

PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U EKSTRAKCIJI BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNOG MATERIJALA UZ PROCJENU ANTIRADIKALNE I ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Jakovljević Kovač, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:911847>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Martina Jakovljević Kovač

**PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA U
EKSTRAKCIJI BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ BILJNOG
MATERIJALA UZ PROCJENU
ANTIRADIKALNE I ANTIBAKTERIJSKE
AKTIVNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Split, 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Martina Jakovljević Kovač

**APPLICATION OF DEEP EUTECTIC
SOLVENTS IN THE EXTRACTION OF
PLANT BIOACTIVE COMPONENTS WITH
THE ASSESSMENT OF ANTIRADICAL
AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

DOCTORAL THESIS

Split, 2024

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Martina Jakovljević Kovač

**PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA U
EKSTRAKCIJI BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ BILJNOG
MATERIJALA UZ PROCJENU
ANTIRADIKALNE I ANTIBAKTERIJSKE
AKTIVNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Maja Molnar

Komentor: prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Martina Jakovljević Kovač

**APPLICATION OF DEEP EUTECTIC
SOLVENTS IN THE EXTRACTION OF
PLANT BIOACTIVE COMPONENTS WITH
THE ASSESSMENT OF ANTIRADICAL
AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

Supervisors:

PhD. Maja Molnar, Full Professor

PhD. Igor Jerković, Full Professor

Split, 2024

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Pristupnica Martina Jakovljević Kovač predala je dana 2. travnja 2024. godine doktorski rad izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Maje Molnar sa Sveučilišta u Osijeku, Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek i prof. dr. sc. Igora Jerkovića sa Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu.

Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada u sastavu:

Prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, Sveučilište u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

povoljno je ocijenilo doktorski rad, a Fakultetsko vijeće Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu na 13. elektroničkoj sjednici održanoj dana 27. i 28. svibnja 2024. godine prihvatilo ocjenu i odobrilo obranu pred povjerenstvom u sastavu:

Prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, Sveučilište u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zamjenski član: doc. dr. sc. Marina Zekić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Obrana doktorskog rada održana je dana 28. lipnja 2024. godine.

Dekan

Prof. dr. sc. Matko Erceg

UDK: UDK 547.8547.8(043.3).

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Znanstvena grana: primijenjena kemija

Institucija: Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju

Mentor rada:

prof. dr. sc. Maja Molnar, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Komentor rada:

prof. dr. sc. Igor Jerković, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

Broj stranica: 289

Broj slika: 61

Broj tablica: 77

Broj literaturnih referenci: 237

Datum obrane: 28. lipnja 2024. godine

Sastav povjerenstva za obranu:

Prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, Sveučilište u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Rad je pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4.

Tema doktorskog rada odobrena je na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu na 15. sjednici održanoj 16. srpnja 2021.

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta *Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva* (UIP-2017-05-6593) Hrvatske zaklade za znanost.

Prije svega, željela bih izraziti zahvalnost svojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Molnar. Vaša neizmijerna podrška, stručnost i vodstvo bili su neprocjenjivi tijekom cijelog doktorskog studija. Upravo me je vaš pristup znanosti inspirirao da uvijek težim najboljem, a vaša strpljivost i razumijevanje pomogli su mi da prevladam mnoge izazove.

Također bih željela zahvaliti svojim kolegama s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek. Vaša suradnja, savjeti i prijateljstvo učinili su ovaj put ne samo podnošljivim, već i izuzetno ugodnim. Posebno hvala svima koji su nesebično dijelili svoja znanja i iskustva te tako doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima. Vaša vjera u mene i stalna podrška bili su moj oslonac. Posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu čije mi je podrška svih ovih godina omogućila da se posvetim svom istraživanju i ostvarenju ovog cilja. Bez tvoje pomoći, mnoge prepreke bi bile nepremostive. Hvala ti što si uvijek bio uz mene, u trenucima sumnje i radosti, te mi pružao snagu da nastavim dalje.

Na kraju, zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada. Vaša podrška značila mi je više nego što riječi mogu izraziti.

SAŽETAK

U okviru doktorskog rada ekstrahirane su bioaktivne komponente (fenolne kiseline, flavonoidi, diterpeni, kanabinoidi i kumarini) iz različitog biljnog materijala primjenom hidrofilnih i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Pripremljenim otapalima ispitana je viskoznost, polarnost i pH. Probir otapala proveden je ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem, a optimiranje uvjeta ekstrakcije provedeno je za svaku komponentu za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i mehanoekstrakciju. Za optimizaciju je odabrano najpogodnije otapalo, a praćen je utjecaj temperature, vremena, udjela vode i brzine kretanja kuglica. Dobiveni rezultati su uspoređeni sa rezultatima dobivenima konvencionalnim otapalima. Za dobivene ekstrakte pri optimalnim uvjetima ispitana je mogućnost izolacije bioaktivnih komponenti primjenom makroporoznih smola, kao i antiradikalna i antibakterijska aktivnost. Pripremljena niskotemperaturna eutektička otapala i makroporozne smole su reciklirane i korištene ponovno za ekstrakciju i izolaciju. Ekstraktima s najvećim udjelom bioaktivnih komponenti pripremljenima s niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i konvencionalnim otapalima određena je stabilnost pri četiri različite temperature skladištenja kroz tri mjeseca.

Primjenom hidrofilnih i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala učinkovito su ekstrahirane komponente iz grupe spojeva kao što su diterpeni, flavonoidi, fenolne kiseline, tenini, kanabinoidi i kumarini. Korištenim otapalima određena je viskoznost, polarnost i pH pri čemu je pokazana najveća korelacija između viskoznosti i udjela komponenti u ekstraktima. Sve korištene tehnike ekstrakcije su se pokazale kao učinkovite, s vrlo malim razlikama u udjelima komponenti u ekstraktu. Ispitani uvjeti ekstrakcije su pokazali različit utjecaj ovisno o komponenti, što govori u prilog selektivnosti ovog načina ekstrakcije. Praćenjem stabilnosti ekstrakata sa najvećim udjelom bioaktivnih komponenti kroz tri mjeseca uočava se pozitivno djelovanje niskotemperaturnih eutektičkih otapala na većinu bioaktivnih komponenti, posebice pri sobnoj temperaturi.

Izolacija bioaktivnih komponenti iz ekstrakata dobivenima niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pomoću različitih makroporoznih smola se pokazuje kao učinkovit proces sa visokom adsorpcijskim i desorpcijskim prinosima. Fizikalno-kemijska svojstva makroporoznih smola, kao i adsorpcijsko i desorpcijsko vrijeme te volumen desorbensa kao ispitani parametri pokazuju različit utjecaj ovisno o bioaktivnoj komponenti što ponovno pokazuje da se ovaj proces može koristiti selektivno. Osim za izolaciju bioaktivnih

komponenti, makroporozne smole su korištene i za recikliranje niskotemperaturnih eutektičkih otapala, a samim procesom desorpcije reciklirane su i makroporozne smole. Korištenjem istog otapala i makroporozne smole u tri ciklusa pokazano je da je učinkovitost otapala u ekstrakciji i makroporozne smole u adsorpciji i desorpciji za većinu bioaktivnih komponenti iznad 60 %.

Osim u slučaju ekstrakta vrkute, ekstrakti dobiveni niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pokazuju bolju antibakterijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima, pri čemu uzorci tretirani makroporoznim smolama pokazuju još bolju aktivnost u odnosu na početni ekstrakt. S druge strane, ekstrakt kadulje i koprive te uzorci nakon tretiranja makroporoznim smolama pokazuju bolju antiradikalnu aktivnost u odnosu na ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima, dok je antiradikalna aktivnost bolja za ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima za industrijsku konoplju i lavandu. Korištenjem niskotemperaturnih eutektičkih otapala u ekstrakciji umjesto organskih otapala smanjuje se negativan utjecaj na okoliš, povećava selektivnost, a kombinacija s inovativnim tehnikama ekstrakcije dovodi do smanjenja utroška energije i vremena.

Ključne riječi: niskotemperaturna eutektička otapala, bioaktivne komponente, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mehanoekstrakcija, makroporozne smole, stabilnost, optimizacija

SUMMARY

In this doctoral thesis, bioactive components (phenolic acids, flavonoids, diterpenes, cannabinoids and coumarins) were extracted from different plant material using hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents. For prepared solvents for viscosity, polarity and pH were determined. Solvent screening was performed by stirring and heating extraction, and optimization of the extraction conditions was carried out for each component for stirring and heating extraction, ultrasound-assisted extraction and mechanochemical extraction. The most suitable solvent was chosen for optimization, and the influence of temperature, time, water content, and beads speed was monitored. The obtained results were compared to results obtained with conventional solvents. For the extracts obtained under optimal conditions, the possibility of isolating bioactive components using macroporous resin, as well as antiradical and antibacterial activity, was tested. The prepared deep eutectic solvents and macroporous resins were recycled and used again for extraction and isolation. The stability of extracts with the highest amount of bioactive components prepared with deep eutectic solvents and conventional solvents was determined at four different storage temperatures for three months.

Using hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents effectively extracts components from the group of compounds such as diterpenes, flavonoids, phenolic acids, tannins, cannabinoids and coumarins. Viscosity, polarity and pH were determined with the solvents used, and the highest correlation between viscosity and the amount of components in the extracts was shown. All the extraction techniques used proved to be effective, with very little differences in the amount of the components in the extract. The tested extraction conditions showed a different influence depending on the component, which points to the selectivity of this method of extraction. By monitoring the stability of the extracts with the highest amount of bioactive components for three months, a positive effect of deep eutectic solvents on the majority of bioactive components is observed, especially at room temperature.

Isolation of bioactive components from extracts obtained with deep eutectic solvents using different macroporous resins is shown to be an efficient process with high adsorption and desorption yields. The physicochemical properties of macroporous resins, as well as the adsorption and desorption time and the volume of the desorbent as tested parameters show a different influence depending on the bioactive component, which again shows that this process can be used selectively. In addition to the isolation of bioactive components,

macroporous resins were also used for recycling deep eutectic solvents, and macroporous resins were also recycled through the desorption process itself. Using the same solvent and macroporous resin in three cycles showed that the efficiency of the solvent in extraction and macroporous resin in adsorption and desorption for most bioactive components is above 60 %.

Except in the case of lady mantle extract, extracts obtained with deep eutectic solvents show better antibacterial activity compared to extracts obtained with conventional solvents, while samples treated with macroporous resins show even better activity compared to the initial extract. On the other hand, sage and nettle extract and samples after treatment with macroporous resins show better antiradical activity compared to extracts obtained with conventional solvents, while antiradical activity is better for extracts obtained with conventional solvents for industrial hemp and lavender.

Using deep eutectic solvents in extraction instead of organic solvents reduces the negative impact on the environment, increases selectivity, and the combination with innovative extraction techniques leads to a reduction in energy and time consumption.

Keywords: deep temperature eutectic solvents, bioactive components, ultrasound-assisted extraction, mechanoextraction, macroporous resins, stability, optimization

SADRŽAJ

1. Uvod	11
2. Opći dio	4
2.1. Zelena kemija	5
2.2. Bioaktivne komponente	8
2.2.1. Fenolne kiseline	9
2.2.2. Flavonoidi	11
2.2.3. Kanabinoidi	12
2.2.4. Kumarini	13
2.2.5. Tanini	14
2.2.6. Terpeni	15
2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	16
2.3.1. Hidrofilna niskotemperaturna eutektička otapala.....	18
2.3.2. Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala	19
2.3.3. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova.....	20
2.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti	26
2.4.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenti	26
2.4.2. Inovativne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenti.....	27
2.4.2.1. Ekstrakcija primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala	28
2.4.2.2. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	36
2.4.2.3. Mehanoekstrakcija.....	40
3. Metodika	42
3.1. Materijali i aparature	43
3.2. Priprava DES-ova	45
3.3. Karakterizacija pripremljenih DES-ova	47

3.3.1. Određivanje viskoznosti	47
3.3.2. Određivanje polarnosti	47
3.3.3. Određivanje pH	48
3.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti konvencionalnim otapalima	48
3.5. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom DES-ova.....	48
3.5.1. Probir otapala.....	49
3.5.2. Optimizacija uvjeta ekstrakcije	49
3.6. Određivanje sastava ekstrakata.....	50
3.6.1. Određivanje sadržaja karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje ...	50
3.6.3. Spektrofometrijsko određivanje HT u ekstraktima vrkute	51
3.6.4. Kromatografsko određivanja sadržaja kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje	52
3.6.5. Kromatografsko određivanje fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima koprive	53
3.6.6. Kromatografsko određivanje kumarina u ekstraktima lavande.....	53
3.7. Statistička obrada rezultata.....	54
3.8. Adsorpcijska i desorpcijska svojstva makroporoznih smola.....	55
3.9. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola.....	56
3.9.1. Recikliranje DES-ova.....	56
3.9.2. Recikliranje makroporoznih smola.....	57
3.10. Određivanje antiradikalne aktivnosti.....	58
3.11. Određivanje antibakterijske aktivnosti	59
3.11.1. Priprema hranjive podloge.....	59
3.11.2. Odabir bakterijskih organizama i nasađivanje bakterijskih kultura	60
3.11.3. Određivanje gustoće bakterijskih suspenzija.....	60
3.11.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).....	60
3.12. Određivanje stabilnosti bioaktivnih komponenti u ekstraktim.....	61

4. Rezultati	62
4.1. Karakterizacija DES-ova	63
4.2. Probir DES-ova za ekstrakciju bioaktivnih komponenti	68
4.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara DES-ova na ekstrahirane udjele bioaktivnih komponenti	84
4.4. Optimizacija procesnih parametara za tehnike ekstrakcije primjenom DES-ova	85
4.5. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom konvencionalnih otapala	132
4.6. Primjena makroporoznih smola za pročišćavanje bioaktivnih komponenti iz ekstrakata	141
4.7. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola.....	158
4.8. Antiradikalna i antibakterijska aktivnost ekstrakata.....	161
4.9. Stabilnost bioaktivnih komponenti u ekstraktima	172
5. Rasprava	194
5.1. Karakterizacija DES-ova	195
5.2. Utjecaj vrste DES-ova na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu	198
5.2.1. Probir otapala za ekstrakciju karnosolne kiseline i karnosola iz kadulje	198
5.2.2. Probir otapala za ekstrakciju fenolnih kiselina i HT iz vrkute	200
5.2.3. Probir otapala za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina iz koprive	202
5.2.4. Probir otapala za ekstrakciju kanabinoida iz ekstrakta industrijske konoplje .	207
5.2.5. Probir otapala za ekstrakciju kumarina iz lavande	210
5.3 Utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu	211
5.4. Utjecaj tehnike ekstrakcije i procesnih parametara na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu	212
5.4.1. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju karnosola i karnosolne kiseline iz kadulje.....	212
5.4.2. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih kiselina i HT iz vrkute.....	215

5.4.3. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina iz koprive.....	218
5.4.4. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju kanabinoida iz industrijske konoplje	222
5.4.5. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju kumarina iz lavande	225
5.5. Usporedba učinkovitosti DES-ova s konvencionalnim otapalima	227
5.6. Utjecaj vrste i fizikalno-kemijskih karakteristika makroporoznih smola i desorbensa na udio bioaktivnih komponenti	230
5.7. Utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije te volumena desorbensa na udio bioaktivnih komponenti	236
5.8. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola.....	238
5.9. Antiradikalna i antibakterijska aktivnost ekstrakata.....	241
5.10. Stabilnost bioaktivnih komponenti u ekstraktima	245
6. Zaključak.....	250
7. Literatura	253
8. Prilozi.....	271
Životopis	284

1. Uvod

Nagli razvoj farmaceutske industrije, posebno u području proizvodnje različitih proizvoda bogatih bioaktivnim komponentama u svrhu održavanja zdravlja, doveo je do brzog razvoja novih metoda ekstrakcije i izolacije [1]. Moderne metode ekstrakcije su uglavnom brže, učinkovitije te ekološki prihvatljivije, pružajući veće prinose i bolju kvalitetu ekstrakata bez upotrebe zapaljivih i toksičnih organskih otapala [2].

U novije vrijeme sve više se ispituje mogućnost primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, - DESs), čija je značajnija uporaba u različite svrhe znatno porasla nakon istraživanja Abbotta i sur. 2003. godine [3,4]. Niskotemperaturna eutektička otapala su smjesa nastala između akceptora (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*-HBA) i donora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Donor*, - HBD) s nižom temperaturom taljenja u odnosu na temperaturu taljenja pojedinih početnih komponenata. Navedena otapala su posljednjih godina vrlo popularna, ponajviše zbog niske cijene polaznih komponenti i jednostavne pripreme, kao i biorazgradivosti, niske toksičnosti [5] te prilagodljivih fizikalno-kemijskih svojstava [6,7]. Uspješno su primijenjena za ekstrakciju i izolaciju u različitim poljima, kao što su ekstrakcija bioaktivnih komponenti, metala i aromatskih ugljikovodika [1].

Budući da postoje brojne različite kombinacije polaznih komponenti i njihovih omjera, eutektička otapala se zapravo mogu smatrati dizajniranim ili dizajnerskim otapalima te ih upravo ta mogućnost čini pogodnima za povećanje topljivosti i učinkovitosti ekstrakcije odabirom odgovarajuće kombinacije HBD i HBA, kao i njihovih molekularnih omjera.

Za liječenje različitih zdravstvenih stanja, biljke se koriste diljem svijeta već tisućama godina [8]. Biljke tu mogućnost upotrebe kod tretiranja različitih zdravstvenih stanja duguju svom kemijskom sastavu, odnosno prisutnosti bioaktivnih komponenti. Prema konsenzusu, bioaktivni spojevi su prirodni esencijalni i neesencijalni spojevi koji mogu pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje.

U okviru ovog doktorskog rada ispitana je uporaba DES-ova u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Ekstrakcije su provedene konvencionalnim miješanjem biljnog materijala s otapalima na magnetskoj miješalici, potpomognute ultrazvukom te mehanokemijski. Prvi dio istraživanja uključio je probir otapala, a nakon odabira najpogodnijeg otapala ispitivanje utjecaja tehnike ekstrakcije te parametara ekstrakcije (vrijeme, temperatura, udio vode, brzina kretanja kuglica). U ekstraktima dobivenima pri optimalnim uvjetima ispitana je mogućnost izolacije bioaktivnih komponenti primjenom makroporoznih smola. Makroporozne smole su osim za proces pročišćavanja ekstrakta i

izolacije bioaktivnih komponenti, poslužile i kao sredstvo za recikliranje DES-ova koji su potom ponovno poslužili kao otapala za ekstrakciju u tri ciklusa. Ekstraktima s najvećim udjelom bioaktivnih komponenti pripremljenima s niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i konvencionalnim otapalima određena je antiradikalna i antibakterijska aktivnost, kao i stabilnost na četiri temperaturna režima kroz tri mjeseca.

U doktorskom radu praćeni su utjecaji fizikalno-kemijskih karakteristika DES-ova, tehnike ekstrakcije i parametara ekstrakcije na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu kako bi se mogla pružiti kompletna slika o učinkovitosti DES-ova u ekstrakciji i dati detaljan uvid u značajne parametre ekstrakcije.

2. Opći dio

2.1. Zelena kemija

Rastući proces industrijalizacije može se smatrati prekretnicom svjetske ekonomske evolucije. U periodu intenzivne industrijalizacije dolazi do naglog porasta stanovništva što je rezultiralo i povećanom proizvodnjom hrane a potom i iscrpljivanja resursa i nastanka velike količine otpada. Unatoč općenitom povećanju kvalitete života ljudi tog perioda u odnosu na prošla vremena, utjecajem tako ogromne industrijalizacije i načina proizvodnje hrane na okoliš nije se bavilo [9].

Tek od 1940-tih godina se počinje razmatrati utjecaj proizvodnje na okoliš i posljedice nekontroliranog iskorištavanja resursa i stvaranja otpada. Kroz sljedećih nekoliko desetljeća, kroz brojne konferencije i skupove, države su postajale svjesnije utjecaja industrijalizacije i pretjeranog iskorištavanja resursa na uništavanje okoliša, ekosustava i zdravlja ljudi. Također, u tom periodu se sve više prepoznaje kako tako nagli razvoj industrije nije održiv te kako je potrebno uvesti promjene na globalnoj razini. Sljedećih godina se kroz brojne sastanke, dokumente i programe spominje održivi razvoj, prevencija zagađanja i u konačnici, zelena proizvodnja i kemija [10].

U raspravi o porastu irske kemijske industrije, Cathcart je 1990. godine prvi put u naslovu rada upotrijebio izraz „zelena kemija“ [11]. Nakon toga, 1996. godine objavljena je prva publikacija autora Anastasa i Williamsona u kojoj je prikazan pristup zelenoj kemiji koji je i danas prihvaćen [12]. Glavni koncept zelene kemije je korištenje kemijskih znanja, vještina i tehnika kako bi se smanjila ili u potpunosti uklonila upotreba otapala, reagenasa, produkata i nusprodukata koji mogu biti opasni za zdravlje i okoliš. Nakon toga, 1998. godine objavljena je i knjiga *Green Chemistry: Theory and Practice* autora Anastasa i Williamsona koja se smatra i prvim priručnikom zelene kemije. U navedenoj knjizi autori su predložili 12 načela zelene kemije koja se temelje na smanjenju ili potpunom uklanjanju toksičnih kemikalija u procesima i analizama, kao i na smanjenju otpada koji proizlaze iz tih procesa.

Dvanaest načela zelene kemije su:

1. Prevenција: naglasak na izbjegavanju stvaranja otpada
2. Atomska ekonomičnost: naglasak na kreiranju procesa u koji se mogu maksimalno uključiti polazne sirovine u konačni produkt
3. Sigurnija proizvodnja: naglasak na kreiranju procesa u kojem se koriste i proizvode tvari s niskom toksičnošću za zdravlje i okoliš (preporuka je zamjena toksičnih otapala otapalima niske toksičnosti ili onima koji ne pokazuju toksičnost)

4. Sigurniji produkti: naglasak na proizvodnju produkata smanjene toksičnosti pri čemu se zadržava odgovarajuća djelotvornost
5. Primjena sigurnijih otapala i pomoćnih tvari: naglasak na izbjegavanje korištenja otapala i pomoćnih tvari kad god je moguće ili zamjena neškodljivim
6. Dizajniranje učinkovitijih energetske procesa: naglasak na provođenju procesa sa smanjenim energetskim zahtjevima (preporuka je što više procesa provoditi pri sobnoj temperaturi i tlaku).
7. Primjena obnovljivih sirovina: naglasak na korištenju obnovljivih sirovina kada god je to ekonomski i tehnički izvedivo.
8. Smanjenje nusprodukata: naglasak na izbjegavanju dodatnih koraka i pomoćnih tvari koji mogu dovesti do nastanka otpada.
9. Kataliza: naglasak na korištenju katalitičkih reagensa u odnosu na stehiometrijske količine
10. Kreiranje biorazgradljivih produkata: naglasak na dizajniranju kemikalija koje se mogu razgraditi u bezopasne produkte neškodljive za okoliš
11. Sprječavanje onečišćenja: naglasak na razvijanju i primjeni analitičkih metoda za praćenje procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari
12. Sprječavanje nesreća: smanjenje uporabe tvari u kemijskim procesima koje mogu uzrokovati štetne posljedice [13].

Vodeći se definicijom zelene kemije, zelen proces ekstrakcije možemo definirati kao otkrivanje i dizajniranje ekstrakcijskih procesa koji će omogućiti smanjenje potrošnje energije, korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih sirovina te osigurati siguran ekstrakt, odnosno konačni proizvod visoke kvalitete. Kako bi se navedeno postiglo, predložena su tri moguća načina za dizajniranje i projektiranje zelenog tipa ekstrakcije u laboratorijskim i industrijskim razmjerima:

- (1) poboljšanje i optimizacija postojećih procesa;
- (2) korištenje primjerene opreme; i
- (3) inovacije u procesima i postupcima uključujući razvoj alternativnih otapala [14].

Osim spomenutih rješenja, u području ekstrakcije razvijena su i šest načela zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda namjenjena znanstvenicima i industriji kao smjernice za

uspostavljanje ne samo inovativnog i zelenog procesa, već i za poboljšanje svih aspekata ekstrakcije kruto-tekuće (Tablica 1) [14].

Tablica 1. Mogućnosti rješavanja određenih problema ekstrakcije putem implementacije načela [14]

Načelo zelene ekstrakcije	Postojeći problemi	Mogućnosti implementacije načela u rješavanju problema
Inovacija korištenjem obnovljivih biljnih izvora	Izumiranje velikog broja biljnih vrsta zbog prekomjernog korištenja	Intenzivni uzgoj <i>In vitro</i> rast biljnih stanica ili organizama „ <i>Plant milking</i> “
Korištenje alternativnih otapala	Prekomjerna upotreba organskih otapala (zapaljivost, toksičnost za ljude i okoliš) Pronalazak tragova organskih otapala u proizvodu	Upotreba zelenijih otapala (subkritična voda, superkritični CO ₂ , agro-otapala, niskotemperaturna eutektička otapala)
Smanjenje potrošnje energije	Velika potrošnja energije Stvaranje velike količine otpada	Optimizacija postojećih procesa Povrat energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije Modifikacija postojećih procesa
Proizvodnja dodatnih proizvoda umjesto otpada	Stvaranje velike količine otpada Odlaganje nastalog otpada	Potpuna inovacija procesa Integrirani pristup za proizvodnju umjesto tradicionalnog pristupa (iskorištavanje cijelog ulaznog materijala) Koncept biorafinerije
Smanjen broj procesa u proizvodnji	Velika potrošnja energije Negativan utjecaj na okoliš zbog prijevoza sirovina Spora proizvodnja s velikim gubitcima Skup konačan proizvod	Razvoj nove opreme, tehnika ili postupaka koji donose značajan napredak u usporedbi s postojećim metodama proizvodnje Kompaktnost proizvodnih jedinica Uvođenje tehnike sa manje pojedinačnih koraka (primjerice superkritična CO ₂ ekstrakcija) Primjena " <i>zelenog ekstraktora</i> "

Načelo zelene ekstrakcije	Postojeći problemi	Mogućnosti implementacije načela u rješavanju problema
Proizvodnja biorazgradljivih ekstrakata sa „zelenim vrijednostima“ bez kontaminananta	Prisutnost ekstrakata na tržištu koji ne zadovoljavaju zahtjeve tržišta i propise	Primjena alata za procjenu utjecaja proizvoda na okoliš (primjerice analiza životnog ciklusa (LCA)) Edukacija uzgajivača biljnog materijala o načinu uzgoja Smanjenje korištenja pesticida i organskih otapala u uzgoju i proizvodnji ekstrakata Upotreba „zelenijih otapala“ i sigurnijih tehnika ekstrakcije Poboljšano praćenje kontrole kvalitete nastalih proizvoda

Zelena ekstrakcija koja se razvija u skladu sa šest načela, novi je koncept nastao kao način suočavanja s izazovima 21. stoljeća. U današnje vrijeme, važno je osigurati ekonomičnost proizvodnje, uz inovativnost i zadovoljavanje potreba potrošača. Potrošači postaju sve svjesniji negativnog utjecaja proizvodnje na okoliš te biraju prirodnije i održive proizvode. Zbog svega navedenog, uveden je i koncept zelenog ekstrakta, odnosno ekstrakta čijom proizvodnjom se najmanje utječe na okoliš, uz planiranje njegovog zbrinjavanja (recikliranje, biorazgradnja ili nastanak dodatnih proizvoda) [14].

2.2. Bioaktivne komponente

Prema svim dostupnim zapisima, biljke kao izvori bioaktivnih komponenti koriste se diljem svijeta tisućama godina za tretiranje različitih zdravstvenih stanja [8]. Razvojem prehrambene industrije, medicine i farmacije nastali su brojni proizvodi, pripravci i lijekovi kako bi se zamijenila upotreba biljaka u svrhu tretiranja ili liječenja različitih stanja. Ipak, unatoč danas dostupnim sintetskim pripravcima i lijekovima, potrošači se sve više ponovno okreću prirodnim alternativama za održavanje i promicanje zdravlja [15].

Prema konsenzusu, bioaktivni spojevi su prirodni esencijalni i neesencijalni spojevi koji mogu pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje. Od 1979. godine nazivaju se i nutraceuticima s obzirom da kod konzumiranja pružaju i određene zdravstvene prednosti [16]. Bioaktivni

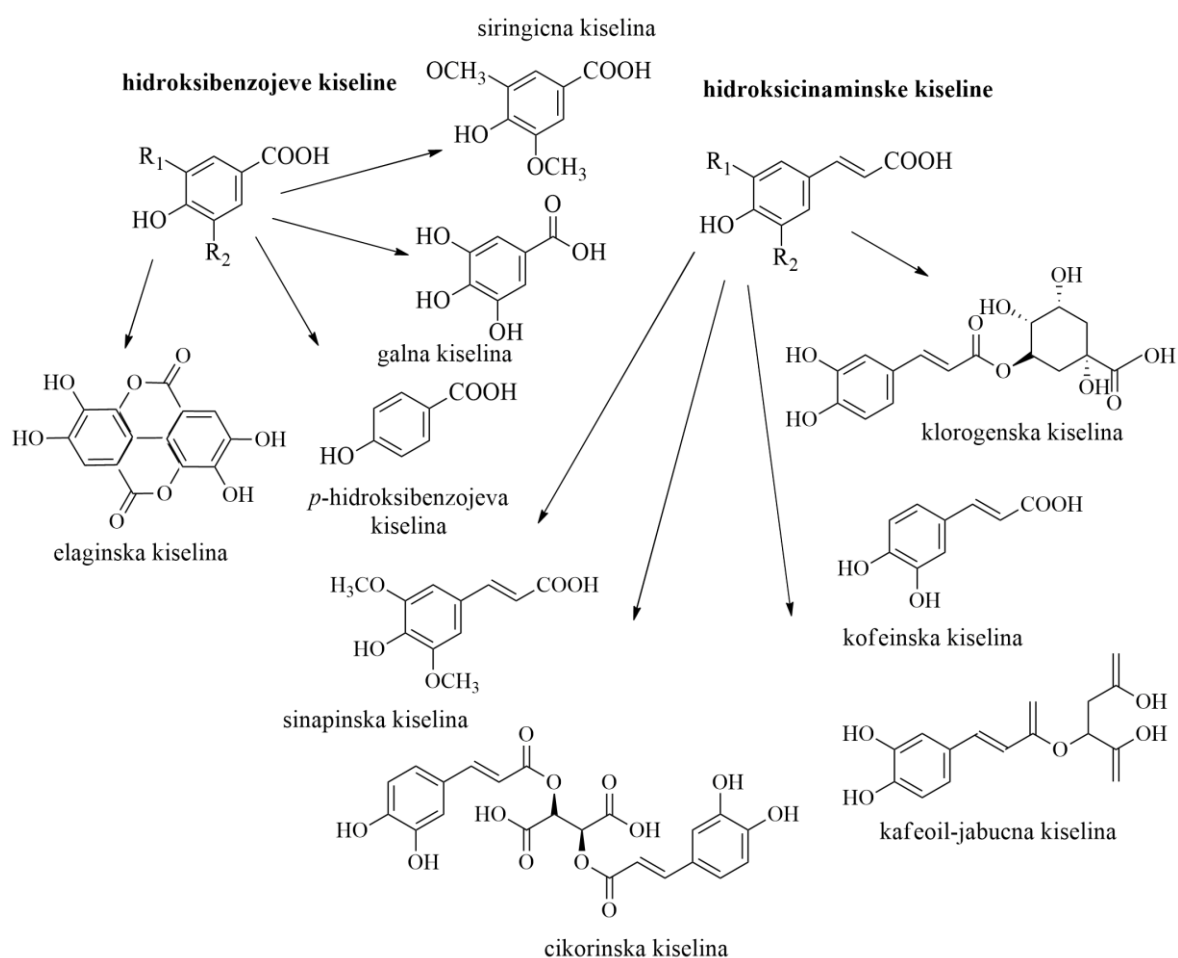
spojevi čine vrlo heterogen skup molekula s različitim kemijskim strukturama [17]. Općenito, možemo ih podijeliti u tri glavne skupine: terpeni, fenolni spojevi i alkaloidi [18]. Osim po strukturi, bioaktivni spojevi razlikuju se po načinu biosinteze. Terpeni se biosintetiziraju mevalonskim biosintetskim putem (MVA) (engl. *Mevalonate Pathway*) i metileritritol fosfatnim biosintetskim putem (MEP) (eng. *Methylerythritol Phosphate Pathway*) [19], dok je za biosintezu fenolnih spojeva uključeno nekoliko putova. Fenilpropanoidi se sintetiziraju šikiminskim biosintetskim putem, a flavonoidi kombinacijom šikiminskog i acetatnog biosintetskog puta [20].

Dobrobiti bioaktivnih spojeva posljedica su nekoliko dokazanih svojstava, uglavnom antioksidativnih, protuupalnih i antimikrobnih učinaka [21]. Općenito, većina bioaktivnih spojeva ima izraženu antioksidativnu aktivnost zbog svoje sposobnosti hvatanja reaktivnih vrsta kisika [21]. Nadalje, bioaktivni spojevi poboljšavaju endogenu antioksidacijsku obranu *in vivo*, što omogućuje njihovu primjenu kroz terapijski pristup protiv oksidativnog stresa i bolesti povezanih sa stresom [22]. Uloga bioaktivnih komponenti u upalnim procesima se očituje u smanjenju sadržaja signalnih molekula kao što su protupalni citokini, kemokini, interleukini, inducibilni enzimi (ciklooksigenaza-2 i inducibilna sintaza dušikovog oksida) i upalni medijatori (prostaglandini, leukotrieni i tromboksan). Povećanje sadržaja navedenih signalnih molekula u organizmu povezano je s razvojem i napredovanjem većine kroničnih bolesti, kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti i karcinomi [23]. Osim antiradikalnog djelovanja, najčešće istraživano djelovanje bioaktivnih komponenti je antimikrobno djelovanje [24]. Antimikrobna aktivnost često se povezuje s fenolnim spojevima, pri čemu je pretpostavka da oni uzrokuju neravnotežu u redoks stanju i posljedično staničnu smrt mikrobnih stanica [25]. Uz navedena svojstva, nekoliko drugih učinaka povezano je s bioaktivnim spojevima, uključujući antikancerogeno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno i imunomodulatorno djelovanje [26].

2.2.1. Fenolne kiseline

Pojam fenolne kiseline je vrlo širok i općenit, a opisuje sve fenolne komponente koje sadrže bar jednu karboksilnu skupinu. Fenolne kiseline predstavljaju jednu od glavnih skupina fenolnih komponenti koje se nalaze u biljkama, i to u gotovo svim dijelovima biljke (sjemenke, korijen, listovi i cvijeće). Fenolne kiseline se mogu naći u biljkama i u slobodnom obliku, ali se najčešće nalaze u vezanom kao amidi, esteri ili glikozidi. Najčešća podjela fenolnih kiselina je na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksicimetne

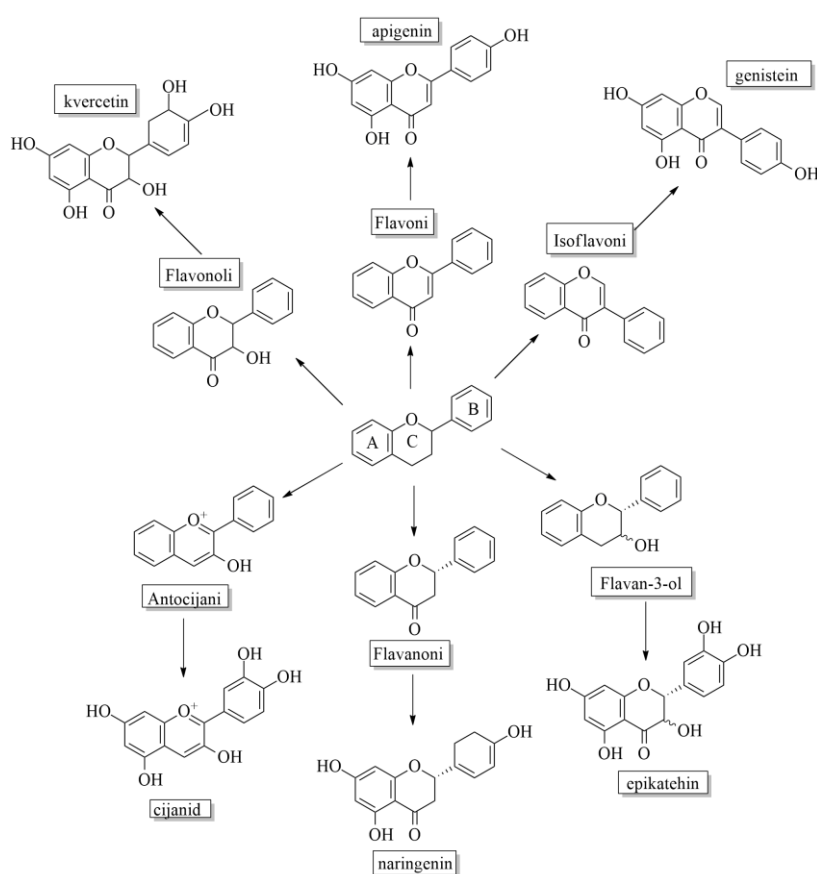
kiseline su one dobivene iz cimetine kiseline i najčešće su prisutne kao esteri s kininskom kiselinom ili glukozom. Najzastupljenije hidroksicimetine kiseline u biljkama su klorogenske kiseline, zatim ferulinska, kofeinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina. S druge strane, hidroksibenzojeve kiseline su izvedene iz benzojeve kiseline, a u biljkama se nalaze ili konjugirane sa šećerima i organskim kiselinama ili vezane za frakcije stanične stijenke kao što je lignin. Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su galna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva, protocatehuinska, vanilinska i siringinska kiselina (Slika 1). Razlog čestih ekstrakcija i ispitivanja fenolnih kiselina leži u njihovoj biološkoj aktivnosti, pri čemu se pokazalo da *in vitro* imaju jače antioksidativno djelovanje u odnosu na antioksidativne vitamine [27].



Slika 1. Prikaz najznačajnijih fenolnih kiselina [27]

2.2.2. Flavonoidi

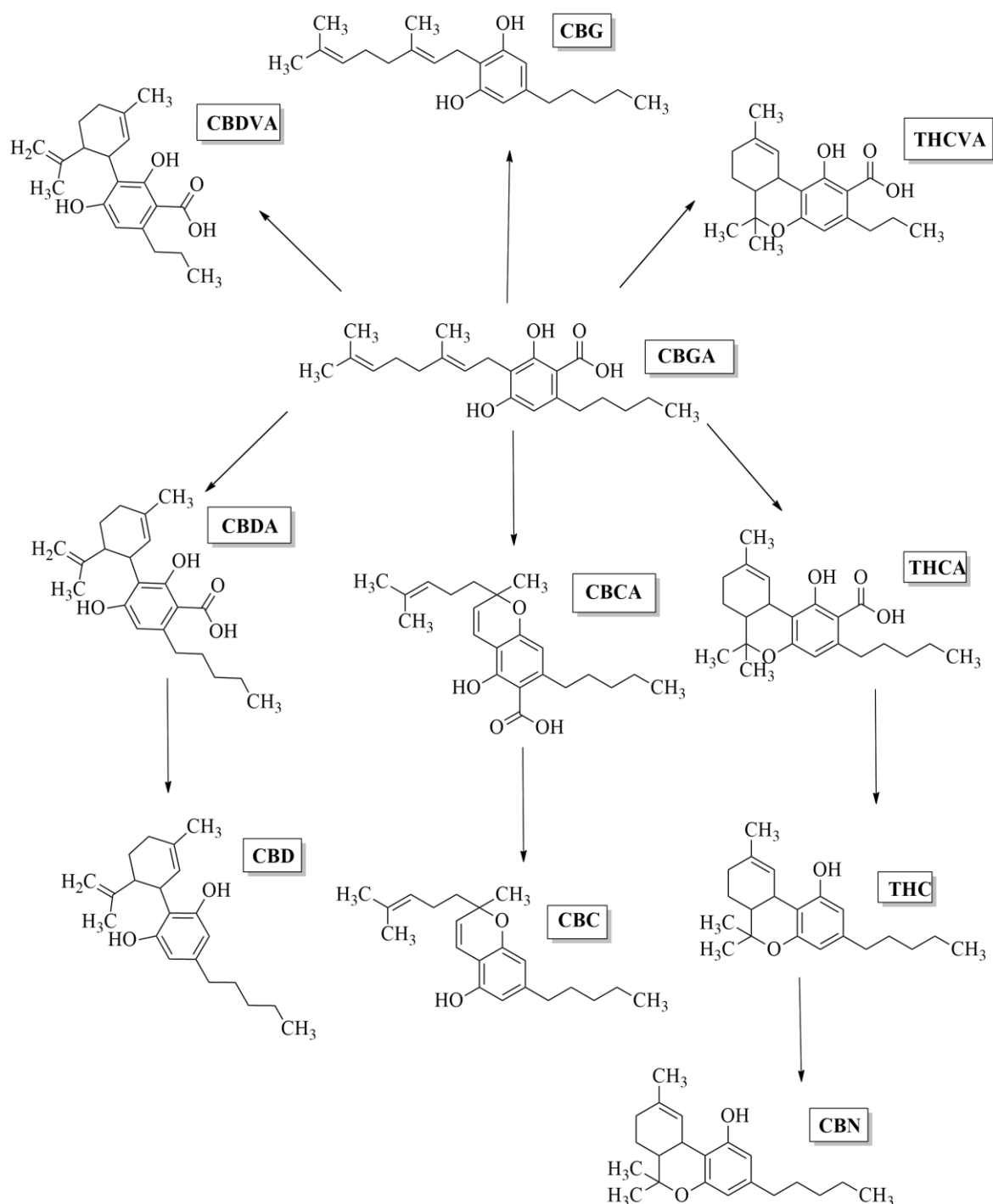
Flavonoidi su važna skupina prirodnih spojeva koji se klasificiraju kao sekundarni metaboliti biljaka polifenolne strukture. Rasprostranjeni su u gotovo svim dijelovima biljaka i imaju širok spektar zdravstvenih učinaka, što ih čini važnim sastojcima za upotrebu u farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim proizvodima. Najčešće ispitivani biološki učinci flavonoida uključuju antioksidativno, protuupalno, antitumorigeno i antikarcinogeno djelovanje zajedno sa sposobnošću moduliranja ključnih funkcija staničnih enzima. Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko podskupina ovisno o ugljiku C prstena na koji je vezan B prsten, kao i o stupnju nezasićenosti i oksidacije C prstena. Flavonoidi u kojima je B prsten vezan na poziciji 3 C prstena nazivaju se izoflavoni, dok su oni u kojima je B prsten vezan na poziciji 4 neoflavonoidi. Prema tome, flavonoidi na koje je prsten B vezan na poziciji 2 mogu se podijeliti u više podskupina koje uključuju flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, flavanole ili katehine, antocijanine i kalkone (Slika 2) [28].



Slika 2. Prikaz podjele flavonoida [28]

2.2.3. Kanabinoidi

Kanabinoidi su značajna skupina biološki aktivnih tvari koje se dijele prema mjestu nastanka na fitokanabinoide, endokanabinoide i sintetske kanabinoide. Endokanabinoidi se sintetiziraju u organizmu te djeluju kao endogeni agonisti kanabinoidnih receptora. Dva glavna spoja te skupine su *N*-arahidonoiletanolamid (anandamid ili AEA) i 2-arahidonoilglicerol (2-AG). Fitokanabinoidi su kanabinoidi biljnog porijekla koji se nalaze u konoplji, dok se sintetski kanabinoidi proizvode u laboratorijima kemijskim procesima [29]. Fitokanabinoidi su prema strukturi podijeljeni u 11 skupina koje broje više od stotinu spojeva [30]. Glavni predstavnici fitokanabinoida su spojevi iz kanabidiolne i Δ^9 -tetrahidrokanabinolne grupe. Unatoč najvećoj popularnosti kanabidiola (CBD) i Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC), oni nisu komponente koje biljka prirodno sintetizira, već su produkti toplinske dekarboksilacije biosintetizirane kanabidiolne kiseline (CBDA) i Δ -tetrahidrokanabinolne kiseline (THCA). CBDA i THCA su glavne komponente cvijeta konoplje, uz prisutnost i drugih manje zastupljenih kanabinoida kao što su kanabikromenska kiselina (CBCA), kanabigerolna kiselina (CBGA) i kanabinolna kiselina (CBDA). CBGA se smatra početno biotitetiziranim endokanabinoidom iz kojeg enzimski nastaju CBDA i THCA. Sve navedene kiseline nakon dekarboksilacije dovode do nastanka neutralnih derivata, odnosno kanabikromena (CBC), kanabigerola (CBG) te kanabinola (CBN), koji nastaje oksidacijom THC-a, najčešće kao rezultat produljenog skladištenja [31] (Slika 3). Kanabinoidi se u ljudskom tijelu vežu na receptore CB1, koji se nalaze u živčanom sustavu, receptore CB2 unutar imunskog sustava te na TRP receptore. Upravo stoga kanabinoidi pokazuju aktivnost u brojnim fiziološkim procesima poput osjeta boli i gladi, utječu na raspoloženje i pamćenje, regulaciju inzulina, metabolizam masti i održavanje imuniteta. Uz to, pojedine komponente kao što su CBD, THC, CBG, CBN i CBC pokazuju protuupalni, antioksidativni, analgetski, antikancerogeni, antibakterijski, antifungalni i fotoprotektivni učinak [32,33].

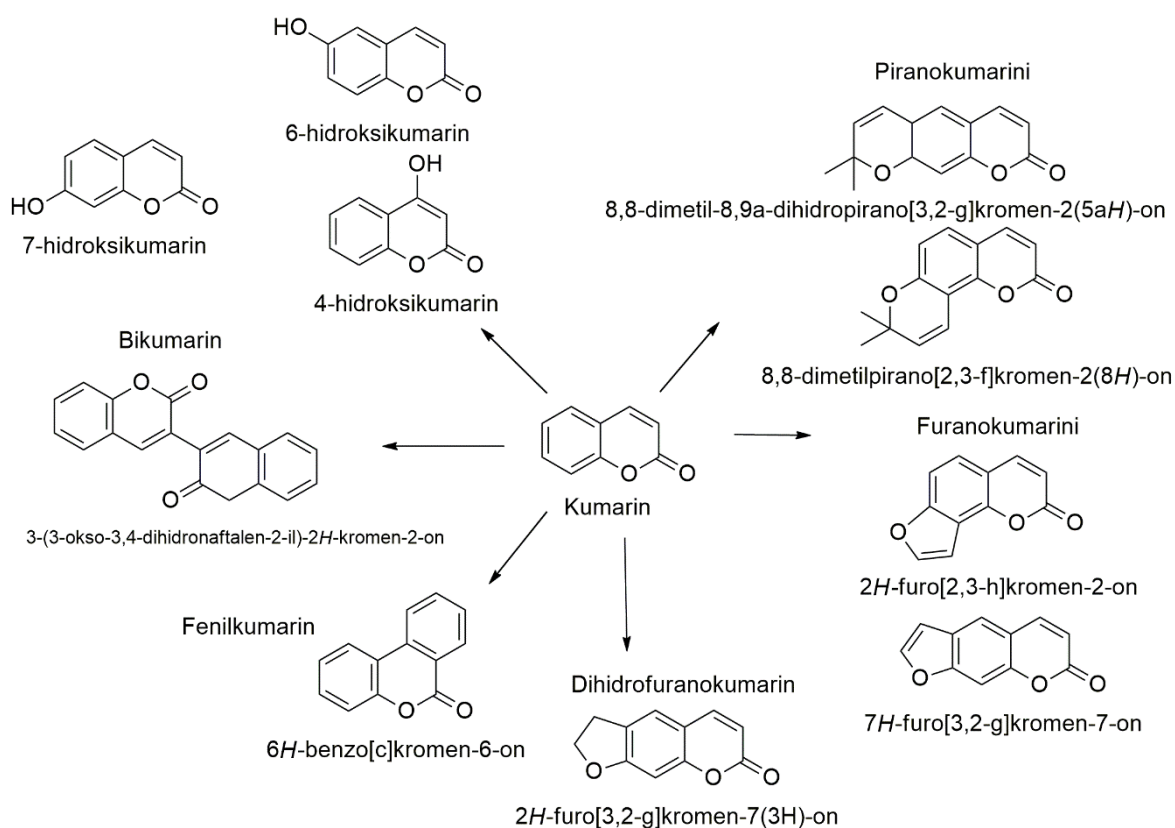


Slika 3. Prikaz najznačajnijih kanabinoida [32]

2.2.4. Kumarini

Pojam kumarini (1,2-benzopironi ili 2*H*-1-benzopiran-2-oni) uključuje važnu i veliku obitelj prirodnih i sintetskih spojeva benzopirona, čija je specifičnost benzenski prsten povezan s pironskim prstenom [34]. Prirodni kumarini se dijele u šest osnovnih skupina počevši od jednostavnih kumarina, furanokumarina (linearnog tipa i uglatog tipa), do

biskumarina, benzokumarina i kumestana (Slika 4) [35]. Kumarini u biljkama nastaju kao sekundarni metaboliti čija je uloga zaštita biljaka od infekcija, nepovoljnih uvjeta okoliša i insekata. Kumarin, kao i njegovi derivati, ovisno o svojoj strukturi, imaju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antioksidativna, antimikrobna, protuupalna, anti-HIV, antikancerogena, antikoagulantsna, antivirusna i antituberkulozna djelovanja [35].

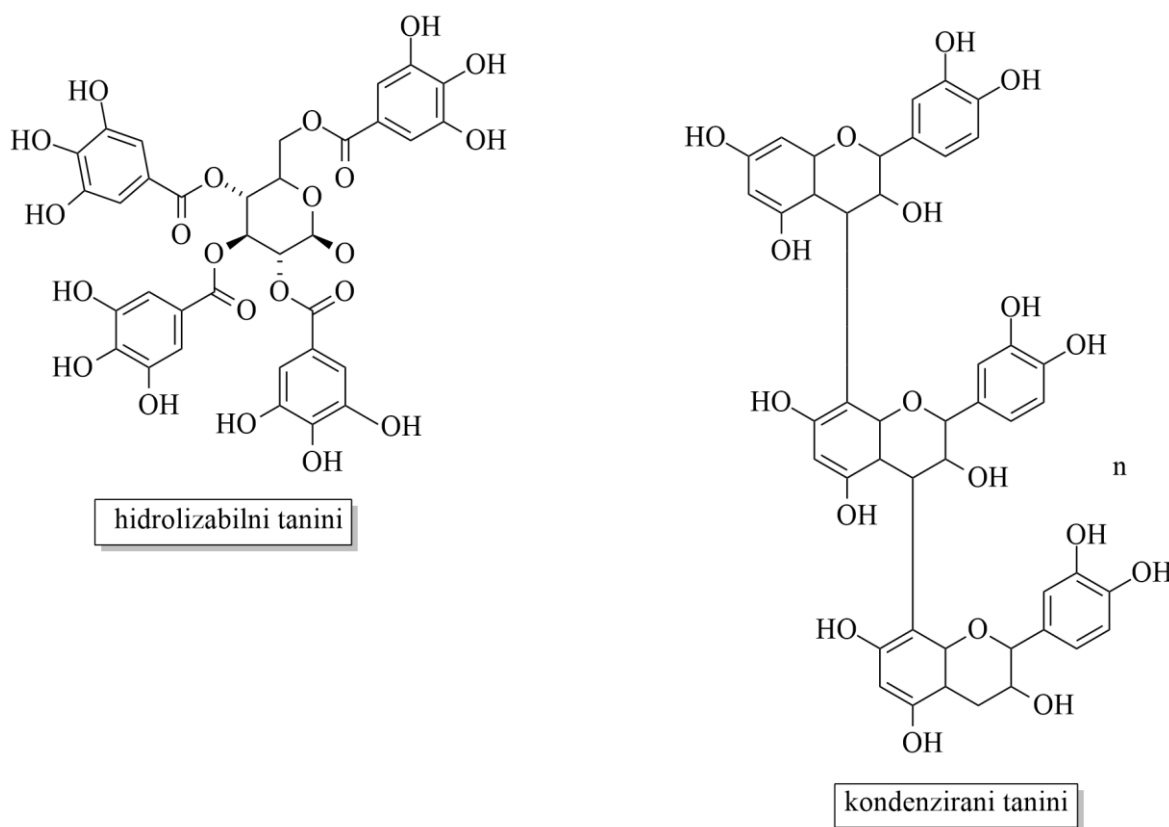


Slika 4. Prikaz podjele kumarina [35]

2.2.5. Tanini

Tanini su u vodi topljivi derivati fenola koje biosintetiziraju i akumuliraju biljke kao sekundarne metabolite. S kemijskog gledišta, tanini su polifenoli molekulske mase između 500 i 3000 Da. U kompleksima koje tvore sa šećerima, alkaloidima i proteinima njihova molekulska masa može porasti i do 20 000 Da. Do sada je izolirano i kemijski karakterizirano više od 8000 različitih tanina. No, zasigurno postoji još mnogo tanina čija kemijska struktura još nije točno utvrđena. Svi tanini imaju neke zajedničke značajke koje omogućuju klasifikaciju ove vrste spojeva u dvije glavne skupine, hidrolizirajuće ili hidrolizabilne i kondenzirane tanine (Slika 5). Hidrolizirajući tanini (HT) se prema sastavu dijele na

galotanine, elagitanine i složene tanine. Kondenzirani tanini (nehidrolizirajući) nazvani proantocijanidini sadrže kondenzirani ugljikov lanac tipičan za flavonoide [36]. Kondenzirani tanini mnogo su otporniji na mikrobnu razgradnju od HT i pokazuju snažnije antibakterijsko, antivirusno i antifungalno djelovanje. Kemijska struktura tanina određuje njegovu biološku aktivnost [37].



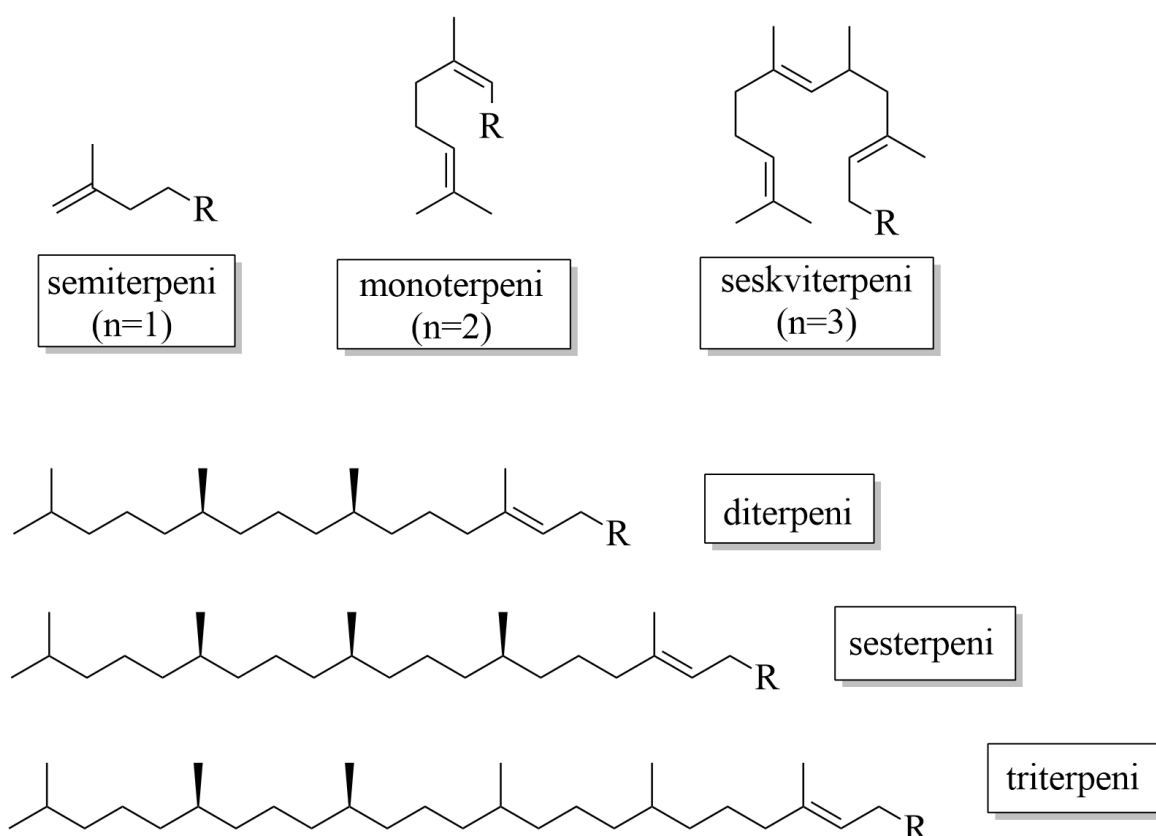
Slika 5. Prikaz osnovne podjele tanina [36]

2.2.6. Terpeni

Terpeni (terpenoidi) su najveća i strukturno najraznovrsnija skupina prirodnih spojeva [38]. Do danas je identificirano više od 30 000 terpena, od kojih je većina prisutna u biljkama gdje igraju važnu ulogu u komunikaciji s kukcima i patogenima. Udio terpena u biljkama ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su uvjeti uzgoja, sastav tla, vrsta biljke i sl., a često se koriste u industriji aroma i mirisa [39].

Unatoč velikom broju različitih terpena, svi oni nastaju biosintetskim putem koji uključuje fuziju C5 jedinica s izopentenoidnom strukturom. Dijelev se prema građi ugljikovog skeleta s naglaskom na broj izoprenoidnih jedinica.

Diterpeni su raznolika skupina strukturno različitih prirodnih spojeva koji sadrže četiri izoprenske jedinice [40]. Prirodni diterpenoidni spojevi dolaze u širokom rasponu kemijskih oblika i obuhvaćaju mnoge medicinske važne spojeve. Svi diterpenoidi nastaju iz istog spoja, (*E,E,E*)-geranil-geranil-difosfata (GGDP), koji se zatim GGDP sintazom ciklizira u jednu od višestrukih formi [41]. Diterpeni su podijeljeni u otprilike 45 različitih kategorija, a na temelju njihove skeletne jezgre, klasificiraju se kao linearni, biciklički, triciklički, tetraciklički, pentaciklički ili makrociklički. U prirodi se obično nalaze polioksigenirani diterpeni, s keto i hidroksilnim skupinama koje su obično esterificirane malim alifatskim ili aromatskim kiselinama [42]. Diterpenoidi imaju niz bioloških funkcija, uključujući antioksidativno, protuupalno i imunomodulatorno djelovanje [43,44].

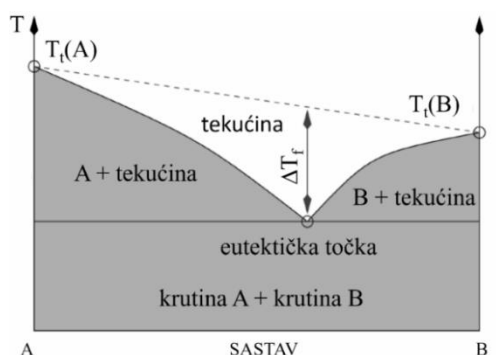


Slika 6. Prikaz osnovne podjele terpena

2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) nastaju miješanjem dviju ili više tvari, najčešće Lewisovih ili Brønsted-Lowryjevih kiselina i baza, i imaju značajno niže talište u odnosu na početne komponente zasebno. To značajno

smanjenje tališta posljedica je međumolekulskih interakcija koje nastaju između komponenti. Sastav tvari pri kojem se postiže najniža temperatura pri kojoj sustav može postojati u tekućoj fazi naziva se eutektička točka (Slika 7).



Slika 7. Fazni dijagram eutektičke smjese [55]

Prilikom pripreme DES-ova koriste se ionski spojevi (anorganske i organske soli) i nenabijene molekule koji djeluju ili kao akceptori vodikove veze ili kao donori vodikove veze. Osim spomenutih interakcija među komponentama u obliku vodikovih veza, ovdje se javljaju i Van der Waalsove te elektrostatske interakcije [45].

Abbott i suradnici 2003. godine prvi su na primjeru smjese kolin-klorida i uree uveli definiciju DES-ova [4]. Pripremljenim smjesama kolin klorida i uree u različitim molarnim omjerima praćeno je talište pri čemu se pokazalo da najniže talište ima smjesa kolin - klorida: uree pri omjeru 1 : 2, koje je iznosilo 12 °C, što je znatno niže od čistih komponenti. Prema dosadašnjim saznanjima, DES-ovi se mogu pripremiti na nekoliko načina:

- 1) miješanjem i zagrijavanjem komponenti
- 2) otapanjem komponenti u vodi, a potom uklanjanjem vode (rotacijskim uparivačem pri sniženom tlaku ili liofilizacijom)
- 3) mljevenjem komponenti
- 4) zagrijavanjem u mikrovalnom reaktoru ili pomoću ultrazvuka
- 5) ekstruzijom [46-48]

Ipak, najčešći način pripreme je miješanjem i zagrijavanjem dvije ili tri komponente, što je vrlo jednostavan način pripreme, bez potrebe za dodatnim pročišćavanjem čime se skraćuje vrijeme pripreme otapala. Glavne značajke ovih otapala koje su pridonijele sve većoj upotrebi su prvenstveno biorazgradivost, nezapaljivost i nizak tlak para, što zatim dovodi do konačnih nižih troškova i manjeg utjecaja na okoliš [50-52]. Zbog njihove nehlapljive i nezapaljive prirode, skladištenje takvih otapala mnogo je sigurnije i lakše. Osim

toga, pokazalo se da zbog svojih specifičnih i prilagodljivih fizikalnih i kemijskih svojstava, zbog čega su i nazvana „dizajnerska otapala“ predstavljaju dobra otapala za ekstrakciju brojnih komponenti.

Prema literaturi, DES-ovi se mogu klasificirati u pet različitih kategorija ovisno o prirodi korištenih HBA-ova i HBD-ova (Tablica 2) [53].

Tablica 2. Klasifikacija DES-ova [54]

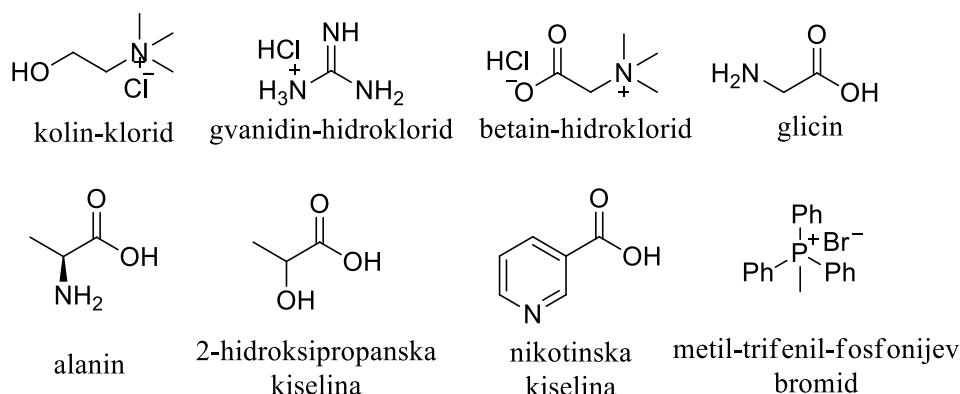
Kategorija	Komponente	Primjer
I	kvaterna amonijeva sol + klorid metala	ChCl : ZnCl ₂
II	kvaterna amonijeva sol + klorid metala (hidrat)	ChCl : FeCl ₃ × 6H ₂ O
III	kvaterna amonijeva sol + HBD	ChCl : urea
IV	klorid metala (hidrat) + HBD	ZnCl ₂ : urea
V	neionski HBA + HBD	Timol : mentol

Otapala koja spadaju pod III. i IV. kategoriju su ona koja se nazivaju niskotemperaturna eutektička otapala, a pripremaju se iz kvaternih amonijevih soli i klorida metala te donora vodikove veze [55]. Osim navedenih kategorija, sve se više spominju i prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents* - NADES), sastavljena od kolin klorida u kombinaciji sa prirodno prisutnim karboksilnim kiselinama, šećerima i aminokiselinama te terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Systems* - THEDES) [56] gdje se kao komponente koriste tvari sa biološkom i farmaceutskom aktivnošću. Takva otapala su vrlo često prisutna kao tercijarni sustavi gdje se voda koristi kao treća komponenta otapala [57].

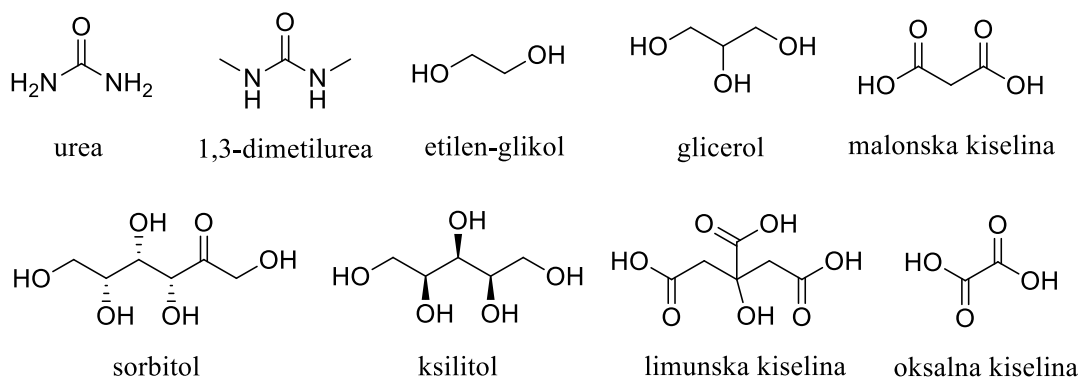
2.3.1. Hidrofilna niskotemperaturna eutektička otapala

Trenutno su hidrofilni DES-ovi češće korišteni što i ne čudi s obzirom na to da su prvi nastali i razvijali se godinama. Jedan od najčešće korištenih HBA za pripremu ovih otapala je kolin-klorid (ChCl), kvaterna amonijeva sol koja je jeftina, biorazgradiva i netoksična s visokom toplinskom i kemijskom stabilnošću. ChCl može tvoriti DES s različitim prirodnim

komponentama kao što su amini, šećeri, šećerni alkoholi, alkoholi i karboksilne kiseline koje predstavljaju HBD (Slika 8 i 9) [3,4]. ChCl pomaže u stabilizaciji otapala u visokotemperaturnim reakcijama. Ipak, s obzirom na njegovu higroskopsku prirodu što ga čini osjetljivim na vlagu, kod većeg udjela vode može doći do ometanja vodikove veze između komponenti otapala [58].



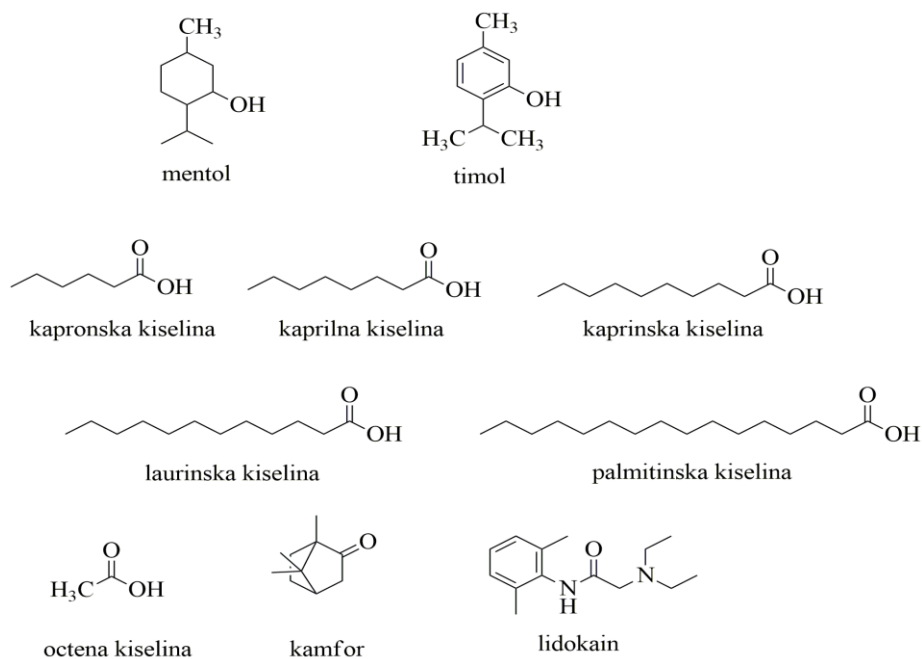
Slika 8. Najčešći akceptori vodikove veze za pripravu DES-ova [59]



Slika 9. Najčešći donori vodikove veze za pripravu DES-ova [45]

2.3.2. Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala

Kako bi se proširila mogućnost primjene u različitim procesima, postoji mogućnost pripreme i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (hDES), koja se ne miješaju s vodom. Za pripremu takvih otapala koriste se dugolančane kvaterne amonijeve soli (tetrabutilamonijev bromid i metiltrioktilamonijev klorid), katehol, rezorcinol, kamfor, timol, lidokain, mentol i dugolančane karboksilne kiseline [60] (Slika 10).



Slika 10. Najčešće komponente hDES-ova

S obzirom da se takva otapala ne miješaju s vodom pokazala su se učinkovita u ekstrakciji isparljivih bioaktivnih spojeva [61] i pesticida [62] iz biljaka te za biokatalizu. Analogno primjeni CHCl_3 u pripremi hidrofilnih DES-ova, mentol se najčešće koristi u slučaju hidrofobnih otapala, uglavnom zbog niže viskoznosti takvih otapala u usporedbi s hDES-ovima na bazi kvaternih amonijevih soli [63]. U odnosu na hidrofilna otapala kod kojih se fizikalno-kemijska svojstva mogu promijeniti dodatkom vode, u slučaju hidrofobnih, unatoč činjenici da se neka mogu miješati s manjim volumenom vode, svojstva se ne mogu podešavati i mijenjati dodatkom vode. Umjesto toga, fizikalno-kemijska svojstva se podešavaju promjenom vrste i omjera komponenti, te dodatkom treće komponente.

2.3.3. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova

Određena fizikalno-kemijska svojstva DES-ova lako se mogu prilagoditi željenoj uporabi, odnosno mogu se „dizajnirati“. Upravo stoga ih i neki autori nazivaju dizajnerskim otapalima [53]. Promjenom komponenti, kao i njihovih molarnih omjera utječe se na promjenu tališta, gustoće, viskoznosti, polarnosti, pH-vrijednosti te provodljivosti.

Najznačajnija karakteristika DES-ova je nastajanje kapljevine pri temperaturi značajno nižoj od temperature taljenja pojedinih komponenti koje čine otapalo. Prema trenutnoj literaturi, sva pripravljena otapala imaju talište niže od 150 °C, dok je većina u tekućem stanju već pri temperaturi od 50 °C ili čak i nižoj [45]. Snižavanje temperature taljenja ovisi o odabranim komponentama, kao i njihovom molarnom omjeru. Iako sam mehanizam tako nagle promjene temperature taljenja nije poznat, pretpostavlja se da ovisi o jačini vodikove veze između donora i akceptora vodikove veze, ionskom privlačenju te o steričkim efektima zbog samog oblika molekula [64].

Gustoća je jedno od osnovnih fizikalnih svojstava tekućina. Prema literaturi, gustoća većine hidrofilnih DES-ova mjerena pri sobnoj temperaturi je veća u odnosu na vodu te iznosi između 1,00 i 1,35 g/mL, dok za DES-ove na bazi metalnih soli čak i 1,3–1,6 g/mL (Tablica 3) [65]. Suprotno tome, gustoća hidrofobnih DES-ova je niža u odnosu na hidrofilna otapala, s tim da neka otapala imaju nižu gustoću i u odnosu na vodu [46].

Na gustoću pojedinog otapala utječe način pripreme, sastav, odnosno odabir donora i akceptora vodikove veze i njihov molarni omjer te temperatura pri kojoj se navedeno otapalo koristi. Ovisno o metodi pripreme, odnosno zagrijavanju i miješanju ili mljevenju komponenti, gustoća, kao i viskoznost pripremljenih DES-ova će se razlikovati [46]. Karakteristike donora vodikove veze i molarni omjer komponenti za pripremu DES-ova imaju značajan učinak na gustoću nastalog otapala. Primjerice, u slučaju DES-ova gdje se kao donor vodikove veze koriste komponente sa hidroksilnim grupama, gustoća raste s brojem hidroksilnih skupina, što je u skladu s pretpostavkama da gušća mreža vodikovih veza smanjuje utjecaj slobodnog volumena između komponenti [66]. Navedeno se može uočiti kod usporedbe različitih alkohola kao donora vodikove veze, pri čemu će veće vrijednosti gustoće biti zabilježene kod DES-ova s glicerolom u odnosu na one s etilen glikolom. S druge strane, gustoća DES-ova se smanjuje ukoliko se kao donori vodikove veze koriste komponente sa aromatskim skupinama, kao što je primjerice fenol. Kod primjene kiselina kao donora vodikove veze, gustoća se smanjuje sa povećanjem duljine alkilnog lanca. Osim utjecaja donora vodikove veze, na gustoću utječe i akceptor vodikove veze, pa je tako pokazano da DES-ovi s bromidnim solima imaju veću gustoću u odnosu na one s kloridnim solima [50]. Gustoća hidrofilnih i hidrofobnih DES-ova ovisna je o temperaturi, odnosno smanjuje se linearno s povećanjem temperature [46,67-69].

Viskoznost je važno i opsežno proučavano svojstvo DES-ova, ponajviše zbog važnosti za industrijsku primjenu. Prema literaturi, većina zabilježenih hidrofilnih DES-ova vrlo su

viskozna na sobnoj temperaturi ($\eta > 100$ mPa/s) što se uglavnom pripisuje razgranatoj mreži vodikovih veza između komponenti otapala, kao i elektrostatskim ili van der Waalsovima interakcijama [45, 70]. S druge strane, viskoznost hidrofobnih DES-ova, posebice onih na bazi DL-mentola je niska, značajno niža u odnosu na hidrofilna otapala. Na viskoznost pojedinog otapala utječe način pripreme otapala, komponente otapala [71,72] i njihov molarni omjer [73], temperatura pri kojoj se navedeno otapalo koristi [3,4,74-76] i sadržaj vode [46,75,77-79]. Ovisno o odabranom donoru i akceptoru vodikove veze, DES-ovi posjeduju vrlo širok raspon viskoznosti. Poznato je da DES-ovi na bazi ChCl s alkoholima imaju nižu viskoznost u odnosu na DES-ove na bazi ChCl s šećerima koji imaju izuzetno visoku viskoznost (Tablica 3). Što se tiče utjecaja strukture komponenti DES-ova na viskoznost, pokazalo se da DES-ovi koji sadrže dikarboksilnu kiselinu imaju veću viskoznost u odnosu na monokarboksilne kiseline, kao i oni DES-ovi koji sadrže karboksilne ili hidroksilne skupine zbog stvaranja dodatnih vodikovih veza. Osim toga, povećanje duljine lanca ugljikovodika također dovodi do povećanja viskoznosti [46].

Temperatura ima važan utjecaj na viskoznost DES-ova, pa se stoga čak i jako viskozni DES-ovi, koji se ne mogu koristiti u praktične svrhe pri sobnoj temperaturi, mogu razmotriti za primjene na višim temperaturama. Ovisnost viskoznosti DES-ova o temperaturi je opisana u literaturi primjenom Arrhenius ili Vogel–Fulcher–Tammanove jednadžbe. Prilagođavanje podataka o viskoznosti i temperaturi Arrheniusovom ponašanju omogućavaju izračun energije aktivacije (E_a), koja se može koristiti za kvantificiranje ovisnosti viskoznosti i temperature te jakosti međumolekulskih sila u DES-ovima. DES-ovi niske viskoznosti pokazuju vrlo niske vrijednosti E_a , dok se najveće vrijednosti E_a dobivaju za jako viskozne DES-ove, poput onih koji sadrže šećere kao HBD.

Osim navedenih utjecaja na viskoznost, smatra se da se viskoznost DES-ova može objasniti i s teorijom praznog prostora [74,80]. Prema navedenoj teoriji smatra se da su viskoznost i električna vodljivost u korelaciji sa praznim prostorom u tekućini koje omogućuje odgovarajuće ionsko gibanje. Stoga, iako interakcije između komponenti DES-ova igraju ključnu ulogu u određivanju viskoznosti, u obzir treba uzeti i prostorne učinke. DES-ovi koji sadrže veće prazne prostore dovode do manje viskoznih kapljevina, i iako to vrijedi za većinu proučavanih DES-ova, trend nije linearan, s obzirom da vrlo viskozni DES-ovi kao što su kolin klorid : glukoza odstupaju od općeg trenda [50].

Tablica 3. Tališta, gustoće i viskoznosti nekih otapala

HBA	HBD	Molarni omjer ChCl : HBD	Talište (°C)	Gustoća (g/mL)	Viskoznost (cP)	Literaturni izvor
ChCl	Urea	1 : 2	12	1,25 (25 °C)	750 (25 °C) 169 (40 °C)	[45, 55, 81]
	Tiourea	1 : 2	69	1,36 (35 °C)	2 972 (35 °C)	[45]
	1,3-Dimetilurea	1 : 2	70	1,36 (40 °C)	4 029 (40 °C)	[45]
	Acetamid	1 : 2	51	1,09 (25 °C)	127 (40 °C)	[45]
	Etilen-glikol	1 : 2	-66	1,12 (25 °C)	36 (20 °C)	[55, 81]
	Glicerol	1 : 2	-40	1,18 (25 °C)	376 (20 °C)	[55, 81]
	Butan-1,4-diol	1:3	-	-	140 (20 °C)	[81]
	Limunska kiselina	1 : 1	69	1,33 (30 °C)	289 (75 °C)	[45,53]
	Malonska kiselina	1 : 1	10	1,25 (25 °C)	721 (25 °C)	[45, 55, 81]
	Oksalna kiselina	1 : 1	34	1,259 (25 °C)	231 (25 °C)	[54, 81]
	Levulinska kiselina	1 : 2	tekućina	1,138 (25 °C)	164 (30 °C)	[50, 54]
	Ksilitol	1 : 1	tekućina	1,25 (25 °C)	5 230 (30 °C)	[55]
	Sorbitol	1 : 1	tekućina	1,28 (25 °C)	12 730 (30 °C)	[55]

HBA	HBD	Molarni omjer ChCl : HBD	Talište (°C)	Gustoća (g/mL)	Viskoznost (cP)	Literaturni izvor
	Glukoza	1 : 1	31	1,273 (25 °C)	9037 (25 °C)	[54,81]
Timol	Kamfor	1 : 1	-44	-	25,8 (25 °C)	[81]
	Kaprinska kiselina	1 : 1	17	-	11,2 (25 °C)	[81]
	Octena kiselina	1 : 1	-7,81	-	8,69 (25 °C) 3,25 (50 °C)	[81]
Mentol	Mliječna kiselina	1 : 2	-61,14	-	218,93 (25 °C) 29,47 (50 °C)	[81]
	Laurinska kiselina	2 : 1	13,84	-	24,42 (25 °C) 7,61 (50 °C)	[81]

Polarnost otapala ključno je svojstvo za karakterizaciju sposobnosti otapanja određenih tvari. Na polarnost DES-ova utječe sastav otapala, molarni omjer komponenti, udio vode u otapalu te temperatura [83]. Za određivanje polarnosti DES-ova koristi se nekoliko ljestvica, najčešće Reichardtova (ET) i Kamlet-Taftova ljestvica [82]. Uobičajeni način mjerenja polariteta otapala je pomoću solvatokromnih boja, koje se dodaju u otapalo pri čemu se mjeri pomak u valnoj duljini UV-VIS spektrofotometrijom. Kao solvatokromne boje najčešće se koriste betainsko bojilo 30 i 33, piren, piren-1-karbaldehid, 8-anilinonaftalen-1-sulfonska kiselina, kumarin 153 i nilsko crvenilo. Prema istraživanjima provedenima na otapalima na bazi ChCl, pokazano je kako veći broj hidroksilnih, karboksilnih i karbonilnih skupina HBD i dodatak vode povećavaju polarnost, dok se porastom temperature polarnost smanjuje [83].

Različiti DES-ovi mogu biti kiseli i bazični, ovisno o samoj prirodi komponenata koje čine otapalo. Određivanje kiselosti važno je za primjenu DES-ova kao otapala i katalizatora u mnogim slučajevima, posebno u reakcijama esterifikacije i transesterifikacije. Na kiselost DES-ova utječe sastav otapala, molarni omjer komponenti, te udio vode u otapalu. Za Brønstedove kisele DES-ove (BADES), Brønstedova jačina kiselosti može se procijeniti mjerenjem pH ili primjenom Hammettove funkcije kiselosti. Za Lewisova kisele DES-ove (LADES), Lewisova kiselost može se odrediti primjenom FTIR-a, gdje se piridin koristi kao slijepa proba za praćenje u rasponu od 1400–1700 cm^{-1} [84,85].

pH se često koristi za procjenu kiselosti BADES-a. Prema provedenim istraživanjima, utvrđeno je kako kemijska priroda HBD-a ima presudan učinak na jačinu kiselosti odgovarajućih BADES-a, dok temperatura ima slab utjecaj na pH vrijednosti [86]. Hammettova funkcija (H_0), koja se oslanja na UV-VIS spektrofotometriju uz upotrebu bazičnog indikatora u vodi, još je jedan pristup za procjenu kiselosti BADES-a, a izračunava se sljedećom jednadžbom (1):

$$H_0 = pK(I)_{aq} + \log([I]_s/[IH^+]_s) \quad (1)$$

gdje I predstavlja indikator, a $pK(I)$ je termodinamička konstanta ionizacije indikatora u vodi. Omjer $[I]/[IH^+]$ može se odrediti iz apsorbancije izmjerene prije i nakon dodavanja BADES-ova. Navedena metoda koristila se za određivanje kiselosti nekoliko DES-ova na bazi ChCl pomoću indikatora 4-nitrobenzilcijanida. Pokazano je kako je otapalo ChCl : urea

(1 : 2) slabo bazično otapalo pri čemu dodatak vode smanjuje bazičnost. Što se tiče otapala s CHCl_3 i kiselinama, uočava se povezanost kiselosti otapala s konstantom disocijacije pojedine kiseline korištene za pripremu otapala [67].

2.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti

S obzirom na sve veću svijest o važnosti bioaktivnih sastojaka biljnog podrijetla, njihova primjena u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji je u porastu. Upravo zato, potrebno je pronaći učinkovitu metodu ekstrakcije koja će osigurati visoke prinose komponenti u što kraćem vremenu, uz što manji utrošak resursa i uz što manje negativnih utjecaja na okoliš i zdravlje ljudi.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti može se opisati kao "odvajanje određenih komponenti od krutog ili tekućeg materijala pomoću odgovarajućeg otapala u kojem su pojedine komponente bolje topljive u odnosu na ostale sastojke početnog materijala" [87]. U ovoj vrsti ekstrakcije, prinos ekstrahiranog spoja ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su priroda otapala i uzorka, omjer kruto-tekuće, kao i vrijeme i temperatura ekstrakcije [88, 89]. Danas, postojeće tehnike ekstrakcije mogu se podijeliti na klasične ili konvencionalne i moderne ili inovativne tehnike ekstrakcije.

2.4.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenti

Klasične ili konvencionalne tehnike ekstrakcije uključuju procese kao što su maceracija, perkolacija, hidrodestilacija i Soxhlet ekstrakcija [90], a obično su dugotrajne uz korištenje velikih količina otapala kao što su ugljikovodici, alkoholi i kloroalkani koji su skupi i, štoviše, opasni za ljudsko zdravlje i okoliš [91,92]. Unatoč tome što se za konvencionalne tehnike ekstrakcije kao otapalo može koristiti i voda, vrlo često željene komponente nisu topljive ili su slabo topljive u vodi [93]. Unatoč učinkovitosti organskih otapala u ekstrakciji bioaktivnih komponenti konačni ekstrakti zahtijevaju koncentriranje i daljnje pročišćavanje što na kraju daje niska iskorištenja bioaktivnih komponenti [14]. Gledajući sve navedeno, s naglaskom na dulje vrijeme ekstrakcije, veću količinu uzorka i otapala za ekstrakciju kao i obavezno pročišćavanje konačnog proizvoda, konvencionalne tehnike smatraju se skupim procesima.

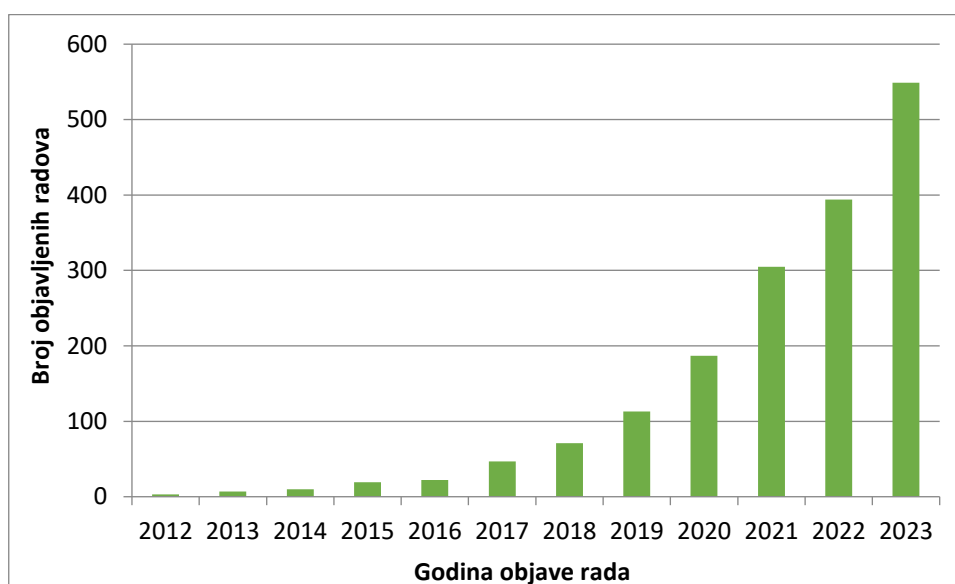
Bioaktivne komponente uključuju velik broj kemijskih spojeva različite strukture što otežava odabir odgovarajuće tehnike ekstrakcije, kao i optimalne uvjete ekstrakcije [89]. Fenolni spojevi, s naglaskom na polifenole, su vrlo često termolabilni što znači da im se na visokoj temperaturi mijenja struktura što dovodi do smanjenja određene aktivnosti spoja. Ova vrsta spojeva često stupa u interakciju s drugim spojevima u stanicama, poput ugljikohidrata i proteina, što rezultira stvaranjem manje topljivih kompleksa i utječe na proces ekstrakcije [94]. Uz već gore navedene nedostatke konvencionalnih tehnika, ove karakteristike bioaktivnih komponenti dodatno otežavaju i smanjuju učinkovitost ovakvog tipa ekstrakcija.

2.4.2. Inovativne tehnike ekstrakcije bioaktivnih komponenti

S obzirom na sve prepoznate nedostatke konvencionalnih tehnika, došlo je do razvoja selektivnijih i bržih tehnika ekstrakcije koje su ekološki prihvatljivije s minimalnom degradacijom komponenti [95,96]. Inovativne tehnike ekstrakcije posljednjih desetljeća razvijaju se vrlo brzo, no trenutno su najpoznatije i najviše korištene ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), ekstrakcija subkritičnom vodom (engl. *Subcritical Water Extraction*, SWE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE) kao i ekstrakcija pomoću ionskih tekućina (engl. *Ionic Liquids*, IL) i DES-ova. Većina navedenih ekstrakcijskih tehnika učinkovitija je od konvencionalnih, stoga prednost nije samo u korištenju „zelenih i sigurnih“ otapala već i u većim prinosima komponenti i boljoj iskoristivosti. Posebnost ovih ekstrakcijskih tehnika je u selektivnoj ekstrakciji koja je omogućena jednostavnom promjenom procesnih parametara (temperatura, vrijeme, protok, snaga itd.), što ih čini pogodnim za ekstrakciju različitih bioaktivnih komponenti bez promjene procesa ili otapala [97].

2.4.2.1. Ekstrakcija primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Broj istraživanja koja se bave ekstrakcijom bioaktivnih komponenti pomoću DES-ova značajno je porastao posljednjih godina s obzirom na brojne navedene prednosti u odnosu na konvencionalna otapala (Slika 5), s naglaskom na selektivnost i bolji prinos komponenti. Boljem prinosu bioaktivnih komponenti pomaže mogućnost otapanja lignoceluloze primjenom određenih DES-ova, što uzrokuje oštećenje stanične stijenke biljke i poboljšava proces prijenosa mase [98].



Slika 11. Prikaz broja objavljenih radova u bazi *Science Direct* s ključnim riječima „*deep eutectic solvents, extraction, bioactive components*“

Trenutno se DES-ovi, a posebno NADES-ovi, smatraju zelenim biorazgradivim otapalima sa mogućnošću recikliranja, što ih čini zanimljivima za industrijsku primjenu. Osim toga, DES-ovi pokazuju izvrsnu sposobnost očuvanja komponenti u ekstraktu tijekom duljeg razdoblja, što govori u prilog njihovoj upotrebi. Uz sve navedeno, dobra postojanost, a posebice njihova niska cijena su jedni od najvažnijih razloga za tako široku primjenu [99] na što ukazuje i broj publikacija koje se bave navedenom problematikom (Slika 11).

Ipak, jedna od najvećih prednosti korištenja DES-ova za ekstrakciju su brojne kombinacije HBA-a i HBD-a koje se mogu koristiti za pripremu otapala. S obzirom na utjecaj početnih komponenti na fizikalno-kemijska svojstva tako pripremljenog otapala, svako otapalo je različito. Upravo to je dovelo do opisivanja DES-ova kao dizajnerskih otapala koja se mogu kreirati kako bi se omogućio najveći prinos točno određene grupe

bioaktivnih spojeva. Prema literaturi, ChCl-DES pokazuju visoku topljivost i selektivnost za fenolne komponente [100]. Većina ChCl-DES su ekološki prihvatljivi, niske toksičnosti i biorazgradivi te sigurni za upotrebu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji [101,102].

Brojni istraživači svakodnevno rade na pripremi novih DES-ova različitih fizikalno-kemijskih svojstava koji nalaze primjenu u mnogim područjima, uključujući i ekstrakciju. Stoga je prvi korak istraživanja obično probir otapala kako bi se pronašlo najprikladnije otapalo za ekstrakciju odabranih komponenti. S obzirom na specifičnost i složenost matriksa kao što su prirodni materijali iz različitih izvora, ne može se dati opći zaključak o najprikladnijim DES-ovima, kao ni optimalnoj kombinaciji HBA i HBD za ekstrakciju željenih komponenti. Ipak, s obzirom na velik broj do sada objavljenih radova, mogu se donijeti neki opći zaključci o prikladnosti pojedine vrste DES-ova za ekstrakciju pojedinih bioaktivnih komponenti [103]. Primjerice, DES-ovi su se pokazali učinkovitima za ekstrakciju fenolnih kiselina, posebno otapala na bazi ChCl i polialkohola [104,105], kao i tercijarna otapala kao što je ChCl : DL-jabučna kiselina : urea (2 : 1 : 2) [106]. Također, za flavonoide su se prikladnima pokazala otapala na bazi ChCl i polialkohola i karboksilnih kiselina [107,108] (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz najpogodnijih otapala i uvjeta za ekstrakciju bioaktivnih komponenti primjenom DES-ova

Biljka	Odabrano otapalo	Tip ekstrakcija	Optimalni uvjeti ekstrakcije	Ekstrahirane komponente	Literaturni izvor
<i>Lonicerae japonicae flos</i>	ChCl : butan-1,3-diol (1 : 2)	MAE	1 g/9 mL 10% vode (v/v) 60 °C 20 min	klorogenska kiselina, kafeinska kiselina, 3,5-dikafeoilkininska kiselina, 3,4-dikafeoilkininska kiselina i 4,5-dikafeoilkininska kiselina	[104]
<i>Artemisia argyi</i>	ChCl : jabučna kiselina (1 : 1) ChCl : jabučna kiselina : urea (2 : 2 : 1)	UAE	1,0 g/57.5 mL 54 % vode (v/v) 23.5 min	3-kafeoilkininska kiselina, 3,4-di- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina, 3,5-di- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina i 4,5-di- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina	[106]
<i>Salvia rosmarinus</i>	Tetrapropil amonijev klorid : propan-1,2-diol : voda (15 : 55 : 30 % wt)	Miješanje i zagrijavanje	1,0 g/21 mL 129 min 84 °C	karnosolna kiselina karnosol	[109]
	ChCl : butan-1,2-diol (1 : 2)	Miješanje i zagrijavanje	1 g/40 mL 50 % vode (v/v) 150 min 65 °C	ružmarinska kiselina karnosolna kiselina karnosol	[110]
<i>Mentha piperita</i> L.	ChCl : glukoza (5 : 2)	Miješanje i zagrijavanje Miješanje	1 g/100 mL 45 min sobna temp.	ružmarinska kiselina riocitrin luteolin 7- <i>O</i> -rutinozid	[111]

Biljka	Odabrano otapalo	Tip ekstrakcija	Optimalni uvjeti ekstrakcije	Ekstrahirane komponente	Literaturni izvor
		UAE			
<i>Lycium barbarum</i> L.	ChCl : p-toluensulfonska kiselina	Miješanje i zagrijavanje UAE	1 g/50 mL 90 min 25 °C	klorogenska kiselina, ferulinska kiselina, p-kumarinska kiselina luteolin, rutin, miricetin, kvercitrin, apigenin, hiperozid	[112]
<i>Camellia oleifera</i>	ChCl : mliječna kiselina (1 : 2)	UAE	1 g/40 mL 35 % vode (v/v) 50 min 40 °C	kvercetin 3-O-ramnozid, kamferol 3-O-ramnozid, kvercetin, kamferol	[107]
<i>Morus alba</i> L.	ChCl : glicerol (1 : 2)	MAE	1,0 g/20 ml DES 20% vode (v/v) 66 °C 18 min	neoklorogenska kiselina, klorogenska kiselina, kriptoklorogenska kiselina, kafeinska kiselina, rutin, izokvercetin, astragalin	[105]
<i>Polygonum aviculare</i>	ChCl : levulinska kiselina (1 : 2)	UAE	1 g/85 mL 38 % vode (v/v) 70 °C 60 min	galna kiselina, 5-kafeoilkininska kiselina, miricitrin, kvercitrin avikularin	[108]

Biljka	Odabrano otapalo	Tip ekstrakcija	Optimalni uvjeti ekstrakcije	Ekstrahirane komponente	Literaturni izvor
<i>Cannabis sativa</i> L.	Mentol : octena kiselina (1:1)	UAE	0,02 g/0,8 mL DES 30°C 10 min	CBD, CBDA, THC, THCA	[113]
	ChCl : (+)-dietil L-tartarat (1:1)	UAE	1 g/24 mL 32% vode (v/v) 48 °C 55 min	CBD	[114]
<i>Flos chamomillae</i> <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Archangelica officinalis</i>	ChCl : mliječna kiselina : 1,3-propandiol (1 : 2 : 1)	Miješanje i zagrijavanje	1 g/40 mL DES 62 °C 20 min	umbeliferon, herniarin, 4-metilumbeliferon, skoparon, Eskulin,	[115]
<i>Camellia sinensis</i>	ChCl : butan-1,4-diol (1 : 3)	MCE	0.05 g/mL 50 % vode (w/w) 4 m/s 20 sekundi	kofein, teobromin, kaemferol, epigalokatehin	[116]

Na temelju svih dosad prikupljenih rezultata, za probir otapala, kao i za predviđanje kombinacija HBA i HBD koje će biti prikladne za ekstrakciju određenih bioaktivnih komponenti, može se koristiti računalno modeliranje. Primjenom takve metode smanjila bi se potreba za probirom velikog broja otapala, štedeći kemikalije, vrijeme, energiju, kao i resurse te stvarajući manje otpada [103]. U istraživanju koje su proveli Yue i sur., [117], računalno modeliranje putem CPCM modela (engl. *Conductor-like Polarizable Continuum Model*) korišteno je za izračunavanje slobodne energije solvatacije klorogenske kiseline u različitim NADES-ovima. Prema dobivenim izračunima, između različitih otapala, DES prolin – jabučna kiselina (1:1) je najprikladniji budući da je klorogenska kiselina imala najveću solvatacijsku slobodnu energiju u tom otapalu. Isto je ispitano i eksperimentalno, a dobiveni rezultati potvrdili su proračune dobivene primjenom računalnog modeliranja. U radu Hroboňová i sur. [115] korišten je kemometrijski pristup za ekstrakciju kumarina kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata, što pridonosi očuvanju okoliša zbog smanjenja količine otapala i generiranog otpada te smanjuje potrošnju resursa. Za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije rutina primjenom 12 NADES-ova korišten je i COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Realistic Solvents*). Korištena otapala su bila na bazi ChCl s kiselinama, šećerima, alkoholima i amidima. Utvrđeno je da se teorijsko predviđanje i eksperimentalno određeno najpogodnije otapalo za ekstrakciju rutina izvrsno slažu. Najveća topljivost rutina zabilježena je u otapalima ChCl : propan-1,2-diol i ChCl : urea [118].

Najznačajniji čimbenici koji utječu na kapacitet ekstrakcije DES-ova su njihova fizikalno-kemijska svojstva, kao što su gustoća, viskoznost, polaritet i kiselost/bazičnost, koji ovise o sastavu DES-a [119] te procesni parametri kao što su temperatura, vrijeme ekstrakcije i omjer kruto-tekuće.

Viskoznost je važan parametar svakog otapala budući da utječe na prijenos mase i ionsku vodljivost, te u konačnici na učinkovitost ekstrakcije [46, 52, 120], budući da je niža viskoznost povezana s većim prijenosom mase i time boljom učinkovitošću ekstrakcije [121]. U usporedbi s organskim otapalima, većina DES-ova je vrlo viskozna na sobnoj temperaturi na što snažno utječe tip kao i omjer HBA i HBD, temperatura ekstrakcije i udio vode [45]. U procesu ekstrakcije, za smanjenje viskoznosti hidrofilnih DES-ova najčešće se dodaje određeni postotak vode ili se ekstrakcija provodi pri višim temperaturama. Unatoč tome što se dodatkom vode viskoznost značajno smanjuje, time se utječe i na druga svojstva

DES-ova, pri čemu je s previsokim postotkom dodatka vode moguće i narušiti strukturu nastalog otapala [46,105,119]. Upravo iz tog razloga, u istraživanjima se vrlo često prati utjecaj dodatka vode na učinkovitost ekstrakcije. U slučaju ekstrakcije fenolnih kiselina s kolin-klorid : glicerol (1 : 2) DES-om praćen je utjecaj dodatka vode u rasponu od 0 do 80 % (w/w) na učinkovitost ekstrakcije. Dodatak vode od 20 % značajno je poboljšao učinkovitost ekstrakcije, a daljnjim povećanjem se ta učinkovitost smanjuje [119], dok se za ekstrakciju kumarina pokazalo da dodavanje vode veće od 40 % smanjuje učinkovitost ekstrakcije [115]. Osim vode, i druga otapala se mogu koristiti za smanjenje viskoznosti DES-a, kao što su etanol i metanol [99]. Osim primjene kootapala, povećanje temperature osigurava dovoljnu kinetičku energiju molekula što dovodi do smanjenja međumolekulskih sila i vodikovih interakcija, što u konačnici dovodi do značajnog smanjenja viskoznosti [70,119].

Istraživanjima je utvrđeno da je učinkovitost ekstrakcije DES-ova uvjetovana i polarnošću kao ključnim pokazateljem sposobnosti otapanja komponenti u DES-ovima. Za promjenu polariteta DES-ova mijenjaju se komponente ili molarni omjer komponenti u DES-ovima ili se dodaje određeni udio vode [50,122]. U slučaju fenolnih kiselina, DES-ovi su se pokazali učinkoviti s obzirom da je njihova polarnost vrlo slična polarnosti željenih komponenti. Odnosno, prema principu "slično se otapa u sličnom" najbolji prinos komponenti postiže se upravo takvim otapalima [105].

Vrijeme, temperatura i omjer kruto-tekuće kao procesni parametri imaju veliki utjecaj na proces ekstrakcije. Temperatura ekstrakcije vrlo je važan parametar budući da povišena temperatura može olakšati slabljenje interakcija između željenih komponenata i matriksa uzorka, čime se povećava otapanje komponenata u otapalu. Osim toga, viša temperatura dovodi do smanjenja viskoznosti, gustoće i površinske napetosti DES-a, što također poboljšava sposobnost ekstrakcije. Kao što je navedeno, viskoznost se može smanjiti povećanjem temperature, međutim, previsoka temperatura može dovesti do degradacije DES-ova kao i željene komponente, što smanjuje učinkovitost ekstrakcije [103]. Osim toga, rad pri višoj temperaturi iziskuje i veći utrošak energije. Prinosi fenolnih kiselina i flavonoida rastu s porastom temperature od 40 do 60 °C, ali daljnje povećanje temperature dovodi do smanjenja prinosa ekstrakcije zbog mogućeg razgradnje komponenata u DES-ovima na bazi ChCl s alkoholima [123-125].

Omjer biljnog materijala i otapala je također važan čimbenik i stoga je važno pronaći optimalan omjer za povećanje učinkovitosti ekstrakcije. Količina dodanog čvrstog biljnog

materijala važna je jer izravno utječe na sposobnost otapanja što posljedično utječe na učinkovitost ekstrakcije [126]. Prekomjerne količine korištenog otapala ne podržavaju načela zelene kemije uglavnom zbog stvaranja veće količine otpada koji je potrebno adekvatno zbrinuti. S druge strane, problem korištenja premale količine otapala uglavnom je nepotpuna ekstrakcija željenih komponenti. Uz to, količina korištenog otapala utječe i na vrijeme ekstrakcije, pri čemu će ekstrakcija trajati duže ukoliko se koristi manje otapala [103]. U ekstrakciji flavonoida pokazano je kako povećanje omjera kruto-tekuće na 1 : 25 dovodi do povećanja prinosa komponenti, dok dodatno povećanje na 1 : 30 ne dovodi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije [123]. Za većinu ispitanih fenolnih kiselina i flavonoida je pokazano da omjer kruto-tekuće od 1 : 20 pokazuje najveću učinkovitost za ekstrakciju svih komponenti [126].

Vrijeme je jedan od bitnih parametara sa značajnim utjecajem na učinkovitost ekstrakcije. Duže trajanje ekstrakcije povećava troškove procesa, te može doći do razgradnje osjetljivih komponenti, dok s druge strane, kratko vrijeme ekstrakcije može dovesti do nižih prinosa komponenti. Stoga je važno pronaći optimalno vrijeme ekstrakcije za komponente u određenim DES-ovima [114]. Osim toga, na primjeru kumarina (eskulin, umbeliferon, skoparon, 4-metilumbeliferon i herniarin) pokazano je kako je za prolazak otapala do ciljanih komponenti, odnosno njihovu ekstrakciju u otapalo važno upravo vrijeme [115].

Visoka viskoznost, koja je već mnogo puta spomenuta, predstavlja najveći nedostatak DES-ova te dovodi do smanjenja učinkovitosti ekstrakcije zbog smanjene difuzije i prijenosa mase. Osim toga, viskoznost može uzrokovati nekoliko praktičnih izazova u daljnjem radu nakon ekstrakcije, kao što su procesi filtracije, dekantiranja i otapanja [114]. U procesu ekstrakcije bioaktivnih komponenti, jedan od najvećih nedostataka korištenja DES-ova je izolacija ciljnih spojeva., budući da se Naime, zbog zanemarivog tlaka pare i općenito visoke sposobnosti miješanja DES-a s vodom ne može se koristiti uobičajen način izolacije kao s konvencionalnim otapalima [6,7]. Stoga, željene se komponente mogu izolirati primjenom makroporoznih smola i sekundarnih otapala (anti-otapala), rekristalizacijom i kromatografskim tehnikama [102, 128]. Prema dostupnoj literaturi [123, 129, 130], za izolaciju komponente najčešće se koristi kolonska kromatografija s makroporoznim smolama. Ova metoda pokazuje dobru učinkovitost i selektivnost uz nisku cijenu. Također, primjena sekundarnih otapala je brza i učinkovita metoda budući da se u ovom slučaju željene komponente talože. Međutim, unatoč sve većem broju istraživanja koje uključuju

problematiku izolacije komponenti iz DES-ova, utjecaj sastava otapala i adsorbensa na proces izolacije još uvijek nije dovoljno istražen [103].

2.4.2.2. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound assisted extraction* - UAE) je inovativna tehnika koja je posljednjih godina pobudila velik interes zbog svojih prednosti u usporedbi s konvencionalnim tehnikama, uključujući upotrebu malih volumena otapala, kraće vrijeme ekstrakcije, te niske ekonomske i ekološke utjecaje [131-133]. Ova tehnika koristi ultrazvučne valove, s frekvencijom između 20 kHz i 10 MHz. Unutar ultrazvučnog raspona mogu se pronaći dva područja, ultrazvuk snage 20–100 kHz, karakteriziran visokim intenzitetom, koji se koristi za ekstrakciju i signalni ili dijagnostički ultrazvuk (100 kHz–10 MHz), koji se koristi kao dijagnostička tehnika te za kontrolu i procjenu kvalitete [134].

Primjena ultrazvuka za ekstrakciju temelji se na fizikalno-kemijskom principu akustične kavitacije (AC). AC je fizikalno-kemijski fenomen koji se sastoji od stvaranja, rasta i kolapsa mjehurića prisutnih u tekućem mediju izazvanih ultrazvučnim valovima. Širenje ultrazvučnih valova kroz bilo koji tekući medij uključuje stvaranje uzastopnih isprekidanih područja visokog i niskog tlaka koja stvaraju mjehuriće plina u mediju [135-137]. Nakon formiranja, mjehurići rastu kao odgovor na te promjene tlaka, što dovodi do njihove kompresije i ekspanzije, dostižući kritičnu veličinu prije kolapsa, u kojoj se stvara vruća točka. U tom smislu, akustična kavitacija predstavlja pokretačku snagu za ekstrakcijske učinke sonikacije, proizvodeći dvije vrste učinaka, fizikalne i kemijske, ovisno o frekvencijskim rasponima koji se koriste tijekom procesa [136].

Primjena UAE može poboljšati prinose ekstrakcije biljnog materijala urušavanjem kavitacijskog mjehurića, čime dolazi do različitih pojava na čvrstim površinama, uključujući efekte mikromiješanja i makroturbulencije [134]. Često su prisutni istovremeno i/ili uzastopno, kombinirajući se tijekom postupka ekstrakcije kako bi se poboljšao prijenos mase iz krutog matriksa u otapalo, što omogućuje postizanje viših prinosa ekstrakcije.

DES-UAE je metoda koja kombinira primjenu ultrazvučnih valova i DES-ova kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije i smanjilo vrijeme ekstrakcije [138]. Na primjeru polifenola, korištenje ultrazvučnih valova u DES-UAE generira visokofrekventnu mehaničku agitaciju, poboljšavajući ekstrakciju povećanjem njihove topljivosti i prijenosom mase iz biljnog materijala u otapalo. Ovo mehaničko miješanje dovodi do kidanja stijenki

biljnih stanica i stvaranja kavitacijskih mjehurića, koji stvaraju udarne valove što potiče oslobađanje polifenola iz biljnog materijala [139].

Prinosi ekstrakcije koji se pripisuju UAE ovise o nizu čimbenika koji se dijele na fizikalne parametre tehnike i parametre procesa ekstrakcije. Također, navedeni čimbenici ne utječu samo na prinose ekstrakcije već i učinkovitost tehnike kao održivog postupka, s ciljem postizanja najniže moguće potrošnje energije [140].

Fizikalni parametri povezani s ultrazvučnim valovima su snaga, frekvencija i intenzitet, dok su oni povezani s ultrazvučnom opremom oblik i veličina ultrazvučnih reaktora. Gledajući DES-UAE dokazan je utjecaj istih parametara kao i kod primjene drugih otapala, odnosno to su frekvencija, snaga, intenzitet i ciklus [58].

U pravilu, visoke vrijednosti snage ultrazvučnih valova poboljšavaju učinkovitost UAE u pogledu prinosa i sastava ekstrakta. Snaga ultrazvuka, mjerena u vatima (W), odnosi se na količinu energije isporučene po jedinici vremena i određena je naponom i strujom koja se dovodi do sonde. Više razine snage rezultiraju učinkovitijom kavitacijom i kolapsom mjehurića, što dovodi do povećane učinkovitosti ekstrakcije. Viskoznost DES-ova znatno je viša od viskoznosti konvencionalnih otapala, a to može imati značajan utjecaj na snagu i intenzitet snage potrebne za ultrazvučni tretman. Veća viskoznost zahtijeva više energije potrebne za stvaranje kavitacije, što je bitno za učinkovitost ultrazvučnog tretmana. Dodatno, veća viskoznost DES-a mogla bi utjecati na ponašanje kavitacijskih mjehurića, što bi moglo dovesti do mehanizama drugačijih od onih uočenih u konvencionalnim otapalima. Ultrazvuk može uzrokovati fragmentaciju čestica kroz međučestične sudare i generirane udarne valove urušavanjem kavitacijskih mjehurića u tekućini. Jedan od izravnih ishoda ovog smanjenja veličine čestica je povećanje čvrste površine, što dovodi do većeg prijenosa mase, većeg prinosa i brzine ekstrakcije [140].

Frekvencija ultrazvuka odnosi se na broj ciklusa u sekundi i obično se izražava u kilohercima (kHz). Više frekvencije povezane su s manjim valnim duljinama i većom dostavom energije, rezultirajući povećanom kavitacijom i većom vjerojatnošću implozije mjehurića. Frekvencija igra ključnu ulogu u DES-UAE, budući da modulira fizikalne i biokemijske učinke kolapsa mjehurića tijekom postupka ekstrakcije, smanjujući gustoću i viskoznost otapala i pojačavajući kavitaciju. Optimiranjem frekvencije ultrazvučnih valova, akustična energija može se podesiti za stvaranje mikrošupljina unutar otapala, olakšavajući proces ekstrakcije čak i u vrlo viskozim otapalima [141]. Interakcija između frekvencije i viskoznosti ključni je faktor u ovom procesu. Pokazano je kako pri visokim frekvencijama,

otapala pokazuju elastično ponašanje, dok pri niskim frekvencijama pokazuju viskozno ponašanje [142]. Međutim, u slučaju DES-ova s nižim vrelištem, frekvenciju ultrazvučnih valova potrebno je prilagoditi kako bi se izbjeglo prekomjerno zagrijavanje i degradacija otapala [58].

Ultrazvučni intenzitet mjeri snagu koju pruža emitirajući ultrazvučni izvor po jedinici vremena [134]. Intenzitet predstavlja važan parametar povezan s UAE, budući da je određen intenzitet potreban za postizanje kavitacije [143]. U praktičnom smislu, povećanje snage povećava intenzitet sve dok se ne postigne maksimalna vrijednost, nakon koje dolazi do gubitka širenja ultrazvučnih valova i smanjenja učinkovitosti kavitacije [144]. S druge strane, fizikalni parametri koji se pripisuju ultrazvučnoj opremi povezani su s ekstrakcijskim vremenom te oblikom i veličinom ultrazvučnih reaktora. Danas se najčešće za UAE koriste dvije vrste uređaja: ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda [140].

Parametri ekstrakcije su oni koji se odnose na prostor u kojem se ultrazvučni valovi prenose od izvora emitiranja do biljnog materijala, što uključuje prirodu i svojstva otapala te temperaturu i vrijeme ekstrakcije.

Otapalo je bitan čimbenik povezan s većinom tehnika ekstrakcije, budući da se u njemu otapa sadržaj koji se oslobađa iz biljnog materijala. Upravo zato je potrebno odabrati odgovarajuće otapalo s kojim je moguće ekstrahirati što veći udio željenih bioaktivnih komponenti. U odabiru odgovarajućeg otapala parametre poput viskoznosti, površinske napetosti i tlaka para otapala, treba uzeti u obzir, zbog mogućeg utjecaja na kavitaciju [145]. U tom smislu, viskoznost i površinska napetost utječu na prag kavitacije budući da će otapala s visokom viskoznošću ili površinskom napetosti trebati veći intenzitet za postizanje praga kavitacije. Jednako tako, tlak para otapala je presudan čimbenik za UAE, budući da niže vrijednosti omogućuju povećanje snage kolapsa mjehurića, koji se mogu lakše širiti u otapalu [144,145].

Temperatura je parametar s važnom ulogom u UAE zbog nekoliko razloga [144]. S jedne strane, temperatura je usko povezana sa svojstvima otapala i izravno utječe na viskoznost, površinsku napetost i tlak para. Povećanje temperature utječe na smanjenje viskoznosti i površinske napetosti otapala, ali također dovodi i do povećanja tlaka pare otapala, što je praćeno povećanom količinom plina koji ulazi unutar mjehurića i ublažava njihovo širenje. Prema tome, visoka temperatura kod većine otapala ne poboljšava ekstrakcijski prinos spojeva iz materijala u ultrazvučnim uređajima. Nadalje, smatra se da povećana temperatura može pogodovati ekstrakciji spojeva povećanjem brzine difuzije i prekidanjem kemijskih

veza u biljnom materijalu, čime se pomaže njihovo otpuštanje u otapalo, ali povišena temperatura može imati i negativan učinak na temolabilne komponente [146]. Zbog svih ovih razloga, optimizacija temperature ekstrakcije za pojedine komponente je potrebna kako bi se poboljšala ekstrakcijska svojstva otapala koje se koristi za UAE i zaštitila struktura i funkcija željenih komponenti [140].

Prinosi ekstrakcije se poboljšavaju povećanjem vremena ekstrakcije, ali dug period ekstrakcije, zbog pretjeranog izlaganja ultrazvučnim valovima može uzrokovati neželjene promjene u ekstrahiranim spojevima kao i u DES-ovima. Upravo stoga, danas se većina DES-UAE provodi u periodu od nekoliko minuta do 1 h, pokazujući poboljšanu učinkovitost ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama. Vrijeme sonikacije ima presudnu ulogu u procesu ekstrakcije [58].

Nekoliko parametara povezanih s biljnim materijalom također utječe na učinkovitost ekstrakcije željenih spojeva, kao što je vrsta biljnog materijala, predobrada materijala, veličina čestica, omjer kruto-tekuće te struktura komponenti [140]. Za ekstrakciju je moguće koristiti i svježi i osušeni biljni materijal, iako je pokazano da je veća učinkovitost kod primjene osušenog biljnog materijala budući da se poboljšava propusnost i prijenos mase [147]. Količina otapala potrebna za maksimalnu ekstrakciju polifenola ovisi o količini uzorka. Općenito, što je veća količina uzorka, to je veća količina otapala potrebna za ekstrakciju. Međutim, u nekim slučajevima, čak i za malu količinu uzorka, potrebno je više otapala zbog čvrste stanične stijenke, niske stope difuzije i niske topljivosti [148]. Ipak, u većini slučajeva bitno je da je omjer između količine uzorka i otapala dovoljno velik da se osigura optimalna učinkovitost ekstrakcije, a da dobiveni ekstrakt ne bude razrijeđen, odnosno s manjim udjelom željenih komponenti u otapalu. Prema literaturi, za ekstrakciju većine polifenola iz biljnog materijala primjenom DES-UAE optimalan omjer kruto-tekuće je u rasponu od 1 : 20 do 1 : 30, nakon čega dolazi do pada u udjelu ekstrahiranih polifenola [58].

DES-UAE metoda se smatra novom, zelenom metodom ekstrakcije polifenola koja nudi brojne prednosti u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije i upotrebom toksičnih organskih otapala s naglaskom na bolju učinkovitost ekstrakcije fenolnih kiselina, flavanoida i kanabinoida (Tablica 4).

2.4.2.3. Mehanoekstrakcija

Mehanokemijski potpomognuta ekstrakcija (engl. *Mechanochemical Extraction*, MCE) jedna je od inovativnih tehnika koja se primjenjuje u ekstrakciji bioaktivnih spojeva [149]. Razvoj MCE povezan je s razvojem mehanokemije kao grane kemije koja se odnosi na kemijske ili fizikalno-kemijske transformacije generirane mehaničkom silom [150,151]. Mehanokemijska tehnologija se sve više primjenjuje u sintezi i modificiranju lijekova [152], razgradnji organskih zagađivača [153] i recikliranju metalnih oksida [154].

Postupci MCE mogu se podijeliti u tri dijela, odnosno na pripremu uzorka, mehanokemijsku reakciju i mehanokstrakciju. Točan mehanizam MCE još uvijek nije poznat. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja mehanizmima djelovanja MCE, a to su smanjenje veličine čestica, razaranje stanične stijenke i kemijske promjene fenolnih komponenti. Prvo, smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja ukupne kontaktne površine, čime se olakšava proces ekstrakcije. Drugo, prilikom mehaničke obrade zbog stiskanja i smicanja dolazi do uništavanja stanične stijenke nakon čega se lakše otpušta sadržaj u otapalo. Treće, prilikom mehanokemijske obrade ne dolazi samo do smanjenja veličine čestica, već i do promjene u strukturi komponenti pri čemu nastaju fenolne komponente u slobodnom obliku u kojem se lakše i ekstrahiraju. Također, kod MCE se voda pokazuje kao učinkovitije otapalo za fenolne komponente u odnosu na druge tehnike ekstrakcije [155].

Pokazano je kako učinkovitost MCE postupka ovisi o nekoliko čimbenika kao što su, vrsta i koncentracija krutog reagensa, vrijeme mljevenja, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, omjer tekućina/krutina i pH [155].

U procesu MCE često se biljnom materijalu dodaju različite alkalne tvari ili reagensi. Tijekom procesa mljevenja, polifenoli koji se najčešće nalaze u vezanom obliku reagiraju s navedenim tvarima pod mehaničkim pritiskom pri čemu dolazi do nastanka fenola u slobodnom obliku, odnosno uklanjaju se najčešće proteini i šećeri. Odabir reagensa povezan je sa kemijskim svojstvima željenih komponenti. Trenutno, čvrsti reagensi koji se najčešće koriste za ekstrakcije su čvrsti alkalni reagensi kao što su Na_2CO_3 , NaHCO_3 i NaOH [156]. Osim vrste, koncentracija je još jedan ključni čimbenik s utjecajem na prinos ekstrakcije. Odgovarajuća koncentracija reagensa pomaže u povećanju učinkovitosti ekstrakcije i smanjenju otpada. Općenito, prinosi polifenola će se povećati s povećanom količinom

reagensa do određene koncentracije nakon čega se uočava ili smanjenje ili stalan udio komponenti u otapalu [157,158].

Mljevenje biljnog materijala zajedno s krutim reagensom je kritičan korak u procesu ekstrakcije s obzirom da povećavanjem vremena ekstrakcije dolazi do povećanja ukupne kontaktne površine, olakšavanja procesa difuzije i transformiranja polifenola u oblik topljiviji u vodi ili drugom otapalu. Ipak, ukoliko je vrijeme ekstrakcije predugo kod komponenti koje se lako oksidiraju i koje stvaraju konglomerate može doći do smanjenja prinosa komponenti. Uz to, duže vrijeme ekstrakcije zahtijeva i veću potrošnju energije [156-158]. Prema dosadašnjim istraživanjima, za ekstrakciju alkaloida, flavonoida i katehina primjenom MCE dovoljno je 30 sekundi do nekoliko minuta, nakon čega je udio komponenti stalan ili dolazi do pada u udjelu ekstrahiranih komponenti zbog raspadanja i nastanka drugih oblika [159].

Temperatura ekstrakcije utječe na topljivost i brzinu difuzije polifenola iz matrice u otapalo. Odgovarajuća temperatura ekstrakcije može poboljšati udio ekstrahiranih komponenti, ubrzati ekstrakciju i smanjiti troškove ekstrakcije [156-158]. Prema literaturi, sobna temperatura (25 °C) se pokazala kao učinkovita za ekstrakciju alkaloida, flavonoida, katehina i terpena. Povišenjem temperature dolazi do smanjenja udjela ekstrahiranih komponenti u dobivenim ekstraktima [157, 160].

MCE se smatra dobrom alternativom tradicionalnim tehnikama ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog i životinjskog materijala. Glavne prednosti MCE uključuju: povećani prinos ekstrakcije i mogućnost selektivnosti, rad pri sobnoj temperaturi čime se omogućuje ekstrakcija termolabilnih spojeva, korištenje vode kao otapala umjesto tradicionalnih organskih otapala u većini slučajeva, smanjeno vrijeme ekstrakcije i jednostavnost procesa. Pokazano je da se umjesto vode mogu koristiti i DES-ovi za ekstrakciju alkaloida, flavanoida i katehina iz biljnog materijala uz bolju učinkovitost u 30 sekundi u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju [160] (Tablica 4). Unatoč navedenim prednostima, još uvijek postoje neki nedostaci, s naglaskom na mogućnost industrijske primjene ove tehnike [155].

3. Metodika

3.1. Materijali i aparature

Za ekstrakciju korišteni su osušeni listovi kadulje (*Salvia officinalis* L.), koprive (*Urtica dioica*), lavande (*Lavandula angustifolia* 'Hidcote') i vrkute (*Alchemilla vulgaris*) te osušeni cvjetovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa*). Prije ekstrakcije, osušeni listovi su samljeveni i prosijani pomoću vertikalnog vibracionog sita (LabortechnikGmbH, Ilmenau, Germany).

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi i analizi su analitičke čistoće i nabavljeni od komercijalnih dobavljača te korišteni bez prethodnog pročišćavanja.

Za kemijske analize korišteni su standardni spojevi:

karnosolna kiselina (4*aR*,10*aS*)-5,6-dihidroksi-1,1-dimetil-7-propan-2-il-2,3,4,9,10,10*a*-heksahidrofenantren-4*a*-karboksilna kiselina) (čistoće ≥ 95,0 %), (Sigma Chemical Co. Missouri, SAD),

karnosol (1*R*,8*S*,10*S*)-3,4-dihidroksi-11,11-dimetil-5-propan-2-il-16-oksatetraciklo [6.6.2.01,10.02,7] heksadeka-2,4,6-trien-15-on) (čistoće ≥ 99,2 %) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD),

galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) (čistoće ≥ 98,0 %) (Phytolab GmbH & Co. KG. Vesten bergsgreuth, Njemačka),

elaginska kiselina (2,3,7,8-tetrahidroksikromono[5,4,3-cde]kromen-5,10-dion) (čistoće ≥ 98,0 %) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD),

taninska kiselina (1,2,3,4,6-penta-O-{3,4-dihidroksi-5-[(3,4,5-trihidroksibenzoil)oksi]benzoil}-D-glukopiranoza) (čistoće ≥ 95,0 %) (Acros Organics, Antwerpen, Belgija),

kafeoil-jabučna kiselina (2-[(*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksibutandioična kiselina) (čistoće ≥ 95,0 %) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Berg, Njemačka),

klorogenska kiselina ((1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi-1,4,5-trihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina) (čistoće ≥ 95,0 %) (Supelco, Pennsylvania, SAD)

neoklorogenska kiselina ((1*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-[(*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi-1,4,5-trihidroksicikloheksan-1-karboksilna kiselina) (čistoće ≥ 98,0%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD)

kofeinska kiselina ((2*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enska kiselina) (čistoće ≥ 98,0%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD)

sinapinska kiselina ((2*E*)-3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)prop-2-enska kiselina (čistoće ≥ 98,0 %) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD)

rutin (2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-[[2*R*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksimetil]oksan-2-il]oksikromen-4-on) (čistoće ≥ 95,0%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD)

ikorinska kiselina ((2*R*,3*R*)-2,3-bis{[(2*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi}butandioična kiselina) (čistoće ≥ 95,0%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, SAD)

kanabidiol (CBD) (2-[(1*R*,6*R*)-6-izopropenil-3-metilcikloheks-2-en-1-il]-5-pentilbenzen-1,3-diol) (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,6 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka),

kanabidiolna kiselina (CBDA) ((1'*R*,2'*R*)-2,6-Dihidroksi-5'-metil-4-pentil-2'-(prop-1-en-2-il)-1',2',3',4'-tetrahydro[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina) (100 µg/mL u metanolu, čistoće 98,3 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka)

kanabidivarinska kiselina (CBDVA) (2,4-dihidroksi-3-[(1*R*,6*R*)-3-metil-6-(1-metiletetil)-2-cikloheksen-1-il]-6-propil-benzojeva kiselina) (100 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,9 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka),

kanabikromenska kiselina (CBCA) (5-hidroksi-2-metil-2-(4-metilpent-3-enil)-7-pentilkromen-6-karboksilna kiselina) (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,3 %) (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, SAD),

kanabigerolna kiselina (CBGA) (3-[(2*E*)-3,7-dimetilokta-2,6-dienil]-2,4-dihidroksi-6-pentilbenzojeva kiselina) (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,3 %) (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, SAD),

tetrahidrokanabivarinska kiselina (THCVA) ((6*aR*,10*aR*)-1-hidroksi-6,6,9-trimetil-3-propil-6*a*,7,8,10*a*-tetrahydrobenzo[*c*]kromen-2-karboksilna kiselina) (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,2 %) (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, SAD),

tetrahidrokanabinolna kiselina (6*aR*,10*aR*)-1-hidroksi-6,6,9-trimetil-3-pentil-6*a*,7,8,10*a*-tetrahydrobenzo[*c*]kromen-2-karboksilna kiselina (THCA) (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 98,5 %) (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, SAD),

kanabinol (CBN) (6,6,9-trimetil-3-(5,5,5-trideuteriopentil)benzo[*c*]kromen-1-ol) (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,6 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, (Njemačka),

kanabikromen (CBC) (2-metil-2-(4-metilpent-3-enil)-7-pentilkromen-5-ol) (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,0 %) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka),

kanabigerol (CBG) 2-[(2*E*)-3,7-dimetilokta-2,6-dienil]-5-pentilbenzen-1,3-diol) (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,0 %), (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka),

Δ9-Tetrahidrokanabinol (Δ9-THC) (6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,10a-tetrahidrobenzo[*c*]kromen-1-ol) (1,0 mg/mL u metanolu čistoće 99,2 %) (Cerilliant Corporation, Round Rock, Texas, SAD)

umbeliferon (7-Hidroksi-2H-benzopiran-2-on) (čistoće 99,0%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Berg, Njemačka),

heniarin (7-metoksi-2H-benzopiran-2-on) (čistoće 99,0%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Berg, Njemačka).

Za određivanje fizikalno kemijskih svojstava DES-ova korišten je V'COMPACT L viskozimetar (Fungilab, Barcelona, Španjolska), UV-1280 UV-VIS Spektrofotometar (Shimatzu), i SevenCompact Duo pH metar (Mettler –Toledo, Greifensee, Švicarska).

Za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem korištena je magnetska miješalica (LLG, Meckenheim, Njemačka) sa aluminijskim blokom, za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom korištena je ultrazvučna kupelj Sonorex Digitec DT 510 H pri 50 W i frekvenciji 37 hZ (Bandelin, Berlin, Njemačka), a mehanokemijske ekstrakcije provedene su u homogenizatoru Bead Ruptor 12 (Omni International, Kennesaw, Georgia, SAD).

Za određivanje sadržaja bioaktivnih komponenti u ekstraktima korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), odnosno uređaj naziva Agilent 1260 Infinity II (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD) i jednozračni UV/VIS Spektrofotometar (Lasany International, Panchkula, Haryana, India).

Za određivanje antiradikalne aktivnosti korišten je jednozračni UV/VIS Spektrofotometar (Lasany International, Panchkula, Haryana, India).

3.2. Priprava DES-ova

Hidrofilni DES-ovi su pripremljeni miješanjem ChCl s različitim donorima vodikovih veza u molarnim omjerima prikazanim u Tablici 5., zagrijavanjem pri 80 °C do nastanka bistrih kapljevina. Hidrofobni DES-ovi su pripremljeni miješanjem različitih komponenti kao donora i akceptora vodikovih veza u molarnim omjerima prikazanim u Tablici 6., zagrijavanjem pri 80 °C do nastanka bistrih kapljevina. Tako pripremljena otapala su bez

dodatnog pročišćavanja korištena za probir najpogodnijeg otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti.

Tablica 5. Komponente za pripremu hidrofilnih DES-ova s pripadajućim molarnim omjerima

HBA	HBD	Omjer	Oznaka	HBA	HBD	Omjer	Oznaka
ChCl	Urea	1 : 2	DES1	ChCl	Glicerol	1 : 2	DES10
	<i>N</i> -metilurea	1 : 3	DES2		Acetamid	1 : 2	DES11
	Tiourea	1 : 2	DES3		Jabučna kiselina	1 : 1	DES12
	Glukoza	1 : 1	DES4		Malonska kiselina	1 : 1	DES13
	Fruktoza	1 : 1	DES5		Oksalna kiselina	1 : 1	DES14
	Ksilitol	1 : 1	DES6		Mliječna kiselina	1 : 2	DES15
	Sorbitol	1 : 1	DES7		Levulinska kiselina	1 : 2	DES16
	Butan-1,4-diol	1 : 2	DES8		Limunska kiselina	1 : 2	DES17
	Etilen-glikol	1 : 2	DES9				

Tablica 6. Komponente za pripremu hidrofobnih DES-ova s pripadajućim molarnim omjerima

HBA	HBD	Omjer	Oznaka	HBA	HBD	Omjer	Oznaka
Mentol	Mravlja kiselina	1 : 1	hDES1	Mentol	Palmitinska kiselina	1 : 1	hDES11
	Octena kiselina	1 : 1	hDES2	Tetra-n-oktilamonijev bromid	Kaprinska kiselina	1 : 2	hDES12
	Kaprinska kiselina	1 : 1	hDES3	Kaprinska kiselina	Lidokain	2 : 1	hDES13
						3 : 1	hDES14
						4 : 1	hDES15
						3 : 2	hDES16
						1 : 1	hDES17
	Mliječna kiselina	1 : 1	hDES4		Kaprinska kiselina	1 : 2	hDES18
						1 : 3	hDES19
	Levulinska kiselina	1 : 1	hDES6	Timol	Kamfor	7 : 3	hDES20
						3 : 2	hDES21
						1 : 1	hDES22
	Laurinska kiselina	1 : 1	hDES7		Kaprilna kiselina	1 : 1	hDES23

Kaprilna kiselina	1 : 1	hDES8	Laurinska kiselina	1 : 1	hDES24
Kaprinska kiselina	1 : 1	hDES9			
	2 : 1	hDES10			

3.3. Karakterizacija pripremljenih DES-ova

Pripremljenim DES-ovima, DES-ovima u kombinaciji s vodom (10-50 % (v/v) i hDES-ovima ispitana je viskoznost, polarnost i pH.

3.3.1. Određivanje viskoznosti

Primjenom V'COMPACT L viskozimetra određena je viskoznost svim korištenim DES-ovima u rasponu temperature 30-70 °C. Tijekom mjerenja viskoznosti, otapala su se postepeno zagrijavala primjenom protočne kupelji. Program mjerenja je na svakoj određenoj temperaturi trajao 30 minuta, pri čemu je vrtnja klipa (TL7) išla od 20-250 rpm u periodu od 30 min pri konstantnoj temperaturi. Otapalo je između mjerenja zagrijano na odgovarajuću temperaturu koja je pomoću protočne pumpe održavana tijekom 30 min. Mjerenja su rađena svakih 5 sekundi, a iz svih dobivenih podataka je izrađena krivulja pomoću koje je određena viskoznost pojedinog otapala. Za mjerenje je korišteno 20 mL pripremljenih otapala.

3.3.2. Određivanje polarnosti

Za određivanje polarnosti DES-ova i DES-ova u kombinaciji sa vodom u rasponu od 10-50 % (v/v) korištena je boja nilsko crvenilo (engl. *Nile Red*, 9-dietilamino-5H-benzo(a)fenoksazin-5-on). Analiza je rađena prema radu Craveiro i sur. [161] prema kojem se 5 µL pripremljene etanolne otopine nilskog crvenila (1 mg/mL) dodaje u kivetu koja sadrži 1 mL eutektičkog otapala. Nakon dodatka boje, sadržaj se promiješa te se odmah snimaju UV spektri. Za svaki uzorak određena je maksimalna valna duljina (λ_{max}) preko koje je izračunata molarna prijelazna energija (ENR) na način (2) :

$$ENR = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (2)$$

Za razliku od pripreme etanolne otopine nilskog crvenila u kojem se boja brzo otapa i otopina poprima jarko rozu boju, u eutekničkim otapalima je potrebno malo duže vremena da se boja uoči, posebice u viskozim otapalima. Viskozna otapala su zagrijavana prije dodatka boje, a potom intenzivno miješana na vrtložnoj miješalici dok nije uočljiva jednolično obojena otopina. Fizikalno-kemijska svojstva nilskog crvenila kao što su fotokemijska stabilnost, dobra topljivost u različitim otapalima i niska bazičnost čine ovu boju prikladnom za mjerenje polarnosti DES-ova [82]. Upotreba nilskog crvenila omogućuje izravno ispitivanje polarnosti otapala na način da utječe na apsorpcijska svojstva molekule boje. U prisustvu otapala više polarnosti, maksimum boje pomiče se na veće valne duljine, što rezultira nižim ENR, odnosno niža vrijednost ENR ukazuje na polarnije otapalo. Preko pomaka i usporedbom s λ_{\max} dobivenom za referentno otapalo, moguće je procijeniti polarnost datog otapala.

3.3.3. Određivanje pH

Za određivanje pH pripremljenih DES-ova i uz dodatak vode u rasponu od 10-50 % (v/v) korišten je SevenCompact Duo pH metar u kombinaciji sa elektrodom InLab Viscous Pro-ISM namijenjenoj mjerenju pH ne-vodenih viskoznih medija te indikator trakice (Whatman, Maidstone, Ujedinjeno Kraljevstvo). pH vrijednost je mjerena pri temperaturi od 30 °C.

3.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti konvencionalnim otapalima

Za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala kao otapala korištena su voda, vodene otopine etanola (30-70% (v/v)), etanol i metanol. Samljeveni osušeni biljni materijal (50 mg) pomiješan je s 1 mL odabranog otapala. Pripremljeni uzorci miješani su na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku na magnetskoj miješalici pri temperaturama 30, 50 i 70 °C i kroz 30, 60 i 90 minuta.

3.5. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom DES-ova

Za ekstrakciju diterpena iz kadulje, fenolnih kiselina i tanina iz vrkute te fenolnih kiselina i flavonoida iz koprive korišteni su DES-ovi, dok su za ekstrakciju kanabinoida iz industrijske konoplje i kumarina iz lavande korišteni hDES-ovi.

3.5.1. Probir otapala

Kod probira otapala, samljeveni osušeni biljni materijal (50 mg) pomiješan je s 1 mL odabranog otapala, čistog DES-a, DES-a s dodatkom vode (10, 30 i 50 % (v/v)) i hDES-a. Pripremljeni uzorci miješani su na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku na magnetskoj miješalici pri temperaturama 30, 50 i 70 °C kroz 60 minuta. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran 15 minuta i zatim dekantiran. Tekući supernatant je zatim razrijeđen metanolom, filtriran kroz PTFE filtar od 0,45 µm i podvrgnut HPLC analizi.

3.5.2. Optimizacija uvjeta ekstrakcije

Kod odabira optimalne tehnike i uvjeta ekstrakcije, osim miješanja na magnetskoj miješalici, ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji i kugličnom mlinu BeadRuptor 12 pri definiranim uvjetima. Za sve primjenjene tehnike ekstrakcije, samljeveni osušeni biljni materijal (50 mg) pomiješan je s 1 mL odabranog otapala, čistog DES-a, DES-a s dodatkom vode (10, 30 i 50 % (v/v)) i hDES-a.

Kod ekstrakcije uz miješanje na magnetskoj miješalici uzorci su miješani na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku prema uvjetima postavljenima primjenom metode odzivnih površina. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran 15 minuta i zatim dekantiran. Tekući supernatant je zatim razrijeđen metanolom, filtriran kroz PTFE filtar od 0,45 µm i podvrgnut HPLC analizi.

Ultrazvučna kupelj postavljena je na frekvenciju od 37 Hz i snagu od 50 W u svim ekstrakcijama. Kod ekstrakcije primjenom ultrazvučne kupelji uzorci su postavljeni u kupelj prema uvjetima postavljenima primjenom metode odzivnih površina. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran 15 minuta i zatim dekantiran. Tekući supernatant je zatim razrijeđen metanolom, filtriran kroz PTFE filtar od 0,45 µm i podvrgnut HPLC analizi.

Kod ekstrakcije u kugličnom mlinu, biljni materijal (50 mg) pomiješan je s 1 mL otapala i 1 g staklenih kuglica. Ekstrakcija je provedena prema zadanim uvjetima postavljenima primjenom metode odzivnih površina. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran 15 minuta i zatim dekantiran. Tekući supernatant je zatim razrijeđen metanolom, filtriran kroz PTFE filtar od 0,45 µm i podvrgnut HPLC analizi.

3.6. Određivanje sastava ekstrakata

Udio bioaktivnih komponenti u ekstraktima određen je primjenom kromatografskih i spektrofometrijskih metoda koje su u sklopu izrade ovog rada razvijene i validirane. Za analizu ekstrakta korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A) temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektorom (G7115A), autosamplerom (automatski uzorkivač) (G7129A) kapaciteta od 36 mjesta i sakupljačem frakcija (G1364E). Obrada podataka i upravljanje sustavom vršeno je pomoću računalnog programa ChemStation.

3.6.1. Određivanje sadržaja karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje

HPLC analize karnosolne kiseline i karnosola provedene su na Agilent 1260 Infinity II HPLC sustavu s kromatografskim odvajanjem na koloni ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD) (4,6 mm ×100 mm, 5 μm). Razdvajanje analiziranih spojeva provedeno je izokratno tijekom 12 minuta, pri čemu je kao faza A korišten acetonitril, a kao faza B 0,1% fosforna kiselina u mili-Q vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka) u omjeru A:B 60:40. Brzina protoka bila je 1,0 mL/min, volumen injektiranja 20 μL, valna duljina UV detekcije 230 nm, a analiza je provedena pri 25 °C. Identifikacija karnosola i karnosolne kiseline provedena je na temelju vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskog spektra u ekstraktima sa spektrom standarda, dok je kvantifikacija napravljena na temelju eksterne kalibracije. Standardne otopine za karnosolnu kiselinu i karnosol pripravljene su u metanolu, od čega je pripravljeno osam koncentracija (10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 i 200 mg/L) za kalibraciju. Vrijeme zadržavanja za karnosol bilo je 4,217 min, a za karnosolnu kiselinu 7,416 min. Prema koeficijentu determinacije, $R^2=0,99789$ za karnosolnu kiselinu i $R^2=0,99968$ za karnosol, linearnost krivulje u rasponu koncentracija je potvrđena. Za validaciju HPLC metode za određivanje karnosolne kiseline i karnosola, osim linearnosti, provedena je usporedba vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardima, ponovljivost mjerenja i pripreme otopine te točnost, što je također prikazano u Prilozima (Tablica A1). Rezultati sadržaja karnosolne kiseline i karnosola u analiziranim uzorcima izraženi su u μg/mg biljke.

3.6.2. Određivanja sadržaja galne i elaginske kiseline u ekstraktima vrkute

HPLC analize galne i elaginske kiseline provedene su na HPLC sustavu Agilent 1260 Infinity II s kromatografskim odvajanjem dobivenim na koloni ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 100 mm, 5 μm). Razdvajanje je postignuto gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 2 mL/min, tijekom 55 minuta, gdje je 0,25 % fosforne kiseline i 1,5 % tetrahidrofurana u mili-Q vodi korišteno kao faza A, a metanol je korišten kao faza B. Gradijent je postavljen na način: 0 - 5 min: 100 % A; 5-10 min: 100-85 % A; 10-20 min: 85-70 % A; 20 - 40 min: 70 – 50 % A; 40 - 45 min: 50 % A; 45-47 min: 50-0 % A; 47–55 min; 0 % A. Volumen injektiranja bio je 35 μL, valna duljina UV detekcije 220 i 270 nm, a analiza je provedena pri 25 °C. Identifikacija galne i elaginske kiseline provedena je na temelju vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskog spektra u ekstraktima sa spektrom standarda, dok je kvantifikacija napravljena na temelju eksterne kalibracije. Standardne otopine galne kiseline i elaginske kiseline pripravljene su u metanolu od čega je pripravljeno osam koncentracija (koncentracije 10,0, 20,0, 50,0, 75,00, 100,0, 200,0 i 500,0 mg/L). Vrijeme zadržavanja galne kiseline bilo je 2,693 min, a za elaginsku kiselinu 24,829 min. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0,99964$ za galnu kiselinu i $R^2 = 0,99909$ za elaginsku kiselinu. Za validaciju HPLC metode za određivanje fenolnih kiselina, osim linearnosti, provedena je usporedba vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardima, ponovljivost mjerenja i pripreme otopine te točnost, što je također prikazano u Prilozima (Tablica A2). Rezultati sadržaja galne i elaginske kiseline u analiziranim uzorcima izraženi su u μg/mg biljke.

3.6.3. Spektrofometrijsko određivanje HT u ekstraktima vrkute

Sadržaj hidrolizirajućih tanina određen je spektrofotometrijski s kalij jodatnim testom. Pet mililitara vodene otopine kalijevog jodida (2,5% w/v) zagrijavano je do 30 °C u vodenoj kupelji 7 minuta, nakon čega je dodan 1 mL uzorka (razrijeđen do 10 mg/mL). Smjesa je stavljena u vodenu kupelj pri 30 °C tijekom 2 minute nakon čega je izmjerena adsorpcija na 550 nm. Kalibracijska krivulja je pripravljena korištenjem otopine taninske kiseline u rasponu 20-2500 μg/mL, a rezultati su izraženi kao mikrogrami ekvivalenta taninske kiseline (TAE) po mg biljke (μg TAE/mg biljke).

3.6.4. Kromatografsko određivanje sadržaja kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje

HPLC analize kanabinoida provedene su na HPLC sustavu Agilent 1260 Infinity II s kromatografskim odvajanjem dobivenim na koloni InfinityLab Poroshell 120 C-C18, duljine 150 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 4 μm . Razdvajanje je postignuto gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 1 mL/min, tijekom 67 minuta, gdje je 0,1 % mravlje kiseline u mili-Q vodi korišteno kao faza A, a 0,05% mravlje kiseline u metanolu je korišteno kao faza B. Gradijent je postavljen na način: 0,00-7,05 min 40% A; 7,05-49,37 min 23% A; 49,37-67,00 min 5% A nakon čega je uslijedio period od 10 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen injektiranja bio je 35 μL , valna duljina UV detekcije bila je 210 i 230 nm, a analiza je provedena pri 50 °C. Identifikacija kanabinoida provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa standardima, dok je kvantifikacija napravljena na temelju eksterne kalibracije. Standardne osnovne otopine galne kiseline i elaginske kiseline pripravljene su u metanolu od čega je pripravljeno šest koncentracija u rasponu: za CBDVA 1,25-125,0 $\mu\text{g/mL}$, za CBD 5,00-100 $\mu\text{g/mL}$, za CBG 1,875-75,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBDA 1,00-50,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBGA 5,00-100 $\mu\text{g/mL}$, za CBN 1,00-50,00 $\mu\text{g/mL}$, za THC 3,125-50,00 $\mu\text{g/mL}$, za THCVA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBC 1,875-75,00 $\mu\text{g/mL}$, za THCA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$ te za CBCA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0,99996$ za CBDVA, $R^2 = 0,99868$ za CBD, $R^2 = 0,99913$ za CBG, $R^2 = 0,99921$ za CBDA, $R^2 = 0,99995$ za CBGA, $R^2 = 0,99910$ za CBN, $R^2 = 0,99995$ za THC, $R^2 = 0,99996$ za THCVA, $R^2 = 0,99810$ for CBC, $R^2 = 0,99994$ za THCA i $R^2 = 0,99996$ za CBCA.

Vrijeme zadržavanja za CBDVA bilo je 23,236 min, za CBD 31,793 min, za CBG 33,123 min, za CBDA 35,253 min, za CBGA 41,228 min, za CBN 43,252 min, za THC 47,047 min, za THCVA 48,210 min, za CBC 55,261 min, za THCA 60,492 min i za CBCA 62,358 min. Za validaciju HPLC metode za određivanje kanabinoida, osim linearnosti, provedena je usporedba vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardima, ponovljivost mjerenja i pripreme otopine te točnost, što je također prikazano u Prilozima (Tablica A3). Rezultati sadržaja kanabinoida u analiziranim uzorcima izraženi su u $\mu\text{g/mg}$ biljke.

3.6.5. Kromatografsko određivanje fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima koprive

HPLC analize fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima koprive provedene su na HPLC sustavu Agilent 1260 Infinity II s kromatografskim odvajanjem dobivenim na koloni ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 100 mm, 5 μm). Razdvajanje je postignuto gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 1 ml/min, tijekom 55 minuta, gdje je 0,1 % mravlje kiseline u mili-Q vodi korišteno kao faza A, a 0,1 % mravlje kiseline u metanolu je korišteno kao faza B. Gradijent je postavljen na način : 0- 8 min: 90 – 75 % A; 8-16 min: 75% A; 16-25 min: 75-55 % A; 25 - 28 min: 55 % A; 28 - 45 min: 55 - 20% A; 45-55 min: 20 % A nakon čega je uslijedio period od 20 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen injektiranja bio je 10 μL, valna duljina UV detekcije 240, 250, 260, 270, 280, 330 i 360 nm, a analiza je provedena pri 50 °C. Identifikacija komponenti provedena je na temelju vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskog spektra u ekstraktima sa spektrom standarda, dok je kvantifikacija napravljena na temelju eksterne kalibracije. Standardne osnovne otopine pripravljene su u metanolu od čega je pripravljeno sedam koncentracija (raspon koncentracija 10 – 500 mg/L). Vrijeme zadržavanja neoklorogenske kiseline bilo je 12,613 min, klorogenske kiseline 16,917 min, kofeinske kiseline 17,673 min, kafeoil-jabučne kiseline 26,258 min, sinapinske kiseline 27,830 min, rutina 31,061 min i cikorinske kiseline 38,755 min. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0,99964$ za neoklorogensku kiselinu, $R^2 = 0,99999$ za klorogensku kiselinu, $R^2 = 0,99983$ za kofeinsku kiselinu, $R^2 = 0,99909$ za kafeoil-jabučnu kiselinu, $R^2 = 0,99922$ za sinapinsku kiselinu, $R^2 = 0,99842$ za rutin i $R^2 = 0,99912$ za cikorinsku kiselinu. Za validaciju HPLC metode za određivanje fenolnih kiselina i HT, osim linearnosti, provedena je usporedba vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardima, ponovljivost mjerenja i pripreme otopine te točnost, što je također prikazano u Prilozima (Tablica A4). Rezultati sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida u analiziranim uzorcima izraženi su u μg/mg biljke.

3.6.6. Kromatografsko određivanje kumarina u ekstraktima lavande

HPLC analize umbeliferona i herniarina provedene su na HPLC sustavu Agilent 1260 Infinity II s kromatografskim odvajanjem dobivenim na koloni Cosmosil 5C18-MA-II (4,6 mm × 150 mm, 5 μm). Razdvajanje je postignuto gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 1 ml/min, tijekom 50 minuta, gdje je 1 % octene kiseline u mili-Q vodi korišteno kao faza

A, a metanol je korišten kao faza B. Gradijent je postavljen na način : 0 - 5 min: 80% A; 5-15 min: 80-40% A; 15-35 min: 40-20% A; 35 - 40 min: 20 - 80% A; 40 - 50 min: 80% A. Volumen injektiranja bio je 20 μ L, valna duljina UV detekcije 250, 280, 300 i 320 nm, a analiza je provedena pri 25 °C. Identifikacija umbeliferona i herniarina provedena je na temelju vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskog spektra u ekstraktima sa spektrom standarda, dok je kvantifikacija napravljena na temelju eksterne kalibracije. Standardne osnovne otopine umbeliferona i herniarina pripravljene su u metanolu od čega je pripravljeno šest koncentracija (raspon koncentracija 1,0–100,00 mg/L). Vrijeme zadržavanja umbeliferona bilo je 16,625 min, a herniarina 20,031 min. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0,99996$ za umbeliferon i $R^2 = 0,99965$ za herniarin. Za validaciju HPLC metode za određivanje kumarina, osim linearnosti, provedena je usporedba vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardima, ponovljivost mjerenja i pripreme otopine te točnost, što je također prikazano u Prilozima (Tablica A5). Udio herniarina i umbeliferona u analiziranim uzorcima izražen je u μ g/mL ekstrakta.

3.7. Statistička obrada rezultata

Optimizacija procesa ekstrakcije provedena je u odnosu na koncentraciju odabranih bioaktivnih komponenti iz kadulje, koprive, lavande, vrkute i konoplje. Za analizu utjecaja parametara ekstrakcije na ispitivane odzive te za optimizaciju procesa korištena je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM). Nezavisne varijable su ovisile o tehnici ekstrakciji te korištenim otapalima.

Za statističku analizu značajnosti ispitivanih parametra na promatrane komponente (ANOVA), procjenu koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom i numeričku optimizaciju ispitivanih parametra korišten je softverski paket Design-Expert®, v.9 (Stat Ease, Minneapolis, SAD). Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %.

Adekvatnost dobivenih modela za različite tehnike ekstrakcije potvrđena je koeficijentom determinacije (R^2), p -vrijednostima za model i nedostatkom modela (engL. *Lack of Fit*).

Na kraju, provedeno je optimiranje promatranog procesa koje se temelji na konceptu željene funkcije (engL. *Desirability function*, D). Za optimiranje, praćeni odziv se preveo u željenu funkciju čije se vrijednosti kreću od rasponu od 0 do 1 pri čemu 1 predstavlju najbolju vrijednost za željenu funkciju.

3.8. Adsorpcijska i desorpcijska svojstva makroporoznih smola

Izolacija željenih komponenti iz ekstrakata dobivenih ekstrakcijom DES-ovima provedena je statičkom adsorpcijom korištenjem različitih makroporoznih smola (Tablica 7) prema modificiranoj metodi Yang i sur. [162]. U 2,5 mL DES ekstrakta dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena miješanjem na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 3 sata. Nakon tri sata, uzorak je filtriran te je provedena analiza filtrata nakon adsorpcije. Potom su makroporoznim smolama dodani različiti desorbensi. Za ekstrakte u DES-ovima je dodana voda, 30, 50 i 70 % otopina etanola, etanol i metanol, a za ekstrakte u hDES-ovima je dodan etanol, dimetil-sulfoksid (DMSO) i metanol. Desorpcija je provedena miješanjem na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 2 sata. Nakon 2 sata, uzorci su filtrirani, a filtrat je analiziran.

Udio bioaktivnih komponenti u DES ekstraktu, otopini nakon adsorpcije i otopini nakon desorpcije određivan je zasebno. Sukladno tome, adsorpcijski kapaciteti makroporoznih smola q (3) i adsorpcijski prinos E (4), kao i desorpcijski prinos otapala D (5) za svaku pojedinačnu komponentu, izračunati su pomoću sljedećih jednadžbi:

$$q = \frac{(\rho_0 - \rho_e) \times V}{m} \quad (3)$$

$$E = \frac{\rho_0 - \rho_e}{\rho_0} \times 100 \quad (4)$$

$$D = \frac{\rho_d \times V}{Q} \times 100 \quad (5)$$

gdje je q jedinični kapacitet adsorpcije zasićenja smole (mg/g); ρ_0 koncentracija bioaktivne komponente u ekstraktu (g/L); ρ_e je ravnotežna koncentracija bioaktivne komponente (g/L); m je masa smole (g); V je volumen filtrata (L), E je adsorpcijski prinos (%), D je desorpcijski prinos, ρ_d je ravnotežna koncentracija bioaktivnih komponenti (g/L), a Q je adsorpcijska količina smole (g). Eksperiment je proveden u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Za ispitivanje adsorpcijskog kapaciteta makroporoznih smola ispitan je utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije, kao i

volumena desorbensa. Ispitivano je vrijeme adsorpcije u rasponu od 60 do 360 min, dok je vrijeme desorpcije bilo 60-1080 min. Volumen desorbensa bio je u rasponu 1-10 mL.

Smole su prije statičke adsorpcije pripremljene prema uputama proizvođača. Željena količina smole je prebačena u tikvicu postavljenu na magnetsku miješalicu, a zatim je dodan etanol tako da nivo etanola bude 2,5 cm iznad smola. Sadržaj je lagano miješan 1 minutu na magnetskoj miješalici i zatim ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim je etanol pažljivo dekantiran i zamijenjen milli-Q vodom. Sadržaj je ponovno miješan 1 minutu i zatim ostavljen 10 minuta. Tako pripremljene smole su neposredno prije upotrebe filtrirane i korištene za daljnji postupak.

Tablica 7. Fizikalna i kemijska svojstva korištenih makroporoznih smola

Naziv smole	Veličina čestica (μm)	Polarnost	Radijus pora (\AA)	Površina (m^2/g)	Materijal
HP20	>250	slabo polarno	260	600	polistiren
HP21	250	nepolarno	80	570	polistiren
HP2MG	>350	srednje polarno	170	470	metakrilat
XAD16N	700	nepolarno	150	800	polistiren
XAD7HP	500	polarno	550	500	akrilat

3.9. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola

3.9.1. Recikliranje DES-ova

Nakon postupka adsorpcije ekstrakta na makroporoznu smolu, eutektičko otapalo je filtrirano i potom podvrgnuto destilaciji pri sniženom tlaku kako bi se uklonila sva zaostala voda. Otapalo je zatim pripremljeno dodavanjem odgovarajućeg volumena vode, ovisno o optimalnim uvjetima za pojedine komponente i ponovno korišteno za daljnju ekstrakciju.

Za ekstrakciju karnosolne kiseline i karnosola iz kadulje korišteno je otapalo DES15 (ChCl : mliječna kiselina (1 : 2)) s 10 % vode. Pripremljeni uzorci miješani su na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku na magnetskoj miješalici na temperaturi od 70 °C kroz 90 minuta.

Za ekstrakciju fenolnih kiselina i HT iz vrkute korišteno je otapalo DES1 (ChCl : urea (1 : 2)) s 50 % vode. Pripremljeni uzorci miješani su na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku na magnetskoj miješalici na temperaturi od 30 °C kroz 68,2 minuta.

Za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina iz koprive korišteno je otapalo DES15 (ChCl : mliječna kiselina (1 : 2)) s 34 % vode. Pripremljeni uzorci ekstrahirani su primjenom ultrazvučne kupelji na temperaturi od 70 °C kroz 90 minuta.

Za ekstrakciju kanabinoida iz industrijske konoplje korišteno je otapalo hDES2 (mentol : octena kiselina (1 : 1)). Pripremljeni uzorci miješani su na 1500 okretaja u minuti u aluminijskom bloku na magnetskoj miješalici na temperaturi od 70 °C kroz 64,78 minuta.

Za ekstrakciju kumarina iz lavande korišteno je otapalo hDES2 (mentol : octena kiselina (1 : 1)). Pripremljeni uzorci ekstrahirani su primjenom ultrazvučne kupelji na temperaturi od 70 °C kroz 60 minuta.

Nakon ekstrakcije, ekstrakti su centrifugirani 15 minuta i zatim dekantirani. Tekući supernatanti su zatim razrijeđeni metanolom, filtrirani kroz PTFE filtar od 0,45 µm i podvrgnuti HPLC analizi.

3.9.2. Recikliranje makroporoznih smola

Nakon procesa desorpcije i filtracije, smole su pripremljene prema uputama proizvođača. Zaostala količina smole je prebačena u tikvicu postavljenu na magnetsku miješalicu, a zatim je dodan etanol 2,5 cm iznad smola. Sadržaj je lagano miješan 1 minutu na magnetskoj miješalici i zatim ostavljen na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim je etanol pažljivo dekantiran i zamijenjen milli-Q vodom. Sadržaj je ponovno miješan 1 minutu i zatim ostavljen 10 minuta. Tako pripremljene smole su neposredno prije upotrebe filtrirane i korištene za daljnji postupak. Nakon toga, ponovno su korištene za adsorpciju komponenata iz ekstrakta.

U 2,5 mL DES ekstrakta kadulje dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 60 minuta. Nakon 60 minuta, uzorak je profiltriran pri čemu je makroporoznim smolama dodan etanol. Provedena je analiza filtrata nakon adsorpcije. Desorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 60 minuta. Nakon 60 minuta, uzorci su profiltrirani, pri čemu se filtrat analizirao.

U 2,5 mL DES ekstrakta vrkute dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 60 minuta. Nakon 60 minuta, uzorak je profiltriran pri čemu je makroporoznim smolama dodan 70 % etanol. Provedena je analiza filtrata nakon adsorpcije. Desorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 720 minuta. Nakon 720 minuta, uzorci su profiltrirani, pri čemu se filtrat analizirao.

U 2,5 mL DES ekstrakta koprive dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 360 minuta. Nakon 360 minuta, uzorak je profiltriran pri čemu je makroporoznim smolama dodan 70 % etanol. Provedena je analiza filtrata nakon adsorpcije. Desorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 300 minuta. Nakon 300 minuta, uzorci su profiltrirani, pri čemu se filtrat analizirao.

U 2,5 mL DES ekstrakta industrijske konoplje dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 360 minuta. Nakon 360 minuta, uzorak je profiltriran pri čemu je makroporoznim smolama dodan etanol. Provedena je analiza filtrata nakon adsorpcije. Desorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 720 minuta. Nakon 720 minuta, uzorci su profiltrirani, pri čemu se filtrat analizirao.

U 2,5 mL DES ekstrakta lavande dodano je 1,0 g makroporozne smole. Adsorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 360 minuta. Nakon 360 minuta, uzorak je profiltriran pri čemu je makroporoznim smolama dodan DMSO. Provedena je analiza filtrata nakon adsorpcije. Desorpcija je provedena na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi i uz 200 okretaja u minuti tijekom 240 minuta. Nakon 240 minuta, uzorci su profiltrirani, pri čemu se filtrat analizirao.

3.10. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalno djelovanje ekstrakata ispitano je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodom. Metanolna otopina DPPH radikala (0,3 mM) pripravljena je svakodnevno i čuvana bez izlaganja svjetlosti do analize. Prije mjerenja uzoraka izmjerena je apsorpcija pripremljene DPPH otopine. Zatim je 1,2 mL uzoraka (koncentracije ovisno o uzorcima) pomiješano s 0,5 mL otopine DPPH i smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi i u mraku

30 minuta. Nakon 30 min, apsorbancija je određena spektrofometrijski na 517 nm. Za sve uzorke mjerenje je provedeno u tri ponavljanja i uspoređeno s kontrolom. Postotak inhibicije DPPH (%) izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$DPPH(\%) = \frac{(A_{DPPH} + A_S) - A_P}{A_{DPPH}} * 100 \quad (6)$$

gdje je A_{DPPH} apsorbancija DPPH otopine, A_S je apsorbancija uzorka, a A_P je apsorbancija slijepe probe (apsorbancija uzorka bez dodatka DPPH otopine).

Za odabrane uzorke, određen je EC_{50} budući da predstavlja lakši alat za usporedbu rezultata s literaturnim podacima gdje su korištene ne samo različite metode nego i različita otapala. Uzorci dobiveni različitim volumenima desorbensa korišteni su za izračun EC_{50} vrijednosti preko krivulje dobivene iz % inhibicije DPPH radikala pri različitim koncentracijama uzoraka.

3.11. Određivanje antibakterijske aktivnosti

3.11.1. Priprema hranjive podloge

Za nasađivanje bakterija korištena je Müller Hinton čvrsta hranjiva podloga. Za pripremu 100 mL čvrste hranjive podloge izvagano je 2,2 g Müller Hintona, 0,5 g ekstrakta kvasca i 1,5 g agara. Zatim je dodano 1 mL glicerola te 0,25 M otopina PBS-a (fosfatni pufer, eng. *Phosphate Buffer Saline*) s podešenom pH vrijednosti na 7,4 do 100 mL, te je kuhano 10 minuta. Nakon kuhanja, podloge su autoklavirane 15 minuta pri 121 °C. Nakon autoklaviranja i kratkog hlađenja podloge su izlivene u sterilne Petrijeve posude. Nakon potpunog hlađenja i skrutnjavanja, podloge su pohranjene u hladnjaku do nasađivanja bakterijskih kultura.

Za pripremu 1 L tekućeg Müller Hinton bujona otopljeno je 22 g Müller Hintona u 1 L destilirane vode. Tekući bujon je zagrijan do potpunog otapanja, a zatim steriliziran autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Pripremljena tekuća podloga ohlađena je i korištena za daljnje istraživanje.

3.11.2. Odabir bakterijskih organizama i nasađivanje bakterijskih kultura

Četiri korištene bakterije izolirane su iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih s Mikrobiološkog odjela Zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. Vrste *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* odabrane su kao dva najčešće korištena modelna organizma u istraživanjima koja predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. S druge strane, kao česti ljudski patogeni odabrane su vrste *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* te također predstavljaju Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvane u hladnjaku u dubokom agaru. Na sterilnu i ohlađenu Müller Hinton čvrstu hranjivu podlogu nasađene su bakterijske kulture, nakon čega su inkubirane u inkubatoru (Binder BD 56, Binder GmbH, Tuttlingen, Njemačka) tijekom 18-24 sata pri temperaturi od 37 °C.

3.11.3. Određivanje gustoće bakterijskih suspenzija

Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarlandovom standardu po principu uspoređivanja sa suspenzijom poznatog zamućenja. McFarlandov standard neophodan je pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni vrijednostima na McFarland skali. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korišten je standard 0,5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi $150 \times 10^6/\text{mL}$. Gustoće bakterijskih suspenzija mjerene su u sterilnoj fiziološkoj otopini na denzitometru (McFarland tube Densitometer DEN-1, Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK).

3.11.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Minimalne inhibitorne koncentracije uzoraka određene su modificiranom metodom mikrodilucije [163]. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korištene su sterilne polipropilenske mikrotitarske pločice sa 96 jažica. Ciprofloksacin, genatimicin i amikacin sulfat su testirani kao pozitivna kontrola, a otapala su korištena kao negativna kontrola. Kontrolni uzorci (pozitivni i negativni) su inkubirani pod istim uvjetima. Najprije je u svaku jažicu pipetirano 100 μL Müller Hinton tekućeg bujona. U jažice prvog stupca dodano je 100 μL razrijeđenog uzorka, nakon čega su rađena serijska dvostruka razrijeđenja unutar mikrotitarske pločice. Svaki uzorak je rađen u tri ponavljanja. Korišten je 24- satni

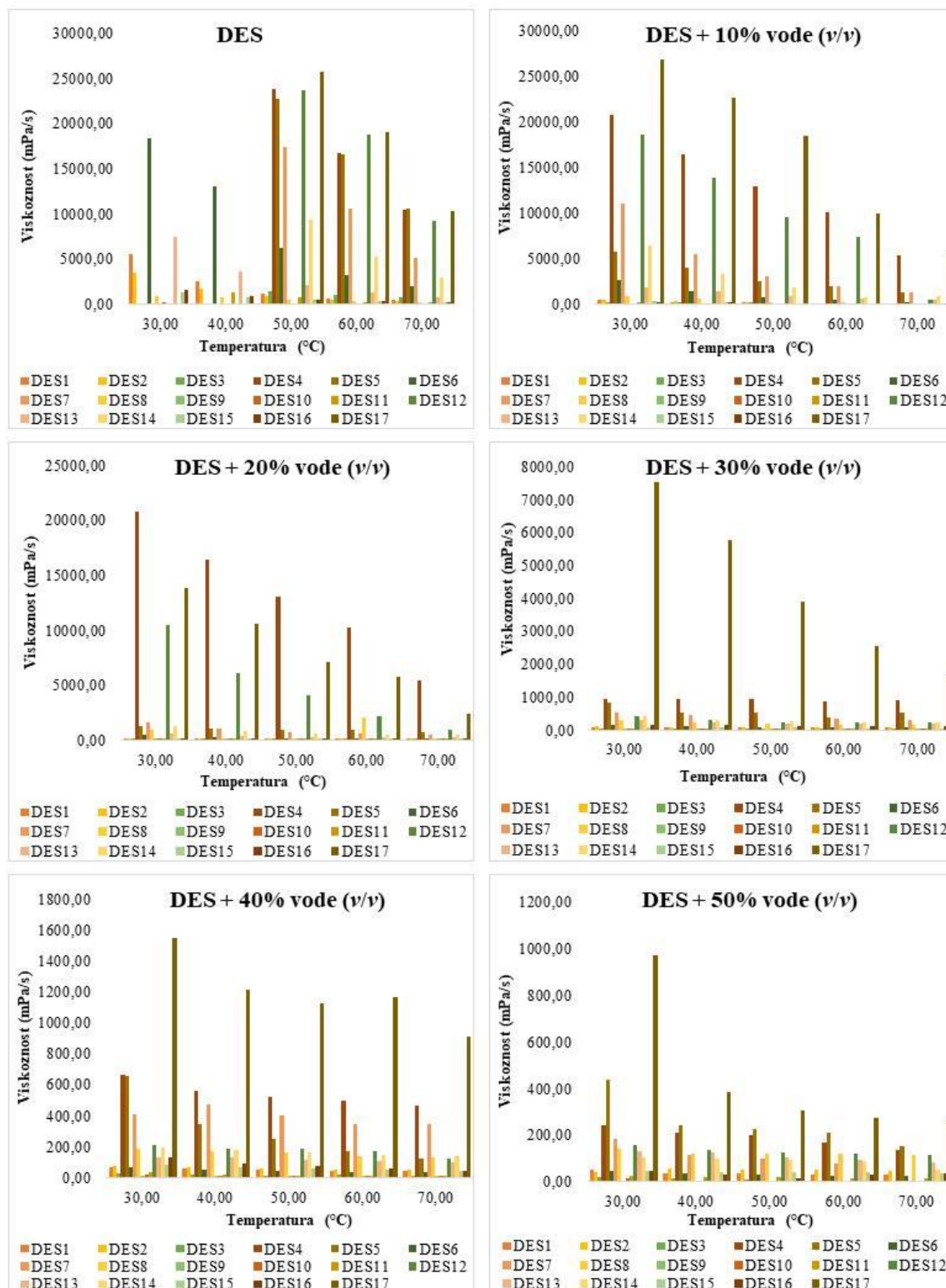
inokulum, a u svaku je jažicu inokulirano 300×10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150×10^6 bakterija/mL). Tako pripremljene pločice stavljene su na inkubaciju pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata. Nakon inkubacijskog perioda u svaku jažicu dodano je $50\text{ }\mu\text{L}$ trifenil tetrazolij klorida (TTC) i stavljeno je na reinkubaciju na $37\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 3 sata. TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji $0,5\text{ mg/mL}$ se koristi kao indikator reducirajućih tvari u podlozi što je vidljivo prema promjeni boje medija u ružičastu. Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitavane su golim okom. Pojava ružičastog obojenja znak je rasta bakterija. Najveće razrjeđenje ekstrakata pri kojem nije došlo do pojave ružičastog obojenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog ekstrakta.

3.12. Određivanje stabilnosti bioaktivnih komponenti u ekstraktima

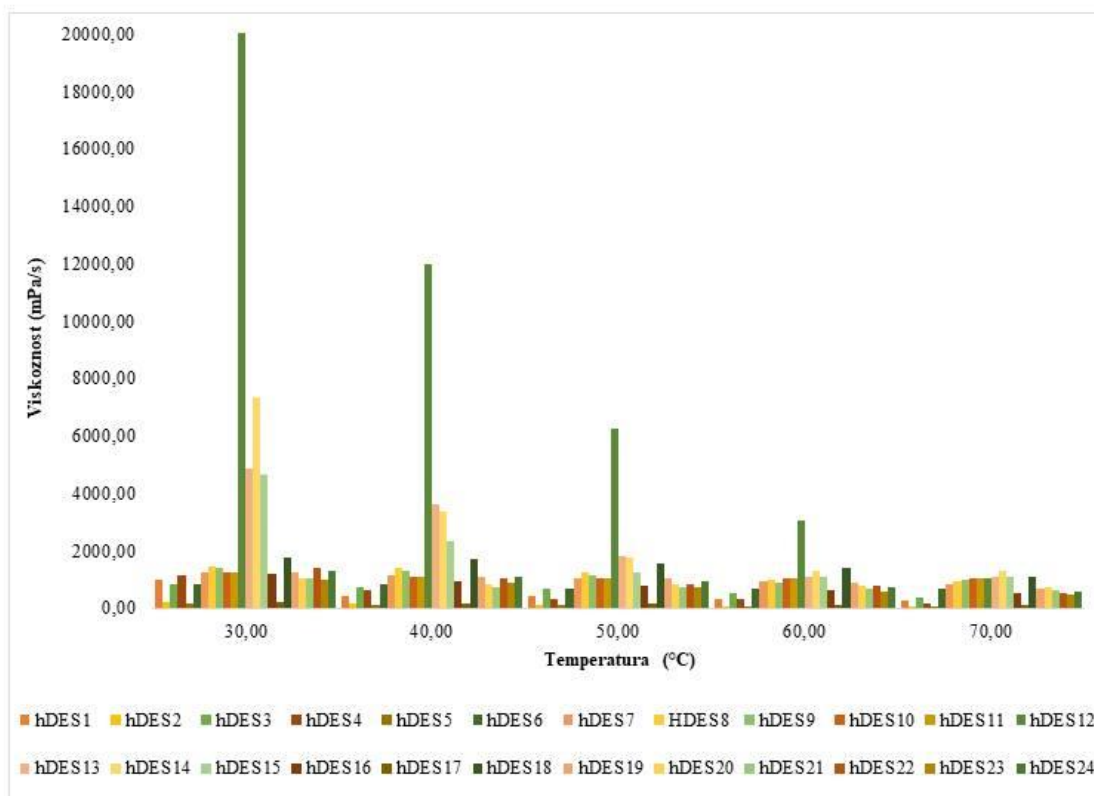
Ekstraktu dobivenom primjenom odabranog DES-a pri optimalnim uvjetima i ekstraktima dobivenima primjenom konvencionalnih otapala pri uvjetima u kojima je postignut najveći udio bioaktivnih komponenti ispitana je stabilnost, odnosno udio bioaktivnih komponenti. Udio bioaktivnih komponenti pripremljenih ekstrakata ispitan je primjenom HPLC-a odmah po ekstrakciji, a nakon toga su podijeljeni za mjerenja u sedam vremenskih perioda. Isti ekstrakti su čuvani pri četiri različite temperature, odnosno na sobnoj temperaturi, u hladnjaku ($4\text{ }^\circ\text{C}$), u zamrzivaču ($-18\text{ }^\circ\text{C}$) i zamrzivaču ultra niske temperature ($-70\text{ }^\circ\text{C}$). Ekstrakti su čuvani u plastičnim prozirnim mikroepruvetama, bez izlaganja direktno svjetlu. Ekstrakti su vađeni i pripremljeni neposredno prije HPLC analize, kako bi se izbjeglo dugotrajno izlaganje višoj temperaturi. Sastav ekstrakata je praćen u sedam različitih vremenskih perioda (nakon 24 sata, 48 sati, 1 tjedna, 2 tjedna, 1 mjeseca, 2 mjeseca i 3 mjeseca) kako bi se uočilo dolazi li i kada do značajnih promjena udjela bioaktivnih komponenti u ekstraktu.

4. Rezultati

4.1. Karakterizacija DES-ova



Slika 12. Viskoznost čistih DES-ova i DES-ova s dodatkom vode u ovisnosti o temperaturi



Slika 13. Viskoznost hDES-ova u ovisnosti o temperaturi

Tablica 8. pH i polarnost čistih DES-ova i s dodatkom vode

Otapalo	Oznaka	Udio vode (v/v)	pH		ENR
			pH metar	indikator trakice	
ChCl : urea (1 : 2)	DES1	0	8,4	8	50,16
		10	8,35	8	49,64
		20	8,05	8	48,62
		30	7,85	8	48,40
		40	7,80	8	48,40
		50	7,67	8	48,40
ChCl : <i>N</i> -metilurea (1 : 3)	DES2	0	6,42	6	50,69
		10	6,31	6	50,04
		20	5,99	6	48,96
		30	5,84	6	49,13
		40	5,77	6	48,62
		50	5,67	6	48,35
ChCl : tiourea (1 : 2)	DES3	0	6,02	6	47,92
		10	5,93	6	48,79
		20	5,74	6	48,24
		30	5,66	6	48,03
ChCl : glukoza	DES4	40	5,59	6	47,92
		50	5,40	5	47,81
		0	5,36	6	48,90

REZULTATI

(1 : 1)		10	4,95	5	48,62
		20	4,41	5	48,57
		30	3,71	4	48,68
		40	3,84	4	48,35
		50	3,85	4	48,35
		0	4,88	4	48,96
		10	4,42	4	48,85
ChCl : fruktoza (1 : 1)	DES5	20	4,02	4	48,79
		30	3,72	4	48,57
		40	3,37	4	48,35
		50	3,35	4	48,35
		0	7,60	8	50,16
		10	7,17	7	49,13
ChCl : ksilitol (1 : 1)	DES6	20	7,0	7	48,85
		30	6,89	7	48,68
		40	6,62	7	48,57
		50	6,49	7	48,46
		0	5,95	6	49,81
		10	5,72	6	49,07
ChCl : sorbitol (1 : 1)	DES7	20	5,37	6	48,90
		30	5,18	5	48,62
		40	5,02	5	48,68
		50	4,90	5	48,51
		0	5,67	5	50,69
		10	5,08	5	49,64
ChCl : butan-1,4-diol (1 : 2)	DES8	20	4,85	5	48,62
		30	4,60	5	48,40
		40	4,53	5	48,40
		50	4,50	4	48,40
		0	6,41	6	50,04
		10	6,29	7	49,64
ChCl : etilen glikol (1 : 2)	DES9	20	6,17	6	49,07
		30	6,53	7	48,79
		40	5,79	7	48,19
		50	5,54	7	48,03
		0	5,93	6	49,98
		10	5,83	5	49,35
ChCl : glicerol (1 : 2)	DES10	20	5,58	5	48,51
		30	5,35	5	48,46
		40	5,24	4	48,13
		50	5,12	4	48,40
		0	7,31	7	50,87
		10	6,76	7	49,81
ChCl : acetamid (1 : 2)	DES11	20	6,23	6	49,47
		30	5,81	6	48,46
		40	5,60	6	48,46
		50	5,39	5	48,46
		0	0,35	0	49,69
		10	0,42	0	49,24
ChCl : jabučna kiselina (1 : 1)	DES12	20	0,55	0	48,19
		30	0,64	0	47,86
		40	0,79	0	47,97
		50	0,93	0	47,97
	DES13	0	0,44	0	44,63

		10	0,58	0	44,67
ChCl : malonska		20	0,60	0	44,67
kiselina		30	0,69	0	47,97
(1 : 1)		40	0,72	0	47,97
		50	0,81	0	47,97
		0	-1,10	0	44,53
ChCl : oksalna		10	-1,01	0	44,53
kiselina	DES14	20	-0,90	0	44,67
(1 : 1)		30	-0,38	0	44,67
		40	-0,23	0	47,97
		50	-0,11	0	47,97
		0	0,50	0	47,97
ChCl : mliječna		10	0,63	0	48,08
kiselina	DES15	20	0,79	0	48,13
(1 : 2)		30	0,94	1	48,13
		40	1,17	1	48,13
		50	1,21	1	48,13
		0	1,24	1	48,79
ChCl : levulinska		10	1,27	1	48,79
kiselina	DES16	20	1,33	1	48,79
(1 : 2)		30	1,46	1	48,62
		40	1,57	2	48,62
		50	1,69	2	48,46
		0	0,02	0	44,67
ChCl : limunska		10	0,10	0	44,67
kiselina	DES17	20	0,22	0	44,67
(1 : 2)		30	0,36	0	44,72
		40	0,42	0	47,86
		50	0,65	0	47,81

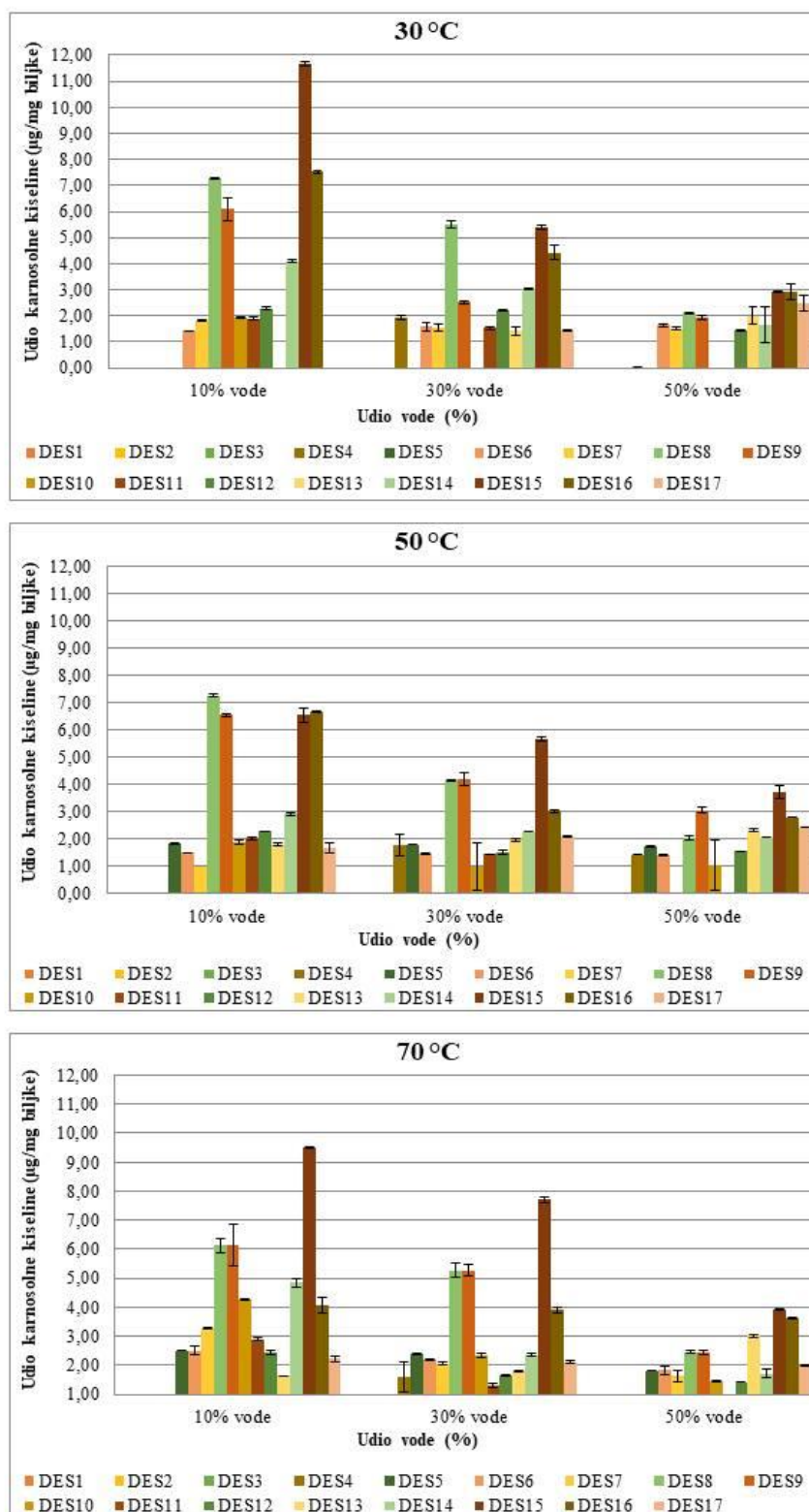
Tablica 9. pH i polarnost hDES-ova

Otapalo	Oznaka	pH		ENR
		pH metar	indikator trakice	
mentol : mravlja kiselina (1 : 1)	hDES1	-0,59	0	53,54
mentol : octena kiselina (1 : 1)	hDES2	1,53	2	52,36
mentol : kapronska kiselina (1 : 1)	hDES3	2,91	3	52,56
mentol : mliječna kiselina (1 : 1)	hDES4	0,62	1	50,28
mentol : mliječna kiselina (1 : 2)	hDES5	0,21	0	50,93
mentol : levulinska kiselina (1 : 1)	hDES6	2,09	2	51,36
mentol : laurinska kiselina (1 : 1)	hDES7	4,11	5	53,61
mentol : kaprilna kiselina (1 : 1)	hDES8	5,55	6	53,54
mentol : kaprinska kiselina	hDES9	1,05	1	53,54

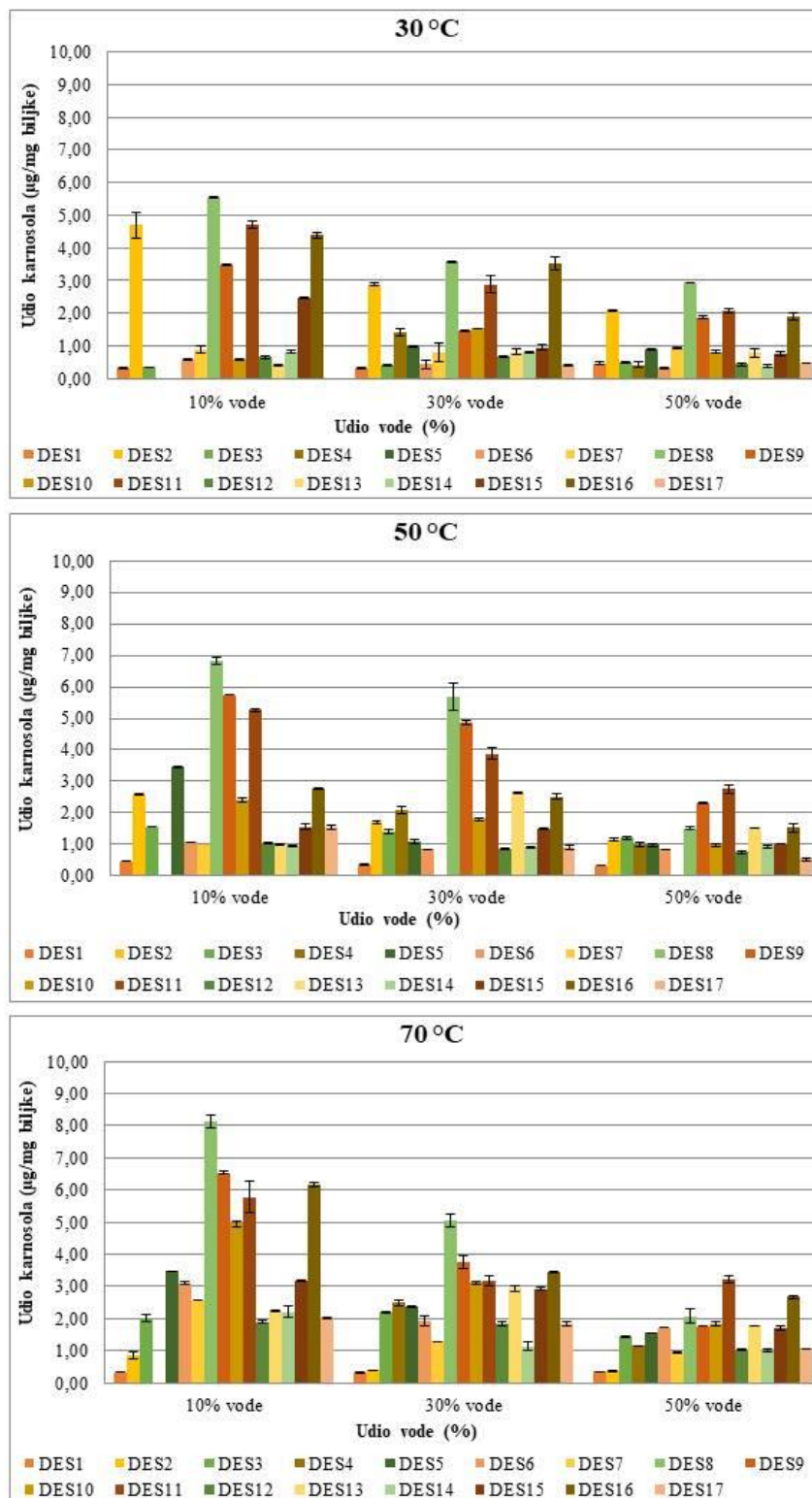
REZULTATI

(1 : 1) mentol : kaprinska kiselina (2 : 1)	hDES10	1,42	1	53,54
mentol : palmitinska kiselina (2 : 1)	hDES11	4,11	5	51,24
Tetra-n-oktilamonijev bromid : kaprinska kiselina (1 : 2)	hDES12	1,15	1	50,75
kaprinska kiselina : lidokain (2 : 1)	hDES13	5,97	6	52,82
kaprinska kiselina : lidokain (3 : 1)	hDES14	5,68	6	53,34
kaprinska kiselina : lidokain (4 : 1)	hDES15	5,37	6	52,75
timol : kaprinska kiselina (3 : 2)	hDES16	3,83	4	50,45
timol : kaprinska kiselina (1 : 1)	hDES17	3,55	4	50,34
timol : kaprinska kiselina (1 : 2)	hDES18	3,15	4	51,36
timol : kaprinska kiselina (1 : 3)	hDES19	2,94	3	51,61
timol : kamfor (7 : 3)	hDES20	5,36	5	50,22
timol : kamfor (3 : 2)	hDES21	5,02	5	50,81
timol : kamfor (1 : 1)	hDES22	5,77	6	50,34
timol : kaprilna kiselina (1 : 1)	hDES23	3,33	4	50,93
timol : laurinska kiselina (1 : 1)	hDES24	5,74	6	50,75

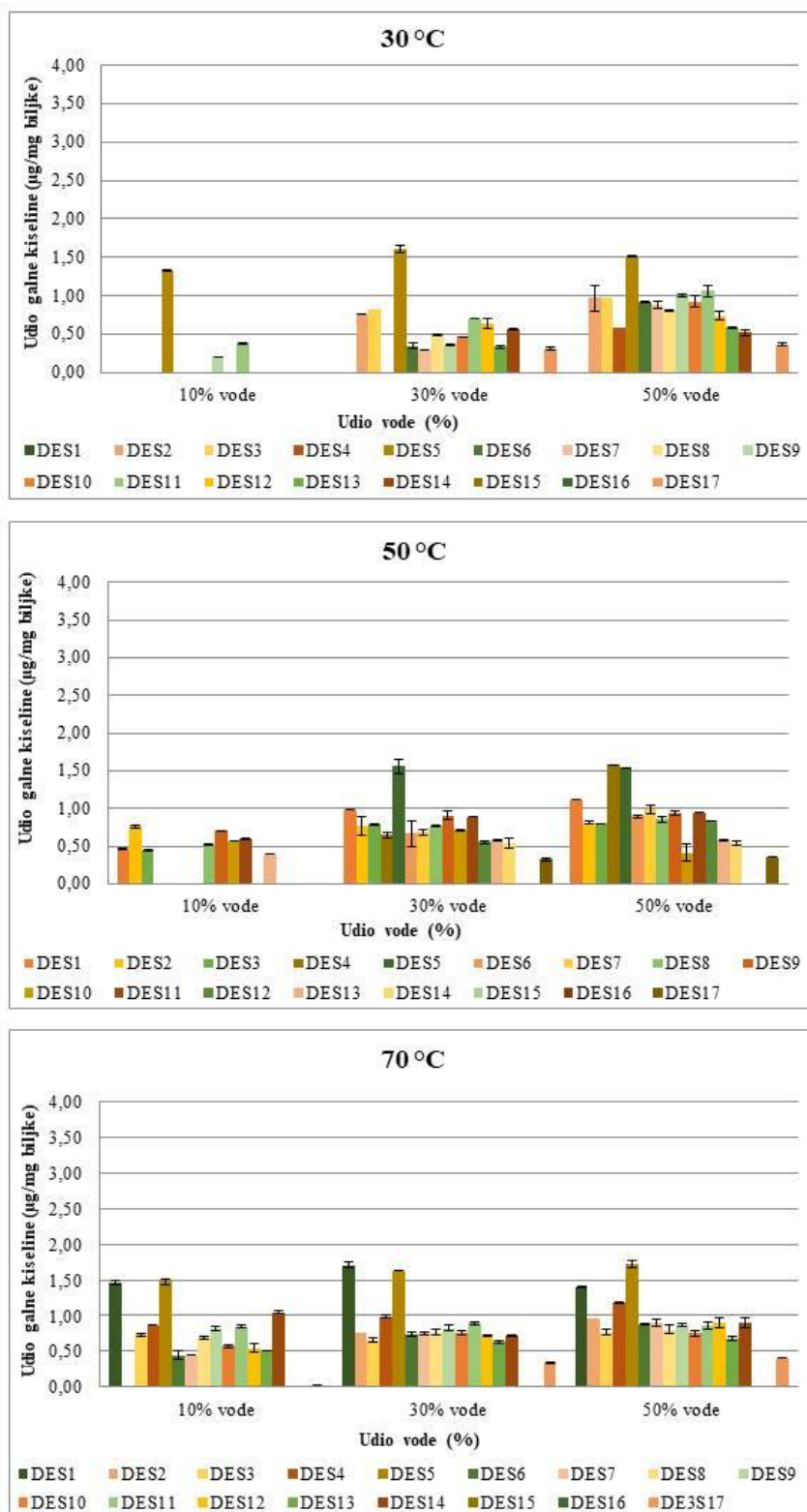
4.2. Probir DES-ova za ekstrakciju bioaktivnih komponenti



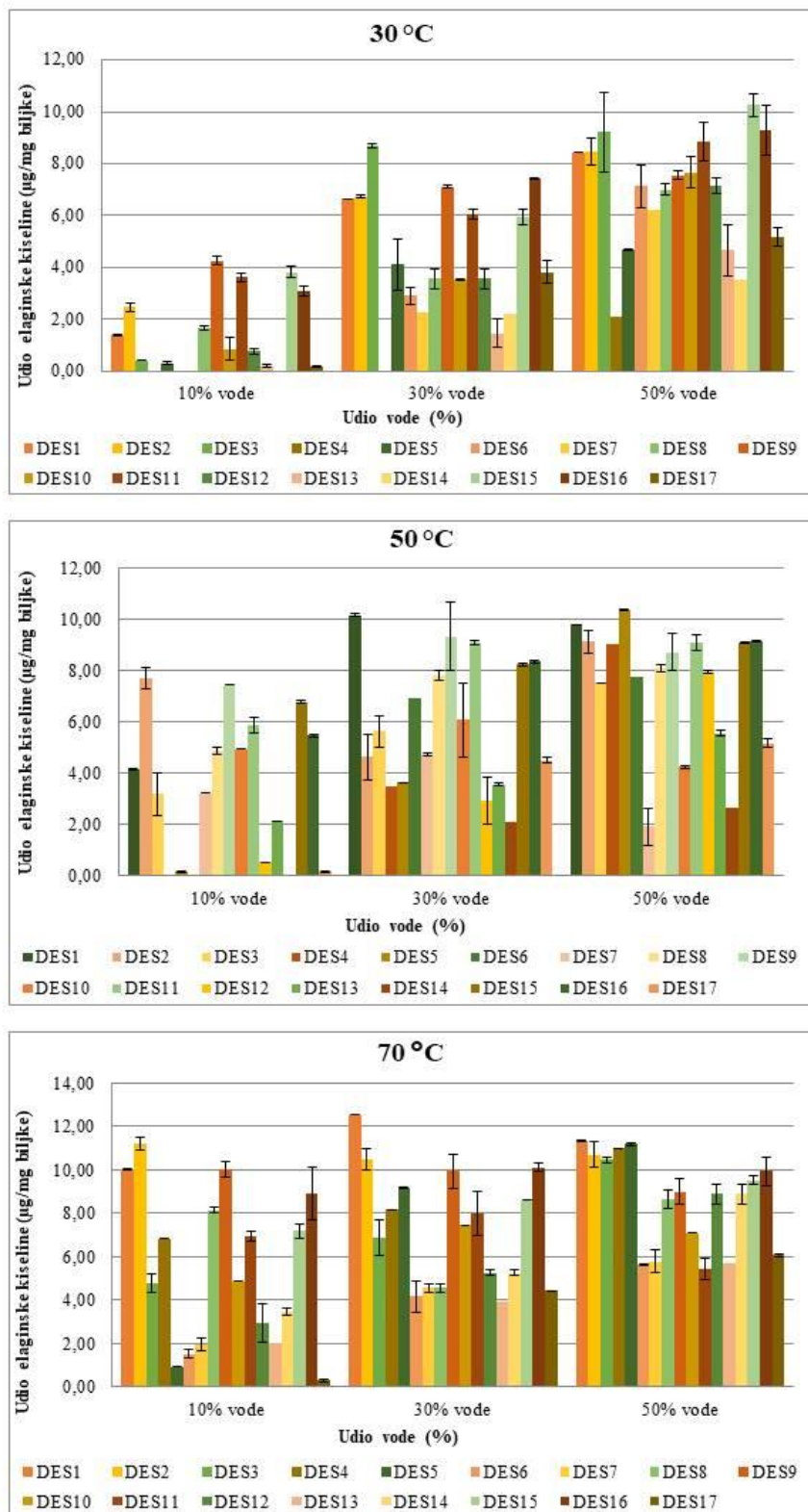
Slika 14. Prikaz udjela karnosolne kiseline ekstrahirane iz kadulje primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



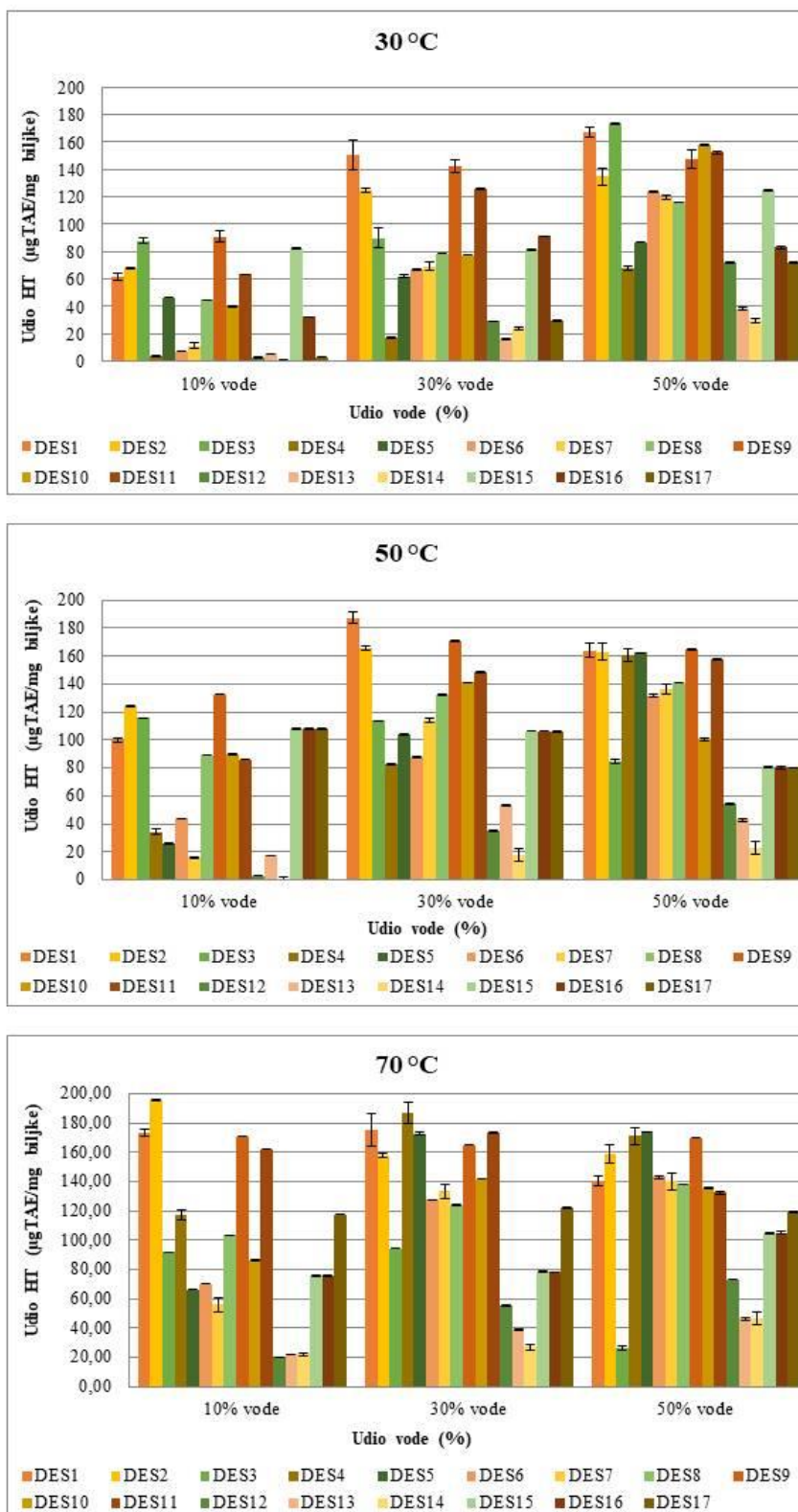
Slika 15. Prikaz udjela karnosola ekstrahiranog iz kadulje primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



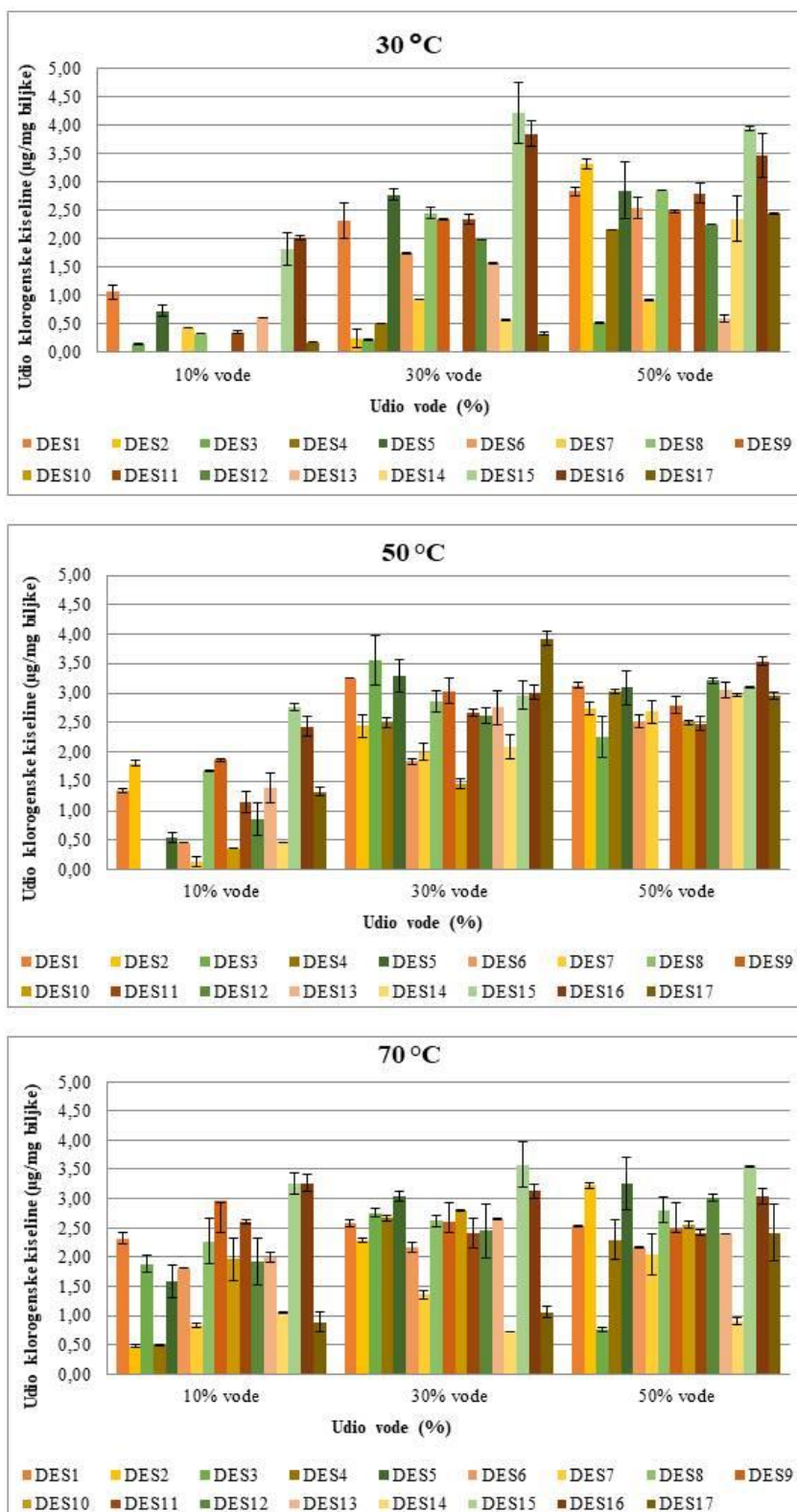
Slika 16. Prikaz udjela galne kiseline ekstrahirane iz vrkute primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



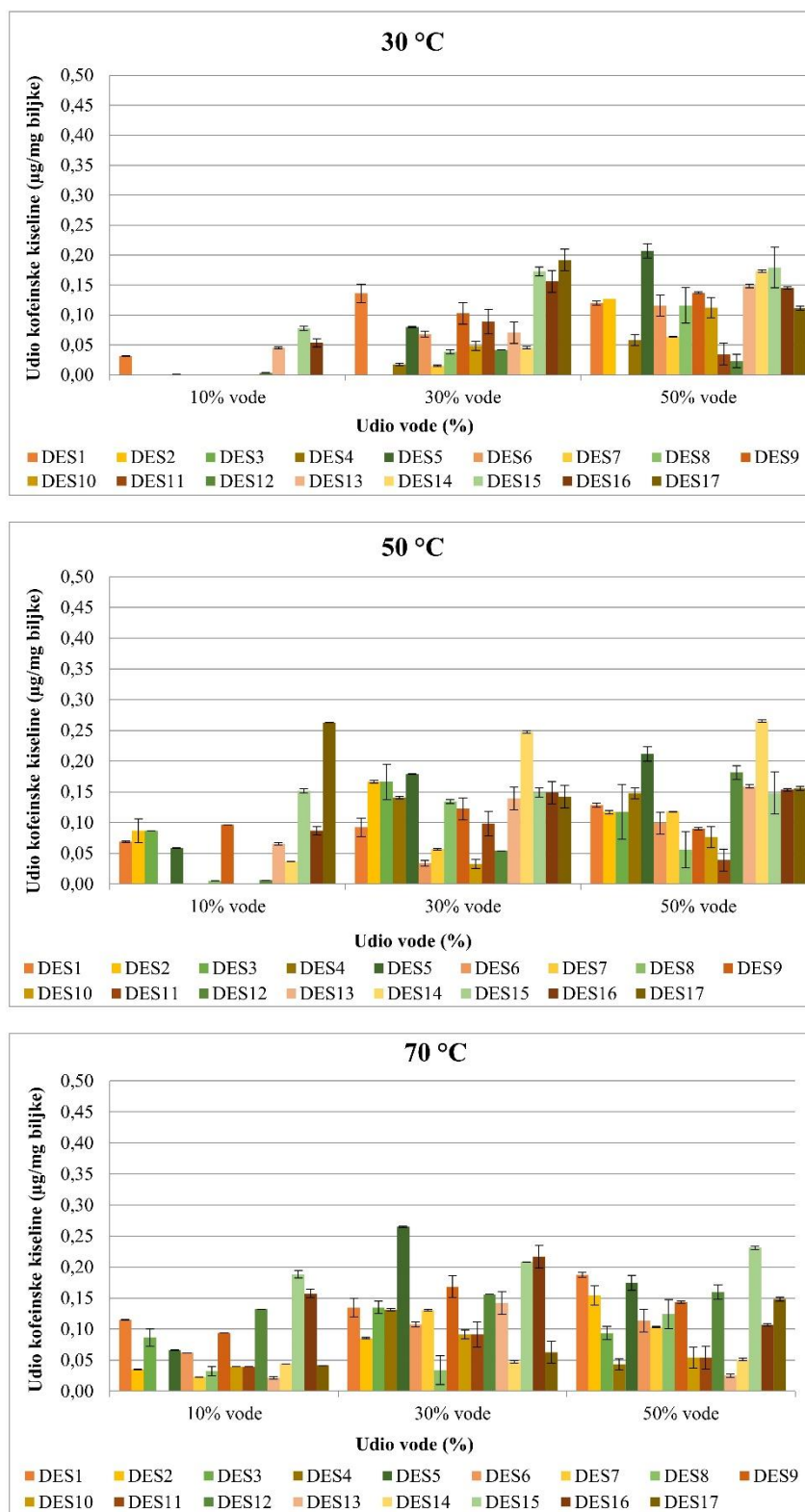
Slika 17. Prikaz udjela elaginske kiseline ekstrahirane iz vrkute primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



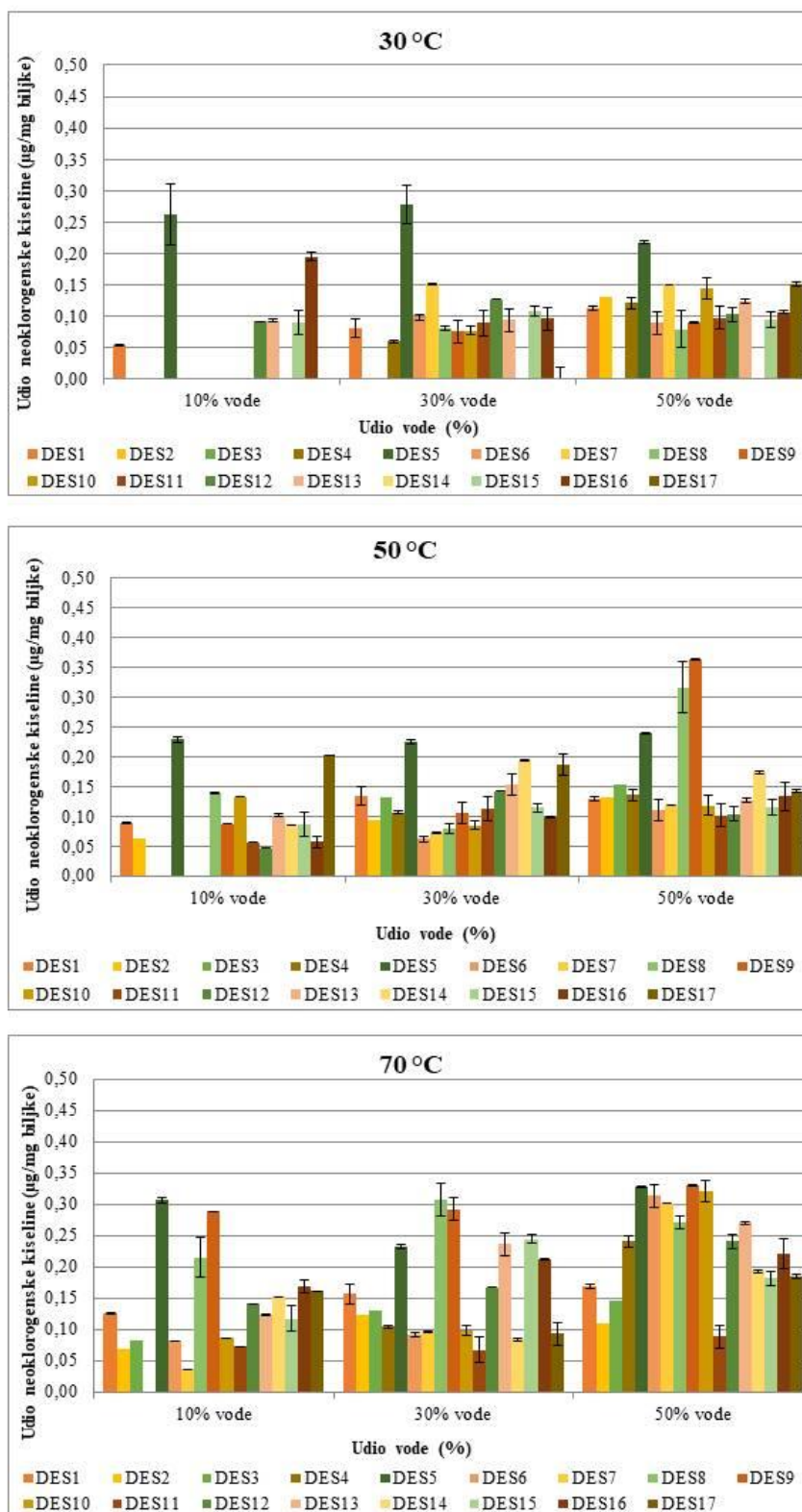
Slika 18. Prikaz udjela HT ekstrahiranih iz vrkute primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



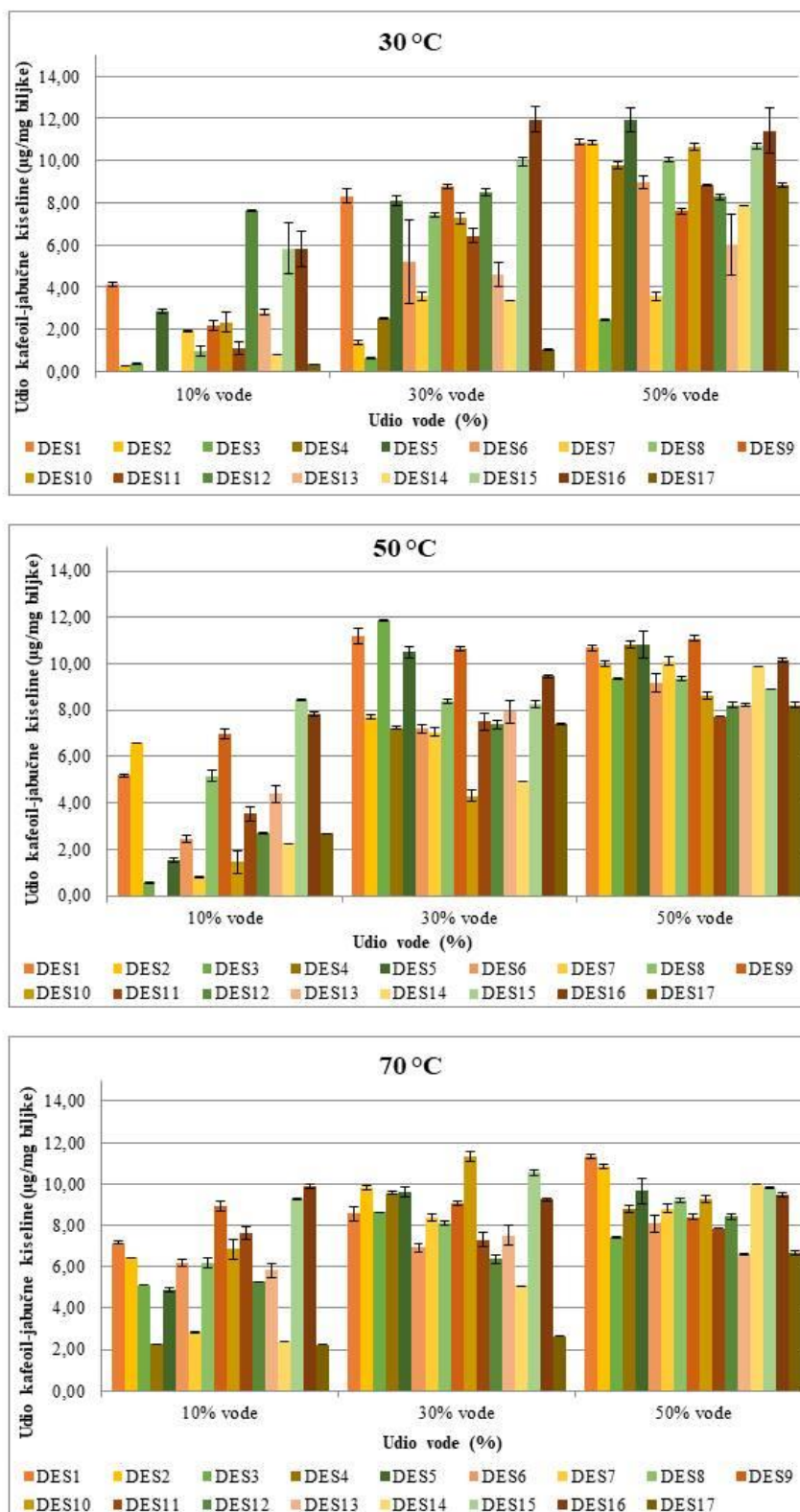
Slika 19. Prikaz udjela klorogenske kiseline ekstrahirane iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



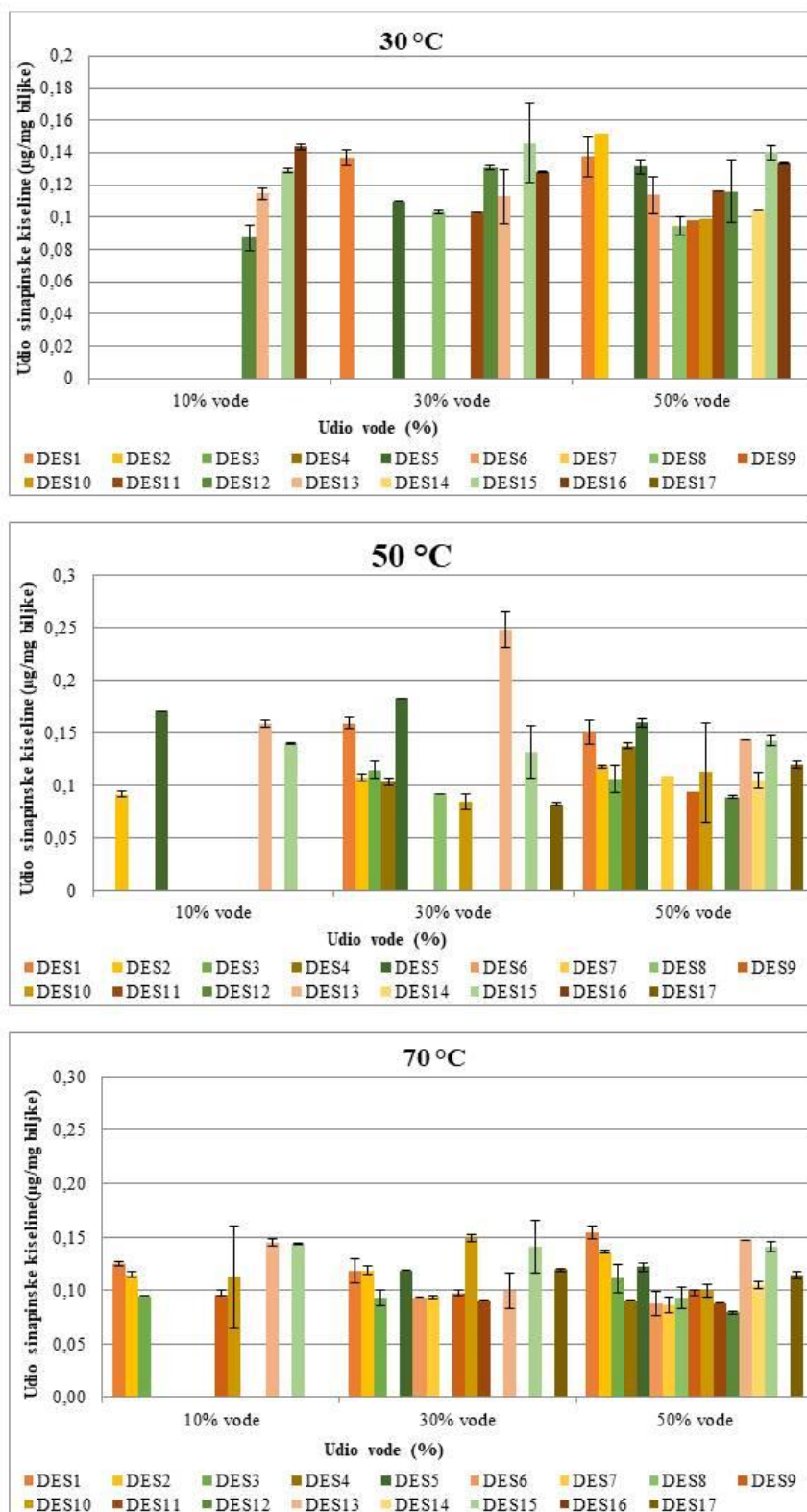
Slika 20. Prikaz udjela kofeinske kiseline ekstrahirane iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



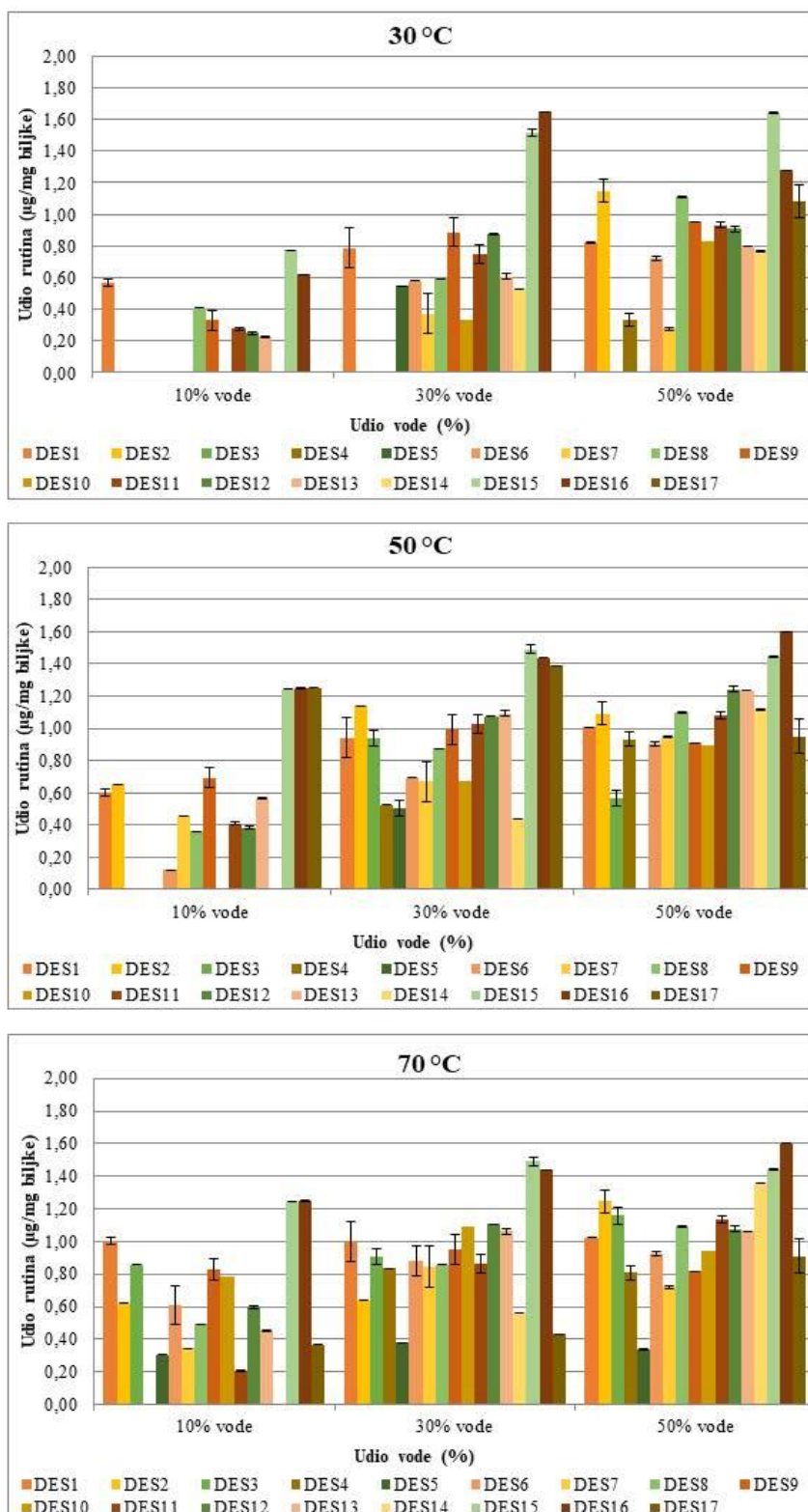
Slika 21. Prikaz udjela neoklorogenske kiseline ekstrahirane iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



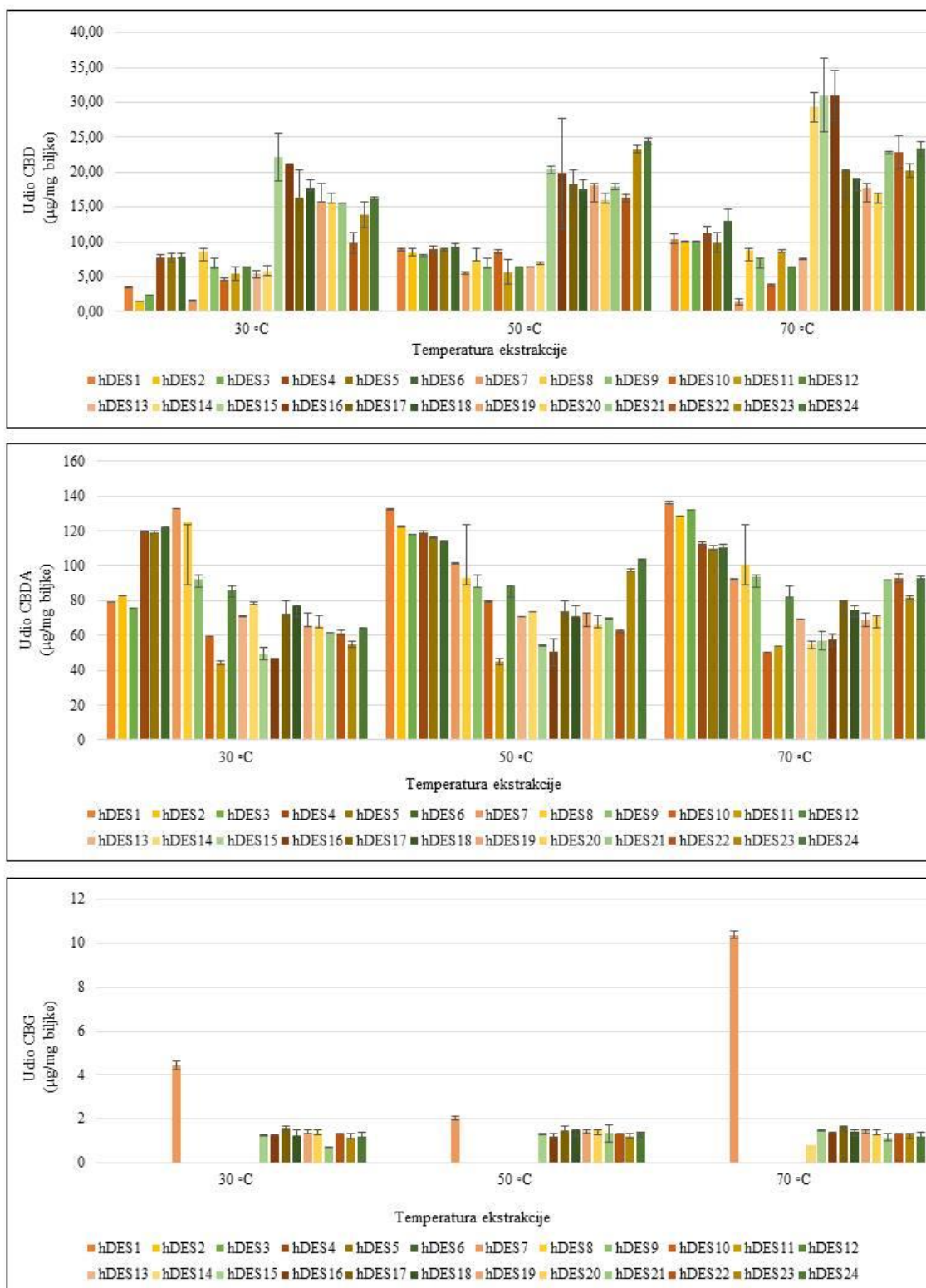
Slika 22. Prikaz udjela kafeoil-jabučne kiseline ekstrahirane iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



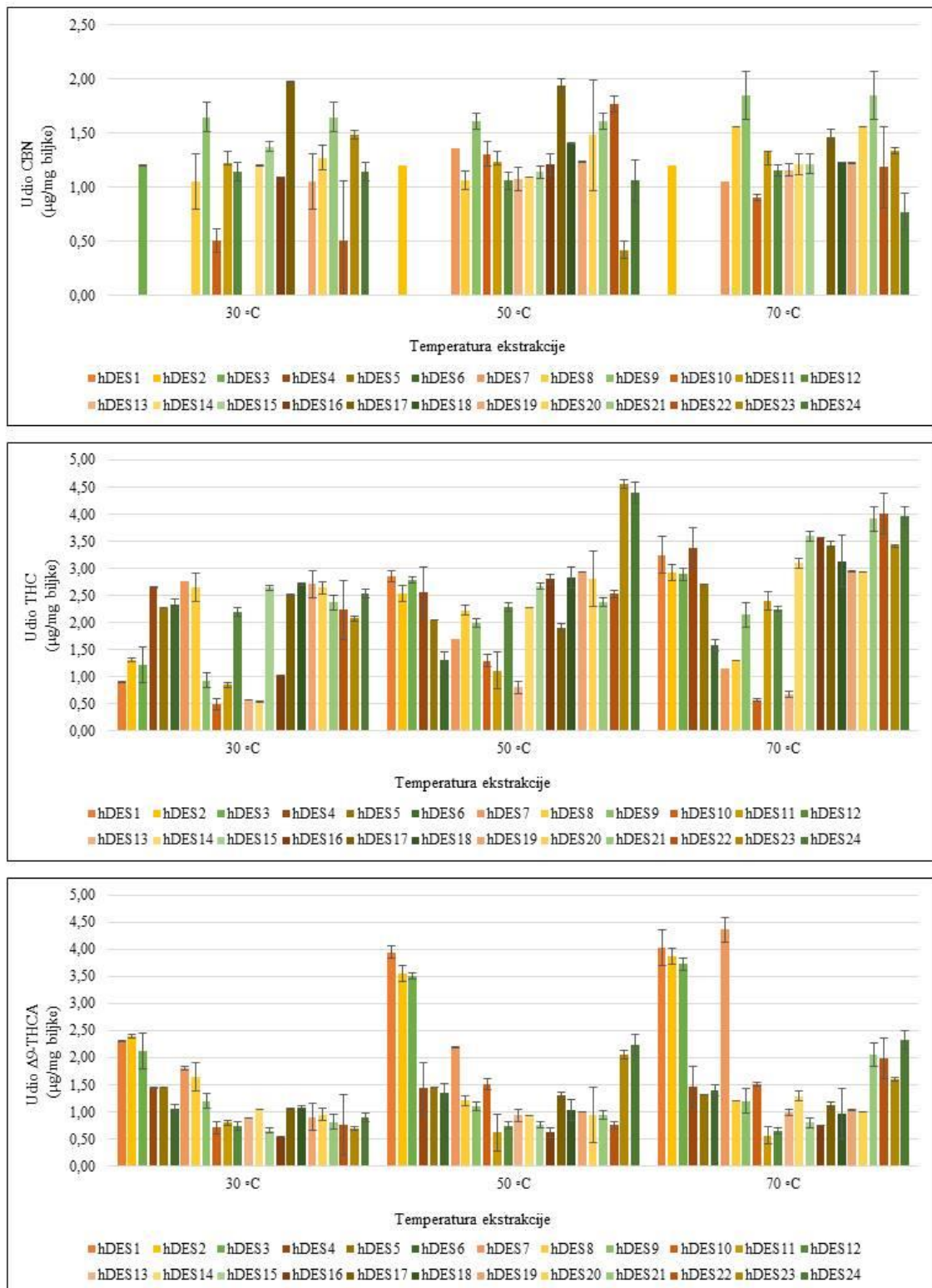
Slika 23. Prikaz udjela sinapinske kiseline ekstrahirane iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



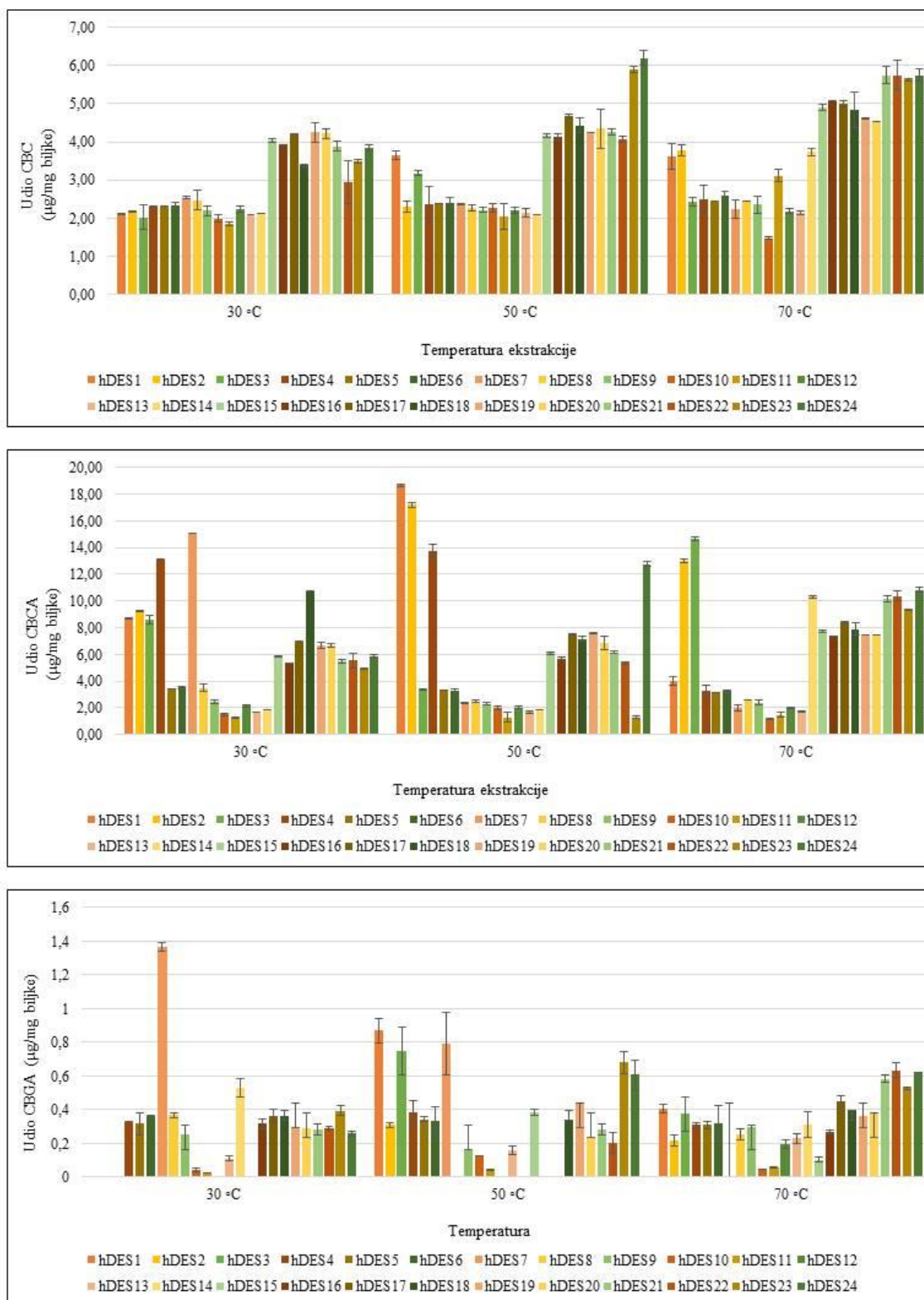
Slika 24. Prikaz rutina ekstrahiranog iz koprive primjenom različitih DES-ova i DES-ova s 10, 30 i 50 % vode



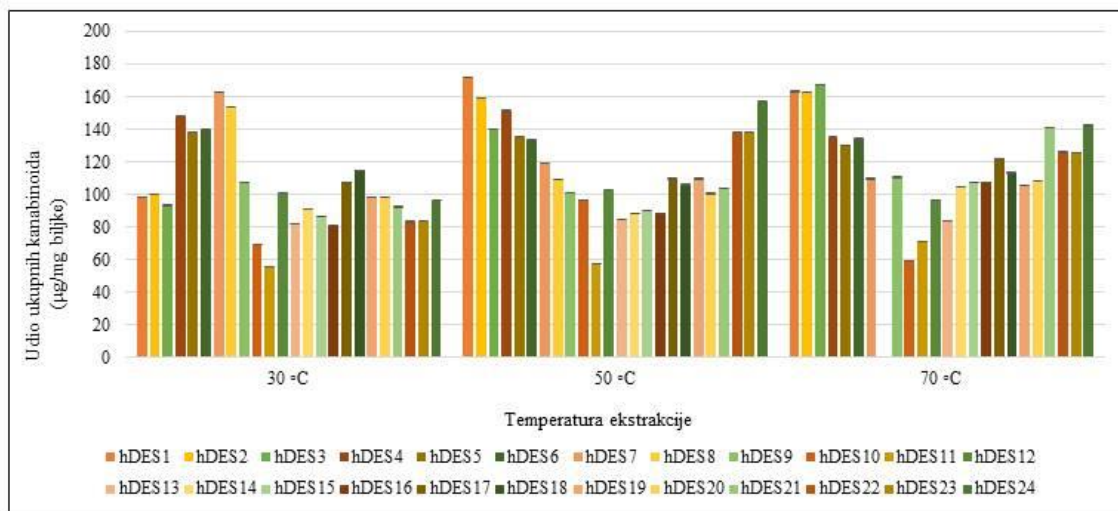
Slika 25. Prikaz CBD, CBDA i CBG ekstrahiranog iz industrijske konoplje primjenom različitih hDES-ova



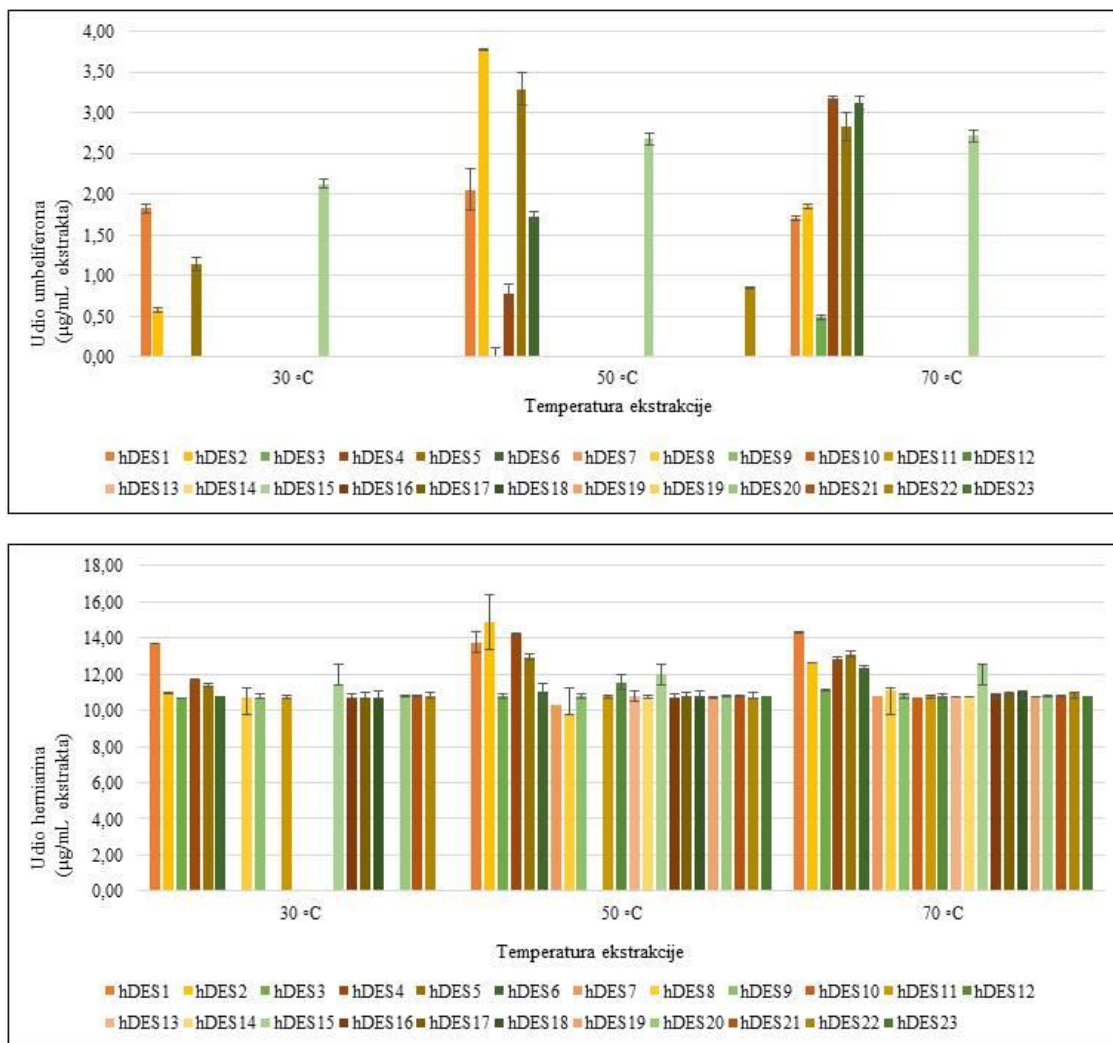
Slika 26. Prikaz CBN, THC i THCA ekstrahiranog iz industrijske konoplje primjenom različitih hDES-ova



Slika 27. Prikaz CBC, CBCA i CBGA ekstrahiranog iz industrijske konoplje primjenom različitih hDES-ova



Slika 28. Prikaz ukupnih kanabinoida ekstrahiranih iz industrijske konoplje primjenom različitih hDES-ova



Slika 29. Prikaz umbeliferona i herniarina ekstrahiranog primjenom različitih hDES-ova

4.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara DES-ova na ekstrahirane udjele bioaktivnih komponenti

Tablica 10. Prikaz korelacija između viskoznosti, polarnosti i pH DES-ova i hDES-ova

	Karnosolna kiselina	Karnosol	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Klorogenska kiselina		Kofeinska kiselina	Neoklogens ka kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Rutin	
Viskoznost	-0,0333	-0,3140	-0,1991	-0,6214	-0,5009	-0,4126		-0,2971	-0,2123	-0,3860	-0,1903	-0,5035	
	Karnosolna kiselina	Karnosol	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Klorogenska kiselina		Kofeinska kiselina	Neoklogens ka kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Rutin	
Polarnost	0,0519	0,4053	0,0289	0,1169	0,3871	-0,1734		-0,5900	-0,2407	-0,0620	-0,2447	-0,3976	
	Karnosolna kiselina	Karnosol	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Klorogenska kiselina		Kofeinska kiselina	Neoklogens ka kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Rutin	
pH	-0,3333	0,1063	0,1197	0,3692	0,6576	-0,0756		-0,4265	-0,2573	0,0929	-0,1124	-0,2411	
	CBD	CBDA	CBG	CBGA	CBN	THC	THCA	THCVA	CBCA	CBC	CBDVA	Umbeliferon	Herniarin
Viskoznost	0,1659	-0,5724	-0,0315	-0,3193	0,2591	-0,3744	-0,5649	-0,1223	-0,4149	-0,2340	-0,4725	-0,4239	-0,5249

*podebljane vrijednosti pokazuju korelaciju uz $p \leq 0,05$

4.4. Optimizacija procesnih parametara za tehnike ekstrakcije primjenom DES-ova

Tablica 11. Eksperimentalno određeni udjeli karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje dobiveni ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Karnosolna kiselina (µg/mg)	Karnosol (µg/mg)
1	30	60	50	3,86	1,99
2	10	90	50	14,43	4,83
3	10	60	70	10,16	3,90
4	30	60	50	4,53	2,27
5	30	60	50	5,16	2,70
6	10	30	50	8,71	2,10
7	30	30	70	5,64	2,51
8	50	90	50	3,16	1,34
9	30	90	70	7,41	4,79
10	10	60	30	10,68	2,35
11	50	60	70	3,87	1,85
12	50	30	50	2,68	0,81
13	30	60	50	5,65	1,99
14	50	60	30	2,55	0,89
15	30	60	50	5,44	1,79
16	30	90	30	5,27	1,70
17	30	30	30	5,37	1,50

Tablica 12. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za karnosolnu kiselinu i karnosol prilikom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Izvor varijabilnosti	SS	df	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Karnosolna kiselina</i>				
Model	157,64	9	20,22	0,0003*
X ₁	4,93	1	145,19	0,0001*
X ₂	-3,97	1	8,95	0,0202*
X ₃	0,98	1	1,49	0,2619
X ₁ X ₂	0,40	1	12,51	0,0095*

Izvor varijabilnosti	SS	df	F-vrijednost	p-vrijednost
X1X3	1,60	1	2,46	0,1608
X2X3	0,71	1	0,39	0,5530
X ₁ ²	0,28	1	7,94	0,0259*
X ₂ ²	-1,31	1	0,98	0,3562
X ₃ ²	0,46	1	1,00	0,3495
Ostatak	6,06	7		0,0003*
Nedostatak modela	3,92	3	2,44	0,2042
Pogreška	2,14	4		
Ukupno	163,70	16		

R²= 0,9630

Karnosol

Model	22,28	9	19,04	0,0004*
X ₁	2,15	1	70,76	0,0001*
X ₂	-1,07	1	31,74	0,0008*
X ₃	0,72	1	45,54	0,0003*
X ₁ X ₂	0,86	1	0,28	0,6146
X ₁ X ₃	-0,093	1	1,52	0,2580
X ₂ X ₃	0,22	1	2,26	0,1768
X ₁ ²	0,26	1	9,34	0,0184*
X ₂ ²	-0,55	1	1,48	0,2630
X ₃ ²	-0,22	1	8,34	0,0234*
Ostatak	22,28	7		
Nedostatak modela	0,91	3	1,09	0,4491
Pogreška	0,41	4		
Ukupno	0,50	16		

R²= 0,9607

*X₁ – udio vode; X₂ – vrijeme ekstrakcije; X₃ - temperatura ekstrakcije *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz p ≤ 0,05.

Tablica 13. Eksperimentalno određeni udjeli karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje dobiveni UAE

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Karnosolna kiselina (µg/mg)	Karnosol (µg/mg)
1	30	60	50	7,37	3,06
2	10	90	50	9,94	3,92

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Karnosolna kiselina (µg/mg)	Karnosol (µg/mg)
3	10	60	70	14,00	4,18
4	30	60	50	4,18	2,22
5	30	60	50	5,04	2,46
6	10	30	50	8,48	3,34
7	30	30	70	1,62	0,70
8	50	90	50	2,09	0,84
9	30	90	70	8,06	2,93
10	10	60	30	2,66	0,83
11	50	60	70	3,69	1,85
12	50	30	50	2,00	0,82
13	30	60	50	4,37	2,25
14	50	60	30	1,94	0,92
15	30	60	50	2,46	1,27
16	30	90	30	2,80	1,22
17	30	30	30	2,18	0,56

Tablica 14. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za karnosolnu kiselinu i karnosol prilikom UAE

Izvor varijabilnosti	SS	df	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Karnosolna kiselina</i>				
Model	171,12	9	5,03	0,0224*
X ₁	-3,17	1	21,24	0,0025*
X ₂	1,08	1	2,45	0,1617
X ₃	2,22	1	10,45	0,0144*
X ₁ X ₂	1,39	1	2,14	0,1871
X ₁ X ₃	-0,52	1	0,30	0,6019
X ₂ X ₃	-0,57	1	0,37	0,5645
X ₁ ²	-0,34	1	0,12	0,7349
X ₂ ²	-2,39	1	6,06	0,0433*
X ₃ ²	1,46	1	2,24	0,1780
Ostatak	171,12	7	19,01	
Nedostatak modela	26,48	3	3,78	0,3444
Pogreška	13,99	4	4,66	
Ukupno	12,49	16	3,12	

Izvor varijabilnosti	SS	df	F-vrijednost	p-vrijednost
$R^2=0,8660$				
<i>Karnosol</i>				
Model	18,29	9	3,18	0,0708
Ostatak	4,48	7	0,64	
Nedostatak modela	2,81	3	2,24	0,2256
Pogreška	1,67	4		
Ukupno	22,77	16		

* X_1 – udio vode; X_2 – vrijeme ekstrakcije; X_3 - temperatura ekstrakcije *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 15. Eksperimentalno određeni udjeli karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje dobiveni MCE

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Brzina okretaja kuglica (m/s)	Karnosolna kiselina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Karnosol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	30	3	1	3,50	1,25
2	30	2	3	3,38	1,23
3	50	3	3	2,51	0,86
4	50	1	3	2,01	0,71
5	50	2	5	2,98	1,03
6	10	3	3	4,29	1,16
7	50	2	1	1,80	0,57
8	10	2	1	3,37	1,02
9	10	1	3	4,06	1,04
10	30	1	5	4,69	1,27
11	30	2	3	3,31	1,01
12	10	2	5	8,26	1,87
13	30	2	3	3,63	1,14
14	30	2	3	3,45	1,09
15	30	1	1	2,45	0,79
16	30	2	3	3,41	0,98
17	30	3	5	7,92	2,02

Tablica 16. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za karnosolnu kiselinu i karnosol prilikom MCE

Izvor varijabilnosti	SS	df	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Karnosolna kiselina</i>				
Model	47,49	9	13,17	0,0013*
X_1	-1,34	1	35,66	0,006*
X_2	0,63	1	7,82	0,0266*
X_3	1,59	1	50,46	0,0002*
X_1X_2	-0,38	1	1,50	0,2608
X_1X_3	0,16	1	0,27	0,6209
X_2X_3	1,05	1	11,49	0,0116*
X_1^2	0,066	1	0,043	0,8409
X_2^2	-0,93	1	8,56	0,0221*
X_3^2	0,54	1	2,95	0,1294
Ostatak	47,49	7	13,17	0,0013*
Nedostatak modela	2,81	3		
Pogreška	2,75	4	64,44	0,008*
Ukupno	0,057	16		
$R^2 = 0,9442$				
<i>Karnosol</i>				
Model	1,93	9	7,26	0,0080*
X_1	1,09	1	15,65	0,0055*
X_2	-0,24	1	9,28	0,0187*
X_3	0,19	1	27,85	0,0012*
X_1X_2	0,32	1	4,61	0,0690
X_1X_3	-0,18	1	0,12	0,7436
X_2X_3	0,029	1	6,33	0,0401*
X_1^2	0,21	1	5,511x10 ⁻³	0,9429
X_2^2	6,381x10 ⁻³	1	1,26	0,2988
X_3^2	-0,096	1	0,74	0,4189
Ostatak	1,93	7	7,26	0,0080
Nedostatak modela	0,21	3		
Pogreška	0,17	4	1,92	0,2966
Ukupno	0,042	16		
$R^2 = 0,9032$				

* X_1 – udio vode; X_2 – vrijeme ekstrakcije; X_3 - brzina okretaja kuglica *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 17. Optimalni uvjeti ekstrakcije karnosolne kiseline i karnosola u ovisnosti o željenim varijablama

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Optimalni parametri	10 % vode 90 minuta 70 °C	11,05 % vode 82,36 minuta 69, 84 °C	11,13 % vode 2,90 minuta 4,98 m/s
Pretpostavljeni udio karnosolne kiseline (µg/mg biljke)	14,20	14,72	8,95
Pretpostavljeni udio karnosola (µg/mg biljke)	6,47	-	2,02
Poželjnost modela	0,99	1,00	1,00
Određen udio karnosolne kiseline (µg/mg biljke)	13,73±0,26	14,24±0,21	8,90±0,10
Određen udio karnosola (µg/mg biljke)	6,15±0,33	14,24±0,21	2,03±0,04

Tablica 18. Eksperimentalno određeni udjeli galne kiseline, elaginske kiseline i HT u ekstraktima vrkute dobiveni ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µg TAE/mg)
1	30	60	50	1,11	10,75	171,73
2	10	90	50	0,94	10,57	178,86
3	10	60	70	0,00	0,74	69,59
4	30	60	50	1,49	10,33	180,06
5	30	60	50	0,97	9,94	165,66
6	10	30	50	0,97	12,76	178,33
7	30	30	70	1,10	11,69	181,26
8	50	90	50	0,58	4,98	96,19
9	30	90	70	1,00	10,67	177,79
10	10	60	30	0,62	7,64	146,53

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µg TAE/mg)
11	50	60	70	0,91	10,46	178,86
12	50	30	50	0,48	7,03	135,13
13	30	60	50	1,03	11,43	178,06
14	50	60	30	0,00	1,04	32,06
15	30	60	50	0,93	9,59	147,86
16	30	90	30	1,89	10,20	166,26
17	30	30	30	0,90	6,01	140,99

Tablica 19. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i HT prilikom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Galna kiselina</i>					
Model	3,12	9	0,3470	8,18	0,0056*
X_1	1,34	1	1,34	31,68	0,0008*
X_2	0,0098	1	0,0098	0,2309	0,6455
X_3	0,0000	1	0,0000	0,0012	0,9736
X_1X_2	0,1444	1	0,1444	3,40	0,1076
X_1X_3	0,9604	1	0,9604	22,63	0,0021*
X_2X_3	0,2025	1	0,2025	4,77	0,0652
X_1^2	0,0547	1	0,0547	1,29	0,2936
X_2^2	0,3764	1	0,3764	8,87	0,0206*
X_3^2	0,0049	1	0,0049	0,1147	0,7448
Ostatak	0,2971	7	0,0424		
Nedostatak modela	0,0741	3	0,0247	0,4426	0,7355
Pogreška	0,2231	4	0,0558		
Ukupno	3,42	16			
$R^2 = 0,9131$					
<i>Elaginska kiselina</i>					
Model	191,87	9	21,32	6,72	0,0100*
X_1	27,08	1	27,08	8,54	0,0223*
X_2	4,96	1	4,96	1,56	0,2513
X_3	16,30	1	16,30	5,14	0,0578
X_1X_2	14,86	1	14,86	4,68	0,0672

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_1X_3	63,28	1	63,28	19,95	0,0029*
X_2X_3	20,30	1	20,30	6,40	0,0393*
X_1^2	22,78	1	22,78	7,18	0,0316*
X_2^2	10,39	1	10,39	3,27	0,1133
X_3^2	7,51	1	7,51	2,37	0,1677
Ostatak	22,21	7	3,17		
nedostatak modela	18,23	3	6,08	6,11	0,0565
Pogreška	3,98	4	0,9950		
Ukupno	214,08	16			
$R^2= 0,8963$					
<i>HT</i>					
Model	28,766,77	9	3196,31	20,79	0,0003*
X_1	5947,59	1	5947,59	38,68	0,0004*
X_2	792,22	1	792,22	5,15	0,0575
X_3	4519,15	1	4519,15	29,39	0,0010*
X_1X_2	1722,67	1	1722,67	11,20	0,0123
X_1X_3	7356,49	1	7356,49	47,84	0,0002*
X_2X_3	22,237,29	1	22,237,29	14,55	0,0066*
X_1^2	2454,50	1	2454,50	15,96	0,0052*
X_2^2	854,31	1	854,31	5,56	0,0506
X_3^2	2268,57	1	2268,57	14,75	0,0064*
Ostatak	1076,42	7	153,77		
Nedostatak modela	893,18	3	297,73	6,50	0,0511
Pogreška	183,24	4	45,81		
Ukupno	29,843,19	16			
$R^2= 0,9639$					

* X_1 – udio vode; X_2 – vrijeme ekstrakcije; X_3 - temperatura ekstrakcije *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 20. Eksperimentalno određeni udjeli galne kiseline, elaginske kiseline i HT u ekstraktima vrkute dobiveni UAE

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µg TAE/mg)
1	30	60	50	1,01	7,89	130,26
2	10	90	50	0,91	4,92	90,59

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µg TAE/mg)
3	10	60	70	0,00	0,39	18,53
4	30	60	50	0,95	5,30	102,06
5	30	60	50	1,05	8,21	136,39
6	10	30	50	0,00	9,46	66,59
7	30	30	70	1,06	5,54	106,73
8	50	90	50	0,24	2,31	50,73
9	30	90	70	0,97	6,03	109,93
10	10	60	30	0,00	1,91	38,79
11	50	60	70	0,91	5,32	107,33
12	50	30	50	0,00	10,87	37,53
13	30	60	50	0,00	8,19	78,53
14	50	60	30	0,00	0,08	14,73
15	30	60	50	0,44	3,15	64,93
16	30	90	30	1,14	7,99	132,99
17	30	30	30	0,90	6,01	140,99

Tablica 21. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i HT prilikom UAE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Galna kiselina</i>					
Model	3,64	9	0,4048	17,30	0,0005*
X ₁	1,28	1	1,28	54,71	0,0001*
X ₂	0,0072	1	0,0072	0,3077	0,5963
X ₃	0,4141	1	0,4141	17,70	0,0040*
X ₁ X ₂	0,0004	1	0,004	0,0171	0,8996
X ₁ X ₃	0,3249	1	0,3249	13,89	0,0074*
X ₂ X ₃	0,0100	1	0,0100	0,4274	0,5341
X ₁ ²	0,1038	1	0,1038	4,44	0,0732*
X ₂ ²	0,3115	1	0,3115	13,31	0,0082*
X ₃ ²	1,06	1	1,06	45,35	0,0003*
Ostatak	0,1638	7	0,0234		
Nedostatak modela	0,1355	3	0,0452	6,38	0,0527
Pogreška	0,0283	4	0,0071		

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Ukupno	3,81	16			
$R^2 = 0,9570$					
<i>Elaginska kiselina</i>					
X_1	149,79	9	16,64	9,31	0,0038*
X_2	49,60	1	49,60	27,74	0,0012*
X_3	3,59	1	3,59	2,01	0,1993
X_1X_2	64,18	1	64,18	35,90	0,0005*
X_1X_3	0,3600	1	0,3600	0,2014	0,6672
X_2X_3	23,52	1	23,52	13,16	0,0084*
X_1^2	0,8464	1	0,8464	0,4734	0,5136
X_2^2	0,2345	1	0,2345	0,1312	0,7279
X_3^2	0,6940	1	0,6940	0,3882	0,5530
Ostatak	7,05	1	7,05		
Nedostatak modela	1,79	7	1,79		
Pogreška	3,43	3	3,43	6,21	0,0550
Ukupno	0,5531	4	0,5531		
$R^2 = 0,9229$					
<i>HT</i>					
Model	23803,68	9	2644,85	7,02	0,0088*
X^1	11536,05	1	11,536,05	30,62	0,0009*
X^2	0,0210	1	0,0210	0,0001	0,9942
X^3	179,93	1	179,93	0,4776	0,5118
X_1X_2	49,91	1	49,91	0,1325	0,7266
X_1X_3	5045,26	1	5045,26	13,39	0,0081*
X_2X_3	761,76	1	761,76	2,02	0,1960
X_1^2	356,01	1	356,01	0,9451	0,3634
X_2^2	1016,84	1	1016,84	2,70	0,1444
X_3^2	4381,32	1	4381,32	11,63	0,0113*
Ostatak	2636,92	7	37670		
Nedostatak modela	2190,64	3	730,21	6,54	0,0506
Pogreška	446,29	4	111,57		
Ukupno	26440,60	16			
$R^2 = 0,9003$					

* X_1 – udio vode; X_2 – vrijeme ekstrakcije; X_3 - temperatura ekstrakcije *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 22. Eksperimentalno određeni udjeli galne kiseline, elaginske kiseline i HT u ekstraktima vrkute dobiveni MCE

Broj eksperimenta	Udio vode (%)	Vrijeme (min)	Brzina okretaja kuglica (m/s)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µg TAE/mg)
1	30	3	1	0,43	3,42	72,26
2	30	2	3	0,00	0,39	21,59
3	50	3	3	0,46	3,89	65,19
4	50	1	3	0,00	0,00	3,06
5	50	2	5	1,02	7,07	115,26
6	10	3	3	0,50	4,05	106,79
7	50	2	1	0,43	3,42	73,73
8	10	2	1	0,41	3,24	70,73
9	10	1	3	0,48	2,19	72,19
10	30	1	5	0,22	0,67	35,26
11	30	2	3	0,00	1,66	36,73
12	10	2	5	0,00	0,14	22,73
13	30	2	3	0,63	5,68	103,79
14	30	2	3	0,87	5,38	105,06
15	30	1	1	0,47	1,44	36,99
16	30	2	3	0,36	2,14	50,39
17	30	3	5	0,84	0,84	103,79

Tablica 23. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i HT prilikom MCE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Galna kiselina</i>					
Model	1,53	9	0,1695	56,24	<0,0001*
X ₁	1,28	1	1,28	424,64	<0,0001*
X ₂	0,0072	1	0,0072	2,39	0,1661
X ₃	0,1512	1	0,1512	50,18	0,0002*
X ₁ X ₂	0,0002	1	0,0002	0,0746	0,796
X ₁ X ₃	0,0756	1	0,0756	25,09	0,0015*
X ₂ X ₃	0,0000	1	0,0000	0,0083	0,9300
X ₁ ²	0,0048	1	0,0048	1,59	0,2476
X ₂ ²	0,0019	1	0,0019	0,6308	0,4532

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_3^2	0,0048	1	0,0048	1,59	0,2476
Ostatak	0,0211	7	0,0030		
Nedostatak modela	0,0173	3	0,0058	6,07	0,0570
Pogreška	0,0038	4	0,0009		
Ukupno	1,55	16			
$R^2 = 0,9864$					
<i>Elaginska kiselina</i>					
X_1	68,29	9	7,59	13,12	0,0013*
X_2	36,42	1	36,42	62,97	<0,0001*
X_3	1,39	1	1,39	2,41	0,1644
X_1X_2	25,24	1	25,24	43,64	0,0003*
X_1X_3	0,0169	1	0,0169	0,0292	0,8691
X_2X_3	3,94	1	3,94	6,81	0,0349*
X_1^2	0,0064	1	0,0064	0,0111	0,9192
X_2^2	1,06	1	1,06	1,84	0,2175
X_3^2	0,0343	1	0,0343	0,0593	0,8146
Ostatak	0,1476	1	0,1476	0,2553	0,6289
Nedostatak modela	4,05	7	0,5784		
Pogreška	2,46	3	0,8197	2,06	0,2478
Ukupno	1,59	4	0,3974		
$R^2 = 0,9440$					
<i>HT</i>					
Model	18998,68	9	2110,96	31,06	<0,0001*
X_1	9590,43	1	9590,43	141,10	<0,0001*
X_2	15,10	1	15,10	0,2221	0,6518
X_3	7088,83	1	7088,83	104,30	<0,0001*
X_1X_2	0,0042	1	0,0042	0,0001	0,9939
X_1X_3	497,29	1	497,29	7,32	0,0304*
X_2X_3	71,06	1	71,06	1,05	0,3406
X_1^2	1266,92	1	1266,92	18,64	0,0035*
X_2^2	342,48	1	342,48	5,04	0,0597
X_3^2	165,20	1	165,20	2,43	0,1630
Ostatak	475,78	7	67,97		
nedostatak modela	395,57	3	131,86	6,58	0,0502
Pogreška	80,20	4	20,05		

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Ukupno	19474,45	16			
$R^2 = 0,9756$					

* X_1 – udio vode; X_2 – vrijeme ekstrakcije; X_3 - brzina okretaja kuglica *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 24. Optimalni uvjeti ekstrakcije galne kiseline, elaginske kiseline i HT u ovisnosti o željenim varijablama

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Optimalni parametri	50% H ₂ O 68,2 min 30 °C	50% H ₂ O 56,6 min 30 °C	49.5% H ₂ O 1,41 min 4,99 m/s
Pretpostavljeni udio galne kiseline (µg/mg biljke)	1,84	1,18	1,03
Pretpostavljeni udio elaginske kiseline (µg/mg biljke)	12,08	8,39	7,18
Pretpostavljeni udio HT (µgTAE/mg biljke)	178,015	141,18	127,99
Poželjnost modela	0,965	0,917	1,000
Određen udio galne kiseline (µg/mg biljke)	1,91 ± 0,04	1,19 ± 0,01	1,04 ± 0,00
Određen udio elaginske kiseline (µg/mg biljke)	12,21 ± 0,09	8,18 ± 0,07	7,10 ± 0,12
Određen udio HT (µgTAE/mg biljke)	169,07 ± 3,42	143,24 ± 2,24	132,26 ± 1,89

Tablica 25. Eksperimentalno određeni udjeli fenolnih kiselina i rutina u ekstraktima koprive dobiveni ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem

Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Udio vode (%)	Klorogenska kiselina (µg/mg)	Kofeinska kiselina (µg/mg)	Neoklorogenska kiselina (µg TAE/mg)	Kafeoil-jabučna kiselina (µg/mg)	Cikorinska kiselina (µg/mg)	Sinapinska kiselina (µg/mg)	Rutin (µg/mg)
1	60	50	30	1,87	0,25	0,14	7,71	0,20	0,15	1,18
2	60	70	10	1,93	0,28	0,18	7,39	0,19	0,13	1,16
3	60	30	10	1,07	0,12	0,10	5,33	0,17	0,00	0,31
4	60	70	50	2,23	0,15	0,22	8,20	0,19	0,11	0,78
5	60	50	30	1,94	0,20	0,15	7,46	0,21	0,16	1,17
6	60	50	30	2,04	0,24	0,14	7,61	0,23	0,17	1,00
7	90	50	10	0,03	0,15	0,12	5,54	0,22	0,10	0,61
8	30	50	10	1,62	0,19	0,11	6,40	0,22	0,17	0,74
9	60	50	30	1,95	0,21	0,16	7,61	0,23	0,19	1,04
10	30	50	50	1,91	0,05	0,15	6,78	0,27	0,24	0,94
11	90	70	30	2,21	0,31	0,22	8,25	0,18	0,12	0,85
12	30	70	30	2,18	0,34	0,17	7,98	0,22	0,13	1,30
13	90	30	30	2,13	0,24	0,15	7,62	0,19	0,20	0,76
14	90	50	50	2,28	0,28	0,18	8,26	0,22	0,20	0,89
15	30	30	30	2,18	0,31	0,15	7,84	0,22	0,18	1,08
16	60	50	30	1,92	0,22	0,15	8,14	0,18	0,11	1,21
17	60	30	50	1,98	0,17	0,15	8,10	0,22	0,19	1,11

Tablica 26. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za fenolne kiseline i rutin prilikom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Klorogenska kiselina</i>					
Model	4,27	9	0,4740	6,04	0,0135*
X_1	1,76	1	1,76	22,41	0,0021*
X_2	0,1770	1	0,1770	2,26	0,1767
X_3	0,1922	1	0,1922	2,45	0,1615
X_1X_2	0,0930	1	0,0930	1,19	0,3122
X_1X_3	0,9604	1	0,9604	12,24	0,0100*
X_2X_3	0,0016	1	0,0016	0,0204	0,8905
X_1^2	0,7722	1	0,7722	9,85	0,0164*
X_2^2	0,3462	1	0,3462	4,41	0,0738
X_3^2	0,0131	1	0,0131	0,1668	0,6951
Ostatak	0,5490	7	0,0784		
Nedostatak modela	0,5337	3	0,1779	46,45	0,0014*
Pogreška	0,0153	4	0,0038		
Ukupno	4,82	16			
$R^2 = 0,8860$					
<i>Kofeinska kiselina</i>					
Model	0,0790	9	0,0088	4,71	0,0266*
X_1	0,0010	1	0,0010	0,5433	0,4850
X_2	0,0072	1	0,0072	3,86	0,0901
X_3	0,0010	1	0,0010	0,5433	0,4850
X_1X_2	0,0081	1	0,0081	4,35	0,0755
X_1X_3	0,0182	1	0,0182	9,78	0,0167*
X_2X_3	0,0004	1	0,0004	0,2146	0,6572
X_1^2	0,0328	1	0,0328	17,60	0,0041*
X_2^2	0,0082	1	0,0082	4,42	0,0735
X_3^2	0,0042	1	0,0042	2,28	0,1750
Ostatak	0,0130	7	0,0019		
Nedostatak modela	0,0113	3	0,0038	8,78	0,0311*
Pogreška	0,0017	4	0,0004		
Ukupno	0,0920	16			
$R^2 = 0,8583$					

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Neoklorogenska kiselina</i>					
Model	0,0161	9	0,0018	16,55	0,0006*
X ₁	0,0045	1	0,0045	41,84	0,0003*
X ₂	0,0072	1	0,0072	66,75	< 0,0001*
X ₃	0,0010	1	0,0010	9,39	0,0182*
X ₁ X ₂	0,0000	1	0,0000	0,2318	0,6449
X ₁ X ₃	0,0001	1	0,0001	0,9272	0,3677
X ₂ X ₃	0,0006	1	0,0006	5,79	0,0470*
X ₁ ²	0,0003	1	0,0003	3,16	0,1186
X ₂ ²	0,0023	1	0,0023	21,56	0,0024*
X ₃ ²	4,211E-06	1	4,211E-06	0,0390	0,8490
Ostatak	0,0008	7	0,0001		
Nedostatak modela	0,0005	3	0,0002	2,26	0,2234
Pogreška	0,0003	4	0,0001		
Ukupno	0,0168	16			
$R^2 = 0,9551$					
<i>Kafeoil-jabučna kiselina</i>					
Model	12,45	9	1,38	16,74	0,0006*
X ₁	5,58	1	5,58	67,52	< 0,0001*
X ₂	1,07	1	1,07	12,99	0,0087*
X ₃	0,0561	1	0,0561	0,6793	0,4370
X ₁ X ₂	0,9604	1	0,9604	11,63	0,0113*
X ₁ X ₃	1,37	1	1,37	16,57	0,0047*
X ₂ X ₃	0,0600	1	0,0600	0,7266	0,4222
X ₁ ²	2,79	1	2,79	33,79	0,0007*
X ₂ ²	0,5556	1	0,5556	6,73	0,0358*
X ₃ ²	0,0907	1	0,0907	1,10	0,3296
Ostatak	0,5782	7	0,0826		
Nedostatak modela	0,3109	3	0,1036	1,55	0,3323
Pogreška	0,2673	4	0,0668		
Ukupno	13,02	16			
$R^2 = 0,9556$					
<i>Cikorinska kiselina</i>					
Model	0,0078	9	0,0009	3,30	0,0649
X ₁	0,0012	1	0,0012	4,73	0,0661

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_2	0,0000	1	0,0000	0,1892	0,6767
X_3	0,0018	1	0,0018	6,81	0,0349*
X_1X_2	0,0006	1	0,0006	2,36	0,1680
X_1X_3	0,0006	1	0,0006	2,36	0,1680
X_2X_3	0,0000	1	0,0000	0,0946	0,7674
X_1^2	0,0002	1	0,0002	0,6223	0,4561
X_2^2	0,0024	1	0,0024	8,99	0,0200*
X_3^2	0,0011	1	0,0011	4,21	0,0794
Ostatak	0,0019	7	0,0003		
Nedostatak modela	0,0000	3	0,0000	0,0370	0,9891
Pogreška	0,0018	4	0,0005		
Ukupno	0,0097	16			
$R^2=0,8092$					
<i>Sinapinska kiselina</i>					
Model	0,0386	9	0,0043	3,21	0,0693
X_1	0,0145	1	0,0145	10,80	0,0134*
X_2	0,0008	1	0,0008	0,5977	0,4648
X_3	0,0013	1	0,0013	0,9338	0,3661
X_1X_2	0,0110	1	0,0110	8,24	0,0240*
X_1X_3	0,0002	1	0,0002	0,1681	0,6941
X_2X_3	0,0002	1	0,0002	0,1681	0,6941
X_1^2	0,0009	1	0,0009	0,6387	0,4504
X_2^2	0,0049	1	0,0049	3,69	0,0962
X_3^2	0,0054	1	0,0054	4,02	0,0850
Ostatak	0,0094	7	0,0013		
Nedostatak modela	0,0058	3	0,0019	2,22	0,2287
Pogreška	0,0035	4	0,0009		
Ukupno	0,0480	16			
$R^2= 0,8048$					
<i>Rutin</i>					
Model	0,9521	9	0,1058	8,77	0,0046*
X_1	0,1013	1	0,1013	8,39	0,0231*
X_2	0,0861	1	0,0861	7,14	0,0319*
X_3	0,1128	1	0,1128	9,35	0,0184*
X_1X_2	0,3481	1	0,3481	28,85	0,0010*

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_1X_3	0,0016	1	0,0016	0,1326	0,7265
X_2X_3	0,0042	1	0,0042	0,3501	0,5727
X_1^2	0,2451	1	0,2451	20,31	0,0028*
X_2^2	0,0063	1	0,0063	0,5239	0,4927
X_3^2	0,0295	1	0,0295	2,45	0,1617
Ostatak	0,0845	7	0,0121		
Nedostatak modela	0,0495	3	0,0165	1,88	0,2732
Pogreška	0,0350	4	0,0087		
Ukupno	1,04	16			

$R^2 = 0,9185$

* X_1 – vrijeme ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; X_3 – udio vode *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 27. Eksperimentalno određeni udjeli fenolnih kiselina i rutina u ekstraktima koprive dobiveni primjenom UAE

Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Udio vode (%)	Klorogenska kiselina (µg/mg)	Kofeinska kiselina (µg/mg)	Neoklorogenska kiselina (µg TAE/mg)	Kafeoil-jabučna kiselina (µg/mg)	Cikorinska kiselina (µg/mg)	Sinapinska kiselina (µg/mg)	Rutin (µg/mg)
1	60	50	30	1,63	0,19	0,13	6,47	0,26	0,15	0,62
2	60	70	10	1,98	0,26	0,16	8,20	0,19	0,10	0,66
3	60	30	10	2,09	0,18	0,12	6,82	0,18	0,11	0,49
4	60	70	50	0,55	0,05	0,06	4,00	0,21	0,11	0,00
5	60	50	30	1,30	0,19	0,15	5,54	0,25	0,09	0,71
6	60	50	30	1,14	0,25	0,12	6,96	0,21	0,19	0,58
7	90	50	10	2,01	0,19	0,14	7,54	0,23	0,31	0,72
8	30	50	10	1,45	0,18	0,12	6,21	0,24	0,17	0,48
9	60	50	30	1,58	0,22	0,14	6,86	0,18	0,16	0,64
10	30	50	50	0,75	0,06	0,07	4,41	0,21	0,06	0,20
11	90	70	30	0,99	0,14	0,09	5,20	0,23	0,13	0,33
12	30	70	30	2,05	0,25	0,14	7,48	0,25	0,09	0,79
13	90	30	30	1,71	0,22	0,13	6,33	0,22	0,20	0,49
14	90	50	50	0,65	0,05	0,06	3,99	0,21	0,00	0,00
15	30	30	30	1,45	0,17	0,11	6,40	0,22	0,14	0,46
16	60	50	30	2,22	0,28	0,14	7,78	0,17	0,28	0,91
17	60	30	50	1,63	0,18	0,14	6,20	0,19	0,29	0,96

Tablica 28. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za fenolne kiseline i rutina prilikom UAE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Klorogenska kiselina</i>					
Model	1,64	9	0,1826	2,15	0,1629
X_1	0,4465	1	0,4465	5,25	0,0557*
X_2	0,0221	1	0,0221	0,2593	0,6262
X_3	0,2415	1	0,2415	2,84	0,1358
X_1X_2	0,0000	1	0,0000	0,0000	1,0000
X_1X_3	0,0870	1	0,0870	1,02	0,3454
X_2X_3	0,0361	1	0,0361	0,4246	0,5355
X_1^2	0,0251	1	0,0251	0,2955	0,6036
X_2^2	0,5929	1	0,5929	6,97	0,0334*
X_3^2	0,1731	1	0,1731	2,04	0,1967
Ostatak	0,5952	7	0,0850		
Nedostatak modela	0,1515	3	0,0505	0,4552	0,7280
Pogreška	0,4437	4	0,1109		
Ukupno	2,24	16			
$R^2 = 0,7342$					
<i>Kofeinska kiselina</i>					
Model	0,0398	9	0,0044	2,11	0,1692
X_1	0,0045	1	0,0045	2,15	0,1860
X_2	0,0021	1	0,0021	1,01	0,3492
X_3	0,0018	1	0,0018	0,8574	0,3853
X_1X_2	0,0001	1	0,0001	0,0476	0,8335
X_1X_3	0,0020	1	0,0020	0,9646	0,3587
X_2X_3	0,0030	1	0,0030	1,44	0,2690
X_1^2	0,0004	1	0,0004	0,1810	0,6833
X_2^2	0,0130	1	0,0130	6,18	0,0419*
X_3^2	0,0118	1	0,0118	5,63	0,0493*
Ostatak	0,0147	7	0,0021		
Nedostatak modela	0,0134	3	0,0045	13,51	0,0147*
Pogreška	0,0013	4	0,0003		
Ukupno	0,0545	16			
$R^2 = 0,7303$					

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Neoklorogenska kiselina</i>					
Model	0,0209	9	0,0023	2,83	0,0920
X ₁	0,0001	1	0,0001	0,1368	0,7224
X ₂	0,0055	1	0,0055	6,71	0,0360*
X ₃	0,0032	1	0,0032	3,89	0,0891
X ₁ X ₂	0,0016	1	0,0016	1,95	0,2057
X ₁ X ₃	0,0000	1	0,0000	0,0304	0,8665
X ₂ X ₃	0,0020	1	0,0020	2,46	0,1605
X ₁ ²	0,0014	1	0,0014	1,75	0,2271
X ₂ ²	0,0056	1	0,0056	6,82	0,0348*
X ₃ ²	0,0015	1	0,0015	1,85	0,2161
Ostatak	0,0058	7	0,0008		
Nedostatak modela	0,0055	3	0,0018	26,07	0,0044*
Pogreška	0,0003	4	0,0001		
Ukupno	0,0267	16			
R ² = 0,7844					
<i>Kafeoil-jabučna kiselina</i>					
Model	13,84	9	1,54	11,85	0,0018*
X ₁	6,79	1	6,79	52,31	0,0002*
X ₂	0,0578	1	0,0578	0,4453	0,5259
X ₃	0,9045	1	0,9045	6,97	0,0334*
X ₁ X ₂	1,33	1	1,33	10,28	0,0149*
X ₁ X ₃	0,7569	1	0,7569	5,83	0,0464*
X ₂ X ₃	0,1640	1	0,1640	1,26	0,2980
X ₁ ²	3,79	1	3,79	29,22	0,0010*
X ₂ ²	0,0001	1	0,0001	0,0004	0,9847
X ₃ ²	0,0064	1	0,0064	0,0493	0,8306
Ostatak	0,9086	7	0,1298		
Nedostatak modela	0,5327	3	0,1776	1,89	0,2725
Pogreška	0,3759	4	0,0940		
Ukupno	14,75	16			
R ² = 0,9384					
<i>Cikorinska kiselina</i>					
Model	0,0025	9	0,0003	0,5045	0,8327
X ₁	0,0008	1	0,0008	1,46	0,2656

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_2	0,0000	1	0,0000	0,0229	0,8840
X_3	0,0000	1	0,0000	0,0229	0,8840
X_1X_2	0,0001	1	0,0001	0,1830	0,6817
X_1X_3	0,0004	1	0,0004	0,7320	0,4205
X_2X_3	0,0000	1	0,0000	0,0458	0,8367
X_1^2	0,0003	1	0,0003	0,5900	0,4676
X_2^2	0,0002	1	0,0002	0,3010	0,6003
X_3^2	0,0005	1	0,0005	0,9752	0,3563
Ostatak	0,0038	7	0,0005		
Nedostatak modela	0,0006	3	0,0002	0,2604	0,8511
Pogreška	0,0032	4	0,0008		
Ukupno	0,0063	16			
$R^2= 0,3934$					
<i>Sinapinska kiselina</i>					
Model	0,0638	9	0,0071	27,51	0,0001*
X_1	0,0001	1	0,0001	0,4363	0,5300
X_2	0,0171	1	0,0171	66,36	< 0.0001*
X_3	0,0098	1	0,0098	38,01	0,0005*
X_1X_2	0,0240	1	0,0240	93,17	< 0.0001*
X_1X_3	0,0016	1	0,0016	6,20	0,0415*
X_2X_3	0,0004	1	0,0004	1,55	0,2530
X_1^2	0,0068	1	0,0068	26,45	0,0013*
X_2^2	0,0001	1	0,0001	0,4501	0,5238
X_3^2	0,0044	1	0,0044	16,98	0,0045*
Ostatak	0,0018	7	0,0003		
Nedostatak modela	0,0011	3	0,0004	2,21	0,2299
Pogreška	0,0007	4	0,0002		
Ukupno	0,0656	16			
$R^2= 0,9725$					
<i>Rutin</i>					
Model	1,17	9	0,1295	14,91	0,0009*
X_1	0,3433	9	0,0381	5,51	0,0175*
X_2	0,0561	1	0,0561	8,10	0,0248*
X_3	0,1225	1	0,1225	17,69	0,0040*
X_1X_2	0,0013	1	0,0013	0,1805	0,6837

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_1X_3	0,0182	1	0,0182	2,63	0,1488
X_2X_3	0,0016	1	0,0016	0,2310	0,6454
X_1^2	0,0169	1	0,0169	2,44	0,1622
X_2^2	0,0932	1	0,0932	13,45	0,0080
X_3^2	0,0005	1	0,0005	0,0770	0,7895
Ostatak	0,0278	1	0,0278	4,01	0,0852
Nedostatak modela	0,0485	7	0,0069		
Pogreška	0,0345	3	0,0115	3,28	0,1404
Ukupno	0,0140	4	0,0035		

$R^2 = 0,8765$

* X_1 – vrijeme ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; X_3 – udio vode *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 29. Eksperimentalno određeni udjeli fenolnih kiselina i rutina u ekstraktima koprive dobiveni primjenom MCE

Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Brzina okretaja (m/s)	Udio vode (%)	Klorogenska kiselina (µg/mg)	Kofeinska kiselina (µg/mg)	Neoklorogenska kiselina (µg TAE/mg)	Kafeoil-jabučna kiselina (µg/mg)	Cikorinska kiselina (µg/mg)	Sinapinska kiselina (µg/mg)	Rutin (µg/mg)
1	3	3	30	1,63	0,19	0,13	6,47	0,26	0,15	0,62
2	1	3	50	1,98	0,26	0,16	8,20	0,19	0,10	0,66
3	1	1	30	2,09	0,18	0,12	6,82	0,18	0,11	0,49
4	1	3	10	0,55	0,05	0,06	4,00	0,21	0,11	0,00
5	3	1	50	1,30	0,19	0,15	5,54	0,25	0,09	0,71
6	5	1	30	1,14	0,25	0,12	6,96	0,21	0,19	0,58
7	5	5	30	2,01	0,19	0,14	7,54	0,23	0,31	0,72
8	3	3	30	1,45	0,18	0,12	6,21	0,24	0,17	0,48
9	3	3	30	1,58	0,22	0,14	6,86	0,18	0,16	0,64
10	5	3	10	0,75	0,06	0,07	4,41	0,21	0,06	0,20
11	3	5	10	0,99	0,14	0,09	5,20	0,23	0,13	0,33
12	1	5	30	2,05	0,25	0,14	7,48	0,25	0,09	0,79
13	3	3	30	1,71	0,22	0,13	6,33	0,22	0,20	0,49
14	3	1	10	0,65	0,05	0,06	3,99	0,21	0,00	0,00
15	3	3	30	1,45	0,17	0,11	6,40	0,22	0,14	0,46
16	3	5	50	2,22	0,28	0,14	7,78	0,17	0,28	0,91
17	5	3	50	1,63	0,18	0,14	6,20	0,19	0,29	0,96

Tablica 30. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za fenolne kiseline i rutin prilikom MCE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Klorogenska kiselina</i>					
Model	4,17	9	0,4637	17,42	0,0005*
X_1	2,19	1	2,19	82,44	< 0.0001*
X_2	0,1624	1	0,1624	6,10	0,0428*
X_3	0,5460	1	0,5460	20,51	0,0027*
X_1X_2	0,0756	1	0,0756	2,84	0,1358
X_1X_3	0,0841	1	0,0841	3,16	0,1187
X_2X_3	0,2070	1	0,2070	7,78	0,0270*
X_1^2	0,7949	1	0,7949	29,86	0,0009*
X_2^2	0,0404	1	0,0404	1,52	0,2576
X_3^2	0,1085	1	0,1085	4,07	0,0833
Ostatak	0,1863	7	0,0266		
Nedostatak modela	0,1344	3	0,0448	3,45	0,1312
Pogreška	0,0519	4	0,0130		
Ukupno	4,36	16			
$R^2 = 0,9573$					
<i>Kofeinska kiselina</i>					
Model	0,0728	9	0,0081	8,27	0,0055*
X_1	0,0465	1	0,0465	47,57	0,0002*
X_2	0,0005	1	0,0005	0,4602	0,5193
X_3	0,0045	1	0,0045	4,61	0,0688*
X_1X_2	0,0020	1	0,0020	2,07	0,1933
X_1X_3	0,0000	1	0,0000	0,0000	1,0000
X_2X_3	0,0042	1	0,0042	4,32	0,0762
X_1^2	0,0130	1	0,0130	13,26	0,0083*
X_2^2	0,0000	1	0,0000	0,0388	0,8495
X_3^2	0,0025	1	0,0025	2,58	0,1519
Ostatak	0,0068	7	0,0010		
Nedostatak modela	0,0047	3	0,0016	2,97	0,1600
Pogreška	0,0021	4	0,0005		
Ukupno	0,0796	16			
$R^2 = 0,9140$					
<i>Neoklorogenska kiselina</i>					

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0147	9	0,0016	16,43	0,0006
X ₁	0,0120	1	0,0120	120,99	< 0.0001
X ₂	0,0000	1	0,0000	0,1259	0,7332
X ₃	0,0005	1	0,0005	4,53	0,0708
X ₁ X ₂	0,0002	1	0,0002	2,27	0,1759
X ₁ X ₃	0,0004	1	0,0004	4,03	0,0847
X ₂ X ₃	0,0000	1	0,0000	0,0000	1.0000
X ₁ ²	0,0016	1	0,0016	15,71	0,0054*
X ₂ ²	2,368E-06	1	2,368E-06	0,0239	0,8816
X ₃ ²	0,0000	1	0,0000	0,4479	0,5248
Ostatak	0,0007	7	0,0001		
Nedostatak modela	0,0002	3	0,0001	0,4487	0,7318
Pogreška	0,0005	4	0,0001		
Ukupno	0,0154	16			
<i>R</i> ² = 0,9548					
<i>Kafeoil-jabučna kiselina</i>					
Model	24,08	9	2,68	11,10	0,0022*
X ₁	12,80	1	12,80	53,14	0,0002*
X ₂	0,2415	1	0,2415	1,00	0,3501
X ₃	2,75	1	2,75	11,41	0,0118*
X ₁ X ₂	1,45	1	1,45	6,03	0,0438*
X ₁ X ₃	0,2652	1	0,2652	1,10	0,3289
X ₂ X ₃	0,0016	1	0,0016	0,0066	0,9373
X ₁ ²	5,69	1	5,69	23,60	0,0018*
X ₂ ²	0,7095	1	0,7095	2,95	0,1298
X ₃ ²	0,4739	1	0,4739	1,97	0,2035
Ostatak	1,69	7	0,2409		
Nedostatak modela	1,44	3	0,4812	7,92	0,0370*
Pogreška	0,2429	4	0,0607		
Ukupno	25,76	16			
<i>R</i> ² =0,9345					
<i>Cikorinska kiselina</i>					
Model	0,0050	9	0,0006	0,6116	0,7588
X ₁	0,0004	1	0,0004	0,4926	0,5054
X ₂	0,0000	1	0,0000	0,0137	0,9102

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_3	0,0001	1	0,0001	0,1231	0,7360
X_1X_2	0,0000	1	0,0000	0,0000	1,0000
X_1X_3	0,0025	1	0,0025	2,74	0,1421
X_2X_3	0,0006	1	0,0006	0,6841	0,4355
X_1^2	0,0007	1	0,0007	0,8091	0,3983
X_2^2	0,0005	1	0,0005	0,5326	0,4892
X_3^2	0,0001	1	0,0001	0,0832	0,7813
Ostatak	0,0064	7	0,0009		
Nedostatak modela	0,0029	3	0,0010	1,09	0,4497
Pogreška	0,0035	4	0,0009		
Ukupno	0,0114	16			
$R^2= 0,4402$					
<i>Sinapinska kiselina</i>					
Model	0,0992	9	0,0110	6,76	0,0098*
X_1	0,0265	1	0,0265	16,21	0,0050*
X_2	0,0242	1	0,0242	14,83	0,0063*
X_3	0,0221	1	0,0221	13,52	0,0079*
X_1X_2	0,0144	1	0,0144	8,83	0,0208*
X_1X_3	0,0009	1	0,0009	0,5517	0,4818
X_2X_3	0,0049	1	0,0049	3,00	0,1267
X_1^2	0,0058	1	0,0058	3,53	0,1022
X_2^2	0,0007	1	0,0007	0,4362	0,5301
X_3^2	0,0000	1	0,0000	0,0103	0,9219
Ostatak	0,0114	7	0,0016		
Nedostatak modela	0,0093	3	0,0031	5,85	0,0605
Pogreška	0,0021	4	0,0005		
Ukupno	0,1106	16			
$R^2= 0,8968$					
<i>Rutin</i>					
Model	1,17	9	0,1295	14,91	0,0009*
X_1	0,9180	1	0,9180	105,68	< 0,0001*
X_2	0,0338	1	0,0338	3,89	0,0891
X_3	0,1176	1	0,1176	13,54	0,0079*
X_1X_2	0,0025	1	0,0025	0,2878	0,6082
X_1X_3	0,0042	1	0,0042	0,4864	0,5080

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
X_2X_3	0,0064	1	0,0064	0,7368	0,4191
X_1^2	0,0609	1	0,0609	7,01	0,0331
X_2^2	0,0058	1	0,0058	0,6726	0,4392
X_3^2	0,0205	1	0,0205	2,36	0,1685
Ostatak	0,0608	7	0,0087		
Nedostatak modela	0,0319	3	0,0106	1,47	0,3485
Pogreška	0,0289	4	0,0072		
Ukupno	1,23	16			
$R^2 = 0,9504$					

* X_1 – vrijeme ekstrakcije; X_2 – brzina okretaja kuglica; X_3 – udio vode *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 31. Optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih kiselina i rutina u ovisnosti o željenim varijablama

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Optimalni parametri	26,21 % H ₂ O 30 min 69,99 °C	34 % H ₂ O 90 min 70 °C	44,99 % H ₂ O 3,88 min 5 m/s
Pretpostavljeni udio klorogenske kiseline (µg/mg biljke)	-	2,40 µg/mg	2,25 µg/mg
Pretpostavljeni udio kofeinske kiseline (µg/mg biljke)	0,24	0,33	0,34
Pretpostavljeni udio neoklorogenske kiseline (µg/mg biljke)	0,14	0,18	0,25
Pretpostavljeni udio kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg biljke)	7,66	8,10	7,90
Pretpostavljeni udio cikorinske kiseline (µg/mg biljke)	0,19	0,22	0,23

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Pretpostavljeni udio sinapinske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,31	0,17	0,19
Pretpostavljeni udio rutina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,92	1,28	1,07
Poželjnost modela	0,933	0,873	0,917
Određen udio klorogenske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	2,19 \pm 0,02	2,53 \pm 0,14	2,37 \pm 0,04
Određen udio kofeinske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,26 \pm 0,01	0,32 \pm 0,00	0,26 \pm 0,00
Određen udio neoklorogenske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,19 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02
Određen udio kafeoil-jabučne kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	7,88 \pm 0,11	7,73 \pm 0,16	7,65 \pm 0,06
Određen udio cikorinske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,20 \pm 0,00	0,18 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
Određen udio sinapinske kiseline ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,20 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
Određen udio rutina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke)	0,87 \pm 0,01	0,89 \pm 0,08	0,88 \pm 0,02

Tablica 32. Eksperimentalno određeni udjeli kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje dobiveni primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	Δ9-THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	THCVA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)
1	50,00	60,00	20,30	80,07	3,38	0,00	1,44	3,01	0,87	0,00	8,83	5,15
2	21,72	60,00	34,04	102,23	4,22	0,00	2,14	3,70	1,18	0,00	11,23	7,04
3	50,00	60,00	20,00	73,61	3,64	0,00	1,40	2,88	0,81	0,00	8,28	4,96
4	50,00	60,00	20,79	73,15	3,43	0,00	1,78	2,78	0,85	0,00	8,00	5,05
5	50,00	102,43	20,10	79,18	3,39	0,00	1,47	2,81	0,85	0,00	8,97	5,87
6	50,00	60,00	20,27	77,04	3,77	0,00	1,23	3,00	0,86	0,00	8,90	5,01
7	50,00	17,57	20,00	76,66	3,34	0,00	1,79	3,01	0,86	0,00	8,95	5,12
8	30,00	30,00	16,46	54,60	0,00	0,00	0,00	2,30	0,66	0,00	5,98	4,33
9	50,00	60,00	20,09	76,28	3,14	0,00	1,64	2,98	0,93	0,00	8,04	5,97
10	70,00	90,00	26,95	86,28	0,57	0,11	1,97	4,84	1,13	0,01	10,00	7,22
11	30,00	90,00	21,85	78,86	3,59	0,00	1,94	3,28	0,89	0,00	9,57	5,31
12	78,28	60,00	47,38	131,25	6,06	0,21	2,45	5,67	1,44	0,08	15,29	9,43
13	70,00	30,00	23,36	88,85	0,00	0,07	1,67	4,44	1,02	0,01	9,29	5,72

Tablica 33. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za kanabinoide prilikom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>CBD</i>					
Model	667,07	5	133,41	6,17	0,0167*
X_1	119,09	1	119,09	5,51	0,0513*
X_2	10,40	1	10,40	0,4811	0,5103
X_3	0,8100	1	0,8100	0,0375	0,8520
X_1X_2	462,49	1	462,49	21,39	0,0024*
X_1^2	32,95	1	32,95	1,52	0,2569
X_2^2	151,33	7	21,62		
Ostatak	150,96	3	50,32	537,31	< 0,0001*
Nedostatak modela	0,3746	4	0,0936		
Pogreška	818,40	12			
Ukupno	667,07	5	133,41	6,17	0,0167*
$R^2 = 0,8151$					
<i>CBDA</i>					
Model	3008,37	5	601,67	4,75	0,0327*
X_1	855,13	1	855,13	6,75	0,0356*
X_2	79,72	1	79,72	0,6289	0,4538
X_1X_2	179,96	1	179,96	1,42	0,2723
X_1^2	1630,45	1	1630,45	12,86	0,0089*
X_2^2	116,97	1	116,97	0,9228	0,3687
Ostatak	887,34	7	126,76		
Nedostatak modela	855,79	3	285,26	36,16	0,0023*
Pogreška	31,55	4	7,89		
Ukupno	3895,72	12			
$R^2 = 0,7722$					
<i>CBG</i>					
Model	13,75	5	2,75	2,85	0,1025
X_1	6,16	1	6,16	6,38	0,0395*
X_2	2,61	1	2,61	2,70	0,1441
X_1X_2	1,80	1	1,80	1,86	0,2150
X_1^2	1,71	1	1,71	1,77	0,2250
X_2^2	1,07	1	1,07	1,10	0,3282
Ostatak	6,76	7	0,9659		

REZULTATI

Nedostatak modela	6,52	3	2,17	36,63	0,0023
Pogreška	0,2375	4	0,0594		
Ukupno	20,52	12			
$R^2 = 0,6704$					

CBN

Model	2,19	5	0,4372	1,58	0,2799
X_1	0,5716	1	0,5716	2,07	0,1935
X_2	0,3994	1	0,3994	1,45	0,2683
X_1X_2	0,6724	1	0,6724	2,43	0,1627
X_1^2	0,4581	1	0,4581	1,66	0,2388
X_2^2	0,0400	1	0,0400	0,1450	0,7147
Ostatak	1,93	7	0,2763		
Nedostatak modela	1,75	3	0,5831	12,64	0,0165
Pogreška	0,1845	4	0,0461		
Ukupno	4,12	12			
$R^2 = 0,5306$					

$\Delta 9$ -THC

Model	10,74	5	2,15	29,94	0,0001*
X_1	5,26	1	5,26	73,26	< 0,0001*
X_2	0,1505	1	0,1505	2,10	0,1909
X_1X_2	0,0841	1	0,0841	1,17	0,3149
X_1^2	5,11	1	5,11	71,16	< 0,0001*
X_2^2	0,0065	1	0,0065	0,0909	0,7718
Ostatak	0,5025	7	0,0718		
Nedostatak modela	0,4637	3	0,1546	15,93	0,0109*
Pogreška	0,0388	4	0,0097		
Ukupno	11,25	12			
$R^2 = 0,9553$					

THCA

Model	0,4010	5	0,0802	7,06	0,0117*
X_1	0,1171	1	0,1171	10,30	0,0149*
X_2	0,0133	1	0,0133	1,17	0,3157
X_1X_2	0,0036	1	0,0036	0,3168	0,5911
X_1^2	0,2346	1	0,2346	20,64	0,0027*
X_2^2	0,0134	1	0,0134	1,18	0,3137
Ostatak	0,0796	7	0,0114		

REZULTATI

Nedostatak modela	0,0720	3	0,0240	12,77	0,0162*
Pogreška	0,0075	4	0,0019		
Ukupno	0,4806	12			
$R^2 = 0,8345$					

CBCA

Model	41,07	5	8,21	3,82	0,0546
X_1	11,24	1	11,24	5,23	0,0561
X_2	2,34	1	2,34	1,09	0,3312
X_1X_2	2,07	1	2,07	0,9651	0,3586
X_1^2	23,17	1	23,17	10,78	0,0134*
X_2^2	0,7348	1	0,7348	0,3420	0,5770
Ostatak	15,04	7	2,15		
Nedostatak modela	14,30	3	4,77	25,82	0,0044*
Pogreška	0,7384	4	0,1846		
Ukupno	56,11	12			
$R^2 = 0,7319$					

CBC

Model	17,97	5	3,59	6,39	0,0153*
X_1	5,58	1	5,58	9,92	0,0162*
X_2	1,57	1	1,57	2,79	0,1390
X_1X_2	0,0676	1	0,0676	0,1202	0,7390
X_1^2	9,99	1	9,99	17,77	0,0040*
X_2^2	0,2046	1	0,2046	0,3638	0,5654
Ostatak	3,94	7	0,5624		
Nedostatak modela	3,23	3	1,08	6,08	0,0568
Pogreška	0,7077	4	0,1769		
Ukupno	21,90	12			
$R^2 = 0,8202$					

* X_1 – temperatura ekstrakcije; X_2 – vrijeme ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 34. Eksperimentalno određeni udjeli kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje dobiveni primjenom UAE

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	Δ9-THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	THCVA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)
1	50,00	60,00	21,50	77,14	3,85	0,00	1,74	2,99	0,96	0,00	8,46	5,21
2	21,72	60,00	27,64	97,30	4,66	0,14	2,19	4,15	1,25	0,00	11,37	6,53
3	50,00	60,00	21,71	73,61	3,93	0,00	1,65	3,36	0,84	0,00	8,26	6,11
4	50,00	60,00	22,28	76,90	3,87	0,00	1,68	3,24	0,94	0,00	9,10	5,37
5	50,00	102,43	21,99	76,78	3,60	0,00	1,40	3,14	0,81	0,00	8,24	5,13
6	50,00	60,00	21,94	77,04	3,22	0,00	1,57	3,34	0,88	0,00	9,20	5,39
7	50,00	17,57	20,17	73,87	2,85	0,02	1,90	2,68	0,82	0,00	8,38	5,88
8	30,00	30,00	25,39	72,32	4,07	0,11	1,87	3,15	0,77	0,01	8,44	5,20
9	50,00	60,00	20,98	82,56	3,37	0,00	1,43	3,14	0,90	0,00	8,51	5,11
10	70,00	90,00	31,39	93,89	4,09	0,07	2,14	3,57	1,05	0,01	10,00	5,88
11	30,00	90,00	21,47	82,63	3,49	0,04	1,99	3,17	0,93	0,00	8,41	6,13
12	78,28	60,00	31,45	99,48	4,27	0,13	0,99	4,10	1,43	0,01	8,42	6,93
13	70,00	30,00	24,19	85,88	3,95	0,00	1,87	4,18	1,08	0,00	9,65	6,83

Tablica 35. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za kanabionoide prilikom UAE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>CBD</i>					
Model	175,68	5	35,14	95,41	< 0,0001*
X_1	24,88	1	24,88	67,56	< 0,0001*
X_2	4,28	1	4,28	11,63	0,0113*
X_3	30,91	1	30,91	83,94	< 0,0001*
X_1X_2	111,63	1	111,63	303,13	< 0,0001*
X_1^2	0,3573	1	0,3573	0,9702	0,3575
X_2^2	2,58	7	0,3683		
Ostatak	1,63	3	0,5423	2,28	0,2212
nedostatak modela	0,9509	4	0,2377		
Pogreška	178,26	12			
Ukupno	175,68	5	35,14	95,41	< 0,0001*
$R^2= 0,9855$					
<i>CBDA</i>					
Model	881,66	5	176,33	8,46	0,0070*
X_1	97,32	1	97,32	4,67	0,0675
X_2	62,92	1	62,92	3,02	0,1259
X_1X_2	1,32	1	1,32	0,0635	0,8084
X_1^2	651,25	1	651,25	31,25	0,0008*
X_2^2	23,99	1	23,99	1,15	0,3190
Ostatak	145,90	7	20,84		
Nedostatak modela	104,48	3	34,83	3,36	0,1360
Pogreška	41,42	4	10,36		
Ukupno	1027,56	12			
$R^2= 0,8580$					
<i>CBG</i>					
Model	1,87	5	0,3742	3,08	0,0874
X_1	0,0006	1	0,0006	0,0053	0,9442
X_2	0,0482	1	0,0482	0,3963	0,5490
X_1X_2	0,1296	1	0,1296	1,07	0,3361
X_1^2	1,24	1	1,24	10,21	0,0152*
X_2^2	0,2720	1	0,2720	2,24	0,1783
Ostatak	0,8506	7	0,1215		

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Nedostatak modela	0,4206	3	0,1402	1,30	0,3887
Pogreška	0,4301	4	0,1075		
Ukupno	2,72	12			
$R^2 = 0,6875$					
<i>CBN</i>					
Model	0,4204	5	0,0841	0,6720	0,6580
X_1	0,2992	1	0,2992	2,39	0,1659
X_2	0,0126	1	0,0126	0,1005	0,7605
X_1X_2	0,0056	1	0,0056	0,0450	0,8381
X_1^2	0,0390	1	0,0390	0,3117	0,5940
X_2^2	0,0765	1	0,0765	0,6116	0,4598
Ostatak	0,8757	7	0,1251		
Nedostatak modela	0,8184	3	0,2728	19,04	0,0079*
Pogreška	0,0573	4	0,0143		
Ukupno	1,30	12			
$R^2 = 0,3243$					
Δ^9 -THC					
Model	2,09	5	0,4181	5,16	0,0266*
X_1	0,2310	1	0,2310	2,85	0,1353
X_2	0,0005	1	0,0005	0,0057	0,9422
X_1X_2	0,0992	1	0,0992	1,22	0,3051
X_1^2	1,44	1	1,44	17,81	0,0039*
X_2^2	0,1607	1	0,1607	1,98	0,2019
Ostatak	0,5674	7	0,0811		
Nedostatak modela	0,4739	3	0,1580	6,76	0,0480*
Pogreška	0,0935	4	0,0234		
Ukupno	2,66	12			
$R^2 = 0,7865$					
<i>THCA</i>					
Model	0,3845	5	0,0769	12,13	0,0024*
X_1	0,0586	1	0,0586	9,24	0,0188*
X_2	0,0017	1	0,0017	0,2647	0,6227
X_1X_2	0,0090	1	0,0090	1,42	0,2716
X_1^2	0,2459	1	0,2459	38,79	0,0004*
X_2^2	0,0386	1	0,0386	6,09	0,0429

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Ostatak	0,0444	7	0,0063		
Nedostatak modela	0,0352	3	0,0117	5,15	0,0736
Pogreška	0,0091	4	0,0023		
Ukupno	0,4289	12			
$R^2 = 0,8966$					
<i>CBCA</i>					
Model	7,66	5	1,53	2,38	0,1442
X_1	2,39	1	2,39	3,72	0,0952
X_2	1,04	1	1,04	1,61	0,2449
X_1X_2	1,72	1	1,72	2,67	0,1462
X_1^2	1,18	1	1,18	1,84	0,2167
X_2^2	1,00	1	1,00	1,56	0,2515
Ostatak	4,50	7	0,6425		
Nedostatak modela	3,80	3	1,27	7,27	0,0426*
Pogreška	0,6971	4	0,1743		
Ukupno	12,15	12			
$R^2 = 0,6299$					
<i>CBC</i>					
Model	4,21	5	0,8416	6,85	0,0126*
X_1	0,4732	1	0,4732	3,85	0,0904
X_2	0,1460	1	0,1460	1,19	0,3116
X_1X_2	0,8836	1	0,8836	7,20	0,0314*
X_1^2	2,67	1	2,67	21,72	0,0023*
X_2^2	0,0003	1	0,0003	0,0025	0,9616
Ostatak	0,8595	7	0,1228		
Nedostatak modela	0,2414	3	0,0805	0,5207	0,6906
Pogreška	0,6181	4	0,1545		
Ukupno	5,07	12			
$R^2 = 0,8304$					

* X_1 – temperatura ekstrakcije; X_2 – vrijeme ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 36. Eksperimentalno određeni udjeli kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje dobiveni primjenom MCE

Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Brzina okretaja kuglica (m/s)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	Δ9-THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	THCVA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)
1	3,00	1,60	27,08	101,76	4,54	0,05	2,24	3,82	1,19	0,00	11,67	6,03
2	0,59	3,00	27,69	74,90	3,35	0,00	1,47	3,39	0,93	0,00	8,71	5,23
3	2,00	3,00	21,96	74,27	3,66	0,00	1,74	3,44	0,86	0,00	8,55	5,28
4	3,00	4,40	21,37	73,15	3,64	0,00	1,42	2,98	0,90	0,00	8,56	5,85
5	1,00	1,60	20,23	75,36	3,72	0,00	2,29	2,94	0,82	0,00	8,17	4,92
6	2,00	4,98	17,66	59,33	3,10	0,00	0,90	2,55	0,64	0,00	7,25	5,32
7	1,00	4,40	20,25	70,47	3,72	0,00	1,37	3,03	0,78	0,00	9,31	5,86
8	2,00	3,00	18,86	72,46	3,46	0,00	1,48	2,91	0,85	0,00	8,25	5,75
9	3,41	3,00	26,08	91,97	4,37	0,00	2,08	4,03	1,14	0,00	10,95	6,07
10	2,00	3,00	18,67	66,14	2,99	0,00	1,26	3,38	0,74	0,00	8,20	5,43
11	2,00	3,00	22,08	73,47	3,69	0,00	1,51	3,27	0,94	0,00	8,25	5,31
12	2,00	1,02	24,75	70,17	1,24	0,00	1,33	3,83	0,90	0,00	7,93	5,05
13	2,00	3,00	21,91	72,47	3,91	0,00	1,35	3,63	0,90	0,00	8,94	5,22

Tablica 37. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za kanabionoide prilikom MCE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>CBD</i>					
Model	103,88	5	20,78	4,40	0,0394*
X_1	6,31	1	6,31	1,34	0,2856
X_2	30,88	1	30,88	6,54	0,0377*
X_3	8,21	1	8,21	1,74	0,2290
X_1X_2	55,67	1	55,67	11,78	0,0109*
X_1^2	0,4743	1	0,4743	0,1004	0,7606
X_2^2	33,07	7	4,72		
Ostatak	20,61	3	6,87	2,21	0,2300
Nedostatak modela	12,46	4	3,12		
Pogreška	136,95	12			
Ukupno	103,88	5	20,78	4,40	0,0394*
$R^2 = 0,7585$					
<i>CBDA</i>					
Model	354,05	1	354,05	15,46	0,0057*
X_1	298,05	1	298,05	13,01	0,0087*
X_2	140,66	1	140,66	6,14	0,0423*
X_1X_2	376,79	1	376,79	16,45	0,0048*
X_1^2	27,35	1	27,35	1,19	0,3107
X_2^2	160,36	7	22,91		
Ostatak	118,56	3	39,52	3,78	0,1157
Nedostatak modela	41,80	4	10,45		
Pogreška	1391,20	12			
Ukupno	1230,84	5	246,17	10,75	0,0035
$R^2 = 0,8847$					
<i>CBG</i>					
Model	4,13	5	0,8264	1,37	0,3402
X_1	0,1748	1	0,1748	0,2893	0,6074
X_2	0,0667	1	0,0667	0,1104	0,7494
X_1X_2	0,9025	1	0,9025	1,49	0,2612
X_1^2	0,7079	1	0,7079	1,17	0,3150
X_2^2	1,92	1	1,92	3,19	0,1175
Ostatak	4,23	7	0,6043		

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Nedostatak modela	3,75	3	1,25	10,35	0,0235
Pogreška	0,4827	4	0,1207		
Ukupno	8,36	12			
$R^2 = 0,4941$					
<i>CBN</i>					
Model	1,31	5	0,2617	2,68	0,1153
X_1	0,0930	1	0,0930	0,9538	0,3613
X_2	0,6892	1	0,6892	7,07	0,0325*
X_1X_2	0,0025	1	0,0025	0,0256	0,8773
X_1^2	0,4339	1	0,4339	4,45	0,0729
X_2^2	0,0448	1	0,0448	0,4594	0,5197
Ostatak	0,6827	7	0,0975		
Nedostatak modela	0,5496	3	0,1832	5,51	0,0664
Pogreška	0,1331	4	0,0333		
Ukupno	1,99	12			
$R^2 = 0,6572$					
Δ^9 -THC					
Model	1,68	5	0,3365	4,22	0,0434*
X_1	0,3763	1	0,3763	4,72	0,0664
X_2	0,8193	1	0,8193	10,27	0,0150*
X_1X_2	0,2162	1	0,2162	2,71	0,1437
X_1^2	0,1133	1	0,1133	1,42	0,2721
X_2^2	0,1219	1	0,1219	1,53	0,2562
Ostatak	0,5583	7	0,0798		
Nedostatak modela	0,2738	3	0,0913	1,28	0,3940
Pogreška	0,2845	4	0,0711		
Ukupno	2,24	12			
$R^2 = 0,7508$					
THCA					
Model	0,2333	5	0,0467	11,62	0,0028*
X_1	0,0774	1	0,0774	19,28	0,0032*
X_2	0,0608	1	0,0608	15,15	0,0060*
X_1X_2	0,0156	1	0,0156	3,89	0,0892
X_1^2	0,0608	1	0,0608	15,14	0,0060*
X_2^2	0,0106	1	0,0106	2,63	0,1486

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Ostatak	0,0281	7	0,0040		
Nedostatak modela	0,0056	3	0,0019	0,3342	0,8027
Pogreška	0,0225	4	0,0056		
Ukupno	0,2614	12			
$R^2 = 0,8924$					
<i>CBCA</i>					
Model	16,21	5	3,24	14,45	0,0014*
X_1	4,38	1	4,38	19,51	0,0031*
X_2	1,07	1	1,07	4,79	0,0648
X_1X_2	4,52	1	4,52	20,13	0,0028*
X_1^2	5,33	1	5,33	23,76	0,0018*
X_2^2	0,4163	1	0,4163	1,86	0,2153
Ostatak	1,57	7	0,2243		
Nedostatak modela	1,18	3	0,3928	4,01	0,1065
Pogreška	0,3919	4	0,0980		
Ukupno	17,78	12			
$R^2 = 0,9117$					
<i>CBC</i>					
Model	1,41	5	0,2821	6,18	0,0167*
X_1	0,6543	1	0,6543	14,33	0,0068*
X_2	0,1630	1	0,1630	3,57	0,1008
X_1X_2	0,3136	1	0,3136	6,87	0,0344*
X_1^2	0,2455	1	0,2455	5,38	0,0535
X_2^2	0,0139	1	0,0139	0,3034	0,5989
Ostatak	0,3196	7	0,0457		
Nedostatak modela	0,1414	3	0,0471	1,06	0,4599
Pogreška	0,1783	4	0,0446		
Ukupno	1,73	12			
$R^2 = 0,8152$					

* X_1 – vrijeme ekstrakcije; X_2 – brzina okretaja kuglica; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 38. Optimalni uvjeti ekstrakcije kanabinoida u ovisnosti o željenim varijablama

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Optimalni parametri	64,78 min 70 °C	90 min 70 °C	3 min 1,6 m/s
Pretpostavljeni udio CBD (µg/mg)	32, 36	30,74	27,55
Pretpostavljeni udio CBDA (µg/mg)	101,01	90,99	95,83
Pretpostavljeni udio CBG (µg/mg)	4,82	4,12	-
Pretpostavljeni udio CBN (µg/mg)	1,99	1,60	2,01
Pretpostavljeni udio THC (µg/mg)	4,60	3,54	4,09
Pretpostavljeni udio THCA (µg/mg)	1,20	1,07	1,16
Pretpostavljeni udio CBC (µg/mg)	7,35	5,70	5,96
Pretpostavljeni udio CBCA (µg/mg)	11,38	-	11,23
Poželjnost modela	0,514	0,937	0,986
Određen udio CBD (µg/mg)	31,76±0,55	29,97±0,32	27,59±0,25
Određen udio CBDA (µg/mg)	101,01±1,39	89,29±2,11	96,08±2,09
Određen udio CBG (µg/mg)	4,52±0,11	3,97±0,06	4,01±0,19
Određen udio CBN (µg/mg)	1,89±0,05	1,55±0,03	1,97±0,02
Određen udio THC (µg/mg)	4,56±0,06	3,44±0,03	3,99±0,04
Određen udio THCA (µg/mg)	1,25±0,06	1,10±0,03	1,11±0,03

Određen udio CBC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	7,35 \pm 0,09	5,68 \pm 0,02	5,93 \pm 0,05
Određen udio CBCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	11,35 \pm 0,02	10,99 \pm 0,03	11,15 \pm 0,03

Tablica 39. Eksperimentalno određeni udjeli umbelifrona i herniarina u ekstraktima lavande dobiveni primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Broj eksperimenta	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Vrijeme (min)	Umbeliferon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Herniarin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	66,21	50,00	1,05	7,72
2	60,00	70,00	2,45	11,48
3	45,00	21,72	0,46	4,88
4	45,00	50,00	0,82	6,20
5	30,00	30,00	0,53	8,71
6	45,00	50,00	0,84	6,33
7	60,00	30,00	0,55	5,96
8	45,00	78,28	1,51	5,78
9	23,79	50,00	0,46	8,62
10	30,00	70,00	1,75	13,48
11	45,00	50,00	0,86	6,56
12	45,00	50,00	0,84	6,42
13	45,00	50,00	0,73	5,54

Tablica 40. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za umbeliferon i herniarin prilikom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Umbeliferon</i>					
Model	3,36	5	0,6715	6,26	0,0161*
X_1	2,65	1	2,65	24,70	0,0016*
X_2	0,3020	1	0,3020	2,81	0,1373
X_3	0,1156	1	0,1156	1,08	0,3339
X_1X_2	0,2672	1	0,2672	2,49	0,1586
X_1^2	0,0456	1	0,0456	0,4253	0,5351
X_2^2	0,7513	7	0,1073		
Ostatak	0,7408	3	0,2469		

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Nedostatak modela	0,0105	4	0,0026	94,25	0,0004*
Pogreška	4,11	12			
Ukupno	3,36	5	0,6715		
$R^2 = 0,8171$					
<i>Herniarin</i>					
Model	43,27	5	8,65	1,88	0,2166
X_1	16,71	1	16,71	3,63	0,0985
X_2	4,53	1	4,53	0,9843	0,3542
X_1X_2	0,1406	1	0,1406	0,0305	0,8662
X_1^2	0,8491	1	0,8491	0,1843	0,6806
X_2^2	21,78	1	21,78	4,73	0,0662
Ostatak	32,24	7	4,61		
Nedostatak modela	31,61	3	10,54	66,91	0,0007*
Pogreška	0,6300	4	0,1575		
Ukupno	75,51	12			
$R^2 = 0,5730$					

* X_1 – temperatura ekstrakcije; X_2 – vrijeme ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 41. Eksperimentalno određeni udjeli umbeliferona i herniarina u ekstraktima lavande dobiveni primjenom UAE

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Umbeliferon (µg/mL)	Herniarin (µg/mL)
1	66,21	50,00	0,92	6,47
2	60,00	70,00	2,65	15,11
3	45,00	21,72	0,36	5,66
4	45,00	50,00	0,87	6,63
5	30,00	30,00	0,71	9,36
6	45,00	50,00	0,89	6,49
7	60,00	30,00	1,02	6,37
8	45,00	78,28	1,75	5,96
9	23,79	50,00	0,70	6,15
10	30,00	70,00	2,05	12,73
11	45,00	50,00	0,78	6,32
12	45,00	50,00	0,70	5,46
13	45,00	50,00	0,79	6,30

Tablica 42. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za umbeliferon i herniarin prilikom UAE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Umbeliferon</i>					
Model	3,98	5	0,7950	5,03	0,0283*
X ₁	3,05	1	3,05	19,28	0,0032*
X ₂	0,1864	1	0,1864	1,18	0,3133
X ₃	0,0210	1	0,0210	0,1331	0,7260
X ₁ X ₂	0,5982	1	0,5982	3,79	0,0927
X ₁ ²	0,2028	1	0,2028	1,28	0,2944
X ₂ ²	1,11	7	0,1579		
Ostatak	1,08	3	0,3607		
Nedostatak modela	0,0233	4	0,0058	61,87	0,0008*
Pogreška	5,08	12			
Ukupno	3,98	5	0,7950		
$R^2 = 0,7824$					
<i>Herniarin</i>					
Model	42,49	5	8,50	0,9187	0,5204
X ₁	19,64	1	19,64	2,12	0,1884
X ₂	0,0031	1	0,0031	0,0003	0,9859
X ₁ X ₂	7,21	1	7,21	0,7794	0,4066
X ₁ ²	6,86	1	6,86	0,7418	0,4176
X ₂ ²	10,75	1	10,75	1,16	0,3168
Ostatak	64,75	7	9,25		
Nedostatak modela	63,92	3	21,31	102,31	0,0003*
Pogreška	0,8330	4	0,2083		
Ukupno	107,24	12			
$R^2 = 0,3962$					

*X₁ – temperatura ekstrakcije; X₂ – vrijeme ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 43. Eksperimentalno određeni udjeli umbeliferona i herniarina u ekstraktima lavande dobiveni primjenom MCE

Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Brzina okretaja kuglica (m/s)	Umbeliferon ($\mu\text{g/mL}$)	Herniarin ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,00	3,00	0,37	5,56
2	3,00	0,17	0,00	5,71
3	5,00	5,00	0,94	6,13
4	5,83	3,00	0,37	8,45
5	1,00	5,00	0,37	5,41
6	3,00	3,00	0,34	5,61
7	3,00	3,00	0,38	6,52
8	5,00	1,00	0,25	5,75
9	1,00	1,00	0,00	5,69
10	3,00	3,00	0,46	5,48
11	0,17	3,00	0,00	5,75
12	3,00	5,83	2,15	6,96
13	3,00	3,00	0,31	6,45

Tablica 44. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za umbeliferon i herniarin prilikom MCE

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Umbeliferon</i>					
Model	3,20	5	0,6407	7,13	0,0113*
X_1	0,2255	1	0,2255	2,51	0,1572
X_2	2,10	1	2,10	23,38	0,0019*
X_3	0,0256	1	0,0256	0,2848	0,6101
X_1X_2	0,1639	1	0,1639	1,82	0,2189
X_1^2	0,5911	1	0,5911	6,58	0,0373*
X_2^2	0,6292	7	0,0899		
Ostatak nedostatak modela	0,6165	3	0,2055		
Pogreška	0,0127	4	0,0032	64,83	0,0008*
Ukupno	3,83	12			
	3,20	5	0,6407		

$R^2 = 0,8358$

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<i>Herniarin</i>					
Model	4,06	5	0,8128	1,28	0,3699
X ₁	2,64	1	2,64	4,15	0,0809
X ₂	0,4361	1	0,4361	0,6854	0,4350
X ₁ X ₂	0,1089	1	0,1089	0,1712	0,6914
X ₁ ²	0,8274	1	0,8274	1,30	0,2916
X ₂ ²	0,0098	1	0,0098	0,0155	0,9045
Ostatak	4,45	7	0,6362		
Nedostatak modela	3,39	3	1,13	4,27	0,0974
Pogreška	1,06	4	0,2650		
Ukupno	8,52	12			

$R^2 = 0,4717$

*X₁ – vrijeme ekstrakcije; X₂ – brzina okretaja kuglica; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Tablica 45. Optimalni uvjeti ekstrakcije umbeliferona i herniarina u ovisnosti o željenim varijablama

Optimalni parametri	Tehnika ekstrakcije		
	Miješanje i zagrijavanje	Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	Mehanoekstrakcija
Optimalni parametri	60 min 70 °C	60 min 70 °C	4,61 min 5 m/s
Pretpostavljeni udio umbeliferona (µg/mg)	2,11	2,03	1,28
Pretpostavljeni udio herniarina (µg/mg)	11,37	9,21	6,94
Poželjnost modela	0,841	0,853	0,911
Određen udio umbeliferona (µg/mg)	2,04±0,01	1,97±0,03	1,36±0,09
Određen udio herniarina (µg/mg)	11,45±0,97	9,05±0,55	6,88±0,27

4.5. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti primjenom konvencionalnih otapala

Tablica 46. Udio karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Karnosolna kiselina (µg/mg)	Karnosol (µg/mg)		
Voda	30	30	0,00	0,00		
	60		0,00	0,24±0,00		
	90		0,00	0,24±0,00		
	30 % etanol (v/v)	30	50	0,00	0,29±0,01	
		60		0,00	0,27±0,00	
		90		0,75±0,03	0,24±0,00	
		50 % etanol (v/v)	30	70	0,00	0,26±0,03
			60		0,00	0,25±0,01
			90		0,74±0,00	0,42±0,02
70 % etanol (v/v)	30		30	1,11±0,03	2,63±0,21	
	60			1,33±0,55	2,26±0,02	
	90			1,45±0,53	2,18±0,20	
	Etanol		30	50	2,32±0,07	2,04±0,05
			60		2,64±0,04	1,99±0,04
			90		2,26±0,30	1,51±0,00
		Etanol	30	70	2,82±0,03	2,92±0,16
			60		2,13±0,14	2,92±0,311
			90		0,93±0,17	2,27±0,38
Etanol			30	30	5,91±0,19	4,65±0,22
			60		3,07±0,39	9,31±0,29
			90		3,02±0,15	9,73±0,86
	Etanol		30	50	7,17±0,05	8,39±0,47
			60		3,15±0,02	9,06±0,11
			90		2,11±0,15	11,25±0,35
		Etanol	30	70	7,63±0,44	6,73±0,38
			60		4,43±0,20	8,79±0,79
			90		1,91±0,00	11,23±0,13
Etanol			30	30	8,28±0,53	3,04±0,01
			60		7,40±0,05	4,82±0,29
			90		7,63±0,0	5,93±0,22
	Etanol		30	50	7,73±0,22	6,17±0,59
			60		8,54±0,28	7,21±0,44
			90		8,71±0,28	5,43±0,51
		Etanol	30	70	8,73±0,14	4,37±0,07
			60		7,53±0,06	6,55±0,22
			90		6,85±0,32	6,89±0,26
Etanol			30	30	11,21±0,51	2,72±0,27
			60		11,13±0,13	3,57±0,25

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Karnosolna kiselina (µg/mg)	Karnosol (µg/mg)
Metanol	90	50	12,77±0,22	2,83±0,06
	30		11,74±0,09	3,57±0,47
	60		12,80±0,19	3,14±0,06
	90		13,64±0,10	3,47±0,01
	30		13,36±0,37	4,46±0,11
	60		12,27±0,11	3,29±0,21
	90	11,27±0,05	3,11±0,09	
	30	70	8,71±0,87	2,88±0,48
	60		9,26±0,06	4,44±0,19
	90		10,50±0,58	4,69±0,58
	30		9,68±0,25	5,03±0,08
	60		11,85±0,05	5,24±0,07
	90		10,72±0,30	4,85±0,40
	30	30	9,69±0,58	3,67±0,24
	60		10,11±0,43	4,41±0,10
	90		10,41±0,12	4,80±0,03

Tablica 47. Udio galne kiseline, elaginske kiseline i HT u ekstraktima vrkute dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Galna kiselina (µg/mg)	Elaginska kiselina (µg/mg)	HT (µgTAE/mg)	
Voda	30	30	2,19±0,02	6,94±0,33	60,13±3,18	
	60		2,02±0,38	6,42±0,19	50,33±6,77	
	90		2,21±0,09	7,54±0,40	76,06±1,64	
	30		1,47±0,03	3,32±0,19	43,93±0,53	
	60		2,03±0,02	4,38±0,07	41,66±3,31	
	90		1,93±0,03	3,88±0,09	39,39±3,31	
	30	70	1,03±0,00	8,24±0,04	68,89±1,50	
	60		1,17±0,01	8,17±0,34	67,93±0,61	
	90		0,64±0,05	4,08±0,52	80,39±0,07	
	30		0,56±0,02	3,44±0,31	90,56±0,50	
	60		0,56±0,00	3,34±0,07	81,73±2,80	
	90		0,61±0,04	3,65±0,60	93,66±2,00	
30 % etanol (v/v)	30	50	0,52±0,01	3,08±0,10	76,33±2,64	
	60		0,54±0,04	4,67±0,20	75,26±1,40	
	90		0,55±0,12	3,62±0,01	88,86±3,42	
	30		0,79±0,02	7,44±0,46	92,39±0,42	
	60		0,57±0,02	3,71±0,35	71,53±2,30	
	90		0,53±0,00	3,68±0,01	97,39±2,20	
50 % etanol (v/v)	30	30	0,77±0,02	3,05±0,13	92,66±5,28	
	60		0,49±0,12	3,23±0,43	84,19±4,66	
	90		0,53±0,00	3,49±0,11	98,59±4,98	
	30		50	0,72±0,02	3,15±0,28	88,19±2,58
	60			0,53±0,00	3,92±0,02	120,13±0,60
	90			0,51±0,04	3,94±0,20	99,06±1,15

REZULTATI

	30		0,57±0,05	4,64±0,12	100,39±5,30
	60	70	0,53±0,00	3,95±0,15	62,19±2,12
	90		0,50±0,01	3,56±0,03	90,33±1,91
	30		0,55±0,00	1,22±0,18	72,46±2,80
	60	30	0,51±0,05	1,81±0,05	47,93±4,10
	90		0,52±0,03	2,40±0,06	51,93±4,80
70 % etanol (v/v)	30		0,54±0,01	2,97±0,18	35,79±2,95
	60	50	0,51±0,00	3,07±0,03	62,26±2,19
	90		0,54±0,00	3,58±0,05	51,53±3,94
	30		0,61±0,04	4,41±0,01	49,46±0,08
	60	70	0,60±0,05	4,36±0,32	77,33±2,84
	90		0,55±0,00	3,83±0,02	71,79±0,70
	30	30	0,00	0,19±0,24	0,46±0,03
	60		0,41±0,04	0,43±0,47	0,86±0,04
	90		0,41±0,17	0,69±0,03	3,86±0,02
Etanol	30	50	0,50±0,09	0,90±0,02	0,66±0,09
	60		0,67±0,00	2,44±0,09	2,19±0,10
	90		0,00	2,48±0,05	2,73±0,14
	30		0,00	2,16±0,04	1,26±0,07
	60	70	0,00	3,73±0,01	29,73±0,40
	90		0,00	4,03±0,11	26,79±1,40
	30		1,11±0,01	1,31±0,19	35,46±0,53
	60	30	0,61±0,00	1,68±0,00	0,00
	90		0,65±0,00	2,14±0,16	40,79±1,20
	30		0,68±0,00	1,95±0,14	41,33±1,51
Metanol	60	50	0,69±0,01	2,19±0,01	46,93±0,80
	90		0,54±0,00	3,90±0,30	81,13±0,65
	30		1,04±0,09	4,24±0,03	0,00
	60	70	1,03±0,01	5,38±0,35	49,33±0,80
	90		0,62±0,02	3,55±0,29	29,66±0,81

Tablica 48. Udio fenolnih kiselina i rutina u ekstraktima koprive dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Klorogenska kiselina (µg/mg)	Kofeinska kiselina (µg/mg)	Neoklorogenska kiselina (µg/mg)	Kafeoil-jabučna kiselina (µg/mg)	Sinapinska kiselina (µg/mg)	Rutin (µg/mg)
Voda	30	30	0,03±0,00	0,06±0,01	0,09±0,01	1,61±0,03	0,14±0,01	0,00±0,00
	60		0,04±0,00	0,07±0,01	0,08±0,02	0,60±0,01	0,18±0,01	0,00±0,00
	90		0,06±0,01	0,06±0,00	0,08±0,01	0,70±0,01	0,19±0,00	0,00±0,00
	30	50	0,35±0,01	0,08±0,00	0,11±0,01	3,00±0,09	0,12±0,03	0,00±0,00
	60		1,33±0,14	0,06±0,00	0,16±0,04	5,90±0,01	0,09±0,00	0,00±0,00
	90		1,30±0,05	0,05±0,00	0,19±0,02	5,88±0,60	0,12±0,03	0,00±0,00
	30	70	1,58±0,10	0,03±0,00	0,13±0,09	6,70±0,13	0,11±0,02	0,26±0,05
	60		1,31±0,18	0,07±0,00	0,31±0,06	6,23±0,03	0,13±0,00	0,39±0,02
	90		0,44±0,05	0,09±0,01	0,36±0,00	5,06±0,22	0,10±0,03	0,00±0,00
30 % etanol (v/v)	30	30	2,54±0,25	0,14±0,01	0,08±0,00	8,05±0,12	0,12±0,01	0,86±0,08
	60		2,94±0,03	0,16±0,00	0,08±0,00	8,17±0,08	0,10±0,00	0,91±0,01
	90		2,78±0,14	0,10±0,00	0,09±0,01	8,45±0,33	0,12±0,01	0,98±0,15
	30	50	3,04±0,05	0,14±0,01	0,07±0,01	9,08±0,56	0,14±0,01	0,84±0,06
	60		2,56±0,05	0,14±0,01	0,11±0,02	7,92±0,53	0,09±0,01	0,86±0,02
	90		2,63±0,09	0,08±0,03	0,10±0,01	8,34±0,40	0,13±0,02	0,68±0,10
	30	70	2,77±0,01	0,13±0,00	0,10±0,01	7,10±0,87	0,10±0,01	1,08±0,04
	60		2,34±0,15	0,08±0,01	0,20±0,03	7,93±0,93	0,13±0,00	0,70±0,06
	90		1,45±0,06	0,18±0,01	0,32±0,00	6,46±0,21	0,13±0,02	0,63±0,06
50 % etanol (v/v)	30	30	2,98±0,34	0,14±0,02	0,06±0,01	8,14±0,30	0,11±0,02	0,95±0,08
	60		2,95±0,03	0,19±0,01	0,05±0,01	8,32±0,42	0,10±0,01	1,00±0,07
	90		3,16±0,08	0,14±0,00	0,06±0,01	8,88±0,11	0,12±0,01	1,08±0,03
	30	50	3,19±0,10	0,14±0,02	0,07±0,00	8,35±0,26	0,13±0,04	1,07±0,09
	60		3,34±0,24	0,17±0,01	0,09±0,01	7,76±0,07	0,08±0,01	1,00±0,05
	90		2,77±0,05	0,12±0,02	0,05±0,01	7,73±0,04	0,11±0,01	0,86±0,06
	30	70	3,04±0,37	0,12±0,01	0,10±0,03	7,49±0,02	0,09±0,03	1,28±0,04
	60		3,24±0,16	0,13±0,01	0,09±0,01	7,35±0,15	0,10±0,02	1,18±0,11
	90		1,57±0,13	0,14±0,02	0,19±0,02	5,87±0,08	0,13±0,01	0,90±0,01
70 % etanol	30	30	2,86±0,17	0,14±0,01	0,10±0,00	5,73±0,30	0,10±0,00	0,70±0,06
60	2,68±0,01		0,13±0,02	0,09±0,00	5,61±0,28	0,11±0,00	0,98±0,13	

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Klorogenska kiselina (µg/mg)	Kofeinska kiselina (µg/mg)	Neoklorogenska kiselina (µg/mg)	Kafeoil-jabučna kiselina (µg/mg)	Sinapinska kiselina (µg/mg)	Rutin (µg/mg)
(v/v)	90	50	2,56±0,11	0,11±0,03	0,08±0,02	6,26±0,18	0,10±0,00	0,86±0,08
	30		3,32±0,18	0,11±0,04	0,12±0,02	6,79±0,01	0,09±0,00	1,01±0,11
	60		3,11±0,05	0,15±0,00	0,11±0,01	5,43±0,03	0,09±0,00	1,01±0,07
	90		3,23±0,11	0,15±0,01	0,12±0,00	5,60±0,13	0,09±0,00	1,26±0,34
	30	70	3,04±0,11	0,13±0,01	0,11±0,01	5,78±0,52	0,09±0,00	0,97±0,11
	60		3,07±0,04	0,15±0,01	0,13±0,01	5,50±0,19	0,11±0,02	1,24±0,19
	90		2,03±0,04	0,24±0,03	0,17±0,00	4,01±0,09	0,14±0,00	0,99±0,01
	30	30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	60		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Etanol	90	50	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
30		0,13±0,00		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
60		0,24±0,01		0,00±0,00	0,00±0,00	0,05±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00
90		0,24±0,03		0,02±0,00	0,00±0,00	0,05±0,00	0,00±0,00	0,22±0,01
30		70	0,21±0,01	0,01±0,00	0,00±0,00	0,06±0,01	0,00±0,00	0,20±0,00
60			0,31±0,01	0,04±0,00	0,00±0,00	0,06±0,00	0,00±0,00	0,21±0,00
90			0,36±0,01	0,04±0,00	0,00±0,00	0,06±0,00	0,00±0,00	0,20±0,00
30		30	0,55±0,03	0,03±0,00	0,08±0,00	1,63±0,00	0,14±0,01	0,46±0,01
60			1,02±0,03	0,05±0,01	0,06±0,01	1,69±0,24	0,10±0,00	0,47±0,08
90			0,96±0,00	0,08±0,00	0,06±0,01	1,76±0,01	0,09±0,00	0,38±0,00
Metanol	30	50	1,06±0,15	0,05±0,01	0,06±0,00	1,75±0,05	0,08±0,00	0,33±0,05
	60		3,05±0,14	0,10±0,01	0,09±0,02	3,42±0,02	0,09±0,00	0,60±0,13
	90		1,39±0,30	0,06±0,01	0,09±0,00	2,57±0,15	0,10±0,00	0,80±0,29
	30	70	1,73±0,02	0,08±0,01	0,09±0,02	2,30±0,25	0,09±0,00	0,65±0,04
	60		1,87±0,04	0,11±0,00	0,09±0,01	2,48±0,22	0,12±0,00	0,85±0,02
	90		0,45±0,02	0,15±0,01	0,07±0,01	1,67±0,06	0,08±0,00	0,69±0,09

Tablica 49. Udio kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)	CBDVA (µg/mg)	
Voda	30	30	0,0	3,47±0,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	60		0,0	3,08±0,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	90		0,0	4,44±0,24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	30	50	0,0	2,77±0,43	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	60		0,0	2,70±0,45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	90		0,0	5,18±0,97	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,36±0,05	0,0	0,0	
	30	70	0,0	37,23±0,10	1,59±0,09	0,0	0,0	0,0	0,71±0,06	3,76±0,32	0,0	0,39±0,05	
	60		0,0	38,24±1,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,43±0,01	2,99±0,18	0,0	0,0	
	90		0,81±0,02	31,00±1,59	0,0	0,0	0,0	0,0	0,30±0,02	2,16±0,12	0,0	0,0	
30	30	0,0	3,47±0,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
60		0,0	41,35±0,99	0,0	0,0	0,0	0,0	0,35±0,06	3,96±0,05	0,0	0,44±0,07		
90		0,0	38,83±0,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,68±0,14	3,64±0,18	0,0	0,44±0,04		
30 % etanol (v/v)	30	50	0,0	38,56±1,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,35±0,04	3,67±0,12	0,0	0,0	
	60		0,0	41,21±2,60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,72±0,09	3,81±0,22	0,0	0,45±0,09	
	90		0,0	39,02±2,93	0,0	0,0	0,0	0,00	0,72±0,01	3,56±0,09	0,0	0,0	
	30	70	7,25±0,11	83,19±3,43	0,0	0,0	0,0	1,21±0,03	2,26±0,00	9,84±0,84	2,31±0,07	0,53±0,09	
	60		13,38±0,26	87,94±3,36	0,14±0,01	0,0	0,12±0,02	1,60±0,13	2,33±0,19	11,16±0,78	2,52±0,04	0,64±0,06	
	90		16,28±0,07	76,57±1,84	0,26±0,01	0,0	0,0	1,61±0,24	2,0±0,08	10,13±0,87	2,50±0,04	0,24±0,05	
	30	30	3,86±0,15	83,73±2,06	0,0	0,0	0,0	0,73±0,03	1,61±0,13	9,17±0,18	2,21±0,07	0,76±0,02	
	60		4,12±0,01	84,41±3,39	0,0	0,0	0,0	1,15±0,05	2,80±0,24	11,77±0,65	2,25±0,02	0,74±0,07	
	90		3,49±0,23	72,68±3,22	0,0	0,0	0,0	0,96±0,08	2,37±0,13	10,15±0,84	2,15±0,06	0,57±0,10	
50 % etanol (v/v)	30	50	4,08±0,09	78,02±2,90	0,0	0,0	0,0	1,10±0,07	2,58±0,15	10,99±0,48	2,30±0,03	0,65±0,04	
	60		4,26±0,09	76,93±3,10	0,0	0,0	0,0	1,04±0,05	2,53±0,09	10,10±0,92	2,16±0,03	0,65±0,04	
	90		4,87±0,06	75,23±0,11	0,0	0,0	0,0	1,18±0,09	2,41±0,18	10,59±0,12	2,24±0,02	0,61±0,04	
	30	70	8,52±0,29	94,16±1,97	0,15±0,01	0,0	0,22±0,04	1,66±0,13	2,58±0,08	11,55±0,22	2,50±0,05	0,69±0,11	
	60		15,50±0,96	96,89±2,48	0,14±0,03	0,0	0,25±0,03	2,24±0,01	2,71±0,17	12,49±0,48	2,80±0,01	0,34±0,02	
	90		15,83±0,24	73,09±3,16	0,26±0,06	0,0	0,20±0,00	1,84±0,12	1,98±0,05	9,57±0,50	2,56±0,03	0,0	
	70 % etanol (v/v)	30	30	4,30±0,15	89,75±2,95	0,0	0,0	0,0	1,30±0,00	3,12±0,20	12,40±0,42	2,32±0,02	0,73±0,07
		60		4,55±0,01	86,10±1,11	0,0	0,0	0,0	1,31±0,18	2,95±0,13	11,81±0,89	2,33±0,07	0,72±0,05
		90		4,27±0,19	83,20±2,92	0,0	0,0	0,0	1,28±0,02	2,83±0,04	11,41±0,18	2,26±0,03	0,72±0,08

REZULTATI

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)	CBDVA (µg/mg)
Etanol	30	50	4,31±0,22	78,59±0,54	0,0	0,0	0,0	1,28±0,03	2,72±0,06	10,52±0,33	2,23±0,02	0,63±0,06
	60		4,39±0,20	77,09±0,18	0,0	0,0	0,0	1,19±0,13	2,68±0,18	10,31±0,60	2,20±0,07	0,64±0,07
	90		0,00	3,08±2,23	0,0	0,0	0,0	1,09±0,09	2,78±0,04	11,32±0,40	2,31±0,03	0,0
	30	70	7,11±0,12	92,06±2,24	0,0	0,0	0,0	1,59±0,06	2,55±0,06	11,61±0,78	2,46±0,02	0,67±0,06
	60		10,70±0,07	85,03±2,83	0,14±0,03	0,0	0,0	1,64±0,21	2,31±0,29	9,92±0,17	2,51±0,07	0,26±0,06
	90		14,42±0,11	84,68±2,45	0,28±0,02	0,0	0,32±0,02	1,96±0,07	2,33±0,02	10,55±0,44	2,68±0,03	0,0
	30	30	4,54±0,12	88,68±2,98	0,0	0,0	0,0	1,44±0,02	3,07±0,10	12,06±0,49	2,34±0,03	0,79±0,09
	60		4,49±0,26	87,50±3,41	0,0	0,11±0,01	0,00	1,41±0,09	3,10±0,11	11,98±0,56	2,34±0,16	0,75±0,08
	90		3,95±0,37	80,65±0,09	0,0	0,0	0,0	1,17±0,04	2,73±0,07	11,23±0,15	2,28±0,03	0,70±0,11
	30	50	3,87±0,39	69,81±1,76	0,0	0,0	0,0	1,08±0,01	2,35±0,08	9,31±0,22	2,14±0,01	0,52±0,08
	60		4,07±0,01	74,65±3,21	0,0	0,0	0,0	1,20±0,15	2,55±0,16	9,72±0,09	2,16±0,05	0,60±0,09
	90		4,92±0,27	77,77±3,70	0,0	0,0	0,0	1,06±0,08	2,62±0,15	10,77±0,31	2,37±0,08	0,62±0,04
	30	70	7,57±0,38	100,25±4,22	1,01±0,02	0,07±0,00	0,0	1,62±0,09	2,91±0,11	12,76±0,41	2,60±0,11	0,42±0,03
	60		9,50±0,15	81,72±3,59	0,21±0,00	0,0	0,0	1,43±0,06	2,30±0,19	9,55±0,36	2,37±0,06	0,76±0,03
	90		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acetonitril: Metanol (55 : 45)	30	30	4,71±0,12	91,97±2,54	0,0	0,0	0,32±0,01	1,04±0,12	2,67±0,31	10,59±0,36	2,29±0,05	0,0
	60		4,24±0,01	91,71±0,81	0,0	0,0	0,09	1,04±0,00	2,70±0,19	9,83±0,01	1,96±0,06	0,37±0,00
	90		3,82±0,26	78,45±2,37	0,0	0,0	0,0	1,13±0,01	2,30±0,03	8,68±0,47	2,16±0,08	0,00
	30	50	4,97±0,00	91,03±0,08	0,12±0,01	0,0	0,0	0,67±0,02	2,54±0,22	9,86±0,50	2,22±0,16	0,66±0,01
	60		4,88±0,11	93,31±2,59	0,0	0,0	0,0	1,20±0,04	2,66±0,20	9,98±0,67	1,98±0,03	0,69±0,05
	90		4,93±0,37	89,58±0,13	0,14±0,02	0,0	0,09±0,00	1,16±0,07	2,51±0,09	9,89±0,75	2,26±0,02	0,61±0,04
	30	70	5,42±0,16	95,18±0,59	0,0	0,0	0,0	1,35±0,04	2,73±0,11	10,45±1,26	2,26±0,06	0,32±0,03
	60		6,64±0,20	93,16±4,25	0,0	0,0	0,0	1,34±0,05	2,58±0,16	10,44±0,17	2,34±0,11	0,65±0,06
	90		8,03±0,19	92,75±3,38	0,16±0,01	0,0	0,0	1,70±0,10	2,65±0,07	11,12±0,43	2,48±0,32	0,74±0,08
	30	30	3,96±0,32	79,13±2,70	0,0	0,0	0,0	1,24±0,02	2,73±0,06	11,11±0,05	2,27±0,06	0,64±0,01
	60		4,12±0,20	80,14±1,75	0,0	0,0	0,0	1,18±0,05	2,78±0,19	11,25±0,60	2,27±0,02	0,65±0,07
	90		4,52±0,46	84,78±0,19	0,0	0,0	0,0	1,26±0,08	2,92±0,19	11,66±1,50	2,32±0,37	0,71±0,09
	30	50	4,30±0,15	82,44±1,97	0,0	0,0	0,0	1,22±0,01	2,86±0,08	11,49±0,01	2,29±0,07	0,69±0,03
	60		4,38±0,17	78,96±3,30	0,0	0,0	0,0	1,21±0,04	2,74±0,16	5,06±0,23	2,31±0,12	0,59±0,06
	90		0,0	4,82±0,66	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,22±0,62	0,0	0,0
Metanol	30	70	0,0	1,27±0,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	60		0,0	1,72±0,09	0,0	0,0	0,0	0,43±0,00	0,30±0,03	0,0	0,0	0,06±0,00

REZULTATI

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBG (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)	CBCA (µg/mg)	CBC (µg/mg)	CBDVA (µg/mg)
	90		0,0	1,66±0,11	0,0	0,0	0,0	0,45±0,01	0,27±0,01	0,0	0,0	0,03±0,00

Tablica 50. Udio umbeliferona i herniarina u ekstraktima lavande dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom

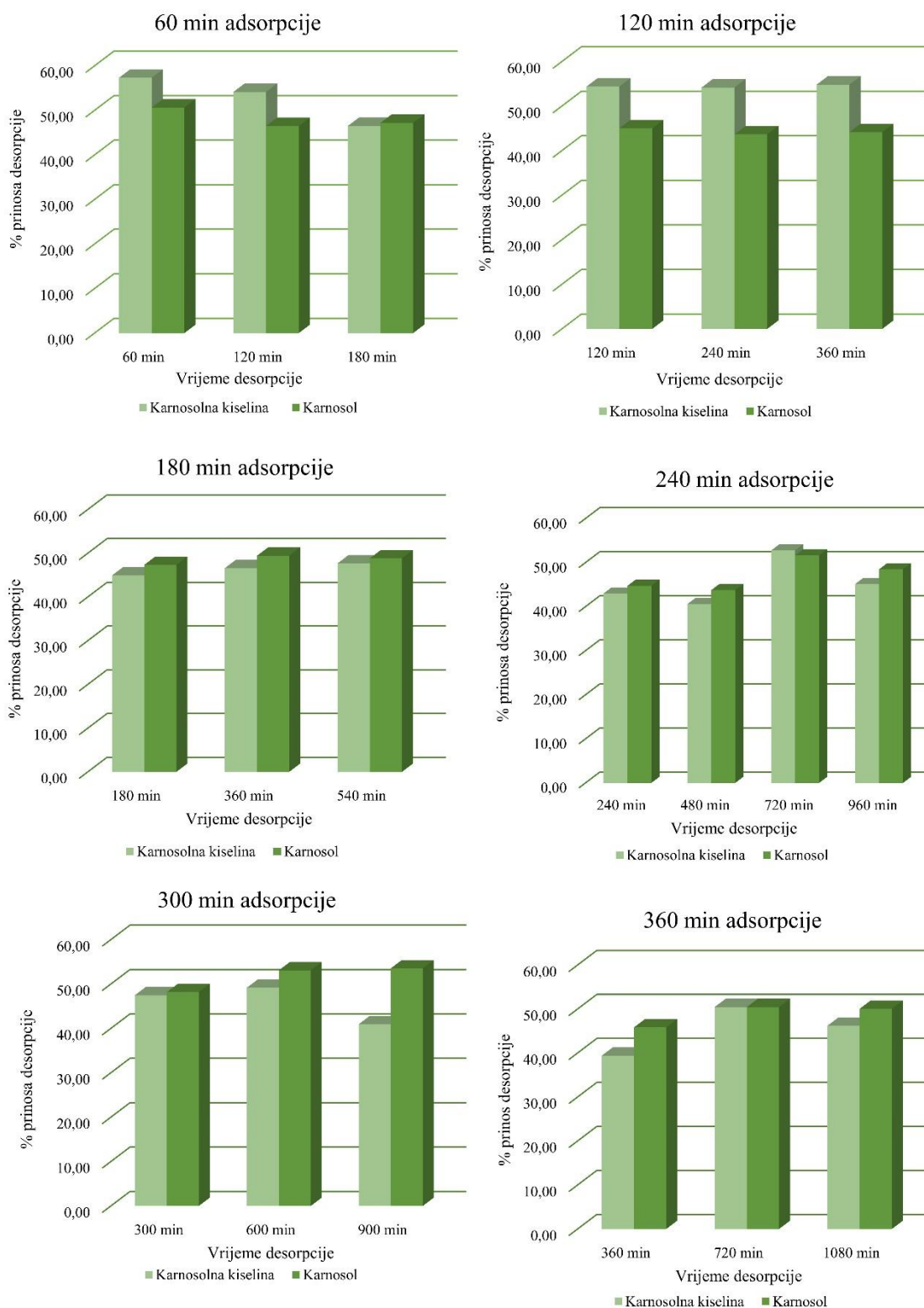
Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Umbeliferon (µg/mL)	Herniarin (µg/mL)		
Voda	30	30	4,98±0,50	9,01±0,18		
	60		3,87±0,08	0,16±0,02		
	90		4,72±0,26	8,81±0,38		
	30 % etanol (v/v)	30	50	4,24±0,18	7,91±0,23	
		60		4,99±0,02	21,82±2,35	
		90		4,34±0,19	7,00±0,04	
		50 % etanol (v/v)	30	70	3,94±0,54	7,56±2,01
			60		5,51±0,29	25,54±0,34
			90		4,50±0,21	25,42±0,37
70 % etanol (v/v)			30	30	6,00±0,17	31,54±0,23
			60		5,59±0,14	22,93±0,22
			90		5,42±0,69	26,99±0,89
	Etanol		30	50	4,92±0,02	37,34±0,22
			60		4,99±0,02	21,82±2,35
			90		4,96±0,01	34,38±0,17
		Metanol	30	70	4,14±0,02	7,63±0,13
			60		6,13±0,21	8,63±0,18
			90		5,03±0,09	42,13±1,53
Etanol			30	30	4,82±0,27	35,22±4,02
			60		5,02±0,38	40,74±0,30
			90		5,12±0,11	34,00±1,27
	Etanol		30	50	4,78±0,23	39,30±2,99
			60		4,23±0,06	41,91±2,63
			90		4,78±0,52	39,73±0,47
		Etanol	30	70	5,05±0,33	51,99±2,24
			60		8,65±1,26	38,77±1,33
			90		5,60±1,35	45,81±1,34
Etanol			30	30	3,02±0,34	27,42±1,68
			60		3,12±0,35	33,15±2,20
			90		5,12±0,11	34,00±1,27
	Etanol		30	50	3,43±0,01	37,15±0,57
			60		3,68±0,23	34,16±2,15
			90		4,46±0,57	35,73±0,83
		Etanol	30	70	4,85±0,62	43,39±1,13
			60		4,40±1,04	40,55±1,91
			90		5,12±0,14	7,90±0,04
Etanol			30	30	0,65±0,14	7,96±0,06
			60		0,59±0,13	7,46±0,11
			90		3,87±0,48	34,94±1,19
	Etanol		30	50	0,82±0,16	8,45±0,23
			60		1,16±0,09	8,90±0,14
			90		1,62±0,11	10,60±0,82
		Etanol	30	70	2,85±0,44	15,30±0,44
			60		2,42±0,18	15,52±0,30
			90		3,07±0,08	8,32±0,13
Metanol			30	30	1,08±0,02	18,70±1,58

Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Umbeliferon (µg/mL)	Herniarin (µg/mL)
	60		1,28±0,10	20,18±1,63
	90		1,64±0,01	23,24±0,46
	30		1,39±0,02	23,47±0,02
	60	50	1,53±0,07	23,90±2,64
	90		1,90±0,17	26,77±0,87
	30		1,35±0,02	23,70±0,41
	60	70	2,51±0,17	34,91±5,81
	90		2,72±0,00	31,92±0,00

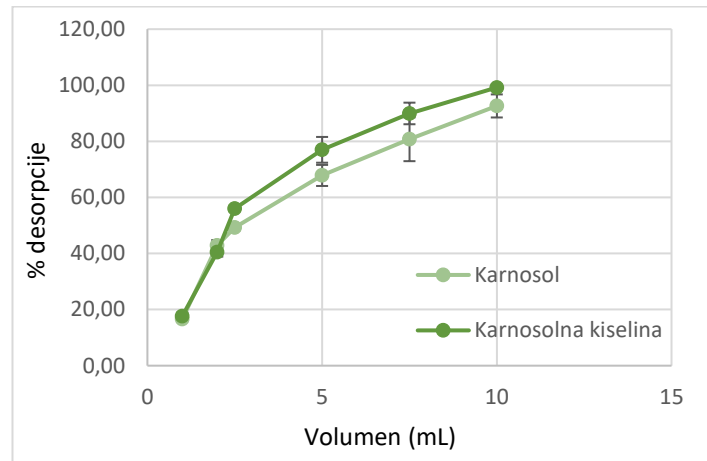
4.6. Primjena makroporoznih smola za pročišćavanje bioaktivnih komponenti iz ekstrakata

Tablica 51. Adsorpcijske i desorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt kadulje

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)		Adsorpcijski prinos (%)		Desorbens	Desorpcijski prinos (%)	
	Karnosolna kiselina	Karnosol	Karnosolna kiselina	Karnosol		Karnosolna kiselina	Karnosol
HP20	25,60	10,10	100,00±0,00	95,09±3,75	voda	14,57±0,09	-
					50 % etanol	14,39±0,01	12,65±0,02
					70 % etanol	16,64±0,11	15,42±0,06
					etanol	20,63±0,17	24,15±0,09
					metanol	10,28±0,33	10,04±0,18
XAD7HP	25,60	10,20	100,00±0,00	91,75±2,72	voda	-	-
					50 % etanol	20,17±0,06	20,74±0,18
					70 % etanol	42,04±0,19	34,78±0,22
					etanol	47,08±0,25	47,47±0,05
					metanol	29,94±0,17	28,42±0,21
XAD16N	24,80	10,40	97,06±6,57	93,58±2,42	voda	-	-
					50 % etanol	10,94±0,05	14,96±0,20
					70 % etanol	18,26±0,09	23,37±0,12
					etanol	29,62±0,15	28,69±0,11
					metanol	16,22±0,07	15,55±0,03
HP21	25,6	10,60	100,00±0,00	95,50±3,70	voda	-	8,61±0,01
					50 % etanol	-	9,51±0,31
					70 % etanol	16,61±0,13	15,54±0,05
					etanol	20,85±0,12	28,72±0,07
					metanol	12,04±0,01	12,91±0,13
HP2MG	0,0185	10,90	87,52±3,26	90,96±2,74	voda	15,59±0,26	11,63±0,22
					50 % etanol	16,55±0,23	18,04±0,02
					70 % etanol	27,38±0,07	29,67±0,05
					etanol	40,32±0,01	43,90±0,24
					metanol	38,33±0,19	37,87±0,09



Slika 30. Utjecaj vremena desorpcije na udio karnosolne kiseline i karnosola iz ekstrakta kadulje u desorbensu (etanol) primjenom smole XAD7HP

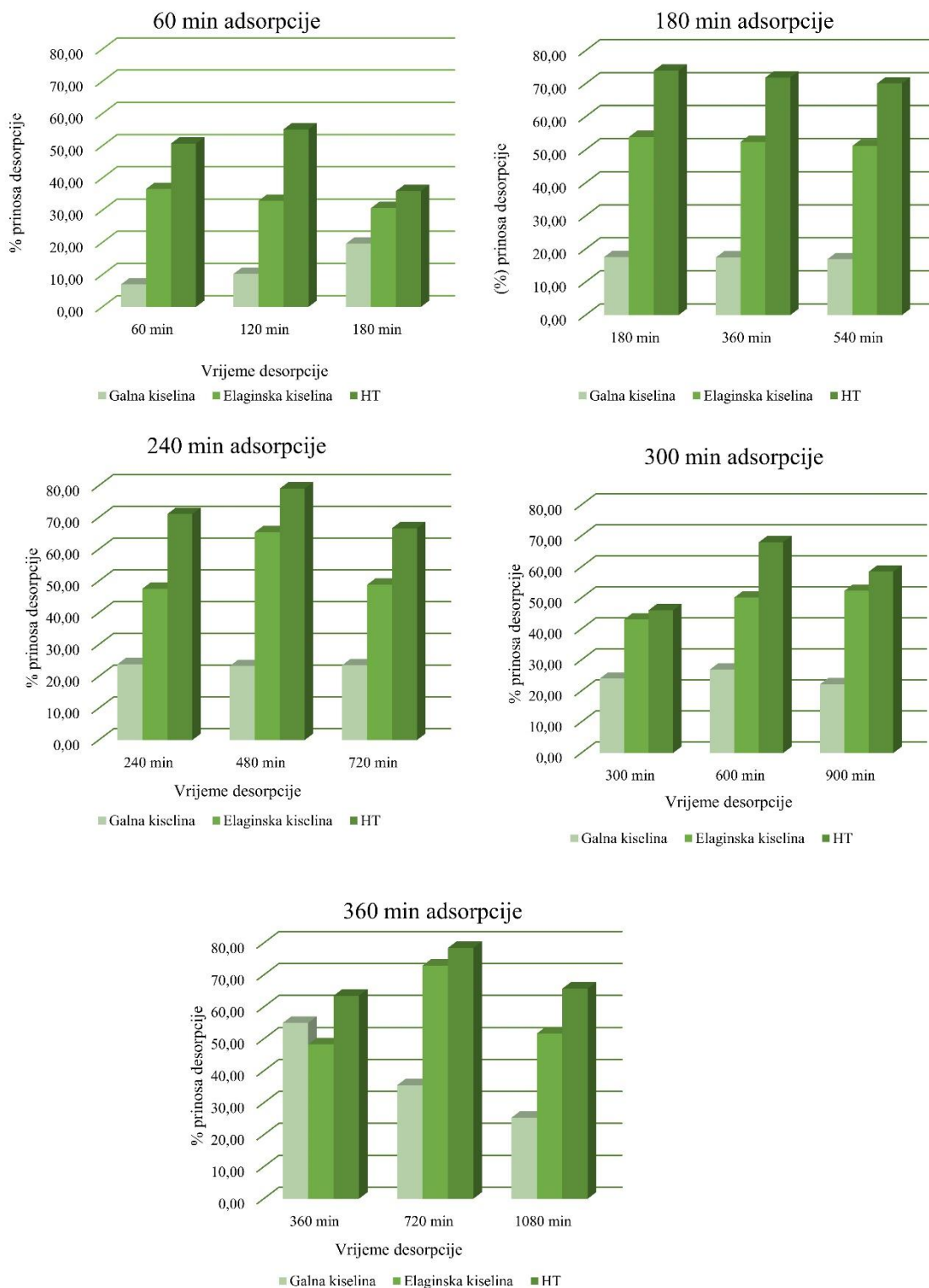


Slika 31. Utjecaj volumena desorbensa na udio karnosolne kiseline i karnosola iz ekstrakta kadulje u desorbensu (etanol) primjenom smole XAD7HP

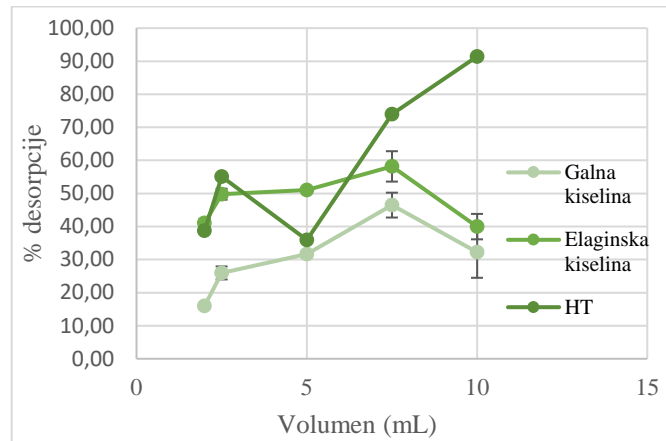
Tablica 52. Adsorpcijske i desorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt vrkute

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)			Adsorpcijski prinos (%)			Desorbens	Desorpcijski prinos (%)		
	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT		Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT
HP20	3,00	23,8	343,0	66,66±1,39	100±0,00	39,05±7,44	voda	24,89±0,68	0,00	2,45±0,21
							30 % etanol	24,15±0,37	12,41±0,81	52,04±0,93
							50 % etanol	27,78±0,52	35,97±1,19	80,31±1,80
							70 % etanol	27,78±0,56	52,00±0,33	79,24±0,21
							etanol	28,22±0,59	47,71±0,75	67,57±0,82
							metanol	27,23±0,60	34,93±0,89	54,22±0,74
							voda	63,34±0,79	0,00	8,65±0,19
XAD7HP	1,50	23,8	358,5	44,64±3,57	100±0,00	39,02±5,89	30 % etanol	70,37±0,74	0,00	25,71±1,05
							50 % etanol	71,25±0,88	26,66±1,15	58,03±1,60
							70 % etanol	70,73±0,99	47,99±0,78	60,00±0,83
							etanol	58,24±0,78	56,48±0,22	56,75±1,37
							metanol	99,50±1,13	42,00±0,23	51,99±1,20
							voda	28,34±0,95	0,00	1,93±0,08
							30 % etanol	32,01±0,53	5,71±0,34	45,50±1,78
XAD16N	1,20	23,8	383,7	57,75±8,92	100±0,00	38,86±6,63	50% etanol	30,65±0,79	37,68±1,01	70,00±0,61
							70 % etanol	49,02±1,59	51,77±0,65	84,20±0,57
							etanol	28,33±0,72	55,97±0,20	68,86±0,34
							metanol	42,58±0,84	46,91±0,33	65,47±1,02
							voda	58,46±1,26	0,00	4,63±0,20
							30 % etanol	31,52±0,33	5,85±0,58	42,87±1,78
							50 % etanol	45,81±0,61	18,09±0,34	88,58±0,79
HP21	1,8	23,8	377,1	55,43±3,80	100±0,00	44,56±8,71	70 % etanol	47,19±1,08	40,74±0,37	81,36±1,15
							etanol	49,33±0,66	54,93±1,25	76,07±1,17
							metanol	43,75±0,33	47,47±0,73	73,15±0,25
HP2MG	7,9	23,8	381,4	50,84±2,22	100±0,00	37,30±4,54	voda	62,15±0,92	4,88±0,24	0,00
							30 % etanol	79,51±0,93	21,02±0,50	0,05±0,01

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)	Adsorpcijski prinos (%)	Desorbens	Desorpcijski prinos (%)		
			50 % etanol	87,96±0,84	49,31±0,15	23,30±1,08
			70 % etanol	88,43±0,95	57,86±0,51	31,85±1,66
			etanol	81,93±0,46	62,37±0,96	46,88±1,37
			metanol	96,93±1,52	55,41±1,43	33,32±1,33



Slika 32. Utjecaj vremena desorpcije na udio fenolnih kiselina i HT iz ekstrakta vrkute u desorbensu (70 % etanol) primjenom smole XAD16N



Slika 33. Utjecaj volumena desorbensa na udio fenolnih kiselina i HT iz ekstrakta vrkute u desorbensu (70% etanol) primjenom smole XAD16N

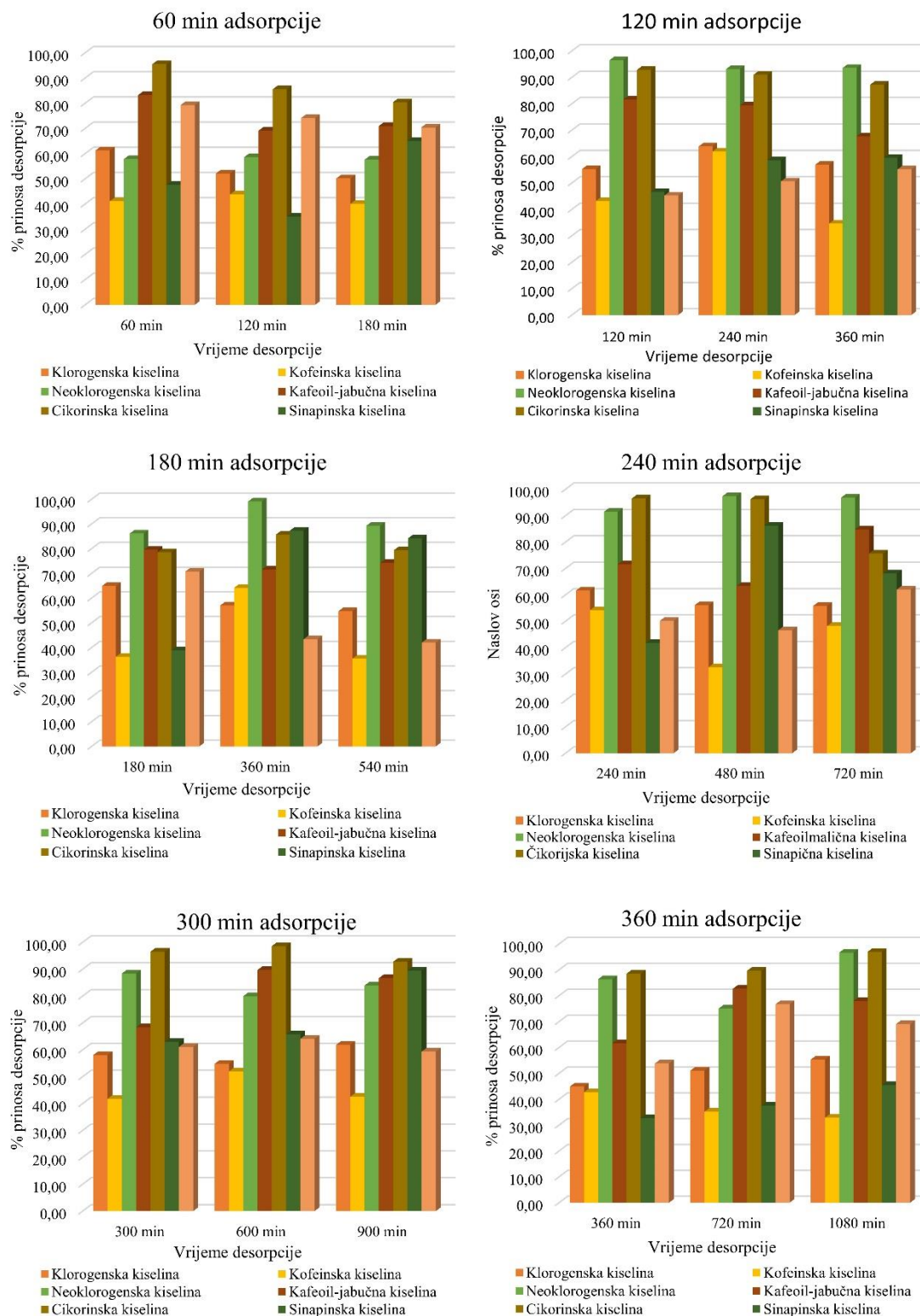
Tablica 53. Adsorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt koprive

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)						
	Kofeinska kiselina	Klorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Cikorinska kiselina	Rutin
HP20	0,3961	2,7294	0,1461	7,7604	0,2865	0,4992	1,9615
XAD7HP	0,4461	3,1294	0,1461	8,7104	0,3365	0,4742	1,9615
XAD16N	0,4211	3,0294	0,1711	7,7104	0,4865	0,4742	1,9615
HP21	0,3711	3,3794	0,1711	7,8104	0,2615	0,3242	1,0115
HP2MG	0,4711	3,5544	0,1711	9,6604	0,2365	0,5742	1,5115
Adsorpcijski prinos (%)							
HP20	70,43±3,53	53,18±2,56	39,75±5,45	61,03±1,56	60,51±1,96	87,46±2,26	100±0,00
XAD7HP	78,07±3,03	61,14±4,95	41,37±3,30	68,58±4,47	68,77±8,90	82,83±4,36	100±0,00
XAD16N	74,15±8,10	58,94±5,24	42,77±1,21	60,57±4,37	100±0,00	89,17±8,56	100±0,00
HP21	66,68±3,72	65,73±2,60	45,87±8,26	61,36±3,27	55,48±5,42	36,70±5,15	53,06±2,45
HP2MG	80,55±4,59	69,53±3,23	45,26±7,96	79,14±8,06	47,82±2,29	100±0,00	72,72±6,70

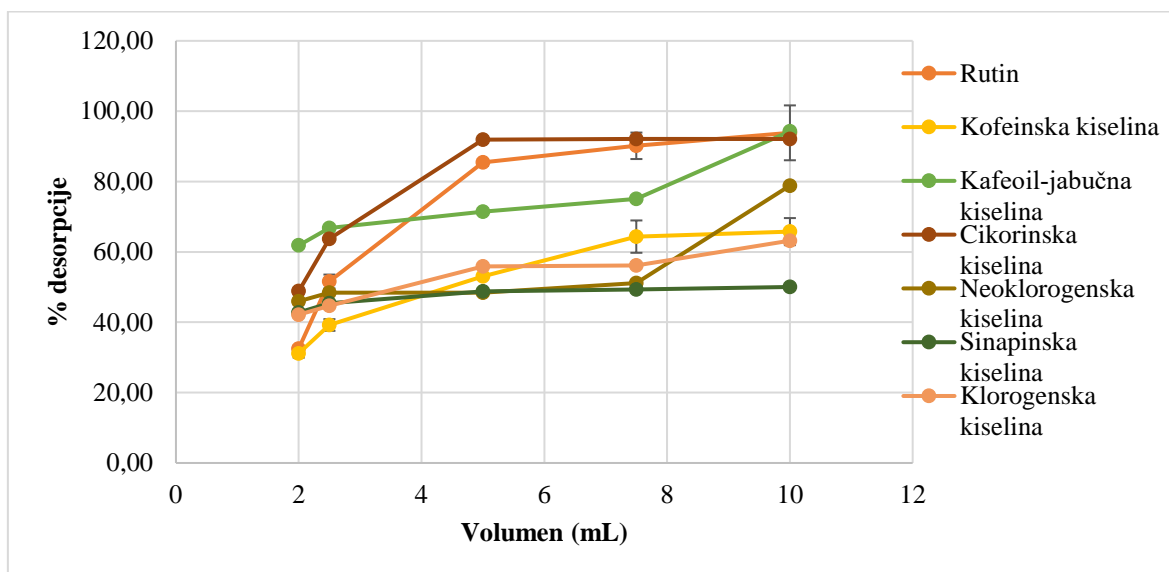
Tablica 54. Desorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt koprive

Naziv smole	Desorbens	Desorpcijski prinos (%)						
		Kofeinska kiselina	Klorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Cikorinska kiselina	Rutin
HP20	voda	0,00	15,41±1,26	0,00	4,55±0,20	0,00	0,00	0,00
	30 % etanol	10,77±0,67	39,39±0,17	60,34±0,46	29,92±0,81	0,00	0,00	0,00
	50 % etanol	26,09±0,32	49,04±0,82	60,19±1,01	48,48±0,77	0,00	0,00	40,70±0,84
	70 % etanol	35,82±1,45	54,50±0,82	63,67±0,60	54,73±1,84	98,68±0,60	0,00	37,90±1,97
	etanol	40,34±0,41	60,90±0,46	79,52±0,83	52,19±0,34	92,79±1,71	97,70±0,76	34,79±0,89
XAD7HP	metanol	31,27±1,16	46,02±0,66	80,39±1,60	56,24±1,66	0,00	0,00	42,70±0,47
	voda	0,00	8,39±0,77	66,81±0,15	0,00	0,00	0,00	0,00

Naziv smole	Desorbens	Desorpcijski prinos (%)						
XAD16N	30 % etanol	6,31±0,70	32,38±0,71	67,17±0,85	26,29±1,77	0,00	0,00	0,00
	50 % etanol	40,35±0,90	54,96±0,25	68,49±1,74	71,19±1,37	76,35±1,51	0,00	82,33±1,36
	70 % etanol	57,28±0,27	53,31±0,42	81,56±1,01	79,08±1,07	0,00	0,00	92,65±0,66
	etanol	70,09±0,79	49,45±1,21	86,07±1,81	75,29±1,80	0,00	0,00	91,71±1,96
	metanol	37,62±0,34	45,71±1,11	73,55±1,16	57,24±0,45	74,20±1,50	0,00	72,24±1,51
	voda	0,00	14,19±0,89	0,00	3,94±1,36	0,00	0,00	0,00
	30 % etanol	20,41±0,19	41,27±0,67	50,00±0,17	45,54±1,66	0,00	0,00	23,90±0,55
	50 % etanol	32,16±0,36	57,53±0,54	53,78±1,84	64,93±0,91	0,00	0,00	46,25±0,91
	70 % etanol	44,79±1,48	57,55±0,09	41,89±0,36	72,08±0,23	50,59±1,69	89,00±0,74	60,81±0,87
	etanol	53,96±0,27	54,34±1,27	94,61±0,71	73,01±1,03	63,17±0,92	0,00	34,79±1,93
	metanol	39,61±1,18	50,93±0,79	84,48±0,81	67,68±1,65	59,10±0,20	97,15±0,60	43,18±0,28
	voda	0,00	13,14±0,70	0,00	2,84±0,33	0,00	0,00	0,00
HP21	30 % etanol	30,11±0,33	46,70±1,07	53,99±0,13	41,38±0,22	0,00	90,78±1,20	25,67±0,26
	50 % etanol	42,74±0,65	57,46±0,49	61,55±0,15	52,64±0,16	0,00	86,71±0,54	40,70±0,85
	70 % etanol	47,63±1,71	60,31±1,48	91,59±0,62	62,90±0,51	98,37±1,48	95,56±1,99	46,45±1,14
	etanol	47,48±0,24	60,05±1,06	99,80±1,38	68,42±1,76	0,00	93,64±0,76	52,16±0,56
	metanol	37,61±0,39	61,31±1,26	82,89±0,99	66,24±0,45	0,00	90,55±0,74	46,41±0,12
	voda	0,00	4,80±0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HP2MG	30 % etanol	0,00	27,83±0,38	0,00	13,57±1,21	0,00	0,00	0,00
	50 % etanol	39,88±1,51	48,05±1,70	83,22±1,78	66,43±0,64	0,00	76,85±1,87	77,51±1,61
	70 % etanol	46,06±0,89	47,15±1,37	99,68±1,74	67,25±1,76	0,00	72,67±1,12	81,89±1,14
	etanol	18,11±0,94	31,84±0,49	77,21±1,88	70,43±0,17	0,00	73,73±1,34	72,94±1,49
	metanol	0,00	7,30±0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Slika 34. Utjecaj vremena desorpcije na udio fenolnih kiselina i rutina iz ekstrakta koprive u desorbensu (70 % etanol) primjenom smole XAD7HP



Slika 35. Utjecaj volumena desorbensa na udio fenolnih kiselina i rutina iz ekstrakta koprive u desorbensu (70 % etanol) primjenom smole XAD7HP

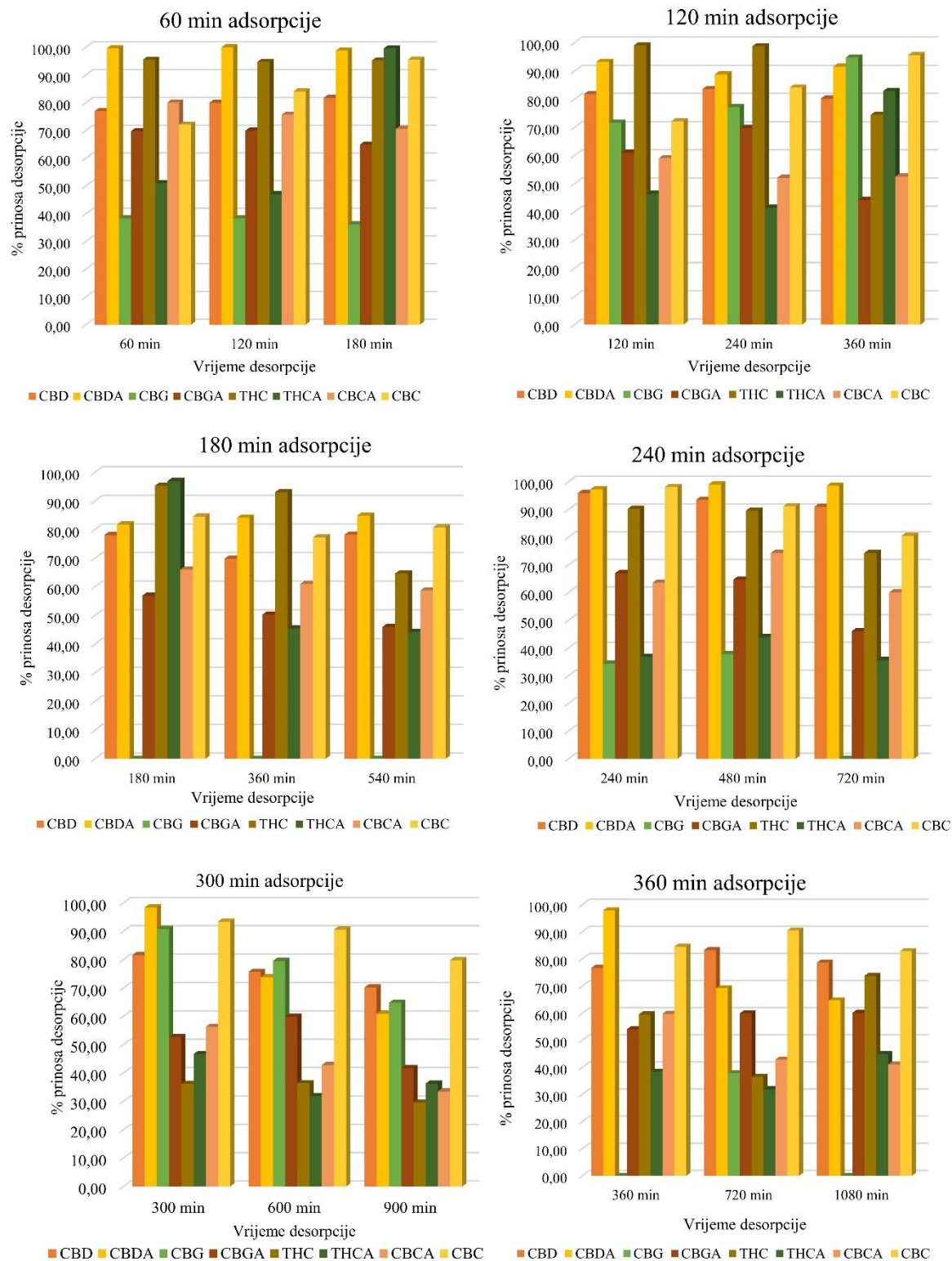
Tablica 55. Adsorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt industrijske konoplje

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)								
	CBD	CBDA	CBG	CBGA	THC	THCA	CBCA	CBC	CBDVA
HP20	6,1377	138,8151	3,3328	6,9164	2,4279	5,0814	16,3605	2,0927	0,9321
XAD7HP	5,4877	131,0151	1,5578	6,8664	2,3279	4,3814	15,0855	1,9677	0,8821
XAD16N	6,0877	140,0651	3,3328	7,0664	2,6779	6,0064	16,4105	2,1427	0,8821
HP21	7,2377	197,2651	1,4578	8,4414	1,9529	3,7814	13,8355	2,9677	1,7321
HP2MG	5,0127	124,8901	1,7578	6,9164	2,5029	4,3314	14,2355	2,2927	0,8821
	Adsorpcijski prinos (%)								
HP20	43,58±2,17	45,98±1,97	100±0,00	46,99±1,81	49,61±1,83	59,38±7,44	52,58±1,74	50,30±0,47	50,65±0,79
XAD7HP	39,04±1,51	43,39±2,67	46,54±1,81	46,71±±0,97	54,13±7,97	51,34±8,36	48,50±2,18	47,49±0,42	50,79±3,33
XAD16N	43,21±2,05	46,39±0,55	100±0,00	48,00±1,51	62,37±1,66	99,52±0,07	52,77±1,91	51,28±1,14	50,65±0,79
HP21	51,34±0,73	65,33±0,27	43,84±1,66	57,40±1,50	39,87±1,01	44,24±1,02	44,44±0,97	65,84±0,01	100,00±0,00
HP2MG	35,50±0,94	41,36±1,02	52,80±2,52	46,93±1,56	51,15±5,75	50,56±8,44	45,76±1,86	55,24±1,60	50,03±2,04

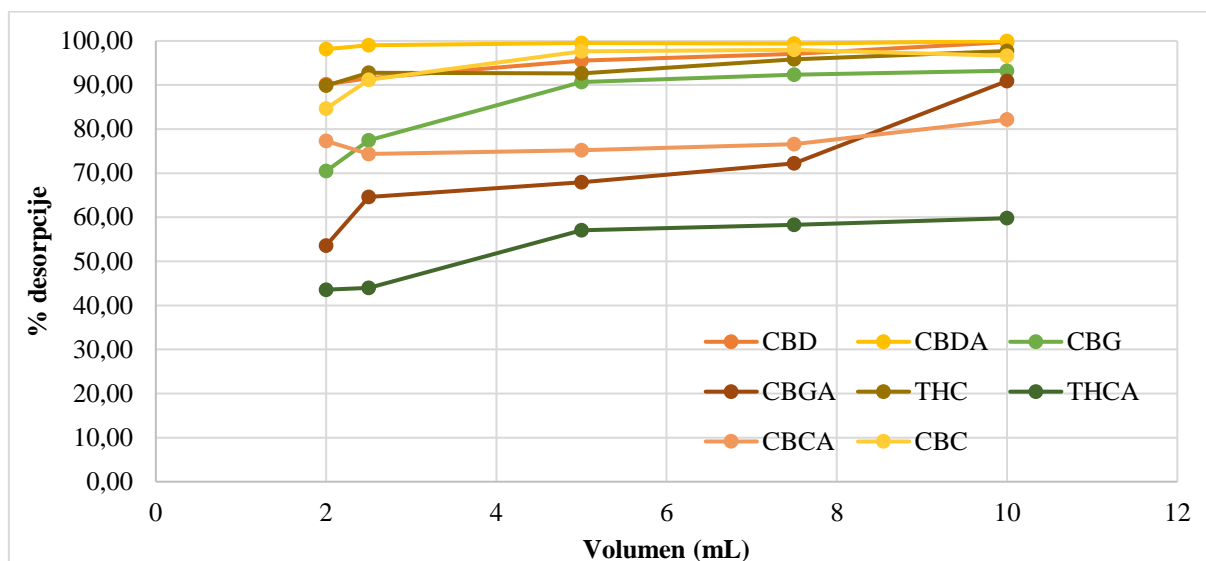
Tablica 56. Desorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt industrijske konoplje

Naziv smole	Desorbens	Desorpcijski prinos (%)								
		CBD	CBDA	CBG	CBGA	THC	THCA	CBCA	CBC	CBDVA
HP20	etanol	59,32±0,74	51,27±1,18	0	46,40±1,16	48,23±1,71	29,98±0,86	40,93±0,87	65,71±1,84	0
	DMSO	68,99±0,99	50,27±1,48	0	48,22±1,68	32,15±0,34	30,09±0,80	44,02±1,13	71,61±1,32	0
	metanol	53,07±0,56	42,26±1,49	0	45,76±1,37	42,49±0,54	22,12±0,58	34,75±0,34	63,51±0,39	0
XAD7HP	etanol	67,31±0,09	58,95±0,39	0	46,49±1,99	43,29±1,56	31,45±0,94	44,09±1,59	72,38±1,79	0
	DMSO	68,56±0,54	47,62±1,18	0	43,90±1,08	56,03±0,73	28,38±0,94	44,33±0,73	72,14±0,72	0
	metanol	72,83±1,10	50,74±1,36	0	46,39±1,84	57,69±1,54	38,56±0,20	40,85±0,62	70,38±0,78	0
XAD16N	etanol	66,58±0,68	54,08±1,70	0	53,46±1,45	52,09±1,81	17,90±1,53	42,91±0,75	69,10±0,48	0

Naziv smole	Desorbens	Desorpcijski prinos (%)									
	DMSO	60,78±0,86	53,71±1,71	0	58,07±1,70	57,51±0,38	13,58±1,44	42,21±0,93	67,62±0,59	0	
	metanol	55,58±0,10	46,81±1,75	0	35,24±1,26	18,69±0,93	12,32±1,58	34,47±1,72	55,85±1,96	0	
	etanol	87,83±1,75	67,59±0,31	0	66,00±1,82	90,95±0,89	59,53±1,97	68,56±1,85	99,99±1,33	0	
HP21	DMSO	88,80±0,70	60,54±1,01	0	65,24±1,63	87,66±0,32	62,85±1,36	76,27±0,93	89,40±1,16	0	
	metanol	68,12±1,31	51,80±0,86	0	43,29±1,66	59,92±1,51	42,39±0,68	51,81±0,29	80,27±1,15	0	
	etanol	79,31±1,19	56,39±0,40	0	45,85±1,49	45,44±0,63	43,17±0,84	47,54±1,85	70,90±1,82	0	
HP2MG	DMSO	79,28±1,55	50,45±0,44	0	39,60±1,33	41,34±1,62	28,31±1,03	41,57±1,14	71,55±1,76	0	
	metanol	78,18±0,75	55,17±0,25	0	45,95±1,18	42,80±1,86	29,32±0,81	46,09±1,77	84,35±0,93	0	



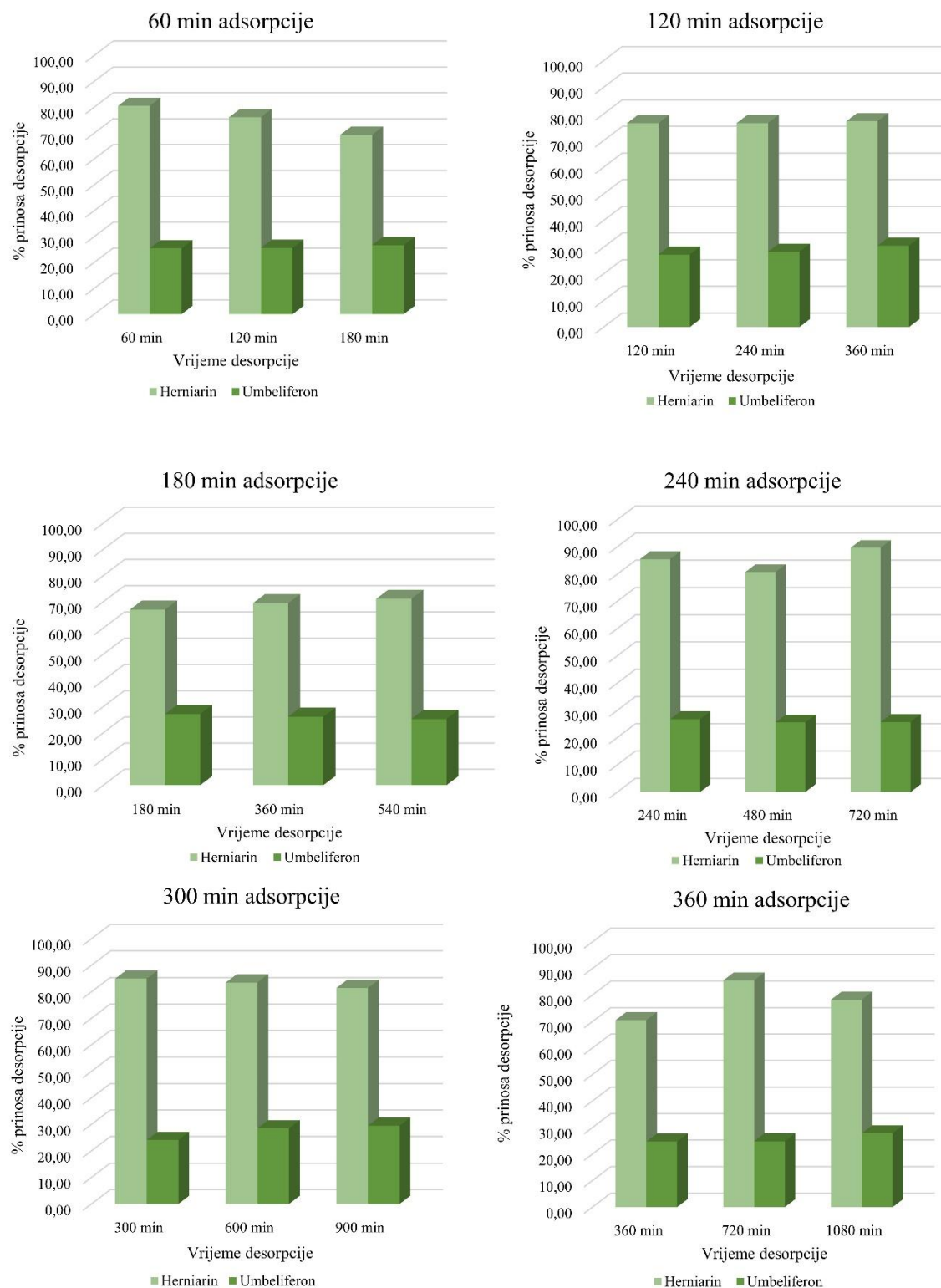
Slika 36. Utjecaj vremena desorpcije na udio kanabinoida u desorbensu iz ekstrakta industrijske konoplje u desorbensu (etanol) primjenom smole HP21



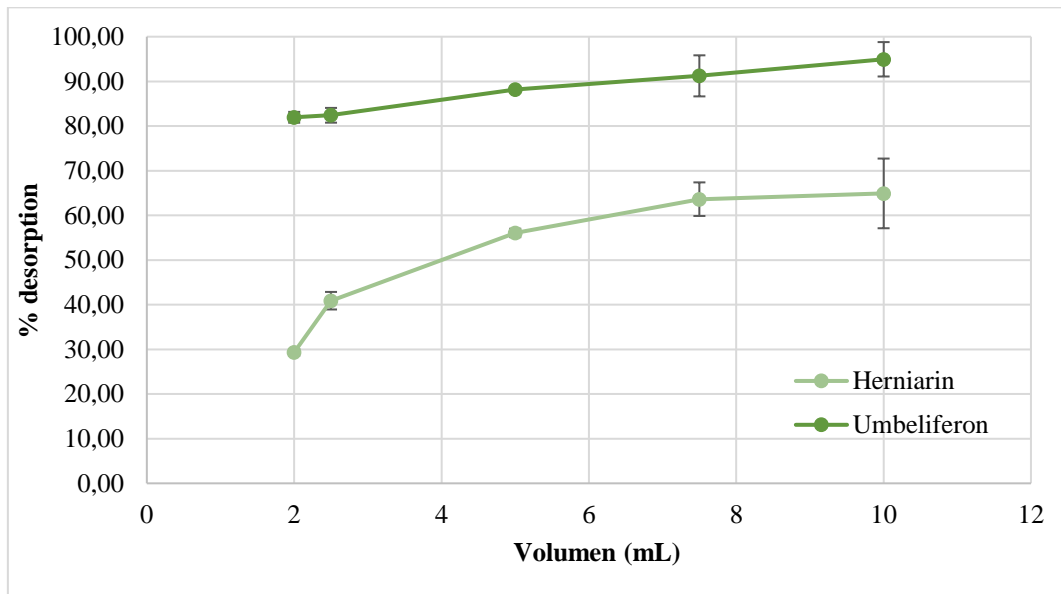
Slika 37. Utjecaj volumena desorbensa na udio kanabinoida iz ekstrakta konoplje u desorbensu (etanol) primjenom smole HP21

Tablica 57. Adsorpcijske i desorpcijske mogućnosti različitih smola upotrijebljenih za optimalni DES ekstrakt lavande

Naziv smole	Adsorpcijski kapacitet (mg/g)		Adsorpcijski prinos (%)		Desorbens	Desorpcijski prinos (%)	
	Umbeliferon	Herniarin	Umbeliferon	Herniarin		Umbeliferon	Herniarin
HP20	5,16±0,04	18,57±0,23	87,55±0,84	48,50±0,24	etanol	0	77,29±0,46
					DMSO	0	78,84±0,15
					metanol	0	76,62±0,91
XAD7HP	4,88±0,21	18,18±0,72	81,69±1,82	47,49±0,53	etanol	0	80,95±0,39
					DMSO	25,52±0,12	89,74±0,20
					metanol	0	87,00±0,05
XAD16N	4,91±0,16	18,02±0,16	85,14±1,80	46,25±0,92	etanol	0	82,93±0,40
					DMSO	0	79,41±0,27
					metanol	0	78,75±0,21
HP21	5,04±0,11	17,92±0,31	84,89±1,21	46,30±0,64	etanol	0	81,42±0,64
					DMSO	0	81,44±0,36
					metanol	0	79,27±0,41
HP2MG	5,07±0,01	19,19±0,07	86,67±1,53	50,23±0,81	etanol	0	76,78±0,12
					DMSO	22,38±0,60	88,19±0,1
					metanol	0	84,09±0,28



Slika 38. Utjecaj vremena desorpcije na udio herniarina i umbeliferona iz ekstrakta lavande u desorbensu (DMSO) primjenom smole XAD7HP



Slika 39. Utjecaj volumena desorbensa na udio umbeliferona i herniarina iz ekstrakta lavande u desorbensu (DMSO) primjenom smole XAD7HP

4.7. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola

Tablica 58. Učinkovitost ekstrakcije, adsorpcije i desorpcije za odabrani reciklirani DES15 i makroporoznu smolu za karnosolnu kiselinu i karnosol iz ekstrakta kadulje

Naziv smole	Broj ciklusa	Učinkovitost ekstrakcije (%)		Adsorpcijski prinos (%)		Desorpcijski prinos (%)	
		Karnosolna kiselina	Karnosol	Karnosolna kiselina	Karnosol	Karnosolna kiselina	Karnosol
XAD7HP	1	97,64±0,03	96,63±0,04	91,79±0,65	94,28±0,06	95,09±1,22	92,51±1,71
	2	93,10±0,66	94,38±0,27	83,07±0,53	86,20±0,48	89,38±0,63	89,38±0,88
	3	88,94±1,15	91,19±0,36	77,28±1,42	78,23±0,49	79,49±1,04	84,94±0,36

Tablica 59. Učinkovitost ekstrakcije, adsorpcije i desorpcije za odabrani reciklirani DES1 i makroporoznu smolu za fenolne kiseline i HT iz ekstrakta vrkute

Naziv smole	Broj ciklusa	Učinkovitost ekstrakcije (%)			Adsorpcijski prinos (%)			Desorpcijski prinos (%)		
		Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT	Galna kiselina	Elaginska kiselina	HT
XAD16N	1	97,64±0,03	96,63±0,04	79,41±1,76	91,79±0,65	94,28±0,06	66,54±1,46	95,09±1,22	92,51±1,71	67,71±0,91
	2	93,10±0,66	94,38±0,27	77,01±0,25	83,07±0,53	86,20±0,48	46,47±1,83	89,38±0,63	89,38±0,88	63,68±0,98
	3	88,94±1,15	91,19±0,36	69,00±0,21	77,28±1,42	78,23±0,49	37,65±0,37	79,49±1,04	84,94±0,36	46,21±1,29

Tablica 60. Učinkovitost ekstrakcije, adsorpcije i desorpcije za odabrani reciklirani DES15 i makroporoznu smolu za fenolne kiseline i HT iz ekstrakta koprive

Naziv smole	Broj ciklusa	Učinkovitost ekstrakcije (%)						
		Kofeinska kiselina	Klorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Cikorinska kiselina	Rutin
XAD7HP	1	91,39±0,25	95,52±0,54	96,52±0,20	83,25±0,11	89,51±0,74	92,85±0,20	94,91±0,72
	2	85,54±0,43	85,68±0,44	86,35±0,03	79,56±0,58	68,09±0,25	89,60±0,93	81,62±0,81
	3	78,60±0,21	75,65±0,60	79,94±0,93	68,38±0,69	58,62±0,62	79,44±0,68	71,03±0,33
Naziv smole	Broj ciklusa	Adsorpcijski prinos (%)						
		Kofeinska kiselina	Klorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Cikorinska kiselina	Rutin
XAD7HP	1	91,71±0,33	80,09±0,28	75,29±0,19	71,19±0,29	92,79±0,12	81,89±0,51	91,71±0,90
	2	81,89±0,51	64,79±0,61	64,39±0,08	66,43±0,57	74,20±0,35	72,24±0,33	82,23±0,42
	3	72,94±0,24	53,96±0,16	56,24±0,48	57,24±0,19	63,17±0,10	60,81±0,53	77,51±0,89
Naziv smole	Broj ciklusa	Desorpcijski prinos (%)						
		Kofeinska kiselina	Klorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kafeoil-jabučna kiselina	Sinapinska kiselina	Cikorinska kiselina	Rutin
XAD7HP	1	90,67±0,11	83,90±0,25	82,33±0,06	87,51±0,88	92,74±0,71	86,09±0,72	92,16±0,39
	2	80,70±0,45	76,25±0,81	72,65±0,28	71,89±0,06	87,63±0,91	75,82±0,76	87,26±0,63
	3	72,16±0,41	60,81±0,79	61,71±0,38	62,94±0,24	66,45±0,12	60,34±0,56	77,25±0,18

Tablica 61. Učinkovitost ekstrakcije, adsorpcije i desorpcije za odabrani reciklirani hDES2 i makroporoznu smolu za kanabinoide iz ekstrakta industrijske konoplje

Naziv smole	Broj ciklusa	Učinkovitost ekstrakcije (%)								
		CBD	CBDA	CBG	CBGA	THC	THCA	CBCA	CBC	CBDVA
HP21	1	97,83±1,08	93,08±0,59	62,55±0,83	90,95±0,69	89,93±0,92	88,56±3,83	88,99±1,09	85,84±0,57	80,90±0,17
	2	88,20±0,88	87,05±0,54	52,60±0,60	87,66±0,69	82,85±0,96	76,26±0,28	72,40±0,99	76,19±0,44	71,55±0,31
	3	68,12±0,98	70,98±0,80	40,98±0,94	79,92±0,47	72,39±0,62	61,81±0,79	70,27±0,82	70,39±0,83	64,35±0,49
Naziv smole	Broj ciklusa	Adsorpcijski prinos (%)								
		CBD	CBDA	CBG	CBGA	THC	THCA	CBCA	CBC	CBDVA
HP21	1	82,32±0,48	91,27±0,37	71,43±0,21	88,23±0,46	89,98±0,52	90,93±0,62	95,71±0,55	91,24±0,83	84,37±0,24
	2	78,99±0,25	80,27±0,72	53,11±0,09	72,15±0,32	80,09±0,67	84,02±0,99	81,61±0,59	84,46±0,49	76,28±0,63
	3	63,07±0,99	69,26±0,35	49,12±0,92	62,49±0,40	72,12±0,47	74,75±0,24	73,51±0,54	74,13±0,32	69,13±0,10
Naziv smole	Broj ciklusa	Desorpcijski prinos (%)								
		CBD	CBDA	CBG	CBGA	THC	THCA	CBCA	CBC	CBDVA
HP21	1	76,58±0,50	84,08±0,68	0	92,09±0,48	87,90±0,61	92,91±0,81	89,10±0,58	89,76±0,50	0
	2	60,78±0,30	73,71±0,40	0	87,51±0,47	83,58±0,46	82,81±0,88	67,62±0,22	77,15±0,88	0
	3	55,58±0,86	66,81±0,38	0	78,69±0,28	72,32±0,42	74,47±0,19	55,85±0,32	68,82±0,85	0

Tablica 62. Učinkovitost ekstrakcije, adsorpcije i desorpcije za odabrani reciklirani hDES2 i makroporoznu smolu za kumarine iz ekstrakta lavande

Naziv smole	Broj ciklusa	Učinkovitost ekstrakcije (%)		Adsorpcijski prinos (%)		Desorpcijski prinos (%)	
		Umbeliferon	Herniarin	Umbeliferon	Herniarin	Umbeliferon	Herniarin
XAD7HP	1	86,99±0,30	92,33±1,18	94,24±0,22	91,33±1,11	87,98±0,79	92,20±0,69
	2	80,54±0,73	83,44±0,52	81,31±0,72	83,44±0,27	82,29±0,71	90,81±0,66
	3	75,17±1,46	78,29±1,61	75,27±1,46	73,34±3,42	72,84±0,10	81,81±0,66

4.8. Antiradikalna i antibakterijska aktivnost ekstrakata

Tablica 63. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata kadulje (250 µg/mg) tretiranima makroporoznim smolama

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP20	voda	2	2,5	6,54±1,57	50	25	25	25
	50 % etanol			33,95±0,40	50	25	25	25
	70 % etanol			41,94±0,63	50	25	25	25
	etanol			44,53±0,24	50	25	13	25
XAD7HP	voda	2	2,5	6,80±0,42	50	25	13	25
	50 % etanol			19,78±0,59	50	25	13	25
	70 % etanol			33,86±0,89	50	25	13	25
	etanol			41,26±0,82	50	25	13	25
XAD16N	voda	2	2,5	16,26±0,82	50	25	25	25
	50 % etanol			19,65±0,39	50	25	25	25
	70 % etanol			42,87±0,51	50	25	13	25

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
HP21	etanol	2	2,5	41,87±1,64	50	25	13	25
	voda			10,77±0,42	50	25	25	25
	50 % etanol			21,64±0,59	50	25	25	25
	70 % etanol			39,88±0,89	50	25	25	25
	etanol			41,17±0,82	50	25	13	25
HP2MG	70 % etanol	2	2,5	42,03±0,36	50	25	13	25
	etanol			42,03±0,36	50	25	13	25
	Gentamicin				0,98	0,98	1,95	3,91

Tablica 64. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata kadulje tretiranim odabranom makroporoznom smolom uz različitih volumen desorbensa

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	EC ₅₀ (µg /mL)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
XAD7HP	etanol	1	1	379,50±13,62	50	25	13	25
			2	314,87±6,25	50	25	13	25
			2,5	266,12±5,62	50	25	13	25
			5	237,26±3,57	50	25	13	25
			7,5	233,19±1,81	50	25	13	25
			10	211,76±2,29	100	50	25	100
Gentamicin					0,98	0,98	1,95	3,91

Tablica 65. Prikaz antibakterijske aktivnosti ekstrakata kadulje dobivenima primjenom konvencionalnih otapala i DES15

	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
			<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
voda			938	938	938	938
50 % etanol	30	90	436	436	436	234
70 % etanol			436	436	436	234
etanol			436	436	436	234
voda			938	938	938	938
50 % etanol	50	90	436	436	436	234
70 % etanol			436	436	436	234
etanol			436	436	436	234
voda			938	938	938	938
50 % etanol	70	90	436	436	436	234
70 % etanol			436	436	436	234
etanol			436	436	436	234
DES ekstrakt			59	59	59	29

Tablica 66. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata vrkute (50 µg/mL) tretiranima makroporoznim smolama

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP20	voda	2	2,5	10,82±0,27	12,5	25	25	25
	30 % etanol			58,47±0,80	12,5	25	25	25
	50 % etanol			68,10±0,11	12,5	25	25	25
	70 % etanol			74,53±1,07	12,5	25	25	25
	etanol			84,96±3,44	25	25	25	25
XAD7HP	voda	2	2,5	13,35±0,38	50	50	25	25
	30 % etanol			41,81±1,12	25	12,5	12,5	12,5
	50 % etanol			78,00±0,16	12,5	12,5	12,5	12,5
	70 % etanol			82,99±0,16	12,5	12,5	12,5	12,5
	etanol			82,89±0,82	12,5	12,5	12,5	12,5
XAD16N	voda	2	2,5	10,93±0,32	12,5	12,5	25	25
	30 % etanol			50,00±0,38	12,5	12,5	12,5	25
	50 % etanol			68,24±0,28	12,5	12,5	12,5	25
	70 % etanol			89,39±0,38	12,5	12,5	12,5	25
	etanol			89,07±0,28	12,5	12,5	25	25
HP21	voda	2	2,5	13,74±0,28	100	50	100	100
	30 % etanol			54,99±0,79	50	50	50	50
	50 % etanol			56,18±1,26	25	25	25	25
	70 % etanol			63,98±0,43	12,5	25	25	25
	etanol			85,52±0,32	12,5	25	25	25
HP2MG	voda	2	2,5	23,82±0,31	12,5	25	25	12,5
	30 % etanol			56,32±2,67	12,5	25	25	12,5
	50 % etanol			68,06±0,95	12,5	25	25	12,5
	70 % etanol			94,10±0,21	12,5	25	25	12,5
	etanol			83,87±0,58	12,5	25	25	12,5
	Amikacin sulfat				0,015	0,015	0,031	0,015

Tablica 67. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata vrkute tretiranim odabranom makroporoznom smolom uz različitih volumena desorbensa

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
XAD16N	70 % etanol	8	2	25,17 ± 0,14	25	12,5	12,5	12,5
			2,5	28,50 ± 0,22	12,5	12,5	12,5	12,5
			5	21,49 ± 0,10	12,5	6,25	12,5	6,25
			7,5	24,62 ± 0,22	12,5	6,25	12,5	6,25
			10	23,38 ± 0,10	12,5	6,25	12,5	6,25
	Amikacin sulfat				0,015	0,015	0,031	0,015

Tablica 68. Prikaz antibakterijske aktivnosti ekstrakata vrkute (50 µg/mL) dobivenima primjenom konvencionalnih otapala i DES1

	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Voda	30	90	49,51±0,09	3,125	12,5	6,250	12,5
30 % etanol	70	30	55,34±2,62	1,563	6,25	3,125	6,25
50 % etanol	70	30	49,51±0,09	1,563	3,125	1,563	1,563
70 % etanol	70	60	62,41±1,25	1,563	1,563	0,781	0,781
Etanol	30	90	14,40±0,74	1,563	0,781	0,391	0,391
DES ekstrakt			88,65±0,21	78,13	78,13	156,25	78,13

Tablica 69. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata koprive (1 mg/mL) tretiranima makroporoznim smolama

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP20	voda	2	2,5	12,23±0,30	0,156	0,313	0,156	0,313
	30 % etanol			32,66±3,08	0,156	0,156	0,156	0,313
	50 % etanol			35,49±0,32	0,156	0,156	0,156	0,313
	70 % etanol			35,31±1,31	0,156	0,156	0,156	0,313
	etanol			31,89±0,38	0,156	0,156	0,156	0,313
XAD7HP	voda	2	2,5	1,75±0,22	0,391	0,391	0,781	0,781
	30 % etanol			41,81±0,39	0,391	0,391	0,781	0,781
	50 % etanol			38,32±0,16	0,391	0,195	0,391	0,781
	70 % etanol			45,97±0,37	0,391	0,391	0,391	0,391
	etanol			38,53±0,26	0,391	0,391	0,391	0,391
XAD16N	voda	2	2,5	7,13±1,05	0,781	0,781	0,781	0,781
	30 % etanol			29,97±1,10	0,391	0,391	0,781	0,781
	50 % etanol			35,98±0,48	0,391	0,391	0,781	0,781
	70 % etanol			45,69±1,27	0,391	0,195	0,391	0,781
	etanol			39,05±0,42	0,391	0,391	0,391	0,781
HP21	voda	2	2,5	2,34±0,64	0,156	0,313	0,00781	0,313
	30 % etanol			25,64±1,43	0,156	0,156	0,313	0,313
	50 % etanol			41,77±0,47	0,156	0,156	0,156	0,313
	70 % etanol			49,95±1,52	0,156	0,156	0,156	0,313
	etanol			48,59±1,79	0,156	0,156	0,156	0,313
HP2MG	voda	2	2,5	1,19±0,21	0,156	0,156	0,313	0,313
	30 % etanol			21,66±0,54	0,156	0,156	0,313	0,313
	50 % etanol			32,97±0,40	0,156	0,156	0,313	0,313
	70 % etanol			38,07±0,18	0,156	0,156	0,313	0,313
	etanol			43,42±0,54	0,078	0,156	0,156	0,156
	Ciprofloxacin				0,98	0,98	1,95	3,91

Tablica 70. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata koprive tretiranim odabranom makroporoznom smolom uz različitih volumena desorbensa

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
XAD7HP	70 % etanol	1	2	280,65±1,22	0,098	0,098	0,195	0,195
			2,5	302,43±0,99	0,079	0,079	0,156	0,156
			5	322,48±2,63	0,079	0,079	0,156	0,156
			7,5	772,31±3,56	0,052	0,052	0,105	0,209
			10	839,95±5,69	0,079	0,079	0,156	0,156
	Ciprofloxacilin				0,0020	0,0039	0,0020	0,0078

Tablica 71. Prikaz antiradikalne antibakterijske aktivnosti ekstrakata koprive (1 mg/mL) dobivenima primjenom konvencionalnih otapala i DES15

Otapalo	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Voda	70	30	49,51±0,09	12,5	6,25	3,125	3,125
30% etanol	50	30	55,34±2,62	12,5	6,25	3,125	3,125
50% etanol	30	90	55,96±0,42	6,25	3,125	1,563	3,125
70% etanol	50	30	62,41±1,25	3,125	3,125	3,125	1,563
Etanol	70	90	14,00±0,37	3,125	1,563	1,563	1,563
DES ekstrakt			88,38±0,96	0,098	0,098	0,098	0,195

Tablica 72. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje (250 µg/mL) tretiranima makroporoznim smolama

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP20	etanol	2	2,5	18,15±0,89	0,0098	0,002	0,0049	0,01953
	DMSO			14,54±1,07	0,0098	0,002	0,0049	0,01953
XAD7HP	etanol	2	2,5	12,14±0,31	0,0098	0,002	0,01953	0,01953
	DMSO			12,36±1,16	0,0020	0,00098	0,0098	0,0049
XAD16N	etanol	2	2,5	15,32±0,67	0,0098	0,0020	0,0049	0,01953
	DMSO			14,97±1,17	0,0195	0,0049	0,0098	0,0195
HP21	etanol	2	2,5	17,64±1,73	0,0098	0,0039	0,0049	0,0195
	DMSO			19,22±0,29	0,0049	0,0020	0,0049	0,0195
HP2MG	etanol	2	2,5	12,28±0,69	0,0391	0,0020	0,0195	0,0195
	DMSO			11,77±0,67	0,0391	0,0098	0,0098	0,0195
	Ciprofloxacin				0,0020	0,0039	0,0078	0,0039

Tablica 73. Prikaz antibakterijske aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje tretiranim odabranom makroporoznom smolom uz različitih volumena desorbensa

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP21	etanol	4	2	0,0098	0,0049	0,0049	0,0049
			2,5	0,0078	0,0078	0,0020	0,0039
			5	0,0391	0,0195	0,0049	0,0098
			7,5	0,0262	0,0065	0,0033	0,0131
			10	0,0195	0,0024	0,0049	0,0195
	Ciprofloxacin		0,0020	0,0039	0,0020	0,0078	

Tablica 74. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje (250 µg/mL) dobivenima primjenom konvencionalnih otapala i hDES2

	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Voda	70	30	21,47±1,44	0,7813	0,1953	0,1953	0,3901
30 % etanol	70	60	43,18±2,27	0,7813	0,3906	3,125	3,125
50 % etanol	70	60	51,23±1,38	0,0244	0,0122	0,3906	3,125
70 % etanol	70	30	43,09±1,02	0,7813	0,1953	0,3906	1,5625
Etanol	70	30	18,80±1,26	0,0122	0,0098	0,0977	0,1953
hDES ekstrakt			20,09±1,93	0,0244	0,0122	0,0244	0,0098

Tablica 75. Prikaz antiradikalne i antibakterijske aktivnosti ekstrakata lavande (250 µg/mL) tretiranim makroporoznim smolama

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
					<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
HP20	etanol	2	2,5	29,69±0,53	0,0781	0,0781	0,0781	0,0391
	DMSO			25,86±0,21	0,0391	0,0391	0,0391	0,0391
XAD7HP	etanol	2	2,5	9,36±0,69	0,0391	0,0391	0,0391	0,0195
	DMSO			29,53±0,12	0,0391	0,0391	0,0781	0,0195
XAD16N	etanol	2	2,5	16,03±0,12	0,0391	0,0391	0,0391	0,0195
	DMSO			15,16±0,53	0,0195	0,0781	0,0781	0,0781
HP21	etanol	2	2,5	3,19±0,18	0,0781	0,1563	0,0781	0,0391
	DMSO			24,56±0,12	0,0781	0,0781	0,0781	0,0781
HP2MG	etanol	2	2,5	20,45±0,18	0,0195	0,0391	0,0391	0,0391
	DMSO			14,96±1,25	0,0195	0,0391	0,0781	0,0195
	Ciprofloxacin				0,0020	0,0039	0,0078	0,0039

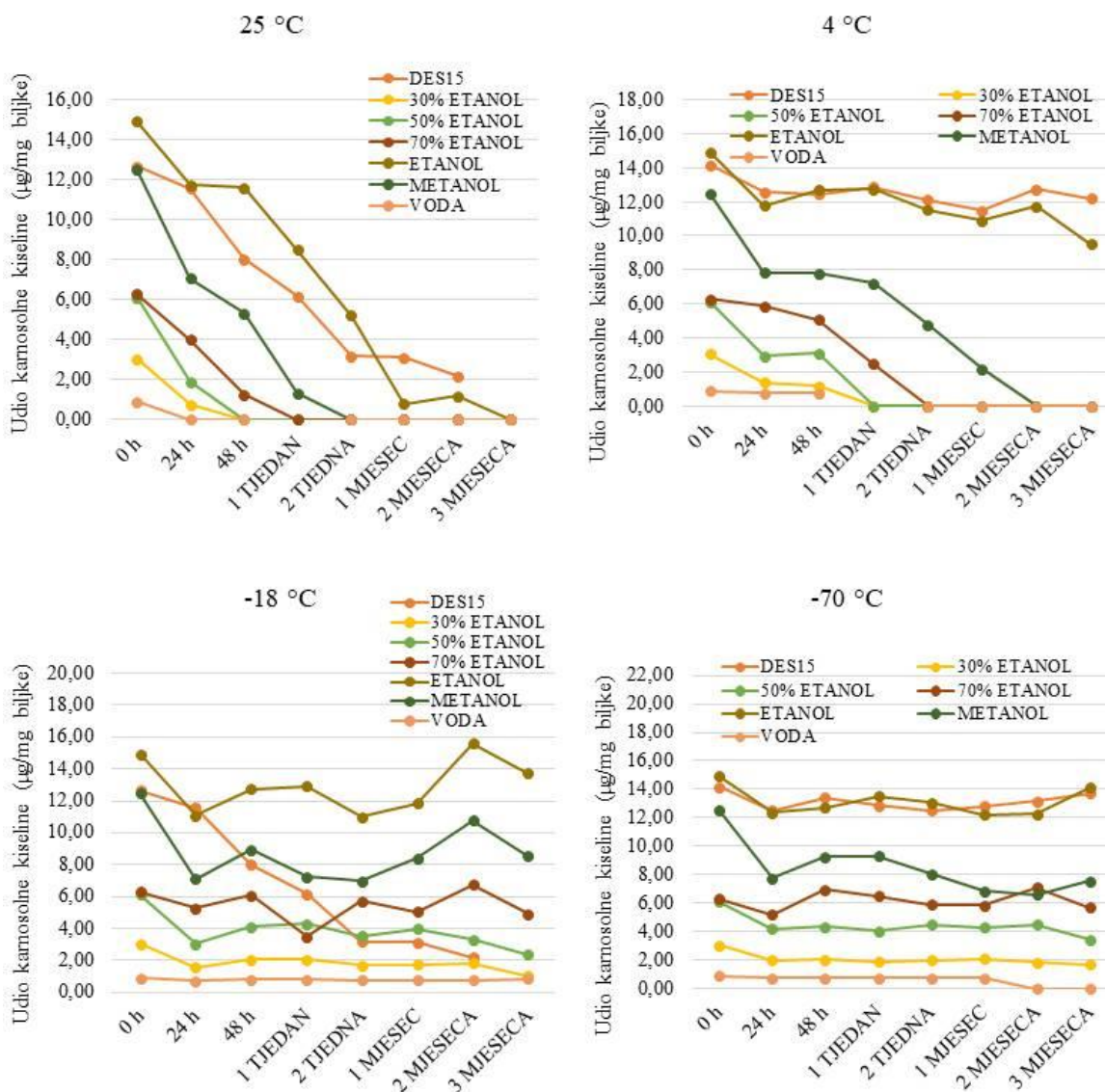
Tablica 76. Prikaz antibakterijske aktivnosti ekstrakata lavande tretiranim odabranom makroporoznom smolom uz različitih volumen desorbensa

Naziv smole	Desorbens	Vrijeme desorpcije (h)	Volumen desorbensa (mL)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
XAD7HP	DMSO	4	2	0,0488	0,0977	0,0977	0,1953
			2,5	0,1563	0,1563	0,1563	0,1563
			5	0,0781	0,0781	0,0781	0,0781
			7,5	0,0547	0,0547	0,0547	0,0547
			10	0,0391	0,0391	0,0391	0,0391
			Ciprofloxacina	0,0020	0,0039	0,0078	0,0039

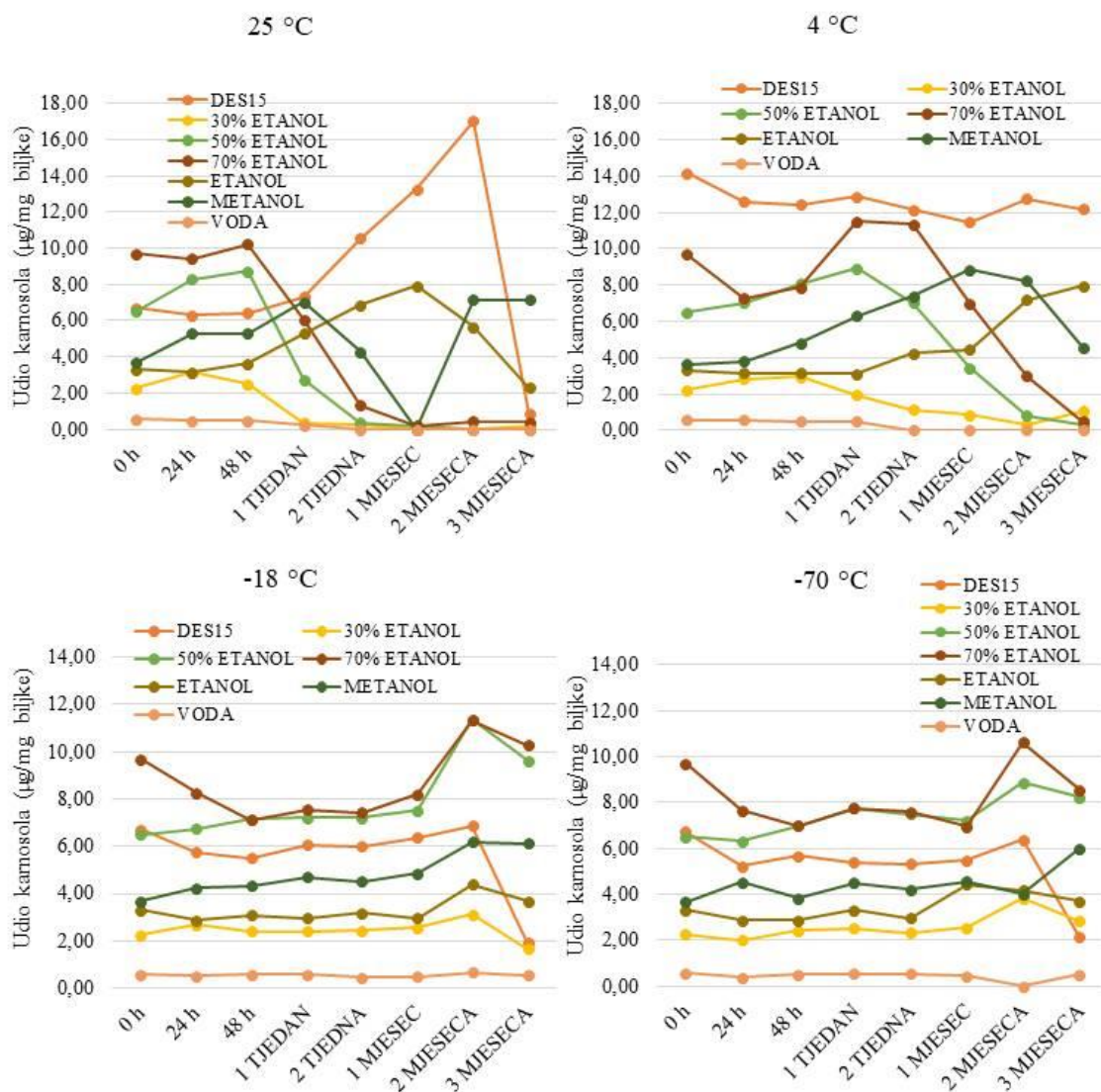
Tablica 77. Prikaz antibakterijske aktivnosti ekstrakata lavande (250 µg/mL) dobivenima primjenom konvencionalnih otapala i hDES2

	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Inhibicija DPPH radikala (%)	Minimalna inhibitorna koncentracije (µg/mL)			
				<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Voda	70	30	21,47±1,44	1,5625	3,125	3,125	1,5625
30 % etanol	70	60	43,18±2,27	3,125	6,25	3,125	6,25
50 % etanol	70	60	51,23±1,38	6,25	3,125	3,125	3,125
70 % etanol	70	30	43,09±1,02	6,25	3,125	3,125	6,25
Etanol	70	30	18,80±1,26	0,0488	0,0122	0,0488	0,0098
hDES ekstrakt			22,17±0,91	0,0244	0,0098	0,0488	0,0098

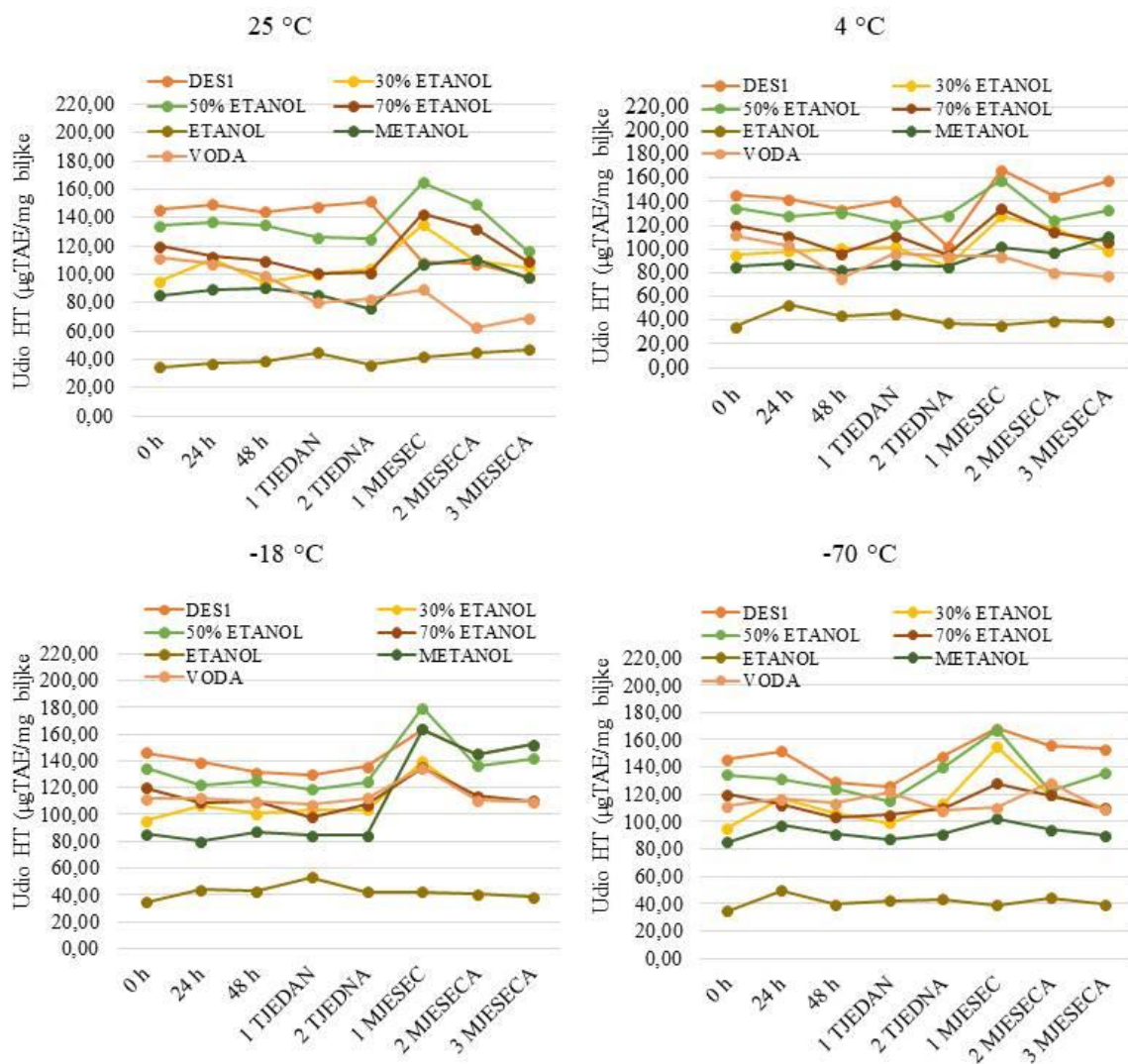
4.9. Stabilnost bioaktivnih komponenti u ekstraktima



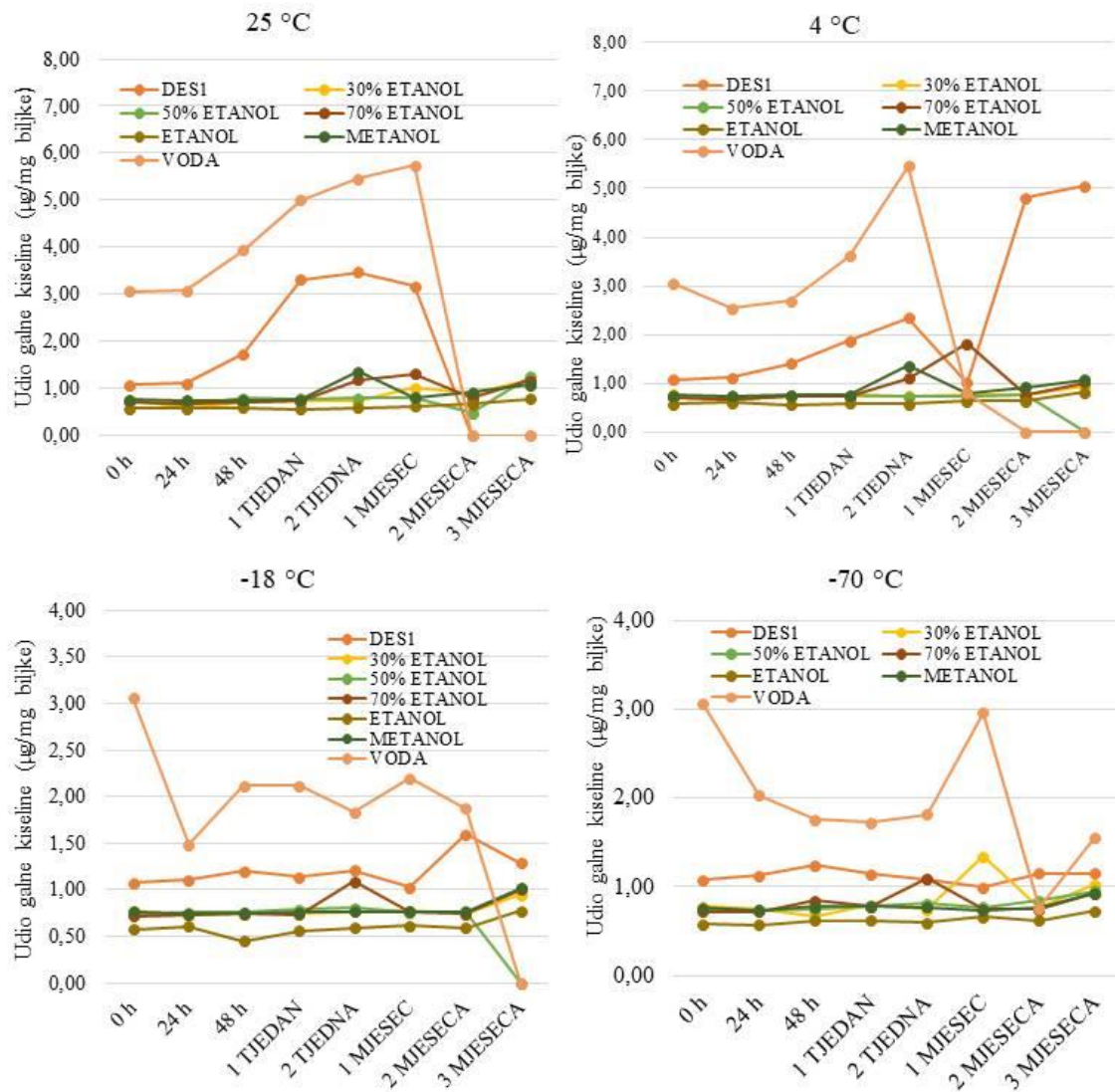
Slika 40. Prikaz udjela karnosolne kiseline u ekstraktima kadulje pohranjenim pri različitim temperaturama



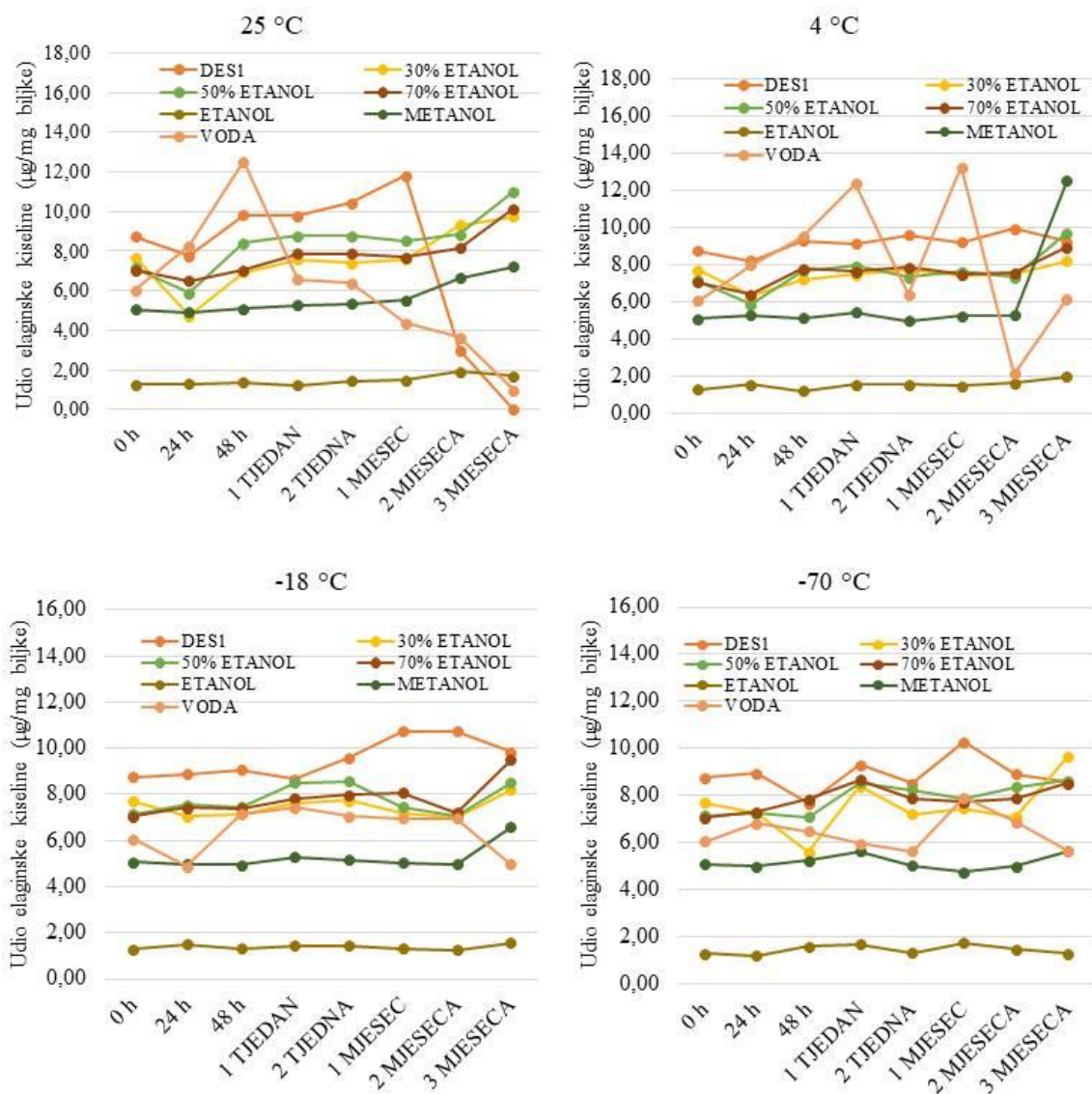
Slika 41. Prikaz udjela karnosola u ekstraktima kadulje pohranjenim pri različitim temperaturama



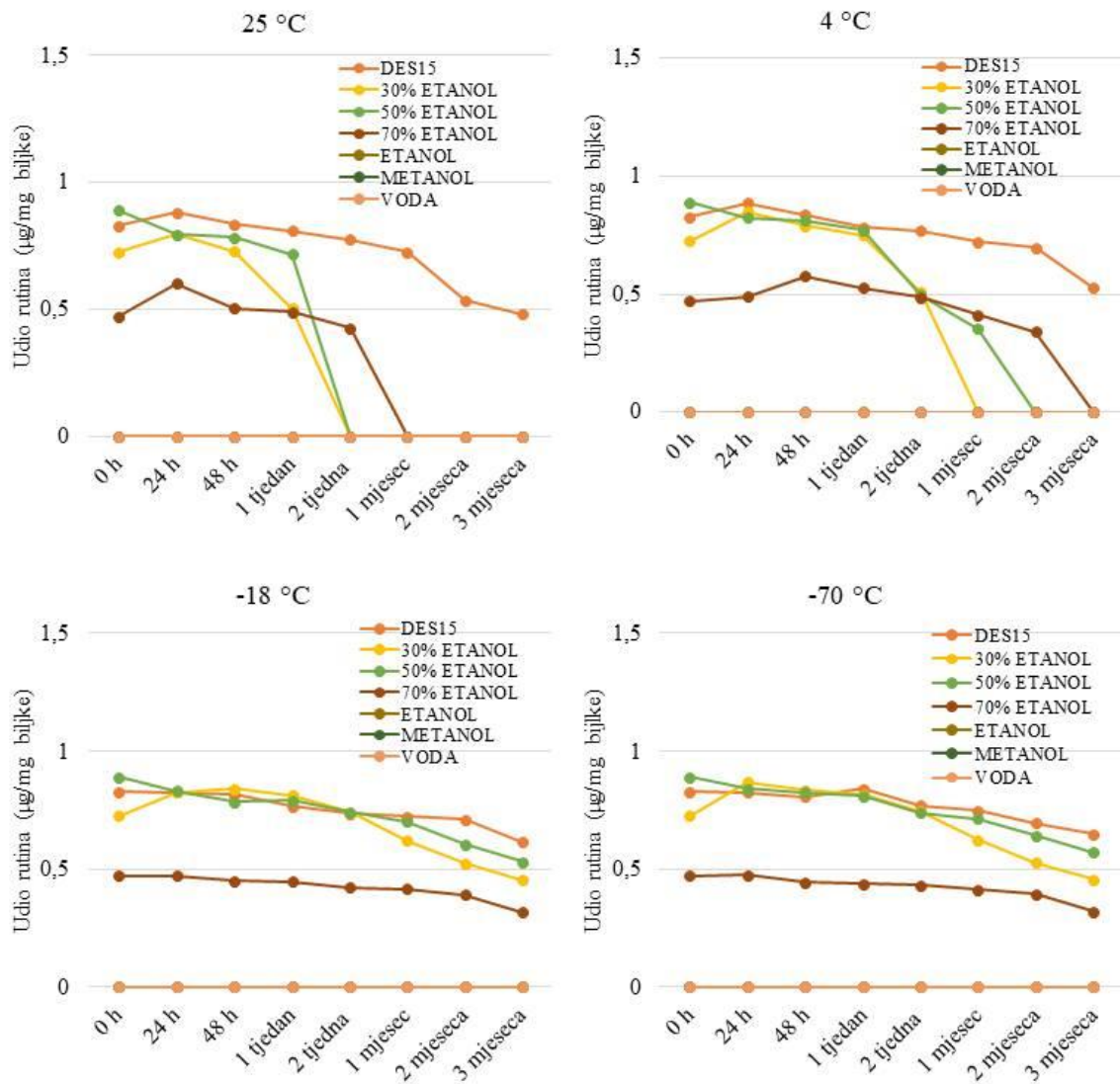
Slika 42. Prikaz udjela HT u ekstraktima vrkute pohranjenim pri različitim temperaturama



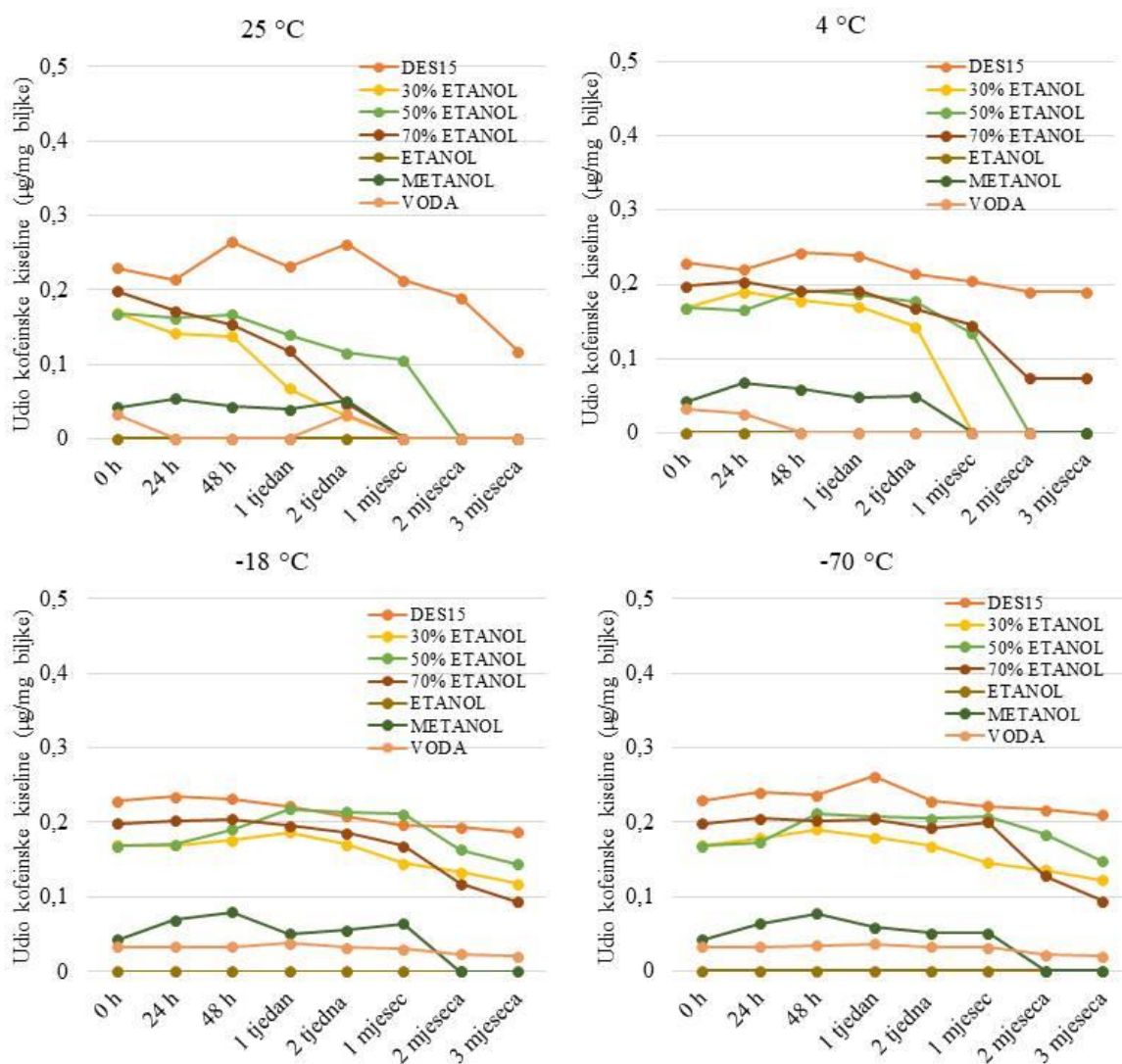
Slika 43. Prikaz udjela galne kiseline u ekstraktima vrkute pohranjenim pri različitim temperaturama



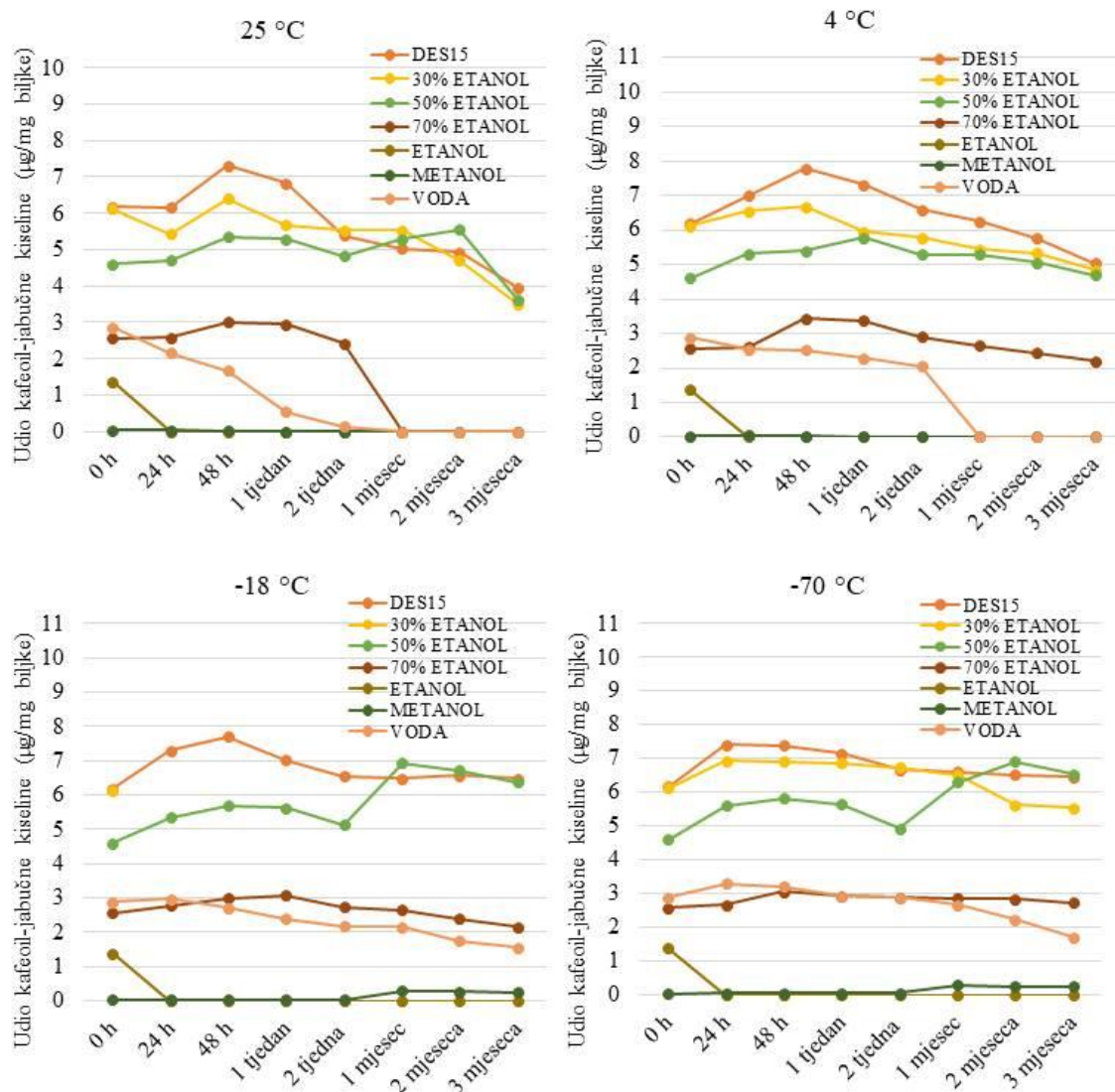
Slika 44. Prikaz udjela elaginske kiseline u ekstraktima vrkute pohranjenim pri različitim temperaturama



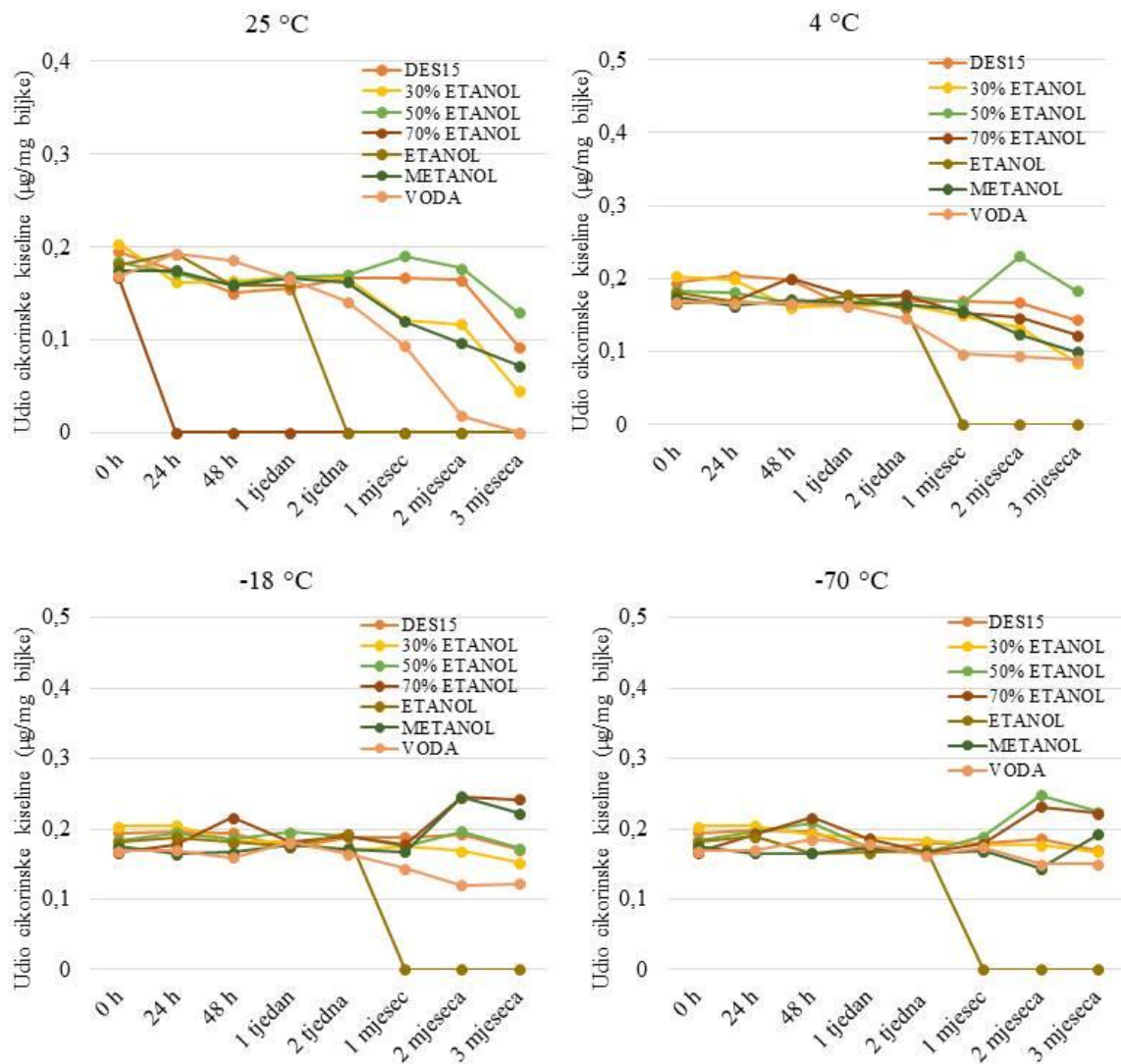
Slika 45. Prikaz udjela rutina u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



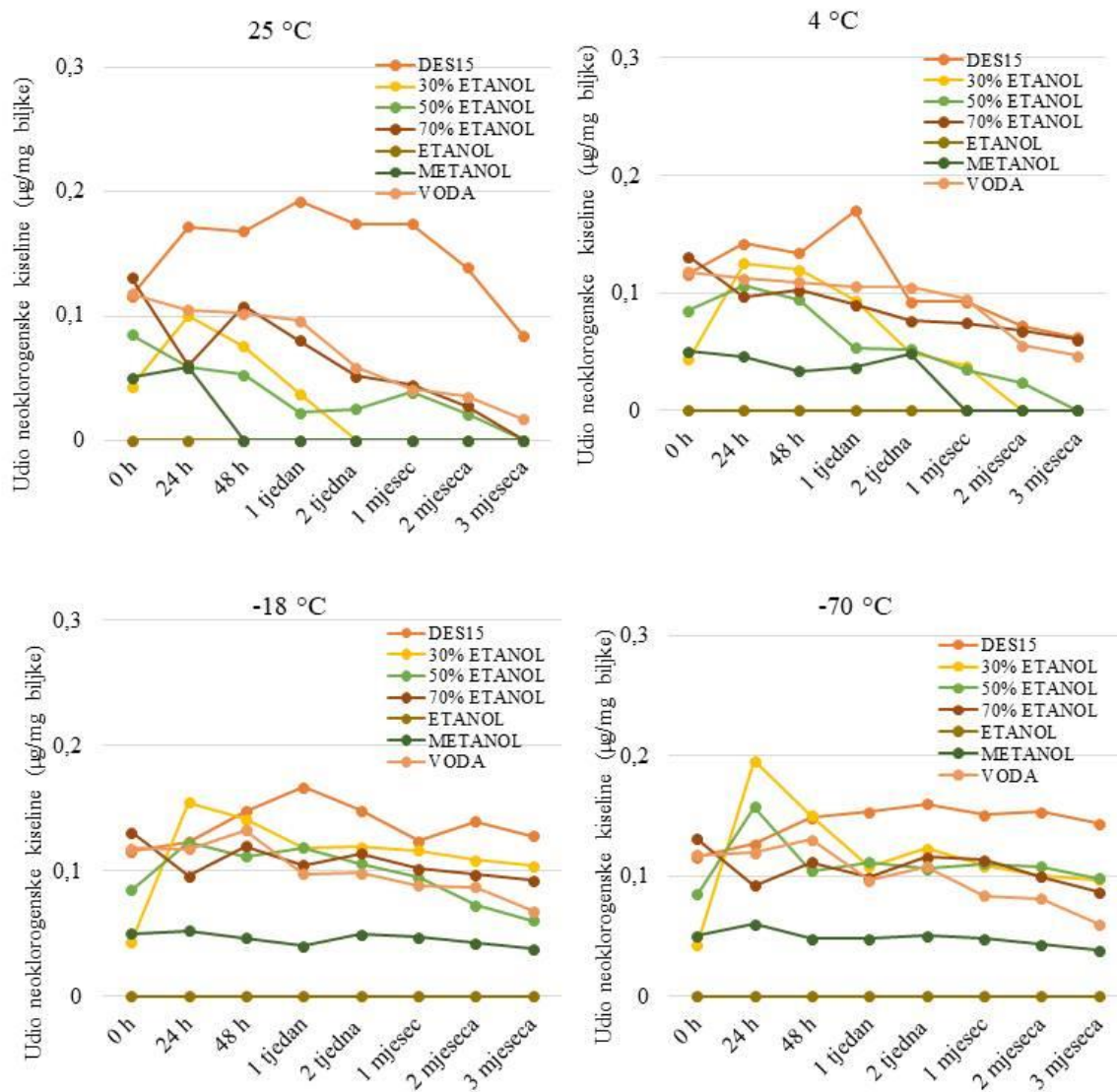
Slika 46. Prikaz udjela kofeinske kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



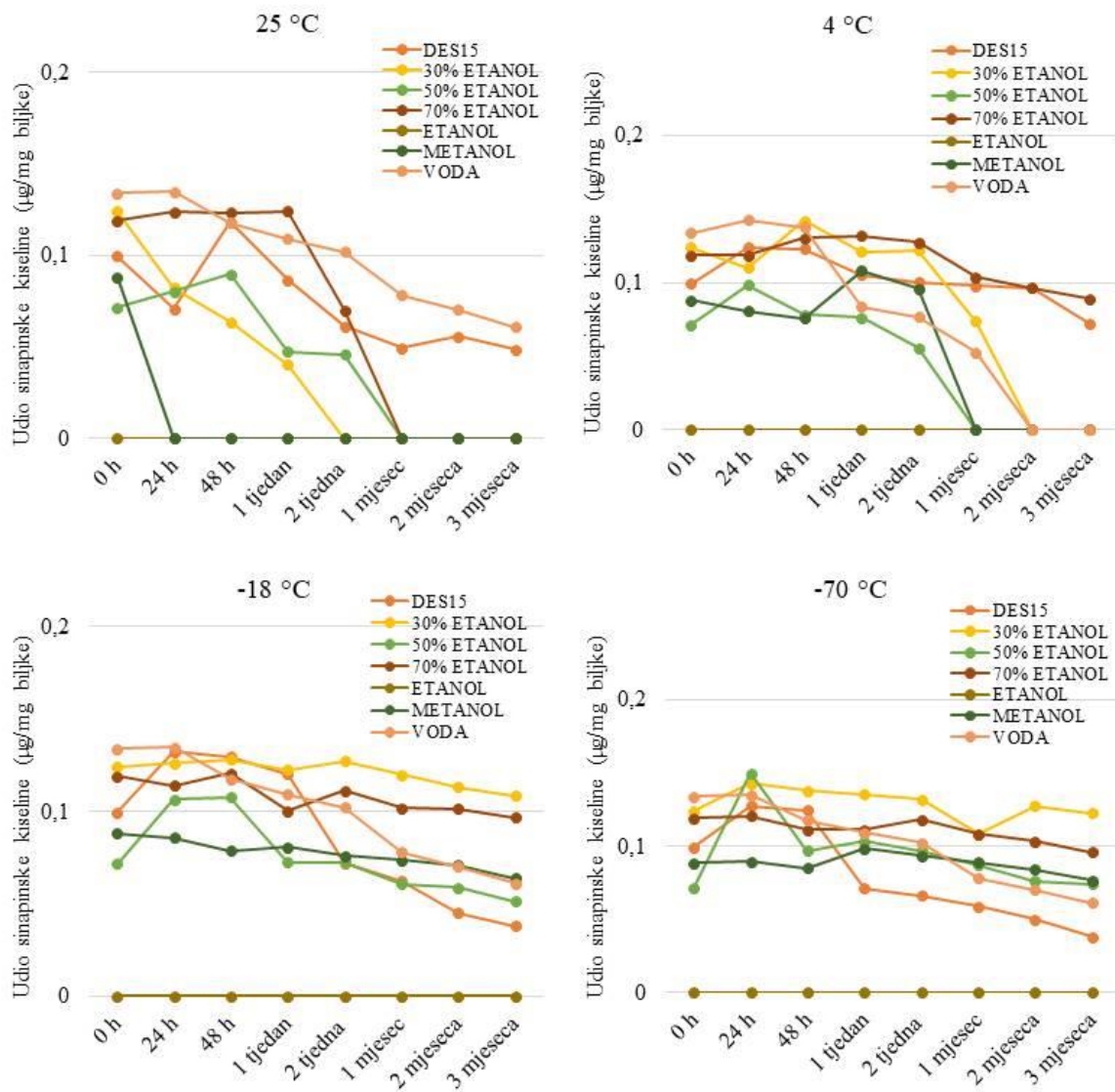
Slika 47. Prikaz udjela kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



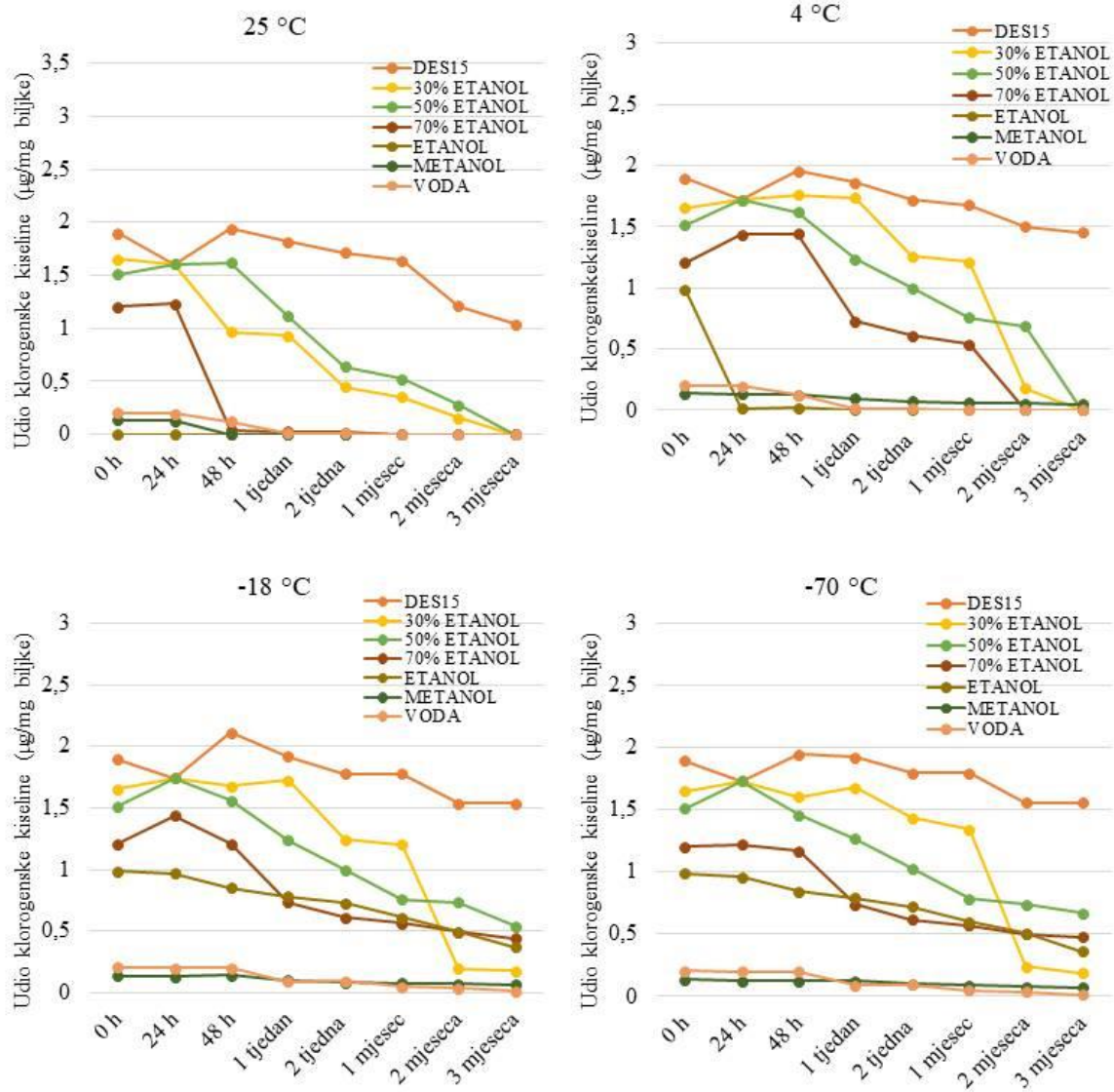
Slika 48. Prikaz udjela cikorijske kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



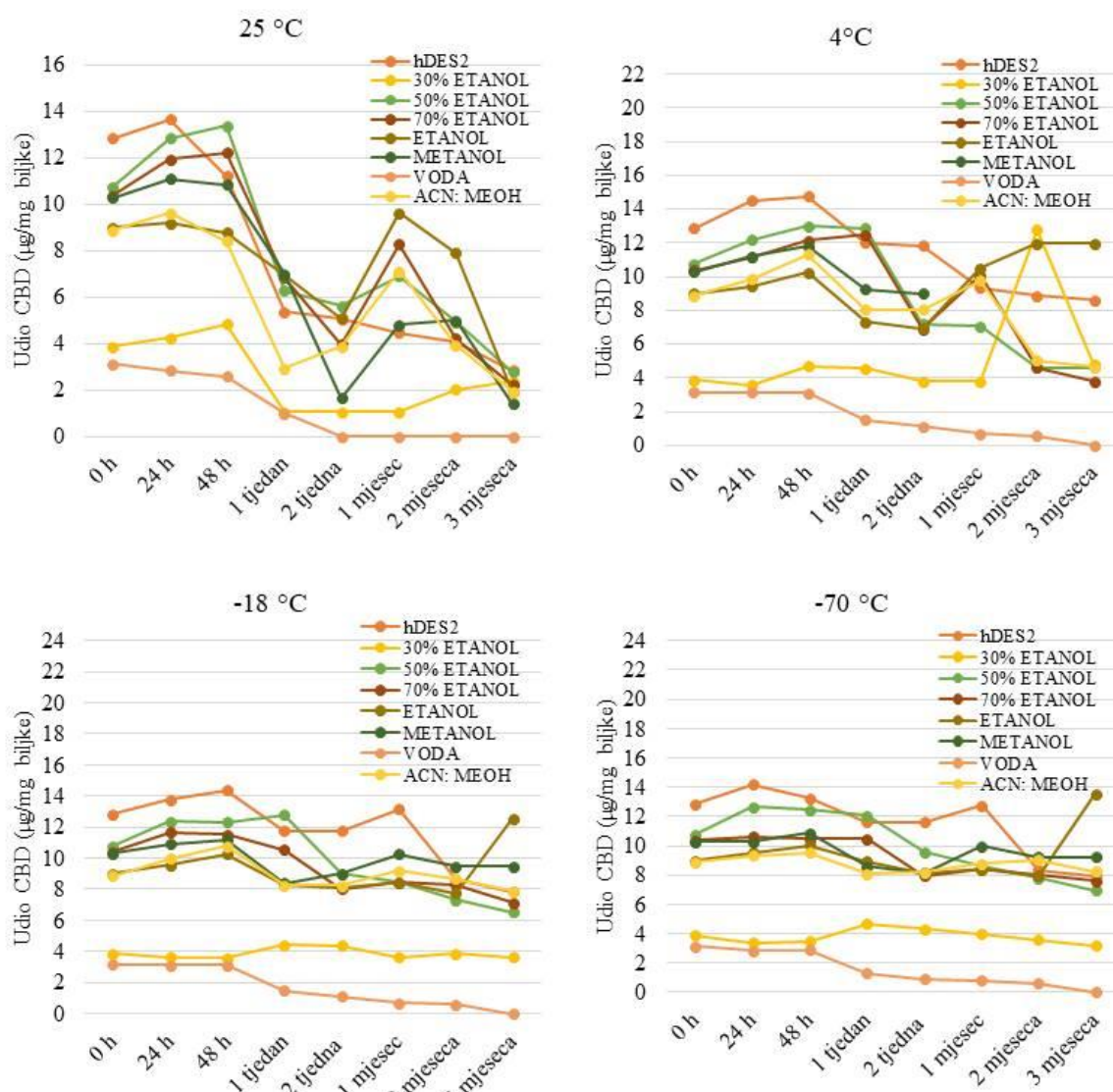
Slika 49. Prikaz udjela neoklorogenske kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



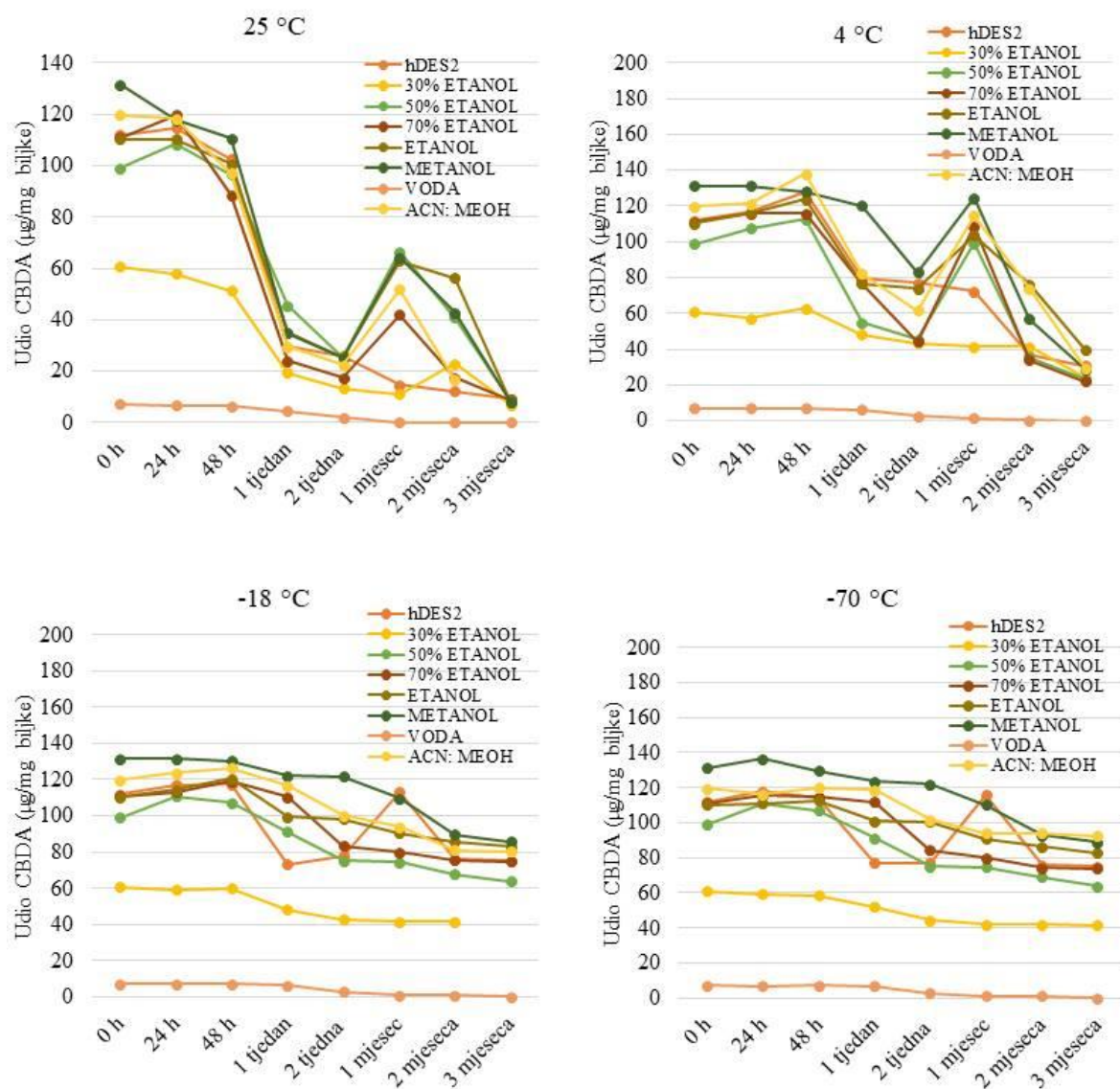
Slika 50. Prikaz udjela sinapinske kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



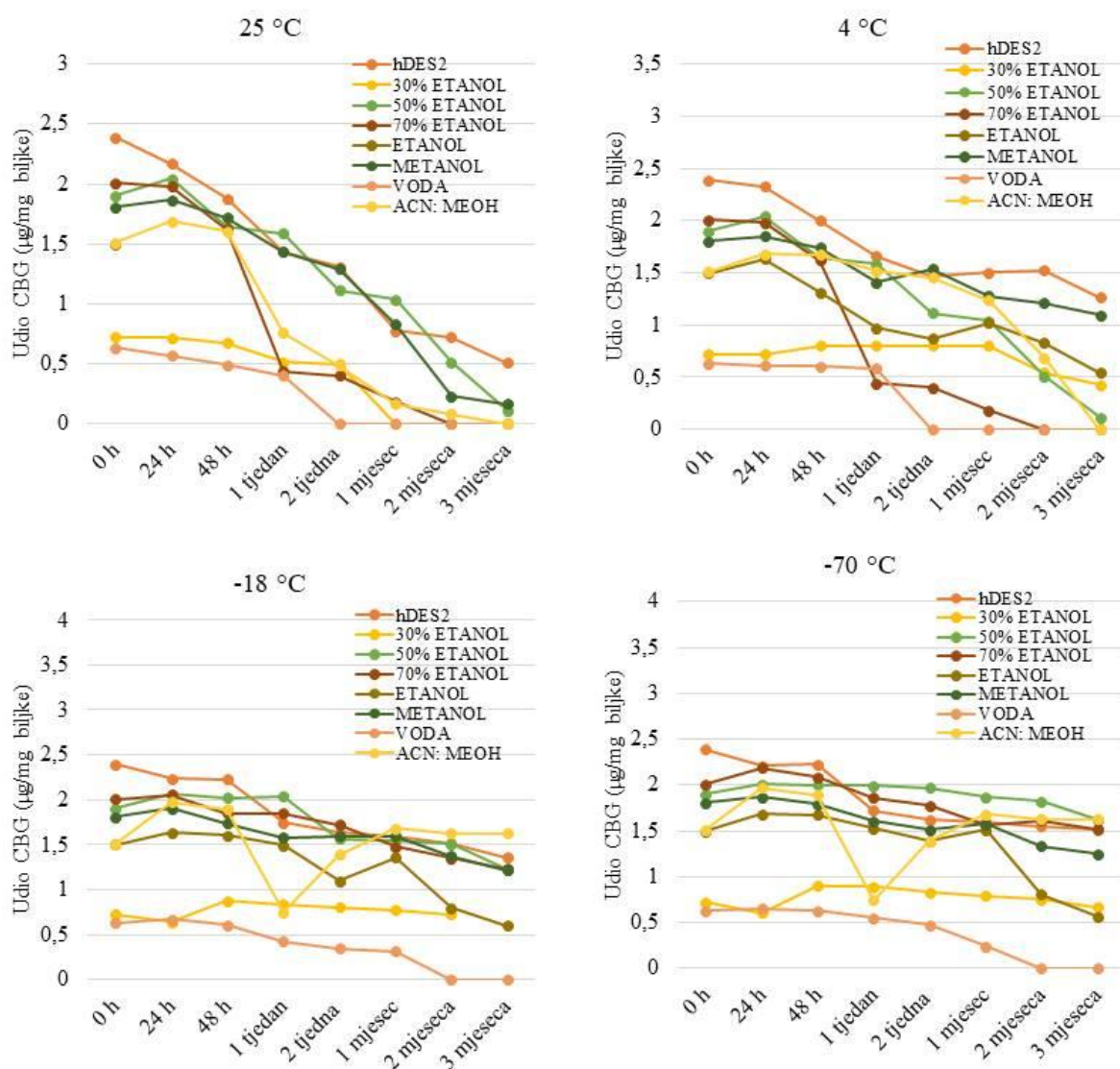
Slika 51. Prikaz udjela klorogenske kiseline u ekstraktima koprive pohranjenim pri različitim temperaturama



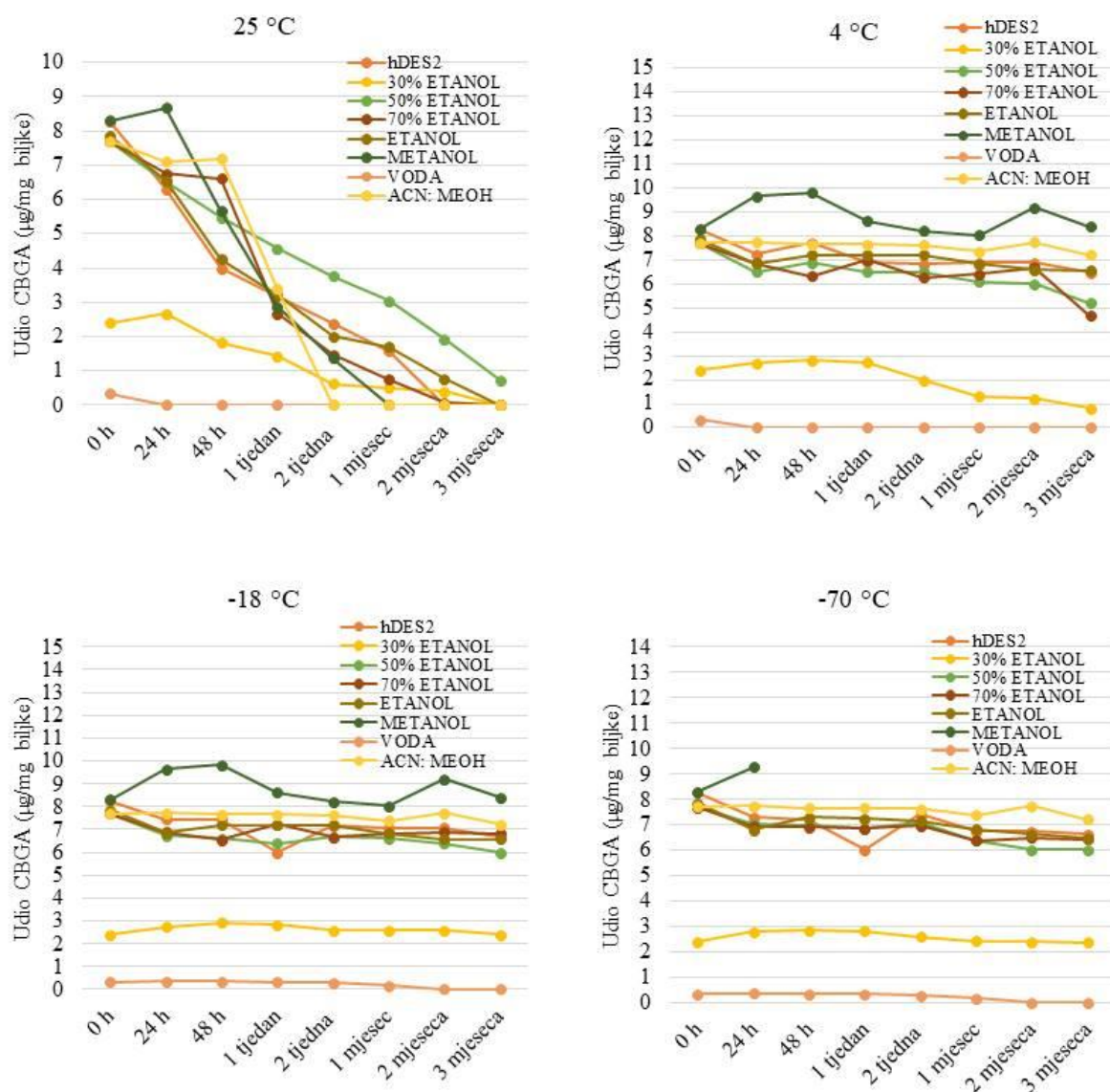
Slika 52. Prikaz udjela CBD u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



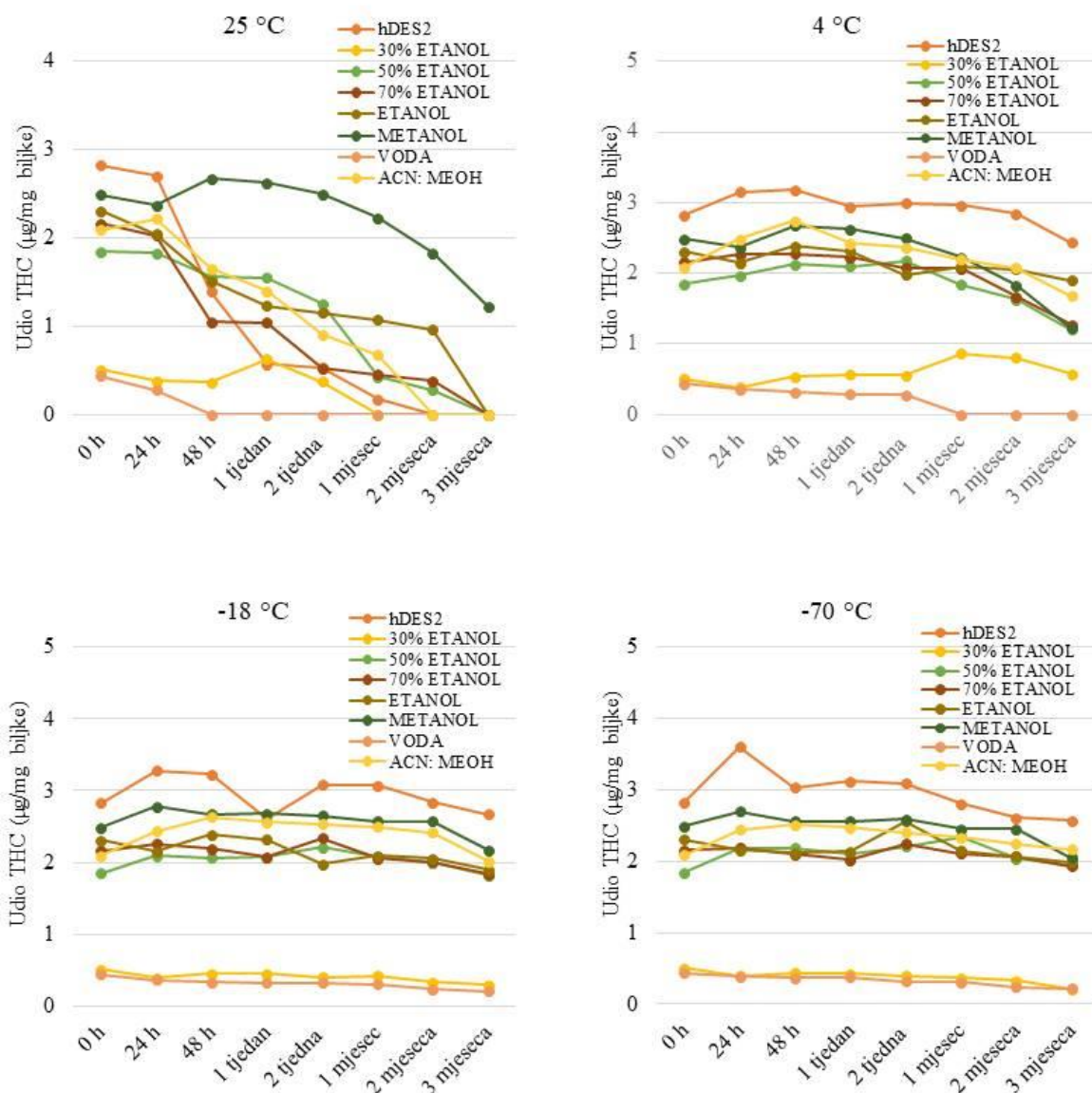
Slika 53. Prikaz udjela CBDA u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



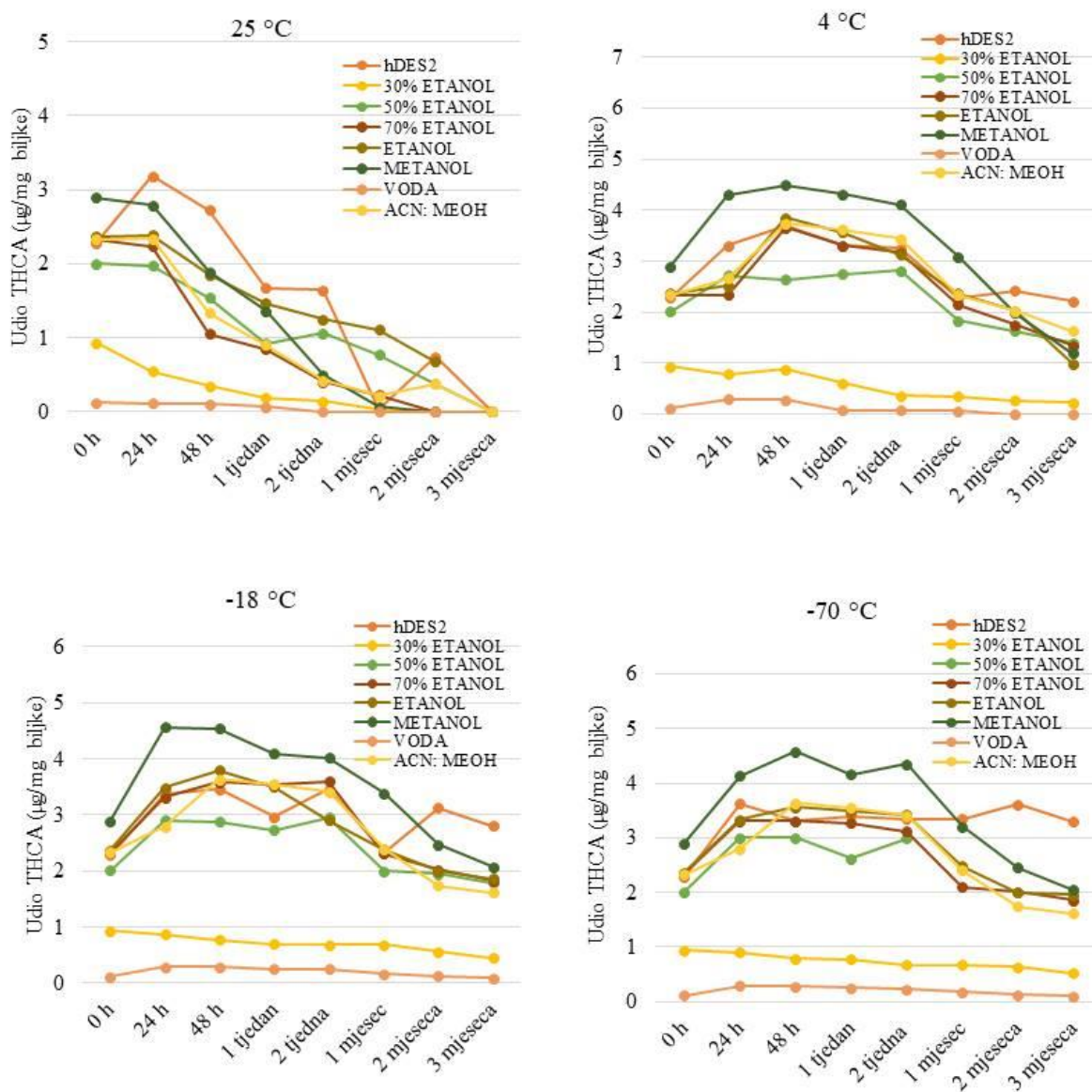
Slika 54. Prikaz udjela CBG u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



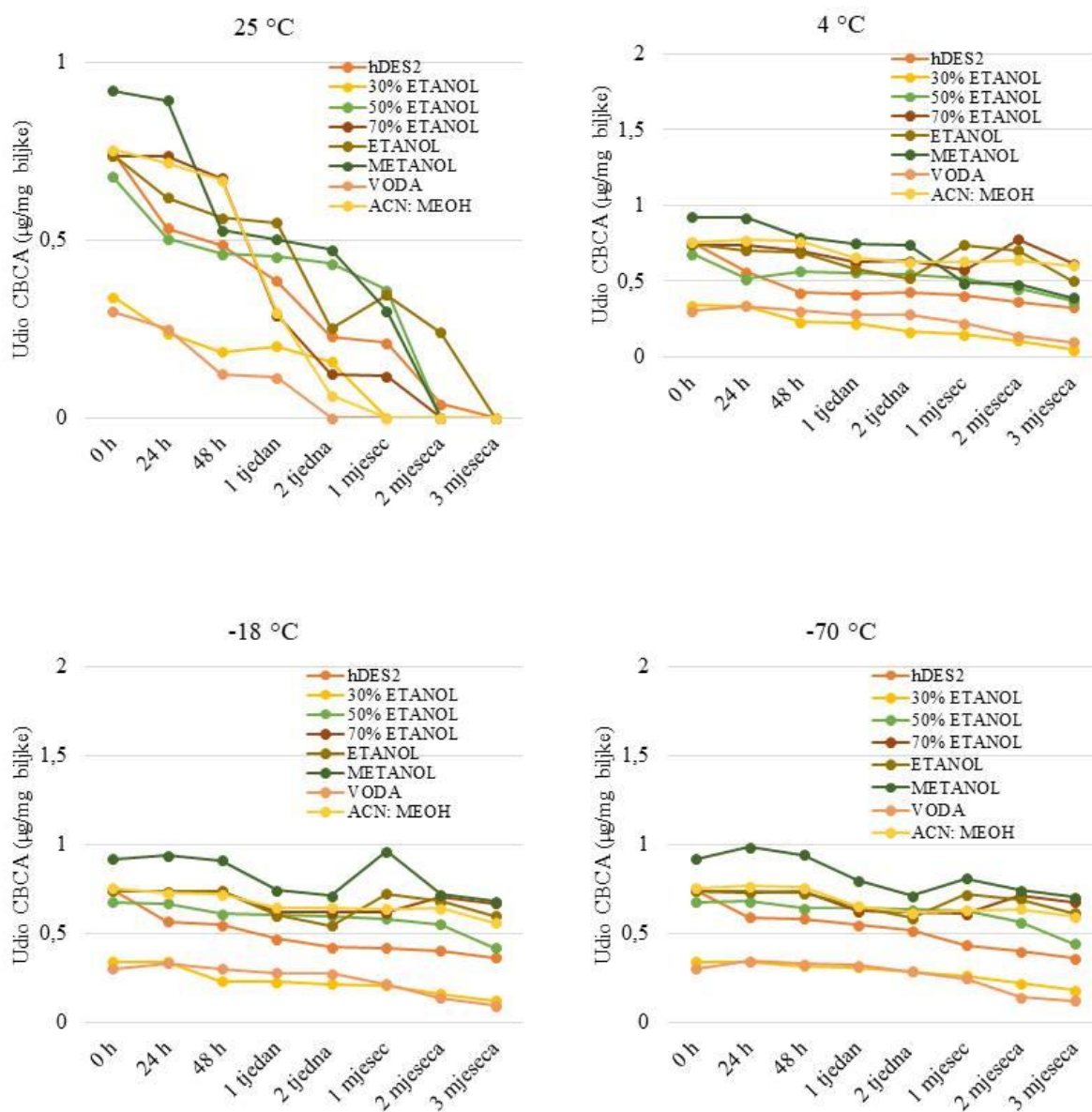
Slika 55. Prikaz udjela CBGA u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



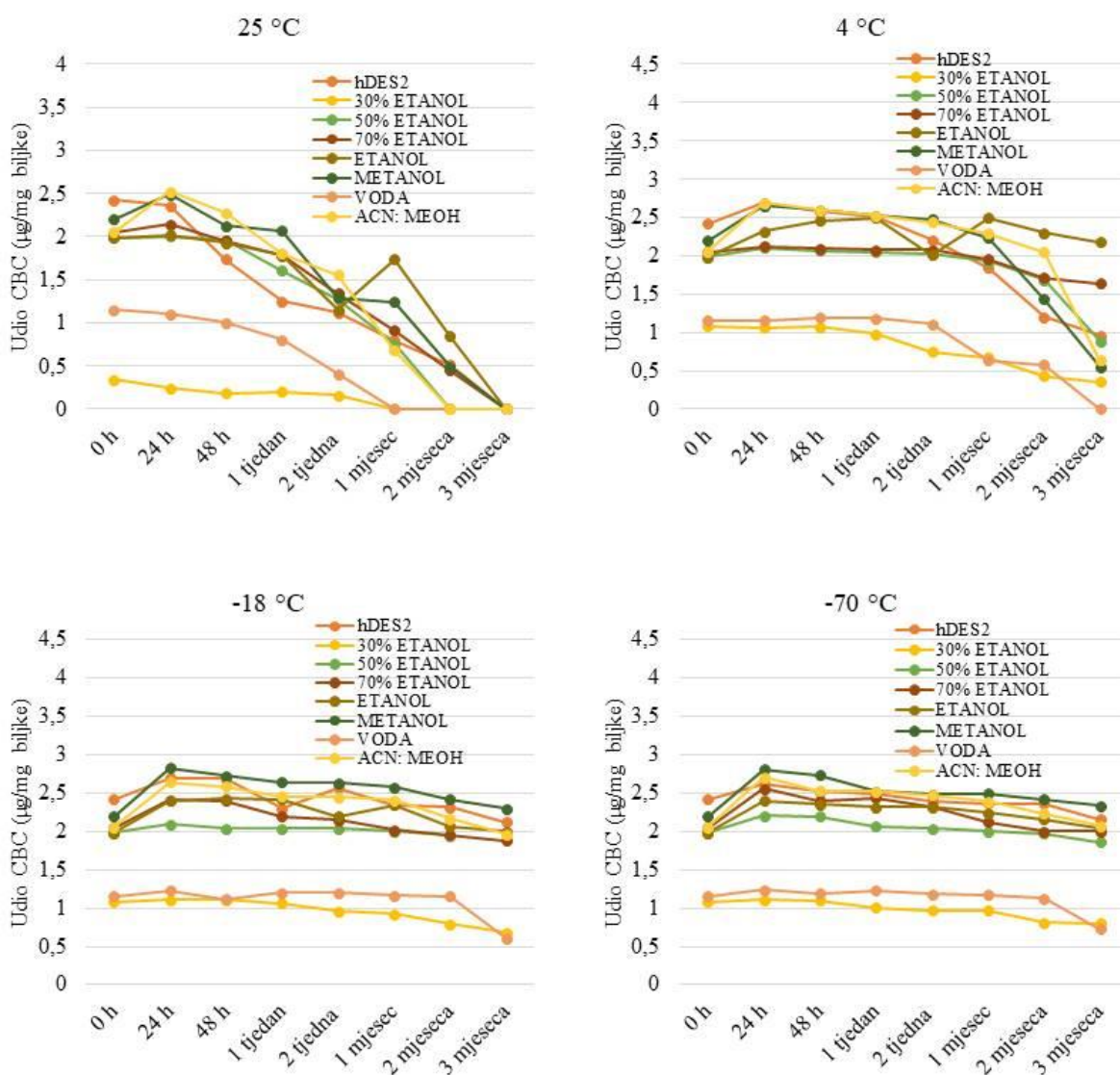
Slika 56. Prikaz udjela THC u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



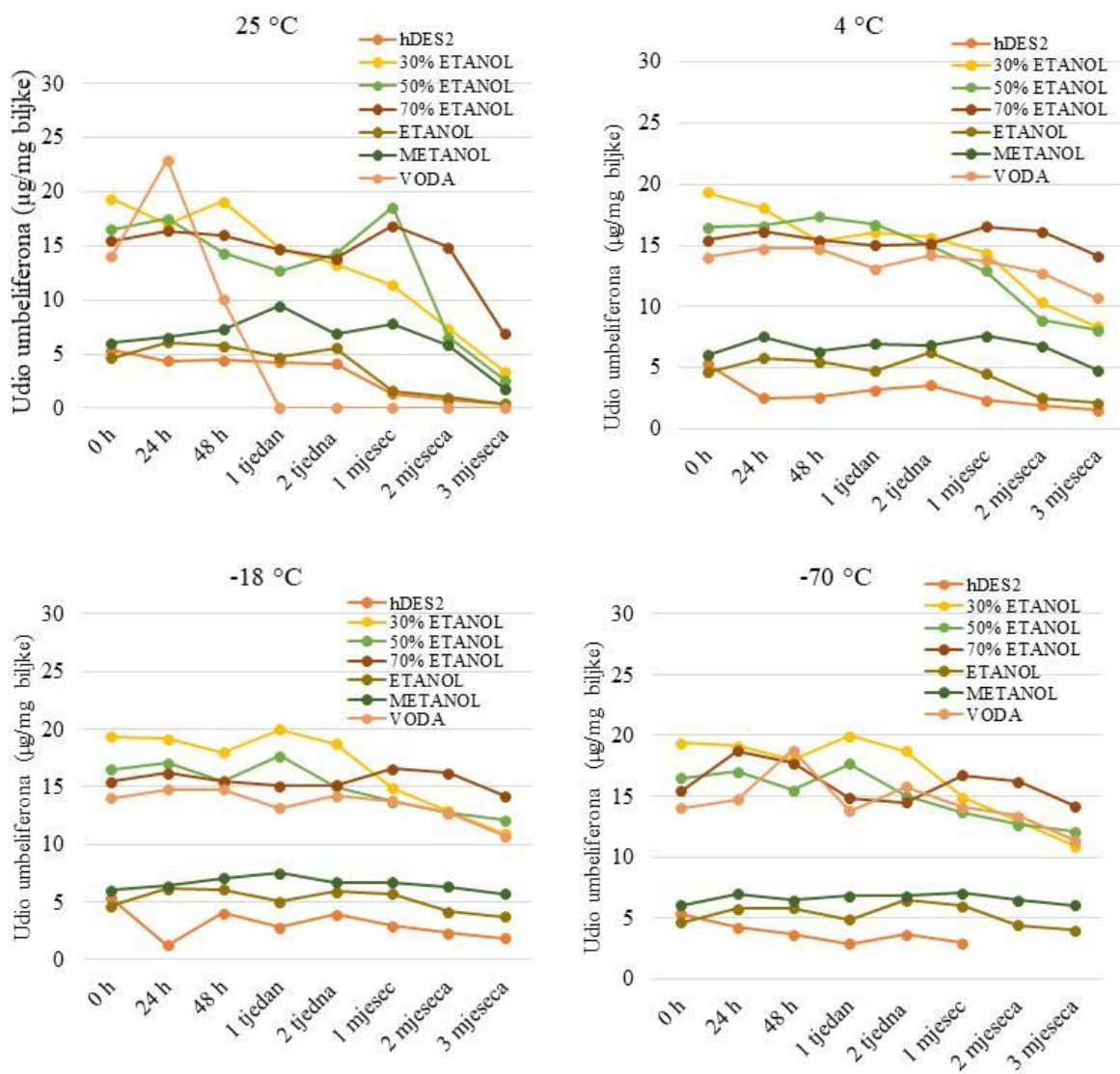
Slika 57. Prikaz udjela THCA u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



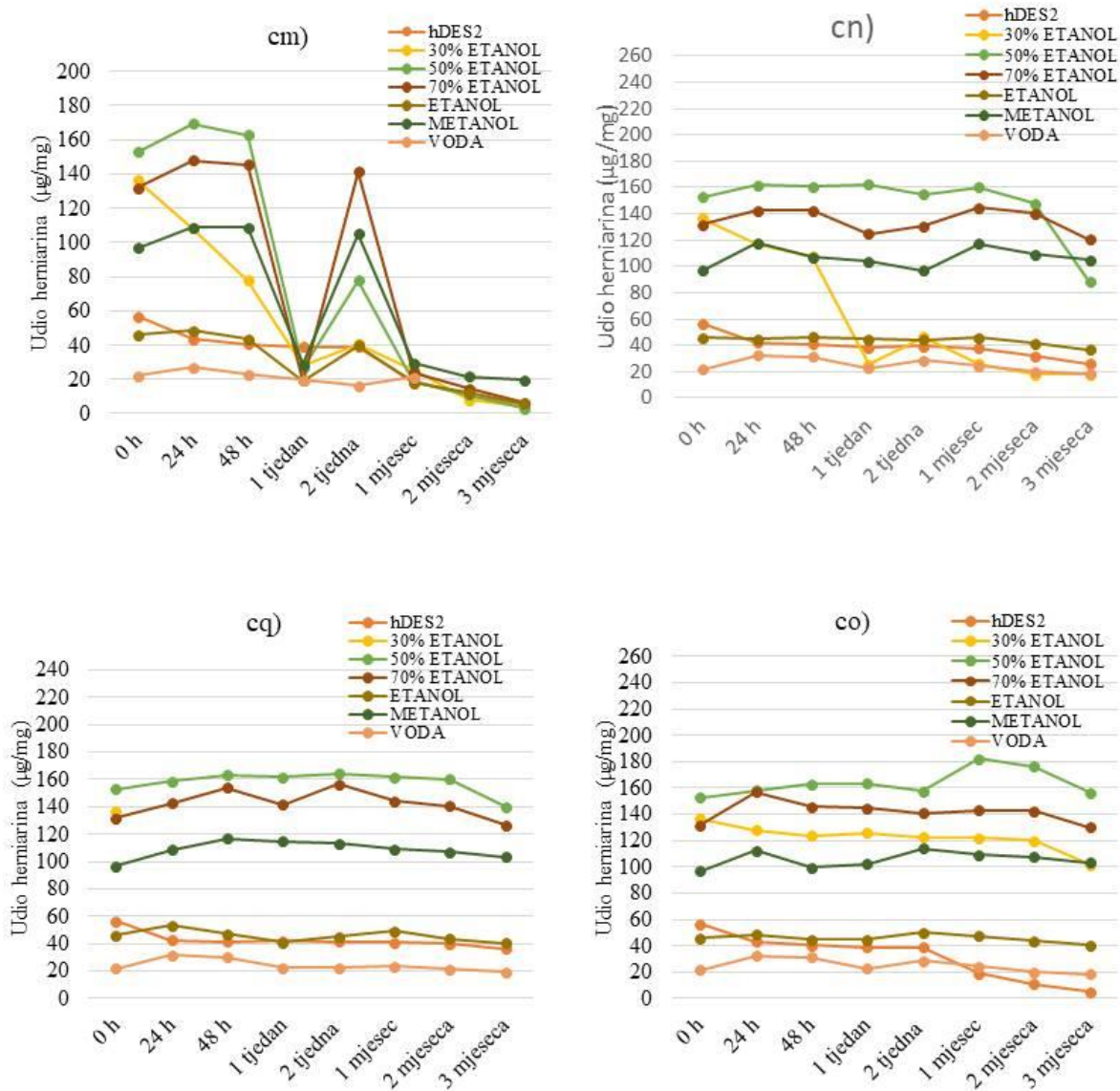
Slika 58. Prikaz udjela CBCA u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



Slika 59. Prikaz udjela CBC u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



Slika 60. Prikaz udjela umbeliferona u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama



Slika 61. Prikaz udjela herniarina u ekstraktima industrijske konoplje pohranjenim pri različitim temperaturama

5. Rasprava

5.1. Karakterizacija DES-ova

Mogućnost primjene i učinkovitost pojedinih DES-ova ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima koja se mogu modificirati i prilagođavati promjenom komponenti i njihovih molarnih omjera, kao i temperature i udjela vode. Upravo je ta mogućnost ono što DES-ove čini pogodnima za ekstrakciju širokog spektra komponenti, odnosno „dizajniranim otapalima“.

Zbog važnosti fizikalno-kemijskih svojstava za učinkovitost DES-ova, u ovom radu ispitana je viskoznost, polarnost i pH DES-ova, DES-ova u kombinaciji s vodom (10-50 % (v/v) i hDES-ova.

Viskoznost je vrlo važno svojstvo otapala, posebice za industrijsku primjenu. Sva ispitana otapala su vrlo viskozna na sobnoj temperaturi ($\eta > 100$ mPa/s) (Slika 12 i 13), što je u skladu sa literaturom [45, 70]. Ispitani DES-ovi su značajno viskozni u odnosu na hDES-ove pri temperaturi od 30 °C, posebice one s mentolom koji pokazuju niže vrijednosti (157-1455,4 mPa/s). Prema literaturi, na viskoznost DES-ova utječe sastav otapala, temperatura i udio vode [3,4,46,72,71,76,79,80,102]. Utjecaj sastava otapala na viskoznost je vidljiva iz širokog raspona viskoznosti za ispitivana otapala, ovisno o odabranom donoru i akceptoru vodikove veze. DES-ovi koji sadrže šećere i određene kiseline, kao što su limunska i jabučna kiselina, pokazuju značajno višu viskoznost u odnosu na DES-ove koji u svom sastavu imaju alkohole i amine (Slika 12). Prema dobivenim rezultatima, najveću viskoznost pri sobnoj temperaturi pokazuju DES17, DES4, DES12 i DES5, odnosno otapala s limunskom kiselinom, glukozom, jabučnom kiselinom i fruktozom, dok su DES9 i DES10, odnosno otapala s etilen-glikolom i glicerolom najmanje viskozna. Od ispitanih hDES-ova, na sobnoj temperaturi najvišu viskoznost pokazuju hDES12 i hDES14, odnosno otapala s tetra-*n*-oktilamonijevim bromidom i kaprinskom kiselinom te kaprinskom kiselinom i lidokainom, dok najmanju viskoznost pokazuju hDES1, hDES5 i hDES18, odnosno otapala s mentolom i mravljom kiselinom, mentolom i mliječnom kiselinom te timol s kaprinskom kiselinom (Slika 13). Prema literaturi, DES-ovi koji sadrže dikarboksilnu kiselinu ili komponente koje sadrže karboksilne ili hidroksilne skupine pokazuju višu viskoznost [46] što je potvrđeno i rezultatima u ovom radu. Temperatura, kao i udio vode pokazuje značajan utjecaj na viskoznost ispitanih otapala. Povišenje temperature dovodi do značajnog smanjenja viskoznosti, čak i kod vrlo viskoznih otapala čime se omogućava njihova primjena u ekstrakciji. Povećanje temperature kod DES-ova i hDES-ova dovodi do smanjenja

viskoznosti i nekoliko puta. Primjerice, kod vrlo viskoznih otapala, kao što je DES17 povećanje temperature od 30 °C do 70 °C, dovodi do smanjenja vrijednosti u rasponu do 25763,10 mPa/s do 10251,00 mPa/s, dok kod manje viskoznih otapala kao što je DES9, porast temperature dovodi do smanjenja viskoznosti u rasponu od 317,3 mPa/s do 85,1 mPa/s pri rasponu 30 – 70 °C. U slučaju hDES-ova, kod najviskoznijeg otapala, hDES12 povišenjem temperature od 30 °C do 70 °C dolazi do pada u viskoznosti od 20574,0 do 1064,3 mPa/s dok kod manje viskoznih kao što je hDES5 taj pad je u rasponu 157,0 do 52,1 mPa/s pri temperaturi od 30 – 70 °C.

Povećanje udjela vode također dovodi do značajnog sniženja viskoznosti, što je ponovno najznačajnije kod vrlo viskoznih otapala. Kod DES17, dodatkom vode do 50 % na 50 °C dolazi do smanjenja viskoznosti u rasponu od 25763,0 mPa/s do 305,1 mPa/s. Kod otapala manje viskoznosti, smanjenje viskoznosti pod utjecajem dodatka vode nije toliko značajno. Primjerice, kod DES9 dodatak vode do 50 % na sobnoj temperaturi dovodi do pada u viskoznosti od 317,3 mPa/s do 44,1 mPa/s. Do najveće promjene u viskoznosti kod većine DES-ova dolazi kod dodataka 20 % vode. Daljnjim dodavanjem vode viskoznost se ne smanjuje tako značajno te dodatkom vode od 50 % većina otapala pokazuje vrlo sličnu i nisku viskoznost u odnosu na same DES-ove. Također, sa dodatkom vode većim od 20 %, povišenje temperature ne pokazuje tako značajan utjecaj na smanjenje viskoznosti kao kod čistih DES-ova i DES-ova sa manjim udjelom vode. Primjerice, kod DES1 sa 30 % vode povišenje temperature do 70 °C smanjuje viskoznost od 94,4 mPa/s do 65,9 mPa/s.

Polarnost otapala jedno je od ključnih svojstava otapala s obzirom da ima značajan utjecaj na mogućnost otapanja određenih tvari u otapalu. Prema literaturi, na polarnost DES-ova utječe sastav otapala, udio vode u otapalu te temperatura. Za određivanje polarnosti otapala, izračunata je molarna prijelazna energija DES-ova, DES-ova s vodom te hDES-ova i uspoređena s konvencionalnim otapalima. Fizikalno-kemijska svojstva nilskog crvenila kao što su fotokemijska stabilnost, dobra topljivost u različitim otapalima i niska bazičnost čine ovu boju prikladnom za mjerenje polarnosti DES-ova [82] pri čemu niža vrijednost ENR ukazuje na polarnije otapalo. Prema dobivenim rezultatima, uočljivo je da sastav otapala igra značajnu ulogu u polarnosti DES-ova. Redoslijed ispitanih DES-ova od najviše prema najnižoj polarnosti je $\text{ChCl} : \text{kiseline} > \text{ChCl} : \text{šećeri} > \text{ChCl} : \text{alkoholi} > \text{ChCl} : \text{amidi}$ (Tablica 8). Dobiveni rezultati su slični onima u literaturi [82,83]. S obzirom na veću polarnost vode u odnosu na većinu DES-ova, dodatak vode ili smanjuje polarnost ili ne djeluje značajno na promjenu polarnosti pripremljenog otapala. Kod hDES-ova najpolarnija

otapala su ona na bazi timola s kaprilnom i laurinskom kiselinom te kamforom (hDES16, hDES17, hDES20, hDES21, hDES22, hDES23 i hDES24) i ona na bazi mentola sa mliječnom kiselinom (hDES4). Najmanje polarna su otapala na bazi mentola s karboksilnim kiselinama (hDES1, hDES7, hDES8, hDES9, hDES10) te otapalo kaprinska kiselina s lidokainom (hDES14).

Za procjenu kiselosti DES-ova često se koristi određivanje pH primjenom pH metra. Prema istraživanjima, na pH utječe sastav otapala i udio vode u otapalu [84-86], što je pokazano i u ovom istraživanju. U slučaju DES-ova, najviši pH je izmjeren kod DES1, odnosno ChCl : urea (1 : 2), a najniži kod DES14, odnosno ChCl : oksalna kiselina (1 : 1). Jedino je kod DES-ova sa kiselinama uočen porast pH dodatkom vode, dok se kod ostalih otapala uočava pad pH vrijednosti sa dodatkom vode. Redoslijed ispitanih DES-ova od najniže prema najvišoj pH vrijednosti je ChCl : kiseline > ChCl : šećeri > ChCl : alkoholi > ChCl : amidi. Dobiveni rezultati su vrlo slični onima u literaturi [165,166]. Kod hDES-ova, najniži pH je izmjeren kod hDES1, odnosno mentol : mravlja kiselina (1 : 1), a najviši kod hDES13, odnosno kaprinska kiselina : lidokain (2 : 1). Kod ispitanih hDES-ova uočava se niži pH u otapalima na bazi mentola, s tim da su najniže vrijednosti zabilježene za karboksilne kiseline, a potom za masne kiseline. U otapalima na bazi timola s kiselinama, zabilježene su više vrijednosti pH koje su najviše ovisile o molarnim omjerima navedenih komponenti u otapalu.

5.2. Utjecaj vrste DES-ova na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu

Zbog različitog utjecaja komponenti otapala na mogućnost ekstrakcije primjenom DES-ova, teško je procijeniti prikladnost pojedinog otapala za ekstrakciju željenih spojeva. Stoga, kako bi se odabralo najpogodnije otapalo za ekstrakciju pojedinih bioaktivnih komponenti, ekstrakcija je provedena sa 17 različitih hidrofilnih DES-ova za ekstrakciju karnosola i karnosolne kiseline iz listova kadulje; elaginske kiseline, galne kiseline te HT iz listova vrkute; klorogenske kiseline, neoklorogenske kiseline, kofeinske kiseline, cikorinske kiseline, kafeoil-jabučne kiseline, sinapinske kiseline i rutina iz listova koprive. Također, 24 hidrofobnih DES-ova korišteno je za ekstrakciju CBD, CBDA, CBN, CBG, CBC, CBCA, THC i THCA iz cvjetova industrijske konoplje te herniarina i umbeliferona iz listova lavande.

Osim utjecaja donora vodikove veze te molarnog omjera komponenti, na prinos željenih komponenti utječe i volumen dodane vode, prvenstveno zbog utjecaja na smanjenje viskoznosti čime se poboljšava prijenos mase i učinkovitost postupka ekstrakcije. Iako se dodavanjem vode smanjuje viskoznost što je uočljivo iz grafova (Slika 6), ipak, prekomjeran volumen vode može smanjiti interakcije između komponenti DES-ova kao i interakcije između DES-ova i željenih komponenti [7]. Povećana temperatura također utječe na smanjenje viskoznosti DES-ova (Slika 12 i 13), ali rad pri povišenim temperaturama može negativno utjecati na stabilnost bioaktivnih komponenti, kao i samog otapala. Iz navedenih razloga, probir hidrofilnih otapala proveden je pri 30, 50 i 70 °C s tri različita volumena dodane vode (10, 30 i 50% (v/v)), dok je za probir hidrofobnih DES-ova praćena samo temperatura (30, 50 i 70 °C). Sve ekstrakcije provedene su kroz period od 60 minuta.

5.2.1. Probir otapala za ekstrakciju karnosolne kiseline i karnosola iz kadulje

Primjenjeni DES-ovi značajno se razlikuju u sposobnosti ekstrakcije karnosolne kiseline i karnosola (Slika 14 i 15) iz kadulje. Primjenom svih DES-ova pri različitim uvjetima ekstrahirano je karnosol u rasponu 0 - 8,14 µg/mg biljke. Najveći prinosi karnosola postignuti su primjenom DES-ova na bazi alkohola (DES8 i DES9), s tim da je najveći udio karnosola postignut ekstrakcijom s DES8 s 10% vode (v/v) na 70 °C (Slika 15). Za razliku od karnosola, karnosolna kiselina se nije ekstrahirala primjenom svih 17 DES-ova. Primjenom bazičnijih otapala (DES1, DES2, DES3) pri različitim uvjetima, u dobivenim ekstraktima

nije pronađena karnosolna kiselina. Udio ekstrahirane karnosolne kiseline je bio u rasponu od 0-14,25 µg/mg biljke, a najveći udio u ekstraktu postignut je primjenom DES-ova na bazi organskih kiselina (DES15 i DES16), posebice primjenom DES15 s 10% vode (v/v) na 30 °C (Slika 14). Prema literaturi, kao najprikladnija otapala za ekstrakciju karnosolne kiseline i karnosola iz ružmarina (*Salvia rosmarinus*) pokazuju se ChCl : butan-1,2-diol (1 : 2) [110] i tetrapropil amonijev klorid : propan-1,2-diol : voda (15 : 55 : 30 % wt) [109]. Najveći udio karnosolne kiseline je dobiven ekstrakcijom s DES15, kod kojeg je HBD mliječna kiselina, koja je prirodna komponenta, a samo otapalo pokazuje nisku viskoznost i pri nižim temperaturama, pa je stoga ovo otapalo odabrano za daljnje optimizacije ekstrakcije karnosolne kiseline i karnosola iz kadulje.

Za većinu otapala primjećen je trend povećanja udjela karnosola u ekstraktima s povećanjem temperature i smanjenjem udjela dodane vode (DES3, DES5, DES6, DES8, DES9, DES10, DES11, DES12, DES14, DES15, DES16, DES17) (Slika 15). Prema literaturi, veći sadržaj karnosola obično je prisutan u ekstraktima dobivenim na višim temperaturama budući da je on jedan od produkata razgradnje termolabilne karnosolne kiseline [167]. Kod DES4 i DE13 primjećeno je kako je najveći udio karnosola ostvaren pri udjelu vode od 30% pri svim temperaturama, pri čemu kod DES4 dolazi do pada u prinosu porastom temperature, dok kod DES13 dolazi do porasta u prinosu karnosola porastom temperature. Kod DES1 i DES7 je za razliku od ostalih otapala, uočen porast udjela karnosola sa povećanim udjelom vode, s tim da kod DES1 povećanje temperature nema utjecaj na prinos, dok kod DES7 dolazi do porasta u udjelu porastom temperature. Kod DES2 primjećeno je kako se udio karnosola smanjuje i sa povećanim udjelom vode i povećanom temperaturom. Unatoč tome što se karnosol može ekstrahirati primjenom svih 17 DES-ova, u ekstraktima dobivenim primjenom DES4 s 10 % vode (v/v) pri sve tri temperature te DES5 i DES17 s 10 % vode pri 30 °C, nije identificiran karnosol. Za ekstrakciju karnosolne kiseline, kod većine otapala primjećen je isti trend povećanja udjela sa povećanjem temperature i smanjenjem udjela dodane vode (Slika 14) kao i kod karnosola (DES5, DES6, DES7, DES9, DES10, DES11, DES12, DES13, DES14). Kod DES4 najveći udio karnosolne kiseline ekstrahiran je sa 30% vode pri svim temperaturama te je uočen pad sa porastom temperature. Kod DES8 i DES16 dolazi također do smanjenog prinosa sa povišenjem temperature i povećanjem udjela vode. Kod DES15 i DES17, nije uočen isti trend pri svim temperaturama, pa je tako s DES15 na 50 i 70 °C primjećen porast udjela karnosolne kiseline

u ekstraktu pri većim udjelima vode, dok je isto primjećeno na temperaturama od 30 i 50 °C s DES17.

5.2.2. Probir otapala za ekstrakciju fenolnih kiselina i HT iz vrkute

Za ekstrakciju galne i elaginske kiseline, kao i HT iz vrkute korišteni su isti DES-ovi kako bi se ispitala njihova učinkovitost u ekstrakciji. Kao što se može vidjeti na Slikama 16-18, DES-ovi su se uvelike razlikovali u svojoj sposobnosti i učinkovitosti u ekstrakciji galne kiseline, elaginske kiseline i HT. Za ekstrakciju galne kiseline nisu svi upotrijebljeni DES-ovi bili učinkoviti (Slika 16). Primjenom DES-ova na bazi kiselina (DES15 i DES16) pri različitim uvjetima, u dobivenim ekstraktima nije identificirana galna kiselina. Udio galne kiseline u ekstraktima bio je u rasponu 0 – 1,71 µg/mg biljke, a najveći udjeli u ekstraktu postignuti su primjenom DES-ova na bazi amida i šećera (DES1, DES4 i DES5), s tim da je najveći udio pronađen u ekstraktu dobivenom primjenom DES1 s 30 % vode pri 70 °C. Prema literaturi najpogodnija otapala za ekstrakciju galne kiseline ovise o polaznom materijalu, pa je tako galna kiselina ekstrahirana iz lišća *Ginkgo biloba* pomoću različitih DES-ova, pri čemu su najprikladnija ChCl : pentan-1,5-dikarboksilna kiselina (1 : 1), ChCl : limunska kiselina (1 : 1), ChCl : glicerol (1 : 2) ili ChCl : etan-1,2-diol (1 : 2) [168]. S druge strane, kod ekstrakcije galne kiseline iz kore i sjemenki manga primjenom ChCl : etan-1,2-diol (1 : 2) i ChCl : glicerol (1 : 2) u dobivenim ekstraktima nije pronađena galna kiselina [169]. Za ekstrakciju galne kiseline iz aronije (*Aronia melanocarpa*) najpogodnijima su se pokazali ChCl : mliječna kiselina (1 : 1) i ChCl : fruktoza : voda (2 : 1 : 1) [170]. Za razliku od galne kiseline, elaginsku kiselinu je moguće ekstrahirati sa svim upotrijebljenim DES-ovima, ovisno o uvjetima ekstrakcije, u rasponu od 0 do 12,52 µg/mg biljke (Slika 17). Najučinkovitiji DES-ovi za ekstrakciju elaginske kiseline bili su DES-ovi na bazi amida, šećera i alkohola, posebice DES1 s 50% vode i DES5 s 50% vode. Za razliku od ekstrakcije galne kiseline, za ekstrakciju elaginske kiseline nije uočen manji prinos korištenjem DES-ova s karboksilnim kiselinama. Štoviše, DES15 i DES16 sa 30 i 50% dodane vode pokazali su se učinkovitima u ekstrakciji elaginske kiseline. Prema literaturi, kao najprikladnija otapala za ekstrakciju galne i elaginske kiseline iz otpada prehrambene industrije se spominju otapala na bazi alkohola [171], kao što su glicerol : glicin (3 : 1) i glicerol : urea (1 : 1), ChCl : glicerol (1 : 2), ChCl : butan-1,4-diol (1 : 5) [172], ChCl : n-propanol (1 : 1) [173] te na bazi kiselina kao što je ChCl : oksalna kiselina (1 : 1) [174]. Također, pokazana

je i mogućnost korištenja trokomponentnih DES-ova, od kojih su se ChCl : glikolna kiselina : oksalna kiselina pokazali najučinkovitijima za ekstrakciju elaginske kiseline (1:1,7:0,3) iz otpada prehrambene industrije[172].

Za ekstrakciju HT, mogu se koristiti svi primjenjeni DES-ovi. Ovisno o korištenom otapalu, postotku dodane vode i temperature, HT su ekstrahirani u u rasponu od 0,53 do 195,86 $\mu\text{gTAE}/\text{mg}$ biljke (Slika 18). Dobiveni rezultati prate trend ekstrakcije galne i elaginske kiseline, što ne čudi s obzirom da HT uključuju galotanine i elagitanine koji u svom sastavu sadrže galnu i elaginsku kiselinu. Prema rezultatima najučinkovitiji DES-ovi za ekstrakciju HT bila su na bazi amida i alkohola, odnosno DES3 i DES9. Prema dobivenim rezultatima, za daljnje ekstrakcije i optimizaciju odabran je ChCl: urea (1:2) (DES1). Ovo otapalo je odabrano jer se sastoji od prirodnih sastojaka koji su jeftini, lako dostupni i u kombinaciji čine biorazgradivo otapalo [175]. Osim toga, ChCl : urea (1 : 2) nije jako viskozno otapalo, što omogućuje lakše rukovanje i bolji prijenos mase tijekom procesa ekstrakcije čak i pri nižim temperaturama.

Kod ekstrakcije galne kiseline (Slika 10), primjećen je trend povećanja udjela sa povećanjem temperature i povećanjem udjela dodane vode (DES2, DES3, DES4, DES5, DES6, DES7, DES8, DES9, DES11, DES12, DES13, DES17). Važno je napomenuti da prilikom ekstrakcije primjenom nekoliko DES-ova s 10 % vode pri 30 °C (DES1, DES2, DES3, DES4, DES6, DES12, DES14, DES17) i s 10 % vode pri 50 °C (DES4, DES6, DES7, DES12, DES17) u dobivenim ekstraktima nije identificirana galna kiselina. U slučaju ekstrakcije primjenom DES10 i DES14 također dolazi do porasta udjela galne kiseline u ekstraktu s povećanjem temperature i udjela vode pri 30 i 70 °C. Primjenom DES10 pri 50 °C najveći udio galne kiseline identificiran je u ekstraktu sa 30 % dodane vode, a kod DES14 pri 50 °C nema promjena u udjelu galne kiseline s dodatnim dodatkom vode. Kod većine otapala primjećen je trend povećanja udjela elaginske kiseline sa povećanjem temperature i povećanjem udjela dodane vode (Slika 11) (DES1, DES4, DES5, DES6, DES8, DES12, DES13, DES14, DES16, DES17). Kod DES2 uočava se porast udjela elaginske kiseline u ekstraktu s porastom temperature, pri čemu se pri 30 °C porast uočava i s dodatkom vode, dok na temperaturama od 50 i 70 °C udio vode nema utjecaja na rezultat. S druge strane, kod DES3 uočava se porast udjela elaginske kiseline u ekstraktu s porastom udjela vode, pri čemu se s udjelom vode od 10 % porast uočava i s porastom temperature, dok s udjelima vode od 30 i 50 % porast temperature nema utjecaj na rezultat. Kod DES7, DES10, DES11 i DES15 dolazi do porasta udjela elaginske kiseline sa povećanjem temperature kod 10 i 30

% dodane vode, dok se kod 50 % dodane vode ne uočava utjecaj temperature ili čak dolazi do smanjenja udjela komponente s porastom temperature. Kod DES9 dolazi do porasta udjela elaginske kiseline s povećanjem udjela vode pri 30 °C, dok pri temperaturama od 50 i 70 °C dolazi do pada udjela elaginske kiseline s povećanjem udjela vode. Najmanji udio elaginske kiseline postignut je dodatkom 10 % vode pri čemu su najučinkovitija otapala DES3 i DES9. Povećanje postotka vode na 30 % dovodi do povećanja prinosa elaginske kiseline u ekstraktu, pri čemu su DES1, DES9 i DES11 s 30 % vode najučinkovitija otapala. Daljnji porast vode do 50 % dovodi ne samo do blagog povećanja sadržaja elaginske kiseline kod otapala učinkovitih i pri nižim dodacima vode, već i do promjene u učinkovitosti DES-ova koji su pri nižim udjelima vode ekstrahirali vrlo malo elaginske kiseline. Kod većine otapala primjećen je i trend povećanja udjela HT sa povećanjem temperature i povećanjem udjela dodane vode (Slika 17) (DES1, DES4, DES5, DES6, DES7, DES8, DES9, DES12, DES13, DES14, DES17). Kod DES2, DES10 i DES11 dolazi do porasta udjela HT sa povećanim udjelom vode pri 30 i 50 °C, dok pri 70 °C dolazi do pada u udjelu HT u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode. Kod DES3 je uočeno kako pri temperaturi od 30 °C dolazi do porasta udjela HT u ekstraktu sa porastom udjela vode, dok pri temperaturama 50 i 70 °C dolazi do pada u udjelu HT u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode. Kod DES15 i DES16 dolazi do porasta udjela HT sa povećanim udjelom vode pri 30 i 70 °C, dok pri 50 °C dolazi do pada u udjelu HT u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode. Kod 10 % dodatka vode u DES uočeno je da je sadržaj ekstrahiranih HT niži u odnosu na veće postotke dodane vode (30 i 50 %), pri čemu su prema rezultatima najučinkovitija otapala bila DES3 i DES9.

5.2.3. Probir otapala za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina iz koprive

Pripremljeni DES-ovi korišteni su i za ekstrakciju klorogenske kiseline, neoklorogenske kiseline, kofeinske kiseline, cikorinske kiseline, kafeoil-jabučne kiseline, sinapinske kiseline i rutina iz koprive. Kao što se može vidjeti na Slikama 19-24, DES-ovi su se uvelike razlikovali u svojoj sposobnosti i učinkovitosti u ekstrakciji navedenih komponenti. Udio klorogenske kiseline u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-4,21 µg/mg biljke. Najpogodnija otapala za ekstrakciju klorogenske kiseline su DES-ovi na bazi kiselina, s naglaskom na DES15 i DES16, pri čemu je najveći udio klorogenske kiseline u ekstraktu (4,21 µg/mg biljke) postignut primjenom DES15 pri 30 °C i sa 30% vode (Slika 19). Prema literaturi, za ekstrakciju klorogenske kiseline iz biljnog materijala, najpogodnija su se

pokazala otapala na bazi alkohola, amida i kiselina. Primjerice, klorogenska kiselina je ekstrahirana iz *Lonicerae japonicae flos* primjenom ChCl : butan-1,3-diol (1 : 6) s 10 % vode [104], iz listova *Morus alba* L. primjenom ChCl : glicerol (1 : 2) s 20 % vode [105], iz kore *Citrus sinensis* primjenom ChCl : glicerol s 25% vode (w/w) [176], iz suncokreta primjenom ChCl : butan-1,4-diol (1 : 2) s 30% vode [177] te iz duhanskog otpada i zrna zelene kave primjenom otapala ChCl : etilen glikol (1 : 2) [178,179]. Također, za ekstrakciju klorogenske kiseline su se povoljnima pokazali i DES-ovi na bazi amida, kao što je ChCl : urea (1 : 2) za ekstrakciju klorogenske kiseline iz suncokreta [179] te na bazi kiselina, kao što je ChCl : jabučna kiselina (1 : 1) za ekstrakciju iz kore citrusa te listova *Eucommia ulmoides* [180,181,182]. Udio neoklorogenske kiseline u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-0,36 µg/mg biljke, a najveći udio klorogenske kiseline ekstrahiran je pomoću DES-ova na bazi alkohola, s naglaskom na DES8 i DES9, te pomoću DES-ova na bazi šećera, kao što je DES5 (Slika 21). Najveći udio neoklorogenske kiseline u ekstraktu (0,36 µg/mg biljke) postignut je primjenom DES9, odnosno ChCl : etilen-glikol (1 : 2) pri 50 °C i sa 50 % vode. Prema literaturi, za ekstrakciju neoklorogenske kiseline iz biljnog materijala, najpogodnija su se pokazala otapala na bazi alkohola, kao što su ChCl : 1,3-butanediol (1:6) s 10 % vode [104] za ekstrakciju iz *Lonicerae japonicae flos*, ChCl : glicerol s 20 % vode (1 : 2) za ekstrakciju iz listova *Morus alba* L. [105] te na bazi kiselina, kao što je ChCl : jabučna kiselina (1 : 1) s 54 % vode za ekstrakciju iz *Artemisia argyi* [106]. Udio kofeinske kiseline u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-0,27 µg/mg biljke. Najveći udio kofeinske kiseline ekstrahiran je primjenom DES-ova na bazi kiselina, s naglaskom na DES14, DES15, DES16 i DES17 i DES-ova na bazi šećera, kao što je DES5. Najveći udio kofeinske kiseline u ekstraktu (0,27 µg/mg biljke) postignut je primjenom DES14, odnosno ChCl : oksalna kiselina (1 : 1) pri 50 °C i sa 50 % vode (Slika 20). Prema literaturi, za ekstrakciju kofeinske kiseline iz biljnog materijala, najpogodnija su se pokazala otapala na bazi alkohola, kao što su ChCl : butan-1,3-diol (1 : 6) s 10 % vode za ekstrakciju iz *Lonicerae japonica eflos* [104], ChCl : glicerol s 20 % vode (1 : 2) za ekstrakciju iz listova *Morus alba* L. [105], ChCl : propan-1,2-diol s 50 % vode [183] za ekstrakciju iz otpada mljevene kave te na bazi kiselina kao što je ChCl : mliječna kiselina (1 : 2) za ekstrakciju iz sjemenki *Phoenix dactylifera* L. [184]. Udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-11,94 µg/mg biljke. Prema rezultatima, uočljivo je da su na 30 °C najpogodniji DES-ovi na bazi kiselina, posebice DES16, odnosno ChCl : levulinska kiselina (1 : 2), dok se porastom temperature ekstrahira gotovo isti udio kafeoil-jabučne kiseline primjenom svih DES-ova (Slika 22). Pri

temperaturi od 70 °C, manji udio kafeoil-jabučne kiseline se postiže samo s DES3, DES4, DES7, DES14 i DES17 s dodatkom vode od 10 %, pri čemu su navedena otapala i viskozija, pa to može utjecati na niži udio ekstrahirane kafeoil-jabučne kiseline. Najveći udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu (11,94 µg/mg biljke) postignut je primjenom DES16, odnosno ChCl : levulinska kiselina (1 : 2) pri 30 °C i sa 30% vode. Prema literaturi, za ekstrakciju kafeoil-jabučne kiseline iz listova koprive pogodno se pokazalo otapalo limunska kiselina : maltoza (1 : 2) [185] te glicerol : ksilitol : fruktoza (3 : 3 : 3) [186] za ekstrakciju iz listova smokve. Istraživanja o učinkovitosti primjeni DES-ova s ChCl za ekstrakciju kafeoil-jabučne kiseline nisu pronađena. Udio sinapinske kiseline u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-0,25 µg/mg biljke. Najveći udio sinapinske kiseline u ekstraktu (0,25 µg/mg biljke) postignut je primjenom DES13, odnosno ChCl : malonska kiselina (1 : 1) pri 50 °C i sa 30 % vode. Prema Slici 23, uočljivo je da su pri 30 °C najpogodniji DES-ovi na bazi kiselina, posebice DES13, dok se porastom temperature uočava učinkovitost ostalih DES-ova. Prema literaturi, za ekstrakciju sinapinske kiseline iz biljnog materijala pogodna su se pokazala otapala na bazi alkohola, ChCl : 1,4-butandiol (1 : 2) s 23,4 % vode kod ekstrakcije iz riže [187] te ChCl : glicerol (1 : 1) [188] za ekstrakciju iz pogače koja nastaje kao nusprodukt proizvodnje ulja. Udio rutina u ekstraktu koprive kretao se u rasponu 0-1,65 µg/mg biljke. Prema Slici 24, uočljivo je da su na najpogodniji DES-ovi za ekstrakciju rutina na bazi kiselina, posebice DES15 i DES16. Najveći udio rutina u ekstraktu (1,65 µg/mg biljke) postignut je primjenom DES16, odnosno ChCl : levulinska kiselina (1 : 2) pri 30 °C i sa 30 % vode. Prema literaturi, za ekstrakciju rutina iz biljnog materijala pogodna su se pokazala otapala na bazi alkohola, kiselina i amida. Za ekstrakciju rutina iz listova *Morus alba* L. najpogodnije otapalo je ChCl : glicerol s 20 % vode (1 : 2) [105], za ekstrakciju iz kore citrusa to je ChCl : butan-1,4-diol (1 : 2) s 25 % vode [176], za ekstrakciju iz *Ruta graveolens* L. najpogodnije je ChCl : limunska kiselina (1 : 1) [189] te za ekstrakciju iz *Satureja montana* L. najpogodnije je ChCl : mliječna kiselina (1 : 2) [190]. Primjenom računalnih programa i modeliranja za ekstrakciju rutina najpogodnija otapala se pokazuju ChCl : propan-1,2-diol (1 : 2) i ChCl : urea (1 : 2) [118].

Iz dobivenih rezultata, uočljivo je da se ispitane komponente mogu ekstrahirati s različitim učinkovitošću s pojedinom DES-ovima. Upravo to govori u prilog selektivnosti, odnosno mogućnosti odabira otapala kojim će se ekstrahirati samo željene komponente u većim udjelima. Ipak, za većinu komponenti najpogodniji su se pokazali DES-ovi na bazi kiselina i alkohola. S obzirom da je praćen utjecaj tehnike ekstrakcije i procesnih parametara

na ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina, odabran je DES s kojim je postignut zadovoljavajući udio svih ispitivanih komponenti. U ovom slučaju to je bio DES15, odnosno CHCl_3 : mliječna kiselina (1 : 2), koji je pogodno otapalo i zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, s naglaskom na nisku viskoznost i pri nižim temperaturama.

Ispitivanje utjecaja temperature i dodatka vode na ekstrakciju klorogenske kiseline pokazalo je kod nekoliko otapala trend povećanja udjela klorogenske kiseline u ekstraktu s povećanjem udjela dodane vode pri sve tri temperature (Slika 19) (DES2, DES5, DES6, DES7, DES8, DES12, DES14). Kod nekih otapala, primjećen je porast udjela klorogenske kiseline u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode samo pri određenoj temperaturi. Porast udjela klorogenske kiseline uočeni su kod DES1, DES3, DES4, DES9, DES11 na 30 °C; kod DES4, DES10, DES11, DES13, DES16 pri 50 °C; te kod DES10 i DES17 pri 70 °C. Uz to, kod nekoliko otapala najveći udio klorogenske kiseline dobiven je ekstrakcijom s DES-ovima s 30 % vode, pri 30 °C (DES13, DES15 i DES16), pri 50 °C (DES1, DES3, DES17) i pri 70 °C (DES1, DES3, DES4, DES13). U nekoliko slučajeva, primjećen je i pad u udjelu klorogenske kiseline u ekstraktu koprive sa porastom udjela vode, i to pri 50 °C za DES9 i 70 °C za DES9, DES11, DES16. Kod većine otapala nije primjećen utjecaj temperature na udio klorogenske kiseline u ekstraktu koprive. U slučaju ekstrakcije neoklorogenske kiseline, kod nekoliko otapala primjećen je trend povećanja udjela neoklorogenske kiseline u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode pri sve tri temperature (DES1, DES2, DES3, DES4, DES6, DES7, DES9, DES11, DES13), pri čemu kod većine otapala nije detektirana neoklorogenska kiselina s 10 % vode pri 30 °C i 50 °C (Slika 21). Kod nekih otapala, primjećen je porast udjela neoklorogenske kiseline u ekstraktu s povećanjem udjela dodane vode samo pri 30 °C (DES10), te pri 70 °C (DES10, DES12 i DES17). Uz to, kod nekoliko otapala primjećen je najveći udio neoklorogenske kiseline u ekstraktima dobivenima s DES-ovima s 30 % vode, pri 30 °C (DES12), pri 50 °C (DES10, DES12 i DES16). U nekoliko slučajeva, primjećen je i pad u udjelu neoklorogenske kiseline u ekstraktu koprive s porastom udjela vode, i to pri 30 °C (DES16) i pri 50 °C (DES17) i 70 °C. Kod otapala DES5, DES14 i DES15 ne uočava se ovisnost udjela ekstrahirane neoklorogenske kiseline o temperaturi i udjelu vode. Kod većine otapala nije primjećen utjecaj temperature na udio neoklorogenske kiseline u ekstraktu koprive. U slučaju ekstrakcije kofeinske kiseline, kod nekoliko otapala primjećen je trend povećanja udjela kofeinske kiseline u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode pri sve tri temperature (DES1, DES2, DES6, DES7, DES8, DES9, DES10), pri čemu kod većine otapala s

dodatkom 10 % vode nije detektirana kofeinska kiselina pri 30 °C (Slika 20). Kod nekih otapala, primjećen je porast udjela kofeinske kiseline u ekstraktu s povećanjem udjela dodane vode samo pri 30 °C (DES4, DES5, DES13, DES14, DES15, DES16), 50 °C (DES4, DES5, DES12, DES13, DES16) te pri 70 °C (DES12, DES14, DES15, DES17). Uz to, kod nekoliko otapala postignut je veći udio kofeinske kiseline u ekstraktima dobivenima s DES-ovima s 30 % vode, pri 30 °C (DES11, DES12, DES17), pri 50 °C (DES3, DES11, DES14) i pri 70 °C (DES3, DES11, DES13, DES16). U slučaju ekstrakcije primjenom DES17 pri 50 °C dolazi do pada u udjelu kofeinske kiseline sa porastom udjela dodane vode. Kod većine otapala nije primjećen utjecaj temperature na udio kofeinske kiseline u ekstraktu koprive. U slučaju ekstrakcije kafeoil-jabučne kiseline iz koprive, kod nekoliko otapala primjećen je trend povećanja udjela kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode i povećanjem temperature (DES2, DES5, DES6, DES7, DES8, DES11, DES12, DES14 i DES17) (Slika 22). Kod nekih otapala, primjećen je porast udjela kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode samo pri 30 °C (DES1, DES3, DES4, DES10, DES13, DES15), pri 50 °C (DES4, DES10, DES13, DES15, DES16) te pri 70 °C (DES1). Uz to, kod nekoliko otapala primjećen je najveći udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktima dobivenima s DES-ovima s 30% vode, pri 30 °C (DES9 i DES16), pri 50 °C (DES1 i DES3) i pri 70 °C (DES). U slučaju ekstrakcije primjenom DES16 pri 70 °C dolazi do pada u udjelu kafeoil-jabučne kiseline sa porastom udjela dodane vode. S obzirom da sinapinska kiselina nije ekstrahirana sa svim otapalima i pri svim uvjetima, teško je pratiti utjecaj parametara na udio sinapinske kiseline u ekstraktu (Slika 23). U slučaju ekstrakcije rutina iz koprive, kod nekoliko otapala primjećen je trend povećanja udjela rutina u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode (DES1, DES2, DES4, DES6, DES8, DES11, DES12, DES13, DES14, DES15 i DES16) (Slika 24). Važno je napomenuti kako kod većine otapala, primjenom DES-ova s 10 % vode nije ekstrahirana rutin. Primjećen je porast udjela rutina u ekstraktu sa povećanjem udjela dodane vode samo pri 30 °C (DES9, DES10, DES17), pri 50 °C (DES7, DES10) te pri 70 °C (DES3, DES17). Uz to, kod nekoliko otapala primjećen je najveći udio rutina u ekstraktima dobivenima s DES-ovima s 30 % vode, pri 30 °C (DES7), pri 50 °C (DES9, DES17) i pri 70 °C (DES7, DES9, DES10).

5.2.4. Probir otapala za ekstrakciju kanabinoida iz ekstrakta industrijske konoplje

Pripremljeni hidrofobni DES-ovi su korišteni za ekstrakciju kanabinoida (CBD, CBDA, CBG, CBN, THC, THCA, CBC i CBCA) iz industrijske konoplje.

Svim korištenim hDES-ovima moguće je ekstrahirati CBD iz industrijske konoplje. Udio CBD u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 1,52-33,24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 25, uočljivo je da su najpogodniji DES-ovi oni s kaprinskom kiselinom i lidokainom pri različitim omjerima. Najveći udio CBD u ekstraktu (33,34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES14, odnosno kaprinska kiselina : lidokain (3 : 1) pri 70 °C. Prema literaturi, za ekstrakciju CBD iz industrijske konoplje ispitana su samo otapala sa mentolom pri čemu su se kao pogodna pokazala otapala mentol : octena kiselina (1 : 1) [113] te mentol : laurinska kiselina (2 : 1) [191]. Svim korištenim hDES-ovima moguće je ekstrahirati CBDA iz industrijske konoplje. Udio CBDA u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 44,18-136,10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 25, uočljivo je da su najpogodniji hDES-ovi oni na bazi mentola s karboksilnim kiselinama, što je u skladu sa dostupnom literaturom prema kojoj su najpogodnija otapala mentol : octena kiselina (1 : 1) i mentol : laurinska kiselina (2 : 1) [113,191]. Najveći udio CBDA u ekstraktu (136,10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES1, odnosno mentol : mravlja kiselina (1 : 1) pri 70 °C. Za ekstrakciju CBG iz konoplje, nisu se sva otapala pokazala učinkovita (hDES1, hDES2, hDES3, hDES4, hDES5, hDES6). Udio CBG u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu od 0-10,36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 25, uočljivo je da je najpogodniji hDES, hDES7, odnosno mentol : laurinska kiselina (1 : 1) s kojim je i postignut najveći udio CBG u ekstraktu (10,36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke). U literaturi nisu pronađeni podaci o ekstrakciji CBG primjenom DES-ova. Za ekstrakciju CBN, nisu se sva otapala pokazala učinkovita (hDES1, hDES3, hDES4, hDES5, hDES6). Udio CBN u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 0-1,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 26, uočljivo je da je najpogodniji hDES, hDES17, odnosno timol : dekanska kiselina (1 : 1) s kojim je i postignut najveći udio CBN u ekstraktu (1,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke). U literaturi nisu pronađeni podaci o ekstrakciji CBN primjenom DES-ova. Svim korištenim hDES-ovima moguće je ekstrahirati THC iz industrijske konoplje. Udio THC u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 0,50-4,55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke (Slika 26). Prema rezultatima, uočljivo je da su najpogodniji hDES-ovi oni s timolom i karboksilnim kiselinama. Najveći udio THC u ekstraktu (4,55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES23, odnosno timol : kaprilna kiselina (1 : 1) pri 50 °C. Prema literaturi, za ekstrakciju THC iz industrijske konoplje ispitana su samo otapala

sa mentolom pri čemu su se kao pogodna pokazala otapala na bazi mentola s karboksilnim kiselinama pri čemu je najpogodnije otapalo bilo mentol : octena kiselina (1 : 1) [113]. Svim korištenim hDES-ovima moguće je ekstrahirati THCA iz industrijske konoplje. Udio THCA u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 0,54-4,37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 26, uočljivo je da su najpogodniji DES-ovi oni na bazi mentola s karboksilnim kiselinama, što je u skladu sa dostupnom literaturom prema kojoj je najpogodnije otapalo bilo mentol : octena kiselina (1 : 1) [113]. Najveći udio THCA u ekstraktu (136,10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES7, odnosno mentol : laurinska kiselina (1 : 1) pri 70 °C. Za ekstrakciju CBC iz ekstrakta industrijske konoplje, sva otapala se pokazuju učinkovita. Udio CBC u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu 1,85-6,18 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 27, uočljivo je da su najpogodniji DES-ovi oni s timolom u kombinaciji s karboksilnim kiselinama. Najveći udio CBC u ekstraktu (6,18 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES24, odnosno timol : laurinska kiselina (1 : 1) pri 50 °C. U literaturi nisu pronađeni podaci o ekstrakciji CBC primjenom DES-ova. Svim korištenim hDES-ovima moguće je ekstrahirati CBCA iz industrijske konoplje. Udio CBCA u ekstraktu konoplje kretao se u rasponu od 1,18-18,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke. Prema Slici 27, uočljivo je da su najpogodniji DES-ovi oni na bazi mentola s karboksilnim i masnim kiselinama. Najveći udio CBCA u ekstraktu (18,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke) postignut je primjenom hDES1, odnosno mentol : mravlja kiselina (1 : 1) pri 50 °C. U literaturi nisu pronađeni podaci o ekstrakciji CBCA primjenom DES-ova. Prema dobivenim rezultatima, uočava se selektivnost korištenih hDES-ova pa se tako određenim vrstama hDES-ova bolje ekstrahiraju kiselinski oblici, dok se primjenom drugih vrsta bolje ekstrahiraju neutralni derivati. Primjenom hDES-ova s mentolom i kiselinama bolje se ekstrahiraju kiselinski oblici kanabinoida, dok se primjenom otapala s timolom, kamforom i lidokainom u kombinaciji s kiselinama bolje ekstrahiraju neutralni derivati kanabinoida. Na ovakav način, odabirom otapala možemo značajno utjecati na sastav ekstrakta i pripremiti ekstrakt koji nam sadrži zadovoljavajući omjer željenih komponenti. S obzirom da se nadalje pratio utjecaj tehnike ekstrakcije i procesnih parametara na kanabinoide, odabran je hDES s kojim je postignut najveći udio ukupnih kanabinoida (Slika 28), ne pojedinačno. Kao najpogodnija otapala pokazala su se hDES1 i hDES2, te je za daljnji rad odabran hDES2, odnosno mentol : octena kiselina (1 : 1).

Za sve ispitivane komponente i većinu hDES-ova je uočen porast udjela kanabinoida s povećanjem temperature (Slika 25-28). Za ekstrakciju CBD, kod gotovo svih otapala primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala s povišenjem temperature (Slika 25). Kod

nekoliko otapala utvrđen je najveći udio CBD u ekstraktima pri 30 °C (hDES10) i 50 °C (hDES7, hDES11, hDES19, hDES23, hDES24). Za ekstrakciju CBDA, kod deset hDES-ova je pokazan trend porasta učinkovitosti otapala s povišenjem temperature (hDES1, hDES2, hDES3, hDES12, hDES15, hDES16, hDES17, hDES20, hDES21, hDES22) (Slika 25). Iznimka je nekoliko otapala kod kojih je primjećen najveći udio CBDA u ekstraktima pri 30 °C (hDES8, hDES18), 50 °C (hDES10, hDES11, hDES19, hDES23, hDES24) i 70 °C (hDES9). Kod nekih otapala primjećen je i pad učinkovitosti otapala za ekstrakciju CBDA s povišenjem temperature (hDES4, hDES5, hDES6, hDES7, hDES13, hDES14). Kod tri otapala pokazan je trend porasta učinkovitosti otapala u ekstrakciji CBG s povišenjem temperature (hDES15, hDES19, hDES24). Najveći udio CBG utvrđen je u ekstraktima pri 50 °C (hDES18, hDES20, hDES21, hDES23). Primjenom otapala hDES16 utvrđen je pad udjela CBG pri 50 °C, a porast pri 70 °C (Slika 25). Kod osam otapala pokazan je trend porasta učinkovitosti otapala u ekstrakciji CBN s povišenjem temperature (hDES8, hDES9, hDES10, hDES11, hDES12, hDES13, hDES20, hDES21). Kod nekoliko otapala najveći je udio CBN detektiran u ekstraktima pri 30 °C (hDES3, hDES23), odnosno 50 °C (hDES7, hDES16, hDES18, hDES19, hDES22). Kod nekoliko otapala detektiran je i pad udjela CBN pri 50 °C, a potom porast pri 70 °C (hDES14, 15, hDES23) (Slika 26). Kod većine otapala vidljiv je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju THC s povišenjem temperature. Najveći udio THC detektiran je u ekstraktima pri 50 °C (hDES10, hDES11, hDES13, hDES23, hDES24) (Slika 26). Kod većine otapala primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju THCA s povišenjem temperature. Najveći udio THCA detektiran je u hDES10, hDES17 i hDES23 ekstraktima pri 50 °C (Slika 26). Kod dva otapala, hDES9, hDES14, detektiran je pad udjela THCA pri 50 °C, a potom porast pri 70 °C (Slika 26). Kod nekih otapala primjećen je pad učinkovitosti otapala za ekstrakciju THCA s povišenjem temperature (hDES5, hDES8, hDES9, hDES12, hDES18). Kod većine otapala primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju CBC s povišenjem temperature, a kod hDES1, hDES3, hDES11, hDES13, hDES23, hDES24 primjećen je najveći udio CBC u ekstraktima pri 50 °C (Slika 27). Kod devet otapala (hDES11, hDES13, hDES14, hDES15, hDES16, hDES17, hDES20, hDES21, hDES22) primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju CBCA s povišenjem temperature. Kod hDES1, hDES11, hDES19 najveći je udio CBCA detektiran u ekstraktima dobivenima pri 50 °C. Kod tri otapala uočen je pad udjela CBCA pri 50 °C, a potom porast pri 70 °C (hDES3, hDES18, hDES23) (Slika 27). Kod nekih otapala primjećen je i pad učinkovitosti otapala za ekstrakciju CBCA s

povišenjem temperature (hDES4, hDES5, hDES5, hDES7, hDES8, hDES9, hDES10). Prema dobivenim rezultatima, izraženiji je pad u učinkovitosti ekstrakcije s porastom temperature za kiselinske oblike u odnosu na neutralne oblike kanabinoida, što ne čudi s obzirom da se porastom temperature neutralni oblici raspadaju, odnosno toplinskom dekarboksilacijom nastaju neutralni derivati [31].

5.2.5. Probir otapala za ekstrakciju kumarina iz lavande

Pripremljeni hDES-ovi korišteni su i za ekstrakciju umbeliferona i herniarina iz lavande. Za ekstrakciju umbeliferona iz ekstrakta lavande, većina otapala nije se pokazala učinkovita. Prema Slici 29, uočljivo je da su najpogodniji hDES-ovi oni na bazi mentola s karboksilnim kiselinama. Najveći udio umbeliferona u ekstraktu (3,78 µg/mL ekstrakta) postignut je primjenom hDES2, odnosno mentol : octena kiselina (1 : 1) pri 50 °C. Većinom korištenih hDES-ova moguće je ekstrahirati umbeliferon iz lavande. Udio herniarina u ekstraktu lavande kretao se u rasponu 9,69-14,87 µg/mL ekstrakta. Prema Slici 29, uočljivo je da su najpogodniji hDES-ovi oni na bazi mentola s karboksilnim kiselinama. Najveći udio herniarina u ekstraktu (14,87 µg/mL ekstrakta) postignut je primjenom hDES2, odnosno mentol : octena kiselina (1 : 1) pri 50 °C. S obzirom na dobivene rezultate, za daljnji rad odabran je hDES2, odnosno mentol : octena kiselina (1 : 1). Prema literaturi, za ekstrakciju umbeliferona i herniarina iz *Chamomillae flos*, *Lavandula angustifolia* i *Archangelica officinalis* najpogodnije se pokazalo otapalo ChCl : mliječna kiselina : propan-1,3-diol (1 : 2 : 1) [115].

Utjecaj temperature na udio kumarina u ekstraktima je različit ovisno o željenoj komponenti i tipu hDES-ova. Kod tri otapala primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju umbeliferona s povišenjem temperature (hDES4, hDES6, hDES15). Najveći udio umbeliferona detektiran je u hDES1, hDES2 i hDES5 ekstraktima pri 50 °C (Slika 29). Kod većina otapala primjećen je trend porasta učinkovitosti otapala za ekstrakciju herniarina s povišenjem temperature (hDES1, hDES5, hDES6, hDES9, hDES11, hDES15, hDES16, hDES17, hDES18, hDES19, hDES23). Najveći udio herniarina detektiran je u hDES2, hDES5, hDES12 i hDES13 ekstraktima pri 50 °C (Slika 29).

5.3 Utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu

Na učinkovitost ekstrakcije utječu svojstva upotrijebljenih otapala. Prema literaturi, na učinkovitost ekstrakcije primjenom DES-ova najviše utječu viskoznost [46, 52, 120], polarnost [50,122] i pH [192]. Upravo stoga je ispitana korelacija primjenom Pearsonovog koeficijenta korelacije između navedenih parametara i udjela ekstrahiranih komponenti.

Prema rezultatima predstavljenima u Tablici 10, uočljivo je kako postoji korelacija između viskoznosti i udjela većine ispitanih komponenti u ekstraktu, odnosno smanjenjem viskoznosti postiže se veći udio komponenti u ekstraktu. Korelacija jedino nije primjećena kod karnosolne kiseline, CBD i CBG. S obzirom na korelaciju kod većine komponenti, može se zaključiti da je viskoznost važno svojstvo DES-ova koje utječe na udio ispitivanih bioaktivnih komponenti u ekstraktu, što je u skladu sa literaturom [46,52,120].

Utjecaj polarnosti se ne pokazuje tako značajno, odnosno korelacija između polarnosti i udjela komponenti je uočena samo kod karnosola, HT, kofeinske kiseline i rutina (Tablica 10). Kod karnosola i HT veća polarnost otapala se odrazila na povećanje udjela komponenti u ekstraktu, dok je za kofeinsku kiselinu i rutin manja polarnost utjecala na postizanje većeg udjela komponenti u ekstraktima. Utjecaj polarnosti je praćen samo za DES-ove i kombinacije DES-ova s vodom. Za hDES-ove nije bilo dovoljno podataka za praćenje korelacije između polarnosti i udjela kanabinoida i kumarina. Prema dobivenim rezultatima, polarnost korištenih otapala za većinu ispitanih komponenti ne pokazuje korelaciju, vjerojatno jer između ispitanih otapala nije uočena tako značajna razlika u polarnosti.

Također, pH vrijednost otapala nije pokazala tako značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije kao viskoznost. Uočava se korelacija između pH otapala i udjela bioaktivnih komponenti u ekstraktu za karnosolnu kiselinu, elaginsku kiselinu, HT i kofeinsku kiselinu (Tablica 10). Za karnosolnu i kofeinsku kiselinu potreban je niži pH da bi se postigao veći udio komponenti u ekstraktu, dok je za elaginsku kiselinu i HT potreban viši pH. Zanimljivo je primjetiti kako je karnosolna kiselina jedina komponenta na koju od ispitanih fizikalno-kemijskih svojstava utjecaj ima samo pH, dok je kofeinska kiselina jedina na koju utjecaj imaju viskoznost, pH i polarnost. Utjecaj pH je praćen samo za DES-ove i kombinacije DES-ova s vodom. Za hDES nije bilo dovoljno podataka za praćenje korelacije između pH otapala i udjela kanabinoida i kumarina u industrijskoj konoplji i lavandi. Prema dobivenim

rezultatima, pH korištenih otapala za većinu ispitanih komponenti ne pokazuje korelaciju vjerojatno jer između ispitanih otapala nije uočena tako značajna razlika u vrijednostima pH.

5.4. Utjecaj tehnike ekstrakcije i procesnih parametara na udio bioaktivnih komponenti u ekstraktu

Nakon odabira odgovarajućeg otapala za pojedine bioaktivne komponente, ispitan je i utjecaj pojedinih tehnika ekstrakcije kao što su ekstrakcija primjenom miješanja i zagrijavanja, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija i mehanoekstrakcija. Navedene tehnike su odabrane zbog mogućnosti povoljnog utjecaja na ekstrakciju biljnog materijala u kombinaciji s DES-ovima [106-113]. Miješanjem se postiže bolji kontakt materijala i otapala, dok kod MCE osim miješanja dolazi do kidanja stanične stjenke pri čemu se povećava prijenos mase i ubrzava difuzija komponenti. Primjenom MCE može se smanjiti vrijeme ekstrakcije i potrošnja otapala u odnosu na uobičajeno miješanje i zagrijavanje [160]. U slučaju ultrazvuka, fenomen kavitacije dovodi do razbijanja staničnih stijenki pri čemu se posljedično poboljšava prinos ekstrakcije u usporedbi s maceracijom [193]. Osim tehnike ekstrakcije, ispitan je i statistička značajnost procesnih parametara ekstrakcije, kako bi se odredili parametri koji pokazuju važnost za udio komponenti u ekstraktu. Na taj način može se odrediti koji su optimalni uvjeti ekstrakcije za postizanje ekstrakata sa maksimalnim udjelom željenih komponenti. Optimizacija procesa ekstrakcije važan je korak u odabiru značajnih uvjeta za postizanje željenih prinosa pojedinih komponenti u dobivenom ekstraktu.

5.4.1. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju karnosola i karnosolne kiseline iz kadulje

Nakon odabira odgovarajućeg otapala, uspoređeni su udjeli ekstrahirane karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima dobivenima ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem, UAE i MAE primjenom DES15 (ChCl : mliječna kiselina (1 : 2) s različitim udjelima vode. U isto vrijeme je ispitan i utjecaj dodatka vode u DES15, temperature i vremena kod ekstrakcije primjenom miješanja i zagrijavanja te kod UAE (Tablica 11 i 13). S obzirom da se kod MCE temperatura ne može kontrolirati, pa time ni pratiti kao parametar, ispitan je učinak dodatka vode u DES15, vrijeme ekstrakcije i brzina kretanja staklenih kuglica (Tablica 15). Prema Tablicama 11, 13 i 15 uočljivo je da su u većini eksperimenata veći

udjeli karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem u usporedbi s UAE i MCE. Iz rezultata uočljivo je kako je pri nižoj temperaturi i kraćem vremenu veći udio karnosolne kiseline i karnosola postignut primjenom miješanja na magnetskoj miješalici u odnosu na UAE dok je pri višoj temperaturi i dužem vremenu taj udio gotovo jednak ili čak i veći u slučaju UAE. Ovakvi se rezultati mogu objasniti pozitivnim utjecajem miješanja na prijenos mase pri nižim temperaturama s obzirom na višu viskoznost otapala. Također, kod otapala veće viskoznosti potrebno je više energije za stvaranje kavitacije [140]. Pri višim temperaturama, viskoznost DES-ova se značajno smanjuje pa se stoga ne uočava razlika izmjeđu miješanja i kavitacije na udio komponenti u ekstraktu. U slučaju MCE, upotreba staklenih kuglica dovela je do boljeg miješanja biljnog materijala i otapala, čime su ekstrahirane značajne količine karnosolne kiseline i karnosola u kraćem vremenu u usporedbi s druge dvije ekstrakcije, i to pri sobnoj temperaturi (Tablica 11, 13 i 15). Uspoređujući ekstrakte dobivene na sobnoj temperaturi primjenom DES15 s 10 % vode na kugličnom mlinu s onima dobivenima miješanjem i u ultrazvučnoj kupelji pri 30 °C, uočljivo je kako je gotovo isti udio karnosolne kiseline i karnosola postignut kroz 2 minute primjenom kugličnog mlina kao i kroz 30 minuta primjenom miješanja na miješalici i ultrazvučne kupelji. Uspoređujući ekstrakte dobivene na sobnoj temperaturi primjenom DES15 s 30 % vode na kugličnom mlinu s onima dobivenima miješanjem i u ultrazvučnoj kupelji pri 30 °C, uočljivo je kako je gotovo isti udio karnosolne kiseline i karnosola postignut kroz 3 minute primjenom kugličnog mlina kao i kroz 90 minuta primjenom miješanja na miješalici i ultrazvučne kupelji. Prema dobivenim rezultatima, primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem dobiven je ekstrakt s najvećim udjelom karnosolne kiseline i karnosola, pa je navedena tehnika ekstrakcije korištena za pripremu ekstrakata za daljnja ispitivanja.

Sadržaj karnosolne kiseline u ekstraktu kadulje dobivenom miješanjem i zagrijavanjem iznosio je 2,55–14,43 µg/mg biljke, ovisno o primijenjenim parametrima ekstrakcije (Tablica 11). Dobiveni sadržaj karnosolne kiseline u ekstraktu dobivenom primjenom UAE je varirao, ovisno o korištenim parametrima, u rasponu 1,62–14,00 µg/mg biljke (Tablica 13). Udio karnosola dobiven primjenom MCE varirao je ovisno o parametrima u rasponu 1,80–8,26 µg/mg (Tablica 15). Udio karnosola dobiven miješanjem i zagrijavanjem iznosio je 0,81–4,83 µg/mg biljke, ovisno o primijenjenim parametrima ekstrakcije (Tablica 11). Sadržaj karnosola, ovisno o parametrima korištenim kod UAE, iznosio je 0,56–4,18 µg/mg biljke (Tablica 13). Sadržaj karnosola dobiven primjenom MCE iznosio je 0,57–2,02 µg/mg

biljke, ovisno o primijenjenim parametrima ekstrakcije (Tablica 15). Statistički značajan utjecaj na sadržaj karnosolne kiseline ($p < 0,0001$; $p = 0,0202$) u ekstraktima dobivenih miješanjem i zagrijavanjem pokazali su dodatak vode u DES i vrijeme ekstrakcije (Tablica 12). Prema tome, udio karnosolne kiseline povećavao se s produljenim vremenom ekstrakcije, a smanjivao s povećanjem udjela vode. Interakcije između udjela dodane vode i vremena ekstrakcije ($p = 0,0259$) također su pokazale značajan utjecaj na sadržaj karnosolne kiseline. U ekstraktima dobivenim UAE, dodatak vode i temperatura pokazuju statistički značajan utjecaj na sadržaj karnosolne kiseline ($p = 0,0025$; $p = 0,0144$) (Tablica 14). Za ovu tehniku ekstrakcije, interakcije između količine dodane vode i temperature ($p = 0,0433$) također su pokazale značajan utjecaj na udio karnosolne kiseline u ekstraktu. Udio karnosolne kiseline rastao je s povećanjem temperature ekstrakcije, a opadao s povećanjem udjela dodane vode. U ekstraktima dobivenim primjenom MCE, dodavanje vode, vrijeme i brzina kretanja kuglica ($p = 0,0006$; $p = 0,0266$; $p = 0,0002$) kao i interakcije između dodatka vode i brzina kretanja kuglica ($p = 0,0221$) pokazale su statistički značajan utjecaj na sadržaj karnosolne kiseline (Tablica 16). Sadržaj karnosolne kiseline se povećavao s vremenom ekstrakcije i brzinom kretanja kuglica, a smanjivao s povećanjem količine vode. Dodatak vode, vrijeme ekstrakcije i temperatura pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj karnosola ($p < 0,0001$; $p = 0,0008$; $p = 0,0003$) u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem (Tablica 12). Prema tome, sadržaj karnosola se povećava s vremenom i temperaturom ekstrakcije te smanjenjem udjela vode u DES-u. Interakcije između količine dodane vode i vremena ekstrakcije te između količine dodane vode i temperature ($p = 0,0184$; $p = 0,0234$) također pokazuju značajan utjecaj na sadržaj karnosola. U ekstraktima dobivenim MCE, dodatak vode, vrijeme i brzina kretanja kuglica ($p = 0,0055$; $p = 0,0187$; $p = 0,0012$) pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj karnosola (Tablica 16). Sadržaj karnosola se povećavao s vremenom ekstrakcije i brzinom kretanja kuglica, a smanjivao se povećanjem udjela vode u DES-u. Budući da model za ekstrakciju karnosola primjenom UAE, prema RSM-u nije značajan ($p = 0,0708$), rezultati dobiveni za parametre te ekstrakcije nisu prikazani (Tablica 14). Što se tiče ostalih modela, statistički su značajni ($p \leq 0,05$). Dodatno, dobiveni modeli pokazali su neznačajan nedostatak modela ($p = 0,2042 - 0,4491$), osim u slučaju MCE karnosolne kiseline ($p = 0,0008$). Optimizacija procesa ekstrakcije važna je za određivanje najpovoljnijih uvjeta za postizanje maksimalnih prinosa željenih komponenti u dobivenim ekstraktima. Na temelju Box-Behnken dizajna s tri varijable (postotak dodane vode, vrijeme i temperatura ili brzina kretanja kuglica) na tri

razine, određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije za karnosolnu kiselinu i karnosol. Poželjnost navedenih optimizacija je bila visoka, a predloženi optimalni uvjeti potvrđeni su i eksperimentalno s manjim odstupanjima (Tablica 17). Uspoređujući s literaturom, karnosolna kiselina i karnosol su ekstrahirani i primjenom DES-ova i hDES-ova. Optimalni uvjeti kod ekstrakcije primjenom otapala tetrapropil amonijev klorid : propan-1,2-diol : voda (15 : 55 : 30 %) su 1,0 g biljke u 21 mL, 129 minuta i 84 °C [109], dok su kod otapala CHCl_3 : butan-1,2-diol (1 : 2) optimalni uvjeti 1 g biljke u 40 mL otapala, 50 % vode (v/v), 150 minuta i 65 °C [110]. Optimalni uvjeti za dobivanje maksimalnog udjela komponenti u ekstraktu, određeni u ovom radu, su primjena nižeg udjela vode i kraćeg vremena u usporedbi s rezultatima iz literature, dok je optimalna temperatura slična onoj u literaturi.

5.4.2. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih kiselina i HT iz vrkute

Nakon odabira DES1 (kolin klorid : urea (1 : 2)) kao optimalnog za ekstrakciju fenolnih kiselina i tanina iz vrkute, ispitan je utjecaj tri različite tehnika ekstrakcije, te utjecaj dodatka vode u DES1 (v/v), temperature i vremena ekstrakcije kod ekstrakcije primjenom miješanja i zagrijavanja i UAE (Tablica 18 i 20). Kod MCE, ispitan je utjecaj dodatka vode, vremena i brzine kretanja kuglica (Tablica 22). Za usporedbu korištena je ekstrakcija miješanjem i zagrijavanjem, UAE i MCE pomoću mlina s kuglicama. Sve tri tehnike dovele su do poboljšanog prijenosa mase i ubrzale difuziju spojeva. Prema rezultatima u Tablicama 18, 20 i 22 vidljivo je da su najveći prinosi komponenata postignuti primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem. Uspoređujući ekstrakte dobivene na sobnoj temperaturi primjenom DES1 s 30 % vode na kugličnom mlinu s onima dobivenima miješanjem i u ultrazvučnoj kupelji pri 30 °C, uočljivo je kako je veći udio galne i elaginske kiseline te hidroliziranih tanina postignut kroz 3 minute primjenom kugličnog mlina u odnosu na 30 minuta primjenom miješanja na miješalici i ultrazvučne kupelji. Prema dobivenim rezultatima, primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem dobiven je ekstrakt s najvećim udjelom galne i elaginske kiseline te HT, pa je navedena tehnika ekstrakcije korištena za daljnju pripremu ekstrakata.

Udio galne kiseline iznosio je 0,00 – 1,89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke u slučaju miješanja i zagrijavanja; 0,00 – 1,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke korištenjem UAE i 0,00 – 1,02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke korištenjem MCE,

ovisno o primjenjenim parametrima. Sadržaj elaginske kiseline u ekstraktu dobivenom miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 0,74 – 12,76 µg/mg biljke, dobivenim UAE u rasponu 0,08 – 10,87 µg/mg biljke i primjenom MCE u rasponu 0,00 – 7,07 µg/mg biljke, ovisno o korištenim parametrima. Sadržaj HT u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 69,59 – 181,26 µgTAE/mg biljke, u ekstraktima dobivenim UAE u rasponu 18,53 – 136,39 µgTAE/mg biljke, a u ekstraktima pomoću MCE u rasponu 3,06 – 115,26 µgTAE/mg biljke, ovisno o korištenim parametrima. Dodatak vode, kao i interakcije između količine dodane vode i temperature, pokazali su statistički značajan utjecaj na udio galne kiseline ($p = 0,0008$; $p = 0,0021$) u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem (Tablica 19). Dakle, udio galne kiseline raste s povećanjem sadržaja vode. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, dodatak vode i temperatura pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj galne kiseline ($p = 0,0001$; $p = 0,0040$) (Tablica 21). Stoga se sadržaj galne kiseline povećava s povećanjem dodavanja vode i smanjenjem temperature ekstrakcije. Osim toga, interakcije između udjela dodane vode i temperature također su pokazale značajan utjecaj u pogledu udjela galne kiseline ($p = 0,0074$). U ekstraktima dobivenim MCE, dodatak vode i brzina kretanja kuglica ($p < 0,0001$; $p = 0,0002$), kao i interakcije između dodavanja vode i brzine kretanja kuglica ($p = 0,0015$), pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj galne kiseline. Iz ovoga se može vidjeti da se sadržaj galne kiseline povećao s većom brzinom kretanja kuglica i s većim dodatkom vode (Tablica 23).

Dodatak vode, kao i interakcije između udjela dodane vode i temperature te interakcije između vremena i temperature, pokazuju statistički značajan utjecaj na udio elaginske kiseline ($p = 0,0223$; $p = 0,0029$; $p = 0,0393$) u ekstraktima dobivenih miješanjem i miješanjem (Tablica 19). Udio elaginske kiseline povećavao se s povećanjem udjela vode. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, dodatak vode i temperatura pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj elaginske kiseline ($p = 0,0012$; $p = 0,0005$) (Tablica 21). Sukladno tome, sadržaj elaginske kiseline raste s povećanjem postotka vode i smanjenjem temperature ekstrakcije. Osim toga, interakcije između udjela dodane vode i temperature kod UAE također su pokazale značajan utjecaj u pogledu udjela elaginske kiseline ($p = 0,0084$). Osim toga, u ekstraktima dobivenim MCE, dodavanje vode i brzina kretanja kuglica ($p < 0,0001$; $p = 0,0003$), kao i interakcije između udjela vode i brzine kretanja kuglica ($p = 0,0349$), pokazale su statistički značajan utjecaj na sadržaj elaginske kiseline (Tablica 23). Stoga je uočeno da udio elaginske kiseline raste s dodatkom vode i

brzinom kretanja kuglica. Udio vode i temperatura pokazali su statistički značajan utjecaj na udio HT ($p = 0,0004$; $p = 0,0010$) u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem (Tablica 19). Stoga je povećanje udjela vode i temperature dovelo do povećanja udjela HT u ekstraktu. Osim toga, interakcije između udjela vode i temperature, kao i interakcije između vremena i temperature ekstrakcije, imale su statistički značajan učinak na udio HT u ekstraktu. S druge strane, u slučaju ekstrakcije pomoću UAE, na udio HT u ekstraktu je statistički značajno utjecao samo udio vode ($p = 0,0009$), pri čemu je udio HT rastao s povećanjem udjela dodane vode (Tablica 21). Kod MCE, situacija je bila sličnija ekstrakciji miješanjem i zagrijavanjem, gdje je na sadržaj HT u ekstraktu statistički značajno utjecao udio vode i brzina kretanja kuglica ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Stoga povećanje udjela vode i brzine kretanja kuglica dovodi do povećanja udjela HT u ekstraktu. Na udio HT također je statistički značajno utjecala interakcija između udjela vode i brzine kretanja kuglica (Tablica 23). Prema tablicama 19, 21 i 23, može se vidjeti da su svi korišteni modeli za galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i HT bili statistički značajni ($p < 0,0001-0,1000$) s neznačajnim nedostatkom modela ($p = 0,5020-0,7355$). Koficijenti determinacije za sve komponente i tehnike ekstrakcije su se kretali u rasponu od 0,8963 do 0,9756. Prema navedenim podacima, dobiveni modeli prikladni su za korištenje u ekstrakciji galne kiseline, elaginske kiseline i HT primjenom DES1 s tri različite tehnike ekstrakcije.

Ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije, optimalni uvjeti ekstrakcije se razlikuju, kao i ekstrahirane količine željenih komponenti. Prema Tablici 24, može se vidjeti da je za sve tri tehnike dodatak vode od 50% najučinkovitiji za ekstrakciju željenih komponenti. Iako je ovo visok postotak dodatka vode, pokazalo se da ChCl : urea (1 : 2) zadržava nanostrukturu DES do 51 wt% vode. Osim udjela vode, optimalna temperatura ekstrakcije od 30 °C bila je ista za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, kao i za UAE. Optimalno vrijeme ekstrakcije je dulje za miješanje i zagrijavanje u usporedbi s UAE. Za mehanoekstrakciju, vremena ekstrakcije općenito su niža, pa ih je teško usporediti s druge dvije tehnike. Prema poželjnosti, uočljivo je da se kreće između 0,917–1,000, što govori u prilog dobivenog modela i optimalnih uvjeta. U prilog razvijenom modelu, dobiveni udjeli galne kiseline, elaginske kiseline i hidroliziranih tanina u ekstraktu dobivenom pri optimalnim uvjetima bile su vrlo slične predviđenim vrijednostima. Uspoređujući s literaturom, galna kiselina je ekstrahirana i iz *Polygonum aviculares* ChCl : levulinska kiselina (1 : 2) pri čemu su optimalni uvjeti 1 g biljke u 50 mL otapala, 38 % vode (v/v), 70 °C i 60 min [108].

5.4.3. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina iz koprive

Nakon odabira DES15 (ChCl : mliječna kiselina (1 : 2)) kao optimalnog za ekstrakciju fenolnih kiselina i flavonoida iz koprive, ispitan je utjecaj tri različite tehnike ekstrakcije, kao i utjecaj dodatka vode u DES1 (v/v), temperature i vremena ekstrakcije kod ekstrakcije primjenom miješanja i zagrijavanje i UAE. Kod MCE, ispitan je utjecaj dodatka vode, vremena i brzine kretanja kuglica. Za usporedbu korištena je ekstrakcija miješanjem i zagrijavanjem, UAE i MCE pomoću mlina s kuglicama. Prema rezultatima u Tablicama 25, 27 i 29 vidljivo je da su najveći prinosi za većinu komponenti postignuti primjenom UAE. Ekstrakcija miješanjem i zagrijavanjem je pogodnija jedino za kafeoil-jabučnu kiselinu i rutin u odnosu na UAE. U slučaju ekstrakcije komponenti iz koprive, primjenom MCE su dobiveni vrlo slični rezultati drugim dvjema tehnikama čak i pri višim temperaturama. Primjerice, primjenom MCE pri sobnoj temperaturi i kroz jednu minutu je ekstrahirano gotovo isto kafeoil-jabučne kiseline kao ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem pri 50 °C i 90 minuta.

Udio klorogenske kiseline iznosio je 0,00–1,89 µg/mg biljke u slučaju miješanja i zagrijavanja; 0,00 – 1,14 µg/mg biljke korištenjem UAE i 0,00 – 1,02 µg/mg biljke korištenjem MCE, ovisno o primjenjenim parametrima. Udio kofeinske kiseline iznosio je 0,05 – 0,31 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem; 0,13 – 0,35 µg/mg biljke kod UAE te 0,05 – 0,28 µg/mg biljke kod MCE. Udio neoklorogenske kiseline iznosio je 0,05 – 0,31 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem; 0,10 – 0,22 µg/mg biljke kod UAE te 0,06 – 0,16 µg/mg biljke kod MCE. Udio kafeoil-jabučne kiseline iznosio je 5,54 – 8,26 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem, 4,54 – 7,67 µg/mg biljke kod UAE te 3,99 – 8,20 µg/mg biljke kod MCE. Udio cikorinske kiseline iznosio je 0,18 – 0,23 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem; 0,18 – 0,25 µg/mg biljke kod UAE te 0,17 – 0,25 µg/mg biljke kod MCE. Udio sinapinske kiseline iznosio je 0,00 – 0,24 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem; 0,00 – 0,28 µg/mg biljke kod UAE te 0,06 – 0,29 µg/mg biljke kod MCE. Udio rutina iznosio je 0,31 – 1,24 µg/mg biljke kod ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem; 0,49 – 0,99 µg/mg biljke kod UAE te 0,00 – 0,96 µg/mg biljke kod MCE (Tablica 25, 27 i 29).

Udio vode, kao i interakcije između količine dodane vode i vremena ekstrakcije, pokazali su statistički značajan utjecaj na udio klorogenske kiseline ($p = 0,0021$; $p = 0,0100$) u

ekstraktima dobivenim miješanjem (Tablica 26). Dakle, udio klorogenske kiseline raste s povećanjem sadržaja vode. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, ispitani parametri ne pokazuju statistički značajan utjecaj na udio klorogenske kiseline (Tablica 28). U ekstraktima dobivenim MCE, dodatak vode, vrijeme ekstrakcije i brzina kretanja kuglica ($p < 0,0001$; $p = 0,0002$), kao i interakcije između vremena ekstrakcije i brzine kretanja kuglica ($p = 0,0015$), pokazuju statistički značajan utjecaj na sadržaj kiseline. Iz ovoga se može vidjeti da se sadržaj klorogenske kiseline povećao s većom brzinom kretanja kuglica i s većim dodatkom vode (Tablica 30).

Na udio kofeinske kiseline dobivene miješanjem i zagrijavanjem statistički značajan utjecaj imaju samo interakcije između udjela vode i vremena ekstrakcije ($p = 0,0167$). Udio kofeinske kiseline smanjuje se s povećanjem udjela vode (Tablica 26). U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, ispitani parametri ne pokazuju statistički značajan utjecaj na udio kofeinske kiseline (Tablica 28). Udio vode pokazuju statistički značajan utjecaj na udio kofeinske kiseline ($p = 0,0002$) u ekstraktima dobivenih MCE. Udio kofeinske kiseline povećavao se s povećanjem udjela vode (Tablica 30).

U ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem, udio vode, temperatura i vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0003$; $p < 0,001$; $p = 0,0182$), kao i interakcije između temperature i vremena ekstrakcije ($p=0,0470$) pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj neoklorogenske kiseline. Sukladno tome, sadržaj neoklorogenske kiseline raste s povećanjem udjela vode i povećanjem temperature ekstrakcije (Tablica 26). U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, ispitani parametri ne pokazuju statistički značajan utjecaj na udio neoklorogenske kiseline (Tablica 28). Osim toga, u ekstraktima dobivenim MCE, udio vode ($p < 0,0001$), pokazuje statistički značajan utjecaj na sadržaj neoklorogenske kiseline. Stoga je uočeno da udio neoklorogenske kiseline raste s većim dodatkom vode (Tablica 30).

Udio vode i temperatura ($p < 0,0001$; $p = 0,0087$), kao i interakcija između udjela vode i temperature i udjela vode i vremena ekstrakcije ($p=0,0113$; $p=0,0047$) pokazali su statistički značajan utjecaj na udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem. Stoga je povećanje udjela vode i temperature dovelo do povećanja udjela kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu (Tablica 26). S druge strane, u slučaju ekstrakcije pomoću UAE, na udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu je statistički značajno utjecao udio vode i vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0002$; $p = 0,0334$), kao i interakcije između udjela vode i temperature te udjela vode i vremena ekstrakcije ($p = 0,0149$; $p = 0,0464$) pri čemu je udio rastao s povećanjem udjela vode i vremena ekstrakcije (Tablica 28). Kod MCE, na

udio kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu statistički je značajno utjecao udio vode i brzina kretanja kuglica, kao i interakcija između udjela vode i vremena ekstrakcije ($p = 0,002$, $p = 0,0118$; $p = 0,0438$). Stoga povećanje udjela vode i brzine kretanja kuglica dovodi do povećanja udjela kafeoil-jabučne kiseline u ekstraktu (Tablica 30).

U ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem, jedino je vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0003$), pokazalo statistički značajan utjecaj na sadržaj cikorinske kiseline (Tablica 26). Sukladno tome, sadržaj cikorinske kiseline raste s povećanjem vremena ekstrakcije. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE i MCE, ispitani parametri ne pokazuju statistički značajan utjecaj na udio cikorinske kiseline (Tablica 28 i 30).

Na udio sinapinske kiseline dobivene miješanjem i zagrijavanjem statistički značajan utjecaj imaju samo udio vode te interakcije između udjela vode i temperature ekstrakcije ($p = 0,0134$; $p = 0,0240$) (Tablica 26). Udio sinapinske kiseline povećavao se sa smanjenjem udjela vode. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, statistički značajan utjecaj na udio sinapinske kiseline imaju temperatura i vrijeme ekstrakcije ($p < 0,0001$; $p = 0,005$), kao i interakcije između udjela vode i temperature te udjela vode i vremena ekstrakcije ($p < 0,0001$; $p = 0,0415$). Udio sinapinske kiseline se povećava sa smanjenjem vremena ekstrakcije i povećanjem temperature (Tablica 28). Udio vode, vrijeme ekstrakcije i brzina kretanja kuglica ($p = 0,0050$; $p = 0,0063$; $p = 0,0079$) kao i interakcija između udjela vode i vremena ekstrakcije ($p = 0,0208$) pokazuju statistički značajan utjecaj na udio sinapinske kiseline u ekstraktima dobivenih MCE. Udio sinapinske kiseline povećavao se se sa manjom brzinom kretanja kuglica i manjim udjelom vode i dužim vremenom ekstrakcije (Tablica 30).

U ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem, udio vode, temperatura i vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0231$; $p = 0,0319$; $p = 0,0184$), kao i interakcije između udjela vode i temperature ($p = 0,0010$) pokazali su statistički značajan utjecaj na sadržaj rutina (Tablica 26). Sukladno tome, sadržaj rutina raste sa smanjenjem postotka vode i smanjenjem vremena ekstrakcije te povećanjem temperature ekstrakcije. U ekstraktima dobivenim primjenom UAE, svi ispitani parametri pokazuju statistički značajan utjecaj na udio rutina, odnosno udio vode, temperatura i vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0175$; $p = 0,0248$; $p = 0,0040$) pokazuju statistički značajan utjecaj (Tablica 28). Sukladno tome, sadržaj rutina raste s povećanjem postotka vode, povećanjem temperature i vremena ekstrakcije. Osim toga, u ekstraktima dobivenim MCE, udio vode ($p < 0,0001$) i brzina kretanja kuglica ($p = 0,0079$) pokazuju

statistički značajan utjecaj na udio rutina (Tablica 30). Uočeno je da udio rutina raste s dodatkom vode i brzinom kretanja kuglica.

Korišteni modeli za cikorinsku kiselinu primjenom sve tri tehnike ekstrakcije nisu bili statistički značajni ($p=0,0649-0,8327$). Također, modeli za klorogensku, kofeinsku i neoklorogensku kiselinu primjenom UAE nisu bili statistički značajni ($p = 0,1629$; $p = 0,1692$; $p = 0,0920$). Svi ostali modeli za fenolne kiseline i tanine su bili statistički značajni ($p<0,0001-0,0269$) (Tablice 26, 28 i 30). Koficijenti korelacije za sve komponente i tehnike ekstrakcije su se kretali u rasponu od 0,8048 do 0,9573. Prema navedenim podacima, većina dobivenih modela prikladna je za korištenje u ekstrakciji fenolnih kiselina i rutina primjenom DES15 s tri različite tehnike ekstrakcije.

Ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije, optimalni uvjeti ekstrakcije se razlikuju, kao i ekstrahirane količine željenih komponenti. Prema Tablici 31, može se vidjeti da je za sve tri tehnike optimalan dodatak vode različit, pri čemu je najmanji udio vode od 26,21 % potreban za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, a najveći od 44,99 % za MCE. Dodatak vode od 50% najučinkovitiji je za ekstrakciju željenih komponenti primjenom UAE. Za razliku od udjela vode, optimalna temperatura ekstrakcije od 70 °C bila je ista za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, kao i za UAE. Optimalno vrijeme ekstrakcije je dulje za UAE u usporebi sa miješanjem i zagrijavanjem. Za MCE, vremena ekstrakcije općenito su niža, pa ih je teško usporediti s druge dvije tehnike, ali za postizanje vrlo sličnog udjela komponenti kao s druge dvije tehnike bilo je potrebno 3,88 minuta. Prema poželjnosti, uočljivo je da se kreće između 0,873–0,933, što govori u prilog dobivenog modela i optimalnih uvjeta. U prilog razvijenom modelu, dobivene količine fenolnih kiselina i rutina bile su vrlo slične predviđenim vrijednostima. Prema literaturi, za ekstrakciju fenolnih kiselina uključujući klorogensku i kofeinsku kiselinu iz *Lonicerae japonicae flos* optimalni uvjeti postignuti s otapalom CHCl_3 : butan-1,3-diol (1:2) su 1 g biljke u 9 mL otapala s 10 % vode, 20 minuta i 60 °C [104], što se razlikuje od naših rezultata ponajviše u udjelu vode kojeg je u našem istraživanju potrebno više. Ekstrakcijom fenolnih kiselina sa otapalom CHCl_3 : jabučna kiselina (1 : 1) optimalni uvjeti su bili omjer kruto tekuće 1 : 57,5, 54 % vode i 23,5 minuta [106]. U drugom istraživanju gdje su također ekstrahirane fenolne kiseline i rutin primjenom CHCl_3 : glicerol (1 : 2) pokazano je kako je potreban omjer kruto tekuće od 1:20, udio vode od 20 %, 66 °C i 18 minuta [105], što je sličnije našim rezultatima. Prema svemu navedenom, može se zaključiti da se optimalni uvjeti razlikuju ovisno o korištenom otapalu, biljnom materijalu i željenim bioaktivnim komponentama.

5.4.4. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju kanabinoida iz industrijske konoplje

Nakon odabira hDES2 (mentol : octena kiselina (1 : 1)) kao optimalnog za ekstrakciju kanabinoida iz industrijske konoplje, ispitan je utjecaj tri različite tehnike ekstrakcije. Za usporedbu korištena je ekstrakcija miješanjem i zagrijavanjem, UAE i MCE. Osim tehnike ekstrakcije, ispitan je i utjecaj temperature i vremena ekstrakcije kod ekstrakcije primjenom miješanja i zagrijavanje i UAE (Tablica 32 i 34). Kod MCE, ispitan je utjecaj vremena i brzine kretanja kuglica (Tablica 36).

Prema rezultatima u Tablicama 32, 34 i 36 vidljivo je da su najveći prinosi za sve pojedinačne komponente, kao i njihov ukupan prinos, postignuti primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem. Ipak, unatoč nižoj temperaturi i kraćem vremenu ekstrakcije, s MCE su dobiveni rezultati vrlo slični rezultatima dobivenim drugim dvjema tehnikama. Primjerice, primjenom MCE pri sobnoj temperaturi, kroz 3 minute i brzini kretanja kuglica od 1,6 m/s je ekstrahirano gotovo isto CBD kao ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem pri 21,72 °C i 60 minuta. Primjenom ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem dobiven je ekstrakt s najvećim udjelom ukupnih kanabinoida pa je navedena tehnika ekstrakcije korištena za daljnju pripremu ekstrakata.

Udio CBD iznosio je 16,46 – 47,38 µg/mg biljke u slučaju miješanja i zagrijavanja; 20,17 – 31,45 µg/mg biljke primjenom UAE i 17,66 – 27,69 µg/mg biljke primjenom MCE, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije CBD miješanjem i zagrijavanjem nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan utjecaj (Tablica 33), kod UAE temperatura i interakcije između temperature i vremena su pokazale statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$; $p < 0,001$) (Tablica 35) dok je kod MCE brzina kretanja kuglica pokazala statistički značajan utjecaj ($p = 0,0377$) (Tablica 37). Udio CBD u ekstraktima dobivenima UAE se povećava s porastom temperature, a u ekstraktima dobivenima MCE udio CBD raste sa smanjenjem brzine kretanja kuglica (Tablica 36).

Udio CBDA u ekstraktu dobivenom miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 54,60 – 131,25 µg/mg biljke, u ekstraktu dobivenom UAE u rasponu 72,32 – 99,48 µg/mg biljke i u ekstraktu dobivenom MCE u rasponu 70,17 – 101,76 µg/mg biljke, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije CBDA miješanjem i zagrijavanjem temperatura pokazuje statistički značajan utjecaj ($p = 0,0356$) (Tablica 33),

kod UAE nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan utjecaj (Tablica 35), dok je kod MCE brzina kretanja kuglica, vrijeme i interakcija između vremena i brzine kretanja kuglica pokazala statistički značajan utjecaj ($p = 0,0087$; $p = 0,0423$, $p = 0,0048$) (Tablica 36). Udio CBDA u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem raste sa porastom temperature, dok kod MCE udio CBDA raste s porastom vremena i smanjenjem brzine kretanja kuglica.

Udio $\Delta 9$ -THC u ekstraktu dobivenom miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 54,60 – 131,25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, u ekstraktu dobivenom UAE u rasponu 72,32 – 99,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke i primjenom MCE u rasponu od 70,17 – 101,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije $\Delta 9$ -THC miješanjem i zagrijavanjem temperatura pokazuje statistički značajan utjecaj ($p = 0,0356$) (Tablica 33), kod UAE nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan utjecaj (Tablica 35), dok je kod MCE brzina kretanja kuglica pokazala statistički značajan utjecaj ($p = 0,0150$) (Tablica 37). Udio $\Delta 9$ -THC u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem raste sa porastom temperature, a kod MCE raste sa smanjenjem brzine kretanja kuglica.

Udio $\Delta 9$ -THCA u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 0,85 – 1,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, u ekstraktima dobivenim UAE u rasponu 0,81 – 1,43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, a u ekstraktima dobivenim MCE u rasponu 0,64 – 0,94 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije $\Delta 9$ -THCA miješanjem i zagrijavanjem i primjenom ultrazvuka temperatura pokazuje statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$; $p = 0,0188$) (Tablica 33 i 34), dok je kod MCE brzina kretanja kuglica i vrijeme ekstrakcije pokazalo statistički značajan utjecaj ($p = 0,0032$; $p = 0,0060$) (Tablica 35). Udio $\Delta 9$ -THC u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem i UAE raste sa porastom temperature, dok kod MCE udio $\Delta 9$ -THC raste s porastom vremena i smanjenjem brzine kretanja kuglica.

Udio CBCA u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 5,98–15,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, u ekstraktima dobivenim UAE u rasponu 8,24 – 11,37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, a u ekstraktima dobivenim MCE u rasponu 7,25 – 11,67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije CBCA miješanjem i zagrijavanjem i primjenom ultrazvuka nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan utjecaj (Tablica 33 i 35), dok je kod MCE vrijeme ekstrakcije pokazalo statistički značajan utjecaj ($p = 0,0031$) (Tablica 37). Udio CBCA u ekstraktima dobivenima primjenom MCE raste s porastom vremena.

Udio CBC u ekstraktima dobivenim miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 4,33–9,43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, u ekstraktima dobivenim UAE u rasponu 5,11 – 6,93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, a u ekstraktima dobivenim MCE u rasponu 4,92 – 6,07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ biljke, ovisno o korištenim parametrima (Tablica 32, 34 i 36). Kod ekstrakcije CBC miješanjem i zagrijavanjem temperatura pokazuje statistički značajan utjecaj ($p = 0,0162$) (Tablica 33), kod UAE nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan utjecaj (Tablica 35), dok je kod MCE vrijeme ekstrakcije i interakcija između vremena i brzine kretanja kuglica pokazalo statistički značajan utjecaj ($p = 0,0068$; $p = 0,0344$) (Tablica 37). Udio CBC u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem raste s porastom temperature, kod MCE raste s porastom vremena ekstrakcije.

Prema dobivenim rezultatima (Tablica 33, 35 i 37), može se vidjeti da su modeli za CBD, CBDA, CBG, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA, CBCA i CBC bili statistički značajni ($p < 0,0001$ - $0,0434$). Modeli za CBG i CBN nisu statistički značajni ($p = 0,0874$ - $0,6568$). Koficijenti korelacije za sve komponente i tehnike ekstrakcije su se kretali u rasponu od 0,7319 do 0,9756. Prema navedenim podacima, dobiveni modeli prikladni su za korištenje u ekstrakciji određenih kanabinoida primjenom hDES2 s tri različite tehnike ekstrakcije.

Ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije, optimalni uvjeti ekstrakcije se razlikuju, kao i ekstrahirane količine željenih komponenti (Tablica 38). Optimalna temperatura ekstrakcije od 70 °C bila je ista za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, kao i za ultrazvučno potpomognutu ekstrakciju. Optimalno vrijeme ekstrakcije je dulje za ultrazvučno potpomognutu ekstrakciju u odnosu na ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem. Za mehanoekstrakciju, vremena ekstrakcije općenito su niža, pa ih je teško usporediti s druge dvije tehnike. Prema poželjnosti modela, uočljivo je da se kreće između 0,514 i 0,986, što govori u prilog dobivenog modela i optimalnih uvjeta. U prilog razvijenom modelu, ekstrahirane količine kanabinoida bile su vrlo slične predviđenim vrijednostima. Pregledom literature ustanovljeno je da su kanabinoidi ekstrahirani i primjenom DES-ova i hDES-ova. Optimalni uvjeti kod ekstrakcije primjenom otapala mentol:octena kiselina (1:1) su 20 mg biljke u 0,8 mL otapala, 10 minuta i 30 °C [113], dok su kod otapala $\text{ChCl}:(+)\text{-diethyl-L-tartarat}$ (1:1) optimalni uvjeti 1 g biljke u 24 mL otapala, 32 % vode (v/v), 55 minuta i 48 °C [114]. U odnosu na rezultate u literaturi, optimalni uvjeti u ovom radu pokazuju primjenu više temperature i dužeg vremena ekstrakcije kao najpogodnijeg za maksimalni udio kanabinoida u ekstraktu industrijske konoplje.

5.4.5. Odabir tehnike ekstrakcije i optimalnih uvjeta za ekstrakciju kumarina iz lavande

Odabirom hDES2 (mentol : octena kiselina (1 : 1)) kao optimalnog za ekstrakciju kumarina iz lavande, ispitan je utjecaj tri različite tehnike ekstrakcije. Za usporedbu korištena je ekstrakcija miješanjem i zagrijavanjem, UAE i MCE pomoću mlina s kuglicama. Prema rezultatima, vidljivo je da su najveći prinosi za obje komponente, postignuti primjenom UAE. . Ipak, unatoč nižoj temperaturi i kraćem vremenu ekstrakcije, s MCE su dobiveni rezultati vrlo slični rezultatima dobivenim drugim dvjema tehnikama. Primjerice, primjenom MCE pri sobnoj temperaturi, kroz tri minute i brzini kretanja kuglica od tri m/s je ekstrahirano gotovo isti udio herniarina kao ekstrakcijom miješanjem i zagrijavanjem te UAE pri 50 °C i 45 minuta. Za umbeliferon je pokazano kako je gotovo isti udio ekstrahirano primjenom UAE kroz tri minute i pri brzini kretanja kuglica od tri m/s i primjenom miješanja i zagrijavanja kroz 45 min pri 21,72 °C. Prema dobivenim rezultatima, primjenom UAE je dobiven ekstrakt s najvećim udjelom kumarina pa je navedena tehnika ekstrakcije korištena za pripremu ekstrakata za daljnje analize.

Udio umbeliferona iznosio je 0,46 – 1,51 µg/mL ekstrakta u slučaju miješanja i zagrijavanja; 0,36 – 2,65 µg/mL ekstrakta korištenjem UAE i 0,00 – 2,15 µg/mL ekstrakta korištenjem MCE, ovisno o primjenjenim parametrima (Tablica 39, 41 i 43). Kod ekstrakcije umbeliferona miješanjem i zagrijavanjem i primjenom UAE temperatura je pokazala statistički značajan utjecaj ($p = 0,0016$) (Tablica 40 i 42) dok je kod MCE brzina kretanja kuglica pokazala statistički značajan utjecaj ($p = 0,0019$) (Tablica 44). Udio umbeliferona u ekstraktima dobivenima miješanjem i zagrijavanjem te primjenom UAE se povećava s porastom temperature, a u ekstraktima dobivenima MCE udio raste sa povećanjem brzine kretanja kuglica.

Udio herniarina u ekstraktu dobivenom miješanjem i zagrijavanjem varirao je u rasponu 4,88 – 13,48 µg/mL ekstrakta, dobivenim UAE u rasponu 5,46 – 15,11 µg/mL ekstrakta i primjenom MCE u rasponu 5,41 – 8,45 µg/mL ekstrakta, ovisno o primjenjenim parametrima (Tablica 39, 41 i 43). Kod ekstrakcije herniarina nijedan parametar nije pokazao statistički značajan utjecaj primjenom sve tri tehnike ekstrakcije (Tablica 40, 42 i 44).

Model za umbeliferon je bio statistički značajan za sve tri tehnike ($p = 0,0113-0,0283$), dok modeli za herniarin nisu bili statistički značajni ($p = 0,2166-0,5204$) (Tablica 40, 42 i 44). Koficijenti korelacije za umbeliferon primjenom sve tri tehnike ekstrakcije su se kretali

u rasponu od 0,7824 do 0,8358. Prema navedenim podacima, dobiveni model za umbeliferon prikladan je za korištenje u ekstrakciji primjenom hDES2 s tri različite tehnike ekstrakcije.

Ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije, optimalni uvjeti ekstrakcije se razlikuju, kao i ekstrahirane količine željenih komponenti (Tablica 45). Optimalna temperatura ekstrakcije od 70 °C i vrijeme ekstrakcije od 60 minuta bilo je isto za ekstrakciju miješanjem i zagrijavanjem, kao i za UAE. Za MCE, vremena ekstrakcije općenito su niža, pa ih je teško usporediti s druge dvije tehnike. Prema poželjnosti modela, uočljivo je da se kreće između 0,841–0,911, što govori u prilog dobivenog modela i optimalnih uvjeta. U prilog razvijenom modelu, unatoč tome što za herniarin razvijeni modeli nisu statistički značajni, dobivene količine kumarina bile su vrlo slične predviđenim vrijednostima. Pregledom literature ustanovljeno je da su kumarini ekstrahirani primjenom DES-ova. Optimalni uvjeti kod ekstrakcije primjenom otapala CHCl_3 : mliječna kiselina : propan-1,3-diol (1 : 2 : 1) su omjer kruto tekuće od 1 : 40, 20 minuta i 62 °C [115]. Za razliku od navedenog u literaturi, optimalni uvjeti određeni u ovom radu, odnosno uvjeti najpogodniji za dobivanje maksimalnog udjela komponenti su viša temperatura (70 °C) i dulje vrijeme (60 min).

5.5. Usporedba učinkovitosti DES-ova s konvencionalnim otapalima

Na biosintezu fitokemikalija u biljkama utječu mnogi čimbenici i to prije i nakon žetve, uključujući genetiku same biljke, poljoprivrednu praksu, čimbenike okoliša (mikroklima, lokacija, sezona rasta, tip tla i hranjive tvari), zrelost biljke, skladištenje i preradu nakon žetve. Svi ti parametri mogu značajno utjecati na procese povezane s rastom i razvojem biljaka, čak i njihovu sposobnost sintetiziranja sekundarnih metabolita, što na kraju dovodi do promjene ukupnog fitokemijskog sastava [194]. Drugim riječima, nijedna biljka neće imati potpuno isti udio bioaktivnih komponenti, pa stoga pri uspoređivanju rezultata s literaturom, čak i za istu biljnu vrstu treba biti pažljiv. Iz tog razloga, u ovom je radu na istim biljkama provedena ekstrakcija s DES-ovima i konvencionalnim otapalima kako bi se usporedila učinkovitost otapala. Za usporedbu rezultata primijenjena je ekstrakcije miješanjem i zagrijavanjem, a korištena su konvencionalna otapala: voda, smjese etanola i vode u rasponu 30-70 % (v/v), etanol i metanol.

Za ekstrakciju karnosolne kiseline i karnosola iz kadulje, konvencionalna otapala su manje učinkovita u odnosu na DES15 pri optimalnim uvjetima. Najviše karnosolne kiseline je ekstrahirano primjenom etanola pri 50 °C kroz 90 min, a najviše karnosola primjenom 50 % etanola pri 50 °C kroz 90 min. Temperatura i vrijeme ekstrakcije pokazuju različit utjecaj ovisno o upotrijebljenom otapalu, pa tako kod nekih otapala duljim vremenom ekstrakcije i višom temperaturom dolazi do smanjenja udjela ekstrahirane karnosolne kiseline, dok se u nekim slučajevima to ne uočava (Tablica 46). Uspoređujući s optimalnim uvjetima kod ekstrakcije DES-ovima, vrijeme potrebno za dobivanje najvećeg udjela karnosolne kiseline i karnosola je jednako, dok je potrebna niža temperatura. Prema literaturi, za ekstrakciju fenolnih diterpena, uključujući karnosolnu kiselinu i karnosol, najučinkovitije su vodene otopine etanola ili metanol, pri čemu su primjećeni veći prinosi sa smanjenjem polarosti otapala [195].

Za ekstrakciju galne i elaginske kiseline te HT iz vrkute, konvencionalna otapala su manje učinkovita u odnosu na DES15 pri optimalnim uvjetima. Najviše galne kiseline je ekstrahirano primjenom vode pri 30 °C kroz 90 min, najviše elaginske kiseline je ekstrahirano primjenom vode pri 70 °C kroz 30 min, a najviše HT s 50 % etanolom pri 50 °C kroz 60 min. Kod većine otapala ne uočava se utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na prinos galne kiseline. Iznimka su voda i metanol gdje dolazi do pada udjela galne kiseline s porastom temperature i vremena. Kod elaginske kiseline utjecaj temperature i vremena na

prinos ovisi o korištenom otapalu. Za najpogodnije otapalo, vodu, uočava se porast udjela elaginske kiseline u ekstraktu s porastom temperature i u kraćem vremenu ekstrakcije. Utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na prinos HT ovisi o korištenom otapalu. Za najpogodnije otapalo, 50 % etanol, ne uočava se utjecaj vremena ekstrakcije pri istoj temperaturi, dok kod povišene temperatura u ekstrakcijama provedenima u vremenu 30 i 90 minuta dolazi do porasta udjela HT (Tablica 47). Za ekstrakciju galne kiseline, elaginske kiseline i HT primjenom konvencionalnih otapala potrebno je slično vrijeme (68,2 minute) i niža temperatura (30 °C) u odnosu na ekstrakciju DES-ovima. Prema literaturi, za ekstrakciju galne kiseline iz biljnog materijala najpogodnije su se pokazale vodene otopine etanola, s naglaskom na 70 % etanol [196, 197]. Za ekstrakciju elaginske kiseline, koja se češće ekstrahira iz voća i povrća nego iz biljnog materijala, korišten je metanol, etanol : dietileter : voda (8 : 1 : 1) te metanol : dimetilformamid (1 : 1) [173, 198, 199]. Proizvodnja komercijalne elaginske kiseline provodi se ekstrakcijom biljnog materijala bogatog elaginskom kiselinom primjenom smjese kiseline i metanola kao otapala, nakon čega slijedi hidroliza s koncentriranom HCl ili H₂SO₄ [200]. Za ekstrakciju tanina koriste se različita otapala, kao što su se voda ili voda u kombinaciji s drugim otapalima poput metanola, etanola, acetona i NaOH [201].

Za ekstrakciju klorogenske, neoklorogenske, kafeoil-jabučne kiseline i rutina iz koprive konvencionalna otapala su se pokazala učinkovitija u odnosu na DES-ove. S druge strane, za ekstrakciju kofeinske i sinapinske kiseline su se DES-ovi pokazali učinkovitiji. Najviše neoklorogenske i sinapinske kiseline ekstrahirano je primjenom vode, i to za neoklorogensku kiselinu pri 70 °C kroz 90 min i sinapinsku kiselinu pri 30 °C kroz 30 min. Za klorogensku kiselinu i rutin najpogodnije otapalo je bilo 50 % etanol, i to za klorogensku kiselinu pri 50 °C kroz 60 min, a za rutin pri 70 °C kroz 30 minuta. Za kofeinsku kiselinu je najpogodnije otapalo 70 % etanol pri 70 °C kroz 90 min. Za sve komponente utjecaj temperature i vremena ekstrakcije je specifičan za samo otapalo, odnosno ne može se ustanoviti neki opći trend. Primjerice, za ekstrakciju klorogenske kiseline sa 50 % etanolom i kafeoiljabučne kiseline sa 30 % etanolom kao najpogodnijim otapalima, primjećuje se porast udjela ekstrahiranih komponenata s vremenom ekstrakcije pri 30 °C, dok se pri 50 i 70 °C uočava pad u udjelu kiselina s vremenom ekstrakcije. Za ekstrakciju kofeinske kiseline sa 70 % etanolom i neoklorogenske kiseline sa vodom primjećuje se pad udjela ekstrahiranih komponenti s vremenom ekstrakcije pri 30 °C, dok se pri 50 i 70 °C uočava porast u udjelu kiselina s vremenom ekstrakcije. Kod sinapinske kiseline su vrijednosti dobivene pri različitim

uvjetima temperature i vremena vrlo slične, pa je teško pratiti utjecaj tih parametara. Za ekstrakciju rutina primjenom 50 % etanola kao najpogodnijeg otapala pri 30 i 50 °C se uočava pad u udjelu rutina s vremenom, dok je pri 70 °C maksimalan udio rutina postignut za 60 minuta (Tablica 48). Uspoređujući s optimalnim uvjetima kod ekstrakcije DES-ovima, rezultati su za određene komponente vrlo slični, dok za neke odstupaju. U svakom slučaju ekstrakcija DES-ovima pri optimalnim uvjetima je kraća, odnosno 30 minuta, dok je temperatura viša, odnosno 70 °C, što su uvjeti koji su potrebni i za određene komponente (klorogenska, kofeinska, rutin) prilikom ekstrakcije konvencionalnim otapalima. Prema literaturi, za ekstrakciju fenolnih kiselina i flavonoida najčešće se koriste vodene otopine etanola i metanola. Prema provedenim istraživanjima, za ekstrakciju klorogenske i neoklorogenske kiseline najpogodnije se pokazala voda te vodene otopine etanola i metanola, kao što je 30 % etanol te 70 i 80 % metanol [202]. Za ekstrakciju kofeinske kiseline iz biljnog materijala najpogodnija otapala su bila metanol (41 i 85 %) te 50 % etanol [203, 204]. Za ekstrakciju sinapinske kiseline najčešće se koriste vodene otopine etanola (najčešće 70 %) i metanola, pri čemu se u etanolne otopine dodaju i puferi kako bi se održao pH otapala odgovarajućim za ekstrakciju [205, 206]. Za ekstrakciju rutina najčešće se koriste etanol i metanol, odnosno 40 – 95 % vodene otopine etanola i metanola [207].

Za ekstrakciju CBD, CBDA, CBG, CBGA i THC hDES-ovi su učinkovitiji u odnosu na konvencionalna otapala, dok su za ekstrakciju THCA i CBCA učinkovitija konvencionalna otapala. Najviše CBD ekstrahirano je primjenom 30 % etanola pri 70 °C kroz 90 minuta, najviše CBDA i CBG primjenom etanola pri 70 °C kroz 30 minuta, najviše CBGA primjenom etanola pri 30 °C kroz 60 minuta, najviše THC primjenom 50 % etanola pri 0 °C kroz 60 minuta, najviše THCA primjenom 70 % etanola pri 30 °C kroz 30 minuta i najviše CBC primjenom 50 % etanola pri 70 °C kroz 60 minuta. S obzirom da iz kiselinskih oblika kanabinoida toplinskom dekarboksilacijom nastaju neutralni oblici, ne čudi da dobiveni rezultati pokazuju da je za kiselinske oblike pogodnija niža temperatura ili kraće vrijeme ekstrakcije, dok je za neutralne oblike pogodnija viša temperatura i duže vrijeme ekstrakcije (Tablica 49). S obzirom da se kod ekstrakcije hDES-ovima ne uočava tako značajan utjecaj parametara ekstrakcije na udio komponenti kao kod konvencionalnih otapala, optimalni uvjeti su pri visokoj temperaturi (70 °C) kroz 60 minuta, što odgovara uvjetima za ekstrakciju neutralnih oblika konvencionalnim otapalima. Za ekstrakciju kanabinoida, najpogodniji su se pokazali etanol i metanol s obzirom na njihovu sposobnost otapanja, relativno nisku cijenu i što je još važnije, nižu točku vrenja. Kod pripreme proizvoda za

medicinske ili dijetetske primjene, etanol je poželjnije otapalo od metanola zbog manje toksičnosti. Uz alkohole, vrlo često se spominje i ekstrakcija primjenom heksana kao pogodna za ekstrakciju kanabinoida [208].

Za ekstrakciju umbeliferona i herniarina konvencionalna otapala su učinkovitija u odnosu na hDES-ove. Najviše umbeliferona je ekstrahirano primjenom vode pri 30 °C kroz 30 min, a najviše herniarina s 50 % etanolom pri 70 °C kroz 30 min. Temperatura i vrijeme ekstrakcije pokazuju različit utjecaj ovisno o upotrijebljenom otapalu, pa je tako primjerice najveći udio umbeliferona detektiran u ekstraktima dobivenima pri 60 minuta neovisno o temperaturi, dok je za ekstrakciju herniarina s 50 % etanolom primjećen porast udjela herniarina s porastom temperature i kraćim vremenom ekstrakcije (Tablica 50). Uspoređujući s optimalnim uvjetima kod ekstrakcije hDES-ovima, vrijeme potrebno za dobivanje najvećeg udjela komponenti je duže za hDES-ove nego za konvencionalna otapala, dok je temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija ista, 70 °C. Prema literaturi, za ekstrakciju herniarina i umbeliferona, najučinkovitije su vodene otopine etanola ili metanola, s naglaskom na 50 % etanol [209].

5.6. Utjecaj vrste i fizikalno-kemijskih karakteristika makroporoznih smola i desorbensa na udio bioaktivnih komponenti

Jedan od nedostataka primjene DES-ova u ekstrakciji fenolnih komponenti je izolacija željenih komponenti iz DES ekstrakata, budući da navedena otapala imaju zanemariv tlak pare i dobro se miješaju s vodom [6,7]. Također, "problem" leži u paradoksu između učinkovitosti ekstrakcije s jedne strane i stope oporavka s druge strane s obzirom da veća sposobnost ekstrakcije znači bolju interakciju između ciljanih spojeva i korištenih otapala, što rezultira težim razdvajanjem željenih spojeva od otapala. Upravo stoga je predloženo nekoliko metoda za dobivanje izolaciju željenih komponenti iz DES ekstrakata, kao što je primjena antiotapala, makroporoznih smola, rekristalizacije i povratne ekstrakcije [102, 128]. Posljednjih se godina sve više koriste makroporozne smole za pročišćavanje ekstrakta i izolaciju komponenata iz biljaka i biljnih ekstrakata jer su se pokazale učinkovite i praktične za rad [209]. U usporedbi s drugim metodama, prednosti primjene makroporoznih smola uključuju nisku cijenu, jednostavan postupak i visoku učinkovitost [211-213].

Ove prednosti čine makroporozne smole uspješnima u izolaciji i pročišćavanju različitih vrsta bioaktivnih komponenti, kao što su saponini [211,212], izoflavoni [213] i antocijanini

[214]. Sposobnosti adsorpcije i desorpcije makroporoznih smola ovise o strukturi same smole i ciljanih spojeva. Zbog kemijske strukture kao i različite polarnosti, veličine čestica, specifične površine i promjera pora različitih vrsta makroporoznih smola, teško je procijeniti njihovu adsorpcijsku sposobnost za željene spojeve. Stoga, kako bi se odredila najbolja smola kao i otapalo za desorpciju bioaktivnih komponenti, ispitivanje je provedeno s različitim smolama i otapalima. Prema materijalu, smole se mogu podijeliti na nepolarne makroporozne smole, na bazi polimera stirena i divinilbenzena; umjereno polarne makroporozne smole, od poliakrilatnih polimera i multifunkcionalnih metakrilata koji se koriste kao sredstva za umrežavanje i polarne makroporozne smole koje u svom sastavu uglavnom sadrže sumpor, kisik i amidne skupine. Ove prednosti čine makroporozne smole uspješnima u izolaciji i pročišćavanju različitih vrsta bioaktivnih komponenti, kao što su saponini [211, 212], izoflavoni [213] i antocijanini [214]. Sposobnosti adsorpcije i desorpcije makroporoznih smola ovise o strukturi same smole i ciljanih spojeva. Zbog kemijske strukture kao i različite polarnosti, veličine čestica, specifične površine i promjera pora različitih vrsta makroporoznih smola, teško je procijeniti njihovu adsorpcijsku sposobnost za željene spojeve.

U procesu adsorpcije postižu se interakcije između adsorbensa i spoja, kao i interakcije s otapalom [215]. Proces adsorpcije fenolnih spojeva na različitim makroporoznim smolama postiže se najčešće van der Waalsovima silama ili vodikovom vezom između komponenti i smole [216]. Prema literaturi [162] kapacitet adsorpcije ovisi o kemijskim i fizičkim svojstvima smole, kao što su interakcije između smola i komponenti, površinska polarnost, veličina čestica i površina makroporoznih smola.

Kao što se može vidjeti iz Tablice 51, sve korištene makroporozne smole pokazale su slična adsorpcijska ponašanja i adsorpcijske kapacitete za karnosolnu kiselinu i karnosol. Površina čestica, radijus pora i površina ispitanih smola su različiti, a budući da su adsorpcijski kapaciteti i prinos svih smola slični za karnosolnu kiselinu i karnosol može se zaključiti da navedene karakteristike ne igraju značajnu ulogu. Gledajući desorpciju, XAD7HP i HP2MG bile su najučinkovitije smole s površinom u rasponu od 470–500 m²/g, veličinom čestica 350 – 500 μm i radijusom pora 170-5500 Å. Za galnu kiselinu adsorpcijski kapacitet je najviši za smolu HP2MG, a adsorpcijski prinos za smolu HP20 (Tablica 52). Navedene smole imaju površinu u rasponu od 470-600 m²/g, što govori u prilog da je za galnu kiselinu navedena površina smola najpogodnija. Veličina čestica navedenih smola je u rasponu od 250 do 350 μm, što znači da je ta veličina čestica smola pogodna za adsorpciju

galne kiseline. Za navedene smole, radijus pora je 170-260 Å što nam govori o najprikladnijem radijusu za adsorpciju galne kiseline. Za desorpciju najpogodnija smola je HP2MG, što znači da su iste fizikalno-kemijske karakteristike smola potrebne i za adsorpciju i desorpciju galne kiseline. Kod elaginske kiseline se ne uočava razlika u adsorpcijskom kapacitetu i prinosu kao i u desorpcijskom prinosu, odnosno tip smole i površina smola ne igra ulogu u adsorpciji (Tablica 52). Kod HT su sa svim smolama postignuti slični rezultati za adsorpcijski kapacitet i prinos, ali najveći kapacitet je postignut sa smolom XAD16N, a najveći prinos s HP21 (Tablica 52). Veličina čestica za te dvije smole je različita, pa prema tome ne igra ulogu u adsorpciji HT, dok je prikladan raspon površine 570-800 m²/g i radijus pora 80-150 Å. Za desorpciju HT iste smole se pokazuju najpogodnijim, što znači da isti parametri utječu i na proces desorpcije HT u prikladno otapalo. Za kofeinsku, klorogensku i kafeoil-jabučnu kiselinu najveći adsorpcijski kapacitet i prinos (Tablica 53) je postignut sa smolom HP2MG sa manjom površinom i veličinom čestica te srednjim radijusom pora. Za desorpciju kofeinske kiseline najpogodnija smola je XAD7HP, a za klorogensku kiselinu HP20 i HP21 što govori o različitim parametrima potrebnima za desorpciju u odnosu na adsorpciju. Kod kafeoil-jabučne kiseline se ne uočava razlika u desorpcijskom prinosu smola što znači da ovi fizikalno-kemijski parametri ne utječu na desorpciju (Tablica 54). Za neoklorogensku kiselinu najveći adsorpcijski kapacitet i prinos je postignut sa smolama XAD16N, HP21 i HP2MG čija se površina značajno razlikuje, pa prema tome površina ne utječe na adsorpciju neoklorogenske kiseline (Tablica 53). Kod neoklorogenske kiseline se ne uočava razlika u desorpcijskom prinosu smola što ukazuje na to da ovi fizikalno-kemijski parametri ne utječu na desorpciju (Tablica 54). Za sinapinsku kiselinu najveći adsorpcijski kapacitet i prinos je postignut sa smolom XAD16N, dok je sa ostalim smolama postignut značajno niži adsorpcijski kapacitet i prinos (Tablica 53). Navedena smola ima veliku površinu i veličinu čestica sa srednjim radijusom pora što je potrebno za adsorpciju sinapinske kiseline. Za cikorinsku kiselinu najveći adsorpcijski kapacitet i prinos je postignut sa smolama HP2MG i HP20 čija površina je u rasponu 470-600 m²/g, veličina čestica u rasponu 250 - 350 μm i radijus pora od 170-260 Å (Tablica 53). S obzirom da se u tom rasponu nalaze i druge smole koje se nisu pokazale učinkovitima u adsorpciji, ne može se govoriti o utjecaju navedenih parametara. Za rutin su najveći adsorpcijski kapacitet i prinos postignuti sa smolama HP20, XAD7HP i XAD16N koje imaju različite fizikalno-kemijske karakteristike (Tablica 53). Za desorpciju rutina najprikladnija smola je XAD7HP koja je bila prikladna i za proces adsorpcije (Tablica 54). Za CBD, CBDA, CBGA, CBC i

CBDVA najveći adsorpcijski kapacitet i prinos je postignut sa smolom HP21 čija je veličina čestica i radijus pora najmanji od ispitanih smola (Tablica 55). Što se tiče desorpcije, ne uočava se razlika između korištenih smola za CBD, CBDA i CBGA, što znači da na desorpciju ne utječu navedene fizikalno-kemijske karakteristike smola (Tablica 56). Primjenom smola nije došlo do desorpcije CBDVA u otapalo. Za CBC najpogodnije smole za desorpciju su XAD16N i HP21. Za CBG i CBCA najveći adsorpcijski kapacitet i prinos je postignut sa smolama XAD16N i HP20 koje imaju veliku površinu i srednji radijus pora (Tablica 55). Veličina čestica je jako različita za dvije najpogodnije smole tako da veličina ne igra ulogu u adsorpciji. Primjenom smola CBG se nije desorbirao u otapalo, dok se za CBCA ne uočava razlika ovisno o korištenoj smoli. Za adsorpcijski kapacitet i prinos za THCA i THC najpogodnija smola je XAD16N, dok je sa ostalim smolama postignut daleko niži adsorpcijski kapacitet i desorpcijski prinos. Navedena smola je smola sa najvećom površinom i veličinom čestica od ispitanih smola, što znači da je za adsorpciju THCA i THC potrebna veća površina i veličina čestica (Tablica 55). Za desorpciju THC i THCA ne uočava se razlika između upotrijebljenih smola, što znači da praćeni fizikalno-kemijski parametri ne utječu na desorpciju (Tablica 56). Za adsorpciju umbeliferona najveći kapacitet i prinos je postignut sa smolom HP20, pri čemu je sljedeća najpogodnija smola HP2MG dok je za adsorpciju umbeliferona najpogodnija HP2MG, pa potom HP20 (Tablica 57). Navedene smole imaju srednju površinu, veličinu čestica i radijus pora, što znači da je za adsorpciju umbeliferona najpogodnija površina u rasponu od 470 do 600 m²/g, veličina čestica 250 do 350 μm i radijus pora od 170-260 Å. Ipak, važno je napomenuti da se u tom rasponu parametara nalaze i druge smole, pa je teško donijeti zaključak o utjecaju određenih parametara. Za desorpciju umbeliferona ne uočava se razlika u desorpcijskom prinosu smola što znači da ovi fizikalno-kemijski parametri ne utječu na desorpciju, dok su za desorpciju umbeliferona najpogodnije smole XAD7HP i HP2MG (Tablica 57).

Što se tiče polarnosti, ovisno o komponenti, odabire se odgovarajuća makroporozna smola na način da se za jako polarne komponente koriste umjereno polarne smole, dok su za slabo polarne komponente koriste nepolarne smole. Također, pokazano je kako se i jako polarne komponente mogu adsorbirati na slabo polarne i nepolarne smole s odgovarajućom veličinom čestica, specifičnom površinom i prosječnim promjerom pora [217]. S obzirom da željene komponente posjeduju hidroksilne, karboksilne skupine i kateholni dio, korištene su i umjereno polarne i nepolarne smole. Budući da je za karnosolnu kiselinu i elaginsku kiselinu postignut isti ili gotovo isti adsorpcijski kapacitet i prinos sa svim smolama, može

se zaključiti da polarnost smola ne utječe na adsorpciju navedenih kiselina. Za galnu kiselinu najpogodnije smole za adsorpciju su slabo do srednje polarne, dok su za HT najpogodnije nepolarne smole. Za kofeinsku, klorogensku i kafeoil-jabučnu kiselinu najpogodnije su srednje polarne do polarne smole. Za neoklorogensku kiselinu najpogodnije se pokazuju nepolarne do srednje polarne smole. Za sinapinsku kiselinu najpogodnija je nepolarna smola, dok su za cikorinsku kiselinu najpogodnije slabo do srednje polarne. Za adsorpciju rutina se pokazao pogodan raspon polarnosti od nepolarnog do polarnog što govori da polarnost makroporoznih smola nije značajan parametar za adsorpciju rutina. Za adsorpciju CBD, CBDA, CBGA, CBC i CBDVA, THC i THCA najpogodnija je nepolarna smola dok su za adsorpciju CBG i CBCA najpogodnije nepolarne do slabo polarne smole. Za adsorpciju umbeliferona i herniarina najpogodnije su slabo do srednje polarne smole. Kod nepolarnih do slabo polarnih polistirenskih adsorbensa dodatna adsorpcijska svojstva uključuju π - π interakcije između benzenskog prstena smola i komponenata, dok se u polimetakrilnim adsorbensima stvaraju vodikove veze između skupina smola i komponenata [162, 216, 217]. Prema tome, kod komponenta koje se bolje adsorbiraju na polistirenske smole dolazi do π - π interakcije između benzenskog prstena smola i komponenata što uključuje HT i većinu kanabinoida, dok kod ostalih komponenti kao što su fenolne kiseline dolazi do stvaranja vodikovih veza između skupina smola i komponenata. Kod komponenata gdje se ne uočava razlika između adsorpcije s polarnim i nepolarnim smolama, postoji mogućnost da se u oba slučaja, iako su veze različite, stvore dovoljno jake veze između skupina smole i skupina željenih komponenti. Prema svemu navedenom, učinak makroporoznih smola može se povezati sa sinergijskim učincima kemijskih i fizikalnih svojstava smola.

Proces desorpcije bioaktivnih komponenti s makroporoznih smola predstavlja kompeticiju međumolekulskih sila adsorpcije i otapanja u otapalu. Kod određenih komponenti, kao što su elaginska kiselina, neoklorogenska kiselina, kafeoil-jabučna kiselina, sinapinska kiselina, cikorinska kiselina, umbeliferon i većina kanabinoida ne uočava se razlika u desorpcijskom prinosu između smola, što znači da se veze postignute i sa nepolarnim i polarnim smolama jednako kidaju u procesu desorpcije. Najveći desorpcijski prinos za karnosolnu kiselinu i karnosol pokazuje smola XAD7HP, a potom HP2MG dok su kod ostalih smola desorpcijski kapaciteti niži. S obzirom da su navedene smole polarne kod kojih dolazi do vodikovih veza, može se zaključiti da čvrstoća vezanja utječe na desorpciju. Prema rezultatima, kod makroporoznih smola koje sadrže metakrilat i akrilat, karnosolna kiselina i karnosol se lakše otpuštaju, što ukazuje na slabiju interakciju između otopljene

tvori i adsorpcijskog materijala. Najveći desorpcijski prinosi za HT su postignuti pomoću smola XAD16N, HP21 i HP20 što su nepolarne do slabo polarne polistirenske smole kod kojih dolazi do π - π interakcije između benzenskog prstena smola i komponenata. Prema tome, navedene interakcije između smola i komponenti su slabije i HT se lakše otpuštaju u otapalo. Najveći desorpcijski prinosi za kofeinsku kiselinu i rutin su sa smolom XAD7H koja je polarna smola kod koje dolazi do stvaranja vodikovih veza. Prema tome, kofeinska kiselina i rutin se lakše otpuštaju sa polarne smole, što ukazuje na slabiju interakciju između otopljenih tvari i adsorpcijskog materijala. Za klorogensku kiselinu najveći desorpcijski prinosi su postignuti sa nepolarnim polistirenskim smolama (HP20 i HP21), kao i CBC (XAD16N, HP20) što govori u prilog slabijim π - π interakcijama pri čemu se klorogenska kiselina i CBC lako otpuštaju u otapalo.

Načelo na kojem se temelji izolacija primjenom makroporozne smole je adsorpcija tvari iz smjese na smolu, koja se potom ispiru pogodnim otapalom kako bi se uklonile adsorbirane komponente. Upravo zato je eluent ili desorbens važan čimbenik tijekom procesa odvajanja, a samoj održivosti procesa pridonosi i upotreba GRAS (eng. *Generally Recognised As Safe*) otapala. Za desorpciju karnosolne kiseline i karnosola iz ekstrakta kadulje sa DES15 s 10% vode najpogodnijim se pokazao etanol sa desorpcijskim prinosom od 47,47 % i 47,08 % (Tablica 51). Za desorpciju galne kiseline, elaginske kiseline i HT iz ekstrakta vrkute sa DES1 s 50% vode najpogodnijim se pokazao 70 % etanol sa desorpcijskim prinosom od 49,02 % za galnu kiselinu, 51,77 % za elaginsku kiselinu i 84,20 % za HT (Tablica 52). Za desorpciju kofeinske kiseline, klorogenske kiseline, neoklorogenske kiseline, kafeoil-jabučne kiseline, sinapinske kiseline, cikorinske kiseline i rutina iz ekstrakta kopriive s DES15 s 34 % vode najpogodnijim se pokazao 70 % etanol s desorpcijskim prinosima od 57,28 % za kofeinsku kiselinu, 53,31 % za klorogensku kiselinu, 81,56 % za neoklorogensku kiselinu, 79,08 % za kafeoil-jabučnu kiselinu, i cikorinsku kiselinu te 92,65 % za rutin (Tablica 53). Za desorpciju kanabinoida iz ekstrakta industrijske konoplje s hDES2 najpogodnijim se pokazao etanol s desorpcijskim prinosima od 79,31 % za CBD, 56,39 % za CBDA, 45,85 % za CBGA, 45,44 % za THC, 43,17 % za THCA, 47,54 % za CBCA, 70,90 % za CBC (Tablica 54). Za desorpciju umbeliferona i herniarina iz ekstrakta lavande s hDES2 najpogodnijim se pokazao DMSO pri čemu su desorpcijski prinosi 25,52 % za umbeliferon i 89,74 % za herniarin (Tablica 55).

Prema svim dobivenim rezultatima, za daljnja ispitivanja za ekstrakt kadulje odabrana je smola XAD7HP sa etanolom, za ekstrakt vrkute smola XAD16N s 70% etanolom, za

ekstrakt koprive smola XAD7HP s 70% etanolom, za ekstrakt industrijske konoplje smola HP21 s etanolom i za lavandu smola XAD7HP sa DMSO kao desorbensom. Primjenom istih smola, pokazano je kako su XAD7HP i HP20, unatoč različitim fizikalno-kemijskim svojstvima bile učinkovite u pročišćavanju ružmarinske kiseline i fenola iz ekstrakta biljke *Rabdosia serra* [217]. U slučaju ekstrakcije fenolnih komponenti iz biljke jobove suze (*Coix lacryma-jobi*) smole XAD7HP, HP20 i HP2MG se ne pokazuju pogodnima, pogodnije su smole XAD16N, SP-207 i SP-825 koje nisu korištene u ovom radu [162].

5.7. Utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije te volumena desorbensa na udio bioaktivnih komponenti

Nakon odabira smole i odgovarajućeg otapala promatran je adsorpcijski i desorpcijski kapacitet za smole u razdoblju 60-360 min kako bi se odredilo najpogodnije vrijeme adsorpcije i desorpcije, odnosno vrijeme pri kojem se najveći udio komponenti adsorbira na smolu, odnosno desorbira u odabrano otapalo.

Kao što se može uočiti na Slici 30, nije bilo razlike u prinosu karnosolne kiseline i karnosola povećanjem vremena adsorpcije i desorpcije. Štoviše, blagi pad dobivenog udjela za obje komponente može se uočiti s povećanjem vremena adsorpcije i desorpcije, što može biti posljedica razgradnje komponenti zbog duljeg razdoblja izlaganja kisiku i svjetlu pri sobnoj temperaturi [218]. Stoga je postotak komponenata gotovo potpuno neovisan o vremenu adsorpcije i desorpcije, pa je za adsorpciju i desorpciju odabrano vrijeme od 60 minuta. Smanjenje vremena adsorpcije i desorpcije ne samo da smanjuje vrijeme izlaganja uzorka svjetlu, zraku i sobnoj temperaturi, već također smanjuje potrošnju energije, što je važno za održivost procesa. Za razliku od vremena desorpcije, koje ne utječe na povećanje količine karnosolne kiseline i karnosola, volumen otapala utječe na količinu aktivnih komponenti u uzorku. Povećanjem volumena etanola kao desorbensa raste i desorpcijski prinos za obje komponente. Dakle, volumen desorbensa je ključni parametar za desorpciju, pri čemu se s volumenom od 10 mL etanola ostvaruje najveći desorpcijski prinos (Slika 31).

Na adsorpcijski i desorpcijski prinos galne kiseline, elaginske kiseline i HT utječe vrijeme adsorpcije i desorpcije. Za desorpciju galne kiseline najveći desorpcijski prinos je postignut za vrijeme desorpcije od 720 minuta. Za elaginsku kiselinu i HT najveći udio ostvaren je za vrijeme desorpcije od 480 minuta, nakon čega slijedi pad prinosa, pa potom ponovno porast za desorpcijsko vrijeme od 720 minuta, te ponovno pad prinosa elaginske kiseline i HT (Slika 32). Prema tome, za ispitivanje utjecaja volumena otapala je izabrano vrijeme adsorpcije od

60 min i desorpcije od 720 minuta. Uz utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije, uočava se i utjecaj volumena 70 % etanola na udio galne kiseline, elaginske kiseline i HT. Prema rezultatima, kod galne i elaginske kiseline uočava se porast u desorpciji do 7,5 mL 70 % etanola, nakon čega dolazi do pada dok se za HT uočava najveći desorpcijski prinos sa 10 mL etanola (Slika 33).

Utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije na prinose je vidljiv i kod fenolnih kiselina i rutina iz ekstrakta koprive (Slika 34). Za kofeinsku, kafeoil-jabučnu i klorogensku kiselinu je primijećen porast u adsorpcijskom prinosu sa porastom vremena, pa je tako najveći prinos zabilježen kod vremena adsorpcije od 360 min. Kod rutina i sinapinske kiseline je najveći adsorpcijski prinos zamijećen za vrijeme adsorpcije od 120 minuta pri čemu je kod rutina taj prinos sličan sve do 360 minuta, dok kod sinapinske kiseline dolazi do pada, pa ponovno do porasta adsorpcijskog prinosa na 360 minuta. Za cikorinsku kiselinu je najveći adsorpcijski prinos postignut na 180 minuta adsorpcije, dok je za neoklorogensku na 240 minuta adsorpcije. Također, i najpogodnija vremena desorpcije se razlikuju ovisno o komponentama pa je tako za kofeinsku, neoklorogensku i sinapinsku kiselinu najveći prinos desorpcije zabilježen na 300 minuta. Za kafeoil-jabučnu i cikorinsku kiselinu najveći desorpcijski prinos je zamijećen na 600 minuta, dok je za rutin i klorogensku kiselinu primijećen najveći desorpcijski prinos već na 60 min nakon čega za rutin dolazi do pada pa ponovnog porasta u prinosu na 900 minuta, a za klorogensku kiselinu su rezultati slični do kraja desorpcije. Prema navedenom, za ispitivanje utjecaja volumena odabrano je vrijeme adsorpcije od 360 minuta i vrijeme desorpcije od 300 minuta. Promjena volumena 70 % etanola kao desorbensa za DES15 ekstrakt koprive je utjecala na udio fenolnih kiselina i rutina. Za sve ispitivane komponente je došlo do porasta udjela sa većim volumenom 70 % etanola, odnosno s 10 mL dok je za cikorinsku kiselinu najveći desorpcijski prinos zabilježen s 7,5 mL 70 % etanola (Slika 35).

Na adsorpcijski i desorpcijski prinos utječe vrijeme adsorpcije i desorpcije, kao i volumen desorbensa. Za komponente CBDA i THCA najveći adsorpcijski prinos je zamijećen na vremenu od 360 minuta, dok je za CBD, CBGA, THC i CBCA zamijećen na 300 minuta. Za CBG je najveći adsorpcijski prinos postignut već pri 60 minuta, dok je za CBC postignut na 180 minuta (Slika 36). Što se tiče desorpcije, rezultati su ovisno i vrsti ispitivane komponente. Primjerice, za CBGA i CBCA je primijećen sličan trend najvećeg desorpcijskog prinosa na 60 minuta, nakon čega dolazi do pada, pa porasta na 480 minuta i tada ponovnog pada. Za CBDA je primijećen također najveći desorpcijski prinos na 60 minuta nakon čega

je udio sve do 720 minuta sličan pa tada dolazi do značajnog pada. Zanimljivo je kako je kod CBD najveći prinos na 480 minuta nakon čega dolazi do pada i porasta na 720 minuta. Upravo stoga je moguće objasniti pad prinosa CBDA i u isto vrijeme porast prinosa CBD konverzijom CBDA u CBD. Kod THCA dolazi do najvećeg prinosa na 240 minuta, nakon čega se uočava pad udjela THC. S druge strane, najveći desorpcijski prinos THC je postignut na 180 min, nakon čega dolazi do pada na 600 minuta i ponovnog porasta na 1080 minuta. U ovom slučaju, kao i slučaju CBG i CBC, ne mogu se povezati porast i pad desorpcijskog prinosa između kiselinskih i neutralnih oblika kanabinoida (Slika 36). Prema navedenom, za ispitivanje utjecaja volumena odabrano je vrijeme adsorpcije od 360 minuta i vrijeme desorpcije od 720 minuta. Kao što je spomenuto, volumen desorbensa utječe na desorpcijski prinos kanabinoida kod kojih dolazi do porasta prinosa sa povećanjem volumena etanola kao desorbensa (Slika 37).

Utjecaj vremena adsorpcije i desorpcije na prinose je vidljiv i kod umbeliferona i herniarna izoliranih iz ekstrakta lavande. Za umbeliferon je najveći adsorpcijski prinos primjećen na 360 min, dok je za herniarin na 180 minuta. Najveći desorpcijski prinos za umbeliferon je na 240 minuta nakon čega dolazi do pada pa ponovnog porasta na 600 minuta. Nakon toga porasta, slijedi ponovno pad, ali ne tako značajan kao nakon 240 minuta. Kod herniarina je najveći desorpcijski prinos na 480 minuta, iako su vrijednosti vrlo slične u cijelom periodu desorpcije (Slika 38). Upravo stoga, odabrano je vrijeme adsorpcije od 360 minuta te vrijeme desorpcije od 240 minuta. Također, povećanje volumena desorbensa utječe na povećanje desorpcijskog prinosa umbeliferona i herniarina (Slika 39).

5.8. Recikliranje DES-ova i makroporoznih smola

Recikliranje, odnosno mogućnost ponovnog korištenja otapala je važan korak u postizanju održivog procesa ekstrakcije. Recikliranje otapala ima povoljan utjecaj sa ekonomske strane, kao i pozitivan utjecaj na okoliš s obzirom da se ovim procesom ne samo štedi novac potreban za nova otapala i skladištenje, već se smanjuje i utjecaj koji otapala imaju na okoliš kroz smanjenje emisija i odlagališta otpada. Za recikliranje DES-ova najčešće se koristi opcija dodavanja antiotapala, kristalizacija, membranska filtracija, ekstrakcija kruto-tekuće, ekstrakcija tekućina-tekućina, destilacija kratkog puta, ekstrakcija superkritičnog fluida, odvajanje zbog razlika u gustoći [219].

S obzirom da je u ovom istraživanju naglasak bio na mogućnosti ponovne upotrebe DES-ova i makroporoznih smola nakon procesa adsorpcije i desorpcije, ispitana je mogućnost korištenja i otapala i makroporozne smole u tri ciklusa ekstrakcije i izolacije. Korištenje makroporoznih smola za adsorpciju komponenti iz ekstrakta dobivenog s DES-ovima u konačnici daje čisti DES koji se može ponovno koristiti za ekstrakciju. Nakon adsorpcije, uz odgovarajući desorbens, komponente se desorbiraju, te se tako makroporozna smola reciklira.

Prema rezultatima, DES15 s 10 % vode u tri ciklusa ekstrakcije je bio učinkovit u ekstrakciji karnosolne kiseline i karnosola sa prinosima iznad 90 % u odnosu na početnu vrijednost (Tablica 58) sa smanjenim vrijednostima u drugom i trećem ciklusu. Ovi rezultati pokazuju da se DES može reciklirati primjenom makroporoznih smola i koristiti ponovno barem tri puta kako bi se postigla relativno visoka razina prinosa karnosola i karnosolne kiseline. Ponovnim korištenjem makroporozne smole uočava se smanjenje mogućnosti adsorpcije i desorpcije s većim brojem ciklusa za karnosolnu kiselinu i karnosol, iako su u svim slučajevima prinosi veći od 70 % (Tablica 58). DES15 s 30 % vode korišten za ekstrakciju fenolnih kiselina i rutina bio je učinkovit u tri ciklusa ekstrakcije, sa najnižim prinosima u trećem ciklusu, iako su i tada bili iznad 50 % u odnosu na početnu vrijednost (Tablica 60). U trećem ciklusu vrijednosti su se kretale u rasponu od 58,62 do 79,44 % u odnosu na početnu vrijednost, što znači da će ekstrakcijom istim otapalom tri puta i dalje postići relativno visoki udjeli željenih komponenti. Ponovnim korištenjem makroporozne smole za adsorpciju i desorpciju uočava se pad sa većim brojem ciklusa, iako su vrijednosti za adsorpciju iznad 50 % od početne vrijednosti u trećem ciklusu, odnosno iznad 60 % za desorpciju. Prema dobivenim rezultatima, ovakav način recikliranja je najpogodniji za rutin i sinapinsku kiselinu za koje su postignuti najveći prinosi i kod ekstrakcije i o procesa adsorpcije i desorpcije, dok su za klorogensku, neoklorogensku i kafeoil-jabučnu kiselinu primjećeni najmanji prinosi u praćenim procesima (Tablica 60).

Također, DES1 s 50 % vode u tri ciklusa ekstrakcije je bio učinkovit u ekstrakciji elaginske kiseline sa prinosima iznad 90 % u prvom i drugom ciklusu, dok u trećem dolazi do značajnog pada u prinosu (Tablica 59). Kod ekstrakcije HT prinos u prvom ciklusu ekstrakcije je 79,41 %, u odnosu na početnu vrijednost, a u drugom i trećem ciklusu dolazi do značajnog pada. Za razliku od elaginske kiseline i HT, kod ekstrakcije galne kiseline dolazi do porasta u prinosu sa većim brojem ciklusa, pri čemu je najveći prinos od 66,48 % postignut u trećem ciklusu. Za adsorpciju se primjećuje porast u prinosu sa većim brojem

ciklusa, pri čemu je najveći prinos zamjećen za galnu kiselinu u trećem ciklusu (Tablica 59). Kod desorpcije dolazi do pada u prinosu sa većim brojem ciklusa, pri čemu je prinos za galnu i elaginsku kiselinu te HT u trećem ciklusu bio u rasponu od 40-50 % u odnosu na početnu vrijednost (Tablica 59).

hDES2 korišten za ekstrakciju kanabinoida i kumarina se pokazuje učinkovit u praćenim ciklusima ekstrakcije sa visokim prinosima za sve komponente osim za CBG. U tri ciklusa ekstrakcije s istim otapalom pročišćenim primjenom makroporoznih smola za sve komponente osim za CBG prinos je bio iznad 60 %, dok je za CBG u trećem ciklusu prinos iznosio 40,98 % (Tablica 61). Kod adsorpcije se uočava pad s većim brojem ciklusa, pa je tako za sve komponente osim za CBG za koji su postignute značajno niže vrijednosti, u prvom ciklusu postignuti adsorpcijski prinosi između 82,32 – 95,71 %, u drugom 72,15 – 84,46 % i u trećem ciklusu 62,49 – 74,75 % u odnosu na početnu vrijednost. Kod desorpcije također dolazi do pada u prinosu sa većim brojem ciklusa, pri čemu je prinos za sve kanabinoide osim za CBG i CBDVA, bio u rasponu od 76,58 – 92,91 % za prvi ciklus, 60,78 – 87,51 % za drugi ciklus i 55,85 – 78,69 % za treći ciklus. CBG i CBDVA nisu desorbirani (Tablica 61).

Unatoč ponekim nižim vrijednostima, većina bioaktivnih komponenti je ekstrahirana, adsorbirana i desorbirana u relativno visokim postotcima, što makroporoznu smolu čini odgovarajućim adsorbensom za željene komponente i pogodnim načinom recikliranja DES-ova. Primjena makroporoznih smola se pokazala učinkovitom kod ponovne upotrebe za adsorpciju i desorpciju klorogenske kiseline i rutina i u pet ciklusa pri čemu su vrijednosti za adsorpciju, ovisno o broju ciklusa bile u rasponu od 88 – 90 % za rutin i 87 – 89 % za klorogensku kiselinu. Vrijednosti za desorpciju za klorogensku kiselinu su iznosile 81 – 84 %, a za rutin 78 – 80 %, ovisno o broju ciklusa [220]. Za klorogensku kiselinu ispitana je i učinkovitost ekstrakcije DES-ovima koji su tretirani makroporoznim smolama pri čemu je ekstrakcijski prinos kroz tri ciklusa pao s 90% na 78 % [177]. Također, učinkovitost ekstrakcije DES-ova tretiranim makroporoznim smolama je visoka kroz tri ciklusa za klorogensku, neoklorogensku, kriptoklorogensku i kofeinsku kiselinu [104].

5.9. Antiradikalna i antibakterijska aktivnost ekstrakata

Za procjenu biološke aktivnosti dobivenih ekstrakata odabrano je određivanje antiradikalne i antibakterijske aktivnosti, kao aktivnosti koje biljni ekstrakti vrlo često pokazuju [221]. Zabrinjavajući porast broja bakterija otpornih na antibiotike što stvara poteškoće u liječenju infekcija pokrenuo je potragu za novim antibakterijskim spojevima i razvoj novih alternativnih strategija u borbi protiv bakterijskih infekcija. Bioaktivne komponente biljnog podrijetla mogu pokazivati izravnu antibakterijsku aktivnost i/ili neizravnu aktivnost kao spojevi koji modificiraju otpornost na antibiotike, što u kombinaciji s antibioticima povećava njihovu učinkovitost. Ova sposobnost bioaktivnih komponenti ogleda se u modificiranju ili blokiranju mehanizma rezistencije tako da bakterija postaje osjetljiva na antibiotik ili antibiotik može djelovati u nižim koncentracijama. Sustavno ispitivanje bioaktivnih spojeva biljnog podrijetla, uključujući one koji mogu sinergistički djelovati s antibioticima, kao sredstava za modificiranje rezistencije, predstavlja potencijalni pristup prevladavanju bakterijske rezistencije [222].

Antiradikalna i antibakterijska aktivnost mjerena je za odabrani DES pri optimalnim uvjetima za svaku biljku, konvencionalna otapala u kojima je postignut najveći udio bioaktivnih komponenti te za ekstrakte dobivene nakon desorpcije sa makroporoznih smola. Navedeni ekstrakti su odabrani kako bi se usporedila aktivnost ekstrakata dobivenih DES-ovima i konvencionalnim otapalima te aktivnost nakon desorpcije sa makroporoznim smola i donio zaključak o učinkovitosti navedenih procesa u kontekstu aktivnosti. Za pripremljene ekstrakte s različitim otapalima, sa smolama i desorpcijskim otapalima, antiradikalno djelovanje ispitano je praćenjem postotka (%) inhibicije DPPH radikala, dok je za uzorke dobivene na odabranoj smoli sa različitim volumena desorbensa, određen EC_{50} .

Najveći % inhibicije DPPH radikala primjenom ekstrakta kadulje postignut je kod ekstrakta tretiranog XAD7HP smolom s etanolom kao desorbensom (Tablica 63). Rezultati pokazuju da je pri koncentraciji ekstrakta od 250 $\mu\text{g/mL}$, postignuta približno 50% inhibicija DPPH radikala. Povećanjem volumena desorbensa primjećeno je kako ne raste samo desorpcijski prinos nego i antiradikalna aktivnost, što se očituje nižom vrijednosti EC_{50} (Tablica 64). Kao što je prikazano u Tablici 63, antibakterijska aktivnost ekstrakata bila je jednako učinkovita za *E. coli* i *B. subtilis* i nije se razlikovala s obzirom na korištenu makroporoznu smolu ili otapalo. Ekstrakti kadulje pokazali su različite učinke na *P. aeruginosa* s obzirom na makroporoznu smolu i desorpcijsko otapalo. Ekstrakti dobiveni

primjenom HP20 i HP21 smola sa 100% etanolom pokazali su najučinkovitije djelovanje protiv *P. aeruginosa*. Najmanji antibakterijski učinak su pokazali ekstrakti na bakteriju *S. aureus*. Svi ekstrakti, neovisno o primijenjenom volumenu desorbensa su pokazali sličnu antibakterijsku aktivnost, a razlika je zamjetna kod volumena desorbensa od 10 mL gdje je uočen veći MIC u odnosu na manje volumene desorbensa, za sve ispitane bakterije. Usporedbom antibakterijske aktivnosti za ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima i DES-om pri optimalnim uvjetima, utvrđena je značajna razlika, pri čemu DES ekstrakt pokazuje značajno niži MIC (Tablica 65). Uzorak dobiven nakon tretiranja DES ekstrakta s makroporoznim smolama i različitim desorbensima, pokazuje niži MIC u odnosu na početni ekstrakt.

Najveći % inhibicije DPPH radikala primjenom ekstrakta vrkute dobiven je primjenom smole HP2MG sa 70 % etanolom kao desorbensom (Tablica 66). Koncentracija etanola u otopini utječe na antiradikalnu aktivnost koja se povećava s povećanjem udjela etanola. Ekstrakti dobiveni primjenom različitih vrsta makroporoznih smola ne pokazuju značajne razlike u antiradikalnoj aktivnosti (Tablica 66). Za antibakterijsku aktivnost ekstrakti dobiveni primjenom smola XAD16N i XAD7HP se pokazuju najpogodnija za sve ispitane bakterije. Povećanje volumena desorbensa s 2,5 mL do 5 mL dovodi do niže MIC za *B. subtilis* i *E. coli*, a dodatnim povećanjem volumena ne dolazi do nikakve promjene. Vrijednost EC₅₀ pokazuje kako je najbolja antiradikalna aktivnost ekstrakta dobivenog s 5 mL desorbensa (Tablica 67). Za razliku od kadulje, kod ekstrakata vrkute je primjećena bolja antibakterijska aktivnost ekstrakata dobivenih s konvencionalnim otapalima u odnosu na ekstrakt dobiven pomoću DES1 i one uzorke dobivene nakon adsorpcije i desorpcije na makroporoznim smolama (Tablica 68).

Kod ekstrakta koprive najveći % inhibicije dobiven je kod ekstrakta tretiranog HP21 smolom sa 70 % etanolom kao desorbensom (Tablica 69). Antiradikalna aktivnost raste sa porastom udjela etanola u vodenoj otopini etanola, odnosno do 70 % etanola. Sa apsolutnim etanolom zamjećuje se pad u % inhibicije DPPH radikala. Tip makroporozne smole ne pokazuje nikakav utjecaj na antiradikalnu aktivnost ekstrakta koprive. Za antibakterijsku aktivnost najpogodnije za sve ispitane bakterije se pokazuju ekstrakti tretirani smolama HP20 i HP21 (Tablica 69). Povećavanje volumena desorbensa do 7,5 mL dovodi do niže MIC vrijednosti za *S. aureus*, *B. subtilis* i *P. aeruginosu*, dok je za *E. coli* pogodniji niži volumen desorbensa od 7,5 mL. Najniža EC₅₀ vrijednost je zabilježena za najmanji korišteni volumen od 2 mL, nakon čega dolazi do smanjenja antiradikalne aktivnosti (Tablica 70). Iz

dobivenih rezultata je vidljivo da DES ekstrakt pokazuje višu antiradikalnu i antibakterijsku aktivnost u usporedbi sa ekstraktima dobivenim s konvencionalnim otapalima (Tablica 71).

Rezultati antibakterijskog djelovanja ovisili su o koncentraciji etanola koji je korišten za desorpciju bioaktivnih komponenti iz adsorbensom tretiranog ekstrakta, što je u skladu s rezultatima [223] prema kojima antibakterijsko djelovanje biljnih ekstrakata varira ovisno o udjelu etanola korištenog u ekstrakciji. Zbog varijacija u sastavu aktivnih spojeva, različite biljke mogu zahtijevati različite koncentracije etanola kako bi se postiglo maksimalno obnavljanje bioaktivnih komponenti.

Kod ekstrakta industrijske konoplje, najveći % inhibicije DPPH je postignut sa smolom HP21 sa etanolom kao desorbensom. Dobivene vrijednosti za inhibiciju DPPH radikala su bile niske i slične za sve smole i desorbense (11,77 – 19,22 %) (Tablica 72). Ekstrakt dobiven primjenom smole XAD7HP pokazuje najnižu vrijednost MIC za *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. coli*, dok ekstrakt dobiven smolom HP21 pokazuje najnižu vrijednost za *P. aeruginosa*. Dobivene vrijednosti su jednake ili čak niže u odnosu na kontrolu (Ciprofloxacina) što govori u prilog izvrsnoj antibakterijskoj aktivnosti dobivenih uzoraka (Tablica 72). Porast volumena desorbensa ne dovodi do bolje antibakterijske aktivnosti, odnosno niže MIC vrijednosti. Uzorci dobiveni pri volumenu desorbensa od 2,5 mL su pokazali najbolju antibakterijsku aktivnost na *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, dok je najbolju antibakterijsku aktivnost na *B. subtilis* pokazao uzorak dobiven desorpcijom s 10 mL otapala (Tablica 73). S obzirom na niske vrijednosti antiradikalne aktivnosti, EC₅₀ nije odrađen. Usporedbom sa rezultatima dobivenim za ekstrakte pripremljene s konvencionalnim otapalima, uočava se značajno bolja antibakterijska aktivnost za hDES ekstrakt. Usporedbom s ekstraktima dobivenima 50 % etanolom i apsolutnim etanolom, koji pokazuju istu ili bolju antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i *B. subtilis*, DES ekstrakt pokazuje značajno bolju antibakterijsku aktivnost za *P. aeruginosa* i *E. coli*. Bolju antiradikalnu aktivnost ipak pokazuju ekstrakti dobiveni s konvencionalnim otapalima, pri čemu je antiradikalna aktivnost hDES ekstrakata industrijske konoplje slična aktivnosti vodenog ekstrakta (Tablica 74).

Najveći % inhibicije DPPH radikala primjenom ekstrakta lavande postignut je primjenom HP20 sa etanolom i XAD7HP sa DMSO kao desorbensom (Tablica 75). Na antiradikalnu aktivnost utječe i tip desorbensa i smole. Najniža vrijednost MIC, odnosno najbolja antibakterijska aktivnost za sve ispitane bakterije se postiže kod ekstrakata dobivenih primjenom smola HP2MG i XAD7HP. Povećavanje volumena DMSO kao desorbensa je

dovelo do niže vrijednosti MIC za sve ispitane bakterije (Tablica 76). hDES ekstrakt lavande pokazuje značajno bolju antibakterijsku aktivnost za *S. aureus* i *B. subtilis* u usporedbi s etanolnim ekstraktom, dok za *P.aeruginosa* i *E. coli* pokazuje istu antibakterijsku aktivnost kao etanolni ekstrakt. Bolju antiradikalnu aktivnost ipak pokazuju ekstrakti s vodenim otopinama etanola, pri čemu je antiradikalna aktivnost hDES ekstrakata lavande slična aktivnosti vodenog i etanolnog ekstrakta (Tablica 77). Usporedbom sa dobivenim rezultatima za ekstrakte pripremljene s konvencionalnim otapalima, uočava se značajno bolja antibakterijska aktivnost za hDES ekstrakt. Promatrajući sve analizirane ekstrakte, ne može se povezati antiradikalna i antibakterijska aktivnost, odnosno ekstrakti sa dobrom antibakterijskom aktivnošću nisu nužno imali dobru antiradikalnu aktivnost, što je posebno uočljivo kod hDES ekstrakata. Kod ekstrakata dobivenih nepolarnim otapalima, pokazano je kako se antibakterijsko djelovanje ne može pripisati antioksidansima, već inhibicijskim učincima putem drugih mehanizama (inhibicija ili regulacija enzima uključenih u biosintezu stanične stijenke, utjecaj na metabolizam i popravak nukleinske kiseline te sintezu proteina) [224]. Pretpostavka je da isto vrijedi i za ekstrakte dobivene u ovom radu koji pokazuju visoku antibakterijsku aktivnost uz nisku inhibiciju DPPH radikala.

Antibakterijska učinkovitost biljnih spojeva ovisi o nekoliko čimbenika uključujući karakteristike ciljnog mikroorganizma (vrsta, rod, soj) i biljnog materijala (botanički izvor, sastav bioaktivnih spojeva kao i vrijeme žetva, stupanj razvoja ili metoda ekstrakcije) te kemijska svojstva (hidrofilnost, lipofilnost, koncentracija, pH vrijednost). Opće je prihvaćeno da biljni ekstrakti, zbog svoje složene prirode, imaju višestruke mehanizme djelovanja. Biljni ekstrakti i njihove glavne komponente mogu pokazivati aktivnost: inhibicijom rasta ili održivosti bakterija, ciljanjem na čimbenike virulencije bakterija ili potenciranjem učinkovitosti antibiotika kao sredstava za modificiranje rezistencije [222].

Inhibicija bakterijskog rasta događa se kroz nekoliko mehanizama: poremećaj funkcije i strukture membrane, prekid sinteze i funkcije DNA/RNA, interferencija s intermedijarnim metabolizmom i indukcija koagulacije citoplazmatskih sastojaka [222]. Gledajući po grupama spojeve, fenolni spojevi, utječu na staničnu membranu, mijenjajući propusnost i uzrokujući istjecanje staničnog sadržaja ili ometajući membranske proteine što u konačnici dovodi do poremećaja strukture [225-229]. Osim djelovanja na staničnu membranu, flavonoidi također inhibiraju sintezu nukleinske kiseline (uzrokovanu inhibicijom topozomeraze) i energetski metabolizam (uzrokovanu inhibicijom NADH-citokrom c reduktaze ili ATP sintaze) te prekidaju sintezu stanične stijenke i stanične membrane [220].

Tanini imaju nekoliko načina djelovanja kao što su destabilizacija stanične membrane, inhibicija izvanstaničnih mikrobnih enzima, izravno djelovanje na mikrobn metabolizam ili oduzimanje supstrata potrebnih za rast mikroba [227]. Kumarini uzrokuju smetnje u procesu staničnog disanja [226]. Terpeni, spojevi izgrađeni od podjedinica izoprena, zbog lipofilne prirode uzrokuju poremećaj u staničnoj membrani [222].

Biljni ekstrakti su složeni uzorci, koji osim ispitanih komponenti sadrže i brojne druge komponente u udjelima ovisno o upotrijebljenom otapalu. Upravo stoga različiti ekstrakti i pokazuju različiti mehanizam djelovanja i različito antibakterijsko djelovanje. Razlika u učinkovitosti djelovanja na Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije je vjerojatno vezana uz strukturne razlike stanične membrane bakterija. Prema istraživanjima, Gram-pozitivne bakterije su osjetljivije na biljne ekstrakte od Gram-negativnih bakterija. To može biti zbog urođene tolerancije na Gram-negativne bakterije te prirode i sastava biljaka. Stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija u usporedbi s Gram-negativnim bakterijama, osjetljivije su na mnoge antimikrobne kemijske spojeve [231] pa čak i na mnoge biljne lijekove [232]. Smatra se da su sloj lipopolisaharida i periplazmatski prostor Gram-negativnih bakterija razlozi njihove relativne otpornosti.

Prema sve većem broju istraživanja o antibakterijskoj aktivnosti DES ekstrakata, uočljivo je kako ekstrakti dobiveni DES-ovima koji u svom sastavu imaju kiselinu pokazuju bolju antibakterijsku aktivnost [233]. Navedeno je uočeno i iz rezultata ovog rada gdje su ekstrakti s DES15 i hDES2, koji u svom sastavu sadrže kiselinu (mliječna i octena kiselina), pokazali bolju antibakterijsku aktivnost od ekstrakata dobivenih s konvencionalnim otapalima. U slučaju DES1 ekstrakta vrkute, koji u sastavu ne sadrži kiselinu, uočena je manja antibakterijska aktivnost u odnosu na ekstrakte dobivene s konvencionalnim otapalima.

Izrazita antibakterijska aktivnost ekstrakata, upotreba sigurnih otapala i nizak rizik od razvoja bakterijske rezistencije učinili su biljne ekstrakte pogodnim izvorom za razvoj novih antibakterijskih sredstava.

5.10. Stabilnost bioaktivnih komponenti u ekstraktima

Stabilnost biljnih ekstrakata je važan faktor za osiguravanje kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti konačnog proizvoda. Unatoč tome što se uobičajeno ispituje udio određenih bioaktivnih komponenti, biljni ekstrakti sadrže tisuće komponenata čime se praćenje stabilnosti i kvalitete znatno otežava. Faktori koji utječu na stabilnost komponenti u

ekstraktima su pH, svjetlo, zrak, temperatura, prisutnost enzima i metalnih iona te otapalo. Najčešće se u ekstraktima događa hidroliza ili oksidacija [234].

U ovom istraživanju, stabilnost je praćena preko vremena u kojem sastav ekstrakta s obzirom na pojedine određivane komponente ostaje nepromijenjen. Praćen je udio, odnosno degradacija ispitivanih komponenti kroz period od tri mjeseca u ekstraktima dobivenim DES-ovima i konvencionalnim otapalima. Osim vremena, praćen je i utjecaj temperature na degradaciju ispitivanih komponenti.

U ekstraktima kadulje praćen je udio karnosolne kiseline i karnosola. Kod karnosolne kiseline uočava se najveći pad udjela s vremenom pri temperaturi od 25 °C. Kod ekstrakata čuvanih pri 4 °C također dolazi do pada udjela s vremenom, ali taj pad je najmanji u etanolnom i DES15 ekstraktu. Kod uzoraka čuvanih pri -18 °C uočene su male promjene udjela karnosolne kiseline kroz period od 3 mjeseca (Slika 40). Kod karnosola u ekstraktima čuvanima pri 25 °C, uočavaju se najveće promjene udjela. S većinom otapala dolazi do postupnog pada udjela karnosola, dok kod metanolnog ekstrakta dolazi čak i do njegovog porasta. U DES15 ekstraktu kadulje je jako uočljiv porast udjela karnosola u drugom mjesecu, pa potom nagli pad u trećem mjesecu skladištenja. Ove promjene se mogu objasniti i razgradnjom karnosolne kiseline s dužim vremenom skladištenja i višom temperaturom, pri čemu je karnosol jedan od produkata razgradnje [124]. Kod uzoraka čuvanih pri 4 °C, također dolazi do pada udjela karnosola u ekstraktima dobivenima primjenom većine ispitivanih otapala, a uočen je porast udjela karnosola u ekstraktu dobivenom s etanolom. Kod navedenih uzoraka, najmanje promjene udjela karnosola sa vremenom se uočavaju u DES15 ekstraktu. Kod uzoraka čuvanih pri -18 °C i -70 °C također dolazi do pada udjela karnosola u ekstraktima dobivenima primjenom većine ispitivanih otapala, a uočen je porast udjela karnosola u etanolnom ekstraktu. Kod navedenih uzoraka, najmanje promjena udjela karnosola sa vremenom se uočava u DES15 ekstraktu, uočen je relativno stabilan udio karnosola kroz period od 3 mjeseca (Slika 41).

U ekstraktima vrkute praćen je udio galne kiseline, elaginske kiseline i HT. Udio HT u ispitanim ekstraktima kroz vremenski period je vrlo sličan neovisno o temperaturi čuvanja ekstrakata. Kod gotovo svih otapala i neovisno o temperaturi skladištenja, primjećen je porast udjela HT u periodu od jednog do dva mjeseca, nakon čega dolazi do pada. Jedino se u slučaju etanolnog ekstrakta uočava relativno stalan udio HT kroz vrijeme, ali navedenim otapalom je ekstrahiran i značajno manji udio HT (Slika 42). Kod galne kiseline je uočen različit udio ovisno o temperaturi čuvanja uzoraka. U vodenim i DES ekstraktima čuvanima

pri 25 °C uočava se porast pa potom nagli pad udjela galne kiseline, dok je za ostala otapala udio relativno stalan i krivulje ovisnosti su vrlo slične. U ekstraktima čuvanima pri 4 °C dolazi do porasta udjela pa potom ponovnog pada, dok kod DES ekstrakta dolazi do porasta nakon mjesec dana skladištenja. Pri -18 °C i -70 °C u svim otapalima, osim vode, uočava se relativno stalan udio galne kiseline i slična krivulja što upućuje na sličan trend raspadanja. Kod vodenih ekstrakata se stalno uočavaju padovi i porasti udjela galne kiseline (Slika 43). Kod elaginske kiseline, neovisno o temperaturi i otapalu, dolazi do promjena udjela kroz promatrani vremenski period, odnosno padova i porasta udjela. Te promjene su najuočljivije kod vodenog ekstrakta i to pri svim temperaturama. Kod gotovo svih otapala nakon tri mjeseca skladištenja uočava se porast udjela elaginske kiseline (Slika 44). Navedeni rezultati ne čude s obzirom da iz HT hidrolizom nastaju upravo elaginska i galna kiselina, pa stoga s vremenom raspadanjem tanina dolazi i do porasta udjela navedenih fenolnih kiselina [235,236].

U ekstraktima koprive, praćen je udio rutina, kofeinske kiseline, kafeoil-jabučne kiseline, cikorinske kiseline, neoklorogenske kiseline, sinapinske kiseline i klorogenske kiseline. Kod praćenja rutina, kofeinske kiseline, kafeoil-jabučne kiseline i neoklorogenske kiseline uočava se isti trend. Do najvećeg pada s vremenom dolazi u ekstraktima čuvanima pri 25 °C pri čemu se taj pad najmanje uočava u DES15 ekstraktima. Također, smanjenje udjela se uočava i u ekstraktima čuvanima pri 4 °C pri čemu su u DES5 ekstraktu bioaktivne komponente stabilnije i manje sklone raspadanju. U ekstraktima čuvanima pri -18 °C i -70 °C, slične su krivulje za sva otapala što znači da se sva otapala na tim temperaturama pokazuju učinkovita u održavanju udjela bioaktivnih komponenti u ekstraktu (Slika 45, 46, 47 i 49). Kod praćenja cikorinske kiseline, u ekstraktima čuvanima pri 25 °C uočen je pad sa svim korištenim otapalima, dok je u ekstraktima čuvanima pri 4 °C, -18 °C i -70 °C udio gotovo stalan kroz sva tri mjeseca sa sličnim krivuljama za ekstrakte dobivene upotrebom svih ispitivanih otapala (Slika 48). Praćenjem udjela sinapinske kiseline vidljivo je kako dolazi do pada u ekstraktima čuvanima pri 4 °C i 25 °C sa svim otapalima dok su pri -18 °C i -70 °C sva otapala učinkovita u održavanju udjela sinapinske kiseline (Slika 50). Kod praćenja klorogenske kiseline, uočeno je gotovo identično ponašanje otapala pri različitim temperaturama. Pad u udjelu klorogenske kiseline je najveći u ekstraktima čuvanima pri 25 °C, pa potom pri 4 °C s tim da je najmanji pad primijećen u DES5 ekstraktu. Do smanjenja udjela klorogenske kiseline dolazi i pri -18 °C i -70 °C, ali je to smanjenje najmanje za DES15 ekstrakt (Slika 51).

U ekstraktima industrijske konoplje praćen je udio kanabinoida, odnosno CBD, CBDA, CBG, CBGA, THC, THCA, CBC i CBCA. Za sve kanabinoide, osim za CBD i CBDA uočava se smanjenje udjela sa svim otapalima u ekstraktima čuvanima na sobnoj temperaturi (Slika 54-59). Praćenjem CBD u ekstraktima čuvanima pri 25 °C uočava se pad u udjelu nakon dva tjedna skladištenja, pri čemu dolazi do porasta u udjelu kroz mjesec dana sa svim otapalima (Slika 52). Također, praćenjem udjela CBDA pri 25 °C dolazi do pada u udjelu nakon tjedan dana, kroz mjesec dana dolazi do porasta, pa potom opet do pada u udjelu CBDA u ekstraktu (Slika 53). Poznato je kako iz CBDA nastaje CBD toplinskom dekarboksilacijom ili raspadanjem kroz vrijeme, pa je ovakav način pada i porasta u udjelu moguće povezan sa prelaskom komponenti iz kiselinskog u neutralni derivat [31]. U ekstraktima čuvanima pri 4 °C primjećuje se pad u udjelu svih kanabinoida, ali ne tako nagli pad kao u ekstraktima čuvanima pri 25 °C (Slika 54-59). U slučaju udjela CBD u ekstraktima čuvanima pri 4 °C ne uočava se tako značajna promjena u udjelu kroz vrijeme (Slika 52), dok se kod CBDA uočava i dalje pad u periodu od tjedna, pa potom porast u periodu od mjesec dana i opet pad (Slika 53). Praćenjem svih kanabinoida u ekstraktima čuvanima u zamrzivačima nema promjena u udjelu kanabinoida kroz period od tri mjeseca (Slika 52-59). Sve krivulje su vrlo slične što govori u prilog manjem raspadanju komponenti i većoj stabilnosti u ekstraktima.

U ekstraktima lavande praćen je udio dvaju kumarina, umbeliferona i herniarina. Praćenjem udjela umbeliferona u ekstraktima čuvanim pri 25 °C uočava se pad s vremenom, dok su u ekstraktima čuvanima pri 4 °C, -18 °C i -70 °C slične krivulje za sva otapala što znači da se sva otapala na tim temperaturama pokazuju učinkovita u održavanju udjela umbeliferona u ekstraktu (Slika 60). Praćenjem udjela herniarina u ekstraktima čuvanim na sobnoj temperaturi uočava se značajan pad u periodu od tjedan dana, pa porast u periodu od dva tjedna do mjesec dana nakon čega ponovno dolazi pada, i to kod svih otapala. U ekstraktima čuvanima u 4 °C, -18 °C, -70 °C slične krivulje su dobivene za sva otapala što znači da se sva otapala na tim temperaturama pokazuju učinkovita u održavanju udjela herniarina u ekstraktu (Slika 61).

Općenito gledajući dobivene rezultate, kod većine komponenti je uočljiv utjecaj temperature skladištenja na udio ispitivanih komponenata, pri čemu kod sobne temperature i temperature hladnjaka lakše dolazi do raspadanja ili smanjenja udjela komponenti. Također, kod svih bioaktivnih komponenti je uočljiv i utjecaj vremena pri čemu sa dužim vremenom za većinu komponenti dolazi do raspadanja ili smanjenja udjela u ekstraktu.

Utjecaj prirode otapala kojim su dobiveni ekstrakti se nije pokazao tako uočljiv, posebice u ekstraktima čuvanima u zamrzivaču, odnosno na jako niskoj temperaturi, kod koje se sva otapala pokazuju učinkovita. U ekstraktima čuvanima pri sobnoj temperaturi, najviše se uočava razlika između otapala pri čemu se kod DES15 koji je korišten za ekstrakciju fenolnih kiselina, HT i rutina te kod hDES2 koji je korišten za određene kanabinoide uočava najmanji pad udjela navedenih komponenti. Mogući razlozi za bolje održavanje udjela bioaktivnih komponenti su niži pH i prisutnost kiselina kao sastavnih dijelova otapala te prisutnost i drugih spojeva koji nisu ispitani u ovom radu, a moguće stabiliziraju ispitivane komponente. Prema Gaftner i Bergeronu [234], niži pH, kao i prisutnost kiselina poput jabučne ili limunske kiseline, poboljšavaju stabilnost komponenti. Jabučna i limunska kiselina mogu stvarati komplekse sa metalima poput bakra i željeza i time spriječiti djelovanje metala i oksidaciju. Uz to, pokazano je kako DES-ovi zbog jakih vodikovih veza i interakcija između bioaktivnih komponenti i komponenti otapala smanjuju kretanje molekula pri čemu se smanjuje njihov međusobni kontakt i posljedično procesi oksidativne razgradnje [237].

6. Zaključak

U okviru doktorskog rada istražena je mogućnost primjene hidrofilnih i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti (fenolne kiseline, flavonoidi, diterpeni, kanabinoidi i kumarini) iz različitog biljnog materijala. Za ekstrakcije su upotrijebljena različita otapala te tehnike i uvjeti ekstrakcije čiji se utjecaj pratio preko udjela bioaktivnih komponenti u ekstraktu.

Primjenom hidrofilnih i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala učinkovito se ekstrahirane komponente iz grupe spojeva kao što su diterpeni, flavonoidi, fenolne kiseline, tenini, kanabinoidi i kumarini. Primjenjenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima određena je viskoznost, polarnost i pH pri čemu je pokazana najveća korelacija između viskoznosti i udjela većine komponenti u ekstraktima. Smanjenje viskoznosti dovodi do većeg udjela bioaktivnih komponenti u ekstraktu. Upotrijebljene tehnike ekstrakcije kao što su ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija i mehanoekstrakcija pokazuju učinkovitost u ekstrakciji kao i metoda zagrijavanjem i miješanjem na magnetskoj miješalici. Ispitani uvjeti ekstrakcije su pokazali različit utjecaj ovisno o bioaktivnoj komponenti, što omogućuje selektivnu ekstrakciju i odabir uvjeta ekstrakcije za postizanje željenog sastava ekstrakta. Usporedba dobivenih rezultata ekstrakcije primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala s rezultatima dobivenima primjenom konvencionalnih otapala ukazuje na prednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala za većinu ispitanih bioaktivnih komponenti. Jedino u slučaju kumarina se uočava značajno bolje djelovanje konvencionalnih otapala u odnosu na hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala, dok su za neke fenolne kiseline, poput klorogenske, neoklorogenske i kafeoil-jabučne kiseline te za flavonoide poput rutina, dobiveni slični rezultati sa konvencionalnim i hidrofilnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

Praćenjem stabilnosti ekstrakata s najvećim udjelom bioaktivnih komponenti kroz tri mjeseca uočava se visoka stabilnost ispitivanih komponenti u ekstraktima dobivenima primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala, posebice kod skladištenja ekstrakata pri sobnoj temperaturi. Snižavanjem temperature do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i stabilnost ispitivanih komponenti u svim ekstraktima je bila zadovoljavajuća.

Izolacija bioaktivnih komponenti iz ekstrakata dobivenima niskotemperaturnim eutektičkim otapalima provedena je pomoću različitih makroporoznih smola. Fizikalno-kemijska svojstva makroporoznih smola, kao i adsorpcijsko i desorpcijsko vrijeme te volumen desorbensa kao ispitani parametri pokazuju različit utjecaj ovisno o bioaktivnoj komponenti.

Osim za izolaciju bioaktivnih komponenti, makroporozne smole su uspješno korištene i za recikliranje niskotemperaturnih eutektičkih otapala, a samim procesom desorpcije reciklirane su i makroporozne smole. Korištenje istog otapala i makroporozne smole u tri ciklusa pokazano je da je učinkovitost otapala u ekstrakciji i makroporozne smole u adsorpciji i desorpciji za većinu bioaktivnih komponenti iznad 60 %. Osim u slučaju ekstrakta vrkute, ekstrakti dobiveni niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pokazuju bolju antibakterijsku aktivnost, pri čemu uzorci tretirani makroporoznim smolama pokazuju još bolju aktivnost u odnosu na početni ekstrakt. S druge strane, ekstrakt vrkute i koprive te uzorci nakon tretiranja makroporoznim smolama pokazuju bolju antiradikalnu aktivnost u odnosu na ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima, dok je antiradikalna aktivnost bolja za ekstrakte dobivene konvencionalnim otapalima za industrijsku konoplju i lavandu.

U ovom doktorskom radu, prikazana je mogućnost korištenja niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju komponenti iz različitih grupa fenolnih spojeva uz prikaz tehnika i parametara koji utječu na udjele tih komponenti u ekstraktima, kao i stabilnost bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima. Nakon ekstrakcije, prikazana je i mogućnost pročišćavanja i izolacije bioaktivnih komponenti iz ekstrakta dobivenog niskotemperaturnim eutektičkim otapalom primjenom makroporoznih smola koju su korištene i za recikliranje samog otapala.

Korištenjem niskotemperaturnih eutektičkih otapala u ekstrakciji umjesto organskih otapala smanjuje se negativan utjecaj na okoliš, a kombinacija sa inovativnim tehnikama ekstrakcije poput ultrazvukom potpomognute ekstrakcije i mehanoekstrakcije dovodi do smanjenja potrošnje energije i vremena. Recikliranje otapala pruža mogućnost ponovnog korištenja istog otapala čime se smanjuje njegovo odlaganje i negativan utjecaj na okoliš.

7. Literatura

1. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N. S. Jayakumar, New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review, *Anal. Chim. Acta* 979 (2017) 1–23.
2. C. Bakirtzi, K. Triantafyllidou, D. P. Makris, Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants, *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 3 (2016) 120–127.
3. A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (29) (2004) 9142–9147.
4. A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *ChemCommun* 1 (2003) 70–71.
5. K. Radošević, N. Čurko, V. Gaurina Srček, M. Cvjetko Bubalo, M. Tomašević, K. Kovačević Ganić, I. Radojčić Redovniković, Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *Lebensm. Wiss. Technol.* 73 (2016) 45–51.
6. W. N. Min, Z. Jing, S. L. Min, H. J. Ji, J. Lee, Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flossophorae*, *Green Chem.* 17 (2015) 1718–1727.
7. W. Bi, M. Tian, K. H. Row, Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 22–30.
8. Y. Fu, J. Luo, J. Qin, M. Yang, Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019) 189–200.
9. M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 943–951.
10. B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. G. Tótolí, A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado, Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review, *Saudi Pharm. J.* 27 (2019) 1–8.
11. C. Cathcart, Green chemistry in the emerald isle, *Chem. Ind. (London)* 21 (1990) 684–687.
12. P. T. Anastas, T. C. Williamson, *Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment*, ACS Symposium Series, Washington, 1996.
13. P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, 1998.
14. F. Chemat, M. A. Vian, G. Cravotto, Green extraction of natural products: concept and principles, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8615–8627.
15. J. Fanzo, N. Covic, A. Dobermann, S. Henson, M. Herrero, P. Pingali, S. Staal, A research vision for food systems in the 2020s: Defying the status quo, *Glob. Food Sec.* 26 (2020) 100397.

16. H. - K. Biesalski, L. O. Dragsted, I. Elmadfa, R. Grossklaus, M. Müller, D. Schrenk, P. Walter, P. Weber, Bioactive compounds: Definition and assessment of activity, *Nutrition* 25 (2009) 1202-1205.
17. J. M. Carbonell-Capella, M. Buniowska, F. J. Barba, M. J. Esteve, A. Frígola, Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (2014) 155-171.
18. J. Bonilla, F. C. Vargas, T. G. de Oliveira, G. L. da Aparecida Makishi, P. J. do Amaral Sobral, Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review, *Curr. Opin. Food Sci.* 5 (2015) 1-7.
19. E. Oldfield, F.-Y. Lin, Terpene biosynthesis: Modularity rules, *Angew. Chemie Int. Ed.* 51 (2012) 1124-1137.
20. V. M. Patil, N. Masand, Anticancer potential of flavonoids: Chemistry, biological activities, and future perspectives, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 59 (2018) 401-430.
21. F. J. Barba, M. J. Esteve, A. Frígola, Bioactive components from leaf vegetable products, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 41 (2014) 321-346.
22. R. R. Pujari, N. S. Vyawahare, P. A. Thakurdesai, Neuroprotective and antioxidant role of *Phoenix dactylifera* in permanent bilateral common carotid occlusion in rats, *J. Acute Dis.* 3 (2014) 104-114.
23. A. F. Mendes, M. T. Cruz, O. Gualillo, Editorial: The physiology of inflammation—The final common pathway to disease, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1741.
24. M. A. Samad, S. H. Hashim, K. Simarani, J. S. Yaacob, Antibacterial Properties and Effects of Fruit Chilling and Extract Storage on Antioxidant Activity, Total Phenolic and Anthocyanin Content of Four Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Cultivars, *Molecules* 26 (2016) 419.
25. H. Taleb, S. E. Maddocks, R. K. Morris, A. D. Kanekanian, Chemical characterisation and the anti-inflammatory, anti-angiogenic and antibacterial properties of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.), *J. Ethnopharmacol.* 194 (2016) 457-468.
26. M. M. Rahman, M. S. Rahaman, M. R. Islam, F. Rahman, F. M. Mithi, T. Alqahtani, M. A. Almikhlaifi, S. Q. Alghamdi, A. S. Alruwaili, M. S. Hossain, M. Ahmed, R. Das, T. B. Emran, M. S. Uddin, Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects, *Molecules.* 30;27(1) (2021) 233.
27. N. Kumar, N. Goel, Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnol. Rep. (Amst).* 20 (2019), 00370.
28. A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J. Food Sci.* 5 (2016) 47.
29. C. Scheau, I. Badarau, L. Mihai, A. Scheau, D.O. Costache, C. Constantin, D. Calina, C. Caruntu, R. Costache, A. Caruntu, Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation, *Molecules* 25(3) (2020) 652-675.
30. M. ElSohly, W. Gul, *Constituents of Cannabis sativa*, Oxford University Press, 2014., str. 3-22.

31. C. Citti, D. Braghiroli, M. A. Vandelli, G. Cannazza, Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 565-579.
32. V. Di Marzo, Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7 (2008) 438–455.
33. L. De Petrocellis, A. Ligresti, A. S. Moriello, M. Allarà, T. Bisogno, S. Petrosino, C. G. Stott, V. Di Marzo, Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes, *Br. J. Pharmacol.* 163(7) (2011) 1479- 1494.
34. N. Robledo-O’Ryan, M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, M. Moncada-Basualto, F. Mura, M. Lapier, J.D. Maya, C. Olea-Azar, Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25 (2017) 621–632.
35. M. Lončar, M. Jakovljević, D. Šubarić, M. Pavlić, V. Buzjak Služek, I. Cindrić, M. Molnar, Coumarins in Food and Methods of Their Determination, *Foods* 9 (2020) 645.
36. K. Khanbabaee, T. van Ree, Tannins: classification and definition, *Nat Prod Rep.* 18(6) (2001) 641-649.
37. M. Krzyzowska, E. Tomaszewska, K. Ranoszek-Soliwoda, K. Bien, P. Orłowski, G. Celichowski, J. Grobelny, Tannic acid modification of metal nanoparticles: possibility for new antiviral applications, In *Micro and Nano Technologies, Nanostructures for Oral Medicine*, Elsevier, 2017., str. 335-363.
38. D. J. Miller, R. K. Allemann, Sesquiterpene synthases: Passive catalysts or active players?, *Nat. Prod. Rep.* 12 (2012) 60.
39. A. Modzelewska, S. Sur, S. K. Kumar, S. R. Khan, Sesquiterpenes: Natural Products That Decrease Cancer Growth, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5 (2005) 477-499.
40. R. A. Khan, R. Hossain, A. Siyatpanah, K. Al-Khafaji, A. B. R. Khalipha, D. Dey, U. H. Asha, P. Biswas, A. S. M. Saikat, H. A. Chenari, P. Wilairatana, M. Torequl Islam, Diterpenes/Diterpenoids and Their Derivatives as Potential Bioactive Leads against Dengue Virus: A Computational and Network Pharmacology Study, *Molecules* 26 (2021) 6821.
41. M. J. Smanski, R. M. Peterson, B. Shen, *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A* . Vol. 515, Academic Press, 2012., str. 163–186.
42. L. P. Sandjo, V. Kuete, *Diterpenoids from the medicinal plants of Africa, Medicinal Plant Research in Africa*, Elsevier, 2013., str 105–133.
43. V. Lanzotti, (2013). *Diterpenes for Therapeutic Use, Natural Products*. Springer, 2013.
44. M. Torequl Islam, C. Quispe, J. Herrera-Bravo, M. M. Rahaman, R. Hossain, C. Sarkar, M. A. Raihan, M. M. Chowdhury, S. J. Uddin, J. A. Shilpi, J. Marcelo de Castro E Sousa, A. A. C. Melo-Cavalcante, M. S. Mubarak, J. Sharifi-Rad, D. Calina, *Activities and Molecular Mechanisms of Diterpenes, Diterpenoids, and Their*

- Derivatives in Rheumatoid Arthritis, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 25 (2022) 4787643.
45. Q. Zhang, K. D. O. Vigier, S. Royer, F. Jerome, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146.
 46. C. Florindo, F. S Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2 (2014), 2416–2425.
 47. J. V. Federico Gomez, M. Espino, M. de los A. Fernández, J. Boiteux, M. F. Silva, DES-Mediated Approaches Toward Green Analytical Chemistry, *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, Wiley, 2019., str. 321 – 334.
 48. Y. Li, Y.-H. Hsieh, Z. Pan, L. Zhang, W. Yu, B. Wang, J. Zhang, Extraction of Alkaloids from *Coptidis Rhizomavia* Betaine-Based Deep Eutectic Solvent, *ChemistrySelect.* 5 (2020) 4973–4978
 49. M. C. Gutiérrez, M. L. Ferrer, C. R. Mateo, F. del Monte, Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures, *Langmuir.* 25(10) (2009) 5509-15.
 50. G. García, S. Aparicio, R. Ullah, M. Atilhan, Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications, *Energy & Fuels* 29 (4) (2015) 2616–2644.
 51. N. R. Mirza, N. J. Nicholas, Y. Wu, S. Kentish, G. W. Stevens, Estimation of Normal Boiling Temperatures, Critical Properties, and Acentric Factors of Deep Eutectic Solvents, *J. Chem. Eng. Data* 60(6) (2015) 1844–1854.
 52. R. Haghbakhsh, K. Parvaneh, S. Raeissi, A. Shariati, A general viscosity model for deep eutectic solvents: The free volume theory coupled with association equations of state, *Fluid Ph. Equilib.* 470 (2018) 193–202.
 53. B. B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J. M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B. W. Doherty, B. Gurkan, E. J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T. A. Zawodzinski, G. A. Baker, M. E. Tuckerman, R. F. Savinell, J. R. Sangoro. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chem. Rev.* 121 (3) (2021) 1232–1285.
 54. S. P. Ijardar, V. Singh, R. L. Gardas, Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents, *Molecules.* 27(4) (2022) 1368.
 55. E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11060–11082.
 56. A. R. C. Duarte, A. S. D. Ferreira, S. Barreiros, E. Cabrita, R. L. Reis, A. Paiva, A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: solubility and permeability studies, *Eur. J. PharmBiopharm.* 114 (2017) 296–304.
 57. Y. H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. W. Arends, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?, *Plant Physiol.* 156 (4) (2011) 1701-1705.

58. S. A. Siddiqui, A. Ali Redha, M. Salauddin, I. A. Harahap, H. P. V. Rupasinghe, Factors Affecting the Extraction of (Poly)Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction, *Crit Rev Anal Chem.* 18 (2023) 1-22.
59. P. Liu, J.-W. Hao, L.-P. Moa, Z.-H. Zhang, Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions, *RSC Adv.* 5 (2015) 48675-48704.
60. Y. Ma, Q. Wang, T. Zhu, Comparison of hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for pretreatment determination of sulfonamides from aqueous environments, *Anal. Methods*, 11 (2019) 5901-5909.
61. G. S. Kanberoglu, E. Yilmaz, M. Soylak, Application of deep eutectic solvent in ultrasound-assisted emulsification microextraction of quercetin from some fruits and vegetables, *J. Mol. Liq.* 279 (2019) 571–577.
62. C. Florindo, L. C. Branco, I. M. Marrucho, Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments, *Fluid Ph. Equilib.* 448 (2017) 135-142.
63. R. Yusof, E. Abdulmalek, S. Kamaliah, M. B. Abdul Rahman, Tetrabutyl ammonium Bromide (TBABr)-Based Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Physical Properties, *Molecules* 19(6) (2014) 8011-8026.
64. R. Kholi, Applications of ionic liquids in removal of surface contaminants: Developments in surface contamination and cleaning: applications of cleaning techniques, *Elsevier* 11 (2019) 619–680.
65. B. Tang, K. H. Row, Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences, *Monatsh. Chem.* 144 (10) (2013) 1427–1454.
66. A. Basaiahgari, S. Panda, R. L. Gardas, Acoustic, volumetric, transport, optical and rheological properties of Benzyltripropylammonium based Deep Eutectic Solvents, *Fluid Ph. Equilib.* 448 (2017) 41-49.
67. Y. Cui, C. Li, J. Yin, S. Li, Y. Jia, M. Bao, Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride, *J. Mol. Liq.* 236 (2017) 338-343.
68. R. K. Ibrahim, M. Hayyan, M. A. AlSaadi, S. Ibrahim, A. Hayyan, M. A. Hashim, Physical properties of ethylene glycol-based deep eutectic solvents, *J Mol Liq* 276 (2019) 794–800.
69. K. Shahbaz, S. Baroutian, F. S. Mjalli, M. A. Hashim, I. M. AlNashef, Densities of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: prediction using artificial intelligence and group contribution techniques, *Thermochim Acta* 527 (2012) 59–66.
70. H. Ghaedi, M. Ayoub, S. Sufian, A. M. Shariff, B. Lal, The study on temperature dependence of viscosity and surface tension of several Phosphonium-based deep eutectic solvents, *J. Mol. Liq.* 241 (2017) 500-510.
71. A. P. Abbott, J. C. Barron, K. S. Ryder, D. Wilson, Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations, *ChemEur. J.* 13 (22) (2007) 6495–6501.
72. C. D'Agostino, R. C. Harris, A. P. Abbott, L. F. Gladden, M. D. Mantle, Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by

- ¹H pulsed field gradient NMR spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(48) (2011) 21383.
73. A. P. Abbott, R. C. Harris, K. S. Ryder, C. D'Agostino, L. F. Gladden, M. D. Mantle, Glycerol eutectics as sustainable solvent systems, *Green Chem.* 13(1) (2011) 82–90.
74. A. P. Abbott, G. Capper, S. Gray, Design of improved deep eutectic solvents using hole theory, *Chem. Phys. Chem.* 7(4) (2006) 803–806.
75. Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food Chem.* 187 (2015) 14–19.
76. M. A. Kareem, F. S. Mjalli, M. A. Hashim, I. M. AlNashef, Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties, *J. Chem. Eng.* 55(11) (2010) 4632–4637.
77. C. D'Agostino, L. F. Gladden, M. D. Mantle, A. P. Abbott, E. I. Ahmed, A. Y. M. Al-Murshedi, R. C. Harris Molecular and ionic diffusion in aqueous–deep eutectic solvent mixtures: probing intermolecular interactions using PFG NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(23) (2015) 15297–15304.
78. C. Du, B. Zhao, X.-B. Chen, N. Birbilis, H. Yang, Effect of water presence on choline chloride-urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid, *SciReports.* 6 (2016) 29225.
79. D. Shah, F. S. Mjalli, Effect of water on the thermo-physical properties of reline: an experimental and molecular simulation based approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16(43) (2014) 23900–23907.
80. A. P. Abbott, R. C. Harris, K. S. Ryder, Application of hole theory to define ionic liquids by their transport properties, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 4910–4913.
81. J. K. U. Ling, K. Hadinoto, Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 3381.
82. M. Q. Farooq, N. M. Abbasi, J. L. Anderson, Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography, *J Chromatogr A.* 1633 (2020) 461613.
83. A. Pandey, R. Rai, M. Pal, S. Pandey, How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 1559-1568.
84. E. P. Parry, An infrared study of pyridine adsorbed on acidic solids, Characterization of surface acidity, *J. Catal.* 2 (1963) 371-379.
85. Y. L. Yang, Y. Kou, Determination of the Lewis acidity of ionic liquids by means of an IR spectroscopic probe, *Chem. Commun.* 2 (2004) 226-227.
86. M. B. Taysun, E. Sert, F. S. Atalay, Physical properties of benzyl tri-methyl ammonium chloride based deep eutectic solvents and employment as catalyst, *J. Mol. Liq.* 223 (2016) 845-852.
87. D. D. Gertenbach, Solid–liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals, *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects.* DC: CRCPress, 2001., str. 331–366.
88. J. Dai, R. J. Mumper, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules* 15 (10) (2010) 7313-7352.

89. M. Naczki, F. Shahidi, Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1523-1542.
90. H. J. Bart, *Extraction of Natural Products from Plants - an Introduction*. Wiley VCH Verlag GmbH & Co, 2011.
91. C. Santana, Z. Ferrera, M. Padrón, J. Rodríguez, Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches, *Molecules* 14 (2009) 298–320.
92. C. C. Teo, S. N. Tana, J.W. Yong, C.S. Hew, E.S. Ong, Pressurized hot water extraction (PHWE), *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2484–2494.
93. G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro, P. Cintas, Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* 5 (2008) 898-902.
94. A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts, Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18 (2013) 2328-2375.
95. A. Liazid, M. Palma, J. Brigui, C. G. Barroso, Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 29-34.
96. C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, M. Esther Torres Padrón, J. Santana Rodríguez, Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches, *Molecules* 14 (1) (2009) 298-320.
97. G. J. Gil-Chávez, J. A. Villa, J. Fernando Ayala-Zavala, J. Basilio Heredia, D. Sepulveda, E. M. Yahia, G.A. González-Aguilar, Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12 (2013) 5-23.
98. C.-W. Zhang, S.-Q. Xia, P.-S. Ma, Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents, *Bioresour. Technol.* 219 (2016) 1-5.
99. J. Serna-Vázquez, M. Z. Ahmad, G. Boczkaj, R. Castro-Muñoz, Latest Insights on Novel Deep Eutectic Solvents (DES) for Sustainable Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources, *Molecules*, 26 (2021) 5037.
100. S. Koutsoukos, T. Tsiaka, A. Tzani, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, Choline chloride and tartaric acid, a natural deep eutectic solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds, *J. Clean. Prod.* 241 (2019) 118384.
101. Y. H. Choi, R. Verpoorte, Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents, *Curr. Opin. Food Sci.* 26 (2019) 87-93.
102. Y. T. Dai, J. V. Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi, Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: Mixtures of solids as extraction solvents, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 2162–2173.
103. A. Ali Redha, Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents, *J. Agric. Food Chem.* 69 (2021) 878–912.
104. X. Peng, M.- H. Duan, X.- H. Yao, Y.- H. Zhang, C.- J. Zhao, Y.- G. Zu, Y.- J. Fu, Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae Flos* with deep eutectic solvent. *Sep. Purif.* 157 (2016) 249-257.

105. M. - Z. Gao, Q. Cui, L. - T. Wang, Y. Meng, L. Yu, Y.-Y. Li, Y.- J. Fu, A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent, *Microchem J.* 154 (2020) 104598.
106. L. Duan, L. L. Dou, L. Guo, P. Li, E. H. Liu, Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4(4) (2016) 2405–2411.
107. Y. Ma, M. Liu, T. Tan, A. Yan, L. Guo, K. Jiang, C. Tan, Y. Wan, Deep eutectic solvents used as extraction solvent for the determination of flavonoids from *Camellia oleifera* flowers by high-performance liquid chromatography, *Phytochem. Anal.* 29 (2018) 639–648.
108. L. Wu, Z. Chen, S. Li, L. Wang, J. Zhang, Eco-friendly and high-efficient extraction of natural antioxidants from *Polygonum aviculare* leaves using tailor-made deep eutectic solvents as extractants, *Sep. Purif.* 262 (2021) 118339.
109. J. P. Wojciechowski, A. M. Ferreira, D. O. Abranches, M. R. Mafra, J. A. P. Coutinho, Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8 (32) (2020) 12132–12141.
110. J. P. Wojciechowski, C. Marques, L. Igarashi-Mafra, J. A. P. Coutinho, M. R. Mafra, Extraction of Phenolic Compounds from Rosemary using Choline Chloride – based Deep Eutectic Solvents, *Sep. Purif. Technol.* 258 (2) (2020) 117975.
111. K. M. Jeong, Y. Jin, D. E. Yoo, S. Y. Han, E. M. Kim, Lee, J. One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents, *Food Chem.* 251 (2018) 69–76.
112. M. C. Ali, J. Chen, H. Zhang, Z. Li, L. Zhao, H. Qiu, Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction, *Talanta* 203 (2019) 16–22.
113. T. Křížek, M. Bursová, R. Horsley, M. Kuchař, P. Tůma, R. Čabala, T. Hložek, Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids, *J. Clean. Prod.* 193 (2018) 391-396.
114. C. Cai, W. Yua, C. Wang, L. Liu, F. Li, Z. Tan, Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin, *J. Mol. Liq.* 287 (2019) 110957.
115. K. Hroboňová, M. Jablonský, P. Májek, Optimization and application of green solvent extraction of natural bioactive coumarins from *Lamiaceae* and *Asteraceae* herbal plants, *J. Mol. Liq.* 338 (13) (2021) 116691.
116. M. Wang, J. Wang, Y. Zhou, M. Zhang, Q. Xia, W. Bi, D. D. Yong Chen. Ecofriendly Mechanochemical Extraction of Bioactive Compounds from Plants with Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5 (2017) 6297–6303.
117. Y. Yue, Q. Huang, Y. Fu, J. Chang, A Quick Selection of Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Chlorogenic Acid from Herba *Artemisiae Scopariae*, *RSC Advances*, 10 (39) (2020) 23403–23409.

118. B. M. Popović, D. Uka, O. Alioui, R. Ždero Pavlović, Y. Benguerba, Experimental and COSMO-RS theoretical exploration of rutin formulations in natural deep eutectic solvents: Solubility, stability, antioxidant activity, and bioaccessibility, *J. Mol. Liq.* 359 (2022) 119266.
119. J. Huang, X. Guo, T. Xu, L. Fan, X. Zhou, S. Wu, Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products, *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 1–19.
120. J. Zhu, K. Yu, Y. Zhu, R. Zhu, F. Ye, N. Song, Y. Xu, Physicochemical properties of deep eutectic solvents formed by choline chloride and phenolic compounds at T = (293.15 to 333.15) K: The influence of electronic effect of substitution group, *J. Mol. Liq.* 232 (2017) 182–187.
121. Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi, Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 105–134.
122. R. Craveiro, I. Aroso, V. Flammia, T. Carvalho, M. T. Viciosa, M. Dionísio, S. Barreiros, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, A. Paiva, Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents, *J. Mol. Liq.* 215 (2016) 534–540.
123. X. - L. Qi, X. Peng, Y.- Y. Huang, L. Li, Z.- F. Wei, Y.- G. Zu, Y.- J. Fu, Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 142-148.
124. Y. Zhang, J. P. Smuts, E. Dodbiba, R. Rangarajan, J. C. Lang, D. W. Armstrong, Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC, *J. Agric. Food Chem.* 60 (36) (2012) 9305–9314.
125. G. Ming-Zhu, C. Qi , W. Li-Tao, M. Yao, Y. Lian, L. Yan-Yan, F. Yi-Jie, A Green and Integrated Strategy for Enhanced Phenolic Compounds Extraction from Mulberry (*Morus Alba* L.) Leaves by Deep Eutectic Solvent, *Microchem. J.* 154 (2020) 104598.
126. S. Q. Liew, G. C. Ngoh, R. Yusoff, W. H. Teoh, Acid and deep eutectic solvent (DES) extraction of pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13 (2018) 1–11.
127. P. Zhou, X. Wang, P. Liu, J. Huang, C. Wang, M. Pan, Z. Kuang, Enhanced Phenolic Compounds Extraction from *Morus Alba* L. Leaves by Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasonic-Assisted Extraction, *Ind. Crops Prod.* 120 (2018) 147–154.
128. Y. Liu, J. Garzon, J. B. Friesen, Y. Zhang, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S. N. Chen, G.F. Pauli, Countercurrent assisted quantitative recovery of metabolites from plant-associated natural deep eutectic solvents, *Fitoterapia* 112 (2016) 30–37.
129. B. Zhuang, L.- L. Dou, P. Li, E.- H. Liu, Deep Eutectic Solvents as Green Media for Extraction of Flavonoid Glycosides and Aglycones from *Platycladi Cacumen*, *J. Pharm. Anal.* 134 (2017) 214–219.

130. X. Yin, Z. Zhong, G. Bian, X. Cheng, D. Li, Ultra-Rapid, Enhanced and Eco-Friendly Extraction of Four Main Flavonoids from the Seeds of *Oroxylum Indicum* by Deep Eutectic Solvents Combined with Tissue-Smashing Extraction, *Food Chem.* 319 (2020) 126555.
131. T. T. Dang, Q. Van Vuong, M. J. Schreider, M. C. Bowyer, I. A. Van Alena, C. J. Scarlett, Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 3161–3173.
132. F. Rahimi, M. Tabarsa, M. Rezaei, Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: Optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 2979–2990.
133. B. Vázquez-Rodríguez, J.A. Gutiérrez-Urbe, M. Antunes-Ricardo, L. Santos-Zea, L.E. Cruz-Suárez, Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae), *J. Appl. Phycol.* 32 (2020) 1441–1453.
134. B.K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrACTrends Anal. Chem.* 71 (2015) 100–109.
135. J. Saien, S. Daneshamoz, Experimental studies on the effect of ultrasonic waves on single drop liquid–liquid extraction, *Ultrason. Sonochem.* 40 (2018) 11–16.
136. S. Kentish, M. Ashokkumar, The physical and chemical effects of ultrasound, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer, 2011., str. 1–12.
137. T. Leong, M. Ashokkumar, S. Kentish, The growth of bubbles in an acoustic field by rectified diffusion, *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*. Springer, 2016., str. 69–98.
138. T. Bosiljkov, F. Dujmić, M. Cvjetko Bubalo, J. Hribar, R. Vidrih, M. Brnčić, E. Zlatic, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins, *Food Bioprod. Process.* 102 (2017) 195–203.
139. P. Panja, Green Extraction Methods of Food Polyphenols from Vegetable Materials, *Curr. Opin. Food Sci.* 23 (2018) 173–182.
140. F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products, Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540–560.
141. E. Roselló-Soto, C. M. Galanakis, M. Brnčić, V. Orlien, F. J. Trujillo, R. Mawson, K. Knoerzer, B. K. Tiwari, F. J. Barba, Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing, Modeling approaches to optimize processing conditions, *Trends Food Sci.* 42(2) 2015, 134–149.
142. M. Kazemi, F. Khodaiyan, M. Labbafi, S. S. Hosseini, Ultrasonic and Heating Extraction of Pistachio by-Product Pectin: Physicochemical, Structural Characterization and Functional Measurement, *Food Measure.* 14 (2020) 679–693.

143. T. Mason, F. Chemat, M. Vinatoru, The extraction of natural products using ultrasound and microwaves, *Curr. Org. Chem.* 15 (2011) 237–247.
144. H. M. Santos, C. Lodeiro, J. L. Capelo-Martinez, *The Power of Ultrasound, Ultrasound in Chemistry*; Wiley-Vch Verlag GmbH & Co., 2009., str. 1–16.
145. T. J. Mason, D. Peters, *Practical Sonochemistry, An introduction to the uses of power ultrasound in chemistry*, Oxford University Press, 1999. str. 1–48.
146. M. Sališová, Š. Toma, T. J. Mason, Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*, *Ultrason. Sonochem.* 4 (1997) 131–134.
147. M. Stramarkou, S. Papadaki, K. Kyriakopoulou, Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 2947–2960.
148. A. S. Dheyab, M. F. A. Bakar, M. Alomar, S. F. Sabran, A. F. M. Hanafi, A. Mohamad, Deep Eutectic Solvents (DESs) as Green Extraction Media of Beneficial Bioactive Phytochemicals, *Separations* 8 (2021) 176.
149. X. Zhu, X. Chen, J. Xie, P. Wang, W. Su, Mechanochemical-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* spores, *Int. J. Food Sci.* 47 (2012) 927-932.
150. S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, T. Friščić, F. Grepioni, K. D. M. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. Guy Orpen, I. P. Parkin, W. C. Shearouse, J.W. Steedk, D. C. Waddelli, Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 413-447.
151. L. Takacs, The historical development of mechanochemistry, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7649-7659.
152. V. V. Boldyrev, Mechanochemical modification and synthesis of drugs, *J. Mater. Sci.* 39 (2004) 5117-5120.
153. X. T. Liu, X. H. Zhang, K. L. Zhang, C. D. Qi, Sodium persulfate-assisted mechanochemical degradation of tetrabromobisphenol A: Efficacy, products and pathway, *Chemosphere* 150 (2016) 551-558.
154. X. Y. Guo, D. Xiang, G. H. Duan, P. Mou, A review of mechanochemistry applications in waste management, *Waste Manag.* 30 (2010) 4-10.
155. K. Wu, T. Ju, Y. Deng, J. Xi, Mechanochemical assisted extraction: A novel, efficient, eco-friendly technology, *Trends Food Sci.* 66 (2017) 166-175.
156. J. Xie, Y. S. Lin, X. J. Shi, X. Y. Zhu, W. K. Su, P. Wang, Mechanochemical assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves, *Ind. Crops Prod.* 43 (2013) 276-282.
157. J. Xie, H. J. Li, X. Y. Zhu, P. Wang, W. K. Su, Efficient and selective extraction of magnolol from *Magnolia officinalis* by mechanochemical extraction technique, *Chem. Eng. Process.* 50 (2011) 325-330.
158. J. Xie, L. X. Shi, X. Y. Zhu, P. Wang, Y. Zhao, W. K. Su, Mechanochemical assisted efficient extraction of rutin from *Hibiscus mutabilis* L., *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12 (2011) 146-152.

159. X. Y. Zhu, Y. L. Mang, J. Xie, P. Wang, W. K. Su, Response surface optimization of mechanochemical-assisted extraction of flavonoids and terpene trilactones from *Ginkgo leaves*, *Ind. Crops Prod.* 34 (2011) 1041-1052.
160. Y. Q. Wang, Y. J. Gao, H. Ding, S. J. Liu, X. Han, J. Z. Gui, D. Liu, Supercritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa Oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity, *Food Chem.* 218 (2017) 152-158.
161. R. Craveiro, I. Aroso, V. Flammia, T. Carvalho, M. T. Viciosa, M. Dionísio, S. Barreiros, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, A. Paiva, Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents, *J. Mol. Liq.* 215 (2016) 534–540.
162. Q. Yang, M. Zhao, L. Lin, Adsorption and desorption characteristics of adlay bran free phenolics on macroporous resins, *Food Chem.* 194 (2016) 900–907.
163. M. P. Weinstein, J. B. Patel, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A11 (11. edition), Committee for Clinical Laboratory Standards, 2018.
164. J. F. Deye, T. A. Berger, A. G. Anderson, Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids, *Anal. Chem.* 62 (1990) 615–622.
165. T. Lemaoui, F. A. Hatab, A. S. Darwish, A. Attoui, N. E. Houda Hammoudi, G. Almustafa, M. Benaicha, Y. Benguerba, I. M. Alnashef, Molecular-Based Guide to Predict the pH of Eutectic Solvents: Promoting an Efficient Design Approach for New Green Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9 (17) (2021) 5783–5808.
166. M. Panić, M. Radović, M. Cvjetko Bubalo, K. Radošević, M. Rogošić, J. A. P Coutinho, I. Radojčić Redovniković, A. Jurinjak Tušek, Prediction of pH Value of Aqueous Acidic and Basic Deep Eutectic Solvent Using COSMO-RS σ Profiles' Molecular Descriptors, *Molecules* 27(14) (2022) 4489.
167. C. Georgantzi, A. E Lioliou, N. Paterakis, P. Makris Dimitris, Combination of Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvents (DES) with γ -Cyclodextrin: Performance Screening Using Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Selected Native Greek Medicinal Plants, *Agronomy* 7 (2017) 54.
168. M. Yang, J. Cao, F. Cao, C. Lu, E. Su, Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from *Ginkgo biloba* Leaves Using Deep Eutectic Solvent/Water Mixture as Green Media, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 32 (2018) 315–324.
169. G. A. Ojeda, M. M. Vallejos, S. C. Sgroppo, C. Sánchez-Moreno, B. de Ancos, Enhanced extraction of phenolic compounds from mango by-products using deep eutectic solvents, *Heliyon* 9 (6) (2023) 16912.
170. M. I. Razboršek, M. Ivanović, P. Krajnc, M. Kolar, Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Extracting Phenolic Compounds from Chokeberry (*Aronia melanocarpa*), *Molecules* 25 (2020) 1619.
171. H. N. Rajha, T. Mhanna, S. El Kantar, A. El Houry, N. Louka, R. G. Maroun, Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvent and a new infrared technology, *LWT* 111 (2019) 138–146.

172. M. Vázquez-González, Á. Fernández-Prior, A. B. Oria, E. M. Rodríguez-Juan, A. G. Pérez-Rubio, J. Fernández-Bolaños, G. Rodríguez-Gutiérrez, Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents, *LWT* 130 (2020) 109645.
173. J.- Y. An, L.- T. Wang, M.- J. Lv, J.- D. Wang, Z.- H. Cai, Y.- Q. Wang, S. Zhang, Q. Yang, Y.- J. Fu, An efficiency strategy for extraction and recovery of ellagic acid from waste chestnut shell and its biological activity evaluation, *Microchem J.* 160 (2021) 105616.
174. Z. Yang, S.J. Yue, H. Gao, Q. Zhang, D.Q. Xu, J. Zhou, J.J. Li, Y.P. Tang, Natural deep eutectic solvent-ultrasound assisted extraction: A green approach for ellagic acid extraction from *Geum japonicum*, *Front Nutr.* 9 (2023) 1079767.
175. K. Salimiyan, D. Saberi, Choline Chloride/Urea as an Eco-Friendly Deep Eutectic Solvent for TCT-Mediated Amide Coupling at Room Temperature, *Chemistry Select* 4 (2019) 3985 –3989.
176. C. Gómez-Urios, A. Viñas-Ospino, P. Puchades-Colera, J. Blesa, D. López-Malo, A. Frígola, M. José Esteve, Choline chloride-based natural deep eutectic solvents for the extraction and stability of phenolic compounds, ascorbic acid, and antioxidant capacity from *Citrus sinensis* peel, *LWT* 177 (2023) 114595.
177. J. Wu, M. Su, A. Hu, H. Wang, Extraction and recovery of chlorogenic acid from sunflower disks using a high-efficiency system composed of deep eutectic solvents and macroporous resins, *J. Food Process. Preserv.* 46 (2022) 16856.
178. M. Banožić, M. Matic, S. Šafranko, A.- M. Cikoš, M. Jakovljević, M. Molnar, S. Jokić, Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada primjenom eutektičkih otapala, *Kem. Ind.* 69 (2020) 1-10.
179. I. V. Herrera-Beltrán, M. Méndez-Torruco, M. H. Matus, Z. Domínguez, Study of the chlorogenic acid extraction with choline chloride-based deep eutectic solvents and its non-covalent interactions analysis, *J. Phys. Org. Chem.* 36 (11) (2023) 4560.
180. Y. Meng, X. Sui, X. Pan, Y. Yang, H. Sui, T. Xu, H. Zhang, T. Liu, J. Liu, P. Ge, An integrated process by ultrasonic enhancement in the deep eutectic solvents system for extraction and separation of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves. *Ultrason. Sonochem.* 99 (2023)106588.
181. Y. Zhu, H. Li, P. - W. Xu, X.- F. Yuan, B. Zhao, *Natural deep eutectic solvent extraction of chlorogenic acid from Eucommia* leaves: high extractability, stability, antibacterial, and antioxidant activity, *New J. Chem.* 47 (2023) 18096.
182. C. Gómez-Urios, A. Viñas-Ospino, P. Puchades-Colera, J. Blesa, D. López-Malo, A. Frígola, M. José Esteve, Choline chloride-based natural deep eutectic solvents for the extraction and stability of phenolic compounds, ascorbic acid, and antioxidant capacity from *Citrus sinensis* peel, *LWT* 177 (2023) 114595.
183. A. García-Roldán, L. Piriou, P. Jauregi, Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities, *Front Plant Sci.* 11 (2023) 1072592.
184. J. Osamede Airouyuwa, H. Mostafa, A. Riaz, S. Maqsood, Utilization of natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction as green extraction

- technique for the recovery of bioactive compounds from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds: An investigation into optimization of process parameters, *Ultrason. Sonochem.* 91 (2022) 106233.
185. H. Koraqi, B. Qazimi, W. Khalid, J. Petreska Stanoeva, A. Sehrish, F. Siddique, C. Česko, K. Ali Khan, M. Abdul Rahim, I. H. Eliasse Zongo, Optimized conditions for extraction, quantification and detection of bioactive compound from Nettle (*Urtica dioica* L.) using the deep eutectic solvents, ultra-sonication and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-DAD-ESI-MS/MS), *Int. J. Food Prop.* 26 (1) (2023) 2171-2185.
186. T. Wang, J. Jiao, Q.-Y. Gai, P. Wang, N. Guo, L.-L. Niu, Y.-J. Fu, Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145 (2017) 339-345.
187. J. Zeng, Y. Dou, N. Yan, N. Li, H. Zhang, J.-N. Tan, Optimizing Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Bioactive Compounds from Chinese Wild Rice, *Molecules* 24 (2019) 2718.
188. P. Wongsirichot, M. Gonzalez-Miquel, J. Winterburn, Holistic valorization of rape seed meal utilizing green solvents extraction and biopolymer production with *Pseudomonas putida*, *J. Clean. Prod.* 230 (2019) 420-429.
189. M. Molnar, M. Jakovljević, S. Jokić, Optimization of the process conditions for the extraction of rutin from *Ruta graveolens* L. by choline chloride based deep eutectic solvents, *Solvent Extr. Res. Dev. Jpn.* 25(2) (2018) 109-116.
190. M. Jakovljević, J. Vladić, S. Vidović, K. Pastor, S. Jokić, M. Molnar, I. Jerković, Application of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Rutin and Rosmarinic Acid from *Satureja montana* L. and Evaluation of the Extracts Antiradical Activity, *Plants* 9 (2020) 153.
191. F. J. Tiago, A. Paiva, A. A. Matias, A. R. C. Duarte, Extraction of Bioactive Compounds From *Cannabis sativa* L. Flowers and/or Leaves Using Deep Eutectic Solvents, *Front Nutr.* 9 (2022) 892314.
192. P. Sombutsuwan, E. Durand, K. Aryasuk, Effect of acidity/alkalinity of deep eutectic solvents on the extraction profiles of phenolics and biomolecules in defatted rice bran extract *PeerJ anal. chem.* 6 (2024) 29.
193. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 303–313.
194. L. Hongyan, T. Rong, D. Zeyuan, Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods, *Can. J. Plant Sci.* 92 (6) (2012) 1101-1111.
195. C. Mantzourani, P.A. Tarantilis, M.G. Kokotou, Carnosic Acid and Carnosol: Analytical Methods for Their Determination in Plants, Foods and Biological Samples, *Separations* 10(9) (2023) 481.
196. C. R. Pawar, S. J. Surana, Optimizing conditions for gallic acid extraction from *Caesalpinia decapetala* wood, *Pak J Pharm Sci.* 23 (4) (2010) 423-5.
197. R. Wang, L. Ma, D. Weng, J. Yao, X. Liu, F. Jin, Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446

- cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway, *Oncol. Rep.* 35 (5) (2016) 3075-83.
198. D. J. Williams, D. Edwards, M. Chaliha, K. Aryasuk, Measuring free ellagic acid: influence of extraction conditions on recovery by studying solubility and UV-Visible spectra, *Chem. Pap.* 70 (2016) 1078–1086.
199. A. Singh, V. Bajpai, S. Kumar, K. R. Sharma, B. Kumara, Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, *Nat Prod Commun.* 11(2) (2016) 239-44.
200. Z. Lei, J. Jervis, R.F. Helm, Use of methanolysis for the determination of total ellagic acid and gallic acid contents of wood and food products, *J. Agric. Food Chem.* 49 (3) (2001)1165-1168.
201. A. K. Das, N. Islam, O. Faruk, A., R. Dungani, Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities, *S. Afr. J. Bot.* (135) (2020) 58-70.
202. D. Wianowska, R. Typek, A. L. Dawidowicz, Chlorogenic acid stability in pressurized liquid extraction conditions, *J AOAC Int.* 98(2) (2015) 415-21.
203. K. L. Tsai, C. H. Hung, S. H. Chan, P. L. Hsieh, H. C. Ou, Y. H. Cheng, P. M. Chu, Chlorogenic Acid Protects Against oxLDL-Induced Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction by Modulating SIRT1 in Endothelial Cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 62(11) (2018) 1700928.
204. X. Zhang, H. Huang, T. Yang, Y. Ye, J. Shan, Z. Yin, L. Luo, Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury, *Injury.* 41(7) (2010) 746-52.
205. M. Chadni, A. L. Flourat, V. Reungoat, L. M. M. Mouterde, F. Allais, I. Ioannou, Selective Extraction of Sinapic Acid Derivatives from Mustard Seed Meal by Acting on pH: Toward a High Antioxidant Activity Rich Extract, *Molecules.* 26 (1) (2021) 212.
206. V. Reungoat, M. Chadni, L. M. M. Mouterde, F. Brunissen, F. Allais, H. Ducatel, I. Ioannou, Liquid-liquid extraction of sinapic acid from a mustard seed by-product using a hollow fiber membrane contactor, *Sep. Purif.* 331 (2024) 125615.
207. L. S. Chua, A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities, *J Ethnopharmacol.* 150(3) (2013) 805-817.
208. M. Valizadehderakhshan, A. Shahbazi, M. Kazem-Rostami, M. S. Todd, A. Bhowmik, L. Wang, Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. (Hemp)—Review, *Agriculture* 11 (2021) 384.
209. M. Molnar, I. Jerković, D. Suknović, B. Bilić Rajs, K. Aladić, D. Šubarić, S. Jokić, Screening of Six Medicinal Plant Extracts Obtained by Two Conventional Methods and Supercritical CO₂ Extraction Targeted on Coumarin Content, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity and Total Phenols Content, *Molecules* 22 (2017) 348.
210. J. Xinyu, Z. Jinhua, Z. Chunshan, Study on Adsorption and Separation of Naringin with Macroporous Resin, *Front. Chem. China* 1 (2006) 77–81.

211. G.-T. Jia, X.-Y. Lu, Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 136–141.
212. Y. Fu, Y. Zu, S. Li, R. Sun, T. Efferth, W. Liu, S. Jiang, H. Luo, Y. Wang, Separation of 7-xylosyl-10-deacetyl paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III from the remainder extracts free of paclitaxel using macroporous resins, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 77–86.
213. W. Liu, S. Zhang, Y.-G. Zu, Y.-J. Fu, W. Ma, D.-Y. Zhang, Y. Kong, X.-J. Li, Preliminary enrichment and separation of genistein and apigenin from extracts of pigeonpea roots by macroporous resins, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4667–4675.
214. X.-L. Chang, D. Wang, B.-Y. Chen, Y.-M. Feng, S.-H. Wen, P.-Y. Zhan, Adsorption and desorption properties of macroporous resins for anthocyanins from the calyx extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2368–2376.
215. S. P. Deosarkar, V. G. Pangarkar, Adsorptive separation and recovery of organics from PHBA and SA plant effluents, *Sep. Purif.* 38(3) (2004) 241-254.
216. Z. Wang, S. Peng, M. Peng, Z. She, Q. Yang, T. Huang, Adsorption and desorption characteristics of polyphenols from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves with macroporous resin and its inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase, *J. Transl. Med.* 8 (2020) 1004.
217. L. Lin, H. Zhao, Y. Dong, B. Yang, M. Zhao, Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf, *Food Chem.* 130(2) (2012) 417-424.
218. A. Chafera, T. Fornari, A. Berna, E. Ibanez, G. Reglero, Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO₂ with ethanol as a co-solvent, *J. Supercrit. Fluid* 34 (2005) 323–329.
219. A. Isci, M. Kaltschmitt, Recovery and recycling of deep eutectic solvents in biomass conversions: a review, *Biomass Conv. Bioref.* 12 (2022) 197–226.
220. Y. Liao, F. Chen, H. Tang, W. Dessie, Z. Qin, Combination of a Deep Eutectic Solvent and Macroporous Resin for Green Recovery of Iridoids, Chlorogenic Acid, and Flavonoids from *Eucommia ulmoides* Leaves, *Molecules* 29(3) (2024) 737.
221. D. Muntean, S. Vulpie, Antioxidant and Antibacterial Activity of Plant Extracts, *Antibiotics* 12 (2023) 1176.
222. O. D. Stefanović, Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control, InTech., 2018.
223. C. Wendakoon, P. Calderon, D. Gagnon, Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens, *J. Med. Act. Plants* 1 (2012) 60–68.
224. W. Qian, M. Yang, T. Wang, Z. Sun, M. Liu, J. Zhang, Q. Zeng, C. Cai, Y. Li, Antibacterial mechanism of vanillic acid on physiological, morphological and biofilm properties of carbapenem-resistant *Enterobacter hormaechei*, *J. Food Prot.* 83(4) (2020) 576-583.

225. N. S. Radulović, P. D. Blagojević, Z. Z. Stojanović-Radić, N. M. Stojanović, Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 932-952.
226. M. C. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 564-582.
227. M. Daglia, Polyphenols as antimicrobial agents, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 174-181.
228. E. Coppo, A. Marchese, Antibacterial activity of polyphenols, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15 (2014) 380-390.
229. H. Keweloh, G. Weyrauch, H. N. Rehm, Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 33 (1990) 66-7.
230. T. Cushnie, A. J. Lamb, Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38 (2011) 99-107.
231. N. Kittika, L. Natta, K. Orapian, Antibacterial Effect of Five *Zingiberaceae* Essential Oil, *Molecules.* 12 (2007) 2047–2060.
232. A. A. Sharifa, Y. L. Neoh, M. I. Iswadi, O. Khairul, M. Abdul Halim, M. Jamalubin, A. B. Mohamed Azman, H. L. Hing, Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago majoron* Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast, *Ann. Microbiol.* 8 (42) (2008) 44.
233. B. Rodríguez-Martínez, P. Ferreira-Santos, I. M. Alfonso, S. Martínez, Z. Genisheva, B. Gullón, Deep Eutectic Solvents as a Green Tool for the Extraction of Bioactive Phenolic Compounds from Avocado Peels, *Molecules* 27(19) (2022) 6646.
234. S. Gafner, C. Bergeron, The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies, *Curr. Pharm. Anal.* 1(2) (2005) 203-215.
235. J. A. Ascacio-Valdés, A. F. Aguilera-Carbó, J. J. Buenrostro, A. Prado-Barragán, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar, The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation, *J. Basic Microbiol.* 56(4) (2016) 329-36.
236. B. W. Bolling, Almond Polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16(3) (2017) 346-368.
237. L. Schuh, M. Reginato, I. Florêncio, L. Falcao, L. Boron, E. F. Gris, V. Mello, S. N. Bão, From Nature to Innovation: The Uncharted Potential of Natural Deep Eutectic Solvents, *Molecules* 28 (22) (2023) 7653.

8. Prilozi

Prilog A1. Validacija HPLC metode za određivanje karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima kadulje

	Udio karnosolne kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio karnosola (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)			
Ponovljivost mjerenja	100,406	100,39±0,43	0,43	99,999	100,39±0,43	0,05			
	100,042			100,004					
	100,913			100,100					
	100,842			99,947					
	100,305			99,977					
Ponovljivost pripreme otopine	104,65	107,46±2,40	2,24	102,231	102,22±0,54	0,53			
	108,45			101,996					
	109,22			103,260					
	109,09			102,161					
	109,24			101,677					
		Dodana vrijednost karnosolne kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost karnosolne kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost karnosolne kiseline (µg/mg)	Recovery (%)	Dodana vrijednost karnosola (µg/mg)	Očekivana vrijednost karnosola (µg/mg)	Dobivena vrijednost karnosola (µg/mg)	Recovery (%)
Točnost	Uzorak			10,36				6,50	
	Uzorak+std1 (1:1)	22,570	16,461	16,426	99	21,329	13,915	13,213	95

	99,9Uzorak+std2 (1:1)	100,406	55,385	55,797	99	99,947	53,223	52,999	99
	Uzorak+std3 (1:1)	212,859	111,618	107,049	96	209,221	107,860	106,995	99

Prilog A2. Validacija HPLC metode za određivanje fenolnih kiselina i HT u ekstraktima vrkute

	Udio galne kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio elaginske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)			
Ponovljivost mjerenja	100,012	100,22±0,23	0,23	100,202	100,05±0,09	0,09			
	99,989			100,009					
	100,522			99,988					
	100,372			99,996					
	100,209			100,058					
Ponovljivost pripreme otopine	101,061	102,275±1,56	1,52	102,377	101,874±1,33	1,30			
	103,553			103,216					
	100,991			102,769					
	104,024			100,043					
	103,996			100,965					
		Dodana vrijednost galne kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost galne kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost galne kiseline (µg/mg)	Recovery (%)	Dodana vrijednost elaginske (µg/mg)	Očekivana vrijednost elaginske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost elaginske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
Točnost	Uzorak			1,14				9,30	
	Uzorak+std1 (1:1)	10,172	5,656	5,485	97	10,099	9,699	9,594	98
	99,9Uzorak+std2 (1:1)	51,009	26,05	25,972	99	49,986	29,643	29,688	100
	Uzorak+std3 (1:1)	205,471	103,306	104,065	100	202,545	105,923	102,524	99

Prilog A3. Validacija HPLC metode za određivanje fenolnih kiselina i rutina u ekstraktima koprive

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio klorogenske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio klorogenske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost klorogenske kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost klorogenske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost klorogenske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
100,875	100,634±0,37	0,37	103,651	102,948±1,51	1,46	Uzorak			2,09	
101,075			103,659			Uzorak+std 1 (1:1)	10,221	6,156	5,994	97
100,712			101,991			Uzorak+std 2 (1:1)	102,126	52,108	51,073	98
100,262			100,691			Uzorak+std 3 (1:1)	254,992	128,541	126,988	98
100,247			103,792							
Udio kofeinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio kofeinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost kofeinske kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost kofeinske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost kofeinske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
102,564	102,870±0,76	0,74	105,372	104,31±0,92	0,88	Uzorak			1,92	
103,692			103,711			Uzorak+std 1 (1:1)	5,375	6,148	6,187	100
102,158			104,543			Uzorak+std 2 (1:1)	101,048	51,484	50,986	99
102,263			103,058			Uzorak+std 3 (1:1)	252,123	127,022	127,095	100
103,675			104,857							

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio neoklorogenske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio neoklorogenske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost neoklorogenske kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost neoklorogenske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost neoklorogenske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
104,869	104,912±0,62	0,59	108,184	105,271±2,32	2,21	Uzorak			1,00	
105,126			105,359			Uzorak+std 1 (1:1)	9,992	5,496	5,409	98
104,338			101,726			Uzorak+std 2 (1:1)	100,483	50,742	49,855	98
105,843			105,996			Uzorak+std 3 (1:1)	251,289	125,73	126,145	100
104,386			105,089							
Udio kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost kafeoil-jabučne kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
100,940	101,860±0,78	0,77	106,219	105,89±1,17	1,11	Uzorak			7,89	
102,994			103,936			Uzorak+std 1 (1:1)	10,383	9,137	8,891	97
102,204			106,696			Uzorak+std 2 (1:1)	103,172	55,531	53,217	95
101,439			105,749			Uzorak+std 3 (1:1)	255,724	131,807	131,946	100
101,725			106,841							

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio sinapinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio sinapinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost sinapinske kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost sinapinske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost sinapinske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
101,586	100,585±0,0,65	0,65	99,701	103,269±3,45	3,38	Uzorak			1,92	
100,394			106,809			Uzorak+std 1 (1:1)	10,340	6,13	6,043	99
99,786			104,378			Uzorak+std 2 (1:1)	104,227	54,149	53,988	99
100,718			105,927			Uzorak+std 3 (1:1)	253,952	127,936	127,271	99
100,441			99,532							
Udio cikorinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio cikorinske kiseline (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost cikorinske kiseline (µg/mg)	Očekivana vrijednost cikorinske kiseline (µg/mg)	Dobivena vrijednost cikorinske kiseline (µg/mg)	Recovery (%)
100,696	101,291±0,54	0,53	99,579	100,662±1,27	1,27	Uzorak			1,58	
101,712			99,444			Uzorak+std 1 (1:1)	9,989	5,785	5,297	92
100,749			102,601			Uzorak+std 2 (1:1)	104,583	53,082	50,876	96
101,843			100,752			Uzorak+std 3 (1:1)	201,992	101,786	100,183	98
101,453			100,933							
Udio rutina (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio rutina (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost rutina	Očekivana vrijednost rutina	Dobivena vrijednost rutina	Recovery (%)

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
							($\mu\text{g}/\text{mg}$)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
100,775	101,145 \pm 0,93	0,93	100,058	102,166 \pm 2,5 4	2,48	Uzorak			5,08	
100,478			100,312			Uzorak+std 1 (1:1)	10,097	7,589	7,146	94
102,593			105,011			Uzorak+std 2 (1:1)	102,612	53,846	53,388	99
100,329			104,861			Uzorak+std 3 (1:1)	253,154	129,117	126,528	98
101,549			100,586							

Prilog A4. Validacija HPLC metode za određivanje kanabinoida u ekstraktima industrijske konoplje

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio CBD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio CBD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost CBD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t CBD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
27,71	26,496 \pm 0,71	0,63	28,119	28,172 \pm 2,25	2,01	Uzorak			20,09	
26,256			30,609			Uzorak+std 1 (1:1)	5,008	12,549	12,071	96
26,213			30,137			Uzorak+std 2 (1:1)	10,073	15,082	14,862	98
26,416			25,293			Uzorak+std 3 (1:1)	25,291	22,691	21,998	96
25,886			26,703							
Udio CBDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio CBDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost CBDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t CBDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
26,606	26,285 \pm 1,02	0,91	25,236	26,731 \pm 1,99	1,78	Uzorak				

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
25,152			27,77			Uzorak+std 1 (1:1)	5,375	6,148	6,187	98
27,854			27,742			Uzorak+std 2 (1:1)	101,048	51,484	50,986	99
26,007			28,83			Uzorak+std 3 (1:1)	252,123	127,022	127,095	97
25,806			24,075							
Udio CBG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio CBG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost CBG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t CBG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
24,669	24,732 \pm 0,65	0,58	27,495	27,353 \pm 1,16	1,04	Uzorak			4,27	
25,773			28,48			Uzorak+std 1 (1:1)	1,009	2,639	2,601	98
24,373			28,061			Uzorak+std 2 (1:1)	10,013	7,141	7,195	99
24,801			27,263			Uzorak+std 3 (1:1)	25,093	14,682	14,083	96
24,046			25,464							
Udio CBGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio CBGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost CBGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t CBGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
28,716	27,322 \pm 1,29	1,15	25,134	27,053 \pm 1,81	1,62	Uzorak			3,67	
27,511			25,149			Uzorak+std 1 (1:1)	1,006	3,688	3,422	93
27,498			27,616			Uzorak+std 2 (1:1)	10,116	6,893	6,361	92
27,688			28,371			Uzorak+std 3 (1:1)	24,969	14,320	13,859	97
25,198			28,996							

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio CBN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio CBN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost CBN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t CBN ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
25,001	26,589 \pm 1,08	0,97	25,009	26,944 \pm 1,25	1,12	Uzorak			2,34	
27,282			27,652			Uzorak+std 1 (1:1)	1,012	1,676	1,511	92
26,258			27,332			Uzorak+std 2 (1:1)	5,201	3,7705	3,743	99
27,847			28,222			Uzorak+std 3 (1:1)	10,181	6,2605	6,161	98
26,559			26,506							
Udio THC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio THC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost THC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost THC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t THC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
26,107	26,032 \pm 0,75	0,67	24,993	26,762 \pm 1,19	1,06	Uzorak			2,95	
25,284			26,759			Uzorak+std 1 (1:1)	1,102	2,026	2,003	98
25,329			27,332			Uzorak+std 2 (1:1)	5,037	3,994	3,961	99
26,365			28,222			Uzorak+std 3 (1:1)	10,137	6,544	6,332	96
27,073			26,506							
Udio THCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)	Udio THCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Srednja vrijednost \pm S D	RSD (%)		Dodana vrijednost THCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost THCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednos t THCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recover y (%)
24,669	25,072 \pm 0,69	0,62	28,199		0,76	Uzorak			1,86	

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
25,544			28,703	27,728 ± 0,85		Uzorak+std 1 (1:1)	1,006	1,433	1,363	95
24,081		28,076			Uzorak+std 2 (1:1)	5,064	3,462	3,226	93	
25,271		26,904			Uzorak+std 3 (1:1)	10,153	6,006	5,904	98	
25,793		26,76								
Udio THCVA (µg/mg)	Srednja vrijednost±S D	RSD (%)	Udio THCA (µg/mg)	Srednja vrijednost±S D	RSD (%)		Dodana vrijednost THCVA (µg/mg)	Očekivana vrijednost THCVA (µg/mg)	Dobivena vrijednos t THCVA (µg/mg)	Recover y (%)
24,159	25,066±0,62	0,55	24,422	25,275±1,07	0,95	Uzorak				
25,161			24,377			Uzorak+std 1 (1:1)	-	-	-	-
24,839			24,708			Uzorak+std 2 (1:1)	-	-	-	-
25,363			26,493			Uzorak+std 3 (1:1)	-	-	-	-
25,806			26,377							
Udio CBCA (µg/mg)	Srednja vrijednost±S D	RSD (%)	Udio CBCA (µg/mg)	Srednja vrijednost±S D	RSD (%)		Dodana vrijednost CBCA (µg/mg)	Očekivana vrijednost CBCA (µg/mg)	Dobivena vrijednos t CBCA (µg/mg)	Recover y (%)
25,009	24,846±0,35	0,32	25,464	26,013±1,63	1,46	Uzorak			8,74	
24,362			24,78			Uzorak+std 1 (1:1)	5,126	6,933	6,861	98
24,603			28,743			Uzorak+std 2 (1:1)	10,081	9,4105	9,377	99
25,226			24,876			Uzorak+std 3 (1:1)	25,122	16,931	16,761	98
25,028			26,2							

Ponovljivost mjerenja			Ponovljivost pripreme otopine			Točnost				
Udio CBC (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio CBC (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)		Dodana vrijednost CBC (µg/mg)	Očekivana vrijednost CBC (µg/mg)	Dobivena vrijednost CBC (µg/mg)	Recovery (%)
24,475	25,624±0,81	0,72	26,081	25,624±0,81	0,72	Uzorak			5,83	
25,76			28,761			Uzorak+std 1 (1:1)	1,014	3,422	3,061	89
26,747			26,503			Uzorak+std 2 (1:1)	5,162	5,496	5,241	95
25,597			27,441			Uzorak+std 3 (1:1)	10,226	8,028	7,961	99
25,541			24,212							

Prilog A5. Validacija HPLC metode za određivanje kumarina u ekstraktima lavande

	Udio umbeliferona (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)	Udio herniarina (µg/mg)	Srednja vrijednost±SD	RSD (%)			
Ponovljivost mjerenja	99,609	100,22±0,23	0,23	99,768	100,05±0,09	0,09			
	100,008			99,843					
	99,314			103,336					
	99,012			102,279					
	99,831			103,423					
Ponovljivost pripreme otopine	98,843	102,275±1,56	1,52	100,874	101,874±1,33	1,30			
	99,986			99,933					
	99,509			99,282					
	102,056			100,896					

	103,911			99,442					
		Dodana vrijednost umbeliferona ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost umbeliferona ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednost umbeliferona ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recovery (%)	Dodana vrijednost herniarina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Očekivana vrijednost herniarina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dobivena vrijednost herniarina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Recovery (%)
Točnost	Uzorak			1,09				5,45	
	Uzorak+std1 (1:1)	10,096	5,593	5,507	98	10,265	7,858	7,511	95
	99,9Uzorak+std2 (1:1)	51,273	26,1815	25,712	98	52,137	28,789	29,239	101
	Uzorak+std3 (1:1)	203,947	102,519	100,248	97	205,718	105,584	103,299	97

Životopis

Martina Jakovljević Kovač rođena je 7. prosinca 1992. u Virovitici. U Belom Manastiru završila je Opću gimnaziju, a potom 2011. godine upisuje preddiplomski studij Prehrambene tehnologije na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski studij Znanost o prehrani i nutricionizam upisuje 2014. te diplomira 28. rujna 2016. godine. Radila je kao stručni suradnik na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek od prosinca 2016 do rujna 2017, a nakon toga zaposlena je na radnom mjestu asistenta na istom Fakultetu. Akademске godine 2017./2018. upisala je poslijediplomski doktorski studij Kemija mediteranskog okoliša na Kemijsko tehnološkom fakultetu u Splitu. Sudjeluje u izvođenju nastave na kolegijima *Opća i anorganska kemija* i *Analitička kemija* na studiju Prehrambene tehnologije i Farmacije. Tijekom akademskih godina 2018./2019. i 2019./2020. sudjelovala je kao vanjski suradnik na kolegiju *Osnovni praktikum iz opće kemije* i kolegiju *Organska kemija* na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Dobitnica je „Godišnje nagrade suradniku za ostvarena postignuća u području znanstvenog, nastavnog i stručnog rada“ Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek za 2018. i 2020. godinu.

Autorica i koautorica je 24 znanstvena rada, pet poglavlja u knjigama i 39 priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. Sudjelovala je kao neposredni voditelj dvanaest završnih i diplomskih radova. Tijekom lipnja 2021. usavršavala se na Tehnološkom fakultetu Novi Sad, a u veljači 2020. i ožujku 2022. na Kemijskom odsjeku Sveučilišta u Portugalu.

Sudjelovala je kao suradnica na bilateralnom projektu „Separacija aktivnih komponenta iz nusproizvoda prehrambene industrije – kakao ljuske i formulacija praškastih produkata,“ i na uspostavnom istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost *Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva* (UIP-2017-05-6593).

Sudjeluje i u brojnim aktivnostima popularizacije znanosti koje se održavaju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, kao što su Festival znanosti i Noć znanosti na kojima se radionicama za djecu i mlade znanost prikazuje na zanimljiv način. Također, sudjelovala je u Europskoj noći znanosti, Znanosti u prolazu u Osijeku te 1. vikendu znanosti u Osijeku. Kao jedan od predstavnika Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek sudjelovala je i u projektu „Kreativna STEM revolucija u Slavoniji“ sufinanciran sredstvima Europskog socijalnog fonda i Ureda za udruge Vlade RH.

Znanstveni radovi:

1. Jakovljević, Martina; Vladić, Jelena; Vidović, Senka; Pastor, Kristian; Jokić, Stela; Molnar, Maja; Jerković, Igor. Application of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Rutin and Rosmarinic Acid from *Satureja montana* L. and Evaluation of the Extracts Antiradical Activity. *Plants*, 9 (2020), 2; 153, 14.
2. Jakovljević, Martina; Jokić, Stela; Molnar, Maja; Jerković, Igor. Application of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) with Response Surface Methodology Optimization. *Plants*, 10 (2021), 80, 20.
3. Jakovljević Kovač, Martina; Pavić, Valentina; Huđ, Anastazija; Cindrić, Ines; Molnar, Maja. Determination of Suitable Macroporous Resins and Desorbents for Carnosol and Carnosic Acid from Deep Eutectic Solvent Sage (*Salvia officinalis*) Extract with Assessment of Antiradical and Antibacterial Activity. *Antioxidants*, 10 (2021), 4; 556, 16.
4. Jakovljević Kovač, Martina; Jokić, Stela; Jerković, Igor; Molnar, Maja. Optimization of Deep Eutectic Solvent Extraction of Phenolic Acids and Tannins from *Alchemilla vulgaris* L. *Plants*, 11 (2022), 4; 474, 21.
5. Jakovljević Kovač, Martina; Molnar, Maja; Jednačak, Tomislav; Balić, Tomislav; Novak, Jurica. Design, preparation and characterization of 7-hydroxy-4-methylcoumarin-based deep eutectic solvents. *New journal of chemistry*, 47 (2023), 35; 16484-16493.
6. Jokić, Stela; Molnar, Maja; Jakovljević, Martina; Aladić, Krunoslav ; Jerković, Igor. Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on oxygenated monoterpenes, α - humulene, viridiflorol and manool. *Journal of supercritical fluids*, 133 (2018), 1; 253-262.
7. Kuś, Piotr; Jerković, Igor; Jakovljević, Martina; Jokić, Stela. Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 152 (2018), 128-136.
8. Molnar, Maja; Jakovljević, Martina ; Jokić, Stela. Optimization of the process conditions for the extraction of rutin from *Ruta graveolens* L. by choline chloride based deep eutectic solvents. *Solvent extraction research and development-japan*, 25 (2018), 2; 109-116. doi: 10.15261/serdj.25.109

9. Kus, Piotr; Okinczyc, Piotr; Jakovljević, Martina; Jokić, Stela; Jerković, Igor. Development of supercritical CO₂ extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC–MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 158 (2018), 15-27.
10. Pavić, Valentina; Jakovljević, Martina; Molnar, Maja; Jokić, Stela. Extraction of carnosic acid and carnosol from sage (*Salvia officinalis* L.) leaves by supercritical fluid extraction and their antioxidant and antibacterial activity. *Plants*, 8 (2019), 1; 16, 14.
11. Pavić, Valentina; Flačer, Dora; Jakovljević, Martina; Molnar, Maja; Jokić, Stela. Assessment of total phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. extracts obtained by choline chloride based natural deep eutectic solvents. *Plants*, 8 (2019), 3; 69, 9.
12. Banožić, Marija; Banjari, Ines; Jakovljević, Martina; Šubarić, Drago; Tomas, Srećko; Babić, Jurislav; Jokić, Stela. Optimization of ultrasound-assisted extraction of some bioactive compounds from tobacco waste. *Molecules*, 24 (2019), 8; 1611, 14.
13. Jokić, Stela; Šafranko, Silvija; Jakovljević, Martina; Cikoš, Ana-Marija; Kajić, Nikolina; Kolarević, Filip; Babić, Jurislav; Molnar, Maja. Sustainable Green Procedure for Extraction of Hesperidin from Selected Croatian Mandarin Peels. *Processes*, 7 (2019), 7; 469, 12.
14. Jokić, Stela; Molnar, Maja; Cikoš, Ana-Marija; Jakovljević, Martina; Šafranko, Silvija; Jerković, Igor. Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO₂ extraction and ultrasound solvent extraction: optimisation of limonene and hesperidin content. *Separation science and technology*, 55 (2020), 15; 2799-2811.
15. Pavlović, Nika; Jokić, Stela; Jakovljević, Martina; Blažić, Marijana; Molnar, Maja. Green Extraction Methods for Active Compounds from Food Waste—Cocoa Bean Shell. *Foods*, 9 (2020), 2; 140, 15.
16. Vladić, Jelena; Jakovljević, Martina; Molnar, Maja; Vidović, Senka; Tomić, Milan; Drinić, Zorica; Jokić, Stela. Valorization of Yarrow (*Achillea millefolium* L.) By-Product through Application of Subcritical Water Extraction. *Molecules*, 25 (2020), 8; 1878, 15.

17. Lončar, Mirjana; Jakovljević, Martina; Šubarić, Drago; Pavlić, Martina; Buzjak Služek, Vlatka; Cindrić, Ines; Molnar, Maja. Coumarins in Food and Methods of Their Determination. *Foods*, 9 (2020), 5; 645, 34.
18. Banožić, Marija; Matic, Maja; Šafranko, Silvija; Cikoš, Ana-Marija; Jakovljević, Martina; Molnar, Maja; Jokić, Stela. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada primjenom eutektičkih otapala. *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, 69 (2020), 13; 1-10.
19. Šafranko, Silvija; Stanković, Anamarija; Asserghine, Abdelilah; Jakovljević, Martina; Hajra, Sugato; Nundy, Srijita; Medvidović- Kosanović, Martina; Jokić, Stela. Electroactivated disposable pencil graphite electrode - new, cost-effective, and sensitive electrochemical detection of bioflavonoid hesperidin. *Electroanalysis*, 33 (2021), 4; 1063-1071.
20. Šafranko, Silvija; Ćorković, Ina; Jerković, Igor; Jakovljević, Martina; Aladić, Krunoslav; Šubarić, Drago ; Jokić, Stela. Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. Kuno): Phytochemical Analysis and Process Optimization. *Foods*, 10 (2021), 5; 1043, 16.
21. Jokić, Stela; Jerković, Igor; Pavić, Valentina; Aladić, Krunoslav; Molnar, Maja; Jakovljević Kovač, Martina; Vladimir-Knežević, Sanda. Terpenes and Cannabinoids in Supercritical CO₂ Extracts of Industrial Hemp Inflorescences: Optimization of Extraction, Antiradical and Antibacterial Activity. *Pharmaceuticals*, 15 (2022), 9; 1117, 21.
22. Gil, Katarzyna Angelika; Jokić, Stela; Cikoš, Ana-Marija; Banožić, Marija; Jakovljević Kovač, Martina; Fis, Antonella; Tuberoso, Carlo Ignazio Giovanni. Comparison of Different Green Extraction Techniques Used for the Extraction of Targeted Flavonoids from Edible Feijoa (*Acca sellowiana* (O.Berg) Burret) Flowers. *Plants*, 12 (2023), 7; 1461, 14.
23. Banožić, Marija; Weronika Wronska, Aleksandra; Jakovljević Kovač, Martina; Aladić, Krunoslav; Jerković, Igor; Jokić, Stela. Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques for Separation of Artemisinin from Sweet Wormwood (*Artemisia annua* L.). *Horticulturae*, 9 (2023), 6; 629, 12.
24. Vladić, Jelena; Jakovljević Kovač, Martina; Pavić, Valentina; Jokić, Stela; Simić, Siniša; Paiva, Alexandre; Jerković, Igor; Duarte, Ana Rita. Towards a Greener

Approach for Biomass Valorization: Integration of Supercritical Fluid and Deep Eutectic Solvents. *Antibiotics*, 12 (2023), 6; 1031, 17.