

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Bojana Brnica, Dunja Crnogorac, Elena Micolaj,
Andreja Poljanec, Kristina Vugrinec

**EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
MAJČINE DUŠICE I RUŽMARINA SA „ZELENIM
OTAPALIMA“ PRIMJENOM
VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA**

Zagreb, 2019.

Ovo istraživanje je provedeno u okviru projekta „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenj financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 MAJČINA DUŠICA	2
2.2 RUŽMARIN.....	4
2.3 POLIFENOLI.....	5
2.3.1. Klasifikacija polifenola	6
2.4 ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	7
2.5 EKSTRAKCIJA „ZELENIM OTAPALIMA“.....	9
2.6 VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE.....	14
2.6.1 Fenomen elektroporacije	16
2.6.2 Reaktivni spojevi kisika i dušika.....	19
2.7 BLISKOINFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA – NIR.....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. MATERIJALI.....	25
3.1.1. Uzorci	25
3.1.2. Reagensi	25
3.1.3. Aparatura i pribor	27
3.2. METODE RADA	27
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom visokonaponskog pražnjenja	28
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	29
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti – FRAP metoda.....	31
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti - DPPH metoda	33
3.2.5. NIR analiza.....	34
3.2.6. Analiza glavnih komponenata	35
3.2.7. Regresija glavnih komponenata	36
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	38
4.1. REZULTATI MJERENJA UKUPNIH FENOLA	40
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	43
4.2.1. FRAP metoda	43
4.2.2. DPPH metoda.....	47
4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	51
4.4. PRINOS EKSTRAKCIJE	53
4.5. NIR ANALIZA – BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA.....	55

4.6.	PCA ANALIZA - ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA	61
4.7.	PCR ANALIZA – REGRESIJA GLAVNIH KOMPONENATA.....	70
5.	ZAKLJUČCI.....	77
6.	ZAHVALE.....	78
7.	SAŽETAK	79
8.	SUMMARY	80
9.	LITERATURA	81

1. UVOD

Svijest o zagađenju okoliša i pretjeranoj eksploataciji prirodnih resursa u industrijama raste te se stoga istražuju nove metode koje su u skladu s načelima zelene kemije. Mnoge kemijske i prehrambene industrije još uvijek koriste uobičajene tehnike ekstrakcije zbog čije primjene dolazi do emisije velike količine ugljikovog dioksida. Konvencionalne metode ekstrakcije spojeva iz biljnog materijala koriste velike količine organskih otapala koja su štetna za okoliš, jer se ne mogu razgraditi do biorazgradivih jedinica. Nove metode ekstrakcije, netoplinske metode, koriste temperature tretmana do 35 °C, dok se kod konvencionalnih metoda primjenjuju visoke temperature (više od 60 °C). Uz brojne prednosti netoplinskih metoda, bitna stavka je kratko vrijeme ekstrakcije i brže dobivanje rezultata analiza, za razliku od konvencionalnih metoda ekstrakcije. Jedna od spomenutih netoplinskih metoda jest i ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem, tj. tretman hladnom plazmom. Zbog ekološke osviještenosti, u ovom su radu korištena tzv. „zeleno otapala“ – voda i etanol, koja su pogodna za ekstrakciju fenolnih spojeva. Fenolni spojevi su vrlo često proučavani i ekstrahirani iz biljnih materijala zbog svoje antioksidacijske aktivnosti koja im omogućuje sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala, sprječavanja oksidacijskog stresa te imaju djelotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Uzorci korišteni za ekstrakciju su majčina dušica i ružmarin, autohtone mediteranske biljke koje se svrstavaju u ljekovite biljke. Ljekovite biljke su definirane kao biljne sorte i vrste, čiji jedan ili više dijelova sadrži biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe. Pronalaženjem novih načina ekstrakcije može se doći do kvalitetnog ekstrakta uz korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih materijala te smanjenje potrošnje energije. Primjena naprednih netoplinskih tehnika i „zelenih otapala“ u sklopu je Agende 2030. i u skladu sa smjernicama održivog razvoja. Održivost i budući razvoj je u zelenoj kemiji te je potrebno osmisliti procese i ponovo iskorištavanje nusprodukata kojima bi se smanjila upotreba supstanci štetnih za zdravlje ljudi i okoliša, uz istovremeno povećanje iskorištenja procesa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 MAJČINA DUŠICA



Slika 1. Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) (Martinić, 2003)

Majčina dušica (Slika 1.) je aromatska ljekovita biljka iz porodice *Lamiaceae*. Naziva se još i babina dušica, divlji bosiljak, čubrić, dušica, dušička, materina dušica, materinka, paprić, popovac, tamjanika, timijan, vrisak (Willfort, 2002).

Biljka je trajni polugrm, visine oko 30 cm sa slabo odrvenjelom, uspravnom ili puzavom stabljikom. Stabljika je okrugla ili četverouglasta, prekrivena dlakama (Willfort, 2002). Listovi su joj nejednakog oblika, veličine od 5 do 15 mm. Listovi mogu biti linearni do okruglasti, jajasti ili pak gotovo kožasti. Na listovima, posebno na naličju lista, vidljive su smeđe točkice koje predstavljaju žlijezde s eteričnim uljem (Kuštrak, 2005). Boje cvjetova variraju od svjetlocrvenih do tamnocrvenih, a cvjetovi su vrlo mali te se razvijaju na vrhovima ogranaka, a skupljeni su u okruglaste cvatove (Willfort, 2002).

Cvatnja se odvija od sredine svibnja do sredine rujna. U vrijeme cvatnje sakuplja se nadzemni izdanak. Odsiječe se gornja trećina stabljike s cvjetovima. Nepotrebno je čupati biljku s korijenom jer se aktivne komponente nalaze u listovima i u cvjetovima. Sabrani materijal se suši u tankom sloju na prozračnome mjestu ili u sušionici na temperaturi do 40 °C, a čuva se u hermetički zatvorenim posudama (Gelenčir, 1991).

Eterično ulje majčine dušice sadrži komponente koje su dokazani antibiotici i dezinficijensi te se koristi za ublažavanje bolova kod reumatizma, gihta i išijasa. Ima veliki značaj u liječenju

kašlja, bronhitisa i upala gornjih dišnih puteva. Istraživanja potvrđuju i snažnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta zahvaljujući sinergizmu brojnih fenolnih komponenata (Čančarević i sur., 2013). Majčina dušica potiče apetit zbog gorkih tvari i ugodna aromatična okusa zbog čega se često koristi kao začim. Miris umiruje vegetativni živčani sustav, pa se često koristi u aromaterapiji, kao psihoterapeutik, kod odraslih osoba i djece (Galle Toplak, 2005).

Suha tvar majčine dušice čini 92% ukupne mase, a pepeo 13 %, 2% cjelokupne mase biljke (Savić i sur., 2008). Kemijski sastav majčine dušice prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav majčine dušice na 100 g (Savić i sur., 2008)

Kemijski sastav majčine dušice (<i>T. serpyllum</i>) na 100 g					
suha tvar	92 g	kalcij	2,1 mg	vitamin A	175 mg
ugljikohidrati	44,0	fosfor	0,9 mg	tamin	51 mg
celuloza	24,3	željezo	0,1 g	riboflavin	0,4 mg
lipidi	4,6	natrij	0,1 mg	niacin	4,9 mg
proteini	6,8 g	kalij	0,9 mg	vitamin C	12 mg

Od fenolnih monoterpena sadrži najviše timola i karvakrola. Neki kemotipovi sadrže citral, 1,8-cineol, linalol, linalilacetat, borneol te geraniol. Također sadrži i fenolne kiseline: ružmarinsku, klorogensku i kafeinsku kiselinu. Od kemijskih spojeva zastupljeni su i flavonoidi: glikozidi apigenina i luteolina (luteolin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukozid), flavonol: kvercetin, flavanon: eriocitrin, flavoni: luteolin, apigenin, triterpenske kiseline: ursolna, oleanolna kiselina, timokinon, te tanini (do 7%) (Galle Toplak, 2005).

2.2 RUŽMARIN



Slika 2. Ružmarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) (Martinić, 2003)

Ružmarin (Slika 2.) raste kao razgranati, zimzeleni grm koji može narasti i do dva metra visine. Postoje i puzajući, odnosno niski oblici koji se mogu saditi kao pokrivači tla. Ima kožaste, čvrste, sjajne listove dužine 2-3 cm. Gornja strana lista je tamnozeleno, a naličje je svijetlozeleno. Vrijeme cvata je od ožujka do listopada, a cvjetovi su mali, od blijedoplave do ljubičaste boje. Ukoliko se listovi protrljaju među prstima, ispustit će intenzivan, jak miris. Cijela biljka je aromatična, a količina ulja u biljci ovisi o klimi i položaju na kojemu raste (Marković, 2010).

Ružmarin je biljka sredozemnog podneblja iz porodice usnača. Za ekstrakciju bioaktivnih komponenti koriste se igličasti listovi. Eterično ulje ružmarina u najvećoj mjeri sadrži 1,8-cineol, α -pinen, kamfor, kamfen, borneol, bornil acetat i kariofilen (Fu i sur., 2007).

Antropolozi i arheolozi su pronašli dokaze o primjeni ružmarina za ljekovite, kulinarske i kozmetičke svrhe još na području staroga Egipta, Mezopotamije, Kine i Indije, dok je danas njegova primjena rasprostranjena po cijelome svijetu. Ekstrakt ružmarina koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, jer sadrži brojne antioksidanse i fenolne spojeve zbog čega se često primjenjuje u liječenju različitih bolesti (Cuvelier i sur., 1996; Fadel i El-Massry, 2000).

U prehrambenoj industriji ružmarin se koristi kao začim, posebno u proizvodima s mastima, mesom i juhama, za poboljšanje okusa i organoleptičkih svojstava. Također se koristi i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za proizvodnju parfema i sapuna (Calin-Sanchez i sur., 2011).

Za antioksidacijski kapacitet ružmarina odgovorni su fenolni diterpeni, flavonoidi i fenolne kiseline (Nakatani i Inatani, 1984; Aruoma i sur., 1997; Cuvelier i sur., 1996; Bicchi i sur., 2000), od kojih se posebno ističu karnozinska kiselina i karnozol, abietanski diterpeni, ružmarinska kiselina i esteri hidroksicimetne kiseline (Wellwood i Cole, 2004; Peñuelas i Munné-Bosch, 2005). Lišće ružmarina sadrži fenolne kiseline: 2-3 % ružmarinske, klorogenske i kafeinske kiseline, fenolne diterpenoidne spojeve: do 4,6 % karnozola, rozmaridifenola, rozmanola, triterpenoidne kiseline: oleanoličnu kiselinu, ursoličnu kiselinu; flavonoide: apigenin, luteolin, nepetin, nepitrin; tanine i eterična ulja (1,2-2,5 %) (Bele i sur., 2010).

2.3 POLIFENOLI

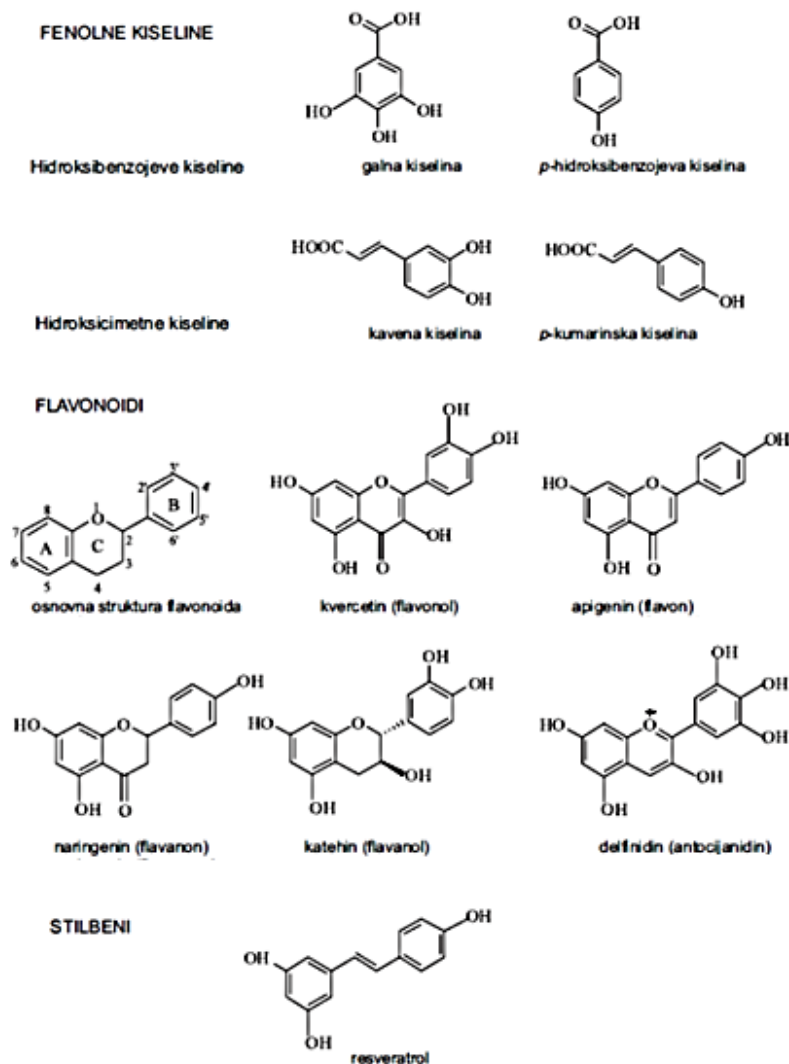
Polifenoli su glavni biljni sekundarni metaboliti, strukturno izuzetno raznoliki, bitni za različite funkcije u biljkama, odgovorni za glavna organoleptička i nutritivna svojstva hrane, dobiveni iz biljaka i korisni za brojne praktične primjene. Znanstvenici i proizvođači pokazuju sve veće zanimanje za polifenole. Glavni razlog za veliki interes je prepoznavanje antioksidativnih svojstava polifenola, zatim velika prisutnost u prehrani i njihova vjerojatna uloga u prevenciji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao što su degenerativne bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih oboljenja. Učinci polifenola na zdravlje ovise o unesenoj količini i njihovoj bioraspoloživosti (Manach i sur., 2004).

Jaki su antioksidansi koji nadopunjuju i dodaju funkcije antioksidativnim vitaminima i enzimima kao obranu od oksidativnog stresa uzrokovanog viškom reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Iako se većina dokaza o antioksidacijskoj aktivnosti polifenola temelji na *in vitro* studijama, sve više dokaza ukazuje na to da oni mogu djelovati na načine izvan antioksidativnih funkcija *in vivo*. Mogu neutralizirati slobodne radikale donirajući elektron ili atom vodika. Visoko konjugirani sustav i određeni obrasci hidroksilacije, kao što je 3-hidroksi skupina u flavonolima, smatraju se važnim u antioksidacijskim aktivnostima. Polifenoli potiskuju stvaranje slobodnih radikala, čime se smanjuje brzina oksidacije inhibicijom ili deaktiviranjem aktivnih vrsta i prekursora slobodnih radikala (Tsao, 2010).

2.3.1. Klasifikacija polifenola

Polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih proizvoda u biljnom svijetu. Trenutno je poznato više od 8000 fenolnih struktura, a među njima je identificirano preko 4000 flavonoida. Iako su polifenoli kemijski karakterizirani kao spojevi s fenolnim strukturnim značajkama, ova skupina prirodnih proizvoda je vrlo raznolika i sadrži nekoliko podskupina fenolnih spojeva. Raznolikost i široka raspodjela polifenola u biljkama dovela je do različitih načina kategorizacije tih spojeva koji se pojavljuju u prirodi. Polifenoli su klasificirani prema izvoru porijekla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Također, većina polifenola u biljkama postoji kao glikozidi s različitim jedinicama šećera i aciliranim šećerima na različitim položajima polifenolnih kostura (Tsao, 2010).

Ovi spojevi mogu se svrstati u različite skupine po broju fenolnih prstenova koje sadrže i strukturnim elementima, koji vezuju ove prstenove jedan za drugog. Tako postoje razlike između fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena i lignana (Slika 3). Flavonoidi, koji imaju zajedničku strukturu koja se sastoji od 2 aromatska prstena (A i B) koji su međusobno vezani s 3 ugljikova atoma koji tvore oksidirani heterociklički prsten (prsten C), mogu se sami podijeliti u 6 podrazreda po heterocikličkim skupinama: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidi i flavanoli (katehini i proantocijanidini). Osim ove podjele, polifenoli se povezuju s različitim ugljikohidratima i organskim kiselinama ili međusobno (Manach i sur., 2004).



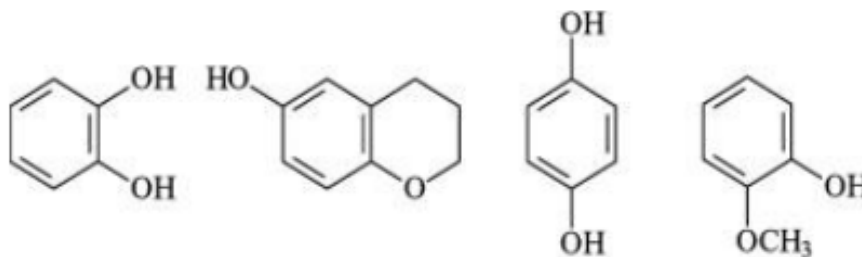
Slika 3. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009)

2.4 ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi predstavljaju skupinu različitih prirodnih spojeva koji imaju bitnu ulogu u zaštiti od štetnog djelovanja slobodnih radikala na način da neutraliziraju već nastale slobodne radikale ili sprječavaju njihovo nastajanje. Antioksidansi mogu biti enzimi ili različite male neenzimske molekule kao što su npr. fenoli, glutation, askorbinska kiselina koji posljedično mogu biti od velike važnosti u prevenciji mnogih bolesti (Shi i sur., 2001). Kemijske strukture antioksidanasa prikazane su na Slici 4.

Antioksidansi djeluju na 2 načina:

1. HAT (eng. *Hydrogen Atom Transfer*) - hvataju slobodne radikale, donirajući atom vodika
2. SET (eng. *Single Electron Transfer*) - prenose 1 elektron, da bi reducirali metalne ione, radikale i karbonile



Slika 4. Kemijske strukture antioksidanasa (Aytul, 2010)

Antioksidansi su odgovorni za zaštitu biljnih stanica u kojima se nalaze, za održavanje kvalitete voća, povrća i općenito biljnih materijala te imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi koji konzumiraju voće i povrće bogato antioksidansima. Postoje epidemiološki dokazi koji upućuju na povezanost prehrane bogate antioksidansima sa smanjenim rizikom od razvoja bolesti (Kaur i Kapoor 2001). Antioksidansi i enzimski sustavi uključeni u njihovu sintezu i regeneraciju, štite stanične membrane i organele od oštećenja uzrokovanih štetnim učincima reaktivnih kisikovih čestica (ROS).

ROS nastaju i tijekom normalnog staničnog metabolizma, dok se pojačano stvaraju u uvjetima stresa uslijed nepovoljnog djelovanja različitih biotičkih i abiotičkih činitelja. ROS uzrokuju oksidativna oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Stoga, antioksidansi, koji mogu neutralizirati slobodne radikale, mogu biti od velike važnosti u prevenciji tih bolesti. Flavonoidi i drugi biljni fenoli, kao što su fenolne kiseline, tanini, lignani i lignini, posebno su važni antioksidansi jer oni obično imaju visok redoks potencijal (Kahkonen i sur., 1999). Supstituenti na aromatskom prstenu utječu na stabilizaciju molekula, pa različite fenolne kiseline pokazuju različitu moć uklanjanja slobodnih radikala (Robbins, 2003). Utvrđeno je da antioksidativna sposobnost fenolnih kiselina raste s brojem hidroksilnih grupa u aromatskom prstenu, dok hidroksilne grupe u *orto*- i *para*- položaju doprinose jačoj antioksidativnoj i antiradikalnoj aktivnosti (Sroka, 2005).

Studije su pokazale da mnoge biljke imaju kemijske komponente i biološku aktivnost koja potiče određeno pozitivno fiziološko djelovanje i stoga se mogu koristiti za liječenje različitih bolesti. Najvažniji od tih bioaktivnih komponenata biljke su alkaloidi, tanini, flavonoidi i fenolni spojevi (Omale i sur., 2008). Antiradikalni antioksidanti djeluju tako što donose vodikove atome lipidnim radikalima. Radikali dobiveni iz antioksidansa s molekularnim strukturama, kao što su fenoli, stabilne su vrste i djeluju povoljno na način da će zaustaviti oksidacijsku lančanu reakciju. Za procjenu antioksidativne aktivnosti određenih spojeva ili ekstrakata, potonji reagiraju sa stabilnim radikalom, 2,2-difenil-pikrilhidrazilom (DPPH) u otopini metanola (Brand-Williams i sur., 1995).

Spektrofotometrijske metode su najčešće metode korištene za određivanje antioksidativne aktivnosti hrane, pića i drugih kompleksnih uzoraka ili individualnih komponenti. One se zasnivaju na spektrofotometrijskom praćenju promjene koncentracije nekog od reaktanata ili produkata u reakciji antioksidanasa sa slobodnim radikalima. U najčešće korištene spektrofotometrijske metode ubrajaju se DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS/TEAC (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina/*Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) i Folin–Ciocalteu (FC) metoda za određivanje ukupnih fenola, koja se svrstava u antioksidativne metode jer određuje ukupan redukcijski kapacitet uzorka (Sikorski i Kolakowska, 2011).

Trolox je antioksidans poput vitamina E, a koristi se u biološkim ili biokemijskim primjenama za smanjenje oksidacijskog stresa ili oštećenja. Antioksidacijska aktivnost najčešće se opisuje TEAC vrijednošću (Trolox ekvivalent antioksidacijske aktivnosti od eng. „*Trolox equivalent antioxidant activity*“), koja je definirana kao koncentracija otopine, izražena u mmol L^{-1} , u vodi topljivog analoga vitamina E, Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mmol L^{-1} otopina ispitivanog fenolnog spoja (Miller i Rice-Evans, 1996). Trolox ekvivalent se najčešće mjeri pomoću ABTS dekolorizacijskog testa. TEAC test koristi se za mjerenje antioksidativnih kapaciteta hrane, pića i dodataka. FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je test antioksidativnih svojstava koji koristi Trolox kao standard.

2.5 EKSTRAKCIJA „ZELENIM OTAPALIMA“

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Ona je obično prvi korak u izolaciji polifenolnih spojeva iz

biljnih materijala (Dai i Mumper, 2010). Za odabir otapala bitne su sljedeće karakteristike: visoka selektivnost tj. da dobro otapa ključne komponente, a da ne otapa druge sastojke, nemješljivost primarnog i sekundarnog otapala, jednostavna regeneracija, velika razlika gustoća, siguran rad, nereaktivnost s biljnim sastavnicama, nemogućnost nagrizanja materijala strojeva, neškodljivost za ljudsko zdravlje, dostupnost i niske cijene.

Zelena ekstrakcija temelji se na principu ekstrakcije koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih biljnih materijala, osigurati siguran i kvalitetan proizvod te zbrinuti otpad industrije (Chemat i sur., 2012). Konvencionalni načini ekstrakcije koriste hlapljiva organska otapala u vrlo velikim količinama koja isparavaju u Zemljinu atmosferu i stvaraju „efekt staklenika“, troše puno energije zbog procesa koji su vremenski dugotrajni i često se provode pri visokoj temperaturi te ne ostvaruju potpuno iskorištenje procesa (Chemat i sur., 2012). Većina organskih otapala su hlapljivi spojevi zbog čega imaju veliku prednost u industrijskim procesima, no s druge strane hlapljivost pridonosi i povećanju rizika od vatre ili eksplozija, a njihovo ispuštanje u atmosferu uzorkuje nastanak smoga, ozonskih rupa i globalnog zatopljenja. Nadalje, mnoga konvencionalna hlapljiva otapala su toksična za ljude, biljke i životinje. Procjenjuje se da otapala koja se koriste tijekom ovakvih procesa ekstrakcije čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih hlapljivih organskih emisija tvari u cijelom svijetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2014), stoga je danas velika pažnja usmjerena na nove vrste otapala, kao što su ionske kapljevine i eutektične tekućine koje bi svojim svojstvima mogle biti dobra zamjena konvencionalnim otapalima.

Jedno od bitnijih polja zelene kemije je upravo zelena ekstrakcija, a koncept zelene kemije je prvi put spomenut na početku devedesetih godina dvadesetog stoljeća te od tada ima velik utjecaj na industriju i dobiva sve veću važnost (Chemat i sur., 2012). Karakterizira ju pomno planiranje kemijskih sinteza kako bi se smanjile potencijalno štetne posljedice korištenja. Cilj je proizvesti proizvode i procese koji su profitabilni, a svojim svojstvima ne škode ljudskom zdravlju niti okolišu. Znanstvenici Paul Anastas i John Warner su 1998. godine osmislili dvanaest načela zelene kemije koja su dizajnirana kao pomoć kemičarima za postizanje cilja održivosti (Tablica 2).

Tablica 2. 12 načela zelene kemije (Anastas i Warner, 1998)

1	Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga tretirati ili uništiti nakon što je nastao.
2	Sintetičke metode bi trebale biti osmišljene tako da se maksimalno iskoriste sve ulazne sirovine u konačnom proizvodu.
3	Kada je moguće, sintetičke metode trebale bi biti osmišljene da koriste i generiraju supstancije koje su malo ili netoksične za ljudsko zdravlje i okoliš.
4	Kemijske proizvode potrebno je osmisliti tako da im se održi djelotvornost, a smanji toksičnost.
5	Uporabu pomoćnih tvari poput otapala i separativnih tvari treba izbjegavati kad god je moguće.
6	Potrebno je poznavati učinak na okoliš te ekonomski učinak energetske zahtjeva kemijskih procesa. Energetski zahtjevi trebaju biti svedeni na minimum tako da se, kad god je moguće, provode na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom tlaku.
7	Treba koristiti obnovljive sirovine i materijale kada je to tehnički i ekonomski izvedivo.
8	Nepotrebna proširenja procesa, kao što su zaštita funkcionalnih skupina i privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa, potrebno je zaobići kada je moguće, jer takvi postupci zahtijevaju dodatne reagense i mogu generirati otpad.
9	Katalitički reagensi, selektivni koliko je moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
10	Kemijski proizvodi trebaju biti osmišljeni tako da se na kraju njihove funkcije raspadnu na neškodljive degradacijske proizvode i da ne štete okolišu.
11	Analitičke metodologije zahtijevaju daljnje razvijanje kako bi dozvolile nadgledanje procesa u stvarnom vremenu te kontrolu prije nastanka opasnih supstanci.
12	Supstance, korištene u kemijskim procesima, treba odabrati tako da se minimalizira potencijalna opasnost od kemijskih nesreći, uključujući eksplozije, požare te štetna isparavanja.

Da bi se optimalno iskoristila sirovina, otapalo i energija, ustanovljena su tri glavna rješenja za provođenje zelene ekstrakcije na laboratorijskoj i industrijskoj razini:

1. poboljšanje i optimizacija postojećih procesa;
2. upotreba nove opreme;
3. inovacije u procesima i postupcima (Chemat i sur., 2012).

Nakon što je postupak ekstrakcije postao ograničavajući korak za industrijski razvoj, inovacija je obavezna, kao i korištenje novih otapala, novih tehnika aktivacije ili nove tehnologije. Nekoliko novih tehnika, koje se primjenjuju za ekstrakciju, pomaže smanjiti vrijeme trajanja ekstrakcije, broj faza, a time i potrošnju energije. Primjer je uporaba pulsirajućih električnih polja, tretman mikrovalovima ili ultrazvukom.

Postavljeno je šest principa zelene ekstrakcije prirodnih produkata te se preporuča da ih znanstvenici i industrija gledaju kao upute u uspostavljanju inovativnih zelenih ekstrakcija (Tablica 3). Opisuju višenamjensku strategiju primjene ovog koncepta na istraživačkom i industrijskom nivou. Nova i inovativna tehnologija, intenziviranje procesa, agro-otapala i ušteda energije su osnove ovog radnog protokola. Raspravlja se o konceptu, načelima i primjerima zelene ekstrakcije te se daje značaj na tehnološki napor koji se stvara i različite aplikacije koje se razvijaju (Chemat i sur., 2012).

Tablica 3. Principi zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2012)

1	Inovacije od selekcija varijeteta obnovljivih biljnih izvora.
2	Korištenje alternativnih otapala i uglavnom vodenih ili agro-otapala.
3	Redukcija potrošnje energije kroz rekuperaciju energije i upotrebu inovativnih tehnologija.
4	Proizvodnja nusprodukta, umjesto otpada, kako bi se uključile druge industrije.
5	Smanjiti rad pogona i koristiti sigurne i kontrolirane procese.
6	Ciljati na ne-denaturirane i biorazgradive ekstrakte bez kontaminanata.

Na ekstrakciju posebno utječu ekološki i ekonomski čimbenici koji zahtijevaju drastično smanjenje potrošnje energije i proizvedenog otpada. Postoje četiri načina za smanjenje potrošnje energije: optimizacija postojećih procesa, rekuperacija energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, pomaganje postojećim procesima intenziviranjem ili potpuna inovacija procesa. Primjeri smanjene potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija su aktivacija mikrovalovima i/ili ultrazvukom, primjena alternativnih otapala, kao što su superkritični fluidi (CO₂ i voda), ionske kapljevine i eutektična otapala.

Eksploatacija polifenola kao bioaktivnih spojeva, koji su stekli iznimnu važnost zbog dobrog utjecaja na zdravlje na komercijalnim razinama, motivirala je znanstvenike da istraže ekološki prihvatljive, učinkovitije i ekonomičnije tehnike ekstrakcije bazirane na „zelenom“ ekstrakcijskom pristupu. Zadnjih dvadeset godina se sve više istražuju električna pražnjenja u vodi. Molekule u tekućini imaju mnogo veći ionizacijski potencijal što znači da je potrebno puno više energije da im se ukloni elektron. Pulsirajuće električno polje koje se koristi za nastajanje plazme dovodi do stvaranja pora u membrani stanice, tj. izaziva elektroporaciju. Kao posljedica polarizacije iona u membrani, dolazi do njezine kompresije i naposljetku pucanja membrane (Fincan i sur., 2004). Time je olakšano provođenje ekstrakcije s većim prinosom bioaktivnih komponenata, a manje oštećenim tkivom stanica.

Pošto korištenje organskih otapala za ekstrakciju predstavlja opasnost za dobrobit okoliša, brojna istraživanja upravo su posvećena otkrivanju „zelenih otapala“ za koja je dokazano da svojim raspadom na pojedine komponente ni na koji način ne štete prirodi (Anastas i Eghbali, 2010). Imaju veliku moć otapanja, biorazgrađiva su, netoksična i nezapaljiva. Njihova ograničenja vezana su za cijenu, viskoznost i temperature vrenja. Idealna zelena otapala moraju zadovoljavati sljedeće kriterije: moraju biti sigurna za zdravlje ljudi, smanjiti opasnost, lako razgrađiva te pružiti visoki prinos produkta (Chemat i sur., 2012). Vrste „zelenih otapala“ koja se najčešće koriste su: voda, etanol, superkritični fluidi, metilni esteri, terpeni, itd., a odabir pojedinog ovisi o više čimbenika, uključujući i kategoriju spojeva koje želimo izolirati.

Voda je molekula koje na planetu najviše ima u izobilju i nekad se za nju kaže da je benigno, univerzalno otapalo. Voda je sigurna i ne predstavlja nikakvu opasnost za okoliš ni za ljude. Može biti korištena kao korisno otapalo raznih procesa u području kemije. Specifične karakteristike vode dovele su do poboljšanja brzine reakcija kroz hidrofobni efekt i lakšu separaciju, pošto se velika količina organskih tvari ne otapa u vodi. Jedina mana koja bi mogla usporiti industrijsku primjenu je kontaminacija vode za koju bi se trebala utrošiti velika količina energije za njezino pročišćavanje

(Anastas i Eghbali, 2010). Primjenjuje se za ekstrakciju polarnih spojeva, kao što su proteini, ugljikohidrati i organske kiseline. Obećavajuće tehnike „zelene“ ekstrakcije vodom su ekstrakcija vrućom vodom pod visokim tlakom te upotreba superkritične vode, pogotovo zato što utječu na povećanu brzinu ekstrakcije. Vrlo značajna karakteristika je olakšana manipulacija dielektrične konstante vode, koja može varirati u širokom rasponu, što se postiže promjenom tlaka i temperature. Pri sobnoj temperaturi, voda ima dielektričnu konstantu oko 80, što je čini vrlo polarnim otapalom te su zbog toga u njoj slabo topljive organske tvari. Topljivost organskih tvari može se povećati promjenom i postavkom parametara vode na određene vrijednosti. Povišenjem temperature i tlakova snizuje se dielektrična konstanta što povećava difuziju vode. Potrebno je pripaziti na mijenjanje parametara temperature i tlakova kako se ne bi trošilo previše energije, te ostalo u okvirima „zelene kemije“ (Chemat i sur., 2012; Chemat i sur., 2016).

Etanol je najčešće „zeleno“ otapalo koje se dobiva fermentacijom biljnih materijala bogatih šećerom poput šećerne repice ili žitarica. Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, u velikoj mjeri se koristi jer je lako dostupan i visoke čistoće, jeftin je i potpuno biorazgradiv. Dobro ekstrahira polarne komponente iz prethodno pripremljenog biljnog materijala (Chemat i sur., 2012).

Superkritični fluidi također predstavljaju alternativu tradicionalnim organskim otapalima i opsežno su proučavani u proteklim desetljećima. To su tvari koje su istovremeno zagrijane i komprimirane iznad njihovih kritičnih točaka. Takva otapala su svestrana, sigurna te se njima lako rukuje što je dokazano u brojnim istraživanjima. Najčešće su superkritični fluidi generirani iz vode i ugljičnog dioksida, iako ugljični dioksid zasada ima najširu upotrebu (Anastas i Eghbali, 2010).

2.6 VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE

Poznato je da je prehrambena industrija na četvrtom mjestu u korištenju energije, odmah nakon kemijske, rudarske i papirne industrije. Mnoge kemijske i prehrambene industrije još uvijek koriste uobičajene tehnike ekstrakcije, čijom primjenom dolazi do emisije velike količine CO₂. Također, konvencionalne metode ekstrakcije spojeva iz biljnog materijala koriste velike količine organskih otapala koja su štetna za okoliš. S ciljem očuvanja okoliša, istražuju se nove metode koje su u skladu s načelima zelene kemije. To su netoplinke metode koje nastoje skratiti vrijeme ekstrakcije bioaktivnih spojeva i ne koriste organska otapala pri čemu se kao njihova zamjena koriste tzv. „zelena otapala“ u koja se ubrajaju voda i etanol. Jedna od spomenutih metoda jest i ekstrakcija

potpomognuta visokonaponskim pražnjenjem, a temelji se na fenomenu električnog izboja u otapalu/tekućini (otopini).

Sa znanstvenog stajališta sva poznata materija u svemiru dijeli se na četiri agregatna stanja: čvrsto, tekuće, plinovito i plazma stanje tvari. Temeljna razlika između krutina, tekućina i plinova je jačina veza koje drže sastavne čestice zajedno na okupu. Kemijske sile kod krutina izrazito su jake, dok su kod tekućina slabije, a kod plinova najslabije. Stanje materije ovisi o kinetičkoj energiji njenih atoma ili molekula, odnosno o ravnoteži između unutarnje toplinske energije i silama među česticama. Dovođenjem energije, odnosno zagrijavanjem krutine, tekućine ili plina, povećava se kinetička energija sastavnih čestica koje prelaze na viša energetska stanja te su u mogućnosti savladati međučestične sile. To dovodi do faznih prijelaza koji se javljaju pri konstantnoj temperaturi i određenom tlaku. Ako se osigura dovoljna količina energije, molekularni plin će postupno disocirati u atomizirani plin kao rezultat sudara između čestica, čija kinetička energija prelazi energiju molekularnih veza. Na dovoljno visokim temperaturama sve veći dio atoma posjedovat će dovoljno kinetičke energije, te tada sudari postaju toliko intenzivni pa dolazi do oslobađanja elektrona pri čemu nastaju negativno nabijeni elektroni i pozitivno nabijeni ioni, što rezultira nastankom elektromagnetskih polja, čime se dobiva energija za daljnju ionizaciju plina, odnosno nastajanje plazme. Mora se naglasiti kako u termodinamičkom smislu ovaj prijelaz nije fazni s obzirom da se javlja postupno s promjenom tj. povećanjem temperature (Bittencour, 2004). U elektrostatskom smislu plazma je kvazineutralna, što znači da je makroskopski gledano neutralna, ali su njezini dijelovi električki nabijeni (Fridman, 2008).

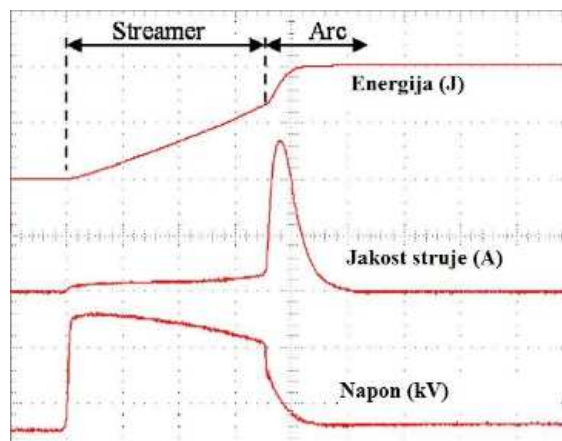
U električnim pražnjenjima karakterističnima za plazmu koja se generira u laboratorijskim uvjetima, energija iz električnog polja prvo se prenosi na elektrone, a zatim na ostale čestice rezultirajući višom temperaturom elektrona u odnosu na druge teže čestice prisutne u plazmi (temperatura elektrona je oko 10 000 K, dok je ostatak čestica plazme na sobnoj temperaturi), što dovodi do termodinamičke neravnoteže, pa takvu plazmu nazivamo neravnotežnom netermičkom plazmom, odnosno hladnom plazmom (Fridman, 2008).

Za stvaranje hladne plazme potrebno je česticama plina osigurati energiju iz vanjskog izvora. To se postiže električnim pražnjenjem plina koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije. Nastalo električno polje uzrokuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anoda), dok pozitivna jezgra biva privučena od strane negativne elektrode (katoda). Povećanjem napona, povećava se i naprezanje u atomima sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode. Boja plazme

ovisi o plinu koji se primjenjuje, a nastaje kao rezultat povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje pri čemu se emitira energija u vidljivom dijelu spektra. U laboratorijskoj primjeni najčešće korišteni plinovi su argon, dušik, helij i ugljikov dioksid (Fridman, 2008).

2.6.1 Fenomen elektroporacije

U sustavu s dvije elektrode i visoko pulsirajućim električnim izvorom, formiranje električnog pražnjenja sastoji se od dvije različite faze. Prva „streamer“ faza podrazumijeva formiranje elektrovodljivog kanala ioniziranog plina. Na prelasku iz „streamer“ faze u drugu „arc“ fazu dolazi do naglog porasta jačine struje, nakon čega sljedi električno pražnjenje, odnosno pad jačine struje pri čemu se oslobađa energija. Upravo „arc“ faza dovodi do stvaranja lokalizirane plazme. Odnos napona, struje i energije sustava prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Odnos napona, struje i energije tijekom električnog pražnjenja (Boussetta i Vorobiev, 2014)

Za vrijeme „arc“ faze također dolazi do formiranja udarnih valova visokog tlaka (90 –100 bar) koji mogu izazvati oštećenje stanica biološkog materijala, istodobno formirajući hidroksilne radikale u procesu fotodisocijacije. Nakon formiranja udarnih valova dolazi do formiranja refrakcijskih valova koji su odgovorni za nastajanje kavitacijskih mjehurića ispunjenih plinom. Urušavanjem nastalih kavitacijskih mjehurića nastaju sekundarni udari koji mogu dovesti do slabljenja i rupture staničnih

struktura. Isti fenomeni mogu dovesti do fragmentacije tretiranog materijala na makroskopskom nivou i nastajanja turbulencije u tekućini što ubrzava procese izlaska biomolekula iz stanica biološkog materijala te pospješuje prijenos mase. Stupanj oštećenja biološkog materijala može se pratiti analizom elektroprovodljivosti nastale suspenzije s obzirom da se izlaskom bioaktivnih komponenata mijenja ionski sastav (Boussetta i Vorobiev, 2014).

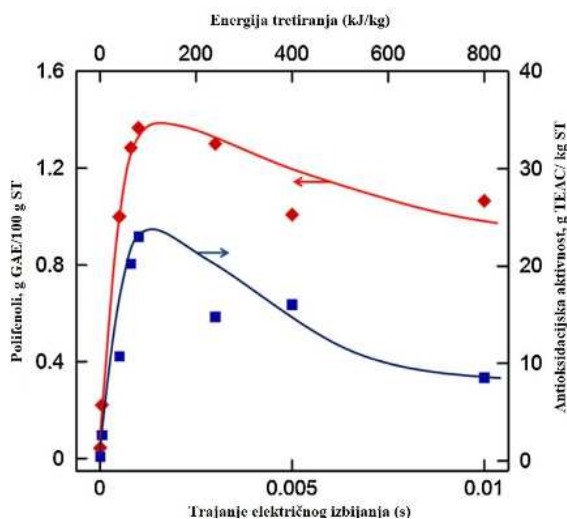
Električni izboj u vodi izaziva oštećenje strukture stanica i fragmentaciju čestica čime je omogućena bolja i brža ekstrakcija unutarstaničnih komponenti – fenomen eletroporacije (Rajha i sur., 2015). Dakle, takva pojava električnog izboja, uzrokovanog visokonaponskim električnim pražnjenjem, dovest će do tekućinske turbulencije, pojave emisije UV svjetla visokog intenziteta, stvaranja vodikovog peroksida (H_2O_2), proizvodnje udarnih valova i kavitacijskih mjehurića (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Učinkovitost hladne plazme ovisi o nekoliko čimbenika, što je prvenstveno povezano s činjenicom da različite plazme i tehnike koje se koriste za njihovu indukciju imaju različite karakteristike. Primjerice, vrsta korištenog plina za preradu uglavnom određuje prirodu i količine reaktivnih vrsta proizvedenih električnim pražnjenjem i djelotvornost postupka tretmana. Analogno, stvorene aktivne vrste podliježu frekvenciji i ulaznom naponu, tj. veće vrijednosti koreliraju s povećanjem gustoće energije (Guo i sur., 2015). Dodatna varijabla procesa koja utječe na učinkovitost tretmana hladnom plazmom je način izloženosti, izravna izloženost je poželjan pristup za poboljšanje procesa, za razliku od neizravnog ili daljinskog izlaganja; budući da potonje smanjuje količinu topline koja se prenosi na materijal, s obzirom na prirodu samopaljenja nabijenih čestica i njihovu sposobnost rekombinacije prije nego zahvati uzorak (Patil i sur., 2014).

Tehnika visokonaponskog električnog pražnjenja omogućava povećanje brzine ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala s minimalnim utroškom energije (Boussetta i sur., 2012). Ova ne-toplinska tehnika u posljednje vrijeme ima sve veću primjenu u prehrambenoj industriji te se takva električna pražnjenja mogu provoditi u tekućini ili plinu. Kao i kod konvencionalnih ekstrakcija, uspješnost korištenja visokonaponskog električnog pražnjenja za ekstrakciju bioaktivnih komponenti ovisi o odabranim uvjetima ekstrakcije (napon, temperatura, vrijeme) u skladu s materijalom koji se tretira i ciljanom komponentom koju želimo ekstrahirati.

Jedan od ključnih parametara za optimizaciju ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) je energija tretiranja uzorka. Slika 6. prikazuje rezultat znanstvenog rada Boussetta i Vorobiev (2014) koji su proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja. Iz prikazanih rezultata može se uočiti da prinos

fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost rastu do energije tretiranja od 80 kJ/kg, nakon čega dolazi do pada istih. Daljnjim povećanjem energije počinju prevladavati negativni učinci električnog pražnjenja, što za posljedicu dovodi do pada prinosa ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.



Slika 6. Utjecaj primijenjene energije pri tretmanu uzorka na ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost (Bousetta i Vorobiev, 2014)

Takva situacija se može objasniti pretpostavkom da prilikom povećanja energije HVED-a dolazi i do intenzivnijeg nastajanja visoko reaktivnih spojeva (hidroksil radikali, ozon) koji oksidiraju polifenole. Nastali hidroksil radikali reagiraju s fenolnim spojevima, pri čemu nastaju fenoksil radikali koji također mogu nastati i djelovanjem ultraljubičastog zračenja koje se stvara kod električnog pražnjenja (Chen i sur., 2004).

Utjecaj dodatka drugih otapala u vodu isto tako ima značajan efekt na učinkovitost ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem. U svom istraživanju Bousetta i suradnici (2013) pokazali su da dodatak etanola u vodu ima sinergistički učinak kod prinosa ukupnih fenola iz kolača lana. Primjenom napona od 40 kV tijekom 5 ms pri temperaturi od 20 °C, koristeći čistu vodu kao otapalo, ekstrakt tretiranog uzorka kolača lana sadržavao je 3,49 mg/g ukupnih polifenola. Dodatkom etanola volumnog udjela 25% pri jednakim uvjetima vremena tretiranja i temperature, prinos ukupnih polifenola porastao na 4,33 mg/g. U ovom slučaju može se zaključiti da je etanol pospješio ekstrakciju polifenolnih spojeva. Zanimljivo je primijetiti rezultate prinosa ukupnih fenola ekstrakcijom bez tretmana HVED-a. Tijekom 80 min, pri temperaturi od 20 °C, koristeći čistu vodu kao otapalo, ukupan prinos polifenola bio je tek 0,33 mg/g. Dodatkom etanola tijekom jednakog vremena ekstrakcije i jednake temperature, prinos ukupnih polifenola se neznatno povećao na 0,51

mg/g. U istom radu, autori (Boussetta i sur., 2013) su pratili i utjecaj povišene temperature na ukupni prinos polifenola. Mjerenja su rađena pri tri različite temperature: 20, 40 i 60 °C. Rezultati ukazuju kako porast temperature otapala nije značajno utjecao na prinos ukupnih fenola.

Jedan od ključnih čimbenika pri odabiru prikladne metode za ekstrakciju ciljane komponente uz ukupni prinos je i ukupni utrošak energije. U svom istraživanju Barba i suradnici (2015) usporedili su učinkovitost različitih metoda ekstrakcije na količinu ekstrahiranih ukupnih antocijana iz fermentirane komine grožđa, odnosno potrošnju energije u kJ po mg dobivenih ukupnih polifenola prilikom tretmana ultrazvukom, pulsirajućim električnim poljem i visokonaponskim električnim pražnjenjem te se pokazalo da je najviše ukupnih fenola ekstrahirano u području kiselog pH uz dodatak etanola i primjenom HVED-a (608 mg GAE L⁻¹). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koje su proveli Parniakov i suradnici (2014) koji su proveli ekstrakciju polifenola iz kore papaje. Što se tiče rezultata mjerenja antioksidacijske aktivnosti koja se mjerila dvjema metodama (ABTS, DPPH), najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci tretirani HVED-om uz dodatak etanola od 50% i pH otopine u lužnatom području (pH=12). Može se zaključiti da lužnato područje više odgovara spojevima koji posjeduju antioksidacijski učinak.

Metoda visokonaponskog pražnjenja (HVED) je pogodan tretman za ekstrakciju fenolnih spojeva te se promjenom parametara napona, frekvencije i vremena tretiranja, može utjecati na učinkovitost same ekstrakcije. Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem utječe na očuvanje ukupnih fenola u ekstraktu te se antioksidacijska aktivnost ekstrakata ne mijenja značajno. Obzirom da se radi o novoj tehnologiji potrebna su daljnja istraživanja antioksidacijskog učinka ekstrakata dobivenih visokonaponskim pražnjenjem, no može se reći da ima velikog potencijala budući da slijedi načela zelene kemije.

2.6.2 Reaktivni spojevi kisika i dušika

Reaktivni spojevi kisika (ROS) i reaktivni spojevi dušika (RNS) su jedne od najznačajnijih skupina slobodnih radikala. Reaktivni spojevi kisika, prikazani u Tablici 4., su ioni ili vrlo male molekule koje uključuju ione kisika, slobodne radikale i perokside te druge anorganske i organske spojeve.

Najčešći ROS su superoksid (O₂⁻), vodikov peroksid (H₂O₂), hipokloritna kiselina (HClO) i hidroksilni radikal (OH[·]), dok su najčešći RNS, prikazani u Tablici 5., dušikov monoksid (NO[·]), dušikov dioksid (NO₂[·]) i peroksinitrit (ONOO[·]). Reaktivni spojevi kisika i dušika, koji nisu slobodni

radikali, nisu u mogućnosti pokrenuti lančane reakcije koje dovode do stvaranja novih nestabilnih produkata. Lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina i oksidaciju organskih molekula mogu izazvati kisikovi radikali (Štefan i sur., 2007).

Tablica 4. Reaktivni kisikovi spojevi (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
supeoksidni, O_2	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, OH^\cdot	hipokloritna kiselina, $HClO$
peroksilni, ROO^\cdot	ozon, O_3
alkoksilni, RO^\cdot	singlet kisik, O_2
hidroperoksilni, HO_2^\cdot	

Tablica 5. Reaktivni dušikovi spojevi (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
dušikov (II) oksid, NO^\cdot	nitrozil, NO^+
dušikov (IV) oksid, NO_2^\cdot	nitratna kiselina, HNO_2
	dušikov (III) oksid, N_2O_3
	peroksinitrit, $ONOO^\cdot$
	alkilperoskinitrit, $ROONO$

2.7 BLISKOINFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA – NIR

Bliskoinfracrvena spektroskopija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem interakcija elektromagnetskog zračenja i materije. Njezina se primjena može pronaći unutar brojnih grana prirodnih znanosti, dok je posebno značajna uporaba u analitičke svrhe. Daje nam informacije o sustavu koji se promatra te građi tvari, tlaku i njezinoj temperaturi. Temeljni su elementi spektroskopije izvor zračenja, monokromator, tj. optički instrument za izdvajanje zračenja sasvim uskog područja spektra te detektor zračenja. Spektar je rezultat spektroskopskog istraživanja.

Prema fenomenu koji izaziva sprezanje elektromagnetskog zračenja, spektroskopija se dijeli na:

- ROTACIJSKU spektroskopiju
- VIBRACIJSKU spektroskopiju
- ELEKTRONSKU spektroskopiju

IR spektroskopija odnosno spektroskopija infracrvenog zračenja za sredstvo proučavanja rabi infracrveno zračenje. Bavi se proučavanjem međudjelovanja tvari i elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih brojeva od 12500 cm^{-1} do 10 cm^{-1} , odnosno valnih duljina od $0,8\text{ }\mu\text{m}$ do $1000\text{ }\mu\text{m}$. Infracrveno područje spektra regija je u spektru koja korespondira frekvenciji točno ispod frekvencije vidljivog dijela spektra, odnosno iznad najviše frekvencije mikrovalova. Zahvaljujući svojim vibracijama molekule emitiraju infracrveno zračenje. Nakon što molekula upije infracrveno zračenje, njezine se vibracije pojačaju, tj. pobude, a zatim i molekule počnu jače vibrirati (riječ je o prijelazu iz osnovnog u pobuđeno vibracijsko stanje). Upravo je zbog toga infracrvena spektroskopija jedna od vibracijskih spektroskopija (uz Ramanovu). Vibracijska se spektroskopija u infracrvenom (IR) području temelji na svojstvu molekula da apsorbiraju zračenje valnih duljina koje odgovaraju energiji potrebnoj za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razina (Metrohm, 2013.) Kovalentne veze u molekulama konstantno vibriraju i ponašaju se poput opruge. Vibracija svake pojedine molekule odvija se pod točno određenom amplitudom koja odgovara vibracijskoj energijskoj razini. U slučaju kada se energija apsorbiranog ili emitiranog fotona izjednači s razlikom dviju vibracijskih energijskih razina, tj. kada je razlika energija raspršenog i dolazećeg fotona jednaka razlici energijskih razina, događa se spektroskopski prijelaz. Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako tijekom vibracije dolazi do promjene dipolnog momenta. S obzirom da je najlakši atom vodik, podložan je najjačim vibracijama tako da glavne vrpce NIR spektra odgovaraju vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome (prvenstveno C-H, N-H, O-H i S-H) (Blanco i Villarroya, 2002).

Energetske razine molekularnih vibracija su kvantizirane, odnosno mogu poprimiti samo diskretne vrijednosti koje se nazivaju energetskim razinama. Te energetske razine označavaju se vibracijskim kvantnim brojem v koji može biti bilo koji cijeli broj, uključujući nulu. Fundamentalni vibracijski prijelazi odnose se na energetske prijelaze iz $v=0$ u $v=1$ i njihove apsorpcijske vrpce pojavljuju se u NIR spektrima.

Rezultat IR spektroskopije svakako je IR spektar koji daje prikaz ovisnosti transmitancije ili apsorbancije o valnoj duljini ili o valnom broju. Njegovo se područje dijeli na blisko, srednje (u tome se području nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve; dijeli se na područje otiska prsta i područje funkcijskih skupina karakteristično za svaki pojedini uzorak) i daleko (Tablica 6.).

Tablica 6. Podjela IR područja (Alishahi i sur., 2010)

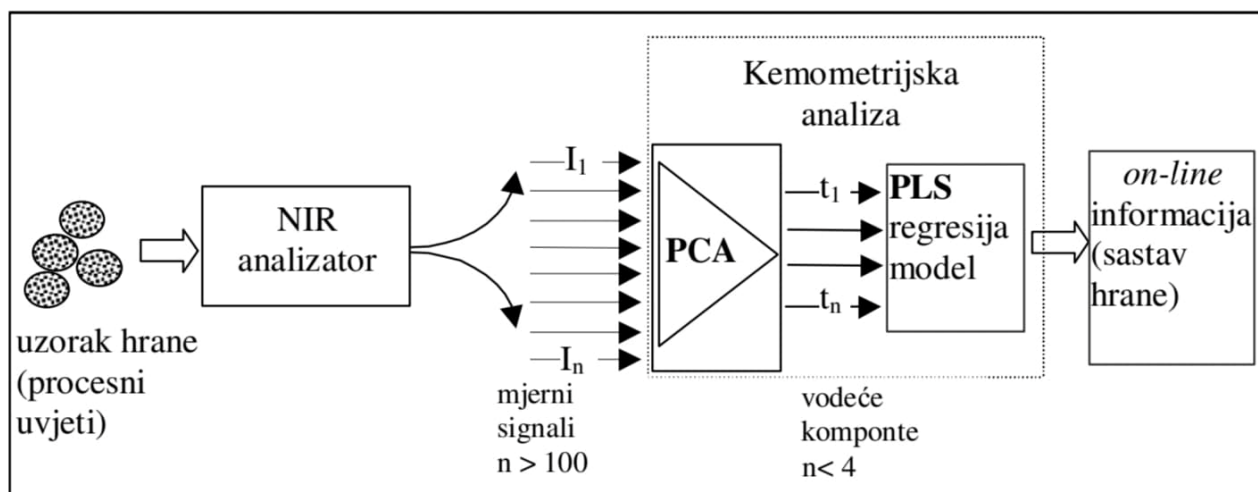
Infra crveno područje	Valna duljina λ /μm	Valni broj /cm^{-1}	Frekvencija ν / s^{-1}
blisko (NIR)	$7,8 \cdot 10^{-1} - 2,5$	12800 – 4000	$3,8 \cdot 10^{14} - 1,2 \cdot 10^{14}$
srednje	$2,5 - 5 \cdot 10^1$	4000 – 200	$1,2 \cdot 10^{14} - 6,0 \cdot 10^{12}$
daleko	$5 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^3$	200 – 10	$6,0 \cdot 10^{12} - 3,0 \cdot 10^8$

NIR (eng. *Near InfraRed*) odnosno bliska infracrvena spektroskopija, spektroskopska je metoda koja rabi infracrveno područje elektromagnetskog spektra od 780 nm do 2500 nm, što odgovara energijama fotona od $2,65 \times 10^{-19}$ do $7,96 \times 10^{-20}$ J. Ta se spektroskopija rabi za kontrolu i praćenje kemijskih i fizičkih procesa te brzu kvantitativnu i kvalitativnu analizu spojeva, kemijskih sastojaka, koji su dio procesa. U NIR području apsorpcijski spektar nastaje preklapanjem osnovnih apsorpcijskih vrpca, tako da je mjerni signal nepravilna krivulja bez pojedinih oštro izraženih apsorpcija.

Riječ je o neinvazivnoj metodi, koja za cilj ima na brz i jednostavan način prikupiti podatke o spektru mjenenog uzorka, a u to je uključena i primjena niza kemometrijskih alata u obradi podataka samoga spektra. Zahvaljujući niskim troškovima pri radu, kao i nezahtjevnoj i relativno brznoj i jednostavnoj pripremi uzorka, uživa sve veću popularnost unutar područja djelovanja prehrambene industrije. Nerazorna je tehnika. Ekološki je prihvatljiva, a i spremna za on-line primjenu. Još jedna od njezinih prednosti svakako je mogućnost analize različitih vrsta uzoraka, od krutih uzoraka, preko tekućina do raznih pasta. NIR spektre karakterizira velik omjer signala i šumova, a zbog slabe apsorpcije vode i stakla mogu se koristiti za snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala (Jednačak i Novak, 2013).

Glavna prednost NIR-a je u tome što najčešće nije nužna priprema uzoraka, dakle analiza je vrlo brza (15-90 s) i vrlo jednostavna. Jedna od pogodnosti NIR tehnologije je u tome da omogućuje istovremeno mjerenje nekoliko sastavnih tvari. Osim toga, za svaku temeljnu vibraciju postoji odgovarajući niz overtona i kombinacija veza te za svaku sljedeću vezu overtona manjeg je intenziteta od prethodne. Ovo pruža ugrađeno razrjeđivanje serije koja omogućuje više izbora apsorpcija od različitih intenziteta koje sadrže iste kemijske informacije. Konačno, relativno slaba apsorpcija zbog visoke vlage onemogućuje analizu hrane (Ozaki i sur., 2006).

„Moć“ NIR spektroskopije otkrio je Herschel davne 1800. godine, međutim njezin značaj nisu prepoznali baš svi, pa se kao jedna od analitičkih metoda učestalo počinje koristiti tek 1950-ih kada ju poljoprivredni sektor prvi uvrštava u domenu svoga djelovanja. Njezina šira primjena započinje desetak godina kasnije, 1960-ih i 1970-ih, kada se njome tretiraju uzorci sjemenki žitarica. Začetak njezine šire primjene može se zahvaliti 1962. godini, K. H. Norrisu i njegovom radu u Beltsville laboratoriju Odjela za poljoprivredu Sjedinjenih Američkih Država gdje je izučavao razne sjemenke žitarica, uljarica i njihov sadržaj vlage. Dvadesetak godina kasnije, tretirajući ih tom metodom, ispitala su se brojna obilježja hrane, od sadržaja vlage u uzorku, do koncentracije vode, udjela masti, proteina i sl. Već je tada bilo jasno da postoji mogućnost njezine sve veće primjene u industriji, dok je razvoj moderne računalne znanosti samo pospješio potonje. Utjecaj joj raste i danas, o čemu nam najbolje svjedoče brojni radovi čiji je cilj istražiti koliko je ta metoda uistinu prikladna za uporabu s obzirom da njezina on-line izvedba i nije toliko praktična. Princip rada je takav da se infracrveno zračenje iz izvora prenosi optičkim vlaknom do sustava leća te se usmjerava prema uzorku gdje dolazi do njegove djelomične apsorpcije. Propušteno zračenje se zatim pomoću optičkog vlakna prenosi natrag do detektora. Safirni prozori i obloga od kemijski inertnog metala štite sondu od vanjskih utjecaja tijekom mjerenja *in situ*. NIR spektri odlikuju se vrlo visokim omjerom signala i šuma, a intenzitet i položaj pojedinih vrpca može se vrlo točno odrediti, što je posebno važno za kvantitativnu analizu. Zbog slabe apsorpcije vode i stakla, moguće je snimanje spektara vodenih otopina uzoraka u staklenim tikvicama ili reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala (Jednačak, 2013).



Slika 7. Tok obrade mjernog signala NIR instrumentom za on-line upravljanje (Miller i Miller, 2000)

Uz silne prednosti, koje NIR spektroskopija nudi, sa sobom nosi i pokoju negativnu stranu. Počevši od vrpce u NIR spektrima vrlo se lako da uočiti da su te vrpce manje informativne od vrpca koje se, primjerice, pojavljuju u MIR području (infracrvena spektroskopija u srednjem infracrvenom području). NIR spektri su specifični po tome što obuhvaćaju kombinacijske vrpce i vrpce viših tonova (*overtona*). Do viših tonova dolazi kada molekula apsorbira zračenje koje dovodi do prijelaza iz $v=0$ u $v=2$ (prvi viši ton), $v=0$ u $v=3$ (drugi viši ton) itd.

Cijeli NIR spektar sastoji se od četiri viša tona, a jačina apsorpcijskih vrpce smanjuje se sa svakim višim tonom (Agelet i Hurburgh Jr., 2010). Područje viših tonova nalazi se između valnih duljina 780 i 2000 nm (Metrohm, 2013). Na višim valnim duljinama (1900-2500 nm) nalazi se područje kombinacijskih vrpce. Kombinacijske vrpce nastaju u poliatomnim molekulama kada energija jednog fotona dovodi do istovremenog povećanja vibracijskog kvantnog broja dvije ili više veza (Blanco i Villarroya, 2002). Upravo na temelju navedenoga glavno ograničenje snimljenih spektara svakako je pojava čestog preklapanja gore spomenutih, što ovu metodu čini manje preciznom, a samim tim i sekundarnom metodom, pa u konačnici podatci bivaju obrađeni multivarijantnim metodama analize, odnosno uključena je i primjena kemometrije. Kemometrija je pojam koji se odnosi na upotrebu matematike, statistike i računala u kemijskoj analizi (Agelet i Hurburgh Jr., 2010). Tok obrade mjernog signala NIR instrumentom za online upravljanje prikazan je na Slici 7. Nadalje, on-line mjerenja u industrijskim uvjetima predstavljaju izazov, jer se pritom javlja značajan utjecaj mnoštva vanjskih faktora, poput promjene temperature, zato se rijetko opisuju u znanstvenim publikacijama, jer su nužna daljnja ispitivanja na području njezine točnosti, kao i pouzdanosti.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

- Osušeni i usitnjeni listovi majčine dušice (SUBAN d.o.o., Perkovčeva 4, Samobor, Hrvatska)
- Osušeni i usitnjeni listovi ružmarina ružmarina (SUBAN d.o.o., Perkovčeva 4, Samobor, Hrvatska)

3.1.2. Reagensi

- otapalo: destilirana voda i etanol (etanol 96%-tni, Gram-Mol, Zagreb) : voda
- Folin-Ciocalteuov reagens (FC reagens) (Kemika, Zagreb)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
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 odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- standard galne kiseline (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)
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.
- 100 %-tni metanol (J.T. Baker, Nizozemska)
- 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)
Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (Sigma-Aldrich, SAD))
Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100

%-tnim metanolom u odmjernej tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.

- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl (CARLO ERBA Reagents, a Dasit Group S.p.A, Italija)

Priprema: 330 μ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjernej tikvici od 100 ml destiliranom vodom te nadopuni do oznake.

- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6

Priprema: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T. Baker, Nizozemska) u odmjernej tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 20 mM otopina željezovog(III)-klorida, FeCl₃

Priprema: 0,0541 g FeCl₃ X 6 H₂O otopi u 10 ml destilirane vode, otopina se priprema svježa.

- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)

Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernej tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja.

- Standard željezo (II)-sulfat septahidrat (FeSO₄×7H₂O) (Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD)

Priprema: Potrebno je pripremiti 1 mM otopinu željezo (II)-sulfata septahidrata (FeSO₄×7H₂O). 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.

- Standard troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (0,02 M) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, USA)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu troloxa u koncentraciji 0,02 mol L⁻¹. 500 mg troloxa se odvaži u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100%-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernej tikvici od 100 mL. Otopinu troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

- FRAP reagens

Priprema: Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl₃ (omjer 10:1:1).

3.1.3. Aparatura i pribor

- odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 1 L
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- vodena kupelj
- staklene kivete
- spektrofotometar (Spectrophotometer Secomam Uviline 9400, Secomam, Ales, Francuska)
- tehnička vaga (Axis, Spolka z o.o., Gdansk, Poland)
- analitička vaga (Sartorius GMBH Gottingen, Germany)
- mikropipete, volumena 100 µL i 1000 µL
- staklene čaše volumena 50 mL, 250 mL i 500 mL
- termometar
- menzura, volumena 100 mL, 250 mL i 1 L
- staklene epruvete
- plastična lađica za vaganje
- stalak za epruvete
- generator hladne plazme (IMP-SSPG-1200)
- Büchnerov lijevak
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR- 128-1.7-USB/6.25/50µm
- štoperica
- falkonice od 50 mL

3.2. METODE RADA

Prije početka, bitno je napomenuti da je provedeno premilinaro istraživanje s više različitih parametara kako bismo odabrali optimalne uvjete tretiranja. Masa ispitivanih uzoraka bila je od 1 g, 3 g, 5 g, 10 g i 20 g na 50 mL otapala. Vrijeme tretiranja bilo je 3, 6 i 9 minuta, a frekvencija 50, 100 i 150 Hz. Na kraju preliminarnog istraživanja odabrali smo optimalne uvjete s kojima krećemo dalje u eksperiment, a to su 1g uzorka na 50 ml otapala, 3 i 9 minuta tretmana te frekvencija od 100 Hz.

3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom visokonaponskog pražnjenja

U ovom se istraživanju ekstrakcija provodi u generatoru IMP-SSPG- 1200 (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska), koji generira hladnu atmosfersku plazmu u uzorku na način da dolazi do ionizacije plina (argon ili dušik). Korišteni plazma generator prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Plazma generator

Tehnički parametri plazma generatora IMP-SSPG-1200:

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

- ambijentalna temperatura 5 °C – 40 °C , ambijentalna vlažnost 10 % – 90 %
- forsirano zračno hlađenje



Slika 9. Visokonaponsko električno pražnjenje u otopini

Prije ekstrakcije uzorak je potrebno pripremiti. Izvaži se 1 g osušenog i usitnjenog te se pomiješa s 50 mL odgovarajućeg otapala (voda i etanol:voda). Ekstrakcija pripremljenog uzorka potpomognuta je tretmanom visokonaponskog električnog pražnjenja (Slika 9.) gdje se generira hladna atmosferska plazma u uzorku, određeno vrijeme pri odgovarajućim uvjetima napona i frekvencije. Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Buchnerovog lijevka te prikuplja u falcon epruvete za daljnju analizu.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Maseni udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima određen je Folin-Ciocalteuovom metodom koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji fenolnih spojeva sa smjesom fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline tj. s Folin-Ciocalteuovim (FC) reagensom. Uslijed reakcije Folin-Ciocalteuova reagensa s fenoksidnim ionom iz uzorka (ekstrakta) dolazi do stvaranja plavo obojene otopine volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se na valnoj duljini od 765 nm (Agbor i sur., 2014).

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji dušika ili argona.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteuova reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

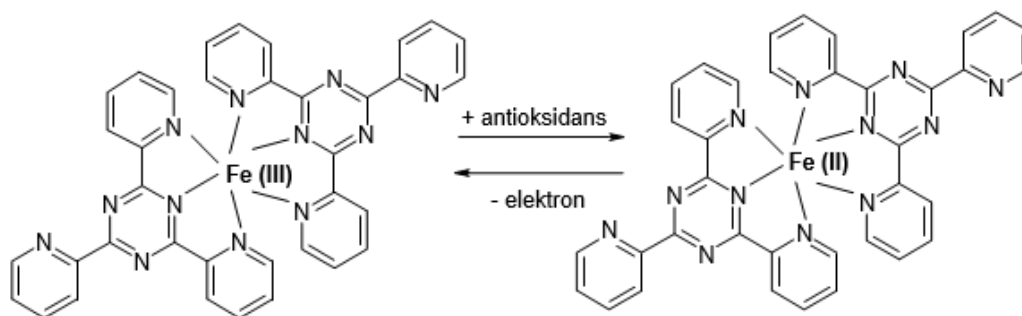
Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteuova reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti – FRAP metoda

FRAP metoda često se koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti biljnih polifenola. U osnovi, FRAP analiza tretira antioksidanse u uzorku kao reducense u redoks kolorimetrijskoj reakciji (Prasad i sur., 2010).

Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt (Slika 10.). Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.



Slika 10. FRAP metoda, redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) s antioksidansom (Benzie i Strain, 1996)

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji dušika ili argona.

Postupak određivanja:

Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancija pri 593 nm. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe ekvivalenta (FE)}/\text{mL}$ uzorka.

Opis metode:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka (prethodno adekvatno razrijeđenog) i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

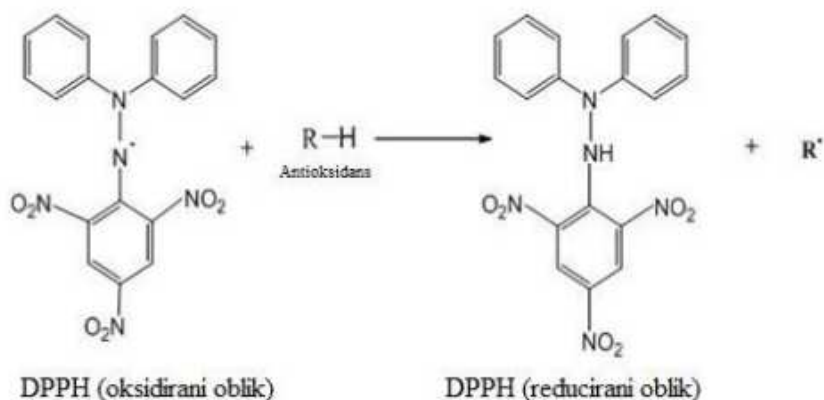
Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 500 mL 1mM otopine željezo (II)-sulfata septahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 0, 25, 100, 250, 500 i 750 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0; 0,25; 1; 2,5; 5 i 7,5 mL alikvot otopine željezo (II)-sulfata 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 promiješa na vortex uređaju, te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C u kupelji od rotavapora. 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 pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom (Benzie i Strain, 1996).

3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti - DPPH metoda

Ukupna antioksidativna aktivnost određena je metodom po Brand-Williamsu iz ekstrakata navedenih biljaka. Prati se reakcija između stabilnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH•) i uzorka u kojem se mjeri antioksidacijska aktivnost. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Sparivanjem nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa stvara se reducirani oblik DPPH-H te dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu (Slika 11.). Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).



Slika 11. Redukcija DPPH • antioksidansom (Casanovas i sur., 2015)

Priprema uzoraka:

Netretirani uzorci pripremljeni su stajanjem u otapalu, bez visokonaponskog pražnjenja, a tretirani uzorci su podvrgnuti djelovanju visokonaponskog pražnjenja u struji dušika ili argona.

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakata te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbanije kontrole potrebno je oduzeti apsorbaniju uzorka. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100 % metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0, ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaže 0,5 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu u odmjerne tikvici od 100 mL te nadopuni metanolom do oznake. Od 0,02 M otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 μ M na način da se redom otpipetira 0.125, 0.25, 0.5 i 1 mL u odmjerne tikvice od 100 mL te se iste do oznake nadopune 100%-tnim metanolom.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL otopine standarda te 1,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 0,75 mL 100%-tnog metanola te 1,5 mL 0,2 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 pomoću programa Microsoft Office Excela s vrijednostima koncentracije Troloxa (μ M) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka na temelju izmjerenih apsorbancija određenih DPPH metodom (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

3.2.5. NIR analiza

Za NIR spektroskopiju koristio se NIR spektrometar Control Development inc., NIR- 128-1.7-USB/6.25/50 μ m s instaliranim Control Development softverom Spec32 kao neinvazivna tehnika u bliskom infracrvenom području od 904 nm do 1699 nm, u kojem se reflektira zračenje ekstrakta.

Prije snimanja, uzorci ekstrakata se pipetiraju u kivetu, koja se zatim postavlja u držač koji je povezan s dva optička kabela, od kojih je jedan povezan s izvorom svjetlosti, a drugi s računalom. Držač se zatim poklopi poklopcem kako bi se osiguralo pravilno osvjjetljenje i spriječio utjecaj okolnog svjetla. Nakon toga se uključi izvor svjetlosti te na računalo pokrene program za snimanje apsorpcijskog spektra – Spec 32. Spektri uzorka snimaju se tri puta zaredom i spremaju u

odgovarajuću odabranu datoteku. Od tri se spektra prikazuje jedan spektar koji predstavlja srednju vrijednost mjerenja.

3.2.6. Analiza glavnih komponenata (PCA – *Principal Component Analysis*)

Karl Pearson je 1901. godine izumio PCA analizu koja se tada u mehanici koristila kao analog osnovnog teorema o osi. U 1930-ima analiza je dorađena i zahvaljujući Haroldu Hotellingu dobila naziv PCA (*Principal Component Analysis*). Danas, analiza glavnih komponenti je metoda koja se rabi u kemometriji, posebnoj grani analitičke kemije, koja se bavi primjenom statističkih ili matematičkih metoda u svrhu obrade analitičko-kemijskih podataka bez postavljenog fizičkog modela. Često se PCA analiza koristi u obradi NIR spektara u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka. Budući da NIR spektri daju veliku količinu informacija o jednom uzorku, glavna svrha PCA analize je prepoznavanje najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara kako bi se smanjila količina podataka (Abdi i Williams, 2010).

Princip PCA analize bazira se na grupiranju seta podataka u određene manje odjeljke, koji najbolje opisuju njihovu povezanost, omogućavajući na taj način brzu i pouzdanu interpretaciju rezultata, a da pritom zadrži većinu informacija iz prvotnog velikog skupa. Dobiveni se podatci prikazuju kao točke u n-dimenzijском prostoru, u kojem svaki vektor predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak, 2013), odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini. Uvođenjem glavnih komponenti (eng. PC, *Principal Components*), koje predstavljaju linearne kombinacije određenog broja varijabli, smanjuje se dimenzionalnost. PCA je statistička procedura, koja rabi ortogonalnu transformaciju kako bi skup promatranja koreliranih varijabli pretvorila u skup vrijednosti linearno nekoreliranih varijabli. Prva glavna komponenta (PCA 1) je linearna kombinacija podataka koji imaju najveću varijancu i kojoj pripada najveći dio varijacije uzoraka, nakon čega slijede redom PCA 2, PCA 3, PCA 4 itd., od kojih svaka sljedeća obuhvaća sve manji iznos varijacija u setu podataka koji se analiziraju. Glavne komponente su međusobno ortogonalne i orijentirane tako da predstavljaju sljedeću najveću varijaciju u podacima (Metrohm, 2013).

Dobiveni koordinatni sustav, koji je sastavljen od vektora PCA 1 i PCA 2, sadrži točke koje su projicirane iz izvornog n-dimenzijского prostora, a koordinate tih točaka se nazivaju faktorskim bodovima (eng. *scoreplots*). Spektri su, čije se vrijednosti faktorskih bodova razlikuju, odvojeni, dok

se vrijednosti za slične spektre nalaze vrlo blizu, a upravo je to razlog njihova grupiranja (Jednačak i Novak, 2013).

3.2.7. Regresija glavnih komponenata (PCR - *Principal Component Regression*)

Regresija glavnih komponenti (PCR) je danas vrlo često korištena metoda multivarijantne statističke analize koja svoju primarnu ulogu ima u smanjenju broja dimenzija u linearnoj regresiji. Također, metoda pretvara skup koreliranih varijabli u manji broj novih nekoreliranih (Mishra i Vanli, 2015), a provodi se u tri glavna koraka:

1. pokretanje PCA (Analiza glavnih komponenti) u tablici varijabli
2. pokretanje regresije najmanjih kvadrata (OLS regresija) koja se naziva i linearna regresija na odabranim komponentama
3. računanje parametara modela koji odgovaraju ulaznim varijablama

Analiza glavnih komponenti (PCA) se koristi u regresiji glavnih komponenti (PCR) u svrhu uvođenja neovisnih (x) varijabli u ortogonalnu osnovu glavne komponente te kako bi se odabrao podskup tih komponenti kao varijabli za predviđanje. Pritom PCR omogućuje transformaciju X tablice s n opažanjima opisanih varijabli u tablicu s n opažanja opisanih q komponenti, gdje je q niža ili jednaka p i takva da je ($S'S$) invertibilna. Dodatna selekcija se može primijeniti na komponente tako da se za stupanj regresije OLS-a čuvaju samo r komponente koje su najviše u korelaciji s Y varijablom. Kao rezultat regresije glavnih komponenti dobiju se grafički prikazi korelacija i opažanja te biploti.

Budući da PCA (*Principal Component Analysis*) služi kao temelj za PCR (*Principal Component Regression*), velika prednost PCR regresije u odnosu na klasičnu regresiju su grafički prikazi koji opisuju strukturu analiziranih podataka, a upravo zahvaljujući korelacijskim vezama među varijablama lako je proučiti njihov odnos. To mogu biti odnosi između eksplanatornih varijabli, kao i između eksplanatornih i zavisnih varijabli. Grafički prikazi korelacija i opažanja daju informacije o blizini uzorka i strukturi skupa analiziranih podataka, dok biplot prikuplja sve te podatke te ih prikazuje u jednom zajedničkom grafikonu.

Sa statističke točke gledišta, PCR se može koristiti kao način rješavanja multikolinearnosti i smanjivanja varijance procjene na račun dodatne pristranosti. Dok sa stajališta računanja, PCR

potencijalno postiže redukciju velikog broja varijabli do skromnog modela, što može biti korisno za modeliranje i za predviđanje budućih opažanja, s obzirom da se u PCR metodi dobiveni rezultati glavnih komponenti koriste kao regresijske varijable za izgradnju predikcijskog modela. I PCR i PCA su korisne tehnike za smanjenje dimenzionalnosti pri modeliranju i posebno su korisne kada su nezavisne varijable visoko kolinearne.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od ciljeva ovog znanstveno-istraživačkog rada bio je utvrditi učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih komponenti i eteričnih ulja iz autohtonog mediteranskog bilja ružmarina i majčine dušice te odrediti optimalne uvjete ekstrakcije biljnog materijala visokonaponskim pražnjenjem uz upotrebu vode i „zelenih otapala“. Od otapala se koristila voda, 25%-tna vodena otopina etanola i 50%-tna vodena otopina etanola.

Fenolni spojevi su u biljnoj hrani važni zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja vezanog za sposobnost hvatanja slobodnih radikala te općenito pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Zbog navedenih prednosti poželjno ih je izdvojiti u što većim količinama uz što manju degradaciju. Fenolni spojevi spadaju u polarne spojeve pa su zbog toga navedena otapala odlična za njihovu izolaciju, princip „slično se otapa u sličnom“.

Kod netretiranih uzoraka prvi broj u oznaci uzorka označava vrijeme ekstrakcije (3 i 9 minuta). Sljedeći broj prikazuje udio etanola u vodenoj otopini koja je korištena kao otapalo pri ekstrakciji. Zadnji broj označava masu uzorka u gramima. Slovo „N“ označava netretirani uzorak, slovo „M“ majčinu dušicu, a slovo „R“ ružmarin. Na primjer, u oznaci 3NM25/1, 3 označava 3 minute tretmana, NM je kratica za netretiranu majčinu dušicu, 25 znači da je korištena 25%-tna otopina etanola, a 1 označava 1 g usitnjene biljke. Kod tretiranih uzoraka prvo slovo označava biljku, a drugo slovo plin koji se koristio tijekom tretmana (N za dušik i A za argon), dok brojke označavaju parametre tretiranja koji su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Parametri ekstrakcije u struji dušika i argona

UZORAK	VRIJEME TRETIRANJA (min)	NAPON (kV)	UDIO ETANOLA (%)
MN1, RN1	3	20	50
MN2, RN2	9	20	0
MN3, RN3	3	20	0
MN4, RN4	3	25	0
MN5, RN5	9	25	25
MN6, RN6	9	20	25
MN7, RN7	9	20	50
MN8, RN8	9	25	50
MN9, RN9	3	25	25
MN10, RN10	9	25	0
MN11, RN11	3	25	50
MN12, RN12	3	20	25
MA1, RA1	3	15	50
MA2, RA2	9	15	0
MA3, RA3	3	15	0
MA4, RA4	3	20	0
MA5, RA5	9	20	25
MA6, RA6	9	15	25
MA7, RA7	9	15	50
MA8, RA8	9	20	50
MA9, RA9	3	20	25
MA10, RA10	9	20	0
MA11, RA11	3	20	50
MA12, RA12	3	15	25

4.1. REZULTATI MJERENJA UKUPNIH FENOLA

U tablicama u nastavku prikazani su rezultati mjerenja ukupnih fenola za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice i ružmarina izraženi u mg GAE (ekvivalent galne kiseline) g⁻¹ uzorka.

Tablica 8. Sadržaj ukupnih fenola u netretiranim i tretiranim uzorcima majčine dušice izražen u mg GAE g⁻¹

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka
3NM0/1	11,08	MA1	35,56	MN1	36,08
3NM25/1	19,56	MA2	29,21	MN2	19,30
3NM50/1	7,78	MA3	20,86	MN3	13,82
9NM0/1	22,43	MA4	27,47	MN4	18,95
9NM25/1	26,47	MA5	32,43	MN5	37,03
9NM50/1	16,87	MA6	26,95	MN6	34,86
-	-	MA7	33,90	MN7	42,86
-	-	MA8	30,95	MN8	42,69
-	-	MA9	40,34	MN9	37,12
-	-	MA10	36,08	MN10	21,56
-	-	MA11	22,17	MN11	32,60
-	-	MA12	21,03	MN12	30,34

Tablica 9. Rezultati ekstrakcije netretiranih i tretiranih uzoraka ružmarina izraženi u mg GAE g⁻¹

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka		mg GAE g ⁻¹ uzorka
3NR0/1	9,50	RA1	17,73	RN1	21,64
3NR25/1	7,58	RA2	10,86	RN2	30,86
3NR50/1	8,26	RA3	11,64	RN3	10,25
9NR0/1	10,41	RA4	7,21	RN4	16,17
9NR25/1	7,76	RA5	26,34	RN5	21,21
9NR50/1	9,78	RA6	22,86	RN6	19,47
-	-	RA7	19,03	RN7	16,86
-	-	RA8	21,12	RN8	31,64
-	-	RA9	22,34	RN9	18,77
-	-	RA10	16,77	RN10	19,56
-	-	RA11	14,86	RN11	22,17
-	-	RA12	17,21	RN12	8,95

Najčešće upotrebljavana tehnika pripreme ekstrakata biljnog materijala je ekstrakcija različitim vrstama otapala upravo zbog njezine efikasnosti i široke primjenjivosti. Udjeli ekstrahiranih polifenolnih spojeva ovise o fizikalno kemijskim karakteristikama ekstrahiranog uzorka te o polarnosti korištenog ekstrakcijskog otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije (Bors i sur., 1990).

Udio ukupnih fenola u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima majčine dušice prikazan je u Tablici 8. i izražen kao mg GAE g⁻¹ biljke. Najveći udio ukupnih fenola u tretiranim uzorcima iznosi 42,96 mg GAE g⁻¹ uzorka, određen u ekstraktu majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 50%-tnoj otopini etanola, tretiran u struji dušika (N7), a najmanji udio, 13,82 mg GAE g⁻¹ uzorka, što je 3,11 puta manje u odnosu na uzorak majčine dušice s najvećim udjelom fenola, određen kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 20 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) te je uzorak također tretiran u struji dušika (N3). Kod uzoraka majčine dušice tretirane u struji argona, najveći udio ukupnih fenola je nešto niži i iznosi 40,34 mg GAE g⁻¹ uzorka, a postignut je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 20 kV, u 25%-tnoj otopini etanola (A9), dok

najmanji udio ukupnih fenola iznosi 20,86 mg GAE g⁻¹ uzorka i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 15 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (A3). Primjećujemo da se fenolni spojevi u uzorcima majčine dušice bolje otapaju u otopini etanola, u usporedbi s vodom, te da duže vrijeme ekstrakcije i veći napon također utječu na povećanje količine ukupnih fenola u ekstraktu.

Netretirani uzorci majčine dušice imaju niži udio ukupnih fenola pa je tako najniža vrijednost zabilježena u uzorku majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, u 50%-tnoj otopini etanola i iznosi 7,78 mg GAE g⁻¹ uzorka (3NM 50/1), dok je najviša vrijednost ukupnih fenola, 26,47 GAE g⁻¹ uzorka, primijećena u uzorku majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije 9 minuta, u 25%-tnoj otopini etanola (9NM 25/1).

Mata i suradnici (2007) ispitivali su ukupne udjele fenola u vodenom ekstraktu majčine dušice. Ekstrakti su pripremljeni kuhanjem 5 g uzorka tijekom 20 min u 100 mL destilirane vode, nakon čega je slijedila filtracija. Udio ukupnih fenola određen je spektrometrijski s Folin-Ciocalteu reagensom i izražen kao mg pirogalola, a iznosio je 74,9 ± 3,3 mg pirogalol g⁻¹ ekstrakta.

U Tablici 9. prikazan je udio ukupnih fenola u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima ružmarina, izražen kao mg GAE g⁻¹ biljke. Najveći udio ukupnih fenola u tretiranim uzorcima iznosi 31,64 mg GAE g⁻¹ uzorka i određen je u ekstraktu ružmarina kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 25 kV, u 50%-tnoj otopini etanola, tretiran u struji dušika (N8), a najmanji udio ukupnih fenola u tretiranim uzorcima iznosi 7,21 mg GAE g⁻¹ uzorka, što je 4,39 puta manje u odnosu na uzorak ružmarina s najvećim udjelom fenola, i određen je kod uzorka tretiranog u struji argona pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 3 min, 20 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (A4). Kod uzoraka ružmarina tretiranog u struji argona, najveći udio ukupnih fenola je nešto niži i iznosi 26,34 mg GAE g⁻¹ uzorka, a postignut je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 15 kV, u 25%-tnoj otopini etanola (A6), dok najmanji udio ukupnih fenola u uzorku ružmarina tretiranog u struji dušika iznosi 8,95 mg GAE g⁻¹ uzorka i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 20 kV, u 25%-tnoj otopini etanola (N12). Fenolni spojevi u uzorcima ružmarina bolje otapaju u otopini etanola, u usporedbi s vodom, kao i kod majčine dušice te duže vrijeme ekstrakcije i veći napon također utječu na povećanje količine ukupnih fenola u ekstraktu. Netretirani uzorci ružmarina imaju niži udio ukupnih fenola pa je tako najniža vrijednost zabilježena u uzorku ružmarina kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, u 25%-tnoj otopini etanola i iznosi 7,58 mg GAE g⁻¹ uzorka (3NR25/1), dok je najviša vrijednost ukupnih fenola primijećena u uzorku ružmarina kod uvjeta ekstrakcije 9 minuta, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (9NR0/1).

Različiti ekstrakcijski uvjeti utječu na koncentraciju fenolnih spojeva u gotovom ekstraktu (Albu i sur., 2004; Wada i sur., 2004). Dorman i suradnici (2003) odredili su koncentraciju polifenolnih spojeva u osušenim listovima ružmarina od 185 mg EGK g⁻¹. U radu Tsai i suradnika (2007), u vodenom ekstraktu ružmarina određen je udjel ukupnih polifenola od 98,7 mg EGK g⁻¹, dok su Yosr i sur. (2013) odredili udio ukupnih polifenola od 37,4 mg EGK g⁻¹ u ekstraktu lišća ružmarina pripremljenom prelijevanjenjem s vodenom acetonskom mješavinom.

Boussetta i suradnici (2013) pokazali su da dodatak etanola u vodu ima sinergistički učinak kod prinosa ukupnih fenola iz kolača lana. Kao otapalo su koristili čistu vodu te su primijenili napon od 40 kV u trajanju od 5 ms pri temperaturi od 20°C. Takav ekstrakt tretiranog uzorka kolača lana imao je 3,49 mg g⁻¹ ukupnih polifenola. Nakon što su dodali etanol volumnog udjela 25% pri jednakim uvjetima vremena tretiranja i temperature, prinos ukupnih polifenola porastao je na 4,33 mg g⁻¹, iz čega se može primijetiti da je etanol pospješio ekstrakciju fenolnih spojeva.

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

4.2.1. FRAP metoda

U sljedećim tablicama prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću FRAP metode za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice i ružmarina izraženi u μmol FE (ekvivalent Fe²⁺) g⁻¹ uzorka.

Tablica 10. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice izraženi u $\mu\text{mol FE g}^{-1}$.

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka
3NM0/1	271,93	MA1	376,93	MN1	390,50
3NM25/1	480,50	MA2	354,79	MN2	491,93
3NM50/1	170,50	MA3	433,36	MN3	390,50
9NM0/1	352,64	MA4	293,36	MN4	150,50
9NM25/1	317,64	MA5	531,93	MN5	540,50
9NM50/1	303,36	MA6	474,79	MN6	526,21
-	-	MA7	404,07	MN7	422,64
-	-	MA8	329,79	MN8	517,64
-	-	MA9	551,93	MN9	497,64
-	-	MA10	92,64	MN10	229,07
-	-	MA11	494,79	MN11	508,36
-	-	MA12	446,21	MN12	476,93

Tablica 11. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom za netretirane i tretirane uzorke ružmarina izraženi u $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka
3NR0/1	104,79	RA1	237,64	RN1	312,64
3NR25/1	101,21	RA2	184,79	RN2	179,79
3NR50/1	169,07	RA3	122,64	RN3	203,36
9NR0/1	114,07	RA4	311,21	RN4	139,79
9NR25/1	123,36	RA5	319,07	RN5	295,50
9NR50/1	44,07	RA6	263,36	RN6	334,07
-	-	RA7	169,79	RN7	226,93
-	-	RA8	486,93	RN8	224,07
-	-	RA9	234,07	RN9	256,93
-	-	RA10	279,79	RN10	562,64
-	-	RA11	176,93	RN11	186,21
-	-	RA12	227,64	RN12	209,79

Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata bogatih polifenolnim spojevima povezan je s njihovom sposobnosti doniranja vodika ili elektrona i hvatanja slobodnih radikala (Stoilova i sur., 2007).

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima majčine dušice prikazani su u Tablici 10. i izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ ekvivalenta (FE)/g uzorka pri različitim uvjetima ekstrakcije u struji dušika i argona. Majčina dušica (92,64 – 551,93 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka) pokazuje različite antioksidacijske kapacitete pri različitim uvjetima ekstrakcije. Najveći antioksidacijski kapacitet iznosi 551,93 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka i određen je u ekstraktu majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 20 kV, u 25%-tnoj otopini etanola, tretiran u struji argona (A9), a najmanji antioksidacijski kapacitet u tretiranim uzorcima dobiven je također u ekstraktu majčine dušice koji je tretiran u struji argona, kod uvjeta ekstrakcije u

trajanju od 9 min, 20 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (A10) i iznosi 92,64 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, što je 5,96 puta manje u odnosu na uzorak majčine dušice s najvećom antioksidacijskom aktivnosti određenom FRAP metodom. Kod uzoraka majčine dušice tretirane u struji dušika, najveći antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iznosi 540,50 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka te je određen kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 25 kV, u 25%-tnoj otopini etanola (N5), dok najmanji antioksidacijski kapacitet iznosi 150,50 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 25 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (N4). Kod netretiranih uzoraka majčine dušice najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom zabilježena je u uzorku majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minute, u 50%-tnoj otopini etanola i iznosi 170,50 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka (3NM 50/1), dok je najviša vrijednost, 352,64 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, primijećena u uzorku majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije 9 minuta, u otopini vode (0%-tna otopina etanola (9NM 0/1).

U Tablici 11. prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima ružmarina, izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ ekvivalenta (FE)/g uzorka pri različitim uvjetima ekstrakcije u struji dušika i argona. Ružmarin pokazuje različite antioksidacijske kapacitete pri različitim uvjetima ekstrakcije. Najveći antioksidacijski kapacitet iznosi 562,64 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka i određen je u ekstraktu ružmarina kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 25 kV, u otopini vode (0%-tna otopini etanola), tretiran u struji dušika (N10), a najmanji antioksidacijski kapacitet u tretiranim uzorcima iznosi 122,64 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, što je 4,59 puta manje u odnosu na uzorak ružmarina s najvećom antioksidacijskom aktivnosti određenom FRAP metodom, i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 15 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola), tretiran u struji argona (A3). Kod uzoraka ružmarina tretiranog u struji argona, najveći antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iznosi 486,93 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, te je određen kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 50%-tnoj otopini etanola (A8), dok najmanji antioksidacijski kapacitet uzorka ružmarina tretiranog u struji dušika iznosi 139,79 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka i dobiven je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 min, 25 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (N4). U ovom slučaju, kod određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta ružmarina FRAP metodom, najveća antioksidacijska aktivnost ipak se postiže kod otopine vode, za razliku od majčine dušice gdje se najveća antioksidacijska aktivnost postigla u otopini etanola. Također, kod ekstrakta ružmarina najveća antioksidacijska aktivnost postiže se u uzorku koji je tretiran u struji dušika, dok je kod majčine dušice najviša vrijednost zabilježena kod uzorka koji je tretiran u struji argona. Kod netretiranih uzoraka ružmarina vidimo nešto niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Najmanja vrijednost zabilježena je u uzorku

ružmarina kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 minuta, u 50%-tnoj otopini etanola i iznosi 44,07 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka (9NR 50/1), što je čak 12,77 puta manje u odnosu na tretirani uzorak ružmarina s najvećom antioksidacijskom aktivnosti određenom FRAP metodom, dok je najviša vrijednost, 169,07 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, primijećena u uzorku ružmarina kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minuta, u 50%-tnoj otopini etanola (3NR 50/1).

Antioksidacijski kapacitet ekstrakta ružmarina odredili su Yosr i suradnici (2013) FRAP metodom, koristeći lišće ružmarina te aceton kao otapalo, a on je iznosio 48,0 mmol FE g^{-1} uzorka.

4.2.2. DPPH metoda

U tablicama u nastavku prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice i ružmarina izražene u $\mu\text{mol TAE}$ (Trolox ekvivalent) g^{-1} uzorka.

Tablica 12. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice izraženi u $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka
3NM0/1	30,49	MA1	30,28	MN1	29,85
3NM25/1	29,71	MA2	28,64	MN2	29,31
3NM50/1	32,03	MA3	28,71	MN3	28,53
6NM0/1	30,74	MA4	29,06	MN4	28,31
9NM0/1	29,46	MA5	28,21	MN5	27,81
9NM25/1	30,53	MA6	28,39	MN6	27,14
-	-	MA7	32,92	MN7	29,78
-	-	MA8	30,53	MN8	29,67
-	-	MA9	29,81	MN9	28,24
-	-	MA10	29,85	MN10	28,46
-	-	MA11	30,92	MN11	30,24
-	-	MA12	30,10	MN12	28,78

Tablica 13. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice izraženi u $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka.

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka		$\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka
3NR0/1	28,31	RA1	31,28	RN1	30,92
3NR25/1	30,89	RA2	25,85	RN2	25,89
3NR50/1	30,92	RA3	29,81	RN3	28,53
9NR0/1	27,17	RA4	30,28	RN4	28,28
9NR25/1	29,64	RA5	28,78	RN5	30,78
9NR50/1	30,92	RA6	27,96	RN6	26,67
-	-	RA7	31,28	RN7	32,92
-	-	RA8	31,31	RN8	31,60
-	-	RA9	28,64	RN9	32,03
-	-	RA10	27,24	RN10	29,03
-	-	RA11	31,24	RN11	30,71
-	-	RA12	29,14	RN12	29,85

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima majčine dušice prikazani su u Tablici 12. i izraženi u $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ biljke. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u uzorku majčine dušice iznosi 32,92 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ i određen je u ekstraktu majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 15 kV, u 50%-tnoj otopini etanola, tretiran u struji argona (A7), dok je maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti tretirane majčine dušice u struji dušika nešto niža i iznosi 30,24 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 3 min, 25 kV, u 50%-tnoj otopini etanola (N11). Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti tretirane majčine dušice određene DPPH metodom iznosi 27,14 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka, što je 1,22 puta manje u odnosu na uzorak majčine dušice s najvećom antioksidacijskom aktivnosti određenom DPPH metodom, te je određena pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 25%-tnoj otopini etanola, a uzorak je tretiran u struji dušika (N6). Minimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakta majčine dušice tretirane

u struji argona iznosi 28,21 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 25%-tnoj otopini etanola (A5). Kod netretiranih uzoraka majčine dušice najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom zabilježena je u uzorku majčine dušice kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 minuta, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) i iznosi 29,46 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka (9NM 0/1). Prema ovoj metodi ne može se zaključiti da je prethodni tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem, tzv. hladnom plazmom, olakšao ekstrakciju i doveo do viših vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Štoviše, rezultati pokazuju suprotno, no razlike su vrlo male pa je teško donijeti točan zaključak. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod netretiranih biljnih ekstrakata majčine dušice iznosi 32,03 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka, određena kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 3 minuta, u 50%-tnoj otopini etanola (3NM 50/1); no većina netretiranih biljnih ekstrakata pri određenim uvjetima ekstrakcije pokazuju vrijednosti antioksidacijske aktivnosti iznad 30 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka.

U Tablici 13. prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u netretiranim i tretiranim biljnim ekstraktima ružmarina, izraženi u $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ biljke. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u uzorku ružmarina iznosi 32,92 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ i određen je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 50%-tnoj otopini etanola, tretiran u struji dušika (N7), dok je maksimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti tretiranog ružmarina u struji argona malo niža i iznosi 31,31 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u 50%-tnoj otopini etanola (A8). Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti tretiranog ružmarina određene DPPH metodom iznosi 25,85 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka, što je 1,27 puta manje u odnosu na uzorak ružmarina s najvećom antioksidacijskom aktivnosti određenom DPPH metodom, te je određena pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 9 min, 15 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola), a uzorak je tretiran u struji argona (A2). Minimalna vrijednost antioksidacijske aktivnosti ekstrakta ružmarina tretiranog u struji dušika slična je kao i minimalna vrijednost kod ekstrakta tretiranog u struji argona i iznosi 25,89 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka pri uvjetima ekstrakcije u trajanju od 9 min, 20 kV, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) (N2). Primjećujemo da antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom u uzorcima ružmarina raste ako su uzorci ekstrahirani u otopini etanola, u ovom slučaju najbolje vrijednosti daje otopina s najvećim postotkom etanola, dakle 50%-tna otopina etanola, u usporedbi s vodom koja daje najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Duže vrijeme ekstrakcije (9 minuta) i veći napon također utječu na povećanje antioksidacijske aktivnosti u gotovom ekstraktu. Kod netretiranih uzoraka ružmarina najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom zabilježena je kod uvjeta ekstrakcije u trajanju od 9 minuta, u otopini vode (0%-tna otopina etanola) i iznosi 27,17 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka (9NM 0/1). Ovi isti uvjeti, ekstrakcija u trajanju od 9 minuta i 0%-tna otopina etanola, rezultiraju najnižom

antioksidacijskom aktivnosti određenom DPPH metodom i kod netretiranih ekstrakata majčine dušice. Ne može se zaključiti da je prethodni tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem olakšao ekstrakciju i doveo do viših vrijednosti antioksidacijske aktivnosti jer su rezultati netretiranih i tretiranih uzoraka veoma slični. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti kod netretiranog ekstrakta ružmarina iznosi 30,92 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka, a određena je kod dvaju uvjeta ekstrakcije: ekstrakcije u trajanju od 3 minuta, u 50%-tnoj otopini etanola (3NM 50/1) i ekstrakcije u trajanju od 9 minuta, u 50%-tnoj otopini etanola.

4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U Tablici 14. prikazan je utjecaj trajanja tretmana, napona i udjela EtOH u vodi na ekstrakciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet dobiven FRAP i DPPH metodama. p-vrijednost $<0,05$ pokazuje značajan utjecaj određenog parametra na količinu ekstrahiranih fenola, odnosno antioksidacijski kapacitet.

Tablica 14. p-vrijednosti pojedinih parametara tretiranja kod ekstrakcije fenola iz majčine dušice/ružmarina u struji argona/dušika

Parametar	MAJČINA DUŠICA						RUŽMARIN					
	Argon			Dušik			Argon			Dušik		
	UF	FRAP	DPPH	UF	FRAP	DPPH	UF	FRAP	DPPH	UF	FRAP	DPPH
<i>TRAJANJE TRETMANA</i>	0,4052	0,0815	0,9329	0,0608	0,0027	0,4223	0,1297	0,4464	0,0187	0,2758	0,3834	0,4793
<i>NAPON</i>	0,4080	0,2561	0,8705	0,2570	0,0041	0,7462	0,4652	0,2870	0,1887	0,5235	0,7106	0,1943
<i>% EtOH U VODI</i>	0,8689	0,0290	0,1575	0,0108	0,0006	0,0667	0,0734	0,8712	0,0095	0,6406	0,9151	0,0920

Rezultati analize varijance parametara tretmana hladnom plazmom pokazali su da značajan utjecaj ima udio etanola u vodi i to kod tretmana majčine dušice u struji argona za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom te u struji dušika za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom. Također udio etanola u otapalu ima značajan utjecaj kod tretmana ružmarina u struji argona za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom. Izbor otapala ključan je parametar ekstrakcije i prvenstveno ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. S obzirom da su polifenoli uglavnom polarni spojevi, zbog prisutstva OH grupe na

aromatskom prstenu, jako polarna otapala (npr. voda) i nepolarna otapala (npr. etil acetat, kloroform i heksan) nisu pogodna za njihovu ekstrakciju. Ako se koristi voda kao otapalo, može se dobiti ekstrakt s visokim sadržajem nečistoća (npr. organskih kiselina, šećera, topivih proteina) koji mogu utjecati na identifikaciju i kvantifikaciju ukupnih fenola. Osim toga, voda ima veću viskoznost od ostalih otapala što utječe na prijenos mase. S druge strane, čisti alkohol kao otapalo smanjuje učinak ekstrakcije. Korištenjem smjese vode s drugim organskim otapalima čini umjereno polarni medij, niže viskoznosti čime se mogu osigurati optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Rafiee i sur., 2011). Nadalje, upotrebom vode u kombinaciji s alkoholom dolazi do povećanog bubrenja biljnog materijala što omogućuje jače prodiranje otapala, povećava se kontaktna površina između uzorka i otapala što poboljšava učinak ekstrakcije (Rafiee i sur., 2011). U takvom sustavu, voda je odgovorna za bubrenje biljnog materijala, a etanol za raspad veza između tvari koju se želi ekstrahirati (polifenoli) i biljnog materijala (Şahin i Şamlı, 2013).

Sljedeći bitan parametar je vrijeme trajanja tretmana visokonaponskog električnog pražnjenja, a statistički značaj utjecaj pokazuje kod uzorka majčine dušice u struji dušika za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom te kod ružmarina tretiranog u struji argona za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom. Vremensko trajanje tretmana ima utjecaj na količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva kao i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Posljedice električnih izboja hladne plazme su nastanak različitih radikala i „energetskih elektrona“ te fizikalne promjene kao što su emisija UV svjetla, nastanak udarnih valova i kavitacije koji imaju degenerativan učinak na fenolne spojeve. Tretman hladnom plazmom potpomaže oslobađanju fenolnih spojeva koji su vezani na staničnu membranu, nakon čega se oni nalaze u slobodnom obliku i postaju skloniji degradaciji izazvanoj reaktivnim vrstama koje nastaju djelovanjem tretmana visokonaponskog pražnjenja. Stoga je bitno odrediti optimalno trajanje tretmana koje će dovesti do ekstrakcije veće količine fenolnih spojeva, no i do njihove velike antioksidacijske aktivnosti. Cilj je ekstrahirati fenolne komponente koje sadrže visok antioksidacijski kapacitet kako bi se ostvarila njihova uloga.

Posljednji promatran parametar koji utječe na ekstrakciju potpomognutu tretmanom hladne plazme je napon koji je pokazao značajan utjecaj kod tretiranja majčine dušice u struji dušika za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom. Veći napon izaziva jače strujne udare i električne izboje koji mogu pospješiti elektroporaciju i izlazak bioaktivnih tvari iz biljnih stanica. Može se pretpostaviti da je količina ekstrahiranih fenolnih spojeva veća kod primjene viših napona, no treba imati na umu kako nastali reaktivni spojevi tijekom tretmana višim naponom ne bi smanjili antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata, pa je stoga bitno optimirati i taj parametar za uspješnu ekstrakciju.

4.4. PRINOS EKSTRAKCIJE

Tablica 15. Rezultati prinosa ekstrakcije (%) netretiranih i tretiranih uzoraka majčine dušice

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)
3NM0/1	1,11	MA1	3,56	MN1	3,61
3NM25/1	1,96	MA2	2,92	MN2	1,93
3NM50/1	0,78	MA3	2,09	MN3	1,38
9NM0/1	2,24	MA4	2,75	MN4	1,89
9NM25/1	2,65	MA5	3,34	MN5	3,70
9NM50/1	1,69	MA6	2,69	MN6	3,49
-	-	MA7	3,39	MN7	4,29
-	-	MA8	3,09	MN8	4,27
-	-	MA9	4,03	MN9	3,71
-	-	MA10	3,61	MN10	2,16
-	-	MA11	2,22	MN11	3,26
-	-	MA12	2,10	MN12	3,03

Prema prikazanim rezultatima u Tablici 15. najveći prinos određen u ekstraktima majčine dušice koji su bili tretirani strujom dušika, ističu se rezultati MN7 (4,29%) i MN8 (4,27%) što su tretmani u trajanju od 9 minuta, otapalo je 50%-tni etanol, te naponi od 20 i 25 kV. Kod tretmana u struji argona najveći prinos pokazao se u uzorku MA9 (4,03%) što je tretman u trajanju od 3 minute, koristio se 25%-tni etanol i napon od 20 kV. Najviša vrijednost prinosa ekstrakcije kod netretiranih uzoraka je 2.65 % određena u uzorku majčine dušice gdje je ekstrakcija trajala 9 minuta, u otopini 25% etanola. Ako pogledamo ostale visoke vrijednosti prinosa ekstrakcije i parametre tretiranja tog određenog uzorka, može se zaključiti da veći prinos ekstrakcije određuje najčešće vremensko trajanje tretmana hladnom plazmom i udio etanola u otapalu, pošto su uzorci s visokim i srednje visokim prinosom ekstrakcije imali duže vrijeme tretiranja ili veći udio etanola u otapalu.

Tablica 16. Rezultati prinosa ekstrakcije (%) netretiranih i tretiranih uzoraka ružmarina

netretirani uzorci		tretirani uzorci			
	prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)		prinos ekstrakcije (%)
3NR0/1	0,95	RA1	1,77	RN1	2,16
3NR25/1	0,76	RA2	1,09	RN2	3,09
3NR50/1	0,83	RA3	1,16	RN3	1,03
9NR0/1	1,04	RA4	0,72	RN4	1,62
9NR25/1	0,78	RA5	2,63	RN5	2,12
9NR50/1	0,98	RA6	2,29	RN6	1,95
-	-	RA7	1,90	RN7	1,69
-	-	RA8	2,11	RN8	3,16
-	-	RA9	2,23	RN9	1,88
-	-	RA10	1,68	RN10	1,96
-	-	RA11	1,49	RN11	2,22
-	-	RA12	1,72	RN12	0,89

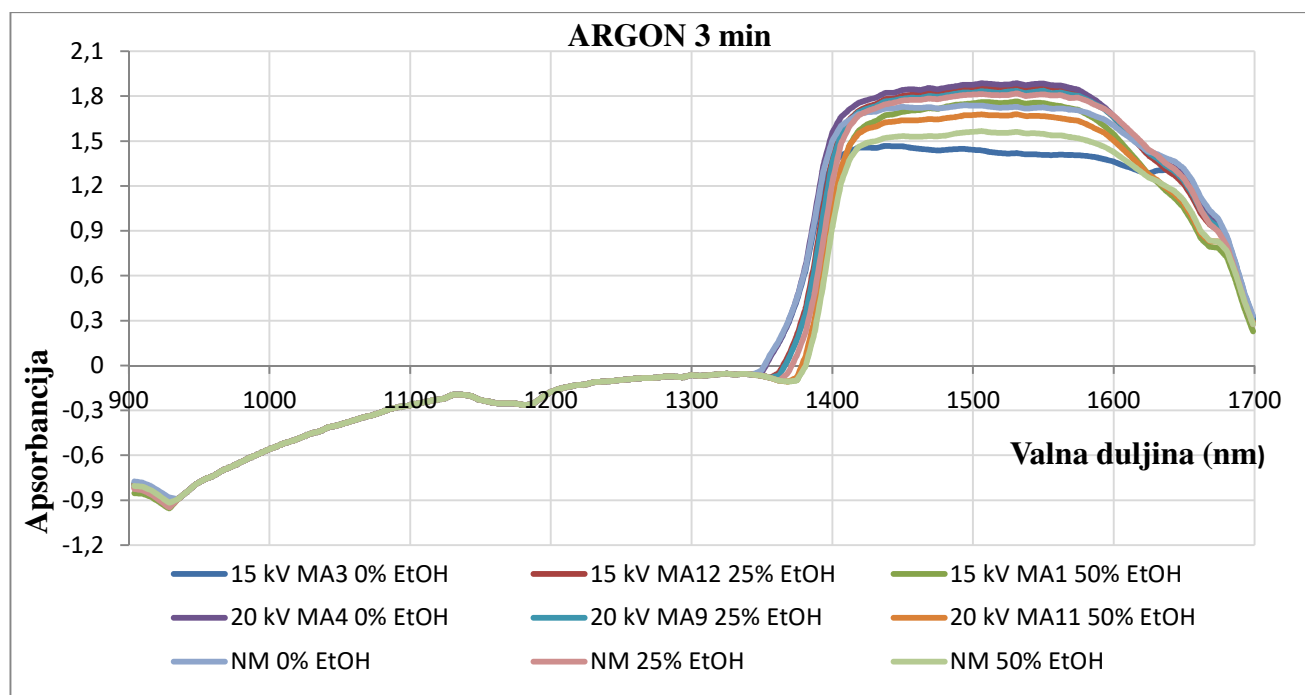
U Tablici 16. može se vidjeti da je najviši prinos ekstrakcije zabilježen u uzorku ružmarina u struji dušika RN8 (3,16 %) tretiranom 9 minuta, u 50%-tnom etanolu i naponu od 25 kV te u uzorku ružmarina RN2 u struji dušika (3,09 %) tretiranom 9 minuta, u vodi i pri 20 kV. Može se vidjeti kako je prinos ekstrakciji veći kod tretmana s dušikom, a isto tako veći je prinos ekstrakcije tretiranih uzoraka u usporedbi s netretiranima. Na prinos ekstrakcije utječu svi parametri: plin, vrijeme trajanja tretmana, korištena otopina te napon.

4.5. NIR ANALIZA – BLISKO INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

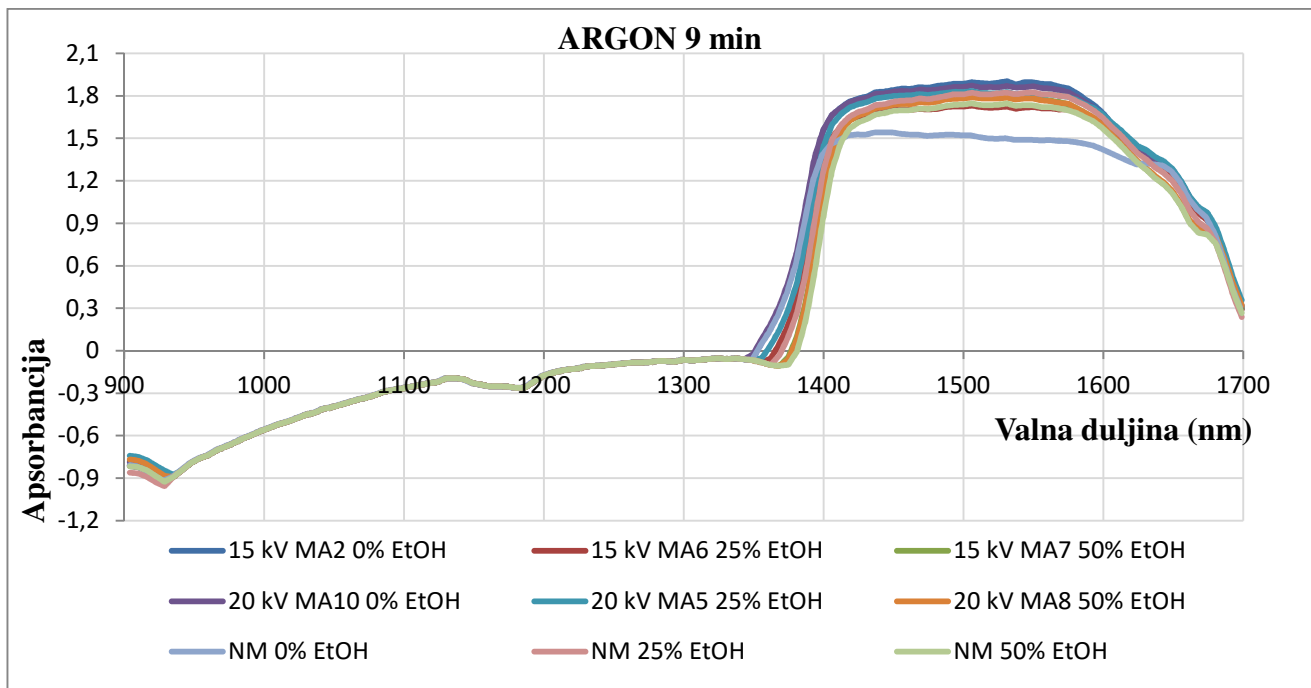
U ovom istraživanju korištena je NIR spektroskopija za otkrivanje bioaktivnih spojeva u području valnih duljina od 904 nm do 1699 nm u ekstraktima ružmarina i majčine dušice. U tom rasponu uzorak apsorbira svjetlost na frekvencijama koje odgovaraju karakterističnim vibracijama, uključujući one koje su dobivene iz detektiranih C-H, O-H, N-H, C=O i ostalih funkcionalnih skupina (Belščak-Cvitanović i sur., 2017).

Na Slikama 12. i 13. prikazani su NIR spektri majčine dušice nakon tretmana argonom, odnosno dušikom u trajanju od 3 i 9 minuta.

A)



B)



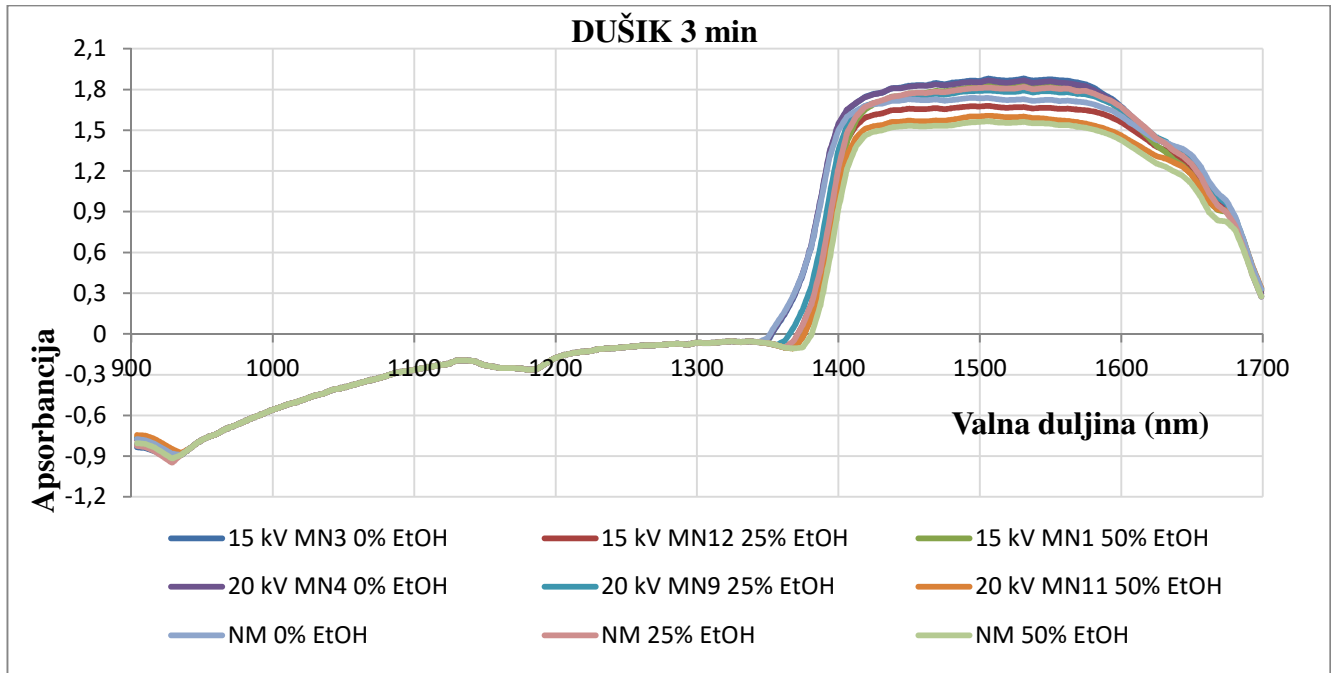
Slika 12. NIR spektri uzoraka majčine dušice tretiranih u struji argona 3 minute (A) i 9 minuta (B) pri 15 kV i 20 kV te uzoraka majčine dušice koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu

Slika 12. prikazuje „sirove“ NIR spektre uzoraka majčine dušice tretiranih u struji argona pri različitim uvjetima HVED tretmana te uzoraka majčine dušice koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu nego konvencionalnoj metodi ekstrakcije.

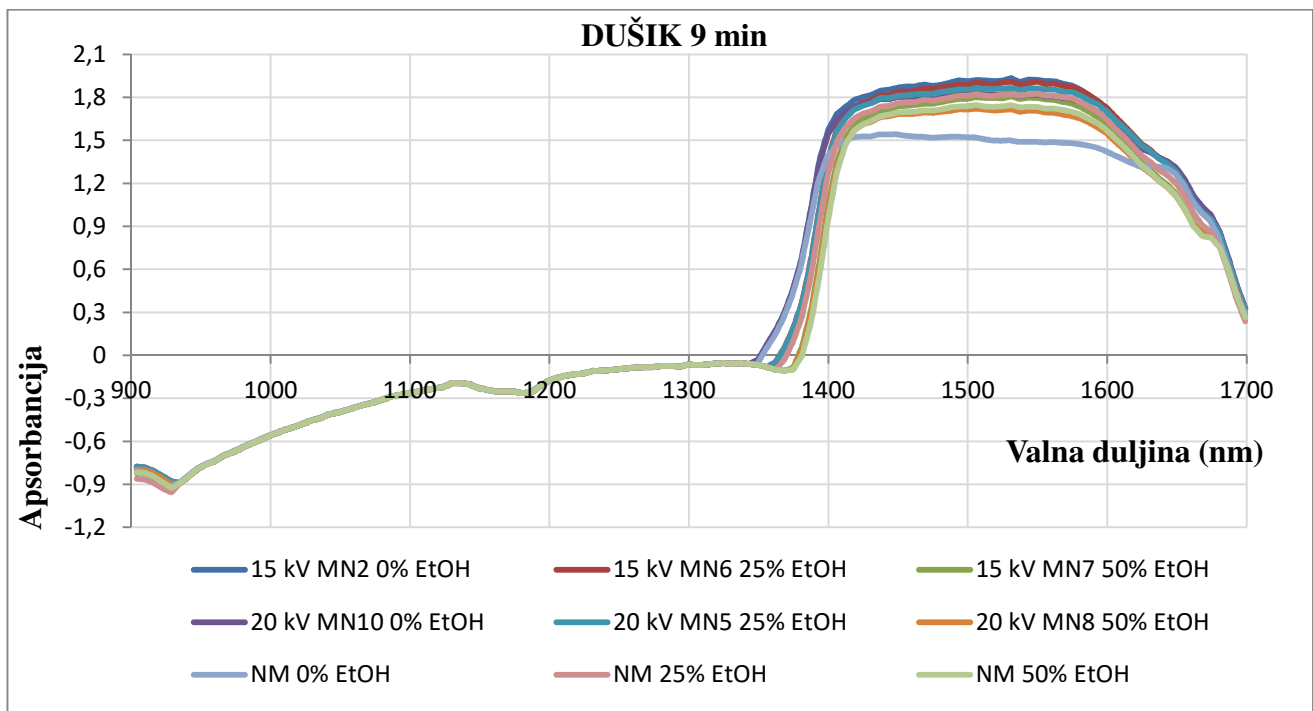
Područje između 1365 nm i 1680 nm unutar NIR regije, na grafičkom prikazu A, obuhvaća vrlo izražene vrpce koje su nastale kao posljedica kombinacija C-H vrpce. Unutar područja od 900 nm do 1360 nm vidljivo je preklapanje vrpce. Kako se udaljenost povećava, odnosno porastom valnih duljina, i razlika je među vrpce sve veća. Voda na ovom grafičkom prikazu dominira spektrom, što se uočava zahvaljujući spektru koji pokriva signale rastezljivosti za molekule vode, odnosno overtone O-H unutar područja od 1365 do 1465 nm.

Na grafičkom prikazu B, vidljivo je da dolazi do preklapanja gotovo svih vrpca, tj. spektara ispitanih uzoraka. Vrh, proizašao iz prvog overtona ArCH istezanja, vidljiv je na valnoj duljini od 1672 nm. U području koje obuhvaća valne duljine od 1376 nm do 1566 nm vidljive su izraženije vrpce. One su prikazane kao posljedica kombinacije vrpce C-H₃, C-H₂ i C-H.

A)



B)

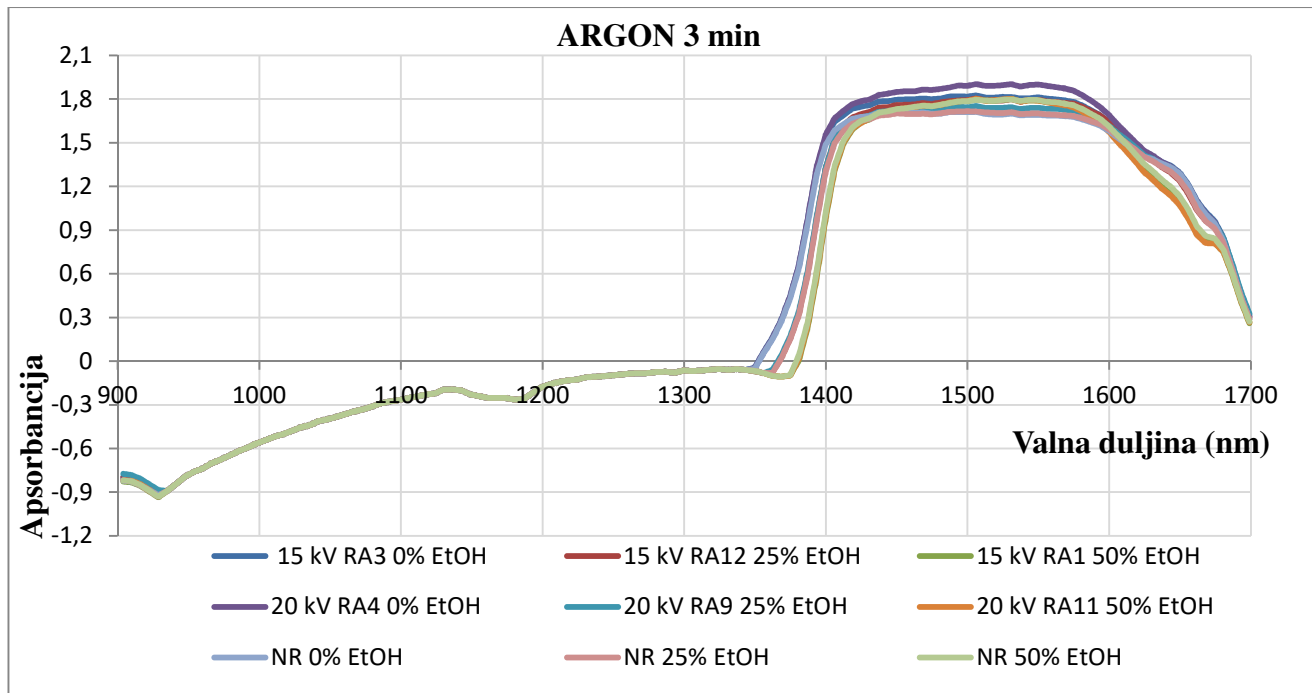


Slika 13. NIR spektri uzoraka majčine dušice tretiranih u struji dušika 3 minute (A) i 9 minuta (B) pri 20 kV i 25 kV te uzoraka majčine dušice koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu

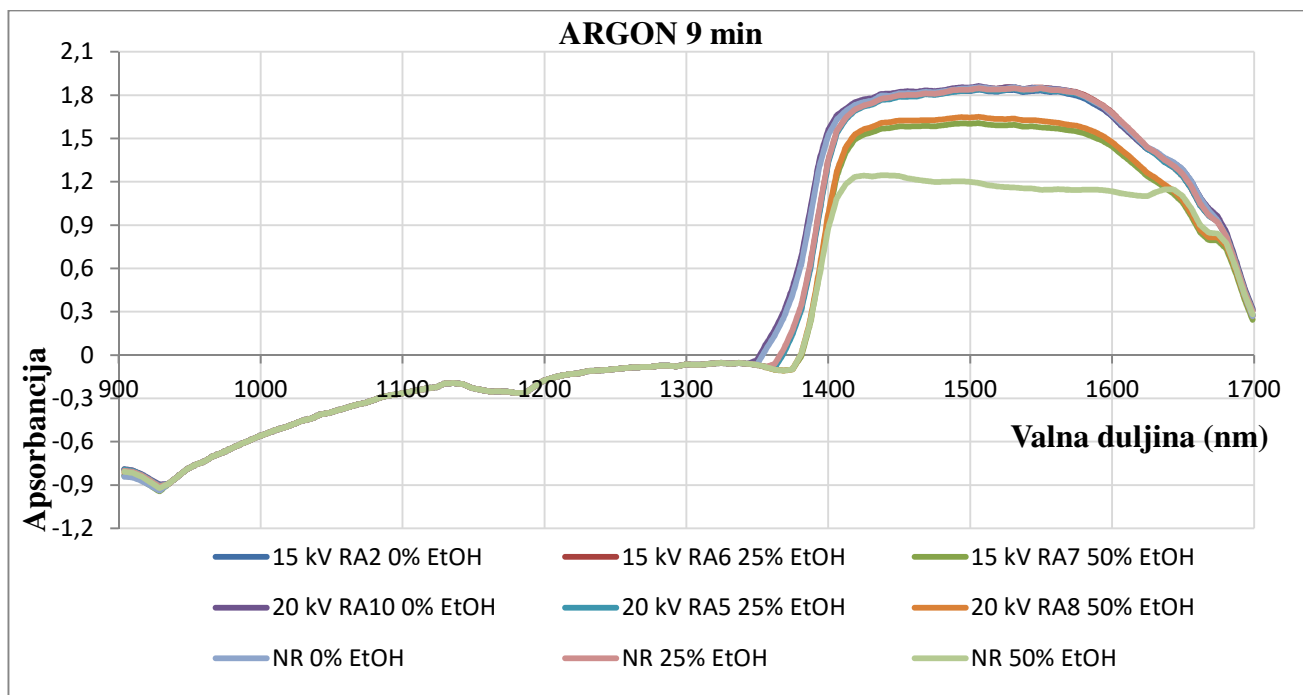
Slika 13. prikazuje „sirove“ NIR spektre uzoraka majčine dušice tretiranih u struji dušika pri različitim parametrima HVED tretmana te uzoraka majčine dušice dobivenih konvencionalnom metodom ekstrakcije. Usporedbom grafičkih prikaza A i B evidentno je da nema dominantnijih razlika unutar NIR regije od 1350 nm do 1699 nm. Ono što uistinu predstavlja razliku, je vremensko trajanje ekstrakcije. Na donjem grafičkom prikazu prisutna je izraženija vrpca koja je posljedica istežanja C-H grupa, proizašlih iz kombinacija prvog overtona unutar regije od 1410 nm do 1610 nm. Na valnoj duljini od oko 1640 nm uočen je vrh za netretirani uzorak kadulje koji se može pripisati rasteznim vibracijama C-H veza, koje potječu iz prvog overtona, dok je na 1680 nm uočen vrh koji se može pripisati vibracijama metilnih grupa. Sve uočene pravilnosti ili nepravilnosti unutar NIR spektara promatranih uzoraka nisu dominantne. Nema značajnije razlike među spektrima, pa je u skladu s tim nužno provesti daljnje analize.

Na slikama 14. i 15. prikazani su NIR spektri ružmarina nakon tretmana argonom, odnosno dušikom u trajanju od 3 i 9 minuta.

A)



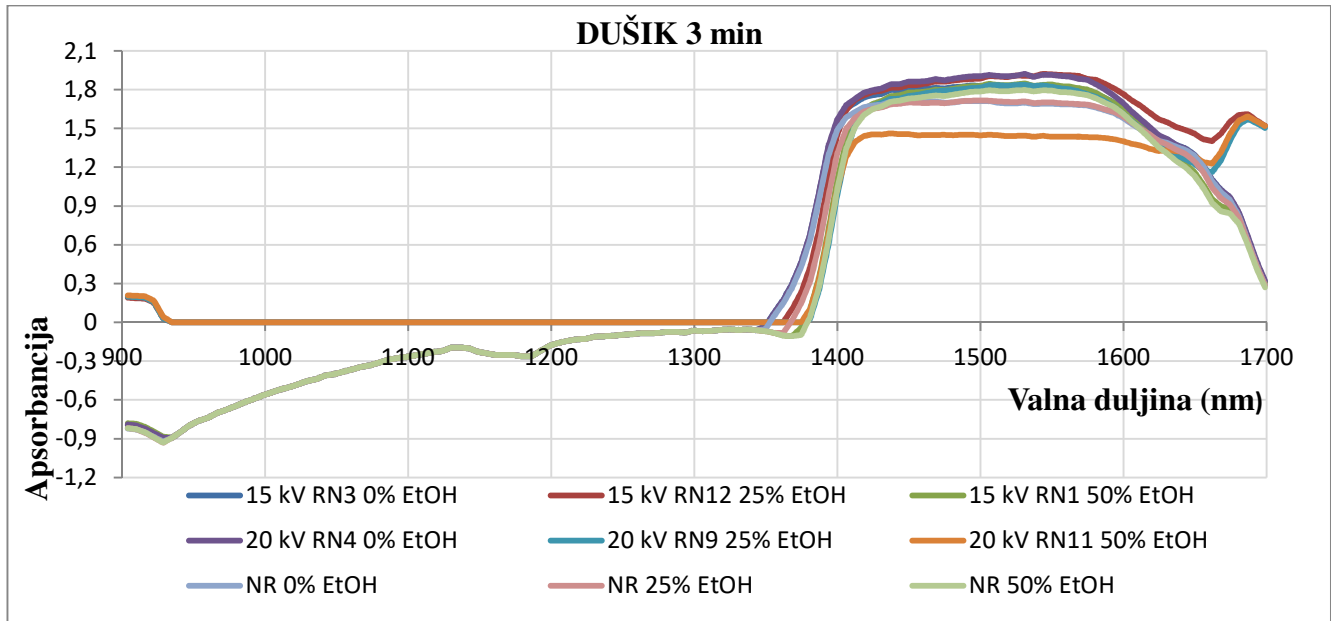
B)



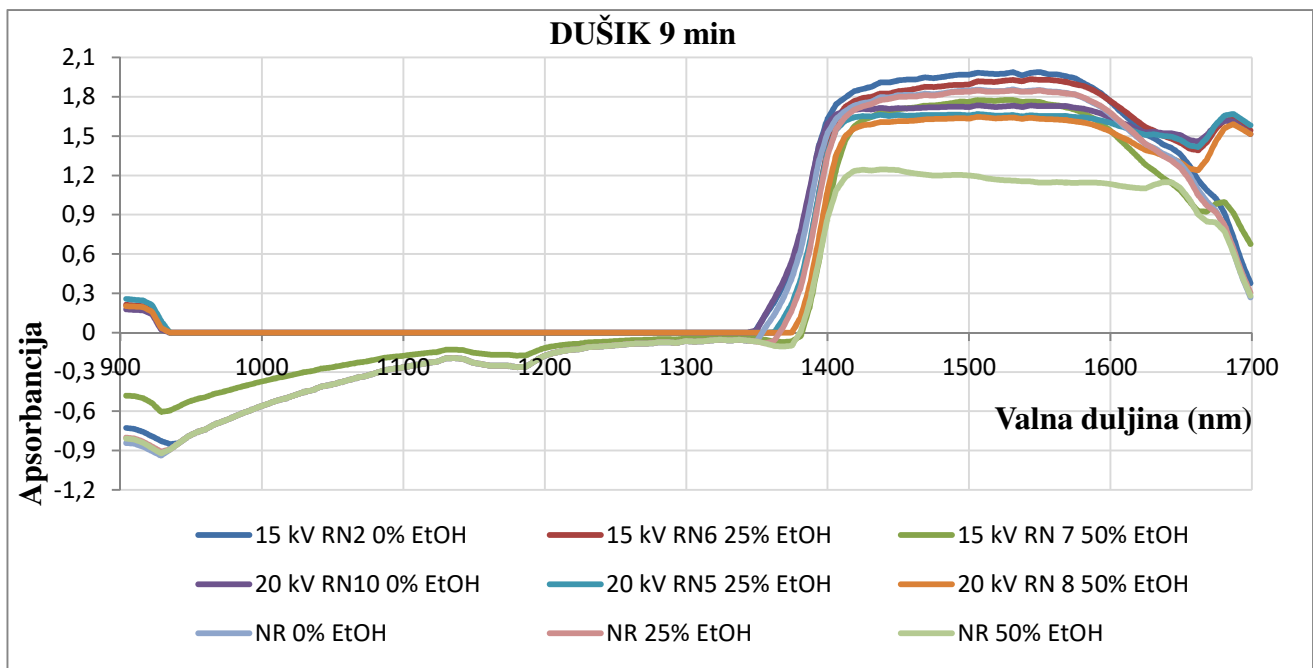
Slika 14. NIR spektri uzoraka ružmarina tretiranih u struji argona 3 minute (A) i 9 minuta (B) pri 15 kV i 20 kV te uzoraka ružmarina koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu

Na slici 14. koja prikazuje NIR spektar uzoraka ružmarina tretiranih u struji argona različitim tretmanima i uzoraka ružmarina koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu uočavamo gotovo potpuno preklapanje vrpce, osim u rasponu 1345 - 1699 nm. Na grafičkom prikazu A, u području 1345 – 1600 nm, vidljive su višestruke vrpce različitih C-H veza (CH_3 , CH_2 , CH) koje dominiraju tim područjem. Prisutnost vode kao otapala i biljne komponente je izražena rasponom od 1395 do 1608 nm u kojem je vidljiv utjecaj rasteznih O-H veza, te također prisutnost ROH grupa. Vrhovi u 1663 nm i 1674 nm posljedica su prvog overtona veza CH_3 skupine i vibracija ArCH veza. Grafički prikaz B pokazuje preklapanja vrpce u području 900 – 1340 nm, nakon čega se, pri većim valnim duljinama, vrpce počinju razlikovati. NIR spektrom u području 1403 – 1603 nm prevladavaju vrpce različitih CH veza. Vrhovi u 1644 nm i 1673 nm posljedica su prvog overtona metilenske skupine.

A)



B)



Slika 15. NIR spektri uzoraka ružmarina tretiranih u struji dušika 3 minute (A) i 9 minuta (B) pri 20 kV i 25 kV te uzoraka ružmarina koji nisu podvrgnuti HVED tretmanu

Slika 15. prikazuje uzorke ružmarina tretiranih strujom dušika različitim intenzitetom i trajanjem tretmana i uzoraka ružmarina netretiranih HVED metodom. Dobiveni spektar pokazuje vrpce i veze od značaja u području valnih duljina 1350-1699 nm. Na grafičkim prikazima u području spektralnih vrijednosti 1402 – 1610 nm uočavamo različite vrpce višestrukih C-H veza, te prvog

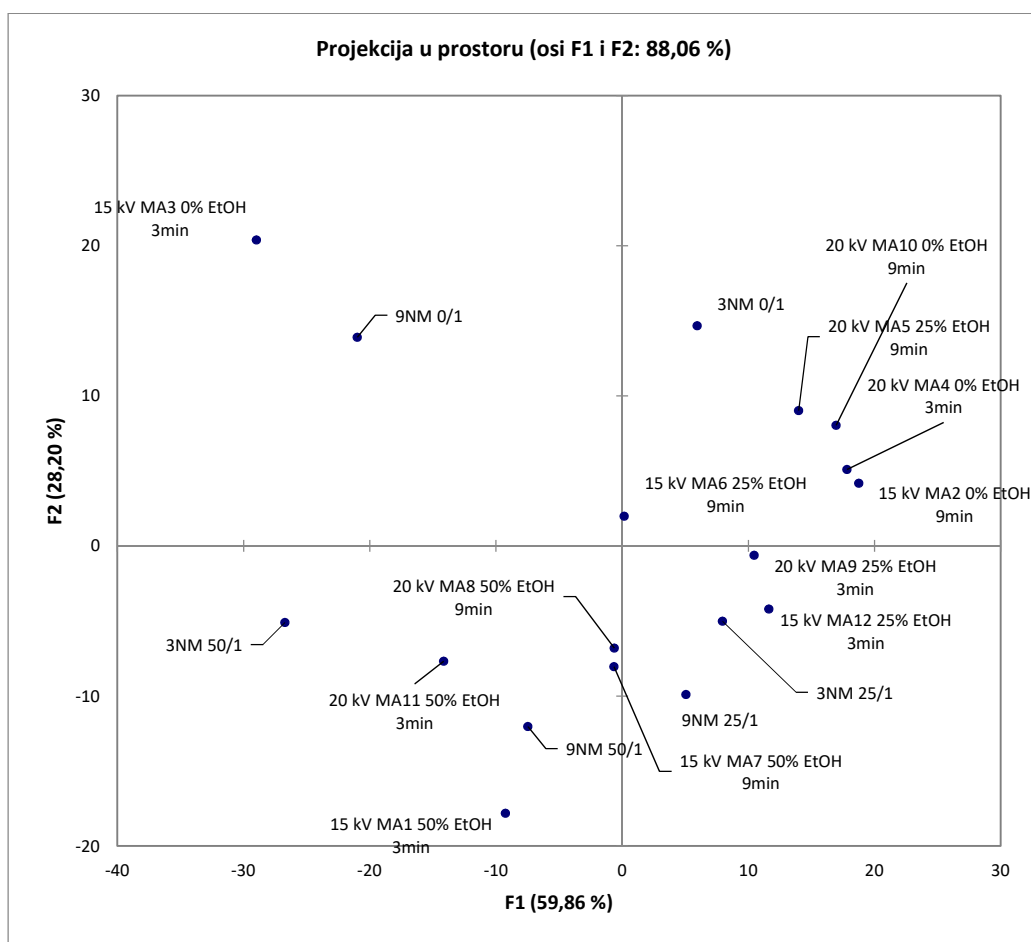
overtona veza N-H veza zbog tretiranja uzoraka strujom dušika. Na grafičkom prikazu A najznačajniji je vrh kod 1684 nm, dok su manje izraženi vrhovi kod 1643 nm i 1672 nm posljedica prve overtone regije C-H veza. U rasponu od 1408 nm do 1604 nm na izgled vrpce utječu rastezne vibracije veza unutar H₂O molekula. Vrhovi kod 1685 nm i 1679 nm najznačajniji su na grafičkom prikazu (B) i posljedica su jako izraženih rastezljivih veza unutar metilenskih skupina spojeva koji su karakteristični za ovu biljnu vrstu. Vrpce uzoraka s višim postotkom etanola kao otapala pokazuju niže vrijednosti apsorbancije i odstupaju od ostalih uzoraka u gotovo cijelom području spektra.

4.6. PCA ANALIZA - ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA

Na temelju NIR-spektra nisu se mogle utvrditi razlike među uzorcima te je bilo potrebno primijeniti neku od kemometrijskih tehnika. Kako bi se bolje objasnio velik broj varijabli upotrebom što manjeg broja komponenti, primijenjena je tehnika analize glavnih komponentata, PCA. Ta je metoda primijenjena u programu XLStat (MS Excel 2010).

Ovu tehniku prvi je opisao Karl Pearson 1901. godine primjenjujući ju na svega dvije ili tri varijable, vjerujući da ju je moguće primijeniti za rješavanje kompleksnijeg problema s više od dvije ispitivane varijable. Razvoj informatičkih tehnologija i računala omogućio je brojnim znanstvenicima primjenu ove metode u svojim istraživanjima, olakšavajući dugotrajan i kompliciran postupak izračuna, te je ova metoda razvojem računala dobila i široku primjenu u brojnim granama znanosti. PCA koristimo za smanjenje dimenzionalnosti skupa podataka, uz zadržavanje onih karakteristika podataka koje najviše doprinose varijanci (Kim, 2001). Može se reći da je PCA svojevrsna transformacija podataka na način da bira novi koordinatni sustav za skup podataka, takav da najveća varijanca bilo koje projekcije skupa podataka leži na prvoj osi (prva glavna komponenta), druga najveća varijanca na drugoj osi itd.

Korištena je analiza glavnih komponentata za dio NIR spektra u kojem su uočene promjene (904-932 nm, 1350-1699 nm) za identifikaciju obrazaca te isticanje sličnosti i različitosti u skupu podataka. Rezultati PCA analize za prve dvije glavne komponente majčine dušice i ružmarina tretirane dušikom i argonom prikazane su na Slikama 16., 17., 18. i 19.



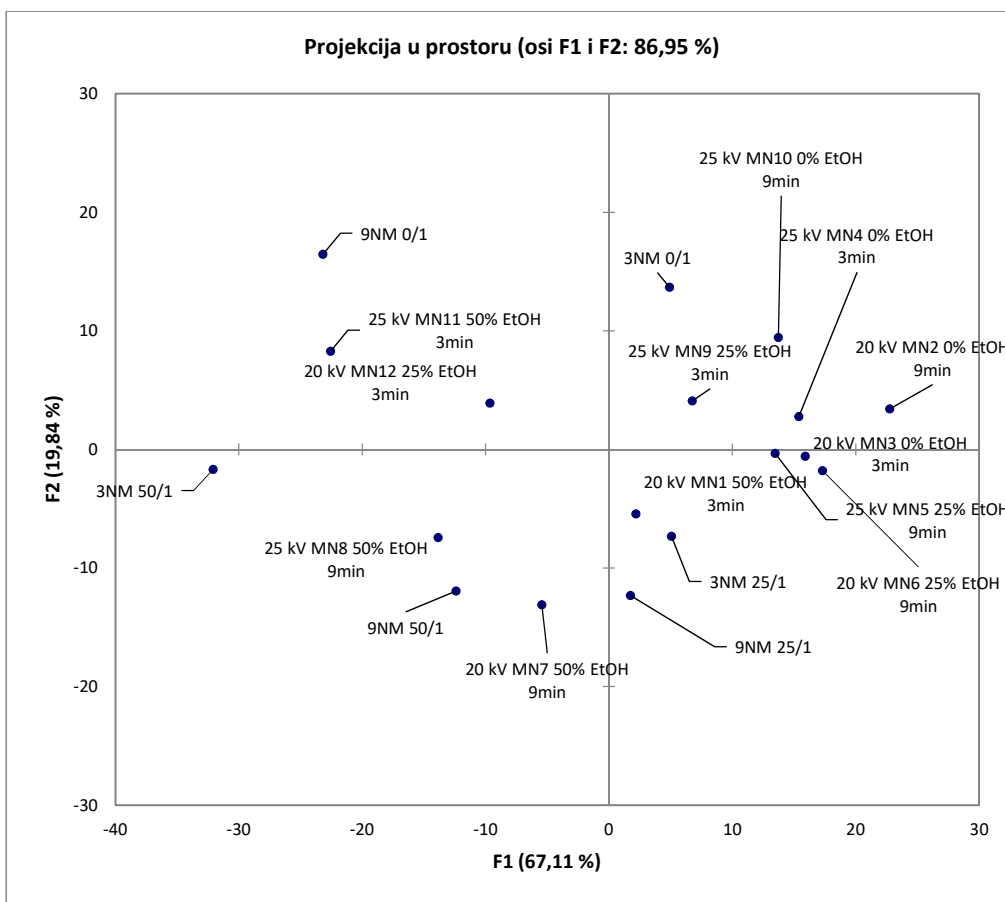
Slika 16. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932 nm, 1350-1699 nm) za uzorke majčine dušice tretirane argonom i netretirane uzorke majčine dušice

Na Slici 16. prikazana je projekcija u prostoru određena prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 za uzorke majčine dušice tretirane argonom te netretirane uzorke majčine dušice. Premda je odabran određen broj ulaznih varijabli kako bi se opisala varijabilnost cijelog sustava, često je velik dio tog varijabiliteta opisan malim brojem varijabla koje predstavljaju glavne komponente. Ako je to ispunjeno, glavne komponente sadrže jednaku količinu informacija kao ulazne varijable. U ovom slučaju glavne komponente F1 i F2 obuhvaćaju 88,06% varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke majčine dušice. Analiza glavnih komponenata otkriva povezanost među varijablama i omogućava interpretaciju do kojih se inače bez ovako provedene analize ne bi moglo doći samo na temelju provedene NIR spektrofotometrije.

Analiza PCA podrazumijeva pronalaženje svojstvenih vrijednosti matrice kovarijanci uzoraka. Ulazni podatci za analizu glavnih komponenata čine p varijabli i n opažaja (individua) i imaju oblik matrice p x n. Geometrijski su te linearne kombinacije koordinatne osi novog

koordinatnog sustava dobivenog rotacijom oko starog s glavnim komponentama kao koordinatnim osima (Jednačak i sur., 2013). Analiza započinje s podacima o p varijabli za n broja mjerenja (opažaja) pomoću k glavnih komponenata ($k < p$), bez gubitka informacija o sustavu. Glavne komponente reprezentiraju smjer maksimalnog varijabiliteta i omogućuju jednostavniji opis strukture skupa podataka. Svojstvena vrijednost najveća je u prvoj komponenti i u svakoj sljedećoj njena vrijednost je manja. Suma svih svojstvenih vrijednosti jednaka je ukupnoj varijanci. Ako je veliki dio varijance (80-90%) protumačen jednom, dvije ili tri glavne komponente, tada te komponente mogu zamijeniti početnih p varijabli bez većeg gubitka informacija. Prva glavna komponenta je linearna kombinacija s najvećom varijancom, dakle F1 (59,86%), dok druga sadrži 28,02% varijance.

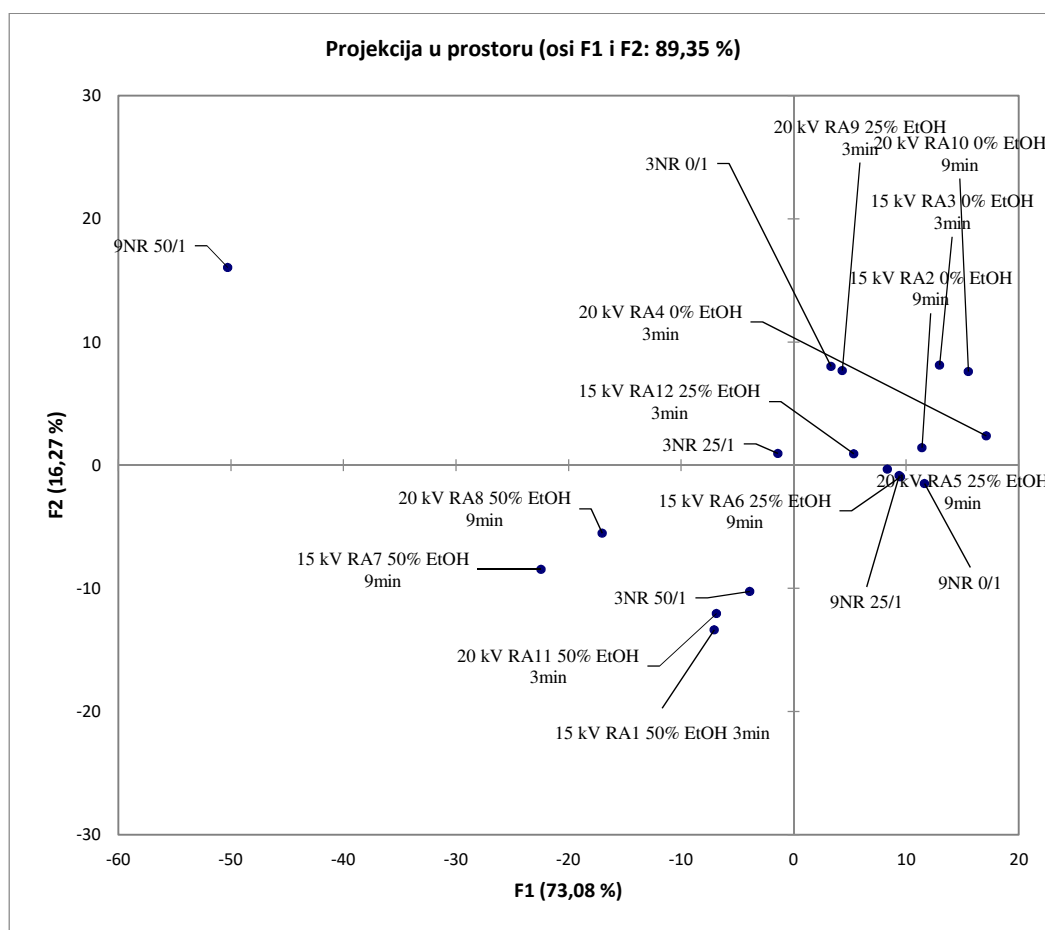
Na Slici 16. se može vidjeti raspodjela uzoraka s obzirom na parametre ekstrakcije. Viši napon, veći udio etanola u otapalu te duže vrijeme tretiranja imaju utjecaj na kemijske spojeve i izazivaju promjene koje se mogu detektirati NIR analizom. U 2.kvadrantu nalaze se uzorci koji su imali blagi tretman u čistoj vodi (0% etanola), kraće vrijeme tretiranja hladnom plazmom te niži napon ili bez tretmana hladnom plazmom. Može se uočiti trend kretanja uzoraka po „jačini“ tretmana u smjeru kazaljke na satu. Dakle, u 1.kvadrantu svrstani su uzorci ekstrahirani u 0 ili 25%-tnoj otopini etanola, tretirani 3 ili 9 minuta te napon od 15 ili 20 kV. Slijedi 4.kvadrant gdje su zastupljeni uzorci ekstrahirani u 25 ili 50%-tnoj otopini etanola, tretirani 3 ili 9 minuta, 15 ili 20 kV, dok su u 3.kvadrantu prisutni oni uzorci koji su imali „jači“ tretman što bi značilo ekstrakciju u 50%-tnoj otopini etanola, 3 ili 9 minuta, pri 15 ili 20 kV. Zaključak vodi k tome da veliku ulogu kod ekstrakcije i promjena koje uzrokuje tretman, ima udio etanola u vodi. Etanol razara veze između fenolnih spojeva i komponenata biljnog materijala na kojima su oni vezani.



Slika 17. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932 nm, 1350-1699 nm) za uzorke majčine dušice tretirane dušikom i netretirane uzorke majčine dušice

Na Slici 17. prikazana je projekcija u prostoru za uzorke tretirane dušikom te netretirane uzorke majčine dušice određena prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 86,95 % varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke majčine dušice. Prva glavna komponenta je linearna kombinacija s najvećom varijancom, dakle F1 (67,11%), dok druga sadrži 19,84 % varijance.

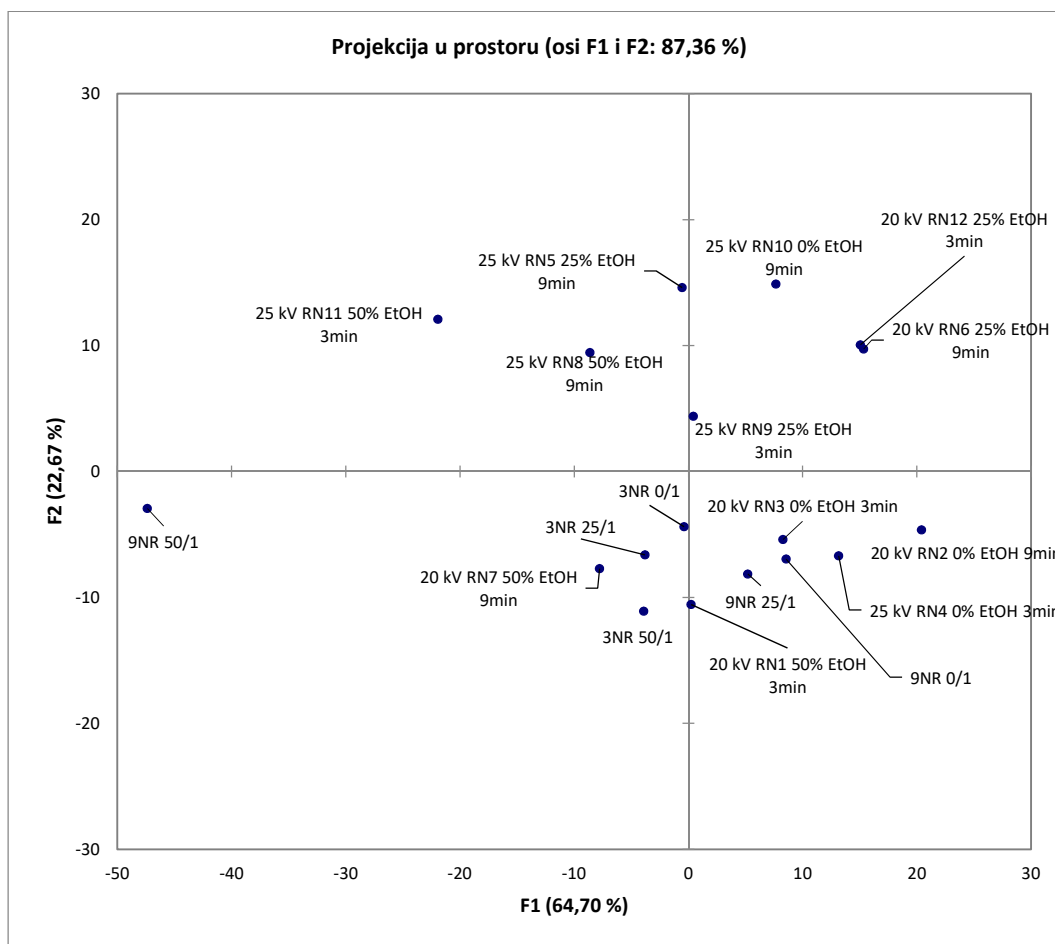
Uzorci majčine dušice grupirali su se s obzirom na parametre tretmana koji su uzrokovali promjene u njihovoj strukturi. Ne može se jasno definirati koji parametar najviše određuje te promjene. Može se vidjeti trend kretanja uzoraka u smjeru kazaljke na satu s obzirom na udio etanola u vodi. U 1.kvadrantu zastupljeni su uzorci ekstrahirani u vodi (0% etanola) te u 25%-tnoj otopini etanola. Sljedi 4.kvadrant gdje su uzorci ekstrahirani u otopinama s 25% i 50% etanola, a u 3.kvadrantu samo u 50%-tnoj otopini etanola.



Slika 18. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932, 1350-1699 nm) za uzorke ružmarina tretiranog argonom i netretirane uzorke ružmarina

Slika 18. prikazuje projekciju u prostoru za uzorke tretirane argonom te netretirane uzorke ružmarina određena prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 89,35 % varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke ružmarina. Prva glavna komponenta je linearna kombinacija s najvećom varijancom, dakle F1 (73,08%), dok druga sadrži 16,27% varijance.

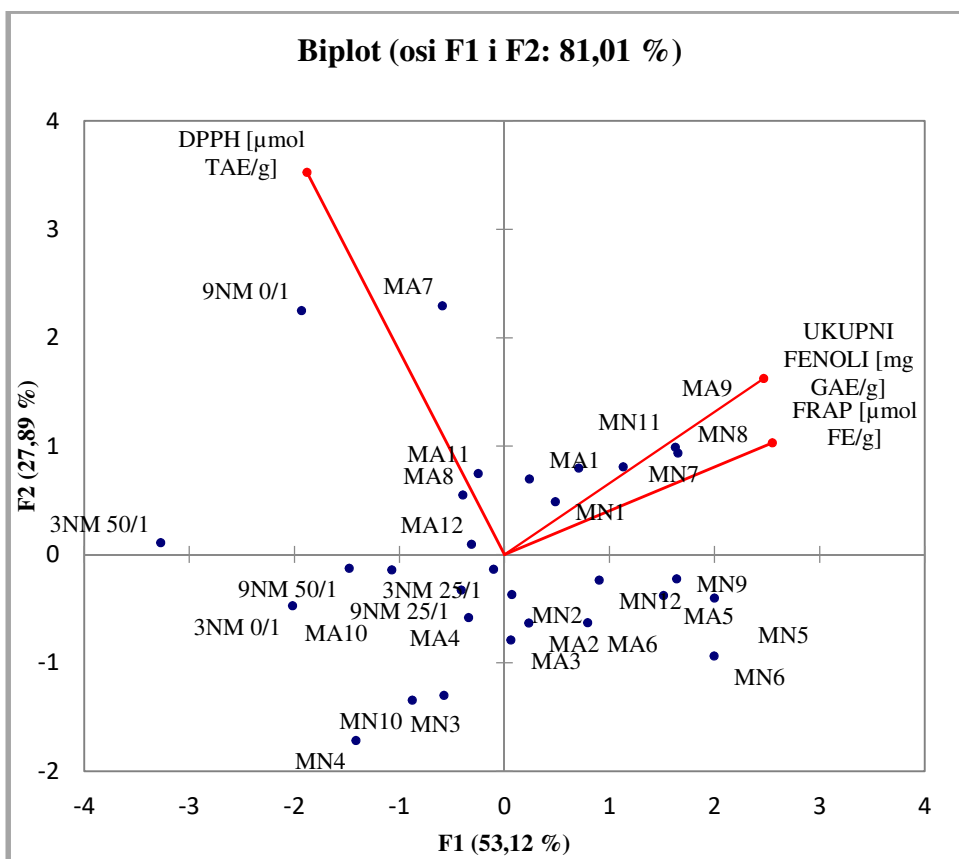
Većina uzoraka grupirana je u 1. i 3. kvadrantu te se može vidjeti kako uzorak 9NR50 odstupa od svih ostalih. U tom uzorku određena je daleko najmanja antioksidacijska aktivnost FRAP metodom u iznosu od $44,07 \mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka, dok je u svima drugima više od 100 pa sve do $560 \mu\text{mol FE/g}$ uzorka. Uzorci grupirani u 3. kvadrantu kao zajedničku karakteristiku imaju udio etanola u vodi od 50%. Ujedno uzorci RA1, RA7, RA8 i RA11 imaju i najvišu antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom koja iznosi preko $31 \mu\text{mol TAE g}^{-1}$ uzorka. Preostali uzorci prisutni u 1. kvadrantu tretirani su u čistoj vodi ili 25%-tnoj otopini etanola koja je očito uzrokovala drugačije promjene u kemijskoj strukturi od onih u 3. kvadrantu s obzirom da bi suprotni kvadranti po dijagonali trebali pokazivati razlike u uzorcima.



Slika 19. Analiza glavnih komponenti NIR spektra (904-932 nm, 1350-1699 nm) za uzorke ružmarina tretiranog dušikom i netretirane uzorke ružmarina

Na Slici 19. je prikazana projekcija u prostoru za uzorke tretirane dušikom te netretirane uzorke ružmarina određena prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 87,36% varijance originalnih podataka za sve prikazane uzorke majčine dušice. Prva glavna komponenta je linearna kombinacija s najvećom varijancom, dakle F1 (64,70%), dok druga sadrži 22,67 % varijance.

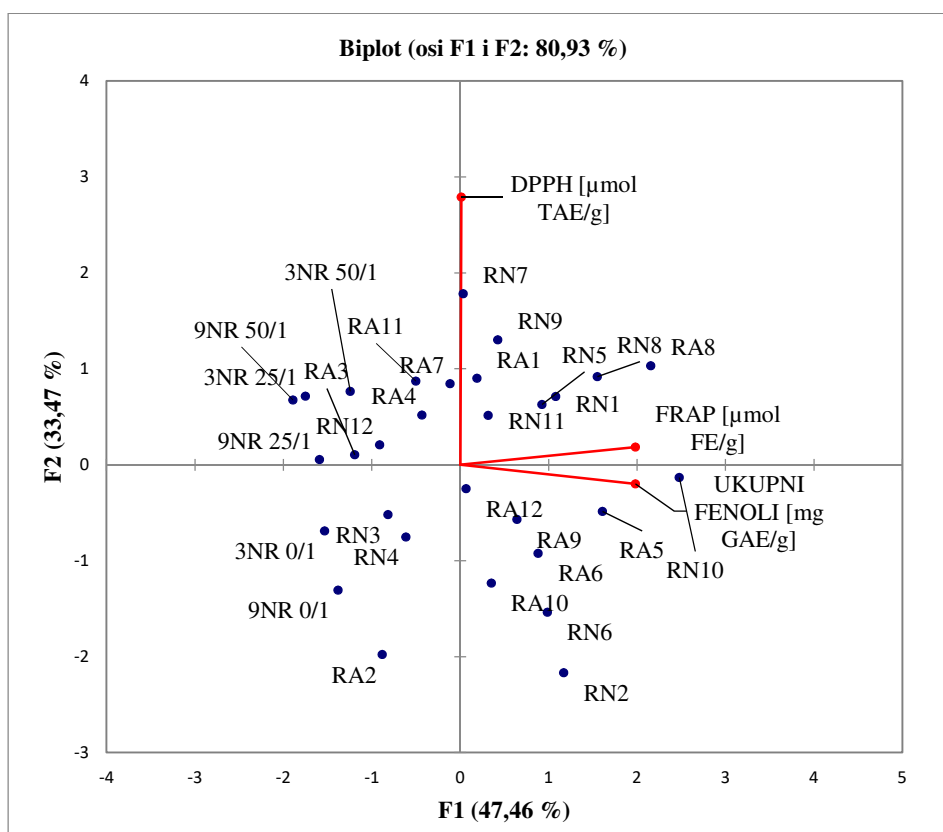
Opet je vidljivo kako uzorak 9NR50 odskače od ostalih zbog najmanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u iznosu od 44,07 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ uzorka. Ostali uzorci grupirali su se većinom u 1. i 3. kvadrantu po određenim sličnim karakteristikama i promjenama uzrokovanim tretmanom ekstrakcije. Ne može se reći koji parametar najviše utječe na promjene, očito je da svi doprinose uočenim promjenama na NIR spektrima.



Slika 20. Analiza glavnih komponentata na temelju rezultata ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom za sve uzorke majčine dušice

Slika 20. daje prikaz korelacije rezultata ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti dobivene metodama FRAP i DPPH za sve uzorke majčine dušice, a projekcija u prostoru određena je prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 81,01% varijance originalnih podataka za sve uzorke majčine dušice. Može se vidjeti da uzorci u kojima se pokazala visoka vrijednost ukupnih fenola, pokazuju i više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta po FRAP metodi te su ti uzorci majčine dušice grupirani u 1. kvadrantu. Uzorci smješteni u 3.kvadrantu pokazuju suprotno, kod njih nije određena visoka vrijednost ukupnih fenola niti visoka antioksidacijska aktivnost po FRAP metodi. Primjerice MA1 i MN1 koji su tretirani u 50%-tnoj otopini etanola, u trajanju od 3 minute u struji argona, odnosno dušika pri nižim naponima (argon 15k V, dušik 20 kV), pokazali su viši udio ukupnih fenola ($35,56 \text{ mg GAE g}^{-1}$ i $36,08 \text{ mg GAE g}^{-1}$) od uzoraka MA4 i MN4 koji su smješteni u suprotnom kvadrantu te ih karakterizira tretman ekstrakcije u čistoj vodi (0% etanola) u trajanju od 3 minute, u struji argona, odnosno dušika pri nižim naponima, a dobivene koncentracije ekstrahiranih fenola su $27,47 \text{ mg GAE g}^{-1}$ i $18,95 \text{ mg GAE g}^{-1}$. Ovo je još jedan pokazatelj važnosti odabira otapala za ekstrakciju i da se više fenolnih spojeva ekstrahira u

otapalu koje nije čista voda, već smjesa vode i etanola u omjeru 1:1. Isti trend prati i antioksidacijska aktivnost određena po FRAP metodi, to jest uzorci u kojima je ustanovljena visoka vrijednost antioksidacijske aktivnosti su oni u kojima je određena i visoka koncentracija ukupnih fenola. Uzmemo li za primjer opet uzorke MA1 i MN1 smješteni u 1.kvadrantu koji su pokazali visoke vrijednosti ukupnih fenola, u njima je izmjeren i viši antioksidacijski kapacitet u vrijednostima od 376,93 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ i 390,50 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$, u odnosu na uzorke MA4 i MN4 koji se nalaze u 3.kvadrantu te pokazuju niži antioksidacijski kapacitet u vrijednostima od 293,36 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$ i 150,50 $\mu\text{mol FE g}^{-1}$. Dakle, ukoliko nam je bitno iz majčine dušice ekstrahirati visok udio fenola visoke antioksidacijske aktivnosti po FRAP metodi možemo odabrati tretmane koje posjeduju uzorci grupirani u 1. kvadrantu. Uzorci koji su pokazali visoku antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom smješteni su u 2. kvadrantu, a suprotnost pokazuju uzorci smješteni u 4. kvadrantu. Primjerice, MA7 tretiran 9 minuta u 50%-tnoj otopini etanola u struji argona pri 15 kV pokazuje višu vrijednost antioksidacijske aktivnosti od 37,92 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$, dok uzorak MA6 tretiran 9 minuta u 25%-tnoj otopini etanola u struji argona pri 15 kV ima nižu vrijednost antioksidacijske aktivnosti u vrijednosti od 28,39 $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$. Opet se razlika temelji na udjelu etanola u vodi pa se može zaključiti da se veća antioksidacijska aktivnost ekstrahiranih fenola dobiva u otapalu koje čini smjesa vode i etanola 1:1.



Slika 21. Analiza glavnih komponenta na temelju rezultata ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom za sve uzorke ružmarina

Slika 21. prikazuje korelaciju rezultata ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti određene metodama FRAP i DPPH za sve uzorke ružmarina, a projekcija u prostoru određena je prvim dvjema glavnim komponentama označenima s F1 i F2 koje obuhvaćaju 80,93% varijance originalnih podataka za sve uzorke ružmarina. Može se uočiti slični trend kao i kod majčine dušice, samo malo zaokrenut u prostoru. Uzorci s visokom vrijednosti ukupnih fenola većinom imaju i višu vrijednost antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom iako su ovdje svrstani u različite kvadrante, 1. i 4., no nalaze se veoma blizu i nisu sa suprotnih strana (suprotnost po dijagonali). Na primjer, uzorci koji pokazuju visoku vrijednost ukupnih fenola su RA5 i RN2 i nalaze se u 4. kvadrantu. Tretman spomenutih uzoraka trajao je dulje vrijeme (9 min), pri višem naponu, u 0 ili 25%-tnoj otopini etanola, a dobivena vrijednost ukupnih fenola je u RA5 25,34 mg GAE g⁻¹, a u RN2 30,86 mg GAE g⁻¹, dok je u uzorcima RA4 i RN12, koji su smješteni sa suprotne strane u 2. kvadrantu, dobivena manja vrijednost ukupnih fenola u iznosu od 7,21 mg GAE g⁻¹ u RA4 i 8,95 mg GAE g⁻¹ u RN12, no i trajanje tretmana je ovdje bilo kraće (3 min), naponi su viši, a udio etanola 0 i 25%. Nadalje, uzorci koji pokazuju visoku vrijednost antioksidacijske aktivnosti po FRAP metodi su oni smješteni najviše u 1. kvadrantu, primjerice RA8 i RN1 koji pokazuju vrijednosti od 486,93 µmol FE g⁻¹ i 312,64 µmol

FE g⁻¹. Njihova zajednička karakteristika je već istican udio etanola u vodi od 50% koji je očito utjecao na ekstrakciju fenolnih spojeva veće antioksidacijske aktivnosti. Za razliku od ovih uzoraka, u 3.kvadrantu smješteni su uzorci RA2 i RN4 koji su pokazali niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u vrijednostima od 184,79 μmol FE g⁻¹ te 139,79 μmol FE g⁻¹, a zajednička karakteristika njihova tretmana je ekstrakcija u čistoj vodi (0% etanola). Uzorci s najboljim antioksidacijskim kapacitetom određenim DPPH metodom smjestili su se negdje oko linije 1 i 2. kvadranta, a to su na primjer RA7 i RN7 gdje ona iznosi 21,28 μmol TAE g⁻¹ i 32,92 μmol TAE g⁻¹. Njihovi tretmani trajali su 9 minuta u 50%-tnoj otopini etanola te su se odvijali pri nižem naponu. Za razliku od ovih, na suprotnoj strani, oko granice 3. i 4. kvadranta smješteni su uzorci RA2 i RN2 s nižim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti u iznosu od 25,85 μmol TAE g⁻¹ i 25,89 μmol TAE g⁻¹ koje karakterizira tretman od 9 minuta, ali u čistoj vodi (0% etanola) i pri nižim naponima.

Na temelju svih prikaza donosi se zaključak kako udio etanola u vodi ima najvažniju ulogu kod ekstrakcije fenolnih spojeva iz uzoraka majčine dušice i ružmarina te se kao najbolja varijanta pokazala 50%-tna otopina etanola. Dulje vremensko trajanje ekstrakcije također doprinosi većoj koncentraciji ukupnih fenola, kao i tretman hladnom plazmom. Odabir vrijednosti napona ovisi i o odabiru ostalih parametara, tj. o njihovoj kombinaciji.

4.7. PCR ANALIZA – REGRESIJA GLAVNIH KOMPONENATA

Za daljnju analizu odnosa između NIR spektra i sadržaja bioaktivnih tvari u ekstraktima majčine dušice i ružmarina te razvijanje predikacijskih modela primijenjena je regresija glavnih komponenata (PCR). Cilj analize je bio ispitati primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu predikcije udjela polifenola, te antioksidativne aktivnosti (FRAP i DPPH) ekstrakata mediteranskih biljaka ružmarina i majčine dušice tretiranih visokonaponskim pražnjenjem uz upotrebu vode i etanola. Matrica podataka s kojom se radilo sadržavala je podatke o NIR spektrima, sadržaj ukupnih fenola te vrijednosti dobivene za DPPH i FRAP. Svaki uzorak je snimljen tri puta te mu je izračunata srednja vrijednost što je rezultiralo s matricom podataka od 796 stupaca i 30 redaka za jednu biljku. PCR analiza provedena je uz pomoć programa XLStat. Modeli su dobiveni korištenjem izvornih spektara bez pred procesiranja.

Tablica 17. Statistički pokazatelji razvijenih PCR modela za predikciju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (FRAP i DPPH) za ružmarin

Broj modela	Valna duljina (nm)		R ²	Prilagođeni R ²	RMSE	RPD	RER
MODEL 1	904-1699	UF	1	0,999	0,227	29,888	107,5762
		FRAP	0,993	0,787	50,404	2,168	10,288
		DPPH	0,997	0,913	0,545	3,399	12,972
MODEL 2	1349-1699	UF	0,994	0,820	2,869	2,359	8,515
		FRAP	0,987	0,620	4543,942	0,02405	0,114
		DPPH	0,995	0,844	0,732	2,531	9,658
MODEL 3	904-932,1349-1699	UF	0,996	0,884	2,307	2,935	10,589
		FRAP	0,993	0,787	50,446	2,166	10,2797
		DPPH	0,997	0,915	0,540	3,431	13,093
MODEL 4	904-932	UF	0,432	0,284	5,740	1,182	4,255
		FRAP	0,150	-0,071	113,073	0,966	4,586
		DPPH	0,685	0,603	1,167	1,588	6,063

Svi dobiveni modeli prikazani su u Tablicama 17. i 18. Podaci modeliranja uključuju koeficijent determinacije za model (R²), prilagođeni koeficijent determinacije (prilagođeni R²), korijen srednje standardne pogreške (RMSE), omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD) te omjer raspona pogrešaka (RER). Prilagođeni R² je korekcija za R², koja uzima u obzir broj varijabli korištenih u modelu. On može biti negativan ako je R² blizu nule (Analytical, 2018). Koeficijent determinacije pokazuje koliko se dobro podatci uklapaju u model, tj. govori o korelaciji i smjeru linearne povezanosti između dvije varijable. Njegova vrijednost se može kretati između 0 i 1, što je bliže broju jedan, to će model biti reprezentativniji. RMSE je standardna pogreška predviđanja, odnosno koliko su podatci udaljeni od regresijske linije. Predlaže se da indikatori za izvrsne modele budu predviđanja vrijednosti R² veće od 0,95 i vrijednosti RPD veće od 6,5. Visoko prihvatljivi modeli imaju niže vrijednosti RMSE, R² veći od 0,8 i RPD veći od 3, dok izvrsni modeli imaju visoku vrijednost R² (veća od 0,9) i RPD preko 5 (Belščak-Cvitanović i sur., 2017). Prema

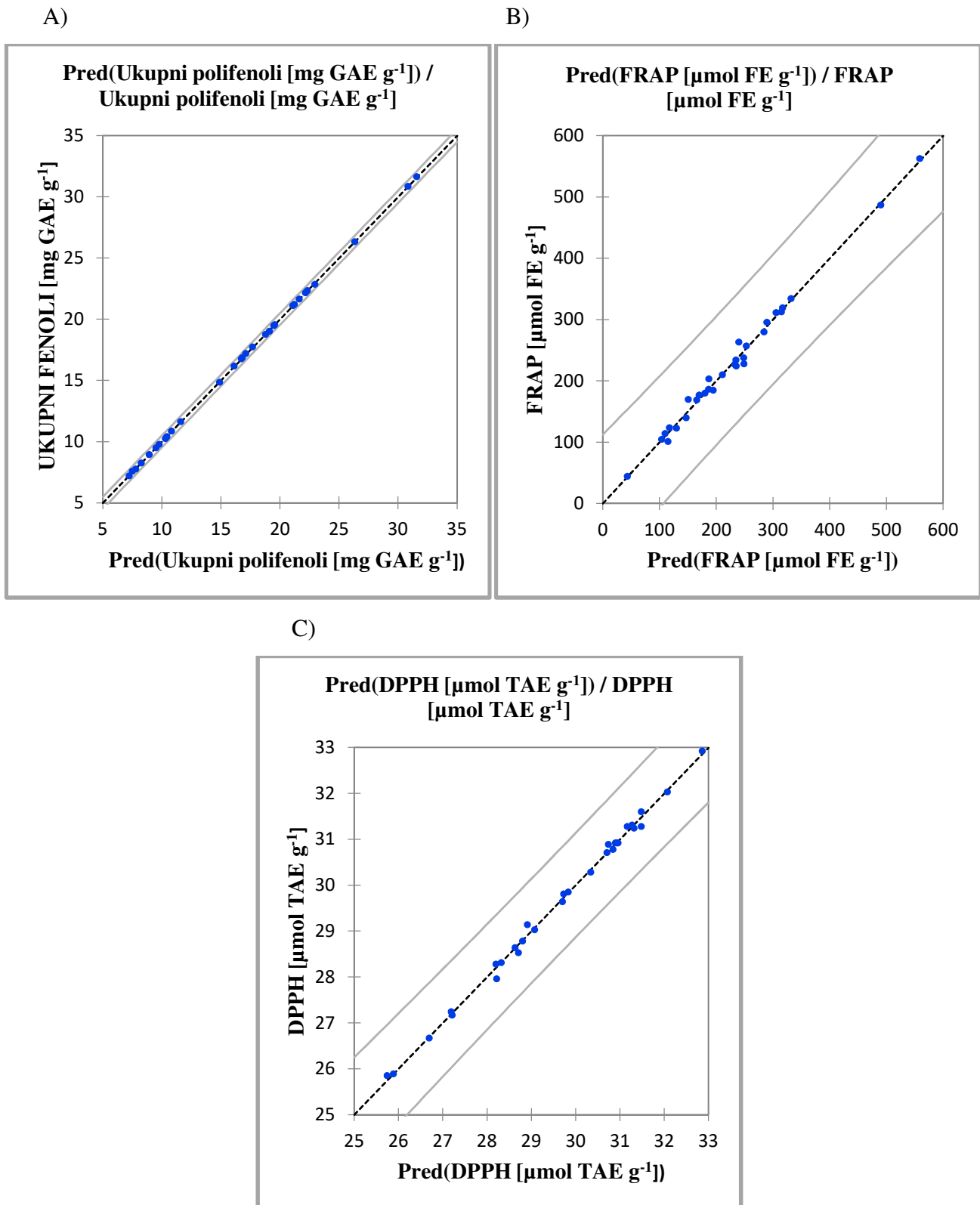
AACC International odobrenim metodama 39-00.01, upotreba RPD kao pokazatelja procjene modela predviđanja pri vrijednosti RPD-a $\geq 2,5$ sugerira da je model prikladan za probir u uzgojnim programima, RPD ≥ 5 je prihvatljiv za kontrolu kvalitete, a RPD ≥ 8 je dobar za kontrolu procesa, razvoj i primijenjena istraživanja.

U Tablici 17. prikazane su vrijednosti parametara koji su dobiveni razvijanjem četiri modela za ružmarin. Vrijednosti parametara modela odvojeni su prema tome je li se pri modeliranju koristio cijeli spektar (model 1 - od 904 do 1699 nm) ili dio spektra (model 2 – od 1349 do 1699 nm, model 3 – od 904 do 932 nm i od 1349 do 1699 nm i model 4 – od 904 do 932 nm).

U dobivenim modelima koeficijent determinacije kretao se između 0,150 do 0,999, dok se prilagođeni koeficijent determinacije kretao od -0,071 do 0,999. Model 1 pokazao je visoke vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) za promatrane uzorke (veće od 0,78), čime ukazuje na dobru linearnu povezanost između vrijednosti NIR spektra snimljenih uzoraka i fenolnih spojeva. Najbolja validacija ukupnih fenola, DPPH i FRAP-a za ekstrakte ružmarina postignuta je pri različitim valnim duljinama.

Izdvojeni su grafički prikazi modela (Slika 22.) koji su pokazali najbolju predikciju za ukupne fenole, FRAP i DPPH. Najbolji model za ukupne fenole i FRAP dobiveni su pri valnim duljinama od 904 do 1699 nm, s vrijednostima parametara $R^2 > 0,99$, RPD $> 2,16$ i RER > 3 , a za DPPH pri rasponu valnih duljina 904-932 i 1349-1699 nm. Osim navedenih valnih duljina DPPH je pokazao zadovoljavajuće rezultate i pri cijelom rasponu valnih duljina (RPD=3,399; RER=12,972). Iako se među promatranim modelima za DPPH ovaj model nije pokazao najboljim, model spada u kategoriju visoko prihvatljivih modela. Pokazalo se da je korištenje cijelog spektra snimljenih valnih duljina dalo kvalitetnije modele za ukupne fenole i FRAP, od korištenja samo dijela spektralnih podataka.

Manje reprezentativni modeli dobiveni su korištenjem ograničenog broja valnih duljina (od 1349 do 1699 nm; od 904 do 932 nm te od 904 do 932, od 1349 do 1699 nm). RMSE vrijednosti za ove modele su visoke, a vrijednosti RPD-a većinom su niže od 2 što znači da modeli ne bi bili prikladni za kvantitativnu analizu ekstrakata s obzirom na sadržaj ukupnih fenola i FRAP. Promatrajući razvijene modele može se zaključiti da se nisu pokazali pouzdanim za predikciju FRAP-a budući da su dobivene vrlo visoke RMSE vrijednosti (veće od 50,404) što upućuje na vrlo visoku grešku predikcije.



Slika 22. Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke za uzorke ružmarina: A) sadržaja ukupnih fenola , B) antioksidacijsku aktivnost određena DPPH metodom, C) antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom

Tablica 18. Statistički pokazatelji razvijenih PCR modela za predikciju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (FRAP i DPPH) za majčinu dušicu

Broj modela	Valna duljina (nm)		R^2	Prilagođeni R^2	RMSE	RPD	RER
MODEL 1	904-1699	UF	0,950	-0,409	11,159	0,842	3,144
		FRAP	0,999	0,999	2,838	43,710	161,85
		DPPH	0,995	0,867	0,513	2,742	11,777
MODEL 2	1350-1699	UF	0,994	0,821	3,965	2,362	8,848
		FRAP	0,990	0,711	66,894	1,859	6,865
		DPPH	0,998	0,949	0,330	4,425	20,325
MODEL 3	904-935, 1344-1699	UF	0,910	-1,520	15,003	0,629	2,338
		FRAP	0,999	0,999	1,274	98,437	360,624
		DPPH	0,999	0,980	0,210	7,076	31,938

Tablica 18. prikazuje vrijednosti glavnih parametara koji su dobiveni razvijanjem tri modela za majčinu dušicu, koji se međusobno razlikuju prema promatranim valnim duljinama. Model 1 je uključivao valne duljine cijelog NIR spektra (904-1699 nm), model 2 obuhvaćao je dio NIR spektra u kojem su uočene najveće promjene među promatranim uzorcima (1350-1699 nm), dok je model 3 uključivao početni dio NIR spektra te dio spektra u kojem su uočena najveća odstupanja između ispitanih uzoraka (904-935 nm; 1344-1699 nm).

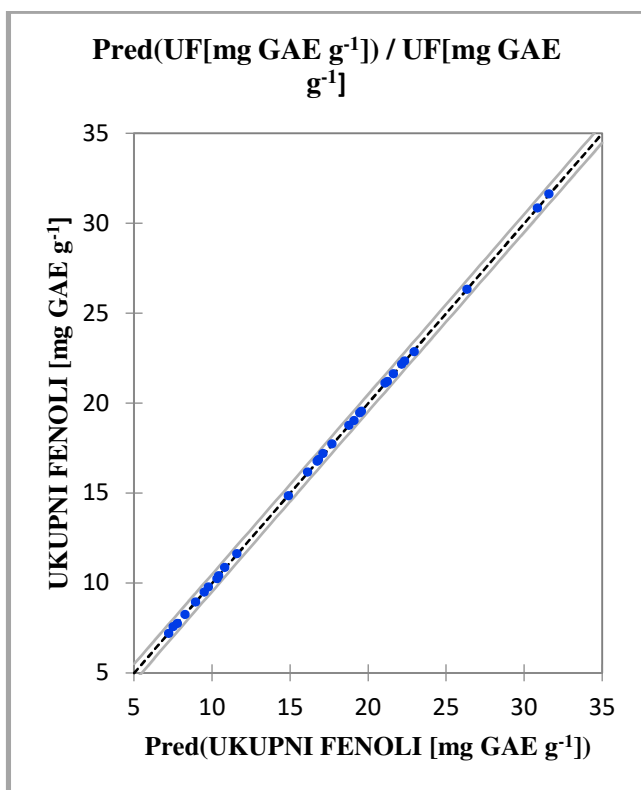
Budući da su koeficijenti determinacije (R^2) u dobivenim modelima vrlo visoki te su za promatrane uzorke veći od 0,99 (osim za ukupne fenole u modelu 1 i u modelu 3), dobivene vrijednosti ukazuju na vrlo dobru linearnu povezanost između fenolnih spojeva i vrijednosti NIR spektra snimljenih uzoraka. Suprotno tome, prilagođeni koeficijenti determinacije (prilagođeni R^2) pokazali su znatno širi raspon vrijednosti te se kretali od vrlo niskih -1,520 do poželjnih 0,999.

Slika 23. prikazuje grafičke prikaze izdvojenih modela koji su dali najbolju predikciju za ukupne fenole, FRAP i DPPH. Model 2 (1350-1699 nm) pokazao se kao najbolji za procjenu ukupnih fenolnih spojeva u uzorku, budući da je vrijednost standardne pogreške predviđanja niska te iznosi

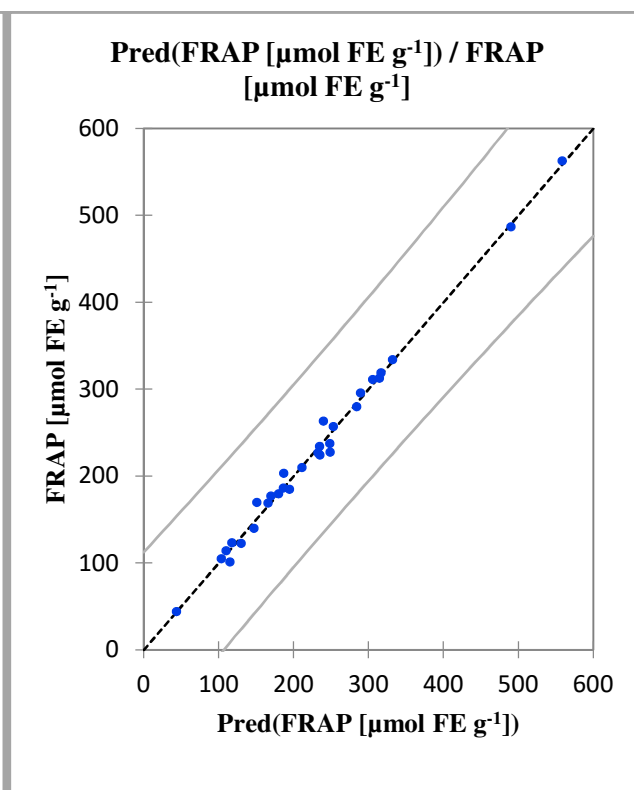
3,965 što znači da su dobivene vrijednosti blizu regresijskog pravca. Za promatrani model, RPD vrijednost za ukupne fenole iznosila je 2,362, a RER 8,848. Iako se među promatranim modelima ovaj model nije pokazao najboljim za predikciju FRAP i DPPH, model spada u kategoriju visoko prihvatljivih modela, budući da je na temelju dobivenih vrijednosti vidljivo da udjel ukupnih fenola u uzorku vrlo dobro korelira s vrijednostima dobivenim DPPH i FRAP metodama. Ipak, boljim modelom za predikciju FRAP i DPPH, se pokazao Model 3 koji je uključivao raspone valnih duljina 904-935 nm i 1344-1699 nm. Pokazalo se da korištenje upravo ovih dijelova spektra snimljenih valnih duljina daje poželjne vrijednosti RPD i RER vrijednosti. Za FRAP, RPD vrijednost iznosi visokih 98,437, a RER 360,624, dok za DPPH RPD vrijednost iznosi 7,076, a RER 31,938, što ovaj model svrstava u kategoriju izvrsnih modela za predikciju FRAP i DPPH.

Za razliku od modela razvijenih za ružmarin, kod modela za majčinu dušicu, vidljivo je da je korištenje cijelog spektra valnih duljina uzoraka majčine dušice dalo manje kvalitetne modele za predikciju, to jest korištenjem samo odabranih valnih duljina spektra, dobiveni su bolji modeli na temelju kojih je moguće preciznije predvidjeti udjel ukupnih fenola u uzorku.

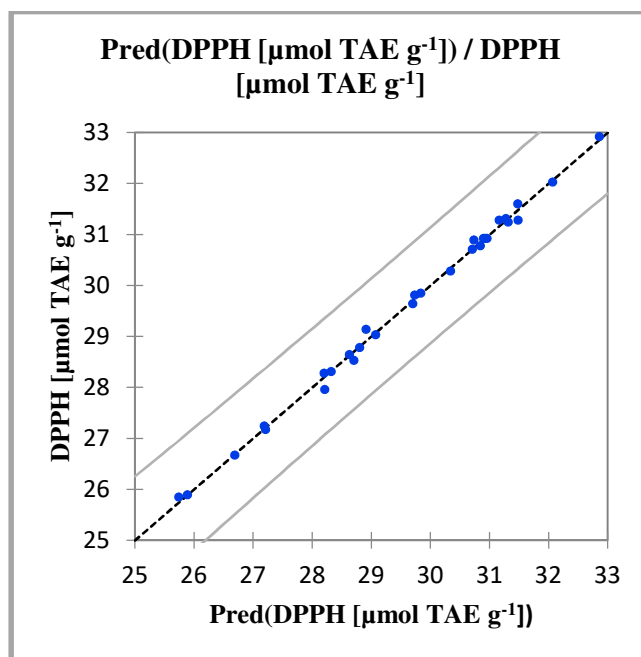
A)



B)



C)



Slika 23. Linearna regresija predviđenih vrijednosti u odnosu na eksperimentalne podatke za uzorke majčine dušice: A) sadržaja ukupnih fenola, B) antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, C) antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz majčine dušice i ružmarina uspješno je provedena pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja korištenjem „zelenih otapala“.
2. Najveći prinos fenolnih spojeva kod uzorka majčine dušice postignut je upotrebom 50%-tne vodene otopine etanola, kod tretmana u struji dušika u trajanju od 9 min i naponu od 20 kV, dok je najveći prinos fenolnih spojeva kod uzorka ružmarina postignut upotrebom 50%-tne vodene otopine etanola, kod tretmana u struji dušika u trajanju od 9 min i naponu od 25 kV.
3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom pokazalo je povećanje antioksidacijskog kapaciteta tretiranih uzoraka u odnosu na netretirane, dok DPPH metoda nije pokazala značajne razlike.
4. Parametri tretmana hladnom plazmom, koji su pokazali da imaju utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet su vrsta plina, udio etanola u vodi, napon i vrijeme tretiranja.
5. Metoda regresije glavnih komponenti (PCR) pokazala je primjenjivost NIR spektroskopije u predikciji udjela polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti (FRAP i DPPH) ekstrakata ružmarina i majčine dušice. Na temelju razvijenih modela vidljivo je da se analizom cijelog NIR spektra (904 nm – 1699 nm) dobio najbolji model za predikciju ukupnog sadržaja polifenola u ekstraktu ružmarina, dok su se za predikciju ukupnih polifenola u ekstraktu majčine dušice pokazali modeli koji su uključivali određene valne duljine NIR spektra gdje su uočene promjene na kemijskim grupama fenolnih komponenti.
6. Korištenje netoplinke tehnike ekstrakcije, „zelenih otapala“ i NIR analize kao neinvazivne spektroskopske metode, omogućava kraće trajanje analiza, manji utrošak otapala, brže dobivanje rezultata te ima ekološki pristup okolišu.

6. ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujemo mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak koja nam je pomogla svojim savjetima pri izradi ovog rada, i što je uvijek imala strpljenja i vremena za brojne upite. Hvala profesorici na stručnosti, pristupačnosti i dijeljenju novih znanja.

Zahvaljujemo i dragoj profesorici dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na velikoj pomoći i strpljenju!

7. SAŽETAK

Bojana Brnica, Dunja Crnogorac, Elena Mikolaj, Andreja Poljanec, Kristina Vugrinec

EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ MAJČINE DUŠICE I RUŽMARINA SA „ZELENIM OTAPALIMA“ PRIMJENOM VISOKONAPONSKOG PRAŽNENJA

Svrha istraživanja bila je utvrditi učinkovitost netoplinske metode ekstrakcije primjenom tretmana visokonaponskog električnog pražnjenja. Cilj je bio ekstrahirati fenolne komponente iz autohtonog mediteranskog bilja, majčine dušice i ružmarina, te odrediti antioksidacijski kapacitet ekstrakata. Tijekom istraživanja uzorci su bili tretirani prema dizajnu eksperimenta, u plazma generatoru IMP-SSPG-1200 pri frekvenciji 100 Hz i različitim vrijednostima napona u struji dušika (20 kV i 25 kV), odnosno u struji argona (15 kV i 20 kV). Ekstrakcija tretiranih i netretiranih uzoraka (1 g usitnjenog suhog bilja u 50 mL otapala) provodila se 3 i 9 minuta u 0%-tnoj, 25%-tnoj i 50%-tnoj otopini etanola. Istraživanje je usmjereno na očuvanje okoliša korištenjem tzv. „zelenih otapala“ te na kraće vrijeme ekstrakcije uz niže temperature tretmana u odnosu na konvencionalne metode. Rezultati su pokazali da uzorci tretirani visokonaponskim pražnjenjem imaju veći udio fenolnih spojeva i veći antioksidacijski kapacitet od netretiranih uzoraka. Najviši udio ukupnih fenola ekstrahiranih iz majčine dušice iznosi 42,86 mg GAE(ekvivalent galne kiseline) g⁻¹, postignut pri uvjetima ekstrakcije 9 min, u 50%-tnoj otopini etanola, u struji dušika pri 20 kV. Najbolji tretman za ekstrakciju fenolnih komponenti iz ružmarina pokazao se onaj u trajanju od 9 min, u 50%-tnoj otopini etanola, u struji dušika pri 25 kV, a udio ukupnih fenola iznosio je 31,64 mg GAE g⁻¹. Razvijeni su i regresijski modeli za predviđanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta sličnih uzoraka na temelju analitičkih podataka i blisko infracrvene spektroskopije (NIRS). Predikcijski modeli smanjuju utrošak otapala na dodatne analize, a do rezultata se dolazi brzo, neinvazivnom metodom (NIRS).

Ključne riječi: majčina dušica, ružmarin, visokonaponsko električno pražnjenje, ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet

8. SUMMARY

Bojana Brnica, Dunja Crnogorac, Elena Mikolaj, Andreja Poljanec, Kristina Vugrinec

HIGH VOLTAGE DISCHARGES FOR GREEN SOLVENT EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THYME AND ROSEMARY

The purpose of the study was to determine the effectiveness of non-thermal extraction methods by using high-voltage electrical discharge (HVED) treatment. The aim was to extract phenolic components from autochthonous Mediterranean herbs, thyme and rosemary, and determine the antioxidant capacity of the extracts. During the experiment, the samples were treated in the plasma generator IMP-SSPG-1200 by frequency of 100 Hz and different voltage values in the nitrogen (20 kV and 25 kV) or argon (15 kV and 20 kV) gas. Extraction duration of treated and untreated samples (1 g of grained dried herbs in 50 mL of solvent) was 3 and 9 minutes in 0%, 25% and 50% solution of ethanol. The research is focused on environment ecology by using “green solvents”, shorter extraction time and lower treatment temperatures than conventional methods have. Obtained results demonstrate that the samples treated with HVED have higher concentration of phenolic compounds and antioxidant capacity than the untreated samples. The highest concentration of total phenolic compounds (TPC) from the thyme was 42.86 mg GAE (equivalent of Gallic acid) g^{-1} , achieved during 9 min treatment, in 50% solution of ethanol, in the nitrogen gas at 20 kV. The best parameters of treatment for highest TPC from the rosemary, 31.64 mg GAE g^{-1} , were 9 minutes, 50% solution of ethanol, nitrogen gas, 25 kV. Regression models were developed for prediction TPC and antioxidant capacity of similar samples based on analytical data and near-infrared spectroscopy (NIRS). Prediction models reduce the need for extended chemical analyzes by using non-invasive method (NIRS).

Keywords: thyme, rosemary, high-voltage electrical discharge, total phenolic compounds, antioxidant capacity

9. LITERATURA

AACC International. *Approved Methods of Analysis, Method 39-00.01. Near-Infrared Methods—Guidelines for Model Development and Maintenance. Approved November 3, 11th Edn.*; AACC International: St. Paul, MN, **1999**. DOI:10.1094/AACCIntMethod-39-00.01

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

Agbor, G. A., Vinson, J. A., Donnelly, P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **8**, 147- 156.

Agelet, L. E., i Hurburgh Jr., C. R. (2010) A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *CRC Cr. Rev. Anal. Chem.* **40**, 246-260.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261-265.

Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., Cozzolino, D. (2010) Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: a review. *Spectrochimica Acta A.* **75**, 1- 7.

Analytical (2018) Near Infrared Spectroscopy, <<https://www.celignis.com/NIR.php#>>. Pristupljeno 04. rujna 2018.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.

Anastas, P., Warner, J. (1998) Theory and Practice. U: Green Chemistry, Oxford University Press, New York, str. 30.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P., Warren, D., Jenner, P., Butler, J., Halliwell, B. (1997) Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chem.* **60**, 49-156.

Aytul, K. K. (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. MSc. Thesis, Izmir Institute of Technology.

- Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., Vorobiev, E. (2015) Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food Bioprocess. Tech.* **8**, 1139-1148.
- Bele, A. A., Jadhav, V. M., Kadam, V. J. (2010) Potential of Tannins: A Review. *Asian J. Plant Sci.* **9**, 209-214.
- Belščak-Cvitanović, A., Valinger, D., Benković, M., Tušek, A. J., Jurina, T., Komes, D., Gajdoš Kljusurić, J. (2017) Integrated approach for bioactive quality evaluation of medicinal plant extracts using HPLC-DAD, spectrophotometric, near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Int. J. Food Prop.* **20**, 2463-2480.
- 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**(1), 70-76.
- Bicchi, C., Binello, A., Rubiolo, P. (2000) Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochem. Anal.* **11**, 236-242.
- Bittencourt, J. A. (2004) Fundamentals of Plasma Physics, Springer Science and Business Media, Brazil, str. 1-2.
- Blanco, M., i Villarroya, I. N. I. R. (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC-Trend Anal. Chem.* **21**(4), 240-250.
- Bors, W., Heller, W., Michael, C., Saran, M. (1990) Radical chemistry of flavonoids antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**, 165-170.
- Boussetta, N., Reess, T., Vorobiev, E., Lanoiselle', J. L. (2012) Pulsed electrical discharges: principles and application to extraction of biocompounds, U: Enhancing extraction processes in the food industry (Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat F., ured.), Taylor & Francis – CRC Press, str. 145–172.
- Boussetta, N., Turka, M., Taeyec, C. D., Larondellec, Y., Lanoiselléd, J. L., Vorobiev, E. (2013) Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Ind. Crop. Prod.* **49**, 690-696.

- Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges. A review. *C. R. Chimie*. **17**, 197–203.
- Braca, A., Tommasi, N. D., Bari, L. D., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64**, 892-895.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Tech.* **28**, 25-30.
- Calin-Sanchez, A., Szummy, A., Figiel, A., Jaloszynski, K., Adamski, M., Carbonell-Barrachina, A. A. (2011) Effects of Vacuum Level and Microwave Power on Rosemary Volatile Composition during Vacuum-microwave Drying. *J. Food Eng.* **103**, 219-227.
- Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) *Azospirillum spp.* and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for *Azospirillum*, (Cassan, ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.
- Chemat, F., Filly, A., Fabiano-Tixier, A., Louis, C., Fernandez, X. (2016) Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Cr. Chim.* **19**(6), 707-717.
- Chemat, F., Vian M., Cravotto, G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principle. *Int. J. of Mol. Sci.* **13** (7) 8615–8627.
- Chen, Y.-S., Zhang, X.-S., Dai, Y.-C., Yuan, W.-K. (2004) Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution. *Sep. Purif. Technol.* **34** (1–3), 5–12.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 645-665.
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furač, J., Gaurina Srček, V. (2014) Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63** (5-6) 163–171.
- Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić, G. (2013) Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Lek. Sirov.* **33**, 3-17.

- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15** (10), 7313-7352.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003) Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. *Food Chem.* **83**, 252-262.
- Fadel, H. H. M., El-Massry, K. F. (2000) *Rosmarinus officinalis* L.: effect of drying on the volatile oil of fresh leaves and antioxidant activity of their extracts. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **3**, 5-19.
- Fincan, M., De Vito, F., Dejmek, P. (2004) Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *J. Food Eng.* **64** (3): 381-388
- Fridman A. (2008) Plasma Chemistry, Cambridge University Press, str. 1-11.
- Fu, Y., Zu, Y., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. (2007) Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. *Phytother. Res.* **21**, 989-994.
- Galle Toplak, K. (2005) Domaće ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb.
- Gelenčir, J. (1991) Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb.
- Guo, J., Huang, K., Wang, J. (2015) Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food Control.* **50**, 482-490.
- Jednačak, T. (2013) Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62** (3-4), 71-80.
- Jednačak, T., Novak, P., Parlov Vuković, J., Zangger, K., Hrenar, T. (2013) NMR and DFT study of Hydrogen Bonding in Mono(salicylidene)carbohydrazide. U: Abstract Book, (Konrat, R., Kontaxis, G., ured.), Universität Wien, str. 23.

- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3954-3962.
- Kaur, C., Kapoor, H. C. (2001) Antioxidant in fruits and vegetables –the millennium's health. *J. Food Sci. Tech.* **36**, 703-735.
- Kim, K. (2001) Face Recognition using Principle Component Analysis. *IEEE Signal Proc. Let.*, **9**, 40-42.
- Kuštrak, D. (2005) Farmakognozija: fitofarmacija. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 270-284.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, **79** (5), 727-747.
- Marković, S. (2010) Fitoaromaterapija, 2. izd., Cedrus centar, Zagreb.
- Martinić, I. (2003) Čovjek i ljekovito bilje, Školska knjiga, Zagreb.
- Mata, A. T., Proenc, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., Araújo, M. E. M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* **103**, 778-786.
- Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes. Metrohm AG., Herisau.
- Miller, J. N., Miller, J. C. (2000) Statistic and chemometric for analytical chemistry, 4. izd., Pearson Education Limited, Harlow.
- Miller, N. J., i Rice-Evans, C. A. (1996) Spectrophotometric determination of antioxidant activity. Redox report, **2** (3), 161-171.
- Mishra, S., Vanli, A. O. (2015) Remaining Useful Life Estimation with Lamb-Wave Sensors Based on Wiener Process and Principal Components Regression. *J. Nondestruct. Eval.* **35**, 11.
- Nakatani, N., Inatani, R. (1984) Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2081-2085.

- Omale, J., i Okafor, P. N. (2008) Comparative antioxidant capacity, membrane stabilization, polyphenol composition and cytotoxicity of the leaf and stem of *Cissus multistriata*. *Afric. J. Biotech.*, **7** (17), 3129-3133.
- Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A. (2006) Near-infrared spectroscopy in food science and technology. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2014) Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Res. Int.* **65**, 337–343.
- Patil, S., Moiseev, T., Misra, N., Cullen, P., Mosnier, J., Keener, K., Bourke, P. (2014) Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package. *J. Hosp. Infect.* **88** (3), 162-169.
- Peñuelas, J., Munné-Bosch, S. (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends. Plant. Sci.* **10**, 166-169.
- Prasad, K. N., Chew, L. Y., Khoo, H. E., Kong, K. W., Azlan, A., Ismail, A. (2010) Antioxidant capacities of peel, pulp, and seed fractions of *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. *BioMed Res. Int.*
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53** (10), 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**, 738-745.
- Rajha, H., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., Vorobiev, E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emerg.* **31**, 60-66.
- Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009) Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem. Ind.* **58**, 121-128.

- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Arg. Food Chem.*, **51** (10), 2866-2887.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 595–602.
- Savić M., Katić, B., Popović, V. (2008) Nutritivni, lekoviti i ekonomski aspekti začina, *Industrija* 4, 119-132.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001) Antioxidants in food, Practical application. U: Introducing natural antioxidants, (Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge, str. 147-158.
- Sikorski, Z. Z. i Kolakowska, A. (2011) Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. *CRC Press*. str. 202.
- Sroka, Z. (2005) Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch. C.* **60** (11-12), 833-843.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S. (2007) Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chem.* **102**, 764-770.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* **43**, 84-93.
- Tsai, P. J., Tsai, T. H., Hoa, S. C. (2007) *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* **105**, 311-316.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2** (12), 1231-1246.
- Wada, M., Kido, H., Ohyama, K., Kishikawa, N., Ohba, Y., Kuroda, N., Nakashima, K. (2004) Evaluation of quenching effects of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts against active oxygen species by chemiluminescent assay. *Food Chem.* **87**, 261-267.
- Wellwood, C. R. L., Cole, R. A. (2004) Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6101-6107.
- Willfort, R. (2002) Ljekovito bilje i njegova upotreba, Erudit, Zagreb.

Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T., Mohamed, B. (2013) Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* **43**, 412-419.