ANA DOBRINČIĆ i LUCIJA TUĐEN

Učinkovitost različitih postupaka ekstrakcije lista masline obzirom na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta

Zagreb, 2017.
Ovo istraživanje je provedeno u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod vodstvom prof.dr.sc. Branke Levaj i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.“
<table>
<thead>
<tr>
<th>Paragraph</th>
<th>Title</th>
<th>Pages</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>UVOD</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>OSNOVNI PARAMETRI EKSTRAKCIJE</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>3.1.</td>
<td>Otapalo</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>3.2.</td>
<td>Konvencionalna ekstrakcija uz refluks</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>3.3.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td>3.4.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td>3.5.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom</td>
<td>10</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>MATERIJALI I METODE</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1.</td>
<td>Materijali</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1.1.</td>
<td>Uzorci</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1.2.</td>
<td>Reagensi</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1.3.</td>
<td>Oprema</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>4.1.4.</td>
<td>Pribor</td>
<td>13</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.</td>
<td>Metode</td>
<td>14</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.1.</td>
<td>Konvencionalna ekstrakcija uz refluks</td>
<td>14</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.2.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom</td>
<td>15</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.3.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima</td>
<td>16</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.4.</td>
<td>Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom</td>
<td>17</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.5.</td>
<td>Određivanje koncentracije ukupnih fenola</td>
<td>17</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.6.</td>
<td>Antioksidacijski kapacitet</td>
<td>18</td>
</tr>
<tr>
<td>4.2.7.</td>
<td>Statistička analiza</td>
<td>19</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>REZULTATI I RASPRAVA</td>
<td>20</td>
</tr>
<tr>
<td>5.1.</td>
<td>Konvencionalna ekstrakcija uz refluks</td>
<td>21</td>
</tr>
<tr>
<td>5.1.1.</td>
<td>Utjecaj vremena ekstrakcije</td>
<td>22</td>
</tr>
<tr>
<td>5.1.2.</td>
<td>Utjecaj broja ponavljanja ekstrakcije</td>
<td>23</td>
</tr>
</tbody>
</table>
5.1.3. Utjecaj mase uzorka ................................................................. 23
5.1.4. Antioksidacijski kapacitet ....................................................... 24
5.1.5. Optimalni uvjeti ekstrakcije ...................................................... 26
5.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ........................................... 27
  5.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije ................................................. 27
  5.2.2. Utjecaj amplitude ................................................................. 28
  5.2.3. Utjecaj mase uzorka .............................................................. 29
  5.2.4. Antioksidacijski kapacitet ..................................................... 29
  5.2.5. Optimalni uvjeti ekstrakcije .................................................. 30
5.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ...................................... 31
  5.3.1. Utjecaj vremena ekstrakcije ................................................. 32
  5.3.2. Utjecaj temperature ............................................................. 33
  5.3.3. Utjecaj mase uzorka ............................................................. 35
  5.3.4. Antioksidacijski kapacitet ..................................................... 36
  5.3.5. Optimalni uvjeti ekstrakcije .................................................. 38
5.4. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom ...................................... 38
  5.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije ................................................. 39
  5.4.2. Utjecaj tlaka ........................................................................ 40
  5.4.3. Utjecaj mase uzorka .............................................................. 40
  5.4.4. Antioksidacijski kapacitet ..................................................... 41
  5.4.5. Optimalni parametri ............................................................. 43
5.5. Usporedba ekstrakcijskih tehnika ................................................... 43
6. ZAKLJUČCI ................................................................................. 48
7. ZAHVALE .................................................................................. 50
8. LITERATURA ............................................................................. 51
SAŽETAK: .................................................................................... 57
SUMMARY: ................................................................................... 59
1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura Mediteranskog područja. Uzgaja se na više od 8 milijuna hektara u cijelom svijetu, a 98 % od toga čini područje Mediterana (Abaza i sur., 2015). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, 2014. godine u Republici Hrvatskoj više od 19 000 ha činili su maslinici, što je 1,5 % od ukupnih poljoprivrednih površina. Prvenstveno se koristi za proizvodnju ulja i plodova koji su važna komponenta u prehrani velikog dijela svjetske populacije. Uzgojem maslina i proizvodnjom maslinovog ulja godišnje se proizvede značajna količina nusproizvoda koji se mogu koristiti kao stočna hrana ili se podvrgavaju uništenju (Ahmad – Qasem i sur., 2013). Rezidbom se godišnje dobije 25 kg nusproizvoda (grančica i lišća) sa svakog stabla (Abaza i sur., 2015), odnosno više od 3 tone nusproizvoda po hektaru (Generalić Mekinić i sur., 2014). Velike količine nusproizvoda dobiju se i u procesu proizvodnje maslinovog ulja (5 – 10 % od težine maslina, ovisno koja tehnika se koristi) (Lafka i sur., 2013).

Visoke koncentracije slobodnih radikala u živim organizmima mogu oksidirati biomolekule što dovodi do oštećenja tkiva, smrti stanica i različitih bolesti kao što su nadraženosti kože, degenerative promjene povezane sa starenjem, kardiovaskularne bolesti, aterosklerozna, dijabetes, živčani poremećaji i raka (Ben Salah i sur., 2012). Antioksidansi mogu značajno odgoditi ili spriječiti oksidaciju ciljanog spoja hvatanjem slobodnih radikala (Yancheva i sur., 2016). Većina komercijalnih antioksidansa je sintetizirana, poput butiliranog hidroksianisola (BHA), butiliranog hidroksitoluena (BHT) i propil galata (PG). Budući da je dokumentirana njihova toksičnost i kancerogenost na životinjskim modelima, povećan je interes za prirodnim antioksidansima iz različitih vrsta biljaka, kao što su žitarice, povrće, voće i začini. Sekundarni biljni metaboliti kao što su tokoferoli, vitamin C, karotenoidi, a posebno polifenoli, su jake biološke aktivnosti zbog svojih antioksidativnih, antimikrobnih, antivirusnih i protuupalnih svojstava (Bayşın i sur., 2007).

Lišće masline potencijalan je izvor različitih biološki aktivnih spojeva, a posebice je bogato polifenolnim spojevima. Polifenolni spojevi lista masline su mnogobrojni, a s obzirom na glavne karakteristike molekule podijeljeni su na jednostavne fenole i kiseline, lignane, sekoidoide i flavonoidne, uključujući flavone (luteolin-7-glikozid, apigenin-7-glikozid, diosmetin-7-glikozid, luteolin i diosmetin), flavonole (rutin), flavan-3-ole (katehin), supstituirane fenole (tirosol, hidroksitirosol, vanilin, vanilinska kiselina i kavska kiselina) i oleuropein (Abaza i sur., 2015). Oleuropein, i drugi derivati su glavne komponente lista masline. Flavonoidi su prisutni u značajnijim količinama, a jednostavni fenoli i kiseline u

1
manjim količinama. Faktori koji mogu utjecati na kvalitativni i kvantitativni sastav fenola lista masline su starost lista, stupanj zrelosti, geografsko podrijetlo, sorta, udio vlage i stupanj onečišćenja sa zemljom (Şahin i Şamlı, 2013).

Nekada se lišće masline koristilo u narodnoj medicini za liječenje različitih bolesti kao što su groznice i malaria (Bayçın i sur., 2007). Osim toga, lišće masline je poljoprivredni i industrijski otpad te se smatra jeftinim, obnovljivim i obilnim izvorom polifenola (Şahin i Şamlı, 2013). Iz navedenih razloga se i u današnje vrijeme izoliraju polifenolni spojevi iz lista masline, a dobiveni ekstrakt koristi se kao namirnica, prehrambeni aditiv ili funkcionalni sastojak (Laflka i sur., 2013). Otkriveno je da ekstrakt lista masline ima antioksidativna, antiupalna i amtimikrobna svojstva protiv bakterija i gljivica, a pokazuje i antivirusna svojstva protiv nekoliko različitih virusa (Ben Salah i sur., 2012).

Proces ekstrakcije se sastoji od 2 koraka. Uzorak se prvo potapa u otapalu kako bi nabubrio i upio vodu, a zatim se topive komponente gibaju u otapalo za ekstrakciju prijenosom mase difuzijom i prodiranjem. Tradicionalne metode ekstrakcije su Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija zagrijavanjem uz reflukš, maceracija, ekstrakcija miješanjem i ekstrakcija čvrsto-tekuće. Ove metode obično koriste visoku temperaturu, traju dugo, zahtijevaju veliku količinu uzorka i otapala, veliki troškovi i ljudski rad te imaju učinak na okoliš i ljudsko zdravlje (Huang i sur., 2013). Upotreba visokih temperatura može poboljšati kinetiku ekstrakcije, ali budući da su polifenoli osjetljivi na visoke temperature može smanjiti količinu ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet. Neke alternative konvencionalnoj ekstrakciji su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima i visokim tlakom, ekstrakcija superkritičnim CO₂, ekstrakcija superpregrijanom vodom.

Tu su još i tehnološki parametri koji utječu na proces ekstrakcije kao što su način pripreme uzorka, veličina čestica uzorka, vrsta otapala, sastav otapala, omjer uzorka i otapala, temperatura i tlak ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i pH (Laflka i sur., 2013). S obzirom na raznolikost u polifenolnom sastavu, koji ovisi o mnogobrojnim već spomenutim čimbenicima, ne postoji jedinstveni protokol za ekstrakciju već ga je potrebno dizajnirati i optimizirati ovisno o primijenjenoj tehnici (Şahin i Şamlı, 2013).
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je istražiti utjecaj različitih postupaka ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija uz refluks, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom) i različitih tehnoloških parametara na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline te optimizirati navedene postupke ekstrakcije.

Specifičan cilj ovog rada je primijeniti optimalne parametre svake od ekstrakcijskih tehnika i utvrditi kojom ekstrakcijskom tehnikom se postiže najveća koncentracija ukupnih fenola i najveći antioksidacijski kapacitet u ekstraktu lista masline.

Početna hipoteza ovog istraživanja bila je da će primjena nekog od novijih postupaka ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima ili visokim tlakom) rezultirati većom koncentracijom ukupnih fenola i većim antioksidacijskim kapacitetom, kraćim vremenom ekstrakcije ili manjom količinom potrebnog otapala, nego primjena konvencionalne ekstrakcije uz refluks.
3. OSNOVNI PARAMETRI EKSTRAKCIJE

Ekstrakt lista masline dobiva se postupkom ekstrakcije u kojem se topive polifenolne komponente difuzijom odvajaju iz lista masline (čvrsta faza) upotrebom otapala (tekuća faza) (Lafka i sur., 2013). Budući da je cilj ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz biljnog materijala ekstrahirati što veću količinu tvari, uspješnost ekstrakcije se mjeri upravo količinom ekstrahiranih tvari. Kako bi ekstrakcija bila uspješnija potrebno je pronaći optimalne uvjete koji će osigurati da se što više komponenti oslobodi iz biljnog materijala, ali da pri tome ne dođe do njihovog uništenja. Količina oslobođenih spojeva ovisi o primijenjenoj tehnici ekstrakcije i parametrima kao što su vrsta i sastav otapala, omjer otapala i uzorka, vrijeme provođenja ekstrakcije, temperatura, tlak i snaga.

3.1. Otapalo

Nekoliko istraživanja je pokazalo da je izbor otapala ključan parametar ekstrakcije i da prvenstveno ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Osim vrste otapala, važan parametar ekstrakcije je i omjer otapala i materijala koji se ekstrahira. Prilikom izbora otapala potrebno je uzeti u obzir: polarnost, točku ključanja (treba biti što niža, da olakša odvajanje otapala od komponente), reaktivnost (ne smije reagirati sa ekstraktom, niti se smije razgrađivati), viskoznost (mora imati nizak viskoznost), stabilnost na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi (po mogućnosti mora biti nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš), mora biti dostupno u dovoljnim količinama, cijenu (mora biti jeftino), pogodnost za ponovnu upotrebu (Albu i sur., 2004).

Važnost izbora otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz lista masline istražili su Lafka i sur. (2013) koristeći metanol, etanol, etanol:voda = 1:1, n – propanol, izopropanol i etil acetat. Najveći udio ukupnih fenola od 2,73 ± 0,31 % imao je etanolni ekstrakt, nakon čega slijedi ekstrakt dobiven upotrebom 50 % – tnoj etanola (2,48 ± 0,28 %) te metanola (2,06 ± 0,18 %). Upotrebom n – propanola, izopropanola i etil acetat postignuti su značajno niži udjeli ukupnih fenola u ekstraktu nego upotrebom ostala 3 otapala, a iznosili su 1,37 ± 0,14, 1,35 ± 0,19 i 1,35 ± 0,12 %, izraženo kao ekvivalent kavske kiseline.

Şahin i Şamlı (2013) proveli su optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije lista masline, varirajući vrstu odnosno koncentraciju otapala, vrijeme ekstrakcije i omjer uzorka i otapala. Kao otapalo koristili su vodu, 50 % – tni etanol i 100 % – tni etanol te su istražili njihov utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola. Upotrebom vode koncentracija ukupnih fenola
kretala se u rasponu od 6,58 do 12,99 mg GAE/g s.t.v., a upotrebom čistog etanola od 5,18 do 10,15 mg GAE/g s.t.v. Najbolji rezultati postignuti su upotrebom 50 % – tnog etanola i bili su u rasponu od 9,98 do 20,37 mg GAE/g s.t.v. Budući da su polifenoli uglavnom polarni spojevi, jako polarna otapala (npr. voda) i ne-polarna otapala (npr. etil acetat, kloroform i heksan) nisu pogodna za njihovu ekstrakciju. Upotrebom vode kao otapala dobiva se ekstrakt sa 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 priručnost mase. S druge strane, čisti alkohol kao otapalo smanjuje učinak ekstrakcije. Upotreba vode u kombinaciji s drugim organskim otapalima čini umjereno polarni medij, niže viskoznosti, osiguravajući optimalne uvjete za ekstrakciju polifenola iz različitih biljnih materijala (Rafiee i sur., 2011). Osim toga, upotreba vode u kombinaciji s alkoholom dovodi do povećanog bubrenja biljnog materijala što omogućuje jači prodiranje otapala u lišće, 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). Zbog svih navedenih činjenica, u ovom se radu nije istraživao utjecaj različitih otapala već je u svim ekstrakcijskim postupcima korišten 50 % – tni etanol.

Omjer otapala i uzorka pokazao se kao jedan od parametara koji najviše utječe na količinu ekstrahiranih fenola iz različitih biljnih materijala kao što su komina grožđa, crni ribizl i rajčica (Şahin i Şamlı, 2013). Sifaoui i sur. (2016) proveli su proces konvencionalne ekstrakcije polifenola iz lista masline upotrebom vode na 50 °C u trajanju od 30 min. Pratili su učinak omjera otapala i uzorka (10:1, 20:1, 40:1 i 80:1) na količinu ekstrahiranih fenola i flavonoida i dokazali su da postoji statistički značajna razlika između promatranih omjera. Količina ekstrahiranih fenola je porasla u skladu s principom prjenos mase. Upotrebom većeg omjera otapala i uzorka molekularna difuzija između dvije faze bila je poboljšana i ekstrakcija je bila uspješnija. Odabir omjera uzorka i otapala ovisi i o tehničke koja se koristi za ekstrakciju s obzirom na različite mehanizme djelovanja svake od tehnika.

3.2. Konvencionalna ekstrakcija uz reflux

U konvencionalnoj ekstrakciji uz reflux uzorak je utočen u određenu količinu otapala u tikvici koja je vertikalno spojena na kondenzator (Liebigovo hladilo). Tikvica se zagrijava do vrenja u vođenoj kupeži, na električnom grijaju ili na plamenu. Otapalo koje pri
tome isparava odlazi u Liebigovo hladilo, kondenzira se u tekućinu i kapa nazad u tikvicu. Metoda je pogodna za ekstrakciju termo stabilnih sastojaka, a može se koristiti za ekstrakciju i u malim (nekoliko grama) i u velikim (desetki kilograma) razmjerima (Liu, 2011). Prednost ove tehnike je da se ekstrakcija može odvijati jako dugi vremenski period bez potrebe za dodatkom novog otapala budući da se sva para odmah kondenzira. Odabrano otapalo uvijek vrije na istoj temperaturi što osigurava konstantnu temperaturu ekstrakcije i omogućuje da se odabirom otapala kontrolira temperatura. Budući da toplina poboljšava prodor otapala u biljne stanice i povećava toplivost spojeva u otapalu, učinkovitost ove metode je puno veća od učinkovitosti maceracije (ekstrakcije na sobnoj temperaturi). Međutim, zbog osjetljivosti polifenola na visoke temperature učinkovitost ove metode je manja od učinkovitosti novih metoda ekstrakcije.

3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Ultrasound assisted extraction, UAE) je jednostavna, učinkovita i jeftina alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije, zbog čega se smatra jednom od najzanimljivijih tehnika kojima se poboljšava ekstrakcija vrijednih spojeva iz biljnog materijala. Tijekom djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta (frekvencija 20 – 100 kHz), prostiranjem zvučnog vala tekućim medijem, stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, što uzrokuju pojavu kavitacije i stvaranja mjehurića plina. Tijekom ciklusa ekspanzije površina ovih mjehurića je veća pa se povećava difuzija plina. Kada osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna za zadržavanje plinske faze u mjehuriću postignut je maksimum, te se na taj način pojavljuje brza kondenzacija. Kondenzirane molekule se sudaraju stvarajući udarne valove koji stvaraju područja vrlo visoke temperature (5500 K) i tlaka (50 MPa) (Herceg i sur., 2009). Ultrazvuk visokog intenziteta, uslijed djelovanja kavitacija na stanične stjenke, omogućuje veće prodiranje otapala u stanični materijal te također povećava prijenos mase. Zbog pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice što ubrzava ekstrakciju i povećava njenu učinkovitost (Brnčić i sur., 2009). Vrste ultrazvučnih reaktora koje se najviše koriste u prehrambenoj industriji su ultrazvučne kupelji i sustavi s direktno uronjenom sondom različitih dužina, promjera i oblika vrha ovisno o upotrebi (Awad i sur., 2012). Iako se ultrazvučne kupelji više koriste, sustavi s uronjenom sondom omogućuju intenzivniju i lokaliziranju primjenu ultrazvuka, što poboljšava učinak u sustavima kruto-tekuće (Ahmad-Qasem i sur., 2013). Osim toga, sonde omogućuju veći odabir procesnih parametara nego
kupelji, što je zanimljivije u istraživačke svrhe. Procesni parametri kao što su površina sonde, električna amplituda, vrijeme tretiranja, temperatura, sastav otapala, omjer otapala i uzorka ili broj ekstrakcijskih koraka također mogu utjecati na proces ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Ahmad-Qasem i sur., 2013).

Ahmad-Qasem i sur. istražili su utjecaj površine sonde na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu lista masline. Eksperimentalni rezultati pokazali su da primjenom sonda površine 1,5 cm² i 12,6 cm² koncentracija ukupnih fenola iznosi 27 mg GAE/g s.tv., odnosno 29,1 mg GAE/g s.tv., a antioksidacijski kapacitet 49,9 mg trolox/g s.tv. i 57,2 mg trolox/g s.tv. Sondom površine 3,8 cm² postignuta je najveća koncentracija ukupnih fenola od 40,4 mg GAE/g s.tv., ali i najveći antioksidacijski kapacitet (73,2 mg trolox/g s.tv.). Ovi rezultati razlog su upotrebe sonde površine 3,8 cm², uronjene 1 cm u otopinu, u našem istraživanju.

Ahmad-Qasem i sur. su također istražili kako na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet utječe amplituda odnosno različiti postotak električne snage, u rasponu od 40 do 100 % (od ukupne snage od 400 W). Upotrebom 100 % od ukupne električne snage ultrazvuka postigli su koncentraciju ukupnih fenola od 29,1 mg GAE/g s.tv. i antioksidacijski kapacitet od 57,2 mg trolox/g s.tv., dok je upotrebom 40 % od ukupne električne snage ultrazvuka postignuta koncentracija ukupnih fenola od 21,6 mg GAE/g s.tv. i antioksidacijski kapacitet od 43,4 mg trolox/g s.tv. Zaključili su da što je veća električna snaga, veća je i koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet. Statistička analiza ovog istraživanja pokazala je da primjena snage koja je manja od 60 % nema statistički značajnog učinka na koncentraciju ukupnih fenola, a primjena snage koja je manja od 80 % na antioksidacijski kapacitet. Istraživanje Sánchez – Ávila i sur. (2007) je pokazalo da snaga nije statistički značajna varijabla u rasponu od 10 – 50 % električne snage od 450 W. Na temelju tih podataka, u ovom istraživanju provjeren je utjecaj amplitude od 50 % i 100 %.

Şahin i Şamlı (2013) su u optimizaciji ultrazvučne ekstrakcije lista masline, varirali omjer otapala i uzorka na način da su 500 mg uzorka ekstrahirali s 10, 15 i 20 mL otapala. Najveću koncentraciju ukupnih fenola imali su ekstrakti dobiveni s 500 mg uzorka u 10 mL 50 % – tnog etanola nakon 40 i 60 minuta i iznosile su 20,37 i 19,51 mg GAE/g s.tv.. Rezultati su pokazali da se povećanjem omjera otapala u odnosu na uzorak, smanjila količina dobivenog ekstrakta i ukupnih fenola, dok antioksidacijska aktivnost tih ekstrakata nije pokazala nikakve promjene. Smanjenje učinka s povećanjem količine otapala nije u skladu s principom prijenosa mase budući da bi koncentracijski gradijent, koji je pokretačka sila, trebao biti viši kada se koristi veći omjer otapala i uzorka i trebalo bi doći do veće difuzije. S
ekonomskog stajališta, upotreba manje količine otapala za ekstrakciju je jako odgovoran i praktičan potez (Şahin i Şamlı, 2013).

Japón – Lujaan i sur. (2009), Bilgin i Şahin (2013) i Khemakhem i sur. (2017) još su neki od autora koji su istraživali utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na fenolni sastav lista masline.

3.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su oblik elektromagnetskog zračenja raspona valnih duljina od 1 mm do 300 mm, a frekvencija od 0,3 do 300 GHz (Chan i sur., 2011). Pod utjecajem mikrovalova molekule u tkivu (ljudskom, životinjskom i biljnom) titraju, a tkivo se zagrijava. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja djeluje na dva simultana načina. Prvi je rotacija dipola uslijed djelovanja elektromagnetskog zračenja, a drugi je ionska vodljivost, tj. zamjena iona između otopljene tvari i otapala (Favretto, 2004). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (Microwave-assisted extraction, MAE) je metoda koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s čvrstom tvari u cilju izdvajanja komponenti uzorka u otapalo. Energija mikrovalova zagrijava polarno otapalo koje je u kontaktu s čvrstim uzorkom i na taj način smanjuje količinu potrebnog otapala i vrijeme ekstrakcije što je zbog uštede na energiji (nema dodatnog zagrijavanja) ekonomski isplativo (Veggi i sur., 2013). Ako se temperatura otopine previše i/ili prenaglo povisi MAE može djelovati negativno na ekstrahirane tvari (bioaktivne spojeve uključujući polifenole). U tom slučaju može doći do razgradnje polifenola ili do njihovog onečišćenja drugim, neželjenim komponentama biljnog materijala.

Na učinkovitost MAE utječe snaga mikrovalova, temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije, izbor otapala i omjer otapala i uzorka. Učinak ekstrakcije povećava se proporcionalno sa porastom snage mikrovalova, ali samo do određene granice dok ne postane beznačajan ili pada. Snaga mikrovalova pruža lokalizirano zagrijavanje u uzorku i ponaša se kao pokretačka snaga za razgradnju biljnog tkiva kako bi se aktivni sastojak mogao osloboditi iz stanice i otopiti u otapalu. Povećanje snage će općenito poboljšati učinak ekstrakcije i skратiti vrijeme ekstrakcije, ali visoka snaga mikrovalova može uzrokovati i lošiji učinak ekstrakcije zbog degradacije termolabilnih sastojaka (Chan i sur., 2011). Upotrijebljena snaga se obično kreće u rasponu od 100 do 500 W.

Viša temperatura poboljšava difuziju otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanje željenih komponenta čime se postiže bolji ekstrakcijski učinak. Međutim svaka tvar ima svoju gornju temperaturnu granicu iznad koje dolazi do razgradnje (Veggi i sur.,
Temperatura i snaga mikrovalova su u takvom međusobnom odnosu da visoka snaga mikrovalova može povećati temperaturu ekstrakcije i obrnuto. Izbor ekstrakcijske temperature ovisi o stabilnosti aktivnog spoja i željenom učinku ekstrakcije. Temperatura ekstrakcije se postavi na željenu vrijednost, obično u rasponu 50 – 100 °C, reguliranjem snage mikrovalova. U tom slučaju, kontinuirano se koristi željena snaga mikrovalova samo dok se ne dosegne željena temperatura ekstrakcije, a zatim se snaga regulira kako bi se održala željena temperatura (Chan i sur., 2011).

Duža ekstrakcija znači i veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje bioaktivnih spojeva zbog čega je izrazito važno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije (Favretto, 2004). Osim interakcije s temperaturom, snaga mikrovalova može djelovati i na vrijeme ekstrakcije. Preveliko izlaganje mikrovalovima, čak i na niskoj snazi, rezultirat će smanjenim učinkom ekstrakcije zbog gubitka kemijske strukture aktivnih sastojaka. Kako bi se izbjegao rizik od temperaturne degradacije i oksidacije, ekstrakcijsko vrijeme obično varira od nekoliko minuta do pola sata (Chan i sur., 2011). Vodeći se preporukama o temperaturnom i vremenskom rasponu ekstrakcije sva mjerenja u ovom radu zadržana smo u tom okviru. U već spomenutom radu, Rafiee i sur. (2011) proveli su ekstrakciju u trajanju od 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 15 min, na 3 različite sorte masline primjenom različitih otapala, između ostalog i 50 % – tnog etanola. Za sve 3 sorte najveće koncentracije ukupnih fenola postignute su nakon 15 minuta i iznosile su 88,298 ± 0,25 mg TAE/g s.tv. (Koroneiki), 80,061 ± 0,09 mg TAE/g s.tv. (Roghani) i 68,833 ± 0,91 mg TAE/g s.tv. (Mission). Maceracijom lišća istih sorti postignute su niže vrijednosti ukupnih fenola u dužem vremenu što potvrđuje glavnu prednost MAE, kraće vrijeme ekstrakcije. Maceracijom lišća sorte Koroneiki nakon 24 h postignuta je koncentracija ukupnih fenola od 69,027 ± 0,59 mg TAE/g s.tv., ekstrakt sorte Roghani nakon 15 h sadržavao je 66,259 ± 0,74 mg TAE/g s.tv., a sorte Mission nakon 3 h 56,326 ± 0,17 mg TAE/g s.tv.

Chan i sur. (2011) su objasnili važnost optimalnog omjera otapala i uzorka u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima jer on osigurava homogenizirano i učinkovito zagrijavanje. Previše otapala uzrokuje lošije zagrijavanje jer se mikrovalno zračenje apsorbira u otapalo zbog čega je potrebno upotrijebiti veću snagu. Mali omjer otapala i uzorka pomiče granicu prijenosa mase jer je distribucija aktivnih sastojaka takva da su koncentrirani u određenim dijelovima što ograničava gibanje spojeva izvan stanice.
3.5. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom

Proučavanja tehnologije visokog tlaka započela su 1914. godine u svrhu pronalaska ne-termalne metode kojom je moguće postići istu razinu sigurnosti hrane kao i pasterizacijom. Primjena visokog tlaka može inaktivirati patogene mikroorganizme i enzime te mijenjati strukturu, s minimalnim učinkom ili u potpunosti bez učinka na nutritivna i senzorska svojstva. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (High pressure extraction, HPE), iz različitih začinskih biljaka, je prvi puta istražavana 2004. godine i pokazala se kao alternativna metoda ekstrakcije za koju je dokazano da je brza, učinkovita i izbjegnuta je degradacija toplinom (Huang i sur., 2013). Visoki tlak kreće se u rasponu od 100 do 800 MPa ili čak do 1000 MPa, zbog čega dolazi do puknuća membrane i oslobađanja spojeva iz unutrašnjosti stanice. HPE uzrokuje trenutnu kompresiju sirovine, mijenjajući njena površinska svojstva, raspored molekula i fizička svojstva. Potiče uspostavu ravnoteže kemijske reakcije, ubrzava prodiranjem otapala, skraćuje vrijeme postizanja ravnoteže otapanja ciljane aktive komponente i povećava brzinu difuzije. To rezultira kraćim vremenom procesa, smanjenjem troškova, poboljšanjem sigurnosti procesa i postizanjem viših prinosa ekstrahiranih spojeva (Huang i sur., 2013).

Princip rada HPE sastoji se od tri faze. Prva faza je povećanje tlaka s atmosferskog, na odabrani radni tlak u vrlo kratkom vremenu. Povećanje razlike tlaka između unutrašnjosti i vanjskog dijela uzrokuje deformaciju stanice i oštećenje stanične membrane. Otapalo za ekstrakciju brzo prodire u stanicu i dolazi u kontakt sa unutarstaničnim materijalom, otapajući aktivne komponente u vrlo kratkom vremenu. U drugoj fazi odabrani radni tlak se zadržava određeno vrijeme kako bi se postigla ravnoteža tlaka u unutrašnjosti i izvan stanice. U posljednjoj fazi tlak se naglo smanjuje na atmosferski pritom mijenjajući nekovalentne veze kao što su vodikove veze, ionske veze i hidrofobne interakcije, koje su odgovorne za 3D strukturu. To uzrokuje proširenje staniča, i tekućina snažno utječe na staničnu stjenku, staničnu membranu, plazmatsku membranu, jezgrinu membranu, vakuole i mikrotubule, rezultirajući značajnim deformacijama i oštećenjima membrane uz porast propusnosti i smanjenje otpora difuzije i prodiranja (Huang i sur., 2013).

Veliki broj parametara utjecat će na proces ekstrakcije potpomognute visokim tlakom: tlak ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, odabir otapala i koncentracije otapala, omjer uzorka i otapala. Xi i sur. (2009) koristili su HPE za ekstrakciju polifenola iz zelenog čaja i procijenili su utjecaj ove tehnike na prinos polifenola. Osim vrste i koncentracije otapala, omjera uzorka i otapala te temperature, varirali su tlak ekstrakcije (100, 200, 300, 400, 500, 600 MPa) i
vrijeme ekstrakcije (1, 4, 7, 10 min). Rezultati su pokazali da je upotrebom optimalnih ekstrakcijskih parametara (tlak od 500 MPa, vrijeme od 1 minute, 50 % tni etanol kao otapalo, sobna temperatura i omjer uzorka i otapala od 1:20 (g/mL)) moguće postići prinos ekstrahiranih polifenola od 30 ± 1,3 % sa udjelom polifenola u ekstraktu od 77 ± 2 %. Ova metoda ekstrakcije uspoređena je s ekstrakcijom na sobnoj temperaturi (20 h), ultrazvučnom ekstrakcijom (90 min) i ekstrakcijom zagrijavanjem uz reflaks (45 min). Postignuti su veoma slični rezultati, ali ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom u značajno kraćem vremenu od samo 1 minute. U ekstrakciji polifenola iz kore citrusa (limun, limeta, mandarina i naranča), koju su proveli Casquete i sur. (2015), varirani parametri HPE su tlak (300 i 500 MPa) i vrijeme ekstrakcije (3 i 10 min). Najveća koncentracija ukupnih fenola za sva 4 citrusa postignuta je primjenom tlaka od 300 MPa i vremena ekstrakcije od 3 minute. Jun i sur. (2009) proveli su HPE iz zelenog čaja te su istražili učinak omjera otapala i uzorka na količinu ekstrahiranih fenola. Rezultati pokazuju porast količine ekstrahiranih fenola s porastom omjera otapalo/uzorak. Kada je omjer otapala i uzorka porastao s 10:1 na 25:1 (mL/g), količina ekstrahiranih fenola porasla je s 17 ± 1,4 % na 30 ± 1,3 %. Budući da je proces otapanja bioaktivnih spojeva u otapalu fizikalni proces, povećanjem količine otapala povećana je i šansa da bioaktivni spoj dođe u kontakt s otapalom, što dovodi do većeg stupnja ekstrakcije.

Ova tehnologija, osim za ekstrakciju polifenola iz zelenog čaja i kore citrusa, se uspješno koristila i za ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa, flavonoida iz propolisa, likopena iz rajčice, ginsenoida iz ginsenga i pektina iz kore naranča. Ali malo je dostupnih informacija o primjeni visokog tlaka za ekstrakciju polifenola iz lista masline. S obzirom na ovdje prikazane rezultate ekstrakcije polifenola iz drugih biljaka, u ovom istraživanju provjeren je utjecaj tlaka od 300 i 500 MPa i vrijeme u rasponu do 10 min na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet iz lista masline.
4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Uzorci

Svježi listovi masline, sorte Oblica, sakupljeni su u ožujku 2016. godine na otoku Hvaru. Posloženi su u jednom sloju i osušeni na sobnoj temperaturi tijekom 5 dana te usitnjeni električnim mlincem, a prah je pohranjen u staklenu posudu i čuvan u mraku na sobnoj temperaturi do ekstrakcije.

4.1.2. Reagensi

- 96 %-tni etanol, p.a. (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- zasićena otopina natrijeva karbonata
  PRIPREMA: 200 g anhidrida natrijeva karbonata (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska) se otopi u 800 mL vruće destilirane vode, u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL, a zatim ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon toga profiltrira.
- Folin - Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, UK)
- Otopina DPPH radikala
  PRIPREMA: 6 mg DPPH radikala (Sigma, Zagreb, Hrvatska) otopi se uz miješanje u 100 mL 96 %-tnog etanola (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda

4.1.3. Oprema

- električni mlinc, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- analitička vag, AX224 (OHAUS Corporation, SAD)
- uređaj za tretiranje ultrazvukom, UP 400 S (Dr. Hilscher GmbH, Njemačka)
- mikrovalni reaktor, Start S Microwave Labstation for Synthesis (Milestone, Italija)
- uređaj za tretiranje visokim tlakom, FPG7100.100 (Stansted Fluid Power LTD, UK)
- uređaj za vakumiranje, FoodSaverV1020 (Jarden Consumer Solutions, SAD)
- centrifuga, Rotofix 32 A (Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- vortex mješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- vodena kupalj, Rotavapor R-205 (Büchi, Švicarska)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- EPR spektrometar, Varian E-109, dodatno opremljen mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG

4.1.4. Pribor
- zračno hladilo
- vodeno hladilo
- tikvice s okruglim dnom, volumena 100 mL
- Erlenmeyerove tikvice s brušenim grlom, volumena 100 mL
- odmjerne tikvice s čepom, volumena 100 mL
- laboratorijske čaše, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL
- menzure, volumena 50 mL, 100 mL
- stakleni lijevci
- epruvete
- staklene kivete
- staklene kapilare
- cjevčica za ESR (elektronsku spinsku spektofotometriju) uređaj
- stakleni štapić
- pipete, volumena 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- mikropipete, volumena 100 µL, 1000 µL
- plastične bočice, volumena 50 mL
- vreće za vakumiranje
- plamenik
- tronožac
- azbestna mrežica
- hvataljka
- magnetni mješači
- filter papir
4.2. Metode

Ekperimentalni dizajn proveden je uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft, 2007). Ispitivan je utjecaj 3 neovisne varijable na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih fenola iz listova masline u 4 tehnike ekstrakcije. Za svaku od tehnika ekstrakcije varijabla $X_1$ je vrijeme tretiranja uzorka, $X_3$ je omjer uzorka i otapala, a $X_2$ varijabla je različita za svaku tehniku. Vrijeme tretiranja uzorka različito je za svaku tehniku ekstrakcije, a omjer uzorka i otapala je isti za sve tehnike i iznosi 1:33,34 i 1:66,67. Za konvencionalnu ekstrakciju uz reflux varijabla $X_2$ je broj ekstrakcijskih koraka, za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom $X_2$ je amplituda, za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima $X_2$ je temperatura, a za ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom $X_2$ je visina tlaka. Svaki od tri ispitivana parametra promatran je na 3 razine prema Tablicama 1 – 4. Dizajn uključuje 12 tretmana za svaku od 4 tehnike ekstrakcije, što čini ukupno 48 eksperimentalnih kombinacija te je svaki tretman uzorka primijenjen u paraleli. U svrhu optimizacije korišten je alat za predviđanje i profiliranje.

4.2.1. Konvencionalna ekstrakcija uz reflux

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je zagrijavanjem u 50 % – norn etanolu uz reflux. U ovoj metodi ekstrakcije ispitivani su: vrijeme ekstrakcije, broj ponavljanja ekstrakcije te omjer otapala i uzorka. Plan pokusa prikazan je u Tablici 1., a svi tretmani napravljeni su u paraleli.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>Vrijeme (min)</th>
<th>Broj ponavljanja</th>
<th>Omjer x(g):100 mL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>R1</td>
<td>10</td>
<td>2</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R2</td>
<td>10</td>
<td>2</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>R3</td>
<td>10</td>
<td>3</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R4</td>
<td>10</td>
<td>3</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>R5</td>
<td>20</td>
<td>2</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R6</td>
<td>20</td>
<td>2</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>R7</td>
<td>20</td>
<td>3</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R8</td>
<td>20</td>
<td>3</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>R9</td>
<td>30</td>
<td>2</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R10</td>
<td>30</td>
<td>2</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>R11</td>
<td>30</td>
<td>3</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>R12</td>
<td>30</td>
<td>3</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Uzorak je odvagan u Erlenmeyerovu tikvicu s točnošću ± 0,01. Neposredno prije ekstrakcije dodano je otapalo. U slučaju ekstrakcije s dva ponavljanja u prvoj ekstrakciji se dodaje 50 mL, a u drugoj 40 mL otapala. U slučaju s tri ponavljanja svaki puta se uzorku dodaje 30 mL otapala. Nakon zadanog vremena ekstrakcija se prekida, ekstrakt se dekantrira u odmjenu tikvicu kroz filter papir. Uzorak se zajedno sa filter papiroam vraća u Erlenmeyerovu tikvicu i dodaje se nova količina otapala. Nakon završene ekstrakcije ekstrakti se spajaju u istu odmjenu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake otapalom. Pripremljeni ekstrakt je skladišten na –18 °C do provođenja analize.

4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je prema metodi Ahmad-Qasem sur. (2013) uz modifikacije. Korišten je uređaj za ultrazvuk, UP 400 S (Dr. Hielscher GmbH, Njemačka), snage 400 W sa ultrazvučnom sondom površine 3,8 cm² uronjena u otopinu 1 cm. U ovome pokusu varirani su omjer uzorka i otapala, vrijeme ekstrakcije i amplituda (opskrba transduktora ultrazvuka različitom razinom električne energije). Plan pokusa prikazan je u Tablici 2., a svi tretmani su napravljeni u paraleli.

Tablica 2. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>Vrijeme (min)</th>
<th>Amplituda (%)</th>
<th>Omjer x(g):100 mL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>UZ1</td>
<td>7</td>
<td>50</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ2</td>
<td>7</td>
<td>50</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ3</td>
<td>7</td>
<td>100</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ4</td>
<td>7</td>
<td>100</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ5</td>
<td>14</td>
<td>50</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ6</td>
<td>14</td>
<td>50</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ7</td>
<td>14</td>
<td>100</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ8</td>
<td>14</td>
<td>100</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ9</td>
<td>21</td>
<td>50</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ10</td>
<td>21</td>
<td>50</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ11</td>
<td>21</td>
<td>100</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>UZ12</td>
<td>21</td>
<td>100</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

U laboratorijsku čašu od 250 mL odvagana je zadana masa uzorka s točnošću ± 0,01 g. Neposredno prije izlaganja ultrazvuku dodano je 90 mL otapala (50 % – tni etanol). Za vrijeme tretmana temperatura u uzorku se mjerila infracrvenim termometrom i nije prelazila 60 °C. Nakon provedene ekstrakcije uzorak je prebačen u menzuru koja je nadopunjena
otapalom do 100 mL. Tako pripremljen ekstrakt centrifugiran je 10 min pri 5000 okr/min. Nakon centrifugiranja tekući dio ekstrakta je dekantiran te skladišten na –18 °C.

4.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta mikrovalovima provedena je u mikrovalnom reaktoru Start S Microwave Labstation for Synthesis (Milestone, Bergamo, Italija) pri različitim uvjetima ekstrakcije prikazanim u Tablici 3. Sva mjerenja odvijala su se pri konstantnoj snazi mikrovalova od 300 W, a varirani parametri su: masa uzorka, temperatura i vrijeme ekstrakcije. Svi tretmani ponovljeni su u paraleli.

Tablica 3. Uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>Vrijeme (min)</th>
<th>Temperatura (°C)</th>
<th>Omjer x(g):50 mL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>M1</td>
<td>2</td>
<td>45</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M2</td>
<td>2</td>
<td>45</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>M3</td>
<td>2</td>
<td>80</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M4</td>
<td>2</td>
<td>80</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>M5</td>
<td>8,5</td>
<td>45</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M6</td>
<td>8,5</td>
<td>45</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>M7</td>
<td>8,5</td>
<td>80</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M8</td>
<td>8,5</td>
<td>80</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>M9</td>
<td>15</td>
<td>45</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M10</td>
<td>15</td>
<td>45</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>M11</td>
<td>15</td>
<td>80</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>M12</td>
<td>15</td>
<td>80</td>
<td>1,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Određena masa uzorka odvaže se s točnošću ± 0,01 u tikvicu s okruglim dnom (100 mL) i prelije s 45 mL otapala (50 % – tni etanol). Sadržaj tikvice se promiješa i u tikvicu se stavi magnetski mješač. Tikvica se stavi na postolje u ekstraktoru, spoji na zračno hladilo, na koje se spoji vodeno hladilo. Na uređaju se postave opći parametri ekstrakcije: vrijeme za postizanje temperature ekstrakcije (2 minute), miješanje (50 %) te ventilacija nakon ekstrakcije (1 minuta). Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakti se ohlade, prebace u menzuru volumena 50 mL, te se sadržaj nadopuni do oznake otapalom. Ekstrakti se zatim centrifugiraju 10 min pri 5000 okr/min, odvoje od taloga te skladište na –18 °C do provođenja analize.
4.2.4. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom


Tablica 4. Uvjeti ekstrakcije potpomognute visokim tlakom

<table>
<thead>
<tr>
<th>Uzorak</th>
<th>Vrijeme (min)</th>
<th>Tlak (MPa)</th>
<th>Omjer x(g):50mL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>VT1</td>
<td>1</td>
<td>300</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT2</td>
<td>1</td>
<td>500</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT3</td>
<td>5,5</td>
<td>300</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT4</td>
<td>5,5</td>
<td>500</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT5</td>
<td>10</td>
<td>300</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT6</td>
<td>10</td>
<td>500</td>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>VT7</td>
<td>1</td>
<td>300</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VT8</td>
<td>1</td>
<td>500</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VT9</td>
<td>5,5</td>
<td>300</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VT10</td>
<td>5,5</td>
<td>500</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VT11</td>
<td>10</td>
<td>300</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VT12</td>
<td>10</td>
<td>500</td>
<td>1,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Određena masa uzorka odvaže se s točnošću ± 0,01 u plastičnu bočicu (50 mL) i prelje s 45 mL otapala (50% -tni etanol). Sadržaj bočice se promiješa i vakuumira u vrećicama za vakuumiranje. Vrećica se stavi u uređaj za ekstrakciju visokim tlakom, u kojem se kao tlačna tekućina koristi otopina glikola. Nakon provedene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se prebacuju u menzuru volumena 50 mL, te se podrzaj nadopuni do oznake otapalom. Ekstrakti se zatim centrifugiraju 10 min pri 5000 okr/min, dekanteraju i skladište na –18 °C do provođenja analize.

4.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodilo se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanjem obojenog produkta. Izmjereni intenzitet obojenog obojenja pri valnoj duljini 765 nm je direktno proporcionalan koncentraciji fenola.
U ovom radu primijenjena je metoda koju su opisali Ahmad – Qasem i sur. (2013) uz nekoliko modifikacija. U stakleni epruvetu otpipetira se 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL 20 % -tne zasićene otopine natrijeva carbonata i promiješa pomoću Vortexa. Nakon termostatiranja u vodenoj kupalji 25 min na 50°C, na spektrofotometru (UV–1600PC, VWR International, SAD) se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 50 % -tni etanol. Sva mjerenja su provedena u paraleli.

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 % -tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz tako pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja koncentracija 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 100 µL i postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola. Iz izmjerjenih vrijednost apsorbancija nacrta se baždarni pravac čija jednadžba glasi:

\[ y = 0.0035 \times x \]
\[ R^2 = 0.9995 \]

gdje je:

- \( y \) – apsorbancija pri 765 nm
- \( x \) – koncentracija galne kiseline (mg/L)

Dobivene masene koncentracije (mg/L) preračunate su i izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline na gram suhe tvari (mg GAE/g s.tv.)

### 4.2.6. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata, dobivenih prethodno opisanim metodama ekstrakcije, određen je metodom elektronske spinske rezonancije. Mjerenja su provedena u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, na EPR spektrometru tipa Varian E-109 koji je dodatno opremljen mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG. Za praćenje antioksidacijske aktivnosti korišten je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal.

Prvo je pripremljena otopina DPPH radikala u etanolu, koncentracije 0,15 mmol/L. Reakcija je započeta dodavanjem ekstrakta lista masline otopini radikala tako da je udio ekstrakta iznosio 1,0 %. Otopina se promiješa na vortex mijehali 3 sekunde i ostavi mirovati do mjerenja. Vrijeme trajanja reakcije počinje se mjeriti od trenutka dodavanja ekstrakta.
otopini radikala. Neposredno prije mjerenja, kapilara se napuni reakcijskom otopinom i s jedne strane se začepi glinom, te se stavi u ESR cjevčicu uređaja. Spektar svih reakcijskih otopina sniman je nakon 30 minuta reakcije.

Kao slijepa proba korištena je otopina DPPH radikala kojoj je umjesto uzorka dodan etanol. Snimanje ESR spektara provedeno je pri slijedećim uvjetima: centralnom polju od 331 mT (3310 G), magnetski posmak od 10 mT (100 G), snagu mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudu modulacije 0,1 mT (1 G) i pojačanje 1600 te vremenom posmaka magnetskog polja od 20 s. Za akumuliranje i obradu spektra korišten je EW (EPRWare) Scientific Software Service program.

Antioksidacijski kapacitet je prikazan kao postotak aktivnosti DPPH radikala koji je neutraliziran prisutnim antioksidacijski komponentama u uzorku.

4.2.7. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je također uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft, 2007). Model regresije za svaku ovisnu varijablu određen je prema slijedećoj jednadžbi:

\[ Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \]

Analiza varijance (ANOVA) povedena je da bi se ispitalo postoji li značajna razlika (p>0,5) između primijenjenih parametara ekstrakcije ukupnih fenola. Model je prilagoden upotrebom višestruke linearne regresije. Učinkovitost kvadratnog empirijskog modela ispitavana je primjenom analize varijance (ANOVA) gdje je korišten 95 % – tni interval pouzdanosti.
5. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon provedenih pokusa rezultati dobiveni ovim istraživanjem prikazani su tablično (Tablica 5. – 10.) i grafički (Slika 1. – 15.). Rezultati su komentirani i uspoređeni sa dosadašnjim istraživanja sa istom i sličnom problematikom.

Tablica 5. Analiza varijance (ANOVA) utjecaja nezavisnih varijabli (X₁, X₂ i X₃) na količinu ukupnih fenola u ekstraktu lista masline primjenom različitih tehnik ekstrakcije na 95 % -tom intervalu vjerojatnosti

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>KONVENCIONALNA EKSTRAKCIJA</th>
<th>EKSTRAKCIJA ULTRAZVUKOM</th>
<th>EKSTRAKCIJA MIKROVALOVIMA</th>
<th>EKSTRAKCIJA VISOKIM TLAKOM</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>F vrijednost</td>
<td>p vrijednost</td>
<td>F vrijednost</td>
<td>p vrijednost</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁</td>
<td>5,06</td>
<td>0,02</td>
<td>28,56</td>
<td>0,00</td>
</tr>
<tr>
<td>X₂</td>
<td>0,95</td>
<td>0,35</td>
<td>3,03</td>
<td>0,10</td>
</tr>
<tr>
<td>X₃</td>
<td>1,49</td>
<td>0,24</td>
<td>3,07</td>
<td>0,10</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁X₂</td>
<td>13,04</td>
<td>0,00</td>
<td>4,30</td>
<td>0,03</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁X₃</td>
<td>12,03</td>
<td>0,09</td>
<td>2,87</td>
<td>0,09</td>
</tr>
<tr>
<td>X₂X₃</td>
<td>6,48</td>
<td>0,02</td>
<td>10,44</td>
<td>0,01</td>
</tr>
</tbody>
</table>

X₁ – vrijeme tretiranja; X₂ (KONVENCIONALNA) – broja ponavljanja; X₃ (ULTRAZVUK) – amplitude; X₃ (MIKROVALOVI) – temperatura; X₃ (VISOKI TLAK) – tlak; X₃ – omjer otapala i uzorka

Tablica 6. Analiza varijance (ANOVA) utjecaja nezavisnih varijabli (X₁, X₂ i X₃) na antioksidacijski kapacitet u ekstraktu lista masline primjenom različitih tehnik ekstrakcije na 95 % -tom intervalu vjerojatnosti

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>KONVENCIONALNA EKSTRAKCIJA</th>
<th>EKSTRAKCIJA ULTRAZVUKOM</th>
<th>EKSTRAKCIJA MIKROVALOVIMA</th>
<th>EKSTRAKCIJA VISOKIM TLAKOM</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>F vrijednost</td>
<td>p vrijednost</td>
<td>F vrijednost</td>
<td>p vrijednost</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁</td>
<td>1,69</td>
<td>0,37</td>
<td>0,70</td>
<td>0,59</td>
</tr>
<tr>
<td>X₂</td>
<td>0,02</td>
<td>0,89</td>
<td>0,08</td>
<td>0,80</td>
</tr>
<tr>
<td>X₃</td>
<td>11,47</td>
<td>0,08</td>
<td>3193,98</td>
<td>0,00</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁X₂</td>
<td>1,72</td>
<td>0,37</td>
<td>0,29</td>
<td>0,77</td>
</tr>
<tr>
<td>X₁X₃</td>
<td>1,69</td>
<td>0,37</td>
<td>0,99</td>
<td>0,50</td>
</tr>
<tr>
<td>X₂X₃</td>
<td>0,00</td>
<td>0,98</td>
<td>0,70</td>
<td>0,49</td>
</tr>
</tbody>
</table>

X₁ – vrijeme tretiranja; X₂ (KONVENCIONALNA) – broja ponavljanja; X₂ (ULTRAZVUK) – amplitude; X₂ (MIKROVALOVI) – temperatura; X₂ (VISOKI TLAK) – tlak; X₃ – omjer otapala i uzorka
Tablica 7. Optimalni parametri ekstrakcije s obzirom na koncentraciju ukupnih fenola te njihove predviđene i dobivene vrijednosti

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tehnika ekstrakcije</th>
<th>Optimalni parametri</th>
<th>Predviđena koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.t.)</th>
<th>Dobivena koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.t.)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Vrijeme (min)</td>
<td>X₂</td>
<td>x (g) : 100 mL</td>
</tr>
<tr>
<td>KONVENCIONALNA</td>
<td>10</td>
<td>3ᵃ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>ULTRAZVUK</td>
<td>21</td>
<td>50ᵇ</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>MIKROVALOVI</td>
<td>2</td>
<td>80ᶜ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VISOKI TLAK</td>
<td>5</td>
<td>50⁰ᵈ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

a - broj ponavljanja; b - amplituda (%); c - temperatura (°C); d - tlak (MPa)

Tablica 8. Optimalni parametri ekstrakcije s obzirom na antioksidacijski kapacitet te njihove predviđene i dobivene vrijednosti

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tehnika ekstrakcije</th>
<th>Optimalni parametri</th>
<th>Predviđeni antioksidacijski kapacitet (%)</th>
<th>Dobiveni antioksidacijski kapacitet (%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Vrijeme (min)</td>
<td>X₂</td>
<td>x (g) : 100 mL</td>
</tr>
<tr>
<td>KONVENCIONALNA</td>
<td>18</td>
<td>2ᵃ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>ULTRAZVUK</td>
<td>12</td>
<td>100ᵇ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>MIKROVALOVI</td>
<td>2</td>
<td>55ᶜ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
<tr>
<td>VISOKI TLAK</td>
<td>1</td>
<td>50⁰ᵈ</td>
<td>1,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

a - broj ponavljanja; b - amplituda (%); c - temperatura (°C); d - tlak (MPa)
* vrijednost dobivena nakon 20 min ekstrakcije  
** vrijednost dobivena nakon 14 min ekstrakcije  
*** vrijednost dobivena na 80 °C  
**** vrijednost dobivena nakon 5 min ekstrakcije

5.1. Konvencionalna ekstrakcija uz refluks

Konvencionalna metoda ekstrakcije je provedena kao temeljna metoda koja se uobičajeno koristi u laboratorijima za ekstrakciju različitih spojeva iz biljnog materijala (Liu i sur., 2011). Pri konvencionalnoj ekstrakciji uz refluks istraživan je utjecaj vremena ekstrakcije, broja ponavljanja ekstrakcije dodatkom novog otapala te odnos mase uzorka i volumena otapala na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva te na antioksidacijsku aktivnost dobivenog ekstrakta. Rezultati mjerenja ukupnih fenola prikazani su na Slici 1., a zajednički
prikaz ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta je na Slici 2. Na dobivenim rezultatima proveden je ANOVA test uz 95 % -tni interval vjerojatnosti, rezultati testa prikazani su u Tablici 5. i 6.

Slika 1. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.t.) dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom uz reflaks iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g.

5.1.1. Utjecaj vremena ekstrakcije

Analiza varijance ANOVA testom pokazuje da vrijeme ekstrakcije statistički značajno (p<0,05) utječe na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih fenolnih spojeva, kao i kombinacija vremena ekstrakcije sa brojem ponavljanja i sa masom uzorka.

U uzorcima s masom 1,5 g (Slika 1.a) vidljiv je pad ekstrahiranih ukupnih fenola s vremenom ekstrakcije neovisno o broju ponavljanja ekstrakcije. Približno iste koncentracije fenola dobivene su ekstrakcijom u vremenu od 2 x 10 min i 2 x 20 min (59,86 i 59,08 mg GAE/g s.t.v.) dok se značajan pad koncentracije dobivenih fenola vidi u vremenu od 2 x 30 min (54,69 mg GAE/g s.t.). Može se zaključiti da nakon 40 min ekstrakcije dolazi do razgradnje djela biljnog materijala koji je izložen povišenoj temperaturi tijekom ekstrakcije uz reflaks pa je i koncentracija ekstrahiranih fenolnih spojeva manja. Do sličnih zaključaka došli su i Dragović – Uzelac i suradnici (2012) kada su istraživali uvjete ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kadulje. Ispitivali su utjecaj 3 različita vremena (30, 60, i 90 min) na koncentraciju ekstrahiranih fenola i kao najbolje vrijeme pokazao se vrijeme od 30 min. Prema tome

U uzorcima mase 3 g (Slika 1.b) utjecaj vremena je različit obzirom na broj ponavljanja ekstrakcije, a najbolji rezultat dobiven je u vremenu 2 x 20 min (63,04 mg GAE/g s.t.v.).

5.1.2. Utjecaj broja ponavljanja ekstrakcije

Broj ponavljanja ekstrakcije uz dodatak svježeg otapala kao zaseban parametar nema statistički značajan (p<0,05) utjecaj na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih fenola. Ali broj ponavljanja ekstrakcije statistički je značajan u kombinaciji sa vremenom ekstrakcije i masom uzorka.

5.1.3. Utjecaj mase uzorka

Istraživan je utjecaj odnosa mase uzorka (1,5 i 3 g) i volumena otapala (100 mL) ali nije dokazano da taj odnos statistički značajno (p<0,05) utječe na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih polifenola. Za kombinaciju utjecaja mase uzorka sa brojem ponavljanja ili vremenom tretiranja uočena je statistički značajna korelacija.

Tretmani uzoraka mase 1,5 g (Slika 1.a) s ponovljenom ekstrakcijom 2 puta rezultirali su s manjom koncentracijom ekstrahiranih ukupnih fenola u vremenu tretiranja 20 i 30 min (59,08 i 54,69 mg GAE/g s.t.v.) u odnosu na tretmane uzoraka mase 3 g (Slika 1.b) s istim brojem ponavljanja i vremenom ekstrakcije (63,04 i 57,31 mg GAE/g s.t.v.). Kod ove kombinacije parametara manji udio otapala pogoduje većoj koncentraciji ukupnih fenola u ekstraktu.

Suprotna je situacija sa 3 puta ponovljenom ekstrakcijom u vremenu od 10 i 20 min za masu uzorka 1,5 g gdje su dobivene veće koncentracije fenola (68,35 i 57,42 mg GAE/g s.t.v.) nego pri istim uvjetima ekstrakcije iz mase uzorka od 3 g (57,96 i 54,17 mg GAE/g s.t.v.). Ako se promatraju uvjeti 2 i 3 ponavljanja po 10 min (68,35 i 57,96 mg GAE/g s.t.v.) veći
udio otapala daje neznatno veću koncentraciju fenolnih spojeva u ekstraktu. Prema navedenom može se zaključiti da masa uzorka utječe na uspjeh ekstrakcije, ali statistički značajno (p<0,05) tek u kombinaciji sa drugim uvjetima ekstrakcije. Souilem i suradnici (2017) u svom preglednom radu gdje su se bavili ekstrakcijom vrijednih spojeva iz lista masline i njihovom primjenom u prehrabrenoj industriji, navode kako se povećanjem udjela otapala povećava udio polifenolnih spojeva u ekstraktu, što se slaže s većim djelom dobivenih rezultata.

5.1.4. Antioksidacijski kapacitet

a)

Slika 2. Zajednički prikaz koncentracije ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) i antioksidacijskog kapaciteta (%) dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom uz reflux iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g.
Izmjereni antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline djelomično prati koncentraciju detektiranih fenolnih spojeva u istom ekstraktu (Slika 2.). Proporcionalna korelacija uočena je na uzorcima R7, R11 i R9 mase 1,5 g gdje pad koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva (57,42, 56,95 i 54,69 mg GAE/g s.t.v.) slijedi i pad antioksidacijske aktivnosti (36,28, 34,76 i 31,05 %). Uzorci R5, R3 i R1 dobiveni u kraćem ukupnom vremenu ekstrakcije (20x2, 10x3 i 10x2 min) pokazuju izraženija antioksidacijska svojstava u odnosu na uzorke dobivene kroz dulje vrijeme ekstrakcije ali nema potpune korelacije između ukupnih fenolnih spojeva i izmjerenog kapaciteta antioksidacije. Iz toga proizlazi pretpostavka da se osim fenolnih spojeva iz lista masline konvencionalnom metodom uz reflux ekstrahiraju još neki antioksidansi koji dužim vremenom ekstrakcije gube svoju aktivnost, a u kraćem vremenu ekstrakcije pridonose izmjerenoj antioksidacijskom kapacitetu.

Uzorci mase 3 g pokazuju nešto manji antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke mase 1,5 g, a razlika u antioksidacijskom kapacitetu među uzorcima je jako mala. Ipak i u ovim uzorcima (R4, R2, R6, R12, R10 i R8) je izmjerena veći antioksidacijski kapacitet (31,90, 31,33 i 31,17 %) ako je ekstrakcija provođena kraće vrijeme 10x3, 10x2 i 20x2 min, nego kada je provođena duže vrijeme 30x3, 30x2 i 20x3 min (30,98, 30,96 i 29,26 %). U uzorcima s manjim udjelom otapala nije uočena korelacija između koncentracije ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu.

Prema statistički dobivenim podacima ANOVA testom (Tablica 2.) ni jedan od primijenjenih parametara ekstrakcije ne utječe značajno (p<0,05) na antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta s koncentracijom ukupnih fenol prikazana je na Slici 3., ali koeficijent determinacije je 0,3057 prema čemu se vidi da se tek 30 % rezultata je linearno ovisno. Do slične spoznaje došli su i Mylonaki i suradnici (2008) kada su istraživali ovisnost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola u listu masline pri različitim uvjetima ekstrakcije uz miješanje. U ovisnost su stavili antioksidacijski kapacitet i koncentraciju fenolnih spojeva onog ekstrakta koji je pokazao najveće vrijednosti jednog i drugog pri čemu su dobili koeficijent determinacije 0,273.
Slika 3. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola za uzorke dobivene konvencionalnom ekstrakcijom uz refluks

5.1.5. Optimalni uvjeti ekstrakcije

Optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva konvencionalnom metodom uz refluks prikazani su u Tablici 7. Prema metodi odzivnih površina najveća koncentracija fenolnih spojeva (67,66 mg GAE/g s.t.v.) ekstrahirat će se iz uzorka sa 1,5 g lista masline za vrijeme od 10 minuta uz ponavljanje ekstrakcije 3 puta. Eksperimentalno najveća koncentracija ukupnih fenola (68,35 mg GAE/g s.t.v.) dobivena je upravo pri optimalnim uvjetima ekstrakcije u nešto većoj koncentraciji od predviđene. Jednadžba regresijskog modela za predviđanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta lista masline prikazana je u Tablici 10. Koeficijent determinacije je 0,916 što upućuje da model odgovara postavljenim parametrima analize najboljih uvjeta ekstrakcije. Prema statističkom modelu predviđanja za antioksidacijsku aktivnost dobivenog ekstrakta optimalni uvjeti ekstrakcije (Tablica 8.) su masa uzorka 1,5 g, vrijeme ekstrakcije 18 min uz 2 ponavljanja. Pri tim uvjetima predviđeni antioksidacijski kapacitet je 45,77 %. Obzirom da ekstrakcija u vremenu od 18 x 2 min nije provedena eksperimentalno uspoređeni su eksperimentalni rezultati dobiveni u vremenu 20 x 2 koji su najbliži statističkim uvjetima. Eksperimentalno dobiveni antioksidacijski kapacitet je 47,64 %, nešto veći od predviđenog ali je i vrijeme 2 x 2 min duže od predviđenog.

Optimalni uvjeti ekstrakcije za antioksidacijski kapacitet i koncentraciju fenolnih spojeva su različiti. Za ekstrakciju najveće količine fenolnih spojeva potrebno je kraće...
vrijeme (10 min x 3) ekstrakcije od potrebnog vremena za postizanje najvećeg antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta (18 min x 2).

5.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Primjenom ove metode ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline ispitivan je utjecaj vremena, amplitude i omjera mase i otapala na koncentraciju ekstrahiranih fenolnih spojeva te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta. Dobiveni rezultati ekstrahiranih fenolnih spojeva prikazani su na Slici 4., a odnos koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta prikazan je na Slici 5. Rezultati su statistički obrađeni ANOVA testom uz 95 %-ni interval vjerojatnosti i prikazani u Tablici 5. i 6.

Slika 4. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g

5.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije

Analiza varijance ANOVA testom je pokazala da vrijeme ekstrakcije statistički značajno (p<0,05) utječe na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih fenola. U uzorcima mase 1,5 g (Slika 4.a) i 100 % amplitude povišenjem temperature (7, 14, 21 min) proporcionalno raste koncentracija ukupnih fenola (59,21, 62,42, 63,64 mg GAE/g s.tv.). U preostalim provedenim tretmanima na uzorcima mase 1,5 g i 50 % amplitude te uzorcima mase 3 g (Slika 4.b) i amplitudama 50 i 100 % koncentracija fenolnih spojeva u vremenu od 14 min odstupa od linearnog rasta i manja je u odnosu na koncentraciju ekstrahiranih fenola u

5.2.2. Utjecaj amplitude

Postotak primijenjene amplitude ultrazvuka pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz lista masline nije statistički značajno (p<0,05) utjecao na koncentraciju ekstrahiranih fenola. Isto su zaključili Sanchez i suradnici (2007) kada su ispitivali parametre koji utječu na ekstrakciju tirterpena iz lista masline. Ali kombinacija amplitude ultrazvuka i vremena ekstrakcije pokazuje statistički značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola kao i kombinacija amplitude i mase uzorka. Uzorci mase 1,5 g (Slika 4.a) na koje je primijenjena amplituda od 50 % (56,06, 52,48 i 62,56 mg GAE/g s.t.) dali su manje fenola nego oni koji su tretirani sa 100 % amplitude (59,21, 62,42 i 63,64 mg GAE/g s.t.).

U uzorcima mase 3 g (Slika 4.b) vidljiv je različit utjecaj vremena i amplitude na koncentraciju ukupnih fenola. Za vrijeme ekstrakcije u trajanju 7 min više fenola je dobiveno tretiranjem uzorka sa 100 % amplitude. Bolji rezultati postignuti su primjenom 50 % amplitude pri ekstrakcijama koje su trajale 14 i 21 min. Ahmad-Qasem i suradnici (2013) u svom istraživanju najboljih parametara ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline potpomognute ultrazvukom dobili su gotovo identičan rezultat. Najboljom se pokazala primjena 100 % amplitude (snaga ultrazvuka je 400 W) na masu uzorka 6,25 g u 200 mL korištenjem ultrazvučne sonde od 3,8 cm², a vrijeme tretmana je 15 min. Pri tim uvjetima ekstrahirano je 66 mg GAE/g s.t. U ovom radu ista koncentracija fenolnih spojeva dobivena je u vremenu od 21 min, ali pri 50 % amplitude što potvrđuje podatak da amplitude u kombinaciji s vremenom ima utjecaj na ekstrakciju polifenola. Potrebno je dodatno istražiti koji parametar bi više smanjio troškove ekstrakcije kraće vrijeme ekstrakcije ili manja amplituda ultrazvuka.
5.2.3. Utjecaj mase uzorka

Promjena mase uzorka nema statistički značajan utjecaj (p<0,05) na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih fenola iz lista masline. Zanimljivo je da ni masa uzorka ni amplituda ako se promatraju kao zasebni parametri nemaju statistički značajnog utjecaja na koncentraciju ekstrahiranih fenola, ali u kombinaciji njihov je utjecaj statistički značajan i opisan u poglavlju „Utjecaj amplitude“. Obzirom da povećanje količine otapala nema značajan utjecaj na koncentraciju ekstrahiranih fenola moguća je ušteda na otapalu ukoliko se koristi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

5.2.4. Antioksidacijski kapacitet

![Slika 5. Zajednički prikaz koncentracije ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) i antioksidacijskog kapaciteta (%) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g]
U uzorcima mase 1,5 g i 3 g (Slika 5.) vidljiva je aktivnost samo do određene granice. Odnosno vidljiva je ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o masi uzorka ali ne i o koncentraciji ekstrahiranih ukupnih fenola iz uzorka. Prema provedenom ANOVA testu (Tablica 6.) također je jedini parametar ekstrakcije koji statistički značajno (p<0,05) utječe na antioksidacijski kapacitet uzorka, upravo masa uzorka. Veća je aktivnost zabilježena u uzorcima s većim udjelom otapala (46,40 % – 47,75 %) u odnosu na uzorke s dvostrukom manjim udjelom otapala (31,36 % - 32,10 %). Prema tome, u uzorcima s manjim udjelom otapala U4, U6, i U8 su razlike u antioksidacijskom kapacitetu neznatne.

Prema Slici 6. vidljivo je da nema linearnje ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta uzorka o koncentraciji fenolnih spojeva u uzorku obzirom da je koeficijent determinacije izuzetno nizak 0,0303.

![Slika 6. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola za uzorke dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom](image)

5.2.5. **Optimalni uvjeti ekstrakcije**

Jednadžba regresijskog modela ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za koncentraciju ukupnih fenola prikazana je u Tablici 9. zajedno s koeficijentom determinacije. Izračunati koeficijent determinacije (R² = 0,863) veći je od 0,8 te dokazuje da je korišteni model prikladan za predviđanje koncentracije fenolnih spojeva dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva ultrazvukom prikazani su u Tablici 7. Prema metodi odzivnih površina optimalni uvjeti za ekstrakciju su vrijeme od 21 minute, 50 % amplitude ultrazvuka te masa uzorka 3 g. Modelom je predviđeno
da će se pri navedenim uvjetima ekstrahirati fenolni spojevi u koncentraciji 66,47 mg GAE/g s.t.v. Eksperimentalno dobivena koncentracija fenolnih spojeva (66,49 mg GAE/g s.t.v.) pri optimalnim uvjetima odgovara predviđenoj koncentraciji prema regresijskom modelu.

U Tablici 10. prikazana je jednadžba regresijskog modela za predviđanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta, njezin koeficijent determinacije je 0,999 prema čemu model odlično odgovara uvjetima analize. Najveća aktivnost antoksidanasa postignuta je za vrijeme ekstrakcije od 12 min pri amplitudi ultrazvuka od 100% te s uzorkom mase 1,5 g (Tablica 8). Pri optimalnim uvjetima predviđena je antioksidacijska aktivnost od 47,69 %, a eksperimentalno je ta vrijednost postignuta u vremenu od 14 min (47,56 %).

Optimalni parametri ekstrakcije za postizanje najbolje antioksidacijske aktivnosti spojeva iz ekstrakta dobiveni regresijskim modelom sasvim su različiti od optimalnih uvjeta ekstrakcije najveće koncentracije fenolnih spojeva. Za postizanje najveće antioksidacijske aktivnosti potrebno je kraće vrijeme, veća amplituda i manja masa uzorka.

5.3. **Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Estrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE) istraživan je utjecaj vremena ekstrakcije, temperature i mase uzorka (omjer uzorka i otapala) na količinu ukupnih ekstrahiranih fenola. Rezultati mjerenja ukupnih fenola prikazani su na Slici 7., a Slika 8. je zajednički prikaz antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni, a rezultati ANOVA testa prikazani su u Tablici 5. i 6., jednadžbe regresijskog modela prikazane su u Tablici 9. i 10., a optimalni parametri ekstrakcije u Tablici 7. i 8.
5.3.1. Utjecaj vremena ekstrakcije

Rezultati ANOVA testa (Tablica 5.) pokazuju da vrijeme ekstrakcije ima statistički značajan učinak (p<0,05) na ekstrakciju fenola. Ovakav rezultat nije iznenađujući s obzirom da su Kala i sur. (2016) zaključili da je vrijeme jedan od tri najosjetljivija parametra ekstrakcije. U svim uzorcima mase 1,5 g može se uočiti da je povećanjem vremena ekstrakcije količina ekstrahiranih fenola sve manja. Ekstrakcijom u trajanju od 2 minute postignuta je veća količina ukupnih fenola nego ekstrakcijom u trajanju od 8,5 i 15 minuta. Koncentracije ukupnih fenola svih uzoraka kreću se u rasponu od 54,82 mg GAE/g s.tv. do 68,12 mg GAE/g s.tv. pri čemu je najmanja vrijednost postignuta nakon 15 minuta ekstrakcije, a najveća nakon 2 minute. U uzorcima mase 3 g i temperature od 45 °C postiže se veća količina ekstrahiranih fenola nego ekstrakcijom u trajanju od 8,5 min (63,35 mg GAE/g s.tv.) nego ekstrakcijom u trajanju od 2 i 15 min. U uzorcima mase 3 g i temperature od 80 °C količina ekstrahiranih fenola je podjednaka ekstrakcijom u trajanju od 2 i 8,5 min, dok nakon 15 minuta dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je vrijeme ekstrakcije od 2 min optimalan parametar, budući da se postiže najveća koncentracija ekstrahiranih fenola koja daljnjim prodljenjem ekstrakcije stagnira ili se smanjuje. Nakon 15 minuta ekstrakcije dobivene vrijednosti su najmanje, bez obzira na ostale parametre, što upućuje na degradaciju fenolnih.

Slika 7. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz mase uzorka a) 0,75 g i b) 1,5 g

Chan i sur. (2016) postavili su teorijski model prema kojem se kao optimalno vrijeme MAE može smatrati prosječno vrijeme potrebno za zagrijavanje unutarstanične vlage od početne faze do faze puknuća stanice. Naime, osušeni biljni materijal korišten za ekstrakciju sadrži malu količinu vlage i kako se mikrovalna energija apsorbira i zatim prevodi u toplinu, vlaga počinje isparavati. Isparavanje stvara tlak u stanici što na kraju dovodi do puknuća stanice čime se olakšava izlučivanje aktivnih spojeva u otapalo i poboljšava učinak ekstrakcije (Ballard i sur., 2010). Postigli su izvrsno podudaranje eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti koje je neovisno o snazi mikrovala, volumenu otapala, omjeru otapala i uzorka i vrsti mikrovalnog sustava. Prema tom modelu za parametre koji su najsličniji našima (300 W, 85 % EtOH, 50 mL/g) optimalno vrijeme je 5,4 min. Međutim, ovaj model vrijedi samo na omjerima otapala i uzorka do 50 mL/g, budući da učinak gibanja biljnih čestica tijekom zagrijavanja nije uzet u obzir. Ovaj teorijski model dokazuje da je mehanizam puknuća stanice dominantan u MAE bioaktivnih spojeva iz biljaka, no postoje ograničenja za njegovu upotrebu.

5.3.2. Utjecaj temperature

Temperatura ne utječe značajno (p>0,05) na količinu ukupnih fenola, ekstrahiranih iz lista masline. Ekstrakcijom na višoj temperaturi ekstrahirna se podjednaka količina fenola kao i ekstrakcijom na nižoj temperaturi. No interakcija vremena i temperature ima statistički značajan učinak (p<0,05) na ekstrakciju ukupnih fenola. Vrijeme ekstrakcije izuzetno je važan parametar ekstrakcije fenolnih spojeva jer samo nekoliko sekundi duže izloženosti mikrovalovima iznad optimalnog vremena može biti dovoljno da se željeni analit uništi. Kao što je već rečeno, vrijeme ekstrakcije i temperatura su duboko povezani pa uzimajući u obzir vrijeme, uvijek u obzir treba uzeti i temperaturu. Može se primijetiti da je u svim uzorcima u kojima je ekstrakcija trajala 2 minute, povećanjem temperature s 45 °C na 80 °C količina ekstrahiranih fenola porasla. U uzorcima s masom od 1,5 g porast je bio s 59,60 na 68,19 mg GAE/g s.tv., a u uzorcima s masom od 3 g s 56,95 na 60,99 mg GAE/g s.tv.. Ovi rezultati u skladu su s očekivanjima, jer znamo da viša temperatura poboljšava difuziju otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanje željenih komponenta čime se postiže bolji

Viša temperatura osim što poboljšava učinak ekstrakcije, može dovesti do degradacije temperaturno osjetljivih spojeva kao što su fenoli ukoliko je vrijeme izloženosti duže od optimuma. Upravo to može se primijetiti u uzorcima u kojima je ekstrakcija trajala 8,5 min jer je na temperaturi od 80 °C ekstrahirana manja količina fenola. Koncentracija ukupnih fenola na temperaturi od 45 °C iznosila je 59,08 mg GAE/g s.tv. za uzorak mase 1,5 g i 63,35 mg GAE/g s.tv. za uzorak mase 3 g, dok je na temperaturi od 80 °C koncentracija smanjena na 57,39 odnosno 60,62 mg GAE/g s.tv.. Na temelju literaturnih podataka, za očekivati je bilo da će viša temperatura rezultirati većom koncentracijom fenola budući da je temperatura od 45 °C relativno niska za temperaturnu degradaciju. Tome u prilog idu rezultati istraživanja Zhanga i sur. (2008) koji su ekstrahirali klorogensku kiselinu iz cvjetnih pupoljaka biljke Lonicera japonica Thunb. Prinos klorogenske kiseline na temperaturi od 80 °C naglo je porastao u prvih 5 minuta, dosegnuo je vrijednost od 6,14 % i tijekom svih 30 minuta ekstrakcije zadržao se otprilike na toj razini. Upotrebom temperature od 45 °C prinos klorogenske kiseline u prvih 5 minuta bio je značajno niži, oko 3,2 %, i tek nakon 30 minuta ekstrakcije dosegnuo je vrijednost od 6 %. Spigno i De Faveri (2009) proveli su mikrovalnu ekstrakciju fenola iz crnog čaja što je rezultiralo postignutom koncentracijom ukupnih fenola nižom od 500 mg GAE/L na temperaturi od 45 °C, dok na temperaturi od 80 °C ona iznosi 1200 mg GAE/L. Dragović – Uzelac i sur. (2012) u ekstrakciji polifenola iz kadulje, kao optimalne parametre dobili su temperaturu od 80 °C, vrijeme od 9 min i snagu mikrovalova od 500 W.
5.3.3. Utjecaj mase uzorka

Masa uzoraka ne pokazuje statistički značajan utjecaj (p>0,05) na količinu ukupnih fenola. Ekstrakcijom dvostruko veće količine uzorka dobije se podjednaka količina fenola kao i ekstrakcijom dvostruko manje mase. Međutim kombinacija vremena i mase uzorka ima statistički značajan učinak (p<0,05) na ekstrakciju ukupnih fenola. Može se primijetiti da se ekstrakcijom u trajanju od 2 min postiže veća količina ukupnih fenola uporabom mase od 1,5 g odnosno upotrebom veće količine otapala. Povećanjem mase uzorka s 1,5 na 3 g, uz stalan volumen otapala, količina ukupnih fenola smanjila se s 59,6 na 56,95 mg GAE/g s.tv. na temperaturi od 45 °C, odnosno s 68,19 na 60,99 mg GAE/g s.tv. na temperaturi od 80 °C. Karakteristično za konvencionalne ekstrakcijske tehnike je da veća količina otapala uvijek poboljšava učinak ekstrakcije jer je povećan koncentracijski gradijent koji je pokretačka sila (Spigno i De Faveri, 2009). Takav učinak obrazložen je u znanstvenoj literaturi i za MAE, međutim zabilježen je i suprotan, negativni učinak kada povećanje količine otapala negativno utječe na koncentraciju ekstrahiranih polifenola. Ovaj pozitivan učinak može se objasniti time da povećanje mase uzorka (uz zadržavanje istog volumena otapala) smanjuje dostupnu površinu za prodiranje otapala u unutrašnjost stanice i otapanje polifenola time uzrokujući smanjenje učinka ekstrakcije polifenola (Ballard i sur., 2010). Isti autori ekstrahirali su polifenole iz pokožice kikirikija i zapazili su da se ekstrakcijom od samo 30 sekundi, povećanjem mase uzorka s 1,5 na 3,5 g uz konstantni volumen otapala (37,5 mL) koncentracija ukupnih fenola smanjila za 35,8 %. I Pan i sur. (2003) su zabilježili porast koncentracije ukupnih fenola s povećanjem volumena otapala od 10 mL/g na 25 mL/g u ekstrakciji fenola iz zelenog čaja upotrebom mikrovalova. Iz navedenih literaturnih podataka može se zaključiti da je zbog smanjene površine dostupne za prodiranje otapala, vrijeme od 2 minute prekratko za uspješnu ekstrakciju polifenola upotrebom veće mase (3 g), odnosno upotrebom manje količine otapala.

Negativan učinak, smanjenje učinka ekstrakcije s povećanjem volumena otapala, može se vidjeti u uzorcima u kojima je ekstrakcija trajala 8,5 min. U njima je povećanjem mase uzorka s 1,5 na 3 g, količina ukupnih fenola porasla s 59,08 na 63,35 mg GAE/g s.tv. na temperaturi od 45 °C, odnosno s 57,39 na 60,62 mg GAE/g s.tv. na temperaturi od 80 °C. Ekstrakcijom u trajanju od 15 min postiže se podjednaka količina ukupnih fenola uporabom mase od 3 g i mase od 1,5 g u rasponu od 54,82 do 57,14 mg GAE/g s.tv. Promjena u volumenu otapala može djelovati na apsorpciju mikrovalne energije pa upotreba veće količine otapala može smanjiti učinak ekstrakcije. Mikrovalovi će se apsorbirati u otapalu i dovoljna količina mikrovalova možda neće dosegnuti biljni materijal i djelovati ne unutarnje
zagrijavanje, a posljedica toga je da je mehanizam puknuća stanica spriječen (Kala i sur., 2016). Xiao i sur. (2008) 10 minuta su ekstrahirali flavonoide iz tradicionalne kineske začinske biljke *Radix Astragali* varirajući omjer otapala i uzorka (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mL/g). Zabilježili su rast koncentracije ekstrahiranih flavonoida do maksimuma od 1,019 mg/g pri 30 mL/g. Daljnjim povećanjem volumena otapala u odnosu na uzorak došlo je do smanjenja učinka ekstrakcije jer je veliki volumen otapala uzrokovao pretjerano bubrenje biljnog materijala i apsorbirao mikrovalove. Isti rezultat zabilježili su i Dahmoune i sur. (2015) ekstrakcijom polifenola iz lišća mirte (*Myrtus communis*), povećanjem omjera otapala i uzorka s 30 mL/g na 40 mL/g koncentracija ukupnih fenola se smanjila s 162,34 ± 5,11 na 152,70 ± 5,00 mg GAE/g. Unatoč smanjenoj površini koja je dostupna za prodor otapala, vrijeme od 8,5 minuta bilo je dovoljno za uspješnu ekstrakciju fenola upotrebom mase od 3 g zbog duže izloženosti uzorka mikrovalovima. Budući da je u industrijskom ekstrakcijskom procesu važno postići najveći učinak ekstrakcije uz minimalnu upotrebu otapala ovi rezultati idu tome u prilog.

5.3.4. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet svih uzoraka (Slika 8.) kreće se u rasponu od 43,32 % do 79,23 %, i najveće vrijednosti postižu se u uzorcima s masom od 1,5 g i u vremenu od 2 min, neovisno o temperaturi. Rezultati ANOVA testa (Tablica 6.) pokazuju da ni jedan od primijenjenih parametara ili kombinacija parametara nema statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Ukupni fenoli (mg GAE/g s.t.)</th>
<th>Antioksidacijski kapacitet (%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>M1 - 2 min; 45 °C</td>
<td>59,6</td>
<td>78,66</td>
</tr>
<tr>
<td>M3 - 2 min; 80 °C</td>
<td>68,19</td>
<td>79,23</td>
</tr>
<tr>
<td>M5 - 8,5 min; 45 °C</td>
<td>59,08</td>
<td>50,44</td>
</tr>
<tr>
<td>M7 - 8,5 min; 80 °C</td>
<td>57,39</td>
<td>56,56</td>
</tr>
<tr>
<td>M9 - 15 min; 45 °C</td>
<td>54,82</td>
<td>54,82</td>
</tr>
<tr>
<td>M11 - 15 min; 80 °C</td>
<td>57,1</td>
<td>57,10</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Slika 8. Zajednički prikaz koncentracije ukupnih fenola (mg GAE/g s.tv.) i antioksidacijskog kapaciteta (%) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g.

Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola prikazana je na Slici 9. Koeficijent determinacije $R^2$ iznosi 0,448, koeficijent korelacije $r$ je 0,67, a statistička značajnost koeficijenta korelacije $p = 0,017$. Budući da je $p<0,05$ može se reći da je koeficijent korelacije značajan i da se radi o srednje jakoj pozitivnoj korelaciji.

Slika 9. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola za uzorke dobivene ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima
5.3.5. Optimalni uvjeti ekstrakcije

Rezultati optimiranja procesa ekstrakcije potpomognute mikrovalovima s obzirom na koncentraciju ukupnih fenola prikazani su u Tablici 7. Vrijeme od 2 minute, temperatura od 80 °C i 1,5 g uzorka su parametri MAE kojima će se postići najveća koncentracija ukupnih fenola i prema predviđanjima ona iznosi 67,79 mg GAE/g s.tv.. Koncentracija ukupnih fenola dobivena eksperimentalno nešto je viša i iznosi 68,19 ± 3,15 mg GAE/g s.tv..

Usporedbom optimalnih parametara ekstrakcije temeljenih na koncentraciji ukupnih fenola (Tablica 7.) s onima temeljenima na antioksidacijskom kapacitetu (Tablica 8.), utvrdili smo da su vrijeme ekstrakcije od 2 min i masa uzorka od 1,5 g optimalni parametri u oba slučaja. Međutim postoji razlika u optimalnoj temperaturi ekstrakcije, koja s obzirom na ukupne fenole iznosi 80 °C, a s obzirom na antioksidacijski kapacitet 55 °C. Razliku u optimalnim parametrima ekstrakcije zabilježili su i Ballard i sur. (2010), kod njih su 90 % mikrovalne snage i 1,5 g uzorka bili optimalni parametri s obzirom na ukupne fenole i s obzirom na antioksidacijski kapacitet. Međutim, optimalno vrijeme ekstrakcije na temelju ukupnih fenola bilo je 30 s, a na temelju antioksidacijskog kapaciteta 150 s. Zaključili su da se više komponenti koje su sposobne za hvatanje slobodnih radikala, ekstrahira produženim vremenom ekstrakcije.

Ovi optimalni parametri potvrđuju glavnu prednost MAE u odnosu na konvencionalne ekstrakcijske tehnike, a to je skraćeno vrijeme ekstrakcije. Budući da je u industrijskom ekstrakcijskom procesu važno postići maksimalni učinak ekstrakcije u minimalnom vremenu, MAE ima veliki potencijal za industrijsku primjenu.

5.4. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom

Ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (HPE) u ovom radu istražen je utjecaj različitih parametara na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu lista masline. Na Slici 10. prikazani su rezultati mjerenja ukupnih fenola ovisno o primijenjenim parametrima ekstrakcije, a Slika 11. je zajednički prikaz antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola. Izmjerene koncentracije ukupnih fenola kreću se u rasponu od 48,21 do 67,81 mg GAE/g s.tv., a vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta su u rasponu od 23 % do 38 %. Rezultati statističke obrade prikazani su u Tablici 5. i pokazuju da su samo tlak ekstrakcije i masa uzorka statistički značajni parametri koji utječu na količinu ekstrahiranih fenola, dok vrijeme ekstrakcije, interakcije vremena i tlaka, vremena i mase uzorka i tlaka i mase uzorka nisu statistički značajni.
Slika 10. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/g s.t.v.) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom iz mase uzorka a) 0,75 g i b) 1,5 g

<table>
<thead>
<tr>
<th>Vrijeme (min)</th>
<th>300 MPa (mg GAE/g s.t.v.)</th>
<th>500 MPa (mg GAE/g s.t.v.)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1 min</td>
<td>52,16</td>
<td>62,23</td>
</tr>
<tr>
<td>5,5 min</td>
<td>50,35</td>
<td>67,81</td>
</tr>
<tr>
<td>10 min</td>
<td>55,80</td>
<td>59,67</td>
</tr>
</tbody>
</table>

5.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije

Može se primijetiti da se u gotovo svim uzorcima najveće vrijednosti koncentracije ukupnih fenola postižu nakon 8,5 minuta, osim u uzorcima mase 1,5 g i tlaka od 300 MPa gdje je najviše fenola ekstrahirano nakon 15 min, a najmanje nakon 8,5 min. Međutim, rezultati ANOVA testa (Tablica 5.) pokazuju da vrijeme ekstrakcije nema statistički značajan učinak (p>0,05) na ekstrakciju fenola. Ovakav trend zabilježen je i u drugim istraživanjima, ekstrakcijom različitih spojeva iz različitih biljaka. U ekstrakciji polifenola iz zelenog čaja, potpomognutoj visokim tlakom, Jun i sur. (2009) su istražili utjecaj vremena zadržavanja tlaka, u rasponu od 1 do 10 minuta, na koncentraciju ukupnih fenola. Rezultati mjerenja za 1, 4, 7 i 10 minuta su redom 29,5 ± 1,4, 30,7 ± 0,8, 31,2 ± 1,5 i 30,6 ± 1,3 %. Iako je nakon 7 minuta postignuta najveća koncentracija ukupnih fenola, ovi rezultati nisu statistički značajni (p>0,05) zbog čega je vrijeme od 1 minute odabrano kao optimum. I u HPE likopena iz rajčice (Jun, 2006), povećanjem vremena ekstrakcije s 1 na 10 minuta, količina ekstrahiranog likopena se nije statistički značajno promijenila (p<0,05) pa je vrijeme od 1 minute odabrano kao optimum. Vrijeme ekstrakcije nije statistički značajno ni u ekstrakciji flavonoida iz propolisa (Shouqin i sur., 2005), kao ni u ekstrakciji kirenola iz ljekovite biljke Siegesbeckia orientalis (Kim i sur., 2014).
Različiti tlak između unutarnje i vanjske strane stanice dovodi do povećanja propusnosti stanice čime bioaktivne tvari dolaze u dodir s otapalom. Vrijeme zadržavanja visokog tlaka važno je za postizanje ravnoteže tlaka između unutrašnjeg i vanjske strane stanice. Prema Pascalovom zakonu tlak se ravnomjerno i trenutačno prenosi na sav tretirani materijal, pa se ravnoteža u tlaku između unutrašnjeg i vanjskog dijela stanice može postići u kratkom vremenu zbog čega je ekstrakcijski proces brz, učinkovit i neovisan o vremenu zadržavanja tlaka.

5.4.2. Utjecaj tlaka

Rezultati ANOVA testa (Tablica 5.) pokazuju da primijenjeni tlak ima statistički značajan učinak (p<0,05) na ekstrakciju fenola iz lista masline. Povećanje tlaka s 300 MPa na 500 MPa u svim uzorcima rezultiralo je povećanom koncentracijom ukupnih fenola, neovisno o ostalim parametrima. Najveći porast u koncentraciji ukupnih fenola, s 50,35 na 67,81 mg GAE/g s.t., može se vidjeti u uzorcima s masom od 1,5 g i vremenom od 8,5 min. Po teoriji prijenosa mase, stanice koje su pod tlakom pokazuju povećanu propusnost. To znači da što je tlak veći, više otapala može ući u stanicu i više spojeva se može izlučiti u otapalo. Osim toga, u ekstrakcijskom procesu pod visokim tlakom povećanjem tlaka povećava se i topivost spojeva u otapalu (Jun, 2006). Sve ovo objašnjava zašto je povećanjem tlaka, povećana količina ekstrahiranih fenola. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Jun i sur. (2009) koji su ekstrahirali polifenole iz zelenog čaja i povećanjem tlaka sa 100 MPa na 600 MPa zabilježili su porast koncentracije fenola s 15 ± 1,4 na 30 ± 1,3 %. I u ekstrakciji likopena iz rajčice zabilježeni je isti trend, povećanjem tlaka sa 100 MPa na 500 MPa koncentracija likopena porasla je sa 18,19 ± 3.02 na 41,73 ± 3,07 mg/100 g (Jun, 2006). Povećanje tlaka utjecalo je i na koncentraciju flavonoida ekstrahiranih iz propolisa, gdje je povećanjem tlaka sa 100 MPa na 600 MPa koncentracija flavonoida porasla s 4,19 na 4,73% (Shouqin i sur., 2005).

5.4.3. Utjecaj mase uzorka

Masa uzorka pokazuje statistički značajan utjecaj (p<0,05) na količinu ukupnih fenola. Povećanje mase uzorka s 1,5 g na 3 g (uz zadržavanje iste količine otapala) imalo je negativan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola odnosno može se primijetiti da je u svim uzorcima s masom 1,5 g postignuta veća koncentracija u odnosu na uzorke s masom od 3 g. Jun i sur. (2009) proveli su HPE polifenola iz zelenog čaja primjenom tlaka od 500MPa u trajanju od 1 min, te su istražili utjecaj omjera otapala i uzorka, u rasponu od 10:1 do 25:1 (mL/g), na koncentraciju ukupnih fenola. Kada su povećali omjer otapala i uzorka s 10:1 na
25:1 (mL/g), koncentracija ukupnih fenola porasla je s $17 \pm 1,4$ na $30 \pm 1,3 \%$. Shouqin i sur. (2005) su povećanjem omjera uzorka i otapala s 1:5 na 1:45 (g/mL), zabilježili porast koncentracije ekstrahiranih flavonoida iz propolisa s 4,19 na 5,25 %. Navedeni rezultati potvrđuju i naše zaključke da je omjer otapala i uzorka važan za poboljšanje koncentracije ekstrahiranih fenola. Primjenom manje mase uzorka (1,5 g), omjer otapala u odnosu na uzorak je veći. Budući da je proces otapanja bioaktivnih spojeva u otapalu fizikalan proces, povećanjem količine otapala povećana je i prilika da bioaktivni spojevi dodu u kontakt s otapalom za ekstrakciju, što dovodi do većeg stupnja izlučivanja odnosno veće koncentracije ekstrahiranih spojeva (Jun i sur., 2009).

5.4.4. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet svih uzoraka (Slika 11.) kreće se u rasponu od 46 % do 75 %, i najveće vrijednosti postižu se u uzorcima s masom od 1,5 g, tlakom od 500 MPa u vremenu od 1 i 10 min. Rezultati ANOVA testa (Tablica 6.) pokazuju da ni jedan od primijenjenih parametara ili kombinacija parametara nema statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet.
Slika 11. Zajednički prikaz koncentracije ukupnih fenola (mg GAE/g s.t.) i antioksidacijskog kapaciteta (%) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom iz mase uzorka a) 1,5 g i b) 3 g.

Na Slici 10. prikazana je povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola. Koeficijent determinacije $R^2$ iznosi 0,000007, koeficijent korelacije $R$ je 0,003.

Slika 12. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i koncentracije ukupnih fenola za uzorke dobivene ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom.
5.4.5. Optimalni parametri

Optimalni parametri ekstrakcije potpomognute visokim tlakom koji će rezultirati najvećom koncentracijom ukupnih fenola iz lista masline prikazani su u Tablici 7. Optimizacija je provedena metodom odzivnih površina (RSM=Response Surface Method) i vrijeme od 5 minuta, tlak od 500 MPa i 1,5 g uzorka u 100 mL otapala su parametri HPE kojima će se, prema predviđanjima, postići koncentracija ukupnih fenola od 66,07 mg GAE/g s.t.v.. Koncentracija ukupnih fenola dobivena eksperimentalno nešto je viša i iznosi 67,81 ± 3,63 mg GAE/g s.t.v..

Usporedbom optimalnih parametara ekstrakcije temeljenih na koncentraciji ukupnih fenola (Tablica 7.) s onima temeljenima na antioksidacijskom kapacitetu (Tablica 8.), utvrdili smo da su tlak do 500 MPa i masa uzorka od 1,5 g optimalni parametri u oba slučaja. Međutim postoji razlika u optimalnom vremenu ekstrakcije, koje s obzirom na ukupne fenole iznosi 5 min, a s obzirom na antioksidacijski kapacitet 1 min.

Ovi optimalni parametri potvrđuju da je HPE prikladna metoda za brzu ekstrakciju fenola iz lišća masline. Zbog svoje brzine, sigurnosti i ekološke prihvatljivosti dobra je alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije u prehrambenoj industriji.

5.5. Usporedba ekstrakcijskih tehnika

Tablice 9. i 10. prikazuju jednadžbe regresijskih modela za koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline dobivenog konvencionalnom ekstrakcijom uz reflaks, ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, mikrovalovima i visokim tlakom. U ovim modelima, proučavani parametri ekstrakcije (vrijeme, omjer otapala i uzorka, amplituda, temperatura, tlak) su kombinirani u linearne, kvadratne i koeficijente interakcija, omogućujući predviđanje odziva promjenjive varijable (koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet) za bilo koje željeno vrijeme, omjer otapala i uzorka, amplitudu, temperaturu ili tlak. Prikladnost ovih modela provjerena je računanjem koeficijenta determinacije $R^2$, koji je omjer protumačenih i ukupnih odstupanja i prepisuje se modelu radije nego slučajnoj pogrešci. Smatra se da dobro prilagođeni model ne bi trebao imati $R^2$ manji od 0,8. Kao što se može vidjeti iz Tablica 9. i 10. svi modeli imaj $R^2$ veći od 0,8 što upućuje na njihovu prikladnost u predviđanju koncentracije ukupnih fenola.
Tablica 9. Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenti determinacije ($R^2$) za provedene ekstrakcije fenolnih spojeva različitim tehnikama ekstrakcije

<table>
<thead>
<tr>
<th>TEHNIKA EKSTRAKCIJE</th>
<th>MODEL</th>
<th>$R^2$</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Konvencionalna</td>
<td>$6.96062X_1 - 0.19078X_2^2 + 39.90428X_3 - 4.78389X_4 - 3.76212X_5X_2 + 0.09160X_3^2X_2 + 0.89740X_4X_3 - 0.01407X_4^3X_3 - 2.91911X_5X_3$</td>
<td>0.832</td>
</tr>
<tr>
<td>Ultrazvuk</td>
<td>$-2.31875X_1 + 0.10815X_2^2 - 0.00372X_3 + 13.75812X_4 + 0.04645X_5X_3 - 0.00188X_5^2X_2 - 1.62759X_6X_3 + 0.06147X_7^2X_3 - 0.08184X_8X_3$</td>
<td>0.863</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikrovalovi</td>
<td>$0.81494X_1 - 0.06401X_2^2 + 0.44612X_3 - 3.15873X_4 - 0.07821X_5 + 0.00387X_6^2X_2 + 1.85481X_7X_3 - 0.09206X_8X_3 - 0.05527X_9X_3$</td>
<td>0.839</td>
</tr>
<tr>
<td>Visoki tlak</td>
<td>$-4.49929X_1 + 0.45900X_2^2 + 0.05005X_3 - 0.40268X_4 + 0.01311X_5X_3 - 0.00131X_5^2X_2 + 0.13107X_6X_3 - 0.00879X_7^2X_3 - 0.00820X_8X_3$</td>
<td>0.892</td>
</tr>
</tbody>
</table>

$X_1$ – vrijeme tretiranja; $X_2$ (KONVENCIONALNA) – broja ponavljanja; $X_3$ (ULTRAZVUK) – amplituda; $X_4$ (MIKROVALOVI) – temperatura; $X_5$ (VISOKI TLAK) – tlak; $X_6$ – omjer otapala i uzorka

Tablica 10. Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenti determinacije ($R^2$) za antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline dobivenog različitim tehnikama ekstrakcije

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tehnika ekstrakcije</th>
<th>Model</th>
<th>$R^2$</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Konvencionalna</td>
<td>$12.51449X_1 - 0.33056X_2^2 + 32.90436X_3 + 0.60242X_4 - 3.84574X_5X_3 + 0.09392X_6^3X_3 - 1.12124X_7X_3 + 0.03551X_8X_3 - 0.08666X_9X_3$</td>
<td>0.916</td>
</tr>
<tr>
<td>Ultrazvuk</td>
<td>$-0.05378X_1 - 0.00402X_2^2 - 0.00935X_3 - 10.30556X_4 + 0.00275X_5X_2 - 0.00007X_5^2X_2 + 0.00161X_6X_3 + 0.00154X_7^2X_3 - 0.00614X_8X_3$</td>
<td>0.999</td>
</tr>
<tr>
<td>Mikrovalovi</td>
<td>$-0.15480X_1 + 0.00641X_2^2 - 0.00226X_3 - 0.22948X_4 + 0.00043X_5X_2 - 0.00002X_5^2X_2 + 0.04431X_6X_3 - 0.00192X_7^2X_3 + 0.00064X_8X_3$</td>
<td>0.962</td>
</tr>
<tr>
<td>Visoki tlak</td>
<td>$-0.09077X_1 + 0.00456X_2^2 + 0.00118X_3 + 0.01806X_4 - 0.00028X_5X_2 - 0.00003X_6X_3 + 0.06810X_7X_3 - 0.00580X_8X_3 - 0.00031X_9X_3$</td>
<td>0.884</td>
</tr>
</tbody>
</table>

$X_1$ – vrijeme tretiranja; $X_2$ (KONVENCIONALNA) – broja ponavljanja; $X_3$ (ULTRAZVUK) – amplituda; $X_4$ (MIKROVALOVI) – temperatura; $X_5$ (VISOKI TLAK) – tlak; $X_6$ – omjer otapala i uzorka

Slika 14. Prikazuje trodimenzionalne prikaze odzivnih površina za ovisnost koncentracije fenolnih spojeva o specifičnom parametru za svaku tehniku (broj ponavljanja, amplituda, temperatura i tlak) i o vremenu ekstrakcije koji je zajednički parametar svim tehnikama. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o specifičnom parametru za svaku tehniku prikazan je na Slici 13. Na temelju prikazanog vidljivo je kako vrijeme ekstrakcije različito utječe na koncentraciju fenola svake
tehnika. Pri ekstrakciji uz reflux i ekstrakcij uz mikrovalove kraće vrijeme pogoduje većoj koncentraciji ekstrahiranih fenola, sasvim suprotno ekstrakcijom uz ultrazvuk najviše je fenola ekstrahirano kroz dulje vrijeme a pri ekstrakciji visokim tlakom promjena koncentracije fenola s vremenom ekstrakcije je vrlo blaga.

Provedba ekstrakcija pri utvrđenim optimalnim uvjetima (Tablica 7.) daje mogućnost usporedbe učinka svih tehnika međusobno Koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva su podjednake u sve četiri istraživane tehnike ekstrakcije, ali se razlika vidi u antioksidacijskom kapacitetu tih ekstrakata (Slika 13.). Nepodudarnost koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta zapažena je i od drugih autora koju tumače na različite načine. Javanmardi i suradnici (2003) navode da antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata može potjecati i od drugih spojeva koji se mogu ekstrahirati, npr. hlapljiva ulja, karotenoidi i vitamini. Suprotno tome, Everette i suradnici (2010) navode da Folin-Ciocalteu reagens nije dovoljno specifičan te može reagirati i s drugim spojevima kao što su proteini, tioli, mnogi vitamini, anorganski ioni Fe^{2+}, Mn^{2+}, I, i SO_{3}^{2-}, nukleotidna baza guanin, trioze glicerakheid i dihidroksiaceton, koji nemaju svi antioksidacijsku aktivnost. Osim toga, nemaju svi polifenolni spojevi istu antioksidacijsku aktivnost, npr. antioksidacijska aktivnost oleuropeina 0,88 ± 0,09, rutina je 2,75 ± 0,05 mM, luteolina 2,25 ± 0,11 mM a tirosola 0,035 ± 0,5 mM (Benavente-Garcia i sur. 2010). Do sada navedeni radovi upućuju da kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakta ovisi o primijenjenoj tehnici i uvjetima ekstrakcije obzirom da ekstrakcija može biti različito učinkovita za pojedine spojeve, a također može doći i do promjene u njihovoj strukturi npr. fenolnih spojeva. Uvjerljivo najveći antioksidacijski kapacitet imaju oni ekstrakti koji su ekstrahirani uz pomoć mikrovalova, slijede ih oni dobiveni visokim tlakom, a poprilično zaostaju oni ekstrahirani pomoću ultrazvuka i oni konvencionalnom metodom. Osim što su ekstrahirani spojevi zadržali veći stupanj sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, ekstrakcija mikrovalovima i visokim tlakom iznimno je kratko trajala. Bez obzira na manju antioksidacijsku aktivnost ekstrahiranih spojeva ultrazvuku u prilog, obzirom na konvencionalnu ekstrakciju, ide kratko vrijeme ekstrakcije i manji udio otapala koji su potrebni za gotovo isti učinak. Prema navedenim pokazateljima ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline najučinkovitija je ako je potpomognuta mikrovalovima.

45
**Slika 13.** Ovisnost antioksidacijskog kapaciteta i ukupnih fenola ekstrahiranih pri optimalnim uvjetima sa 4 različite tehnike ekstrakcije

<table>
<thead>
<tr>
<th>Ukupni fenoli (mg GAE/g s.t.)</th>
<th>Antioksidacijski kapacitet (%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Refluks</td>
<td>Ultražvuk</td>
</tr>
<tr>
<td>68,35</td>
<td>66,49</td>
</tr>
<tr>
<td>23,57</td>
<td>26,65</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Slika 8.** Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktu lista masline dobivenog ekstrakcijom (a) uz refleks u ovisnosti o broju ponavljanja i vremenu; potpodom gnutom (b) ultrazvukom u ovisnosti o amplitudi i vremenu; (c)
mikrovalovima u ovisnosti o temperaturi i vremenu; (d) visokim tlakom u ovisnosti o tlaku i vremenu.

Slika 95. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet u ekstraktu lista masline dobivenog ekstrakcijom (a) uz refluks u ovisnosti o broju ponavljanja i vremenu; potpomognutom (b) ultrazvukom u ovisnosti o amplitudi i vremenu; (c) mikrovalovima u ovisnosti o temperaturi i vremenu; (d) visokim tlakom u ovisnosti o tlaku i vremenu.
6. ZAKLJUČCI

- Pri konvencionalnoj ekstrakciji uz refluks svi ispitani parametri imaju podjednak utjecaj na koncentraciju ekstrahiranih fenolnih spojeva iz lista masline. Iz optimizacije procesa proizlazi da se najbolji rezultati dobiju sa 3 puta ponovljenom ekstrakcijom u trajanju od 10 min s masom uzorka 1,5 g.

- Pri konvencionalnoj ekstrakciji uz refluks ni jedan ispitivan parametar ekstrakcije ne utječe statistički značajno na antioksidacijski kapacitet ekstrakta. Iz optimizacije procesa proizlazi da se najbolji rezultati dobiju sa 2 puta ponovljenom ekstrakcijom u trajanju od 18 min s masom uzorka 1,5 g.

- Pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom statistički najznačajniji parametar za koncentraciju ekstrahiranih fenolnih spojeva je vrijeme ekstrakcije. Iz optimizacije procesa proizlazi da se najbolji rezultat dobije ako se uzorkak mase 3 g tretira 21 min sa 50 % amplitude ultrazvuka. Ovom tehnikom ekstrakcije je smanjeno vrijeme ekstrakcije i utrošak otapala u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju za neznatno manju koncentraciju ukupnih fenola.

- Pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom jedini statistički značajan parametar za antioksidacijski kapacitet ekstrakta je masa uzorka. Iz optimizacije procesa proizlazi da se najbolji rezultati dobiju tretiranjem uzorka mase 1,5 g ultrazvukom sa 100 % amplitude u trajanju od 12 min. Vrijeme ekstrakcije je smanjeno na više od pola vremena potrebnog za konvencionalnu ekstrakciju za isti antioksidacijski kapacitet ekstrakta.

- Vrijeme ekstrakcije, interakcija vremena i temperature te vremena i mase uzorka, imaju statistički značajan učinak na ekstrakciju fenola. Rezultati pokazuju da je primjena veće temperature u kraćem vremenu vjerojatno najučinkovitiji način ekstrakcije polifenola iz lista masline jer produženjem vremena izloženosti mikrovalovima može dovesti do temperaturnog uništenja fenola. Vrijeme od 2 minute, temperatura od 80 °C i masa uzorka 1,5 g su parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima kojima će se postići najveća koncentracija ukupnih fenola.
Vrijeme, temperatura ni masa uzorka, kao ni kombinacije ovih parametara nemaju statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Vrijeme od 2 minute, i masa uzorka 1,5 g su optimalni parametri i s obzirom na antioksidacijski kapacitet, ali optimalna temperatura je 55 °C. Ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o koncentraciji ukupnih fenola pokazuje srednju jaku pozitivnu korelaciju, ali samo 45 % antioksidacijskog kapaciteta lista masline potječe od fenolnih spojeva. Iz toga može se zaključiti da antioksidacijska aktivnost biljnih ekstrakata nije ograničena samo na fenole.

Tlak ekstrakcije i masa uzorka statistički su značajni parametri koji utječu na količinu ekstrahiranih fenola ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom. Povećanje tlaka pokazuje pozitivan, a povećanje mase u odnosu na otapalo negativan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola. Vrijeme od 5 minuta, tlak od 500 MPa i masa uzorka 1,5 g su optimalni parametri ekstrakcije potpomognute visokim tlakom s obzirom na koncentraciju ukupnih fenola.

Vrijeme, tlak ni masa uzorka, kao ni kombinacije ovih parametara nemaju statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline dobivenog ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom. Tlak od 500 MPa i masa uzorka 1,5 g su optimalni parametri i s obzirom na antioksidacijski kapacitet, no optimalno vrijeme je 1 minuta. Ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o koncentraciji ukupnih fenola nije statistički značajna. Ovo potvrđuje da antioksidacijski kapacitet ne mora nužno biti u korelaciji s koncentracijom ukupnih fenola, zbog čega je potrebno oboje uzeti u obzir kada govorimo o antioksidacijskom potencijalu ekstrakta lista masline.

Usporedbom sve četiri tehnike ekstrakcije može se primijetiti da su koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva podjednake, no antioksidacijski kapacitet ekstrakta dobivenog uz pomoć mikrovalovima je najveći. Osim toga, ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima vrijeme ekstrakcije je skraćeno na samo 2 minute, što čini ovu tehniku najuspješnijom.
7. ZAHVALE

8. LITERATURA


Kala, H. K., Mehta, R., Sen, K. K., Tandey, R., Mandal, V. (2016) Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: Have we really done enough. Trends Anal. Chem. 85, 140-152.


Scientific Software Services, EW (EPRWare), Stoneleigh Ct., Northville, SAD. <http://www.scientific-software.com/>


Ana Dobrinčić i Lucija Tuđen

Učinkovitost različitih postupaka ekstrakcije lista masline obzirom na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta

SAŽETAK:

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih postupaka ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija uz reflux, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom) i različitih tehnoloških parametara (vremena tretiranja, omjera uzorka i otapala te ovisno o tehnički broj ponavljanja ili amplituda ili temperatura ili tlak) na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline te optimirati navedene postupke ekstrakcije.

Istraživanja su provedena na osušenom listu masline sorte Oblica. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodilo se spektrofotometrijskom metodom uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen je metodom elektronske spinske rezonancije pomoću DPPH radikala a maksimalna vrijednost je izražena kao 100 %.

Dobiveni rezultati su statistički obrađeni i optimiranje je provedeno metodom odzivnih površina. Primjenom svih tehnika i parametara ekstrakcije postignuta je koncentracija ukupnih fenola u rasponu 48,21 mg GAE/g s.t. - 68,35 mg GAE/g s.t. i antioksidacijski kapacitet u rasponu 29,26 % - 79,23 %.

Prema dobivenim rezultatima masa od 1,5 g pokazala se povoljnijom od mase 3 g kao i kraće trajanje tretmana za sve tehnike ekstrakcije osim one potpomognute ultrazvukom. Utjecaj ostalih ispitivanih parametara ovisio je o primijenjenoj tehnici ekstrakcije.

Najbolji rezultati konvencionalnom ekstrakcijom za koncentraciju fenolnih spojeva (68,35 ± 3,16 mg GAE/g s.t.) postignuti su uzastopno ponovljenom ekstrakcijom 3 puta po 10 min a za antioksidacijski kapacitet (47,64 %) ponavljanjem ekstrakcije 2 puta po 18 min. Jedino pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za koncentraciju ukupnih fenola najbolji postignuti rezultati (66,49 ± 0,81 mg GAE/g s.t.) su s masom uzorka 3 g i to uz amplitudu 50 % tijekom dužeg vremena (21 min), a za antioksidacijski kapacitet (47,56 % ) najbolji parametri su 100 % amplitude u vremenu 12 min. Najbolji rezultati ekstrakcije
mikrovalovima za koncentraciju fenolnih spojeva (68,19 ± 3,15 mg GAE/g s.t.v.) dobiju se u kraćem vremenu (2 min) i pri višoj temperaturi (80 °C) dok se najveći antioksidacijski kapacitet (55,24 %) dobije pri temperaturi 55 °C. Najveće vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva (67,81 ± 3,63 mg GAE/g s.t.v.) pri ekstrakciji visokim tlakom postignute su pri tlaku 500 MPa i 5 min dok se najbolji rezultat za antioksidacijski kapacitet (40,47 %) dobije u vremenu od 1 minute.

Koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva pri optimalnim uvjetima sve četiri tehnike ekstrakcije su podjednake međutim ekstrakcijom mikrovalovima postiže se u najkraćem vremenu, tj. za samo 2 min. Istom tehnikom dobije se i najbolji antioksidacijski kapacitet ekstrakta.

Ključne riječi: list masline, refluks, mikrovalovi, ultrazvuk, visoki tlak
Effect of various olive leaf extraction methods on the total phenolic concentration and antioxidant capacity of the extract

SUMMARY:

The aim of this research was to investigate the effect of various extraction methods (conventional extraction under reflux, ultrasound assisted extraction, microwave - assisted extraction and high pressure extraction) and various technological parameters (extraction time, sample to solvent ratio, and depending on extraction method the number of extraction steps, amplitude or pressure) on the total phenolic concentration and antioxidant capacity of olive leaf extract and optimize these extraction methods.

Dried leafs of Dalmatian autochthonic olive cultivar Oblica were used for extraction. The total polyphenolic content of olive leaf extracts was determined spectrophotometrically using Folin – Ciocalteu method while electron spin resonance (ESR) spectroscopy was used to determine antioxidant capacity by DPPH, with maximum value. Obtained results were statistically evaluated and the optimization was performed by the response surface method. Total phenolic concentration is in the range from 48.1 mg GAE/g d.m. to 68.35 mg GAE/g d.m., while the antioxidant capacity is in a range from 29.26 % to 79.23 %.

For almost all extraction methods the weight of 1.5 g showed better results that weight of 3 g. Furthermore, a shorter extraction time proved to be more effective for all methods except for ultrasound assisted extraction. The influence of other investigated parameters was depended on the applied extraction method.

Using conventional extraction with reflux the highest results of total phenolic concentration (68.35 ± 3.16 mg GAE/g d.m.) were achieved in 3 extraction steps for 10 min, while for antioxidation capacity the best results (47.64 %) were obtain in 2 extraction steps for 18 min. Only by using ultrasound assisted extraction, sample mass of 3 g showed better results for total phenolic concentration (66.49 ± 0.81 mg GAE/g d.m.), using amplitude of 50 % for 21 min, and antioxidation capacity (47.56 %), using amplitude of 100 % for 12 min. The highest concentration of phenolic compounds (68.19 ± 3.15 mg GAE/g d.m.), using microwave – assisted extraction, was obtained in a shorter time (2 min) and at a higher
temperature (80 °C) while the highest antioxidant capacity (55.24 %) was obtain at 55 °C. Using high pressure extraction, the highest concentrations of phenolic compounds (67.81 ± 3.63 mg GAE/g d.m.) was achieved at 500 MPa and 5 min, while the best result for antioxidant capacity (40.47 %) was obtained after 1 minute of extraction.

Total phenolic concentration, at optimal conditions, is similar for all four extraction methods. However, microwave – assisted extraction required the shortest time (only 2 minutes) and it provided the best antioxidant capacity of the extract.

Key words: olive leaf, reflux, microwave, ultrasound, high pressure