. Obje strane listova prekrivene su sitnim trihomima koji se sastoje od kraćih jednostavnih dlačica izmiješanih s duljim krutim žarnim dlačicama i cistolitima (Grauso i sur., 2020).



**Slika 1.** *Urtica dioica* L. (Asgarpanah i Mohajerani, 2012)

### 2.1.2. Fitokemijski sastav koprive

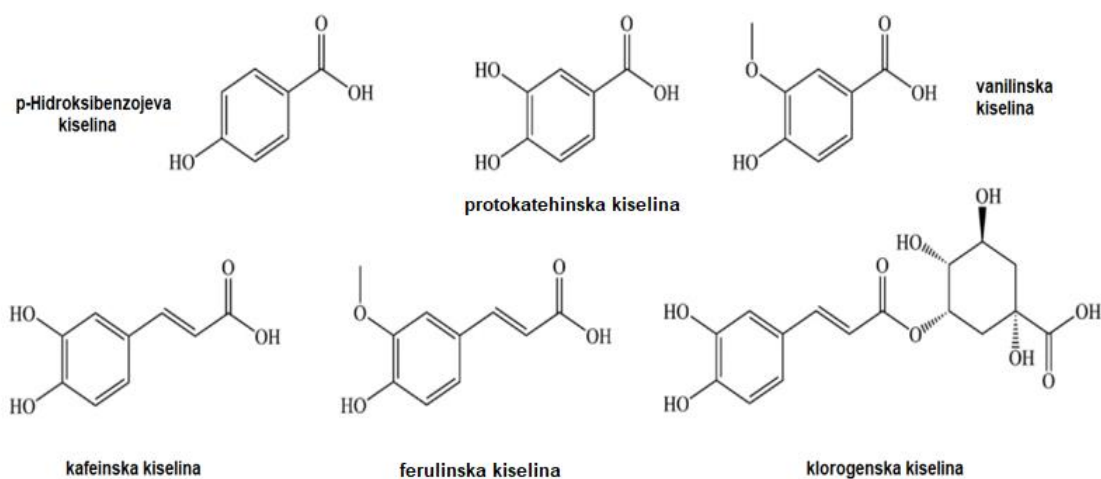
Fitokemikalije su biljni metaboliti proizvedeni kao odgovor na bilo koji infektivni napad ili kao nusproizvod bilo kojeg metaboličkog puta (Alamgir, 2018). Zbog svojih blagotvornih svojstava, kemijski sastav biljke koprive dosta je istražen. Aktivni kemijski dio koprive uključuje gotovo pedeset spojeva lipofilne i hidrofilne frakcije čija je kemijska struktura poznata. List koprive bogat je flavonoidima, taninima, klorofilima, karotenoidima, vitaminima (posebno C i K), masnim kiselinama i fitosterolima. S druge strane, korijen sadrži visok udio lignana, polisaharida, lektina i fitosterola. Svi ti spojevi doprinose različitim farmakološkim aktivnostima poput antioksidacijskih, protuupalnih, antiulkusnih, antikolitisa, antivirusnih, antikancerogenih, antibakterijskih, antimikrobnih, antifungalnih, antiandrogenih, insekticidnih, imunomodulatornih, hipoglikemijskih, kardiovaskularnih, analgetičkih, hipotenzivnih te hepatoprotektivnih učinaka (Taheri i sur., 2022).

### 2.1.2.1. Fenoli i polifenoli u koprivi

Zbog svoje visoke biološke aktivnosti, fenolni i polifenolni spojevi smatraju se jednom od najvažnijih klasa organskih spojeva. Postoji nekoliko skupina ovih spojeva pronađenih u koprivi koji uključuju jednostavne fenole, fenolne kiseline, stilbene, flavonoide, kumarine, tanine i lignane. Nalaze se isključivo u konjugiranom obliku s ugljikohidratima vezanim na hidroksilnu ili aromatsku skupinu. Provedena su brojna istraživanja o prisutnosti i sadržaju ovih spojeva u koprivi, ali rezultati se razlikuju zbog nekoliko čimbenika, kao što su geografske, sezonske i okolišne varijacije te koji je dio biljke korišten za ekstrakciju (korijen, stabljika, listovi) i koja je tehnika ekstrakcije upotrijebljena (Đurović i sur. 2024).

Đurović i sur. (2023) su izvijestili da su listovi koprive najbogatiji polifenolnim spojevima te zatim stabljika i korijen. Spojevi poput siringične kiseline, miricetina, kvercetina, kempferola, rutina, elagične kiseline, izorhamnetina, p-kumarinske kiseline, ferulinske kiseline i naringina pronađeni su i kvantificirani u svim uzorcima.

p-Hidroksibenzojeva kiselina (slika 2) široko je rasprostranjena u koprivi. Dokazano je da ima antioksidacijsko, antimikrobno i estrogensko djelovanje. Kao i sve polifenolne kiseline, p-hidroksibenzojeva kiselina pokazuje antioksidacijsku aktivnost te djeluje kao neutralizator ROS-a (reaktivnih kisikovih vrsta) i slobodnih radikala. Ima antimikrobni učinak na većinu Gram-pozitivnih i neke Gram-negativne bakterije. Također, iz skupine fenolnih kiselina koje su prirodno prisutni u koprivi, a poznati su po svojim bioaktivnim svojstvima su još i protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina i klorogenska kiselinu (Manuja i sur., 2013).



**Slika 2.** Strukturna formula najzastupljenijih fenolnih i polifenolnih kiselina u koprivi (prema Đurović i sur. 2024)

## 2.2. INDUSTRIJSKA KONOPLJA

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) jedna je od najstarijih jednogodišnjih kultura porijeklom iz Azije. Vrsta *C. sativa* prepoznata je po brojnim varijantama koji se klasificiraju prema njihovoj uporabi. Unatoč različitim mišljenjima, *C. sativa* se obično dijeli u dvije podvrste na temelju sadržaja psihoaktivnih spojeva, tj. tetrahidrokanabinola (THC). Kategorija „droga” obično sadrži oko 20 % THC-a na osnovi suhe tvari, iako neke posebno uzgajane sorte mogu doseći i preko 30 % THC-a. “Nehalucinogene” vrste (industrijska konoplja) u većini europskih zemalja moraju imati sadržaj THC-a niži od 0,2 %. Droga je poznata po rekreacijskoj uporabi, no terapijski interes za kanabinoide doveo je do fleksibilizacije zakonodavstva i legalizacije proizvoda na bazi kanabinoida u nekim zemljama (Isidore i sur., 2021).

Također se uzgaja za široku paletu krajnjih proizvoda dobivenih od kanabinoida, sjemena i vlakana te se može uzgajati kao zaštitni usjev. Kao usjev za proizvodnju vlakana, jedna je od najstarijih neprehrambenih kultura na svijetu (Sorrentino, 2020).

Danas industrijska konoplja pripada skupini kultura čija se velika biomasa može koristiti na različite načine. Ogroman potencijal ove biljke koristi se u gotovo svakom industrijskom sektoru: od industrije celuloze i papira do lake industrije (odjeća, tekstil) (Strzelczyk i sur., 2022).

### 2.2.1. Botanička svojstva

Industrijska konoplja (slika 3) pripada biljkama iznimne genetske plastičnosti, kako u smislu morfoloških tako i kemijskih parametara. Zbog raznolikih geografskih i klimatskih uvjeta na koje su bile prisiljene prilagoditi se, ove biljke mogu rasti na gotovo svakom tlu. Karakterizira ih srednje dugo vegetacijsko razdoblje koje traje od 80 do 120 dana. Visina biljaka obično prelazi 150 cm, a u povoljnim vremenskim uvjetima može doseći čak 4 metra (Strzelczyk i sur., 2022).

Konoplja je višestruko korisna biljka, pri čemu se različiti dijelovi koriste za specifične namjene. Cvjetovi i listovi prvenstveno se koriste za dobivanje psihoaktivnih spojeva (THC) i nepsihoaktivnih kanabinoida (CBD), dok se sjeme ističe nutritivnom vrijednošću. Bogato je vitaminima A, C i E,  $\beta$ -karotenom, te mineralima poput fosfora, kalija, magnezija i kalcija. Osim toga, sadrži 20–25 % proteina, 20–30 % ugljikohidrata, 25–35 % ulja i 10–15 % netopivih vlakana. Ulje konopljina sjemena ima idealan omjer polinezasićenih masnih kiselina (3:1 linolna i linolenska kiselina) i pokazuje pozitivan učinak na zdravlje (Montserrat-de la Paz i sur., 2014).



**Slika 3.** *Cannabis sativa* L. (Schilling i sur., 2020)

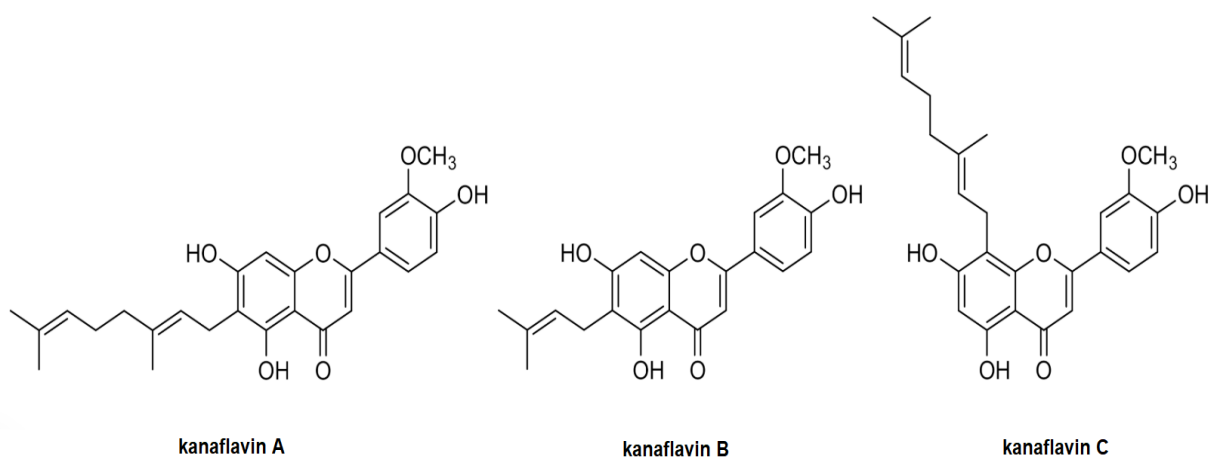
## 2.2.2. Fitokemijski sastav industrijske konoplje

### 2.1.2.1. Fenoli i polifenoli u industrijskoj konoplji

Industrijska konoplja sadrži velik broj biološki aktivnih spojeva, među kojima su polifenoli poput flavonoida, fenolnih kiselina, fenolnih amida i lignanamida, koji su poznati po svojim terapijskim svojstvima. Polifenolni profil *C. sativa* varira među različitim dijelovima biljke, a budući da cvjetovi predstavljaju važan reproduktivni organ očekivana je visoka razina obojenih polifenola (Izzo i sur., 2020).

Biljka *C. sativa* sintetizira fenolne spojeve od kojih su neki jedinstveni; identificirano je najmanje 26 flavonoida. Ti flavonoidi mogu biti glikozilirani ili u obliku aglikona. Neki uobičajeni flavonoidi

uključuju viteksin, izoviteksin, apigenin, luteolin, kempferol, orientin i kvercetin, dok su drugi, poput kanaflavina A, B i C (slika 4), jedinstveni za *C. sativa*. To su flavoni povezani s geranilnom skupinom kod kanaflavina A i C ili prenilnom skupinom kod kanaflavina B. Izvanredne biološke aktivnosti kanaflavina su dobro dokumentirane. In vivo testovi pokazali su protuupalno djelovanje, kao i antikancerogene aktivnosti. Ovi spojevi mogu ublažiti bol do trideset puta učinkovitije od aspirina (Isidore i sur., 2021).



**Slika 4.** Specifični flavonoidi pronađeni u konoplji (Isidore i sur., 2021)

### 2.3. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI

Ekstrakcija je prvi korak u svakom istraživanju ljekovitih biljaka i igra značajnu ulogu u konačnim rezultatima i ishodima. Metode ekstrakcije ponekad se nazivaju „tehnika pripreme uzorka“. Ekstrakcija biljnih materijala može se provoditi različitim postupcima. Tijekom posljednjih 50 godina razvijene su nekonvencionalne metode koje su ekološki prihvatljivije zbog smanjene upotrebe sintetičkih i organskih kemikalija, kraćeg vremena rada te boljeg prinosa i kvalitete ekstrakta. U svrhu optimizacije prinosa i selektivnosti bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala proučavane su nekonvencionalne metode poput ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja, enzimske digestije, ekstruzije, mikrovalnog zagrijavanja, ohmičkog zagrijavanja, superkritičnih fluida i ubrzana ekstrakcija otapalima. Bioaktivni spojevi iz biljnih materijala također se mogu izdvajati klasičnim tehnikama ekstrakcije. Većina tih tehnika temelji se na ekstrakcijskoj snazi



različitih otapala koja se koriste uz primjenu topline i/ili miješanja. Postojeće klasične tehnike za dobivanje bioaktivnih spojeva iz biljaka uključuju: Soxhlet ekstrakciju,, maceraciju i hidrodestilaciju (Azmir i sur., 2013).

### 2.3.1. Maceracija

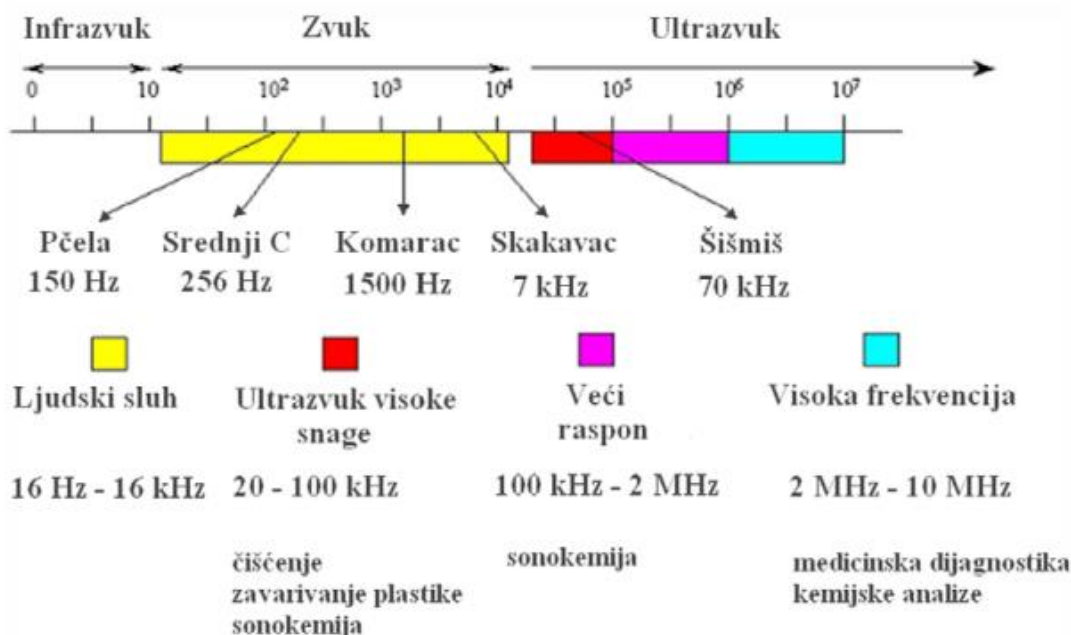
Maceracija je jedna od konvencionalnih metoda ekstrakcije koja je vrlo jednostavna i najjeftinija jer zahtijeva samo jednostavnu posudu za ekstrakciju. Može se provoditi bilo gdje i najčešće se koristi za ekstrakciju aktivnih spojeva te se cijeli proces provodi potapanjem uzorka u odabrano otapalo za ekstrakciju. Međutim, ovaj postupak zahtijeva dug vremenski period. Količina sirovih materijala, izbor otapala i pravilno određivanje vremena ekstrakcije, ključni su faktori koji utječu na učinkovitost ove metode ekstrakcije (Tambun i sur., 2021).

### 2.3.2. Tretman ultrazvukom

U novije vrijeme, primjena ultrazvuka u procesima ekstrakcije i rafiniranja privlači sve veću pažnju. Ultrazvuk može značajno unaprijediti tehnologiju ekstrakcije (Hromádková i Ebringerová, 2003).

Primijenjeni ultrazvuk može se svrstati u dvije podskupine: dijagnostički ultrazvuk niskog intenziteta (5–10 MHz) i ultrazvuk visokog intenziteta (20–100 kHz) (slika 5). Prva skupina obično se koristi kao analitički alat za nedestruktivnu inspekciju, kontrolu procesa i procjenu kvalitete, tj. ultrazvuk niskog intenziteta primjenjuje se za određivanje svojstava hrane poput čvrstoće, sadržaja ulja i ukupnih otopljenih tvari. S druge strane, primjena ultrazvuka visokog intenziteta relativno je nova u prehrambenoj industriji i do nedavno nije bila detaljno istražena. Njegova primjena ima dvije svrhe: zamjena konvencionalnih tehnologija obrade i potpora tradicionalnim procesima u prehrambenoj industriji. Ima potencijal povećavanja učinkovitost procesa i smanjenje nedostataka tradicionalnih tehnologija obrade hrane. Ultrazvuk se širi kroz niz ciklusa kompresije i razrjeđenja koje zvučni valovi induciraju na molekule medija kroz koji prolazi. Kada je snaga ultrazvuka dovoljno velika, razrjeđenje može premašiti privlačne sile između molekula u mediju, što dovodi do stvaranja kavitacijskih mjehurića. Ovisno o tome pucaju li kavitacijski mjehurići, mogu se klasificirati na stabilnu i prijelaznu kavitaciju. Kretanje kavitacijskih mjehurića tijekom stabilne kavitacije može dovesti do mikrostrujanja. Mikrostrujanje stvara snažne vrtložne struje u

mediju koji okružuje kavitacijske mjehuriće. Osim toga, difuzija otopljenih plinova u mjehuriće i iz njih također stvara mikrostruje oko njih. Mikrostrujanje ima brojne vrijedne primjene, poput uklanjanja plinova i razgradnje staničnih membrana (Cheng i sur., 2015).



**Slika 5.** Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Režek Jambrak, 2008)

## 2.4. GLICEROL

Glicerol je organski spoj kemijske formule  $C_3H_8O_3$ . Sinonimi za glicerol uključuju propan-1,2,3-triol, 1,2,3-propanetriol, 1,2,3-trihidroksipropan, gliceritol i glicil alkohol. Glicerol je alkohol niske toksičnosti koji se sastoji od tri ugljikova atoma, pri čemu je na svaki atom vezana hidroksilna skupina. Čistoća dobivenog glicerola često je niska zbog prisutnosti nečistoća poput ostataka katalizatora, vode, sapuna, soli i estera nastalih tijekom reakcije. Pročišćavanje glicerola i njegova konverzija u vrijedne proizvode posljednjih godina privlače sve veću pozornost zbog dramatičnog rasta industrije biodizela (Tan i sur., 2013).

Glicerol ima brojne primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Može se dobiti kao nusproizvod reakcijama saponifikacije i hidrolize u oleokemijskim postrojenjima te transesterifikacijom u pogonima za proizvodnju biodizela. Sirovi glicerol, nusproizvod ovih procesa, sadrži brojne nečistoće ovisno o tehnološkom postupku i sirovinama koje se obrađuju. Na primjer, sirovi glicerol iz biodizelskih postrojenja sastoji se od glicerola, vode, organskih i anorganskih soli, sapuna, alkohola, tragova glicerida i biljnih pigmenata. U slučaju hidrolize obuhvaća glicerol, vodu, slobodne masne kiseline, nereagirane trigliceride, soli te ostale organske tvari koje nisu glicerol, što ga čini sirovim materijalom koji zahtijeva daljnju obradu kako bi postao prikladan za industrijsku upotrebu. (Tan i sur., 2013).

## 2.5. OCAT

Ocat je tekući proizvodi dobiven alkoholnom i naknadnom octenom fermentacijom izvora ugljikohidrata. Kroz povijest su se koristili kao lijekovi u mnogim kulturama, a redovita konzumacija povezuje se s korisnim učincima na zdravlje. Takve koristi pripisuju se različitim vrstama polifenola, mikronutrijenata i drugih bioaktivnih spojeva prisutnih u octu, koji doprinose njegovim farmakološkim učincima, uključujući antimikrobne, antidijabetičke, antioksidacijske, antiadipozne i antihipertenzivne učinke. Postoje tri glavne vrste octa: voćni, vinski i alkoholni ocat (Ho i sur., 2017).

Jabučni ocat jedan je od najčešće korištenih začina zbog svojih zdravstvenih dobrobiti. Istraživanja su otkrila njegova antioksidacijska, antibakterijska, protugljivična, kardiovaskularna, anti-karcinogena i anti-Alzheimerova svojstva (Tripathi i Mazumder, 2020).

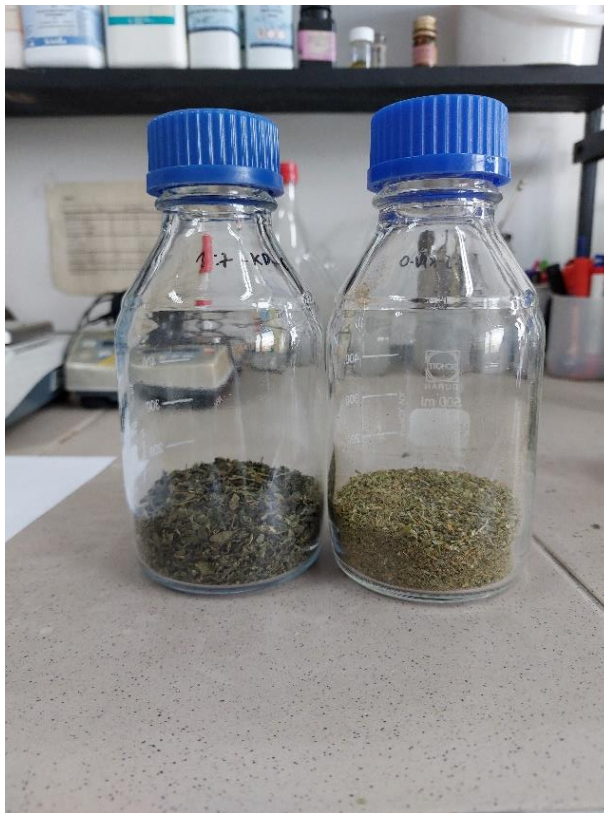
Predloženi su različiti mehanizmi kako bi se objasnili pretpostavljeni učinci jabučnog octa na zdravlje. Antiglikemijska svojstva mogla bi se pripisati sporijem pražnjenju želuca, inhibiciji aktivnosti disaharidaza, poboljšanoj osjetljivosti na inzulin ili poticanju proizvodnje glikogena. Ova svojstva su klinički zanimljiva jer bi potencijalno mogla smanjiti kardiometaboličke čimbenike rizika. Međutim, dokazi koji podupiru te učinke su ograničeni. Iako većina studija koje pokazuju određene pozitivne rezultate, često imaju metodološka ograničenja poput kratkog trajanja intervencije, malog broja sudionika ili rizika od pristranosti (Launholt i sur., 2020).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biljni materijali

Biljni materijali koji su se koristili u ovom radu su osušeni te usitnjeni listovi i grančice industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) i obične koprive (*Urtica dioica* L.) proizvođača „Suban“ (Strmec Samoborski, Hrvatska) (slika 6).



**Slika 6.** Osušeni i usitnjeni listovi i grančice industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) i obične koprive (*Urtica dioica* L.)

### 3.1.2. Kemikalije

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korištene se slijedeće kemikalije:

- destilirana voda
- jabučni ocat
- glicerol (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- PBS pufer
- etanol 96 % (Kefo, Slovenija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
- natrijev karbonat bezvodni,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Gram-mol, Hrvatska)
- aluminij klorid heksahidrat,  $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- natrijev acetat bezvodni,  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  (Gram-mol, Hrvatska)
- željezo(III) klorid,  $\text{FeCl}_3$  (Gram-mol, Hrvatska)
- octena kiselina, ledena,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (Kemika, Hrvatska)
- diamnojjeva sol 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox),  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$  (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- rutin, analitički standard (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- kalijev persulfat,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- galna kiselina, analitički standard (Sigma-Aldrich, Njemačka)

### 3.1.3. Laboratorijska oprema i uređaji

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korištena je oprema i uređaji:

- analitička vaga BP 210 S (Sartorius, Njemačka)
- ultrazvučni uređaj s ultrazvučnom sondom promjera 14 mm, snaga 100 W, amplituda 100% (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka)
- eksikator
- laboratorijski sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)
- laboratorijsko stakleno i plastično posuđe
- pH metar CG 842 (Schott, Njemačka)

- potrošni laboratorijski pribor (tipsevi, filter papir, kivete)
- tehnička vaga KB1200-2N (Kern, Njemačka)
- spektrofotometar Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka)
- vodena kupelj s tresilicom WNE 10 (Memmert GmbH+COKG, Njemačka)
- vortex Reax top (Heidolph, Njemačka)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema ekstrakta industrijske konoplje i obične koprive

#### 3.2.1.1. Maceracija

Ekstrakt dobiven maceracijom biljnog materijala (industrijske konoplje i koprive) bio je pripremljen u kombinaciji jabučnog octa i glicerola ili s etanolom. Otopina je sadržavala ili 20 % glicerola (80 % jabučnog octa - 40 mL glicerola + 160 ml octa) ili 30 % glicerola (70 % jabučnog octa - 60 mL glicerola + 140 mL jabučnog octa) ili 50 % glicerola (50 % jabučnog octa - 100 mL glicerola + 100 mL jabučnog octa). Također, uzorci koji su sadržavali etanol su bili priređeni s 30 % etanola (uzorci koprive) i 96 % etanola (uzorci konoplje). Ova koncentracija etanola za koprivu odabrana je na temelju preliminarnih rezultata i dostupne literature koja ističe učinkovitost ove koncentracije za ekstrakciju fenolnih spojeva (Elez Garofulić i sur., 2021; Cegledi i sur., 2022). S druge strane, 96 % etanol za konoplju korišten je prema literaturnim podacima, gdje se navodi kao standardno otapalo za ekstrakciju lipofilnih spojeva poput CBD ulja (Jambrović, 2021). Omjeri biljnog materijala i otopine su bili 1:20 (10 g biljnog materijala na 200 mL otopine) i 1:50 (4g biljnog materijala na 200 mL otopine). Uzorci su označeni na sljedeći način: K - kopriva, IK - industrijska konoplja; 20/50 - omjer biljnog materijala i otapala; G20/G30/G50 - koncentracija glicerola; E30/E96 - koncentracija etanola.

- **Uzorak 1 (K\_20\_G20)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 20 % glicerola
- **Uzorak 2 (K\_20\_G30)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 30 % glicerola

- **Uzorak 3 (K\_20\_G50)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 50 % glicerola
- **Uzorak 4 (K\_50\_G20)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 20 % glicerola
- **Uzorak 5 (K\_50\_G30)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 30 % glicerola
- **Uzorak 6 (K\_50\_G50)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 50 % glicerola
- **Uzorak 7 (K\_20\_E30)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je etanol u koncentraciji 30 %
- **Uzorak 8 (K\_50\_E30)** – Kopriva (*Urtica dioica L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je etanol u koncentraciji 30 %
- **Uzorak 9 (IK\_20\_G20)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 20 % glicerola
- **Uzorak 10 (IK\_20\_G30)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 30 % glicerola
- **Uzorak 11 (IK\_20\_G50)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 50 % glicerola
- **Uzorak 12 (IK\_50\_G20)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 20 % glicerola
- **Uzorak 13 (IK\_50\_G30)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 30 % glicerola
- **Uzorak 14 (IK\_50\_G50)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je glicerol i ocat u koncentraciji 50 % glicerola
- **Uzorak 15 (IK\_20\_E96)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:20, otapalo je etanol u koncentraciji 96 %
- **Uzorak 16 (IK\_50\_E96)** – Konoplja (*Cannabis sativa L.*), omjer biljnog materijala i otapala 1:50, otapalo je etanol u koncentraciji 96 %

Odvagana masa biljnog materijala je stavljena u staklene boce s poklopcem te je u svaki uzorak dodano odgovarajuće otapalo (prema gore navedenim omjerima) (slika 7). Boce su hermetički zatvorene i čuvane na tamnom mjestu pri sobnoj temperature (20-25°C). Nakon određenog vremenskog perioda (24 sata, 1 tjedan, 2 tjedna i 3 tjedna) otopine su filtrirane

pomoću filter papira kako bi se uklonio čvrsti materijal, pri čemu je filtrat sakupljen u plastične Falcon epruvete. Dobiveni filtrati su bili čuvani na hladnom i suhom mjestu do daljnje kemijske analize.

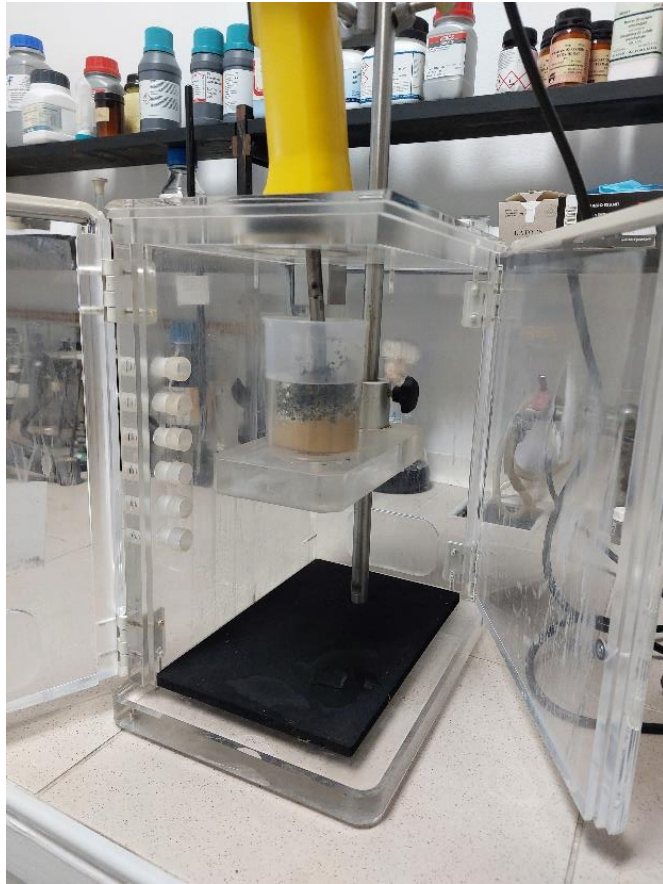


**Slika 7.** Macerati industrijske konoplje (lijevo) i obične koprive (desno)

### 3.2.1.2. Ultrazvučni tretman

Pored standardne maceracije u istraživanju je korišten i ultrazvučni tretman. Tretman je proveden ultrazvukom pomoću ultrazvučne sonde promjera 14 mm kroz 3 minute, pri amplitudi od 100 % te snazi 100 W (slika 8). Uzorci na kojima je proveden ultrazvučni tretman pripremljeni su na način koji je ranije spomenut (potpoglavlje „Maceracija“). Zbog povećanja temperature tijekom tretmana, ekstrakcija je provedena tako da je čaša s uzorkom bila uronjena u čašu s hladnom vodom kako bi se temperatura snizila. Ostatak procesa (filtracija i pohrana ekstrakata) proveden je kao što je prethodno opisano u klasičnoj maceraciji.





**Slika 8.** Ultrazvučni tretman

### 3.2.1. Metode određivanja biološki aktivnih spojeva

#### 3.2.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (TFC)

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima određen je kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom. U prisutnosti aluminijevog klorida dolazi do stvaranja kompleksa s C-4 keto skupinom ili C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavonola (Pečkal i Pyrzynska, 2014).

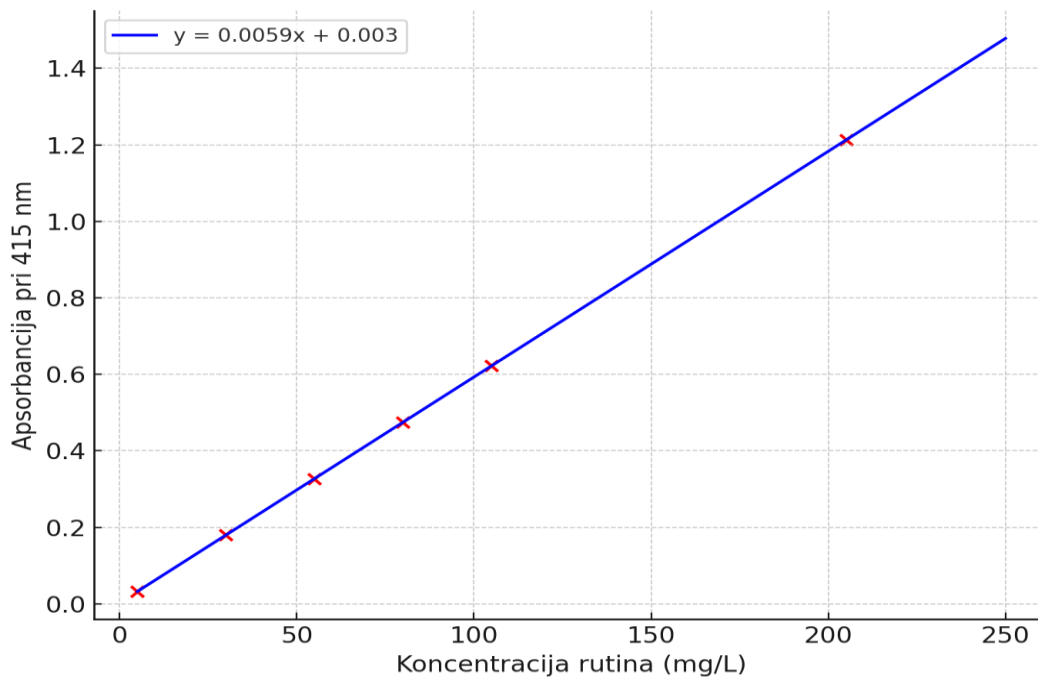
#### **Postupak rada**

Uzorci su bili razrijeđeni 10 puta. U odmjernu tikvicu od 5 mL odpipetirano je 500  $\mu$ L razrijeđenog uzorka, 100  $\mu$ L 10 % aluminijevog klorida, 100  $\mu$ L natrijevog acetate koncentracije 1 M i 1,5 mL 80 % etanola. Otopina je ostavljena 30 minuta na tamnom i suhom mjestu nakog čega je izmjerena apsorbancija pri 415 nm na spektrofotometru. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i uzorak, ali umjesto uzorka dodaje se 500  $\mu$ L 80 % etanola.

Za izradu baždarnog pravca (slika 9) kao standard upotrebljen je rutin u rasponu masenih koncentracija od 5 do 250 mg/L. Na temelju podataka o apsorbanciji i koncentraciji rutina izrađen je baždarni pravac, a jednadžba pravca dana je formulom [1]:

$$y = 0,0059x + 0,003 \quad (R^2 = 0,999) \quad [1]$$

gdje je y apsorbancija izmjerena pri 415 nm, x je koncentracija rutina (mg/L), a  $R^2$  koeficijent determinacije je 0,999 što ukazuje na visoku preciznost pravca. Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku izračunava se pomoću jednadžbe (1) i izražava se kao mg ekvivalenata rutina (RE) po litri macerata (mg RE/L). Budući da su uzorci bili razrijeđeni 10 puta, rezultat je potrebno pomnožiti s faktorom 10. Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele.



**Slika 9.** Baždarni pravac za određivanje ukupnih flavonoida

### 3.2.1.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) određuje se prema modificiranoj metodi po Singletonni Rossi (1965) uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline koja se prilikom reakcije s fenolnim spojevima reducira u plavo obojene okside volframa i molibdena. Metoda se temelji na redoks reakciji u kojoj svi fenolni spojevi koji su u uzorku reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom tako da nastane plavo obojenje. Nakon toga intenzitet plave boje mjeri se spektrofotometrijski na 760 nm. Intenzitet boje povezan je s količinom fenolnih spojeva u uzorku.

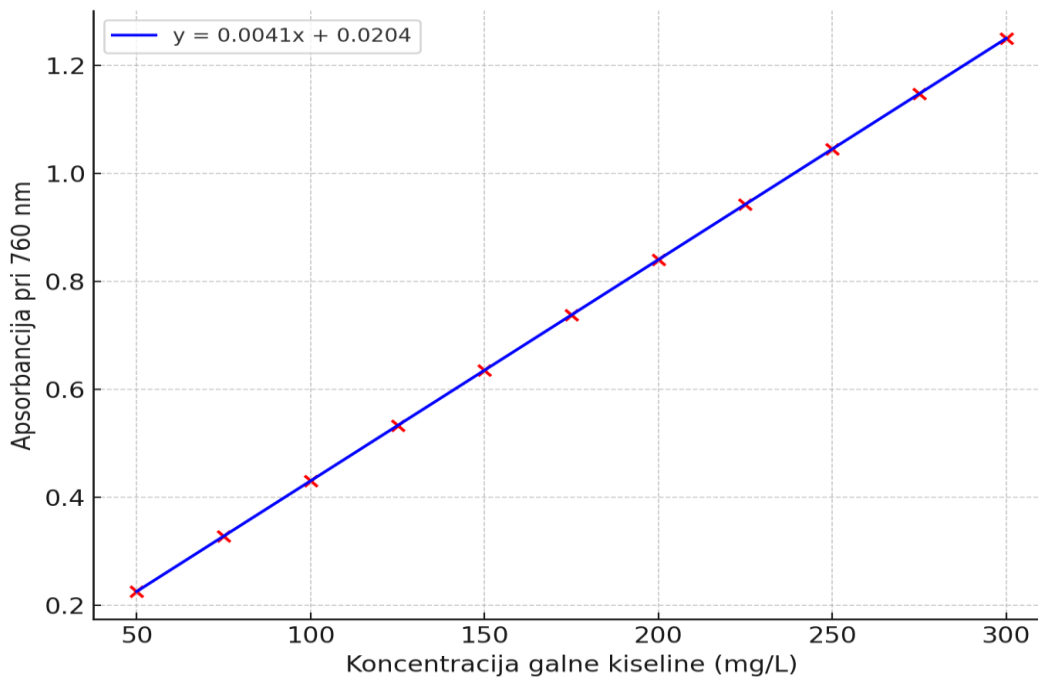
## Postupak rada

Uzorci su razrijeđeni 5 puta. U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetirano je 300  $\mu$ L razrijeđenog uzorka, 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci se pomiješaju i nakon 5 minuta se u tikvicu doda 1,5 mL natrijevog karbonata. Zatim se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake (10 mL). Uzorak se ostavi na tamnom mjestu te se nakon 2 sata mjeri apsorbanacija na 760 nm pomoću spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka). Svaki uzorak mjeren je u dvije paralele.

Slijepa proba pripremljena je na isti način osim što je umjesto uzorka dodano 300  $\mu$ L destilirane vode. Za izradu baždarnog pravca (slika 10) korištena je galna kiselina u rasponu koncentracija od 50 do 300 mg/L. Koncentracija ukupnih fenola (TPC) izračunata je prema sljedećoj jednadžbi pravca [2]:

$$y = 0,0041x + 0,0204 \quad (R^2 = 0,998) \quad [2]$$

gdje je apsorbanacija pri 760 nm označena s  $y$ , dok  $x$  predstavlja koncentraciju galne kiseline u mg/L. Koeficijent determinacije iznosi 0,998, što ukazuje na visoku linearnost metode. Rezultati analize izraženi su kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri uzorka (mg GAE/L). Pri konačnom izračunu koncentracije fenola, uzeto je u obzir da su uzorci bili razrijeđeni 5 puta.



**Slika 10.** Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenolnih spojeva

### 3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti

#### 3.2.2.1. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ABTS metodom*

ABTS metoda temelji se na smanjenju intenziteta plavo-zelene boje ABTS radikal-kationa (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), koji nastaje oksidacijom ABTS-a kemijskom reakcijom s kalijevim persulfatom. Antioksidansi prisutni u uzorku reduciraju ABTS radikal, čime se smanjuje boja otopine. Stupanj promjene boje izravno je proporcionalan koncentraciji antioksidansa i vremenu reakcije te se uspoređuje sa standardom, obično Troloxom (Re i sur., 1999).

#### **Postupak rada**

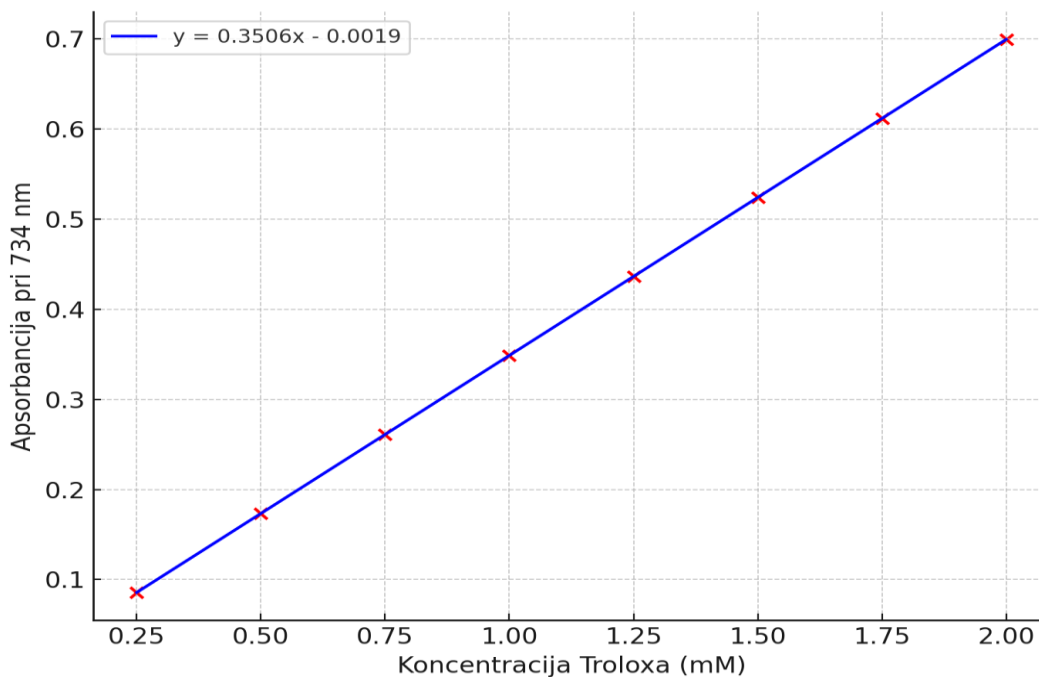
Pripremi se 7 mM otopina ABTS-a otapanjem 0,0384 g ABTS-a u 10 mL destilirane vode. Također se otopi 0,37846 g kalijevog persulfata u 10 mL destilirane vode kako bi se dobila 140 mM otopina kalijevog persulfata. Zatim se pomiješa 89  $\mu$ L kalijevog persulfata s 5 mL ABTS otopine te se

smjesa čuva u mraku 12-16 sati. Sljedeći dan pripremi se 1 %-tna otopina ABTS-a otapanjem 1 mL ABTS radikala u 96 %-tnom etanolu, do ukupnog volumena od 100 mL. Apsorbancija otopine se prilagođava na  $0,700 \pm 0,02$  pri 734 nm dodavanjem ABTS-a ili etanola.

U uzorak se dodaje 20  $\mu$ L razrijeđenog uzorka (prethodno razrijeđen 10 puta) u 2 mL ABTS otopine. Reakcija traje 6 minuta u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za izradu baždarnog pravca (slika 11) korišten je standard Trolox u rasponu koncentracija 0,25-2,0 mM. Antioksidacijski kapacitet uzoraka izračunava se pomoću jednadžbe [3]:

$$y = 0,3506x - 0,0019 \quad (R^2 = 0,992) \quad [3]$$

gdje je y apsorbancija pri 734 nm, x koncentracija Troloxa (mM), a  $R^2$  koeficijent determinacije. Konačni rezultat se množi s faktorom razrjeđenja 10 kako bi se dobila stvarna koncentracija antioksidansa u uzorku. Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele.



**Slika 11.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ABTS metodom

### 3.2.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP metodom

FRAP metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da reduciraju Fe(III)-TPTZ kompleks (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u Fe(II)-TPTZ fero-kompleks, koji je intenzivno plave boje, s apsorpcijskim maksimumom na 593 nm. Ova reakcija odvija se u kiselom mediju (pH 3,6) što omogućuje zadržavanje dobre topljivosti željeza i povećava redoks potencijal koji olakšava prijenos elektrona. Pri niskim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal, čime se omogućuje prijenos elektrona, dok redoks potencijal sustava Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V, što znači da svi spojevi s nižim redoks potencijalom mogu reducirati Fe(III) u Fe(II). Ovaj proces direktno odražava sposobnost antioksidansa da djeluju kao redukcijska sredstva u sustavu. Rezultat reakcije mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 593 nm. Metoda je osmišljena za procjenu antioksidacijskog kapaciteta tvari koje mogu reducirati Fe(III) u Fe(II) te se koristi u analizi hrane, biljnih ekstrakata i drugih bioloških uzoraka. FRAP metoda omogućuje mjerenje antioksidacijske aktivnosti tvari u vodenim otopinama, a intenzitet plave boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa u uzorku (Moharram i Youssef, 2014).

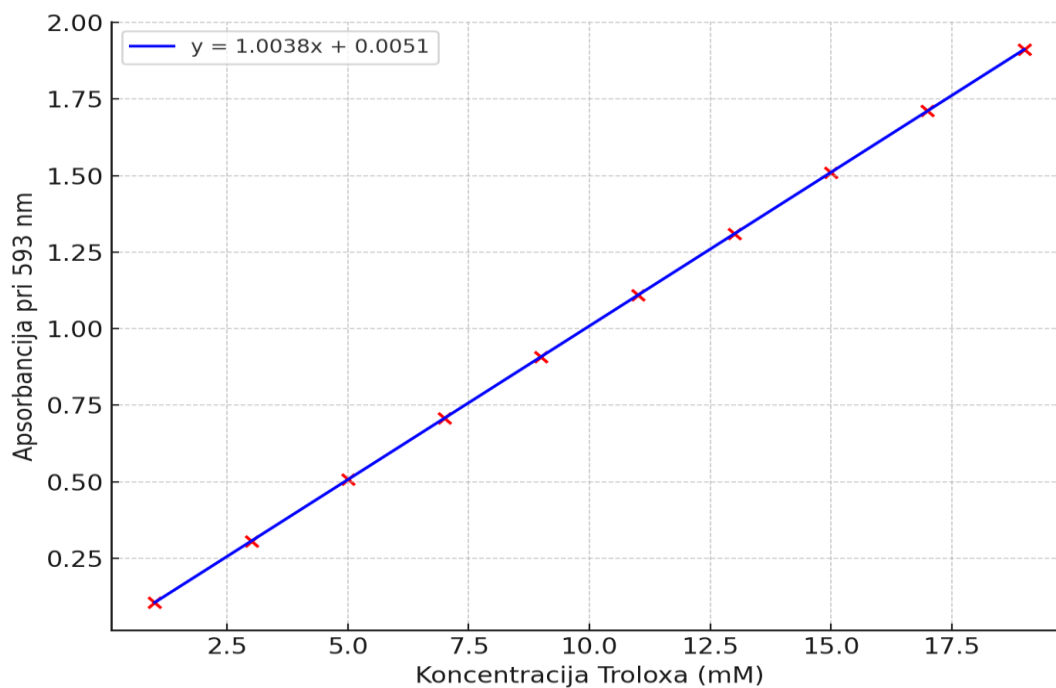
#### Postupak rada

Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka pomoću FRAP metode provedeno je prema postupku koji su razvili Benzie i Strain 1999. godine. Postupak uključuje miješanje tri komponente: 50 mL 0,3 M acetatnog pufera (priprema otapanjem 0,93 g natrijevog acetata u 8 mL ledene octene kiseline, nadopunjeno vodom do 500 mL); 5 mL 10 mM TPTZ otopine (0,0312 g TPTZ-a otopljenog u 10 mL 40 mM HCl) i 5 mL 20 mM otopine željezovog(III)-klorida (0,0541 g FeCl<sub>3</sub> otopljenog u 10 mL destilirane vode).

Zatim se u odmjernu tikvicu od 10 mL dodaje 240 µL destilirane vode, 80 µL razrijeđenog uzorka (razrijeđenog 10 puta) i 2080 µL FRAP reagensa. Smjesa se inkubira 5 minuta na 37 °C, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i uzorak, ali umjesto uzorka dodaje se 80 µL etanola. Trolox se koristi za izradu baždarnog pravca (slika 12) u koncentracijama od 0,1 do 2,0 mM. Antioksidacijski kapacitet uzorka izračunava se pomoću jednadžbe [4]:

$$y = 1,0038x + 0,0051 \quad (R^2 = 0,998) \quad [4]$$

gdje je y apsorbancija pri 593 nm, a x koncentracija Troloxa (mM). Konačni rezultat se pomnoži s faktorom razrjeđenja (10) kako bi se dobila stvarna koncentracija antioksidansa u uzorku. Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele.



**Slika 12.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP metodom

### 3.2.3. Fizikalno-kemijski parametri

#### 3.2.3.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednosti uzoraka macerata koprive i konoplje izmjerene su pomoću pH metra Schott CG 842 (Mainz, Njemačka). Kalibracija uređaja izvršena je uranjanjem pH-elektrode u pufer otopinu pH = 7.



### 3.3.3.2. *Određivanje ukupnog ekstrakta*

Ekstrakt macerata koprive i konoplje u glicerolu i jabučnom octu podrazumijeva sve neisparljive sastojke koji ostaju nakon isparavanja vode i otapala. Ukupni ekstrakt određuje se gravimetrijskom metodom. U prethodno izvaganu porculansku posudicu doda se 5 mL tekućeg ekstrakta, te se posudica s uzorkom stavlja u vodenu kupelj na 100 °C dok većina tekućine ne ispari. Zatim se posudica stavlja u sušionik na 105 °C tijekom jednog sata (Da Silva i sur., 2019).

Nakon sušenja, posudica s ostatkom uzorka prenosi se u eksikator da se ohladi na sobnoj temperaturi, nakon čega se ponovno važe. Ukupni sadržaj ekstrakta izražava se kao g L<sup>-1</sup> te izračunava prema formuli [5]:

$$\text{Ukupni ekstrakt (g/L)} = (m_1 - m_2) \times 1000/\text{mL uzorka} \quad [5]$$

gdje je  $m_1$  masa posudice s ekstraktom nakon sušenja (g), a  $m_2$  masa prazne posudice (g).

### 3.2.3.3. *Određivanje kromatskih parametara*

Kromatske karakteristike macerata koprive i konoplje u glicerolu i octu određene su spektrofotometrijski prema CIElab sustavu koristeći spektrofotometar Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka) s izvorom svjetlosti D65. Transmisija uzoraka mjerena je skeniranjem valnih duljina od 380 do 780 nm svakih 10 nm. Na temelju dobivenih vrijednosti propusnosti izračunati su kromatski parametri. Svjetlina (L) opisuje raspon od 0 (apsolutno crno) do 100 (apsolutno bijelo), pri čemu veće vrijednosti L označavaju svjetlije boje, a niže tamnije. Kromatske koordinate a i b označavaju boje na sljedeći način: pozitivna a vrijednost označava crvenu, a negativna zelenu boju, dok pozitivna b vrijednost označava žutu, a negativna plavu boju. Zasićenost (C) definira intenzitet boje, pri čemu visoka zasićenost ukazuje na čistu, jarku boju, dok niža zasićenost sugerira pastelne tonove i veći udio sive. Ton boje (h) određuje tonalitet boje, odnosno vizualni doživljaj izazvan različitim dijelovima spektra pri jednakoj svjetlini (OIV, 2014).

#### 3.2.4. Obrada podataka

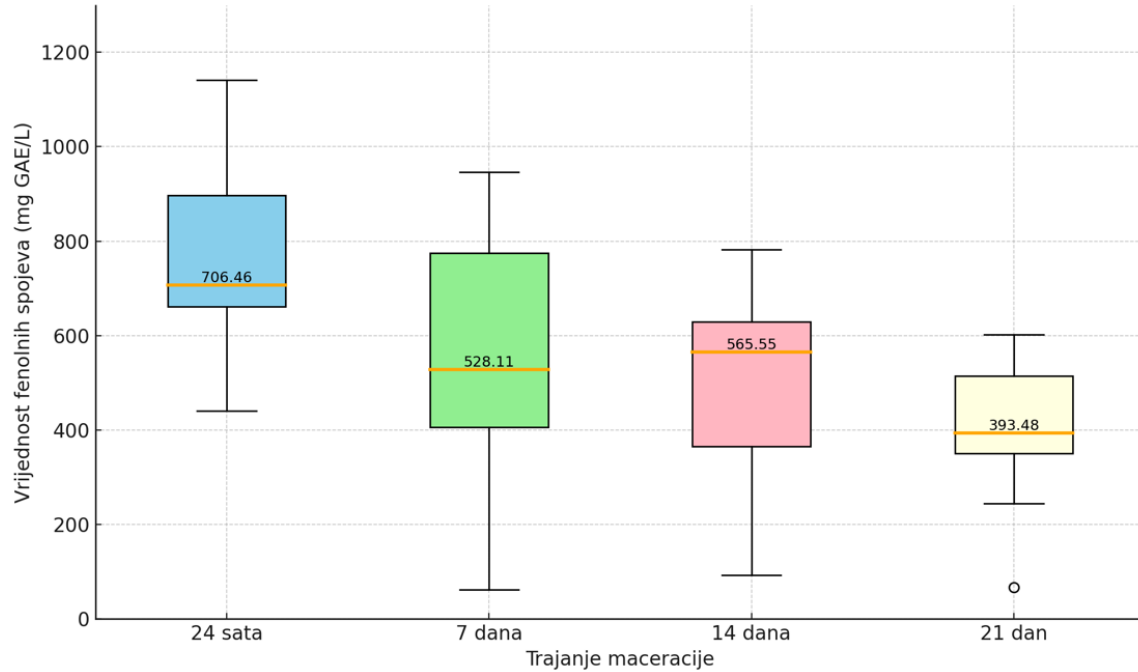
Za izradu grafičkih prikaza eksperimentalnih podataka korišten je Microsoft Office Excel 2024. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

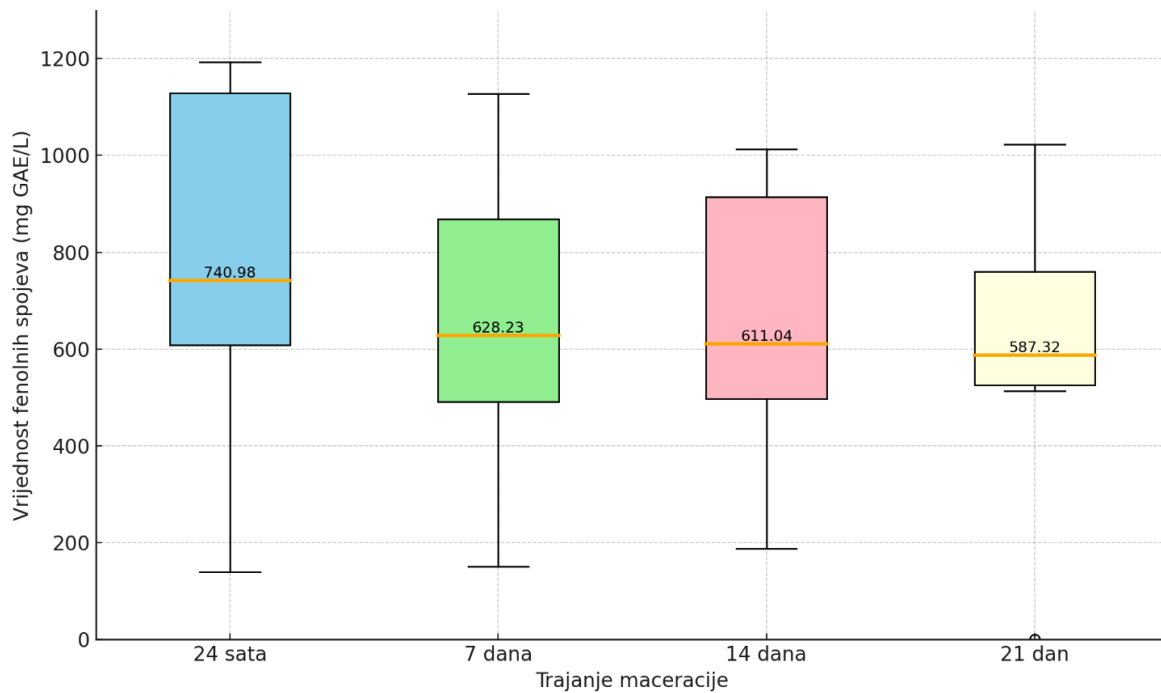
U ovom radu istražen je utjecaj različitih metoda ekstrakcije na fitokemijski profil, antioksidacijsku aktivnost te fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata koprive i industrijske konoplje. Pripremljena su ukupno 32 uzoraka, od kojih je 16 dobiveno klasičnom maceracijom, a 16 ultrazvučnim tretmanom. Uzorci su se međusobno razlikovali na temelju parametara ekstrakcije: omjer biljnog materijala i otapala (1:20 i 1:50) te sastav otapala (20, 30 i 50 % v/v glicerola u jabučnom octu, etanol) . U svakom uzorku analizirani su sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i flavonoida te antioksidacijska aktivnost primjenom ABTS i FRAP metoda, dok su dodatno procijenjeni fizikalno-kemijski parametri: pH, ukupni suhi ekstrakt i kromatske karakteristike.

### 4.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Na slikama 13 i 14 prikazuje se distribucija koncentracije fenolnih spojeva tijekom četiri vremenske točke (24 sata, 7 dana, 14 dana i 21 dan) za različite uzorke. Analizirani uzorci uključuju biljni materijal koprive (*Urtica dioica* L.) i konoplje (*Cannabis sativa* L.), uz različite omjere otapala (glicerol/octat i etanol) i biljnog materijala. Cilj je bio istražiti utjecaj trajanja maceracije na sadržaj fenolnih spojeva u različitim kombinacijama biljnog materijala i otapala.



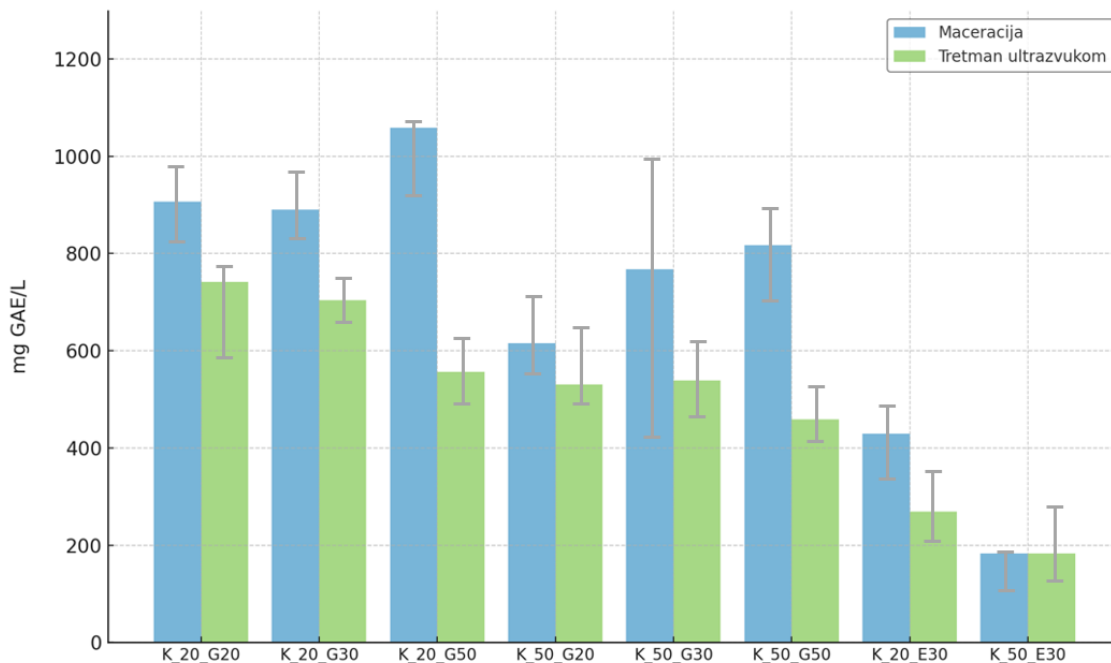
**Slika 13.** Prikaz distribucije prosječnih vrijednosti fenolnih spojeva (mg GAE/L) u ekstraktima koprive tijekom različitog vremena trajanja maceracije (24 sata, 7, 14 i 21 dan)



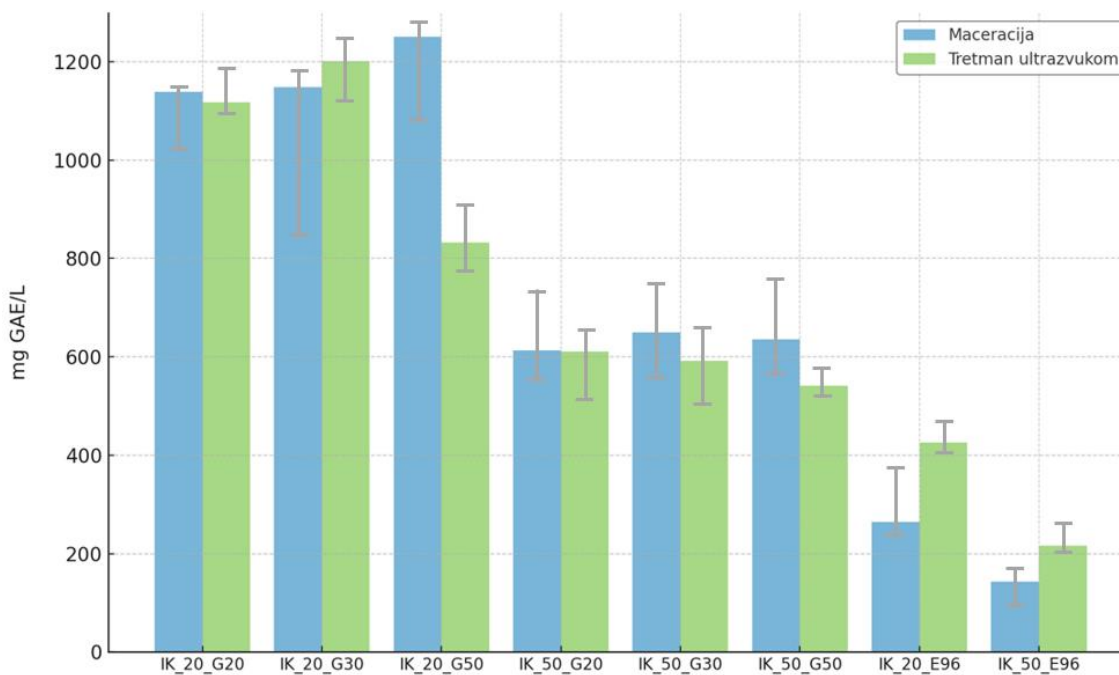
**Slika 14.** Prikaz distribucije prosječnih vrijednosti fenolnih spojeva (mg GAE/L) u ekstraktima industrijske konoplje tijekom različitog vremena trajanja maceracije (24 sata, 7, 14 i 21 dan)

Prikazani podaci sugeriraju da je koncentracija fenolnih spojeva najveća nakon 24 sata maceracije, s medijanom od 706,46 i 740,98 mg GAE/L. S vremenom dolazi do postupnog smanjenja koncentracije fenolnih spojeva, što je najizraženije nakon 21 dana maceracije kada je medijan 393,48 i 587,32 mg GAE/L. Smanjenje sadržaja fenolnih spojeva tijekom vremena može se pripisati procesima razgradnje ili polimerizacije fenolnih spojeva u otopini (Lochab i sur., 2014). Zbog toga su se za daljnje analize uzimali uzorci koji su macerirani 24 sata.

Rezultati pokazuju (slika 14 i slika 15) da je metoda maceracije općenito učinkovitija u postizanju viših koncentracija fenolnih spojeva u usporedbi s ultrazvukom, što je posebno izraženo kod viših koncentracija glicerola (50%). Znači da iako ultrazvuk ubrzava proces ekstrakcije, nije bio dovoljan za potpunu ekstrakciju fenolnih spojeva u kratkom vremenskom periodu. Mogući razlog je da u klasičnoj maceraciji jabučni ocat i glicerol omogućuju stabilnije otapanje fenolnih spojeva jer će se ekstrakcija odvijati sporije i time će biti manje fizičkih oštećenja biljnih stanica. Također, uzorci s glicerolom i jabučnim octom pokazali su veće razlike između ultrazvučnog tretmana i maceracije, dok su uzorci s etanolom kao otapalom imali manju razliku. Time se dolazi do zaključka da je etanol bolje otapalo za brzu ekstrakciju fenolnih spojeva ultrazvučnim tretmanom. Također, glicerol je viskoznije otapalo u usporedbi s etanolom te je učinkovitost ultrazvučnih valova smanjena jer kavitacija nije toliko intenzivna (Jambrak i Drmić, 2008).



**Slika 15.** Prikaz koncentracije fenolnih spojeva (mg GAE/L) u ekstraktima koprive nakon maceracije (plavi stupci) i tretmana ultrazvukom (zeleni stupci) (uzorci 1-8)



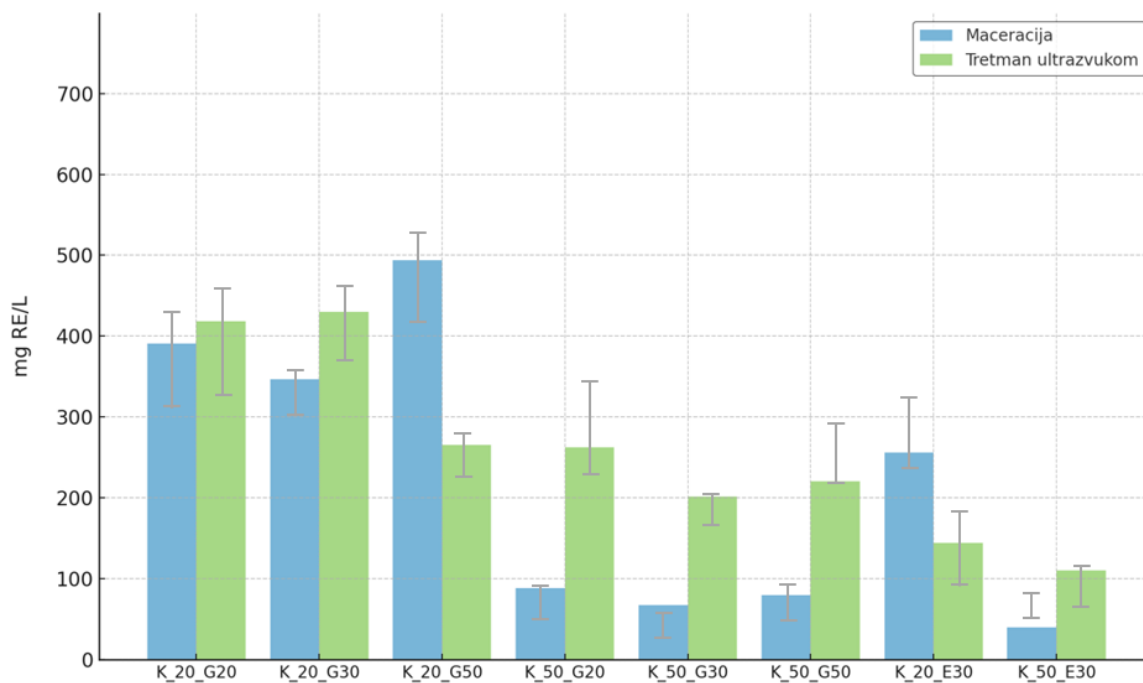
**Slika 16.** Prikaz koncentracije fenolnih spojeva (mg GAE/L) u ekstraktima industrijske konoplje nakon maceracije (plavi stupci) i tretmana ultrazvukom (zeleni stupci) (uzorci 9-16)

Razlike u vrijednostima između uzoraka pripremljenih korištenjem glicerola i octa te etanola kao otapala, jasno ukazuju na različita ekstrakcijska svojstva tih otapala. Glicerol i ocat pokazali su se učinkovitijima u stabilizaciji fenolnih spojeva i postizanju viših koncentracija tih spojeva zbog svojih različitih ekstrakcijskih svojstava u odnosu na etanol, koji uzrokuje bržu degradaciju fenolnih spojeva (Nawaz i sur., 2019). Kada se uspoređuju biljni materijali konoplja je generalno pokazivala veće koncentracije fenolnih spojeva u usporedbi s koprivom.

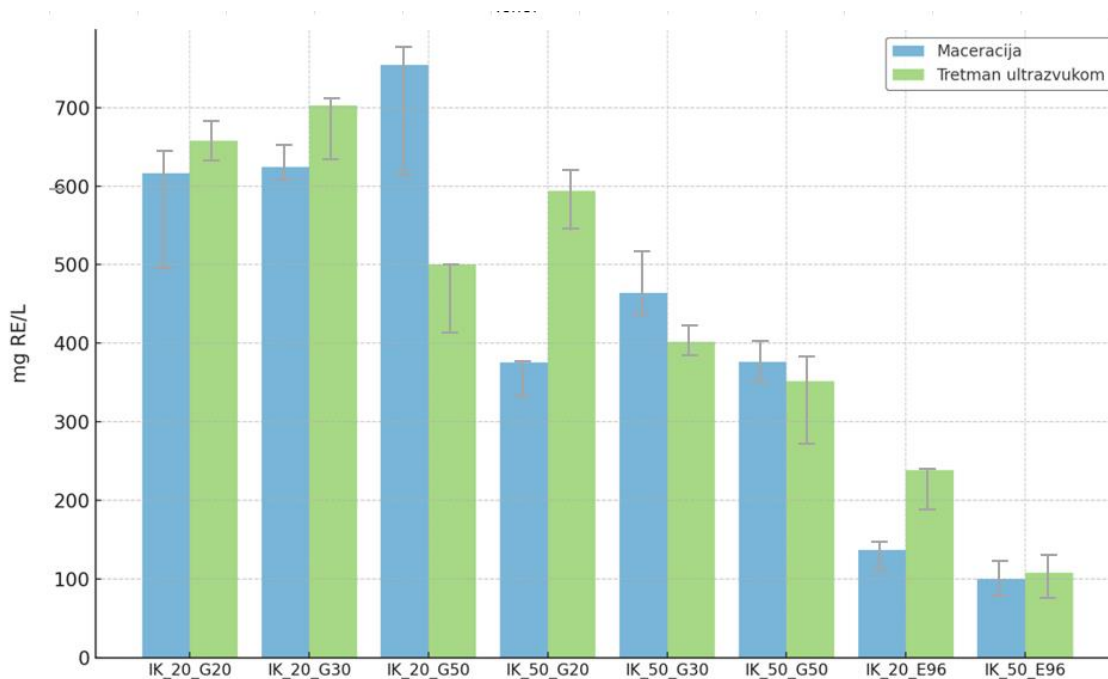
## **4.2. Određivanje ukupnih flavonoida**

Analizom rezultata ekstrakcije flavonoida iz koprive i konoplje uočene su značajne razlike ovisno o korištenoj metodi, omjeru biljnog materijala, vrsti biljke i sastavu otapala. Rezultati (slika 16 i slika 17) pokazuju da je tretman ultrazvukom općenito učinkovitiji za ekstrakciju flavonoida, posebno kod uzoraka koprive s manjim udjelom biljnog materijala (1:50). Ovaj efekt je osobito izražen kada su glicerol i ocat korišteni kao otapala pri koncentracijama glicerola od 20 %.

Pri većim koncentracijama glicerola (50 %) metoda maceracije pokazuje bolje rezultate u odnosu na ultrazvuk, što ukazuje na smanjenu učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije u ovim uvjetima (isto je zabilježeno kod fenolnih spojeva).



**Slika 17.** Prikaz koncentracije flavonoida (mg RE/L) u ekstraktima koprive nakon maceracije (plavi stupci) i tretmana ultrazvukom (zeleni stupci) (uzorci 1-8)



**Slika 18.** Prikaz koncentracije flavonoida (mg RE/L) u ekstraktima konoplje nakon maceracije (plavi stupci) i tretmana ultrazvukom (zeleni stupci) (uzorci 9-16)



Općenito, uzorci s manjim udjelom biljnog materijala (1:50) pokazali su bolju ekstrakciju, iako je veći omjer biljnog materijala (1:20) rezultirao višim koncentracijama flavonoida bez obzira na metodu ekstrakcije. Ovaj trend potvrđuje da manji omjer biljnog materijala može olakšati oslobađanje bioaktivnih spojeva iz stanica biljke. Također, potvrđuje važnost optimizacije omjera biljnog materijala i otapala za specifične uvjete i ciljeve ekstrakcije, jer različiti omjeri mogu utjecati na kinetiku ekstrakcije i stupanj zasićenja otapala bioaktivnim spojevima. Usporedba između koprive i konoplje pokazuje da je efekt omjera biljnog materijala izraženiji kod konoplje, koja sadrži više lako dostupnih flavonoida poput kanaflavina A i B (Isidore i sur., 2021).

Rezultati pokazuju da viši postotak glicerola (50 %) u uzorcima s većim udjelom biljnog materijala (1:20) poboljšava ekstrakciju flavonoida kod maceracije, što bi se moglo pripisati polarnosti glicerola jer može bolje otapati flavonoide koji su također polarni spojevi (Xu i sur., 2019).

Iako je ultrazvučna ekstrakcija u prosjeku rezultirala višom koncentracijom flavonoida, kod nekih uzoraka taj trend nije uočen (npr. IK\_1\_20\_G50). To je zato što je glicerol viskozno otapalo te je učinkovitost ultrazvučnih valova smanjena jer kavitacija nije toliko intenzivna (Jambrak i Drmić, 2008).

### **4.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti**

Ispitivana je antioksidacijska aktivnost različitih ekstrakata koprive (*Urtica dioica* L.) i konoplje (*Cannabis sativa* L.) korištenjem ABTS i FRAP metoda, nakon primjene različitih tretmana ekstrakcije. Podaci pokazuju (tablica 1) da su uzorci pripremljeni maceracijom općenito imali višu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s onima tretiranim ultrazvukom. Srednja vrijednost za ABTS metodu nakon ultrazvučnog tretmana iznosila je 4,95 mM Troloxa, dok je za maceraciju bila nešto viša 5,36 mM Troloxa. Za FRAP metodu, prosječne vrijednosti iznosile su 4,90 mM Troloxa za ultrazvuk, dok su uzorci maceracije imali prosječnu vrijednost od 5,22 mM Troloxa. Ovi rezultati sugeriraju da dulja ekstrakcija omogućava bolju izolaciju spojeva koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost.

**Tablica 1.** Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata koprive i industrijske konoplje određene ABTS i FRAP metodama nakon 24-satne maceracije i tretmana ultrazvukom. Rezultati su izraženi kao mM Trolox ekvivalenti s pripadajućim standardnim devijacijama ( $\pm$ ).

Uzorak	ABTS (mM Trolox)		FRAP (mM Trolox)	
	Maceracija	Ultrazvuk	Maceracija	Ultrazvuk
K_20_G20	7,83 $\pm$ 0,03	6,48 $\pm$ 0,02	7,92 $\pm$ 0,22	6,12 $\pm$ 0,02
K_20_G30	6,01 $\pm$ 0,09	6,18 $\pm$ 0,02	7,15 $\pm$ 0,06	5,97 $\pm$ 0,02
K_20_G50	8,20 $\pm$ 0,04	3,50 $\pm$ 0,04	8,35 $\pm$ 0,40	4,95 $\pm$ 0,002
K_50_G20	3,65 $\pm$ 0,05	3,74 $\pm$ 0,05	3,78 $\pm$ 0,13	4,37 $\pm$ 0,02
K_50_G30	3,37 $\pm$ 0,04	2,63 $\pm$ 0,06	3,34 $\pm$ 0,06	3,90 $\pm$ 0,010
K_50_G50	2,51 $\pm$ 0,04	2,73 $\pm$ 0,05	3,14 $\pm$ 0,21	3,60 $\pm$ 0,01
K_20_E30	8,05 $\pm$ 0,01	2,77 $\pm$ 0,003	3,49 $\pm$ 0,35	4,11 $\pm$ 0,005
K_50_E30	4,66 $\pm$ 0,13	1,96 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,15	1,93 $\pm$ 0,02
IK_20_G20	5,31 $\pm$ 0,01	8,60 $\pm$ 0,06	7,84 $\pm$ 0,00	8,62 $\pm$ 0,02
IK_20_G30	3,38 $\pm$ 0,07	8,75 $\pm$ 0,06	9,04 $\pm$ 0,03	7,82 $\pm$ 0,02
IK_20_G50	3,58 $\pm$ 0,07	6,85 $\pm$ 0,03	10,39 $\pm$ 0,18	7,01 $\pm$ 0,02
IK_50_G20	2,27 $\pm$ 0,03	3,88 $\pm$ 0,03	5,07 $\pm$ 0,23	5,25 $\pm$ 0,003
IK_50_G30	5,41 $\pm$ 0,01	5,15 $\pm$ 0,02	5,25 $\pm$ 0,50	5,39 $\pm$ 0,005
IK_50_G50	8,50 $\pm$ 0,05	4,47 $\pm$ 0,09	5,51 $\pm$ 0,18	4,15 $\pm$ 0,008
IK_20_E96	8,77 $\pm$ 0,02	7,27 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,06	2,75 $\pm$ 0,09
IK_50_E96	4,25 $\pm$ 0,009	4,25 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,09	2,43 $\pm$ 0,44

Usporedba antioksidacijske aktivnosti ekstrakata koprive i konoplje pokazala je da konoplja ima viši antioksidacijski kapacitet u obje korištene metode, osim kada je za analizu primijenjena FRAP metoda, pri čemu je kao otapalo korišten 96 % etanol. Prosječna vrijednost za ABTS kod koprive iznosila je 4,64 mM Troloxa, dok je kod konoplje bila viša, iznoseći 5,67 mM Troloxa. Sličan trend zabilježen je i kod FRAP metode, gdje je kopriva pokazivala prosječnu vrijednost od 4,58 mM Troloxa, dok je konoplja imala prosjek od 5,54 mM Troloxa.

Dodatna analiza pokazuje da tretman maceracijom daje nešto veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s ultrazvučnim tretmanom. To je posebno izraženo kod ekstrakata pripremljenih u glicerolu i octu gdje su vrijednosti za maceraciju bile konzistentno veće. Ultrazvuk se pokazao manje učinkovitim u postizanju većih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta; to bi mogla biti posljedica kraćeg vremena kontakta između otapala i biljnog materijala. Ovaj

nedostatak učinkovitosti dodatno se može objasniti generiranjem slobodnih radikala potaknutih ultrazvučnim djelovanjem, što je značajno pod utjecajem operativnih parametara, poput temperature. Naime, temperatura značajno utječe na opseg reakcija posredovanih radikalima jer mijenja fizikalna svojstva medija te ponašanje kavitacijskih mjehurića. Promjene u tim parametrima mogu dovesti do nepoželjnog oksidativnog oštećenja nekih antioksidativnih spojeva, što ograničava učinkovitost ultrazvuka u maksimalnoj ekstrakciji ovih spojeva (Akti i Yildiz, 2020).

Rezultati pokazuju da je etanol kao otapalo učinkovitiji u ekstrakciji spojeva s antioksidacijskom aktivnošću iz koprive nego glicerol i ocat u slučaju maceracije i ABTS metode. Također, uzorci konoplje pripremljeni s 96 % etanola pokazali su najvišu antioksidacijsku aktivnost prema ABTS metodi.

Međutim, kod FRAP metode može se uočiti da su uzorci konoplje pripremljeni s 96 % etanolom imali znatno nižu antioksidacijsku aktivnost. S obzirom na to da je FRAP metoda specifična za spojeve koji su sposobni reducirati željezo, ovi rezultati ukazuju na nisku koncentraciju takvih spojeva u ekstraktima konoplje kada se koristi visoka koncentracija etanola. S druge strane, uzorci pripremljeni u glicerolu i octu pokazali su konzistentnije vrijednosti antioksidacijske aktivnosti prema FRAP metodi. Zaključno, to pokazuje na bolju sposobnost tih otapala da ekstrahiraju spojeve odgovorne za redukciju željeza (Gąsior i sur., 2020).

#### **4.4. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara**

##### **4.4.1. pH vrijednost**

Provedena je analiza pH vrijednosti uzoraka (tablica 2) dobivenih maceracijom i ultrazvukom kako bi se procijenio utjecaj različitih metoda ekstrakcije na kiselost dobivenih ekstrakata. Mjerenja pH vrijednosti provedena su na uzorcima dobivenim 24-satnom maceracijom i ultrazvučnim tretmanom. pH vrijednosti određene su korištenjem pH metra Schott CG 842 (Mainz, Njemačka). Dobiveni rezultati mjerenja pH-vrijednosti uzoraka prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Rezultati pH vrijednosti ekstrakata koprive i konoplje dobivenih maceracijom i ultrazvukom

Uzorak	pH vrijednost	
	Maceracija	Ultrazvuk
K_20_G20	4,08	4,05
K_20_G30	4,22	4,14
K_20_G50	4,35	4,19
K_50_G20	3,84	3,78
K_50_G30	3,89	3,89
K_50_G50	3,98	4,11
K_20_E30	8,07	7,07
K_50_E30	8,46	7,14
IK_20_G20	4,05	4,05
IK_20_G30	4,16	4,12
IK_20_G50	4,38	4,17
IK_50_G20	3,86	3,85
IK_50_G30	3,91	3,89
IK_50_G50	4,05	3,99
IK_20_E96	6,41	6,53
IK_50_E96	6,59	6,63

Većina uzoraka kojima je otapalo glicerol i ocat pokazivala je blago kisele pH-vrijednosti između 3,78 i 4,19 za ultrazvuk te 3,84 - 4,38 za uzorke pripravljene maceracijom. Uzorci pripravljene s etanolom pokazivali su značajno viši pH (7,07 i 7,14 za 96 % etanol) što je i očekivano jer je etanol manje kiselo otapalo u usporedbi s glicerolom i octom.

Uzorci koprive općenito su pokazivali nešto niže pH vrijednosti u usporedbi s konopljom, a to je povezano s većim sadržajem kiselih spojeva u koprivi (Garofulić i sur., 2021).

Omjer biljnog materijala (1:20 i 1:50) nije pokazao značajan utjecaj na pH vrijednosti te se time zaključuje da količina biljnog materijala ne utječe značajno na pH-vrijednost dobivenih ekstrakata.

#### 4.4.2. Ukupni suhi ekstrakt

U istraživanju su uspoređivane koncentracije ukupnog ekstrakta uzoraka dobivenih maceracijom i ultrazvučnim tretmanom te primjenom različitih otapala. Rezultati pokazuju razlike u učinkovitosti ovih metoda za ekstrakciju suhe tvari iz biljnih materijala ovisno o vrsti uzorka i korištenom postupku (tablica 3).

**Tablica 3.** Rezultati ukupnog ekstrakta izraženi kao sadržaj suhe tvari (g/L) ekstrakata koprive i industrijske konoplje dobivenih ultrazvukom i maceracijom

Uzorak	Suha tvar (g/L)	
	Maceracija	Ultrazvuk
K_20_G20	13,88	11,17
K_20_G30	35,08	36,01
K_20_G50	48,62	40,26
K_50_G20	9,52	8,29
K_50_G30	29,74	23,9
K_50_G50	39,8	37,12
K_20_E30	35,96	28,53
K_50_E30	34,2	30,36
IK_20_G20	18,98	20,82
IK_20_G30	40,46	30,77
IK_20_G50	58,12	33,24
IK_50_G20	10,26	8,62
IK_50_G30	30,38	23,33
IK_50_G50	39,02	36,83
IK_20_E96	44,96	36,27
IK_50_E96	44,12	38,34

Rezultati pokazuju da je maceracija u većini slučajeva dovela do većih koncentracija ukupnog ekstrakta u usporedbi s ultrazvučnim tretmanom. Kod uzoraka K\_20\_G50 i IK\_20\_G50, koncentracije suhe tvari kod maceracije bile su znatno veće (48,62 g/L i 58,12 g/L) u usporedbi s ultrazvukom (40,26 g/L i 33,24 g/L). Ovi rezultati ukazuju da je dulje vrijeme kontakta između

biljnog materijala i otapala omogućilo bolju ekstrakciju, no treba uzeti u obzir da visoka viskoznost glicerola (50 %) može smanjiti učinkovitost ultrazvučnog tretmana, što također doprinosi nižim rezultatima ultrazvuka. S druge strane kod uzorka K\_1\_20\_G30 (36,01 g/L ultrazvuk, 35,08 g/L maceracija), ultrazvučni tretman je bio nešto učinkovitiji. Isto je i vidljivo kod uzorka K\_1\_50\_G50 (37,12 g/L ultrazvuk, 39,8 g/L maceracija).

Glicerol kao otapalo, zbog svoje viskoznosti i topljivosti polarnih spojeva, doprinio je većim vrijednostima suhe tvari, no moguće je da dio mase dolazi od zaostalog otapala. Pri manjim koncentracijama glicerola (20 % i 30 %), razlike između tretmana su bile manje izražene te s povremenom prednošću ultrazvuka.

U usporedbi biljaka, konoplja je općenito imala veće koncentracije suhe tvari u odnosu na koprivu. Na primjer kod uzorka IK\_20\_G30 koncentracija suhe tvari iznosi 40,46 g/L (maceracija), dok kod koprive pod istim uvjetima iznosi 35,08 g/L. Ova razlika sugerira da je konoplja bogatija ekstraktivnim tvarima u usporedbi s koprivom.

#### 4.4.3. Kromatski parametri

Kromatski parametri dobivenih ekstrakta određeni su spektrofotometrijski prema CIElab sustavu (OIV, 2014). Svi dobiveni ekstrakti su obojeni.

**Tablica 4.** Kromatski parametri (a, b, L, Cab i hab) za ekstrakte dobivene maceracijom

<b>Uzorak</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>L</b>	<b>Cab</b>	<b>hab</b>
<b>K_20_G20</b>	18,9805	74,3509	61,5265	66,7354	1,3209
<b>K_20_G30</b>	16,9466	72,5822	64,5648	64,5343	1,3414
<b>K_20_G50</b>	25,1504	77,3887	51,3794	61,3729	1,2566
<b>K_50_G20</b>	5,9634	51,3892	78,6114	51,7341	1,4553
<b>K_50_G30</b>	4,9794	48,9212	81,4388	49,1739	1,4694
<b>K_50_G50</b>	4,7331	49,7877	82,4450	50,0122	1,4760
<b>K_20_E30</b>	-0,2474	0,3608	14,1686	0,4375	1,9718
<b>K_50_E30</b>	-0,4892	1,4031	9,9259	1,4860	1,6063
<b>IK_20_G20</b>	4,7262	58,5308	80,0442	58,7213	1,4902
<b>IK_20_G30</b>	-0,8722	-6,2363	59,0751	6,2970	4,5734
<b>IK_20_G50</b>	0,1783	2,3856	14,2365	2,3923	1,4962
<b>IK_50_G20</b>	-0,1128	1,9957	12,9911	1,9989	1,6273
<b>IK_50_G30</b>	-0,0775	1,9095	5,7161	1,9111	1,6114
<b>IK_50_G50</b>	-0,0817	2,0586	13,5647	2,0602	1,6105
<b>IK_20_E96</b>	-11,1589	52,2890	35,0082	52,6690	1,7442
<b>IK_50_E96</b>	-15,3274	69,4570	56,4143	71,1280	1,7880

**Tablica 5.** Kromatski parametri (a, b, L, Cab i hab) za ekstrakte dobivene ultrazvučnim tretmanom

Uzorak	a	b	L	Cab	hab
<b>K_20_G20</b>	14,8874	52,8781	42,9553	54,9339	1,2964
<b>K_20_G30</b>	14,4521	58,8474	53,6506	60,5960	1,3300
<b>K_20_G50</b>	7,9330	55,9976	52,8369	49,5408	1,3480
<b>K_50_G20</b>	10,9486	48,3158	52,8369	49,5408	1,3480
<b>K_50_G30</b>	8,5685	50,2727	66,4186	50,9977	1,4020
<b>K_50_G50</b>	6,8343	49,5783	67,2364	49,5783	1,4325
<b>K_20_E30</b>	7,9929	49,4906	45,5443	50,1319	1,4107
<b>K_50_E30</b>	3,5088	46,9620	61,3708	47,0929	1,4962
<b>IK_20_G20</b>	15,7866	40,4531	24,2185	40,4531	1,1699
<b>IK_20_G30</b>	14,7540	49,6505	34,6375	49,6505	1,2691
<b>IK_20_G50</b>	12,6939	51,3373	46,4755	52,8834	1,3284
<b>IK_50_G20</b>	7,8441	43,0536	54,5146	43,7623	1,3906
<b>IK_50_G30</b>	6,6062	43,5866	62,8794	44,0844	1,4204
<b>IK_50_G50</b>	7,7337	42,5951	53,9989	43,2915	1,3912
<b>IK_20_E96</b>	-9,6325	56,4948	60,1120	57,3101	1,7397
<b>IK_50_E96</b>	-13,1536	75,9494	83,9570	77,0800	1,7423

Usporedba rezultata za tretmane maceracije i ultrazvuka (tablica 4 i tablica 5) pokazuju značajne razlike u kromatskim parametrima ekstrakata. Vrijednosti svjetline (L) kod uzoraka tretiranih ultrazvukom bile su u većini slučajeva niže u usporedbi s maceriranim uzorcima. To sugerira da ultrazvuk omogućuje bolju ekstrakciju tamnijih pigmenta i čime se dobiva tamniji ekstrakt. Ovaj efekt se može pripisati intenzivnim mehaničkim silama koje ultrazvuk stvara u otapalu, čime se povećava oslobađanje biljnih pigmenta (Linares i Rojas, 2022). Kod usporedbe biljnog materijala, ultrazvučni tretman rezultirao je intenzivnijim bojama i bolju stabilnost svjetline uzoraka kod konoplje, osobito u kombinaciji s visokim udjelom etanola. Međutim, maceracija je osigurala veću stabilnost i svjetlinu uzoraka kod koprive.



Kromatski intenzitet (Cab) pokazao je da su uzorci ekstrahirani etanolom pokazali značajno veće vrijednosti od uzoraka koji su sadržavali glicerol i jabučni ocat kao otapalo. Kod koncentracije od 96 % etanola, uzorci su imali značajno prosječno veće vrijednosti kromatskog intenziteta u usporedbi s 30 % etanolom, čime prikazuje da veća koncentracija etanola olakšava otapanje pigmenta. Ova promjena intenziteta boje može biti korisna pri razvoju proizvoda gdje je potrebna visoka zasićenost boje (Casassa i sur., 2013).

Nijansa boje (hab) pokazala je različite obrasce ovisno o tretmanu i vrsti otapala. Kod tretmana maceracijom nijansa je bila konzistentnija, znači da je proces ekstrakcije stabilniji. Kod uzoraka tretiranih nižim koncentracijama glicerola (20 %) nijanse su bile toplije, a s povećanjem koncentracije glicerola prelazile su prema hladnijim tonovima.. Etanol se pokazao kao vrlo efikasno otapalo za ekstrakciju pigmenata (najbolje 96 % koncentracija) što je dovelo do tamnijih i zasićenijih ekstrakta. To je posebno izraženo kod konoplje jer sadrži veće koncentracije lipofilnih pigmenata koji se lakše otapaju u visokom postotku etanola (Stasiłowicz-Krzemień i sur., 2023).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati su pokazali da je koncentracija fenolnih spojeva najveća nakon 24 sata maceracije, dok produljenje trajanja maceracije dovodi do postupnog smanjenja njihove koncentracije. Ovaj pad može se pripisati procesima razgradnje ili polimerizacije fenolnih spojeva u otopini.
2. Istraživanje je pokazalo da maceracija omogućuje bolju ekstrakciju fenolnih spojeva u usporedbi s ultrazvučnim tretmanom. Ova metoda bila je posebno učinkovita pri uporabi otapala s većom koncentracijom glicerola (50%).
3. Ultrazvučni tretman pokazao se učinkovitijim za ekstrakciju flavonoida, osobito uz manji omjer biljnog materijala (1:50) i otapala. Međutim, viskoznost glicerola smanjila je učinkovitost ultrazvučnih valova zbog slabije kavitacije, što je rezultiralo nižom koncentracijom flavonoida pri većim koncentracijama glicerola (50 %). Konoplja je bila bogatiji izvor flavonoida u odnosu na koprivu, što odgovara njezinom kemijskom sastavu.
4. Ekstrakti dobiveni maceracijom pokazali su bolju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ultrazvukom, posebno pri višim koncentracijama glicerola. Pri tim koncentracijama, kopriva je pokazala bolju antioksidacijsku aktivnost od konoplje. Glicerol i ocat su se općenito pokazali učinkovitijim otapalima od etanola za ekstrakciju antioksidacijskih spojeva.
5. Kod analize kromatskih svojstava, ultrazvučni tretman rezultirao je intenzivnijim bojama i bolju stabilnost svjetline uzoraka (L) kod konoplje, osobito u kombinaciji s visokim udjelom etanola. Međutim, maceracija je osigurala veću stabilnost i svjetlinu uzoraka kod koprive. Što se tiče pH vrijednosti i sadržaja ukupnog ekstrakta, s povećanjem koncentracije glicerola u otapalu te s porastom koncentracije bilja kod obje metode ekstrakcije, dolazi do povećanja pH vrijednosti i sadržaja ukupnog ekstrakta.

## 6. LITERATURA

- Akti N, Yıldız S (2024) Exploring ultrasound-induced free radical formation: A comparative study in water and sour cherry juice using glutathione and terephthalic acid indicators. *Ultrason. Sonochem.* **112**, 107193. doi: 10.1016/j.ultsonch.2024.107193. Alamgir ANM
- (2018) Phytoconstituents-Active and Inert Constituents, Metabolic Pathways, Chemistry and Application of Phytoconstituents, Primary Metabolic Products, and Bioactive Compounds of Primary Metabolic Origin, 2. izd., Springer, Cham.
- Anaya-Esparza LM, Aurora-Vigo EF, Villagrán Z, Rodríguez-Lafitte E, Ruvalcaba-Gómez JM, Solano-Cornejo MA, i sur. (2023) Design of Experiments for Optimizing Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Plant-Based Sources. *Molecules* **28** (23), 7752. doi:10.3390/molecules28237752.
- Asgarpanah J, Mohajerani R (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *J. Med. Plant Res.* **6**, 5714–5719. doi: 10.5897/JMPR12.540.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117** (4), 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- Bhusal KK, Magar SK, Thapa R, Lamsal A, Bhandari S, Maharjan R, i sur. (2022) Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon* **2022**. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09717.
- Casassa LF, Beaver CW, Mireles MS, Harbertson JF (2013) Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, colour components and sensory attributes of Merlot wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **19** (1), 25–39. doi:10.1111/ajgw.12009.
- Cegledi E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Roje M, Dragović-Uzelac V (2022) Effect of Spray Drying Encapsulation on Nettle Leaf Extract Powder Properties, Polyphenols and Their Bioavailability. *Foods* **11**, 2852. <https://doi.org/10.3390/foods11182852>
- Cheng X, Zhang M, Xu B, Adhikari B, Sun J (2015) The principles of ultrasound and its application in freezing related processes of food materials: A review. *Ultrason. Sonochem.* **27**, 576–585. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.04.015.
- Crini G, Lichtfouse E, Chanet G, Morin-Crini N (2020) Traditional and new applications of hemp. *Sustain. Agric. Res.* **42**, 37-87. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41384-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41384-2_2)
- Da Silva HR, da Cruz de Assis D, Lafourcade Prada A, Carrera Silva JO, de Sousa MB, Ferreira AM, i sur. (2019) Obtaining and characterization of anthocyanins from *Euterpe oleracea* (açai) dry extract for nutraceutical and food preparations. *Rev. Bras. Farmacogn.* **29**, 677–685.
- Đurović S, Kojić I, Radić D, Smyatskaya YA, Bazarnova JG, Filip S, Tosti T (2024) Chemical Constituents of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.): A Comprehensive Review on Phenolic and Polyphenolic Compounds and Their Bioactivity. *Int. J. Mol. Sci.* **25** (6), 3430. doi:10.3390/ijms25063430.
- Đurović S, Micić D, Šorgić S, Popov S, Gašić U, Tosti T, i sur. (2023) Recovery of Polyphenolic Compounds and Vitamins from the Stinging Nettle Leaves: Thermal and Behavior and Biological Activity of Obtained Extracts. *Molecules* **28** (5), 2278. doi:10.3390/molecules28052278.

- Elez Garofulić I, Malin V, Repajić M, Zorić Z, Pedisić S, Sterniša M, Smole Možina S, Dragović-Uzelac V (2021) Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules* **26** (20), 6153. doi:10.3390/molecules26206153.
- Gašior J, Kawa-Rygielska J, Kucharska AZ (2020) Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules* **25** (17), 3882. doi: 10.3390/molecules25173882.
- Grauso L, de Falco B, Lanzotti V, Motti R (2020) Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem. Rev.* **19**, 1341–1377. doi: 10.1007/s11101-020-09680-x.
- Ho CW, Lazim AM, Fazry S, Zaki UKHH, Lim SJ (2017) Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chem.* **221**, 1621–1630. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.128.
- Hromádková Z, Ebringerová A (2003) Ultrasonic extraction of plant materials—investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrason. Sonochem.* **10** (3), 127–133. doi: 10.1016/s1350-4177(03)00094-4.
- Isidore E, Karim H, Ioannou I (2021) Extraction of phenolic compounds and terpenes from *Cannabis sativa* L. by-products: From conventional to intensified processes. *Antioxidants* **10** (6), 942. doi:10.3390/antiox10060942.
- Izzo L, Castaldo L, Narváez A, Graziani G, Gaspari A, Rodríguez-Carrasco Y, i sur. (2020) Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L. Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules* **25**, 631. doi:10.3390/molecules25030631.
- Jambrović M (2021) Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Završni rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Laganà P, Anastasi G, Marano F, Piccione S, Singla RK, Dubey AK, i sur. (2019) Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *J. AOAC Int.* **102**, 1378–1387. doi:10.1093/jaoac/102.5.1378.
- Launholt TL, Kristiansen CB, Hjorth P (2020) Safety and side effects of apple vinegar intake and its effect on metabolic parameters and body weight: a systematic review. *Eur. J. Nutr.* **59** (6), 2273–2289. doi:10.1007/s00394-020-02214-3.
- Linares G, Rojas ML (2022) Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Pigments From Food Processing By-Products: A Review. *Front. Nutr.* **9**, 891462. doi:10.3389/fnut.2022.891462.
- Lochab B, Shukla S, Varma IK (2014) Naturally occurring phenolic sources: monomers and polymers. *RSC Adv.* **4** (42), 21712–21752. doi:10.1039/c4ra00181h.
- Manuja R, Sachdeva S, Jain A, Chaudhary J (2013) A Comprehensive Review on Biological Activities of P-Hydroxy Benzoic Acid and Its Derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **22**, 109–115.
- Moharram HA, Youssef MM (2014) Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alex. J. Fd. Sci. Technol.* **11**, 31–42.
- Montserrat-de la Paz S, Marín-Aguilar F, Garcia Gimenez MD, Fernandez-Arche MA (2014) Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: Analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agric. Food Chem.* **62** (5), 1105–1110. doi:10.1021/jf404278q.

Nawaz K, Kait C, Chia I, Huei (2019) Glycerol-Mediated Facile Synthesis of Colored Titania Nanoparticles for Visible Light Photodegradation of Phenolic Compounds. *Nanomaterials* **9** (11), 1586. doi:10.3390/nano9111586.

OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin (2014) Determination of chromatic characteristics, OIV-MA-BS-27, International Organisation of Vine and Wine, Paris.

Pękal A, Pyrzynska K (2014) Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods* **7** (9), 1776–1782. DOI: 10.1007/s12161-014-9814-x.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237.

Režek Jambrak A (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno biotehnoški fakultet, Disertacija, Zagreb.

Schilling S, Melzer R, McCabe PF (2020) *Cannabis sativa*. *Curr. Biol.* **30** (1), 8–9.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158.

Sorrentino G (2021) Introduction to emerging industrial applications of cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Rendiconti Lincei. Sci. Fis. Nat.* **32**, 233–243. doi:10.1007/s12210-021-00979-1.

Stasiłowicz-Krzemień A, Szulc P, Cielecka-Piontek J (2023) Co-Dispersion Delivery Systems with Solubilizing Carriers Improving the Solubility and Permeability of Cannabinoids (Cannabidiol, Cannabidiolic Acid, and Cannabichromene) from *Cannabis sativa* (Henola Variety) Inflorescences. *Pharmaceutics* **15** (9), 2280. doi:10.3390/pharmaceutics15092280.

Strzelczyk M, Lochynska M, Chudy M (2022) Systematics and botanical characteristics of industrial hemp *Cannabis sativa* L. *J. Nat. Fibers* **19** (13), 5804–5826. doi:10.1080/15440478.2021.1889443.

Taheri Y, Quispe C, Herrera-Bravo J, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Merghany RM, i sur. (2022) *Urtica dioica*-derived phytochemicals for pharmacological and therapeutic applications. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2022**, 1–30. doi:10.1155/2022/4024331.

Tambun R, Alexander V, Ginting Y (2021) Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **1122** (1), 012095. doi:10.1088/1757-899X/1122/1/012095.

Tan HW, Abdul Aziz AR, Aroua MK (2013) Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **27**, 118–127. doi:10.1016/j.rser.2013.06.035.

Tripathi S, Mazumder PM (2020) Apple Cider Vinegar (ACV) and their Pharmacological Approach towards Alzheimer's Disease (AD): A Review. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **54** (2), 67–74. doi:10.5530/ijper.54.2s.62.

Xu M, Ran L, Chen N, Fan X, Ren D, Yi L. (2019) Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food Chem.* **297**, 124970. doi:10.1016/j.foodchem.2019.124970.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Matija Preis 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.

---

Vlastoručni potpis