

Modeliranje mikrovalne ekstrakcije za ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost ružmarina (*Rosmarinus Officinalis*)

Franjić, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:800935>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

MODELIRANJE MIKROVALNE EKSTRAKCIJE ZA UKUPNE FENOLE I
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST RUŽMARINA (*ROSMARINUS*
***OFFICINALIS*)**

ZAVRŠNI RAD

TEA FRANJIĆ

Matični broj: 177

Split, kolovoz 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

MODELIRANJE MIKROVALNE EKSTRAKCIJE ZA UKUPNE
FENOLE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST RUŽMARINA
(ROSMARINUS OFFICINALIS)

ZAVRŠNI RAD

TEA FRANJIĆ

Matični broj: 177

Split, kolovoz 2024.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE UNIVERSITY STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**MODELING OF MICROWAVE EXTRACTION OF TOTAL
PHENOLIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROSEMARY
(*ROSMARINUS OFFICINALIS*)**

BACHELOR THESIS

TEA FRANJIĆ

Parent number: 177

Split, August, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Prijediplomski studij Prehrambene tehnologije
Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Mentor: doc. dr. sc. Nives Vladislavić

MODELIRANJE MIKROVALNE EKSTRAKCIJE ZA UKUPNE FENOLE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST RUŽMARINA (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

Tea Franjić, 177

Sažetak: Poznato je da ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*) predstavlja iznimno bogat izvor fenolnih spojeva, koji su zaslužni za njegovu visoku bioaktivnost. Posljednjih godina ova biljka se opsežno proučava kao izvor prirodnih bioaktivnih spojeva zbog snažnog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, antibakterijskih i antimutagenih svojstava te kao kemopreventivno sredstvo. U Dalmaciji, koja je od davnina bogata autohtonim ljekovitim biljkama, ružmarin je široko rasprostranjen. Nedovoljnim unosom antioksidansa ljudski organizam snosi posljedice. Tvdnja "Paradoks kisika" o kojoj će se u nastavku govoriti, objašnjava opasnost reaktivnih kisikovih vrsta za oblike života. Implementacija novih metoda ekstrakcije s većom iskoristivošću energije i sirovine i upotreba "zelenih" otapala znatno doprinose očuvanju okoliša i energetske učinkovitosti. Voda, kao najvažnije otapalo u kombinaciji s mikrovalovima daje mnoge benefite za postizanje ovih ciljeva. Svrha ovog rada bila je optimirati parametre za ekstrakciju i naći najpogodnije uvjete za primjenu mikrovalne ekstrakcije. Nadalje, sljedeći zadatak bio je izvršiti karakterizaciju ekstrakata, odnosno odrediti ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost spektrofotometrijskim metodama. Na temelju rezultata uzoraka sa 7 različitih lokacija u Dalmaciji su izvedeni zaključci o utjecaju geografskog položaja, mikrolokacije i staništa biljke na navedena svojstva. Analizirajući podatke, uočava se da uzorci Makarske pokazuju visoke koncentracije ukupnih fenola i najveću antioksidacijsku aktivnost (1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). Uzorak Milna (o. Brač) pokazuje najveći sadržaj ukupnih fenola (947,8 mg GAE/L). Uzorci Split (Kampus) i Sinj pokazuju nešto niže vrijednosti ukupnih fenola. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima znatno utječe na svojstva ekstrakta. Neposredna blizina mora i višesatna izloženost suncu najvjerojatnije doprinose povećanju udjela bioaktivnih molekula. Time se može zaključiti kako su blizina mora i sunčeva svjetlost najvažniji čimbenici za visoku antioksidacijsku aktivnost ružmarina. Stoga ne čudi i podatak s početka ovog rada o podrijetlu imena, ružmarin, *Rossmaris*, što na latinskom jeziku znači morska rosa.

Ključne riječi: ružmarin, mikrovalna ekstrakcija, fenoli, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 56 stranica, 23 slike, 13 tablica, 2 sheme, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Marina Zekić	član
3. Izv. prof. dr. sc. Nives Vladislavić	mentor

Datum obrane: 28.8.2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate university study Food Technology
Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: assistant professor Nives Vladislavić

MODELING OF MICROWAVE EXTRACTION OF TOTAL PHENOLIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROSEMARY (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

Tea Franjić, 177

Abstract: Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) is an extremely rich source of phenolic compounds, which are responsible for its high bioactivity. In recent years, this plant has been extensively studied as a source of natural bioactive compounds due to its strong antioxidant and anti-inflammatory effects, antibacterial and antimutagenic properties and chemopreventive action. In Dalmatia, which has been rich in autochthonous medicinal plants since ancient times, rosemary is very common. Insufficient intake of antioxidants has consequences for the human body. The phenomenon of the so-called "Oxygen Paradox", which is discussed below, explains the danger posed by reactive oxygen species to living organisms. The implementation of new extraction methods with higher energy and raw material utilization and the use of "green" solvents contribute significantly to environmental protection and energy efficiency. Water as the main solvent in combination with microwaves offers numerous advantages to achieve these goals. The aim of this work was to optimize the extraction parameters and to find the most suitable conditions for the application of microwave extraction. In addition, the next task was to characterize the extracts, i.e. to determine the total phenols and antioxidant activity using spectrophotometric methods. Based on the results from 7 different locations in Dalmatia, conclusions were drawn about the influence of the geographical location, the micro-location and the habitat of the plant on the aforementioned properties. The data analysis showed that the samples from Makarska had high concentrations of total phenols and the highest antioxidant activity (1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). The sample from Milna (Brač) has the highest content of total phenols (947,8 mg GAE/L). The samples from Split (Kampus) and Sinj had slightly lower values of total phenols. Extraction assisted by microwaves significantly affects the properties of the extract. The close proximity to the sea and exposure to sunlight most likely contribute to an increase in the proportion of bioactive molecules. It can therefore be concluded that exposure to the sea and sunlight are the most important factors for the high antioxidant activity of rosemary. So, the information mentioned at the beginning about the origin of the name rosemary, *Rossamaris*, which is made up of the Latin words, is therefore not surprising.

Keywords: rosemary, microwave extraction, phenols, antioxidant activity

Thesis contains: 56 pages, 23 pictures, 13 tables, 2 schemes, 40 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Marina Zekić, PhD, assistant prof. | member |
| 3. Nives Vladislavić, PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: 28.8.2024.

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Nives Vladislavić, u razdoblju od ožujka do kolovoza 2024. godine.

ZAHVALA

Prije svega, zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nives Vladislavić koja je bila uvijek na raspolaganju za pomoć i ideje pri izradi ovog rada te je nesebično uložila svoje vrijeme i iskustvo kako bi mi prenijela znanje i vještine koje će mi biti od velike važnosti u budućnosti.

Hvala mojim prijateljima, koji su bili uz mene u svim dobrim i manje dobrim studentskim danima, usponima i padovima te svojom prisutnošću mi olakšali i uljepšali ovo razdoblje te ga učinili nezaboravnim.

Na kraju, najveću hvalu dajem svojoj obitelji, roditeljima i sestri, bez kojih ovo što sam do sada postigla ne bi bilo moguće jer su mi dali beskonačnu ljubav, sigurnost i vjeru u uspjeh te su mi bili vjetar u leđa koji me neprestano gurao naprijed od prvog dana mog studentskog putovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Modelirati i optimirati parametre mikrovalne ekstrakcije.
2. Ekstrakciju uzoraka ružmarina prikupljenih s različitih lokacija duž jadranske obale provesti iz vodenih otopina potpomognuto mikrovalovima u trajanju od 2, 5 i 10 minuta.
3. Svim ekstraktima odrediti ukupne fenole (kao ekvivalent galne kiseline) i antioksidacijsku aktivnost klasičnim spektrofotometrijskim metodama.
4. Karakterizirati uzorke prema sadržaju fenola i antioksidacijskoj aktivnosti te povući paralelu s geografskim položajem s kojeg je bilje ubrano, odnosno mikrolokacijom i uvjetima rasta.
5. Istaknuti prednosti i nedostatke mikrovalne ekstrakcije s obzirom na sadržaj fenola i antioksidacijsku aktivnost uzoraka.

SAŽETAK

Poznato je da ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*) predstavlja iznimno bogat izvor fenolnih spojeva, koji su zaslužni za njegovu visoku bioaktivnost. Posljednjih godina ova biljka se opsežno proučava kao izvor prirodnih bioaktivnih spojeva zbog snažnog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, antibakterijskih i antimutagenih svojstava te kao kemopreventivno sredstvo. U Dalmaciji, koja je od davnina bogata autohtonim ljekovitim biljkama, ružmarin je široko rasprostranjen.

Nedovoljnim unosom antioksidansa ljudski organizam snosi posljedice. Tvrdnja "Paradoks kisika" o kojoj će se u nastavku govoriti, objašnjava opasnost reaktivnih kisikovih vrsta za oblike života.

Implementacija novih metoda ekstrakcije s većom iskoristivošću energije i sirovine i upotreba "zelenih" otapala znatno doprinose očuvanju okoliša i energetske učinkovitosti. Voda, kao najvažnije otapalo u kombinaciji s mikrovalovima daje mnoge benefite za postizanje ovih ciljeva.

Svrha ovog rada bila je optimirati parametre za ekstrakciju i naći najpogodnije uvjete za primjenu mikrovalne ekstrakcije. Nadalje, sljedeći zadatak bio je izvršiti karakterizaciju ekstrakata, odnosno odrediti ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost spektrofotometrijskim metodama. Na temelju rezultata uzoraka sa 7 različitih lokacija u Dalmaciji su izvedeni zaključci o utjecaju geografskog položaja, mikrolokacije i staništa biljke na navedena svojstva. Analizirajući podatke, uočava se da uzorci Makarske pokazuju visoke koncentracije ukupnih fenola i najveću antioksidacijsku aktivnost (1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). Uzorak Milna (o. Brač) pokazuje najveći sadržaj ukupnih fenola (947,8 mg GAE/L). Uzorci Split (Kampus) i Sinj pokazuju nešto niže vrijednosti ukupnih fenola. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima znatno utječe na svojstva ekstrakta. Neposredna blizina mora i višesatna izloženost suncu najvjerojatnije doprinose povećanju udjela bioaktivnih molekula. Time se može zaključiti kako su blizina mora i sunčeva svjetlost najvažniji čimbenici za visoku antioksidacijsku aktivnost ružmarina. Stoga, ne čudi i podatak s početka ovog rada o podrijetlu imena, ružmarin, *Rossmaris*, što na latinskom jeziku znači morska rosa.

Ključne riječi: ružmarin, mikrovalna ekstrakcija, fenoli, antioksidacijska aktivnost

ABSTRACT

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is an extremely rich source of phenolic compounds, which are responsible for its high bioactivity. In recent years, this plant has been extensively studied as a source of natural bioactive compounds due to its strong antioxidant and anti-inflammatory effects, antibacterial and antimutagenic properties and chemopreventive action. In Dalmatia, which has been rich in autochthonous medicinal plants since ancient times, rosemary is very common. Insufficient intake of antioxidants has consequences for the human body. The phenomenon of the so-called "Oxygen Paradox", which is discussed below, explains the danger posed by reactive oxygen species to living organisms.

The implementation of new extraction methods with higher energy and raw material utilization and the use of "green" solvents contribute significantly to environmental protection and energy efficiency. Water as the main solvent in combination with microwaves offers numerous advantages to achieve these goals.

The aim of this work was to optimize the extraction parameters and to find the most suitable conditions for the application of microwave extraction. In addition, the next task was to characterize the extracts, i.e. to determine the total phenols and antioxidant activity using spectrophotometric methods. Based on the results from 7 different locations in Dalmatia, conclusions were drawn about the influence of the geographical location, the micro-location and the habitat of the plant on the aforementioned properties. The data analysis showed that the samples from Makarska had high concentrations of total phenols and the highest antioxidant activity (1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). The sample from Milna (Brač) has the highest content of total phenols (947,8 mg GAE/L). The samples from Split (Kampus) and Sinj had slightly lower values of total phenols. Extraction assisted by microwaves significantly affects the properties of the extract. The close proximity to the sea and exposure to sunlight most likely contribute to an increase in the proportion of bioactive molecules. It can therefore be concluded that exposure to the sea and sunlight are the most important factors for the high antioxidant activity of rosemary. So, the information mentioned at the beginning about the origin of the name rosemary (*Rossamaris*), which is made up of the Latin words, is therefore not surprising.

Keywords: rosemary, microwave extraction, phenols, antioxidant activity

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Ružmarin	2
1.2. Fenoli	4
1.3. Antioksidacijska aktivnost	6
1.4. Galna kiselina	11
1.5. Ekstrakcija	13
1.5.1. "Zelena ekstrakcija"	13
1.5.2. Mikrovalna ekstrakcija	15
1.6. Spektrofotometrija	19
1.6.1. Folin-Ciocalteu metoda	19
1.6.2. FRAP metoda	21
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. Kemikalije i priprava otopina	23
2.1.1. Mikrovalna ekstrakcija	25
2.1.2. Spektrofotometrijska mjerenja	26
2.2. Priprava i karakterizacija realnih uzoraka	26
2.3. Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola	28
2.4. FRAP metoda (eng. <i>Ferric reducing/Antioxidant power</i>) - određivanje antioksidacijske aktivnosti	30
3. REZULTATI I RASPRAVA	33
3.1. Optimiranje parametara mikrovalne ekstrakcije - Čimbenici	33
3.2. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja	41
3.3. Usporedba dobivenih rezultata – procjena utjecaja različitih parametara	47
4. ZAKLJUČCI	50
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA	52
6. LITERATURA	53

UVOD

Iako su polifenoli prisutni u gotovo svim biljkama, ružmarin predstavlja iznimno bogat izvor različitih fenolnih spojeva. Oni su ponajviše zaslužni za visoku bioaktivnost ružmarina, koja se stoljećima koristi u tradicionalnoj medicini. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je aromatična zimzelena grmolika biljka, široko rasprostranjena u Sredozemlju kao divlja kultura. Također se naširoko uzgaja u drugim regijama svijeta zbog svog bogatog mirisa i okusa. Biljka se koristi u kulinarstvu kao začim odnosno, za izmjenu ili poboljšanje okusa hrane, kao ukrasna biljka u vrtovima, kao i u narodnoj medicini.

Posljednjih godina ružmarin se opsežno proučava kao izvor prirodnih bioaktivnih spojeva zbog snažnog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, antibakterijskih i antimutagenih svojstava te kao kemopreventivno sredstvo. U Dalmaciji, koja je od davnina bogata autohtonim ljekovitim biljkama, ružmarin je široko rasprostranjen zbog odgovarajuće mediteranske klime. Spada u skupinu dalmatinskog bilja koje ima široku uporabu na tome području zbog svojih blagodati. Budući da je dalmatinsko bilje izvrstan izvor antioksidanasa, njegov unos pozitivno djeluje na ljudski organizam.

Oksidativni stres je neizbježna posljedica života u atmosferi bogatoj kisikom. Reaktivni kisikovi radikali i druge aktivirane vrste kisika nastaju kao nusproizvodi aerobnog metabolizma i izloženost raznim prirodnim i sintetskim otrovima. Tvrdnja "Paradoks kisika" o kojoj će se u nastavku detaljno govoriti, objašnjava opasnost kisika za oblike života kojima je također neophodna komponenta za proizvodnju energije.¹

Naime, oksidativni stres je tjelesno stanje koje se događa kada su razine antioksidanasa niske, a razine slobodnih kisikovih i dušikovih radikala uvećane. Posljedica je neravnoteža između reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta i antioksidanasa koja dovodi do niza opasnih stanja.

Svrha ovog rada bila je usporediti sadržaj fenola u ekstraktima različitih ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) dobivenih iz suhe biljke, procijeniti antioksidativni karakter te napraviti komparaciju utjecaja geografskog položaja i staništa biljke na navedena svojstva. Istraženi su uzorci sa 7 lokacija u Dalmaciji, uz karakterizaciju prema vremenu osunčanosti, blizini mora, količini vode i izloženosti utjecaju vjetra i prometa.

1. OPĆI DIO

1.1. Ružmarin

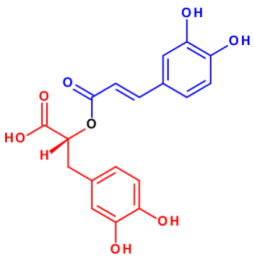
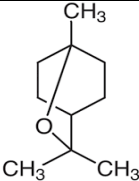
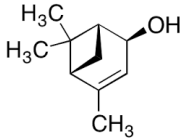
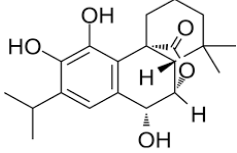
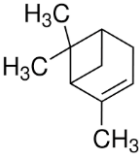
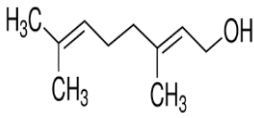
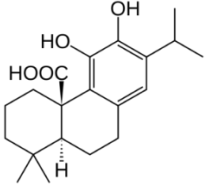
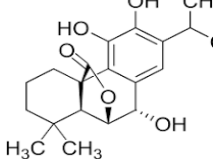
Ružmarin (*lat. Rosmarinus officinalis L.*) je aromatična biljka koja potiče iz Sredozemlja, poznata po svojim karakterističnim igličastim listovima i jakom mirisu. Ružmarin je gusta, zimzelena, izdržljiva višegodišnja aromatična zeljasta biljka visine 60-200 cm s malim (2-4 cm) šiljastim listovima (Slika 1). Gornja površina lista je glatka te tamnozeleno ili plave boje, dok je donja strana lista bijela te su listovi smolasti. Grane su krute s oštrom korom a stabljike smeđe, četvrtaste i drvenaste. Cvjetovi rastu pršljenasto i odlikuju se bijelom ili svijetloplavom bojom. Lišće, cvjetni vrhovi i grančice daju eterično ulje i uljnu smolu cijenjenu u receptima, tradicionalnoj medicini, modernoj medicini i aromaterapiji, kao i industriji parfema i aroma.²



Slika 1 Ružmarin (lat. Rosmarinus officinalis L.)³

Ružmarin se često koristi u kulinarstvu zbog svog bogatog okusa i mirisa. Budući da ime ružmarina potječe od latinskog *ros* (rosa) i *marinus* (more), ne iznenađuje podatak da ružmarin ima dugu povijest korištenja u Dalmaciji, koja je poznata po sunčanim danima i blagoj klimom koja pogoduje rastu ove biljke. U Dalmaciji, ružmarin raste u vrtovima, te se koristi u pripremi raznih jela, osobito onih koji se temelje na lokalnim namirnicama poput ribe, maslinovog ulja i povrća, gdje ružmarin daje poseban miris i okus. Osim u kulinarstvu, ružmarin se koristi i u tradicionalnoj medicini te medicini općenito, zbog svojih izraženih antioksidacijskih svojstava.

Tablica 1 Glavni sastojci ružmarina – prema topljivosti u vodi pri 25 °C.

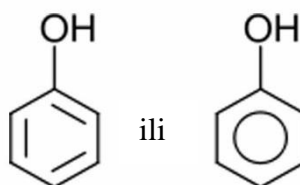
Glavni sastojci	Struktura
<p>Ružmarinska kiselina, $C_{18}H_{16}O_8$, kemijski gledano, ružmarinska kiselina je ester kafeinske kiseline (plavo), s tirozinom koji daje drugi fenolni prsten preko dihidroksifenil-mliječne kiseline (crveno). Ima molekularnu masu od $360,32 \text{ g mol}^{-1}$. Poznata po brojnim zdravstvenim učincima. Među najjačim prirodnim antioksidansima. Crveno-narančasti prah, hidrofilan, jednako topljiv u vodi i etanolu (18 mg/mL).</p>	
<p>1,8-cineol, $C_{10}H_{18}O$ ili eukaliptol je monoterpenoidna bezbojna tekućina i biciklički eter. Ima svježi miris poput kamfora i ljutkast okus koji hladi. Netopljiv ili vrlo slabo topljiv je u vodi (3,5 mg/mL), ali se miješa s organskim otapalima.</p>	
<p>Verbenol, $C_{10}H_{16}O$, (2-pin-4-ol) je skupina stereoizomernih bicikličkih monoterpenских alkohola. Utvrđeno je da su ti spojevi aktivne komponente feromona insekata i eteričnih ulja. Topljivost u vodi 3,5 mg/mL</p>	
<p>Epirosmanol - $C_{20}H_{26}O_5$, je prirodni diterpenški lakton. Epirosmanol pokazuje antikancerogeno djelovanje i inhibira biosintezu melanina protiv stanica melanoma. Slabo je topljiv u vodi, 0,8 mg/mL.</p>	
<p>α-Pinen, $C_{10}H_{16}$, je skup nezasićenih bicikličkih monoterpena. U prirodi se nalaze dva kiralna geometrijska izomera pinena, α-pinen i β-pinen. Nalaze se u borovima i nečetinarskim biljkama, kao što je i ružmarin. Topljivost u vodi 0,249 mg/100 ml.</p>	
<p>Geraniol, $C_{10}H_{18}O$, je monoterpenoid i alkohol. Primarna je komponenta ulja citronele, ulja ruže i ulja palmarose. To je bezbojno ulje, iako komercijalni uzorci mogu djelovati žuto. Slabo je topiv u vodi, 0,1 mg/mL, ali je topiv u organskim otapalima.</p>	
<p>Karnozna kiselina, $C_{20}H_{28}O_4$ je prirodni benzendiol, diterpen koji se nalazi u ružmarinu i običnoj kadulji (1,5 do 2,5%). Karnozna kiselina i karnozol, koriste se kao antioksidativni konzervansi u prehrambenim i neprehrambenim proizvodima, gdje su označeni kao "ekstrakt ružmarina" (E392). Vrlo slabo topljiva u vodi <0,1 mg/mL.</p>	
<p>Rozmanol, $C_{20}H_{26}O_5$ je prirodni polifenol iz biljke ružmarin s visokim antioksidativnim djelovanjem. Vrlo slabo topljiva u vodi <0,1 mg/mL.</p>	

Poznata antioksidacijska svojstva ružmarina igraju važnu ulogu u procesu sprječavanja nastanka slobodnih kisikovih radikala te sukladno tomu smanjuju oksidativni stres stanice. Ekstrakti ružmarina su od davnina korišteni su u liječenju bolesti, zbog svog hepatoprotektivnog potencijala, terapijskog potencijala za Alzheimerovu bolest i njegovog antiangiogenog učinka. S druge strane, koristi se i u konzerviranju hrane, jer sprječava oksidaciju i mikrobnu kontaminaciju.²

Sastav eteričnog ulja ružmarina naširoko je proučavan u svijetu u mnogim različitim regijama. Glavni sastojci 1,8-cineol ~25%, kamfor ~25% α -pinen ~20% i verbenol noseći su fenolni diterpeni odgovorni za antioksidativna svojstva ružmarina. Druge značajne komponente eteričnog ulja ružmarina koje se mogu dobiti destilacijom su borneol, bornil acetat, p-cimena, geraniol, karnozna kiselina, karnozol, rozmanol i epirosmanol. Ovi spojevi imaju potencijal za kozmetičku i farmaceutsku industriju njihove zdravstvene dobrobiti kao što su antioksidativne, antibakterijske, antiseptičke i smanjena tjeskoba.⁴

1.2. Fenoli

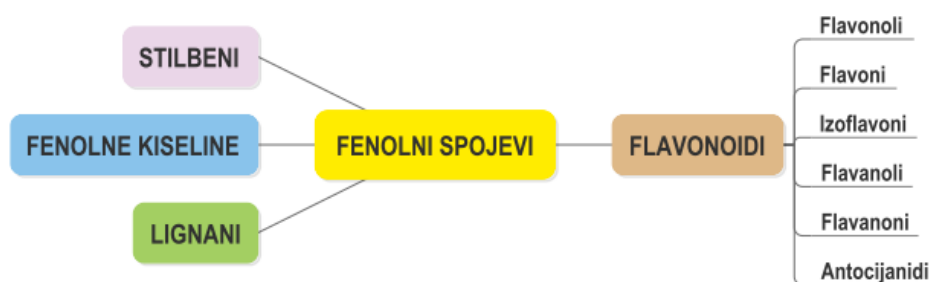
Fenoli, u organskoj kemiji označavaju skupinu spojeva karakteriziranih hidroksilnom (-OH) skupinom, izravno vezanom za ugljikov atom koji je dio aromatskog prstena. Osim što naziv fenol služi kao generalan naziv za takvu skupinu spojeva, također označava i najjednostavniji spoj unutar te skupine - fenol (C₆H₅OH).⁵ Kemijska struktura fenola, odnosno njegova benzenskog prstena, može se označavati na dva načina što je prikazano na slici 2.



Slika 2 Kemijska struktura fenola.⁶

Fenolni spojevi čine jednu od najbrojnijih i najraširenijih grupa spojeva u biljnom svijetu. S kemijskog stajališta grupa fenolnih spojeva označava spojeve s jednim ili više fenolnih prstenova, na koje je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Budući su fenoli sekundarni metaboliti, obuhvaćaju i širok spektar jednostavnih spojeva, kao što su stilbeni, polifenoli ili fenolne kiseline te polimerizirane spojeve poput kondenziranih tanina.

Fenolni spojevi se općenito dijele na monofenole i polifenole. U monofenolne spojeve se ubrajaju fenolne kiseline, fenolni alkoholi i slični spojevi, a primjeri polifenolnih spojeve su pigmenti poput flavonoida i stilbena. Navedena podjela se temelji na broju aromatskih jezgri u molekuli (Slika 3).



Slika 3 Podjela fenolnih spojeva.

Prvi predstavnik ove grupe spojeva, fenol ili karbolna kiselina, C_6H_5OH , najjednostavniji spoj iz skupine fenola, na zraku se postupno oboja u crveno, tali se pri $43^\circ C$, topljiv je u alkaljskim otopinama, alkoholu, eteru, kloroformu, sumporougljiku i vrućoj vodi. Otrovan je i djeluje baktericidno. Danas je potpuno zamijenjen sredstvima koja ne oštećuju živo tkivo i služi samo za dezinfekciju različitog pribora i sl. Velike količine karbolne kiseline i drugih fenola služe u kemijskoj industriji za pripremu mnogih aromatskih spojeva (bojila, lijekova, polimernih materijala, eksploziva, mirisa i dr.) pa je fenol jedan o najvećih zagađivača industrijskih otpadnih voda.

Fenoli se smatraju najkorisnijim fitokemikalijama današnjice zbog antioksidacijske aktivnosti kojom se odlikuju u zavidnoj mjeri. Iako su dosta slični alkoholima, stvaraju jače vodikove veze, jer hidroksilna skupina nije vezana na zasićen atom ugljika, već na aromatski prsten. Iz navedenoga razloga, fenoli se odlikuju većom topljivosti u vodi nego alkoholi i

imaju više točke vrelišta. Kiselost fenola brojčano se nalazi između kiselosti alifatskih spojeva i karboksilnih kiselina, oko milijun puta je veća od kiselosti alkohola za što je odgovorna stabilizacija fenoksidnog iona rezonancijom. Soli fenola se nazivaju fenolati i fenoksidi, te nastaju gubitkom pozitivno nabijenog atoma vodika s hidroksilne skupine fenola.⁷ Fenoli se u prirodi pojavljuju kao bezbojne tekućine ili bijele krutine na sobnoj temperaturi. Imaju niska tališta, a većinom kristaliziraju u bezbojne strukture s prizmom kao jediničnom ćelijom. To su tvari osjetljive na svjetlost i zrak, gdje stajanjem potamne. Imaju karakterističan, manje ili više oštar miris. U rastaljenom stanju su bistre, bezbojne i pokretljive tekućine. Točke taljenja i skrućivanja znatno se snižavaju vodom radi prisutne vodikove veze. Fenoli su lako topljivi u većini organskih otapala, što igra važnu ulogu pri ekstrakciji biljnog ekstrakta.

Namirnice bogate fenolnim spojevima su voće i povrće, te začini u čemu leži i upotreba navedenih namirnica kao funkcionalnih namirnica. Fenolni spojevi čine glavni kriterij kvalitete biljaka i biljnih proizvoda jer o njihovom sastavu ovise aroma, miris i okus biljke odnosno organoleptička svojstva i nutritivni sastav. Odgovorni su za organoleptičku (boja, miris, okus) i nutritivnu kvalitetu biljke. Iz tih razloga se često koriste za poboljšavanje okusa u kulinarstvu i ostalim prehrambenim granama industrije (proizvodnja alkoholnih i ostalih pića).⁴

1.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su molekule koje djeluju kao redukcijska sredstva doniranjem elektrona slobodnim radikalima, kako bi ih stabilizirali i umanjili štetu izazvanu napadom slobodnih radikala na DNK, stanice i organe tijela. Antioksidansi uključuju tvari kao što su polifenoli, flavonoidi, vitamini i enzimi poput glutation peroksidaza i superoksid dismutaza. Poznato je i kako imaju višestruke korisne učinke na zdravlje, kao na primjer smanjenje rizika od raka, bolesti srca i neurodegenerativnih poremećaja. Svi mediji nas u posljednja dva desetljeća bombardiraju o važnosti unosa antioksidansa u organizam putem voća, povrća i mnogih prirodnih proizvoda, ali i mnogobrojnih nadomjestaka ishrani.

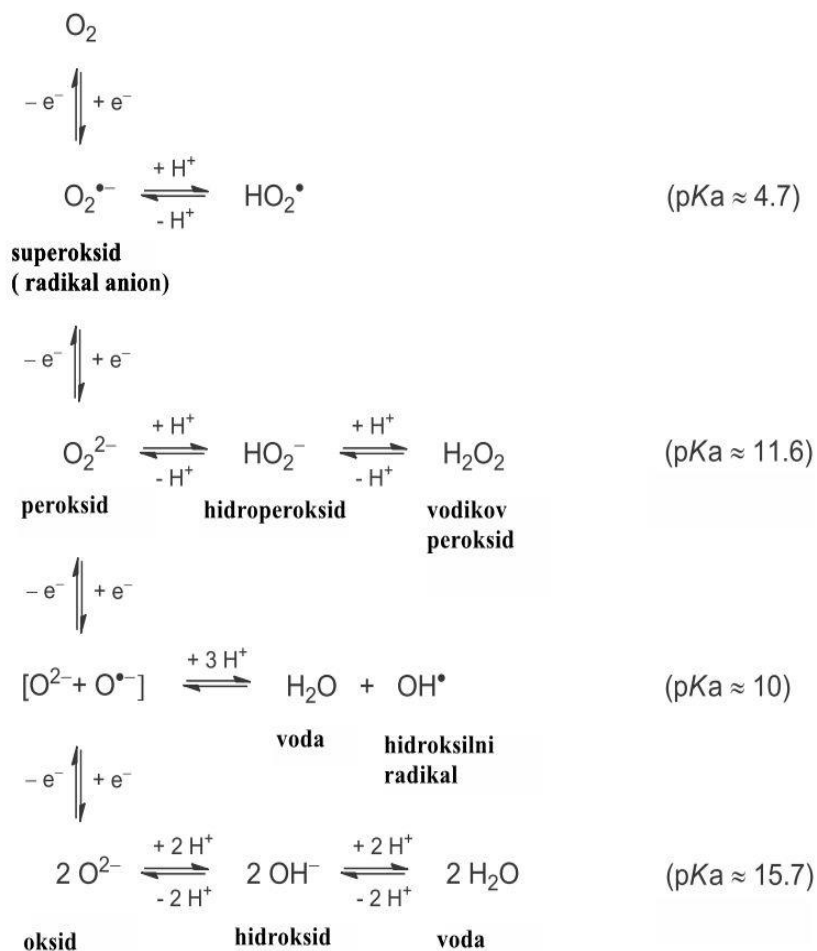
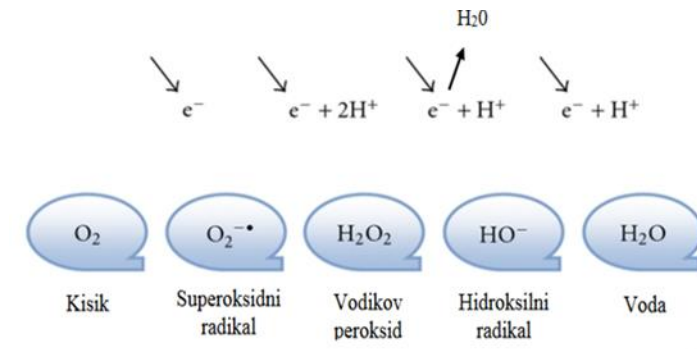
Antioksidansi (reducensi) su kemijski spojevi koji sprječavaju djelovanje oksidacije u ljudskom organizmu. Uz pojam antioksidanasa, usko su vezani pojmovi oksidativnog stresa

i slobodnih kisikovih radikala. U organizmu se stalno događaju reakcije oksidacije i redukcije (redoks-reakcije). Neravnoteža redoks-reakcija u korist oksidacije je odgovorna za promjene koje se događaju u ljudskom organizmu, poput raznih mutacija, obolijevanja, ubrzanog starenja, te na kraju i smrti. Opasnost oksidacije leži u otpuštanju reaktivnih kisikovih molekula ili spojeva (*Reactive Oxygen Species*, ROS), poznatih i kao slobodni kisikovi radikali. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim (sposobni oksidirati biološke molekule). Te visoko reaktivne molekule u suvišku oštećuju stanične strukture. U najzastupljenije reaktivne kisikove vrste, takozvane primarne radikale koji nastaju u organizmu aeroba ubrajamo superoksidni anion, hidroksilni radikal, perhidroksilni radikal i vodikov peroksid. One teže brzom stabilizaciji, pa lako reagiraju s molekulama iz svoje okoline. Tako započinju lančanu reakciju u kojoj nastaju novi radikali. Ovoj grupi još možemo dodati ozon, ozonidni radikal i kisikov atom koji nastaju u ekstremnim uvjetima kao izuzetno aktivne i štetne vrste (Tablica 2).⁸

Tablica 2 Prikaz molekula ili ionskih vrsta i pripadajućih Lewisovih struktura slobodnih radikala

Molekula ili ionska vrsta	Simbol	Struktura slobodnog radikala
Kisik	O ₂	$\cdot\ddot{O}:\ddot{O}\cdot$
Vodikov peroksid	H ₂ O ₂	$H:\ddot{O}:\ddot{O}:H$
Superoksid anion	O ₂ ^{•-}	$\cdot\ddot{O}:\ddot{O}:$
Peroksidni anion	O ₂ ^{•2-}	$:\ddot{O}:\ddot{O}:$
Hidroksidni radikal	•OH	$\cdot\ddot{O}:H$
Hidroksilni ion	OH ⁻	$:\ddot{O}:H$

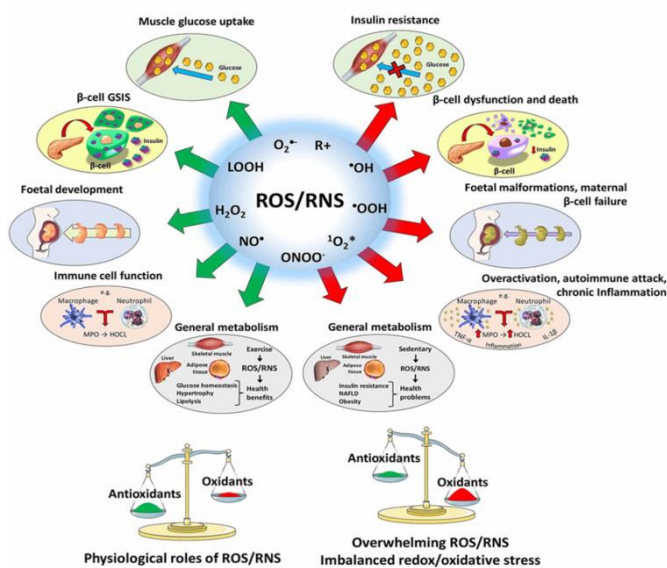
U procesu stupnjevite redukcije kisika do vode dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Stupnjevita redukcija kisika stvara slobodne radikale kisika redom kako je prikazano na slici 4, da bi u konačnici metaboličkim reakcijama prešao u vodu.⁸



Slika 4 Mehanizam nastanka vode metaboličkim procesima ⁸

Budući kako je bez kisika život nemoguć te je upravo kisik neophodan za sve fiziološke funkcije organizma, važno je naglasiti kako se kisikovi radikali stvaraju kontinuirano u metaboličkim procesima organizama aeroba i da kao takvi nisu štetni.

Problem nastaje kada zdrave stanice aerobnog organizma ne uspijevaju održati ravnotežu između stvaranja i eliminiranja slobodnih kisikovih radikala (Slika 5).



*Slika 5 ROS - reaktivni kisikovi spojevi, RNS - reaktivni dušikovi spojevi, prikaz posljedica neravnoteže.*⁹

U fenomenu prirodnog uspostavljanja takve ravnoteže u stanicama, glavnu riječ imaju upravo antioksidansi, koji omogućuju zaštitni sustav organizmu sakupljajući nesparene kisikove radikale i neutraliziraju molekule, koje su nastale. Zbog toga se ističe bitnost antioksidanasa u ljudskom organizmu, kao i preporuka za konzumacijom funkcionalne hrane koja ih sadrži u izobilju, jer na taj način se povećava sposobnost stanica za uklanjanje ROS vrsta.

Pri manjku antioksidanasa u organizmu aeroba, dolazi do „preplavlivanja“ stanica s kisikovim radikalima, odnosno do velike količine reaktivnih vrsta. Takav poremećaj u ravnoteži oksidansa i reducensa, odnosno antioksidanasa u korist oksidansa se naziva oksidativni stres (Slika 6). Oksidativni stres zapravo je neravnoteža stanične antioksidativne zaštitne obrane od pojave kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) i dušikovih reaktivnih vrsta (RNS).¹⁰



Slika 6 Ilustrativni prikaz učinka oksidativnog stresa.¹¹

Antioksidansi se mogu prirodno pojaviti u biljkama, životinjama i mikroorganizmima ili se mogu sintetizirati kemijskim putem. Više biljke i njihovi sastojci predstavljaju bogat izvor prirodnih antioksidansi, poput tokoferola i polifenola koji su nalaze se u izobilju u začinima, bilju, voću, povrću, žitaricama, sjemenkama, čajevima i uljima. Prirodni antioksidansi se mogu izolirati iz svog izvornog materijala kao čisti spojevi za moguću uporabu u nutraceutskim/farmaceutskim pripravcima. Na učinkovitost antioksidansa općenito utječe niz čimbenika, uključujući njihove strukturne značajke, koncentraciju, temperaturu, vrstu oksidacijskog supstrata i fizičko stanje sustava, kao i prisutnost prooksidansa i sinergista.¹²

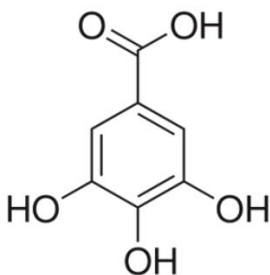
Antioksidansi igraju važnu ulogu u konzerviranju hrane inhibicijom oksidacijskih procesa i doprinose promicanju zdravlja kroz mnoge dodatke prehrani, nutraceutike i funkcionalne sastojke hrane. Antioksidacijska aktivnost može se pratiti raznim testovima s različitim mehanizmima, uključujući prijenos atoma vodika (HAT), prijenos jednog elektrona (ET), smanjenje snage i keliranje metala.¹²

Za utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti fitokemikalija koriste se mnogi testovi koji se mogu svrstati u pet kategorija:¹³

- CUPRAC, FRAP te Colin-Ciocalteu metode (prijenos elektrona između antioksidansa i supstrata)
- ORAC i TRAP metode (prijenos atoma vodika s antioksidansa na supstrat)
- DPPH i TEAC metode (mehanizmi prijenosa atoma vodika u 2 koraka)
- metoda određivanja željezo-kelirajuće aktivnosti (kelacija antioksidansa s prijelaznim metalima, kao što su Cu(II) i Fe(II))
- FTC, TBA, HORAC i SRSA/SOD metode (sprečavanju ili smanjenju oksidacije lipida te čišćenje RNS-a i ROS-a)

1.4. Galna kiselina

Galna kiselina, kao član fenola, pripada grupi organskih kiselina koje sadrže hidroksilnu skupinu (-OH) direktno povezanu s aromatskim benzenskim prstenom. Bezbojna ili blago žuta kristalna krutina, gledano s kemijskog stajališta sadrži tri hidroksilne skupine (3,4,5-trihidroksibenzoinska kiselina), što je čini polifenolom. Osim hidroksilnih, sadrži i jednu karboksilnu skupinu (-COOH), što je svrstava u glavne fenolne kiseline (Slika 7). Galna kiselina se kao sekundarni metabolit ističe snažnom antioksidacijskom aktivnošću, pokazuje protuupalna i antimikrobna svojstva potencijalno antikancerogeno djelovanje. Može se pronaći u raznim prehrambenim proizvodima, posebno voću i povrću, a biosintetizira se iz šikiminske kiseline, koju proizvode biljke i gljive.¹⁴

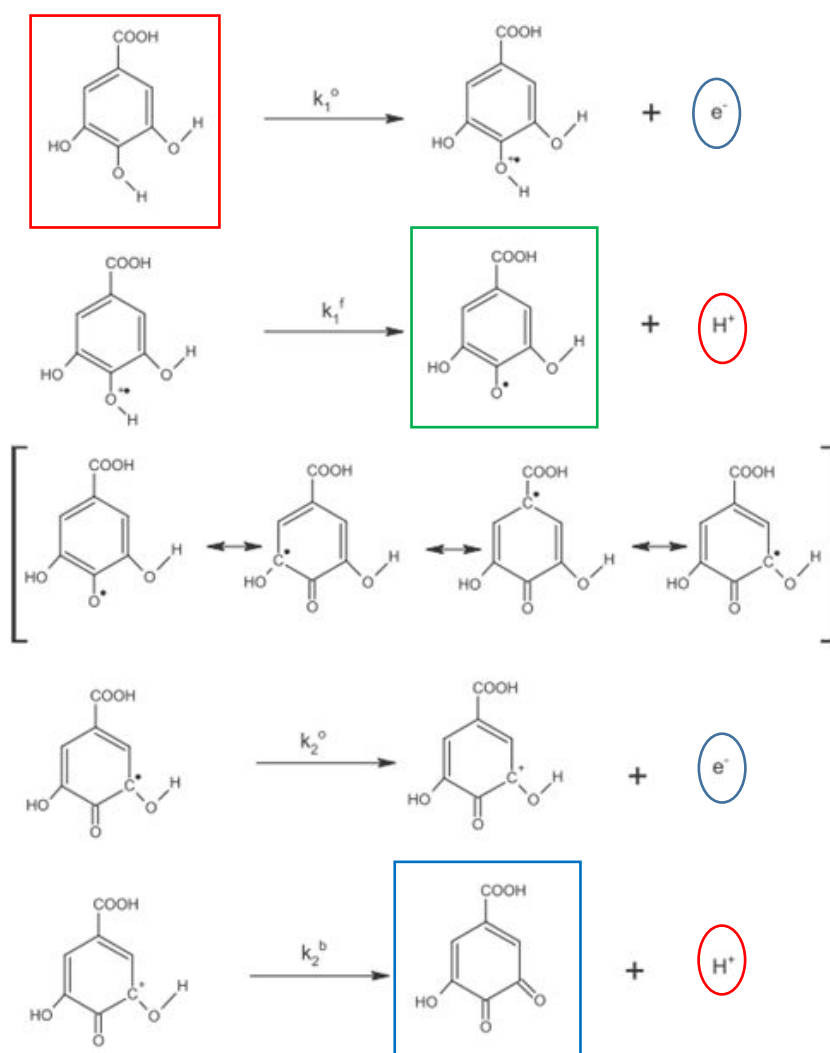


Slika 7 Kemijska struktura galne kiseline¹⁵

Galna kiselina je topiva u vodi, alkoholu, eteru i glicerolu, a netopljiva u benzenu i kloroformu. Industrijski se proizvodi kiselom hidrolizom taninske kiseline ili razgradnjom taninske kiseline pomoću tanaze. Tanaza je enzim kojega proizvode različiti mikroorganizmi, posebice gljive rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, uglavnom procesom fermentacije. Galna kiselina vezana je na proteine i minerale poput kalcija, cinka i željeza te ima utjecaj na apsorpciju tih elemenata. Količina galne kiseline prisutna u biljkama varira ovisno o vanjskim faktorima, kao što su mikrobna kontaminacija, izloženost zračenju i uvjeti skladištenja. Ekstrakcija iz prirodnih izvora moguća je korištenjem polarnih otapala kao što su etanol, metanol, voda ili njihove smjese.¹⁴

Oksidacija galne kiseline je dvoelektronska/dvoprotonska reakcija, što je vidljivo na slici 8, gdje je prikazan detaljni mehanizam oksidacije jednog polifenola. Reakcija ovisi o nizu faktora, koji uzrokuju stvaranje produkata oksidacije i niza međuprodukata. Galna kiselina (crveni pravokutnik) u prvom stupnju daje semikinonski radikal (zeleni

pravokutnik), a u drugom kinon (plavi pravokutnik). Reakcija govori u prilog jačini fenola kao reducensa, ali ta jačina ipak ovisi o uvjetima. Međuprodukti koji nastaju su odgovorni za drugi stupanj reakcije. Ako uvjeti ne omoguće nastanak međuprodukata, reakcija ne ide do kinona koji je stabilno produkt oksidacije galne kiseline.¹⁶



Slika 8 Mehanizam oksidacije galne kiseline¹⁶

1.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak kojim se potpuno ili djelomično razdvajaju tvari koje imaju različitu topljivost u različitim otapalima. U ovom postupku, smjesa tvari se tretira odgovarajućim otapalom kako bi se izdvojila komponenta koja se lakše otapa, formirajući otopinu. Tvar koja se ekstrakcijom izdvaja iz biomaterijala prelazi u otopinu. Da bi se ta tvar izdvojila u čistom obliku, otopina se može ispariti ili kristalizirati ili se mogu primijeniti oba procesa istovremeno. Mnogo češća metoda izdvajanja je izravno fizikalno odvajanje ostatka biomaterijala od otopine postupkom filtracije, centrifugiranja, taloženjem ili dekantiranjem (bistrenjem).

1.5.1. “Zelena ekstrakcija“

“Zelena ekstrakcija“ se odnosi na proces ekstrakcije ili proizvodnje koji je održiv, ekološki prihvatljiv i manje štetan za okoliš u usporedbi s tradicionalnim metodama. To može uključivati korištenje obnovljivih izvora energije, smanjenje korištenja kemikalija ili njihovu zamjenu ekološki prihvatljivijim alternativama, te smanjenje otpada i emisije stakleničkih plinova. U mnogim industrijama, uključujući prehrambenu, kozmetičku, farmaceutsku i energetska, sve veća svijest o održivosti potiče razvoj i primjena zelenih tehnologija, uključujući i zelenu ekstrakciju.¹⁷

Opća definicija zelene kemije je *izum, dizajn i primjena kemijskih proizvoda i procesa za smanjenje ili uklanjanje uporabe i stvaranja opasnih tvari*. Zelena ekstrakcija se temelji na šest načela ekstrakcije prirodnih proizvoda:¹⁷

1. *Inovacija odabirom sorti i korištenje obnovljivih biljnih izvora*
2. *Korištenje alternativnih otapala, uglavnom vode ili agrootapala*
3. *Smanjenje potrošnje energije uporabom energije i korištenjem inovativnih tehnologija*
4. *Proizvodnja ko-proizvoda umjesto otpada uključujući bio- i agro-rafiniranje industrija*
5. *Prednost sigurnim i kontroliranim procesima*
6. *Ciljan nedenaturirani i biorazgradivi ekstrakt bez kontaminanata*

Načela su identificirana i opisana ne kao pravila, već više kao inovativni primjeri koje uspješno primjenjuje svaka grana industrije.

Tradicionalna, organska otapala pridonose efektu staklenika i uzrokuju zagađenje okoliša zbog svoje toksičnosti, isparljivosti i zapaljivosti. Kako bi se umanjili ti negativni učinci, industrija istražuje upotrebu zelenih otapala, poznatih kao "bio-otapala", koja su neškodljiva, nezapaljiva, biorazgradiva te učinkovito otapaju tvari. Najčešću primjenu pri provedbi zelene ekstrakcije imaju sljedeća bio-otapala: ¹⁷

- **Etanol** je obnovljivi izvor koji se dobiva fermentacijom biljnih sirovina poput kukuruza, šećerne trske ili celuloze. Koristi se u ekstrakciji biljnih spojeva poput fitokemikalija ili ulja ($t_v = 78,37^\circ\text{C}$)
- **Glicerin** je bezbojna, bezmirisna tekućina koja se koristi kao otapalo u ekstrakciji biljnih spojeva. Može se dobiti iz biljnih ulja i masti te se smatra sigurnim za upotrebu. ($t_v = 290^\circ\text{C}$)
- **Voda** - u nekim slučajevima, ekstrakcija se može provoditi samo vodom, posebno za ekstrakciju vodotopivih spojeva ili za ekstrakciju pod visokim tlakom i temperaturom. ($t_v = 100^\circ\text{C}$)
- **Superkritični ugljikov dioksid (CO₂)** je često korišten jer je ekološki prihvatljiv, eliminira nastanak toksičnih ostataka i ne doprinosi globalnom zagrijavanju. Također je siguran za upotrebu u proizvodnji hrane i farmaceutskih proizvoda

Etanol je najčešće biootapalo koje se dobiva fermentacijom materijala bogatih šećerom, kao što su šećerna repa i žitarice. Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, etanol se koristi u velikim količinama, jer je lako dostupan, visokog stupnja čistoće te ima nisku cijenu i potpuno je biorazgradiv. Polarna priroda vode također omogućuje njenu upotrebu kao ekstrakcijskog otapala za prirodne tvari topive u vodi kao što su proteini, šećeri, organske kiseline i anorganske tvari. Ekstrakcija toplom vodom pod tlakom (PHWE) ili subkritičnom vodom jedna je od najperspektivnijih modernih tehnika i metoda zelene ekstrakcije, posebno u dinamičkom načinu rada. Izvanredna značajka ove tehnike je laka manipulacija dielektričnom konstantom (ϵ_r) vode, koja se može natjerati da varira u širokom rasponu samo promjenom temperature i tlaka. Dakle, pri temperaturi i tlaku okoline voda ima dielektričnu konstantu od cca. 80, što je čini izuzetno polarnim otapalom.¹⁷

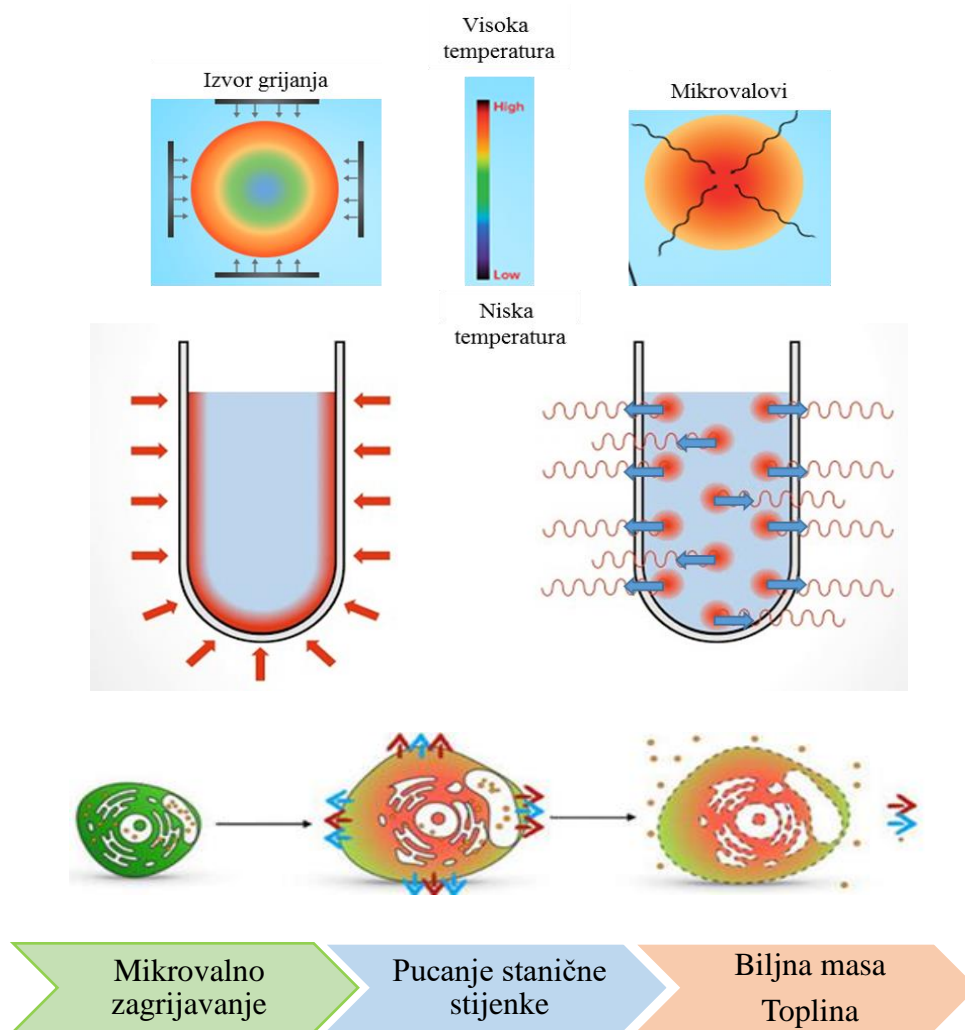
1.5.2. Mikrovalna ekstrakcija

Posljednjih su godina tehnike potpomognute ekstrakcije poput ultrazvuka i mikrovalne tehnike postale vrlo popularne za ekstrakciju polifenola. Obično tradicionalna tehnika zahtjeva duže vrijeme ekstrakcije, stoga postoji ozbiljan rizik od toplinske degradacije za većinu fitosastojaka biljke koja se ekstrahira. Činjenica da jedna biljka može sadržavati do nekoliko tisuća sekundarnih metabolita stvara potrebu za razvojem ekstrakcija visokih performansi i velike brzine.¹⁸ Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ili mikrovalna ekstrakcija, MVE, (*Microwave Assisted Extraction*) kombinira brzo zagrijavanje u mikrovalnom polju s tradicionalnom ekstrakcijom otapalom. Poboljšanje procesa ekstrakcije leži u činjenici da se otapalo ili uzorak brzo zagrijavaju izravnom interakcijom s elektromagnetskim zračenjem. Izravna interakcija s elektromagnetskim zračenjem omogućuje do 20-30 puta brže zagrijavanje nego u konvencionalnim sustavima, što omogućuje značajnu uštedu vremena. Općenito, prednosti ovakvog tipa ekstrakcije uključuju smanjeno vrijeme ekstrakcije, manju potrošnju otapala i veće prinose.

U slučaju ekstrakcije ružmarina, mikrovalovi se najviše koriste u destilaciji vodenom parom za dobivanje eteričnih ulja. MVE različitih biljnih vrsta provodi se i korištenjem smjesa otapala, metanol-voda, aceton-voda, etilacetat-voda i etanol-voda koje su prethodno primjenjivane za ekstrakciju ukupnih polifenola.¹⁹

Mikrovalovi koji se koriste su neionizirajući elektromagnetski valovi s rasponom frekvencija između 300 MHz i 300 GHz, a snagom od 500 W do 1000 W. Međutim, mikrovalne frekvencije od 915 MHz i 2450 MHz su dvije najistraživanije i najkorištenije frekvencije za grijanje. Za analitičke svrhe, a i u svrhe zagrijavanja hrane najviše se primjenjuje 2450 MHz frekvencija mikrovalova. Mikrovalovi se sastoje od dva oscilirajuća okomita polja, električnog i magnetskog polja. U ovom slučaju, električno polje je odgovorno za zagrijavanje. Za razliku od konvencionalnog grijanja koje ovisi o kondukciji i konvekciji pri čemu se na kraju veliki dio toplinske energije gubi u okoliš, u slučaju MVE zagrijavanje se događa ciljano i selektivno, pri čemu se ne gubi toplina u okoliš, jer se zagrijavanje odvija u zatvorenom sustavu.²⁰ Ovaj jedinstveni mehanizam zagrijavanja može značajno smanjiti vrijeme ekstrakcije. Poseban uređaj, magnetron, proizvodi mikrovalno zračenje određene frekvencija i snage. Energiju mikrovalnog zračenja apsorbiraju molekule vode sadržane u

preparatu koji se podvrgava ekstrakciji. Primljena energija mikrovalnog zračenja izaziva brze vibracije molekula vode u hrani, pri čemu nastupa zagrijavanje vode unutar namirnica, odnosno radi na principu unutarnjeg zagrijavanja uzorka vlastitom sadržanom vodom, za razliku od klasičnog zagrijavanja koje grije okolnu vodu i izaziva velike gubitke energije i topline (Slika 9).



Slika 9 Klasična vs. mikrovalna metoda zagrijavanja sa smjerom grijanja, temperaturnim profilom grijanog materijala i shemom promjena u stanici.

U **Tablici 3** dan je prikaz elektromagnetskog spektra obzirom na jakost elektromagnetskoga zračenja kao funkcije njegove frekvencije, odnosno valne duljine, gdje je vidljivo kako su vrijednosti energije ove vrste zračenja izrazito niske.

Tablica 3 Elektromagnetski spektar - prikaz jakosti elektromagnetskoga zračenja kao funkcije njegove frekvencije, odnosno valne duljine.

Naziv valova	Valna duljina	Frekvencija (Hz)	Energija fotona (eV)
Gama-čestica	< 0,02 nm	> $15 \cdot 10^{18}$	> 62,1 keV
Rendgenske zrake	0,01 nm - 10 nm	30×10^{18} - 30×10^{15}	124 keV - 124 eV
UV zračenje	10 nm - 400 nm	30 PHz - 750 THz	124 eV - 3 eV
Vidljiva svjetlost	390 nm - 750 nm	770 THz - 400 THz	3,2 eV - 1,7 eV
IR zračenje	750 nm - 1 mm	400 THz - 300 GHz	1,7 eV - 1,24 meV
Mikrovalovi	1 mm - 1 m	300 GHz - 300 MHz	1,24 meV - 1,24 μeV
Radio valovi	1 m - 100 km	300 MHz - 3 kHz	$1,24 \mu\text{eV} - 1,24 \times 10^{-11} \text{ eV}$

Raspršivanje elektromagnetske energije u mikrovalnim sustavima je kontrolirano Maxwellovom jednadžbom.²¹ Na njega utječu konformacije sustava i granice između tretiranih materijala i preostalog prostora kaviteta. Dielektrična svojstva analiziranih biomaterijala ključni su parametri svojstava Maxwellovih jednadžbi. "Rotacija dipola i ionska kondukcija" dva su ključna mehanizma kroz koji se prenosi energija u slučaju primjene mikrovalova. Dipolna rotacija dovodi do prekida slabih vodikovih veza što uzrokuje nastanak naknadne topline koja će se osloboditi. Ionska kondukcija odnosi se na elektroforetsku migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja, što dovodi do povećanog ulaska otapala i kretanja ciljanih ionskih analita.²⁰ Biomolekule se učinkovito oslobađaju u slučaju MVE, što se pripisuje porastu tlaka u biološkim tkivima. Naknadno puca stanični matriks i ovojnica i povećava se poroznost, što vodi do povećanog kretanja otapala i analita. Kombiniranom mikrovalnom ekstrakcijom s odabranim zelenim otapalima mogu se postići izvanredni rezultati ekstrakcije bioaktivnih tvari iz različitih vrsta uzoraka.

Manipuliranjem parametara MVE (temperatura, snaga, tlak...) znatno se mijenjaju svojstva otapala, povećava topljivost i omogućava ekstrakcija teško topljivih spojeva. Brza i učinkovita ekstrakcija, mala potrošnja otapala, varijacije otapala koje nude stabilnost za termolabilne sastojke su samo neke od atraktivnih značajki ove tehnike ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, koja je svoj veliki zamah u upotrebi u analitičke svrhe doživjela u zadnjem desetljeću. Pregledom literature možemo naići na jedan zanimljiv rad iz 2007. godine, gdje su Mandel i suradnici istražili primjenu MVE i tada naišli na tek nešto

više od 50 radova s tom tematikom. Iz rezultata su dali pregled važnih značajki za ekstrakciju primjenom mikrovalova.²⁰

Pregledom Scopus baze podataka u svim poljima znanosti taj broj od početka primjene, 1994. g do 2007. g iznosio je 540 radova. Danas se ta brojka radova s primjenom MVE popela na približno 5000 prema istoj bazi, a primjena je zastupljena u skoro svim granama znanosti, industrije, tehnologije i edukacije. Rasprave o glavnim parametrima koji utječu na učinkovitost ekstrakcije su i danas vrlo popularne, jer svaki segment ekstrakcije je potrebno učiniti ekonomski i ekološki prihvatljivijim. Godine 1975., Abu-Samra et al. bili su prvi istraživači koji su ikada koristili mikrovalnu kućnu pećnicu u laboratoriju, ekstrakcijom metala iz bioloških uzoraka. Trebalo je gotovo čak 10 godina da bi se prva publikacija pojavila 1986. Ganzler i sur. razvili su protokole ekstrakcije za lipide, ne-nutritivne tvari i pesticide iz tla, sjemenke i hranu te preporučuju nekoliko mililitara otapala, a ekstrakcija u trajanju od 30 s se ponavlja 7 puta u kućnoj pećnici. Od tada su mikrovalne metode ekstrakcije razvijene za različite vrste uzoraka kao što su biljke, biološke, okolišne, geološke i metalne matrice.^{20, 22, 23}

U osnovi postoje dvije vrste komercijalno dostupnih MVE sustava: zatvoreni i otvoreni sustavi mikroekstrakcije.^{24, 25}

Prednosti zatvorenih sustava:

- A. Mogu postići više temperature od otvorenih sustava, zbog povećanog tlaka unutar posude povisuje se vrelište korištenih otapala. Više temperature smanjuju vrijeme potrebno za tretman mikrovalovima.
- B. Nema gubitka hlapljivih tvari tijekom ekstrakcije.
- C. Potrebno je manje otapala. Budući da ne dolazi do isparavanja, nema potrebe za stalnim dodavanjem otapala, a izbjegnuto je i rizik od kontaminacije.
- D. Pare koje nastaju tijekom ekstrakcije se nalaze unutar posude.

Nedostatci zatvorenih sustava:

- A. Visoki tlakovi koji se koriste predstavljaju sigurnosni rizik (eksploziju).
- B. Količina uzorka koji se može obraditi je ograničena.

- C. Uobičajeni sastavni materijal posude, PTFE (politetrafluoroetilen), ne dopušta visoku temperaturu.
- D. Postupak u jednom koraku isključuje dodavanje reagensa ili otapala tijekom rada.
- E. Posuda se mora ohladiti prije otvaranja nakon tretmana kako bi se izbjegao gubitak hlapljivih sastojaka.

Prednosti otvorenih sustava:

- A. Uz atmosferski tlak ekstrakcija može biti još učinkovitija nego u zatvorenom sustavu.
- B. Povećana sigurnost proizlazi iz rada u atmosferskim uvjetima tlaka.
- C. Mogućnost dodavanja reagensa u bilo kojem trenutku ekstrakcije.
- D. Mogućnost korištenja posuda izrađenih od različitih materijala, uključujući PTFE, staklo i kvarc.
- E. Lakoća kojom se može ukloniti višak otapala.
- F. Mogućnost obrade velikih uzoraka.
- G. Nepostojanje bilo kakvog zahtjeva za hlađenjem ili depresurizacija.
- H. Niska cijena potrebne opreme.
- I. Sposobnost prolaska kroz cikluse ispiranja (kvantitativno uklanjanje ciljnih vrsta).
- J. Potpuno automatski rad.
- K. Prikladniji za termolabilne vrste, jer koristi niske temperature u odnosu na zatvorene sustave.

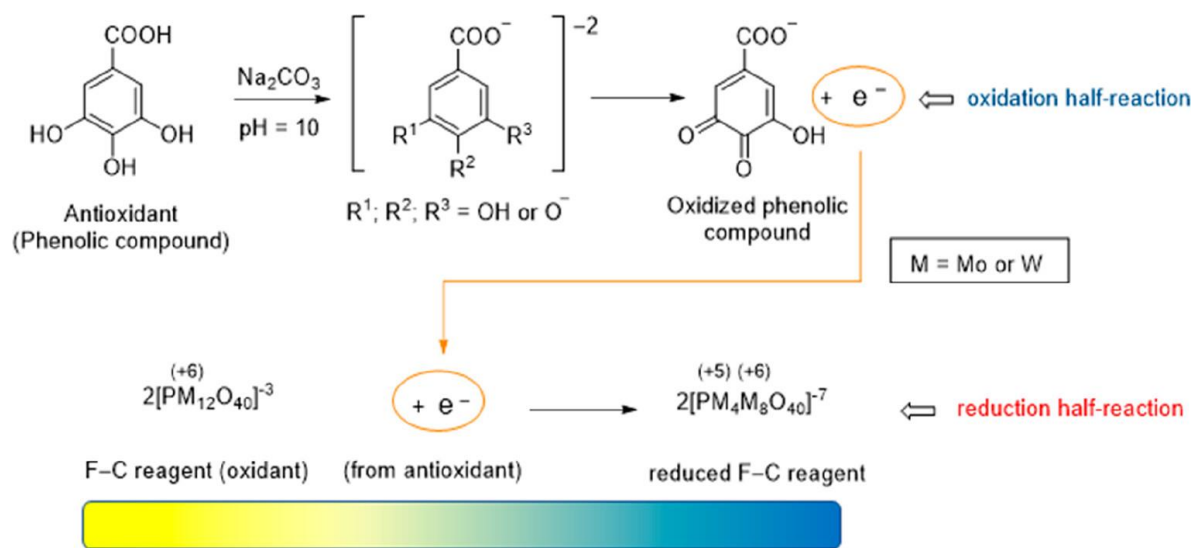
Nedostatci otvorenih sustava:

- A. Metode koje slijede obično su manje precizne od ovih razvijen korištenjem sustava zatvorenih posuda.
- B. Protok uzorka je niži, kod većine otvorenih sustava ne može obraditi više uzoraka istovremeno, dok sustavi zatvorenih posuda mogu obraditi 8-14 uzoraka odjednom.
- C. Radna vremena potrebna za dobivanje rezultata sličnih onima zatvorenih sustava obično su duža.

1.6. Spektrofotometrija

1.6.1. Folin-Ciocalteu metoda

Folin-Ciocalteuova metoda je poznat način određivanja ukupnog sadržaja fenola. Navedena metoda spada u spektrofotometrijske metode i temeljena je na oksidaciji fenolnih spojeva dodatkom Folin-Ciocalteu (F-C) reagensa, čime nastaju obojeni produkti.²⁶ Primjenom ove metode fenolne grupe oksidiraju se do kinona. Molibdofosfatni i volframfosfatni anioni koji potječu iz F-C reagensa se reduciraju. Reducirani produkti ove metode su prepoznatljivi po stabilnom plavom obojenju. Plavo obojenje je zapravo plavi kromofor maksimalne apsorpcije 765 nm, dok je nereducirani F-C reagens žute boje. Važno je naglasiti kako je reakciju potrebno provoditi u alkalnom mediju (Slika 10).



Slika 10 Redukcija F-C reagensa²⁷

Folin-Ciocalteuov test naširoko je korišten u području biomedicine i nutricionizma. Predstavlja glavni način za kvantitativno određivanje ukupnih fenola u biljnim tkivima, hrani biljnog podrijetla te biološkim uzorcima, pri čemu se galna kiselina koristi kao referentni standard. Međutim, rezultati sadržaja ukupnih fenola mogu se izražavati i kao ekvivalentni katehini, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina ili ferulna kiselina, što zahtjeva standardizaciju uzoraka. Iz toga razloga, u literaturi se za metodu koju su razvili znanstvenici Otto Folin i Vintil Ciocalteu davne 1927. godine može naći i naziv *Metoda ekvivalencije galne kiseline* (GAE). Metoda je izvorno osmišljena za analizu proteina, no kasnije je prihvaćena kao metoda za analizu fenolnih komponenti u vinu. Nakon toga je navedena

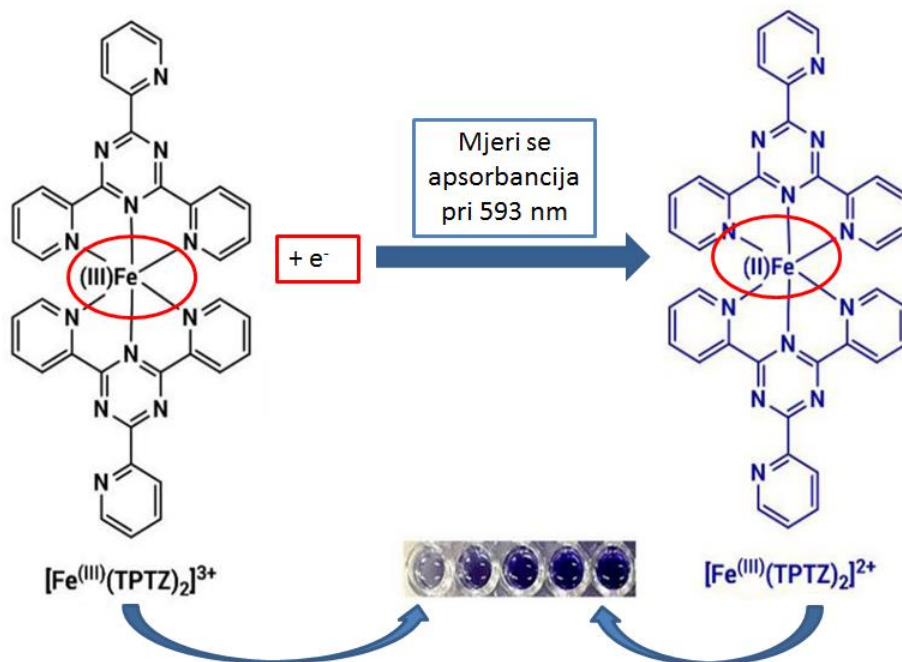
metoda postala standardna rutinska metoda u procjeni antioksidanasa u hrani i biljnim ekstraktima.¹³

Jednostavnost, osjetljivost, kratko trajanje postupka, prilagodljivost i niska cijena korištenih reagensa opravdava široku primjenu F-C metode u raznim područjima znanosti. Međutim, postoji nekoliko nedostataka koje treba uzeti u obzir prilikom primjenjivanja F-C metode, od kojih su izraženi osjetljivost na pH, temperaturu i neželjena oksidacija. Ovi nedostaci ukazuju na to da, iako je Folin-Ciocalteu metoda korisna za određivanje ukupnog fenolnog sadržaja, treba je koristiti s određenim razumijevanjem njenih ograničenja.

1.6.2. FRAP metoda

FRAP metoda (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) je kolorimetrijska metoda koja se koristi za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. Ova metoda se često koristi u analizi hrane, pića, lijekova, čajeva, začinskog bilja, bioloških tekućina te ekstrakata biljaka. Metoda se pokazala učinkovitom pri procjeni sposobnosti bioloških tvari za neutralizaciju slobodnih radikala i uklanjanje štete izazvane oksidativnim stresom. Također, ovom metodom se utvrđuju i učinci obrade, genetske modifikacije i uvjeta skladištenja prehrambenih proizvoda. Služi za procjenu antioksidacijske aktivnosti u biološkim tekućinama, hrani i ekstraktima biljaka, za istraživanje učinka skladištenja, obrade i genetske modifikacije prehrambenih proizvoda, za kontrolu kvalitete i razvoj proizvoda, te za usporedbu antioksidacijskog sadržaja u hrani, lijekovima, tradicionalnim lijekovima, čajevima, začinskom bilju, začinicima i dr. Također ju je moguće koristiti za otkrivanje onečišćene vode i proučavanje učinka onečišćenja, zračenja i klimatskih promjena na žive organizme.¹³

FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije FRAP reagensa kojeg čine TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), koji s željezom(III) daje kompleks žutog obojenja (Slika 11). U prisutnosti antioksidansa žuti kompleks prelazi u intenzivno plavi željezov(II) kompleks u kiseloj sredini. Kao alternativni ligand umjesto TPTZ može se koristiti i ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline), koji služi za procjenu reducirajuće moći askorbinske kiseline. FRAP metodom se događa sljedeća reakcija:



Slika 11 Redukcije FRAP reagensa.

U novije vrijeme, kalijev fericijanid je najčešće korišten željezni reagens u FRAP testovima umjesto otopine željezova(III) klorida. Za razliku od F-C metode, FRAP metoda se odvija u kiselom acetatnom mediju (pH=3,6). Razlog tome leži u zadržavanju dobre topljivosti željeza. Reakciji pogoduje što niža pH vrijednost, jer se tako smanjuje ionizacijski potencijal koji pokreće prijenos elektrona odnosno povećava redoks potencijal što za posljedicu ima dodatni pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta doprinosi redoks potencijal reakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ koji iznosi 0,77V, te svi spojevi koji imaju niži redoks potencijal i ulaze u reakciju redukcije željeza. FRAP test je jednostavan, brz i isplativ te ne zahtijeva specijaliziranu opremu.¹³

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i priprava otopina

U Tablici 4 su navedene kemikalije korištene za pripravu otopina prilikom izvedbe eksperimenta. U Tablici 5 prikazane su priređene otopine.

Tablica 4 Korištene kemikalije

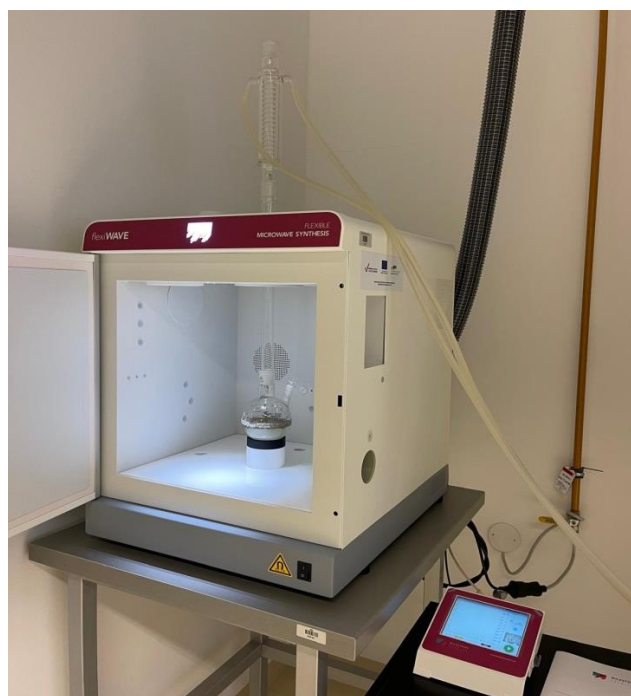
Kemikalija	Molekulska formula	Dobavljač
Dušična kiselina (65%)	HNO ₃	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Klorovodična kiselina (36%)	HCl	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
Octena kiselina (99,8 %)	CH ₃ COOH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Etanol (96%)	C ₂ H ₅ OH	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Galna kiselina	C ₇ H ₆ O ₅	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Natrijev klorid	NaCl	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Kalijev klorid	KCl	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Natrijev karbonat	Na ₂ CO ₃	GRAM-MOL d.o.o., Zagreb
Folin-Ciocalteu reagens		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin)		SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

Tablica 5 Priprema otopina

Otopina	Koncentracija i volumen	Potrebno
Otopina dušične kiseline Za čišćenje posuđa	0,5 mol dm ⁻³ 1 dm ³	34,62 cm ³ konc. HNO ₃ (W = 65%)
Otopine galne kiseline Standard za ukupne fenole	0,01 mol dm ⁻³ 25 cm ³	0,17 g galne kiseline
Otopine klorovodične kiseline Za pripremu TPTZ	0,040 mol dm ⁻³ 1 dm ³	3,4365 cm ³ konc. HCl (W = 36%)
Acetatni pufer pH= 3,6 Za pripremu FRAP reagens	0,3 mol dm ⁻³ 1 dm ³	U odmjernu tikvicu od 1 dm ³ otopiti 3,1 g natrijevog acetata, CH ₃ COONa×3 H ₂ O i 16 cm ³ koncentrirane octene kiseline, CH ₃ COOH.
Otopina željezova(III) klorida Za pripremu FRAP reagensa	0,020 mol dm ⁻³ 0,10 dm ³	551,6 mg željezo(III) klorida (FeCl ₃ × 6 H ₂ O).
Matična otopina standarda Fe²⁺ Standard za antioksidacijsku aktivnost	0,10 mol dm ⁻³ 0,10 dm ³	2.7801 g željezova(II) sulfata (FeSO ₄ × 7H ₂ O). Od nje su dalje pripravljene otopine različitih koncentracija Fe ²⁺ iona, od 100-1000 μmol dm ⁻³ .
Zasićena otopina natrijeva karbonata		100 g bezvodnog natrijevog karbonata (Na ₂ CO ₃) i 500 cm ³ vode Sol otopiti kuhanjem, ohladiti na sobnoj temperaturi i filtrirati nakon 24 sata.
Otopina TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin) Za pripremu FRAP reagensa		159,4 mg TPTZ-a otopiti u 50 cm ³ 0,040 mol dm ⁻³ klorovodične kiseline.
Priprema radnog FRAP reagensa		FRAP reagens pripravlja se svaki put neposredno prije mjerenja miješanjem 50 cm ³ (pH=3,6= 0,3 mol dm ⁻³) acetatnog pufera, 5,0 cm ³ otopine TPTZ-a i 5,0 cm ³ otopine FeCl ₃ × 6 H ₂ O.

2.1.1. Mikrovalna ekstrakcija

Za mikrovalnu ekstrakciju korišten je uređaj Milestone flexiWAVE prikazan na slici 12. Korišten uređaj opremljen je s dva magnetrona od 950 W, što čini ukupnu snagu od 1900 W i svrstava ga među najjače dostupne uređaje trenutno u svijetu za mikrovalnu ekstrakciju i organske i anorganske sinteze. Velika snaga u kombinaciji s difuzorom omogućuje vrlo brzo i homogeno zagrijavanje uzoraka. Homogenost zagrijavanja je dodatno pospješena magnetnim mješalom. Pomoću ovog uređaja, izuzetni rezultati se dobivaju već nakon nekoliko minuta ekstrakiranja, za razliku od obične ekstrakcije, gdje se slabiji rezultati dobiju tek nakon nekoliko sati ekstrakiranja. Milestone flexiWAVE ima niz iznimnih performansi i inovacija, kao što su: kapacitet od 70 litara, najnapredniji reakcijski senzori za kontrolu reakcije, mikrovalna homogenost polja, magnetsko miješanje, optički i infracrveni senzori za kontrolu visoke temperature (do 300 °C) i kontrolu visokog tlaka. Također, svi parametri reakcije mogu se modificirati "u hodu", čime se osigurava najveća fleksibilnost rada.



Slika 12 Milestone flexiWAVE

2.1.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Za spektrofotometrijska mjerenja korišten je spektrofotometar Cary 5000 UV-Vis-NIR (Slika 13) uređaj visokih performansi s vrhunskim fotometrijskim značajkama. Uređaj omogućava mjerenje apsorpcijskih i transmisijskih spektara tekućih i praškastih uzorka u području od 175 do 3300 nm valne duljine. Mjerenja su provedena u području valnih duljina vidljive svjetlosti i ovisno o metodi, na određenim fiksnim valnim duljinama. Cary WinUV software je korišten za analizu dobivenih podataka. Sva mjerenja su rađena u kvarcnim kivetama širine 1 cm.



Slika 13 Cary 5000 UV-Vis-NIR uređaj

2.2. Priprava i karakterizacija realnih uzoraka

Prikupljeno je ukupno 7 uzoraka s različitih lokacija Dalmacije: Makarska, Zadar, Sinj, Milna (otok Brač), Imotski, Split (Kampus) i Kaštel Kambelovac. Na slici 14 navedene lokacije su prikazane na karti Hrvatske.

Sav prikupljeni i analizirani ružmarin je iste vrste, *Rosmarinus officinalis*, uspravni ružmarin. Svi uzorci su brani u zimskom periodu i sušeni na zraku u prostoru bez prisutnog sunčevog svjetla, na temperaturi ~ 20 °C. Sadržaj fenola i antioksidacijska aktivnost određivana je iz lista.



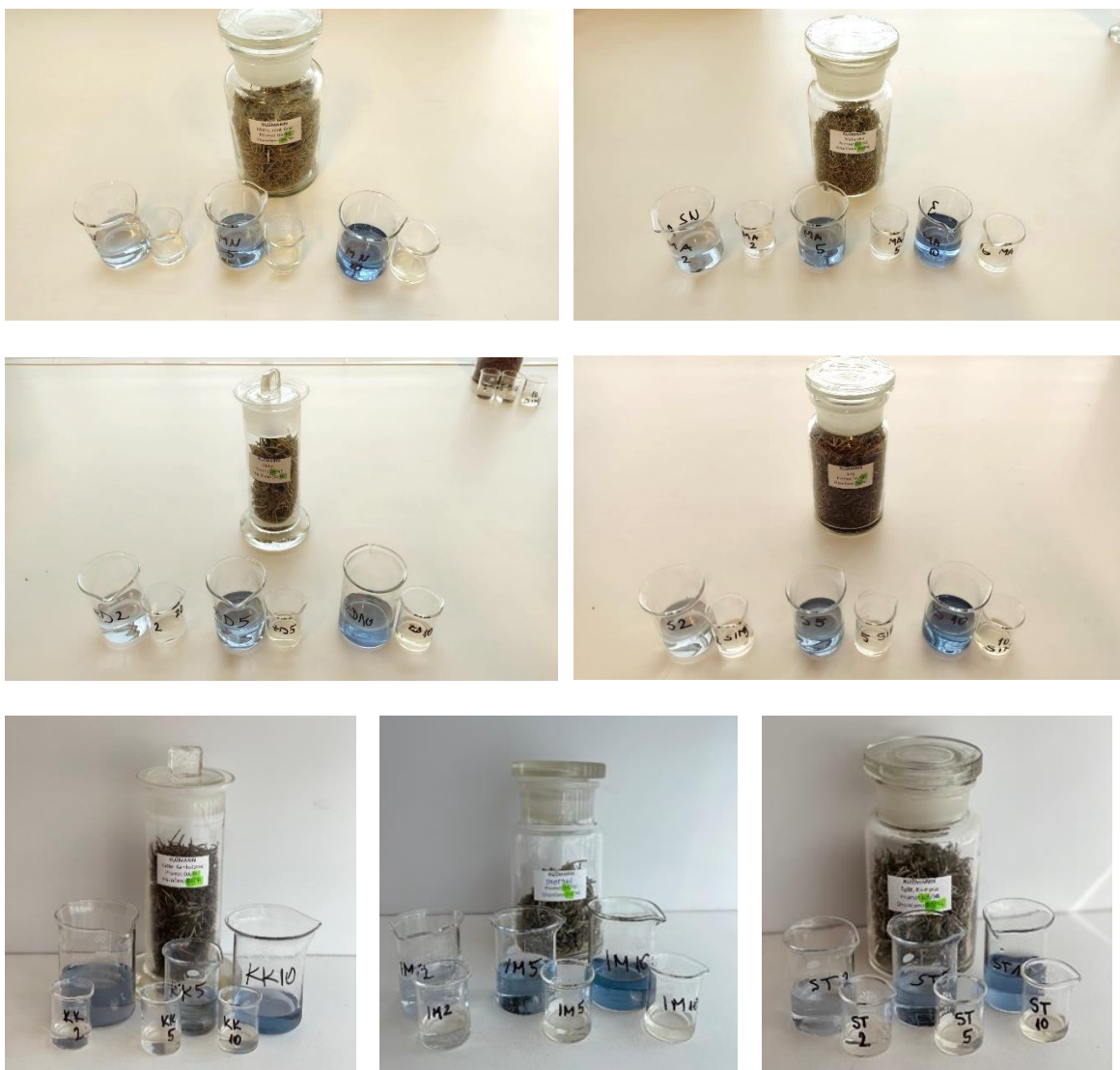
Slika 14 Lokacije rasta prikupljenih uzorak.

Tablica 6 Uvjeti rasta uzoraka ružmarina

Uzorci	Lokacija i uvjeti rasta				
	Lokacija	Osunčanost	Promet	Zalijevanje	Udaljenost od mora
Uzorak 1	Makarska	Cjelodnevna	Uz prometnicu	DA	Uz more
Uzorak 2	Zadar	Bez sunca	Uz prometnicu centar grada	NE	1-2 km
Uzorak 3	Sinj	Cjelodnevna	Uz prometnicu	NE	> 30 km
Uzorak 4	Milna, otok Brač	Cjelodnevna	Bez prometa	DA	0,5 km
Uzorak 5	Imotski	Cjelodnevna	Uz prometnicu	DA	> 30 km
Uzorak 6	Split -Kampus	Djelomična	Uz prometnicu centar grada	DA	1-2 km
Uzorak 7	Kaštel Kambelovac	Djelomična	Uz prometnicu	NE	0,5 km

Prije ekstrakcije suhi ružmarin je usitnjen. Realni uzorci pripremljeni su ekstrakcijom 1 g biljnog materijala (ružmarina) u 200 cm³ redestilirane vode. Tako pripremljeni uzorci prebačeni su u tikvicu za mikrovalnu ekstrakciju. Grijanje u mikroreaktoru je prethodno optimirano.²⁸ Za usporedbu rezultata uzorcima je određena antioksidacijska aktivnost i ukupni fenoli klasičnim grijanjem na 100 °C, 1 g uzorka u 200 ml vode bez primjene mikrovalova u trajanju od 5 minuta (slično priređivanju čaja ili kratkotrajnom kuhanju).⁴

Odabrani parametri za ekstrakciju su predgrijanje: 2 minuta, snaga mikrovalova 600 W, a odabrano vrijeme je 2, 5 i 10 minuta. Nakon isteka vremena predviđenog za ekstrakciju, realni uzorci su filtrirani te su filtratima odmah određivani ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost (Slika 15).



Slika 15 Odabrani uzorci ružmarina i ekstrakti dobiveni različitim metodama ekstrakcije

2.3.Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola

Za izradu krivulje umjeravanja, priređene su otopine galne kiseline (radni standardi) različitih koncentracija: 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg dm⁻³ (Slika 16). U odmjernu tikvicu od 25 cm³ dodati 0,250 cm³ otopine određenog radnog standarda, 15 cm³ destilirane vode i 1,250 cm³ Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj u tikvici dobro promiješati, promućkati, nakon

jedne minute dodati još $3,750 \text{ cm}^3$ zasićene otopine natrijeva karbonata i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Tako priređene radne standarde ostaviti u mraku pri sobnoj temperaturi 2 sata. Nakon isteka 2 sata izmjeriti apsorbanciju svake otopine pri 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm .

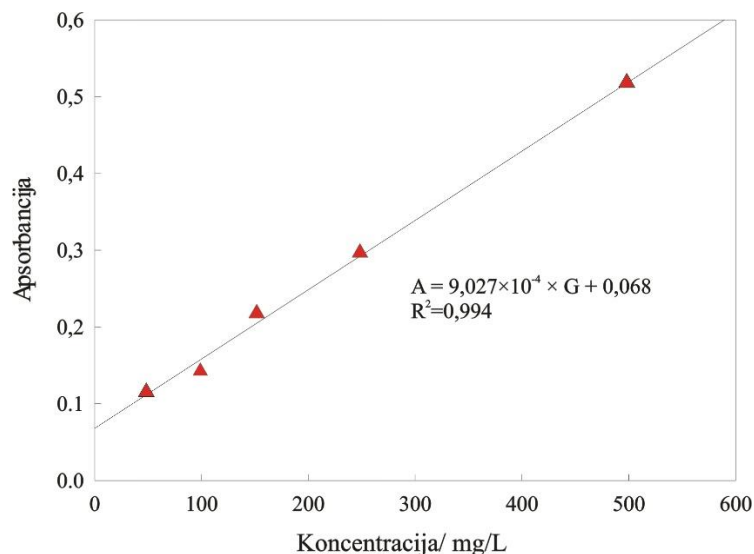


Slika 16 Otopine galne kiseline (radni standardi) korištene za izradu krivulje

Tablica 7 prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbancije. Konstruirana krivulja umjeravanja koncentracija prema apsorbanciji (Slika 17) koristi se za procjenu ukupnih fenola u uzorcima.

Tablica 7 Vrijednosti apsorbancije za konstruiranje krivulje umjeravanja za standard galnu kiselinu

Koncentracija, mg/L	Srednja vrijednost apsorbancije	Standardna devijacija
0		
50	0,1138	$\pm 0,0489$
100	0,1416	$\pm 0,0285$
150	0,2204	$\pm 0,0734$
250	0,2954	$\pm 0,0237$
500	0,5166	$\pm 0,0062$



Slika 17 Krivulja umjeravanja za standard galnu kiselinu.

Pomoću dobivene krivulje umjeravanja, odnosno iz omjera koncentracija-apsorbancija procjenjuju se ukupni fenoli u ekstraktima u odnosu na standard galne kiseline, prema matematičkom izrazu:

$$A = 9,027 \times 10^{-4} \times Y + 0,068$$

gdje Y predstavlja masenu koncentraciju u mg dm^{-3} ekstrakta, a rezultat se izražava kao ekvivalent, mg GAE/L.

Na identičan način prirediti i realne uzorke, gdje se umjesto galne kiseline dodaje ekstrakt. Nakon isteka 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm.

2.4. FRAP metoda (eng. *Ferric reducing/Antioxidant power*) - određivanje antioksidacijske aktivnosti

FRAP metoda je analiza reducirajuće antioksidativne snage željeza. To je široko korištena metoda koja koristi antioksidanse kao reducense u kolorimetrijskoj reakciji vezanoj za redoks reakciju, gdje se Fe^{3+} reducira u Fe^{2+} . Redukcija željezova(III) do željezova(II) iona pri niskom pH uzrokuje stvaranje promjenu boje u obojeni kompleks, koji nastaje u

reakciji sa specifičnim ligandom. Reakcija predstavlja izmjenu jednog elektrona. Najčešći ligand je TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin).

FRAP reagens potrebno je pripremiti svaki dan neposredno prije mjerenja. Koncentracija potrebnih otopina data je u poglavlju 2.1.

- 50 mL otopine acetatnog pufera,
- 5,0cm³ otopine TPTZ i
- 5,0 cm³ otopine FeCl₃ x 6 H₂O

U kivetu širine 1 cm staviti 1,5 cm³ FRAP reagensa i izmjeriti apsorbanciju pri 593 nm (A_0). Zatim u kivetu s reagensom dodati još 0,150 cm³ destilirane vode i 0,050 cm³ pripremljenog ekstrakta, odnosno realnog uzorka. Apsorbancija pri 593 se kontinuirano prati tijekom vremena. Obzirom na kinetiku reakcije možemo podijeliti i antioksidanse na brze i spore. Apsorbanciju bilježiti nakon 4 i nakon 10 minuta.

Za svaki uzorak promjenu apsorbancije (ΔA) izračunati prema jednadžbi:

$$\Delta A = A - A_0$$

Promjenu apsorbancije uzorka usporediti s promjenom apsorbancije izazvane dodatkom standardne otopine iona Fe²⁺, $c(\text{Fe}^{2+}) = 1,000 \text{ mmol dm}^{-3}$, ($\Delta A_{\text{Fe}^{2+}}$). FRAP vrijednost uzorka izračunati prema jednadžbi:

$$\text{FRAP } (\mu\text{mol dm}^{-3}) = (\Delta A / \Delta A_{\text{Fe}^{2+}}) \times 1000$$

gdje je $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}}$ jednaka apsorbanciji standardne otopine Fe²⁺ pri koncentraciji $c(\text{Fe}^{2+})=1,000 \text{ mmol dm}^{-3}$ korigiranoj za vrijednost A_0 .

Za naše uzorke, $\Delta A_{\text{Fe}^{2+}} = 0,9975 - 0,0091 = 0,9884$.

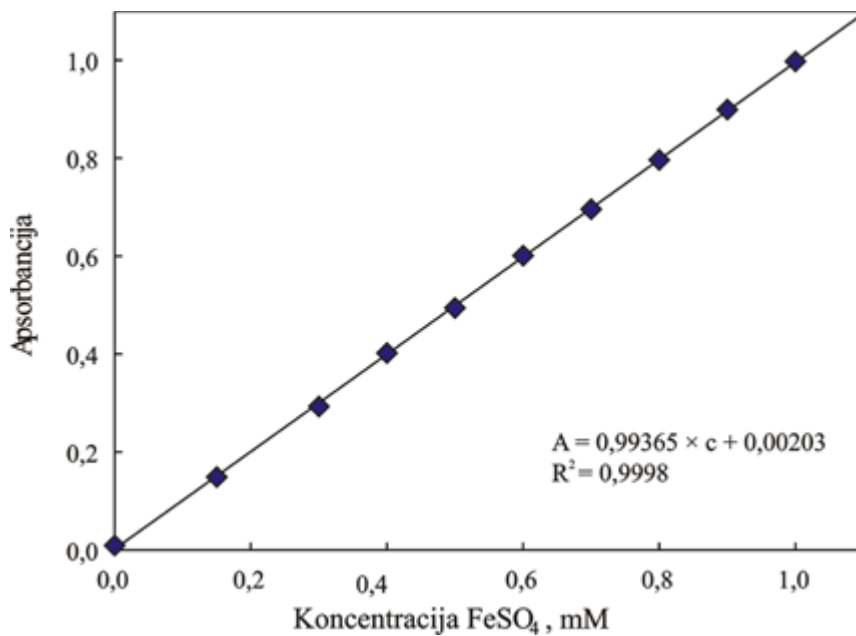
U odnosu na signal reakcije Fe²⁺ iona poznate koncentracije, FRAP metodom je izračunat učinak antioksidansa.

Slika 18 predstavlja krivulju umjeravanja za standardnu otopinu FeSO₄. Pomoću dobivene krivulje umjeravanja, odnosno iz omjera koncentracija-apsorbancija procjenjuje se antioksidacijska aktivnost u ekstraktima u odnosu na standardne otopine FeSO₄, prema matematičkom izrazu:

$$A = 0,993657 \times c + 0,00203$$

gdje c predstavlja množinsku koncentraciju antioksidansa u ekstraktu, a rezultat se izražava kao ekvivalent, $\mu\text{M Fe}^{2+}$.

Na identičan način prirediti i realne uzorke, gdje se umjesto galne kiseline dodaje ekstrakt. Nakon isteka 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm.



Slika 18 Krivulja umjeravanja za standardnu otopinu FeSO₄

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Optimiranje parametara mikrovalne ekstrakcije - Čimbenici

3.1.1. Izbor otapala - Priroda i volumen otapala

Kako se za ekstrakciju većinom koristi osušeni biljni materijal, u stanicama biljaka ostaju sitni mikroskopski tragovi vlage, koji su upravo „meta“ grijanja pomoću mikrovalova. Voda unutar stanice pod utjecajem MW stvara pritisak na stjenke stanice, dovodi do istežanja i konačnog pucanja stjenke. Pora na stanici omogućava ulazak otapalu i ispiranje bioaktivnih tvari iz biljnog ili drugog materijala. Viša temperatura postignuta mikrovalnim zračenjem može hidrolizirati eterske veze u celulozi, koja je glavna sastavni dio stanične stjenke biljaka i može se pretvoriti u topljive frakcije unutar 1 do 2 min. Paralelno se smanjuje mehanička čvrstoća i olakšava pristup otapalu spojevima unutar stanice.²⁹

Učinak mikrovalova jako ovisi o dielektričnoj konstanti otapala i o čvrstoj biljnoj matrici. Bitan faktor je i sposobnost apsorbiranja mikrovalne energije. S te strane važno je znati i što nam je ciljano bioaktivna vrsta i njene karakteristike, je li termostabilna i kakva joj je topljivost. Izbor otapala s nižom temperaturom vrelišta je svakako potreban za termolabilne komponente koji će spriječiti njihovu degradaciju.^{22, 23, 30, 31}

Ispravan izbor otapala je temeljan za optimalan proces ekstrakcije. Po mogućnosti otapalo treba imati visoku selektivnost prema analitu od interesa, isključujući neželjene komponente matrice. Ovo je posebno važno u ekstrakciji pesticida i organskih polutanata iz uzorka tla. Još jedan važan aspekt je kompatibilnost otapala za ekstrakciju s daljnjim analitičkim koracima.

MVE se može izvesti s istim otapalom koje se koristi za konvencionalne ekstrakcije. Međutim, optimalna ekstrakcija za MVE ne može se uvijek provesti s konvencionalnim otapalima kao što su voda, etanol i metanol. Potrebno je sagledati dielektričnu konstantu i sposobnost apsorpcije mikrovalova otapala. Heksan na primjer ima vrlo nisku sposobnost apsorpcije mikrovalova, kažemo da je „proziran“ za mikrovalove, ne zagrijava se pod

utjecajem MW, dok etanol ima dobru sposobnost apsorpcije mikrovalova i stoga se brže zagrijava i može poboljšati proces ekstrakcije.

Radi poboljšanja svojstava i optimiranja često se miješaju otapala do idealnih karakteristika. Utvrđeno je da će sastav otapala s niskom apsorpcijom mikrovalova proizvesti optimalne rezultate. Etanol je relativno dobar apsorber ($\epsilon' = 25,7$) mikrovalne energije, ali nije dobro ekstrakcijsko otapalo za npr. solanesol (bijela, voštana krutina), a heksan je a dobro otapalo za ekstrakciju, ali nije dobar apsorber mikrovalova energije ($\epsilon' = 2,0$). Stoga su pomiješani etanol i heksan u različitim omjerima ponekada idealna kombinacija za ekstrakciju. Stvaranje topline u uzorku mikrovalnim poljem zahtijeva prisutnost dielektričnog spoja, a oslobađanje topline opaža se samo ako uzorak ima dielektrične gubitke ili gubitke provodljivosti pod mikrovalnim zračenjem. Ova sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu djelomično će ovisiti o faktoru disipacije ($\tan \delta$). Faktor disipacije dali su Kingston i Jassie.³² Što je veći faktor disipacije, to će biti veća toplinska energija.

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

gdje je ϵ' dielektrična konstanta, koja izražava sposobnost molekule da se polarizira električnim poljem, a ϵ'' je faktor dielektričnih gubitaka, koji izražava učinkovitost transformacije elektromagnetske energije u toplinu. Polarna otapala kao što je voda imaju velike dielektrične gubitke. Na njihov stalni dipolni moment utjecat će mikrovalovi koji su bili snažno apsorbirani. Napolarna otapala se neće zagrijati kada su izložena mikrovalovima i kažemo da su prozirna za mikrovalove.

Dielektrične konstante uobičajenih otapala sažete su u sljedećoj tablici.

	Dielektrična konstanta Dobar apsorber	Tan δ , učinkovitost grijanja mikrovalovima	Dielektrični gubitak
Voda	80,4	0,123	9,889
Etanol	24,3	0,941	22,866
Heksan	1,9	0,020	0,038

3.1.2. Volumen otapala

Volumen otapala mora biti dovoljan da osigura da je matrica biljke uvijek u cijelosti uronjena u otapalo tijekom ekstrakcije. Općenito, veći omjer volumena otapala i čvrste

matrice može biti učinkovit u konvencionalnim metodama ekstrakcije. Međutim, kod MVE veći omjer može dovesti do nižih prinosa, što može biti posljedica neadekvatnog miješanja otapala. Ne postoji isključivo pravilo, nego je ovo parametar koji je za svaku vrstu potrebno optimirati. Za flavonoide je npr 50:1 (ml otapala/g suhe tvari). pogodan za postizanje visokog prinosa flavonoida iz sušene stanične kulture. Ti omjeri mogu biti vrlo različiti i kretati se od 10:1 pa do 100:1 (ml otapala/g suhe tvari).³³

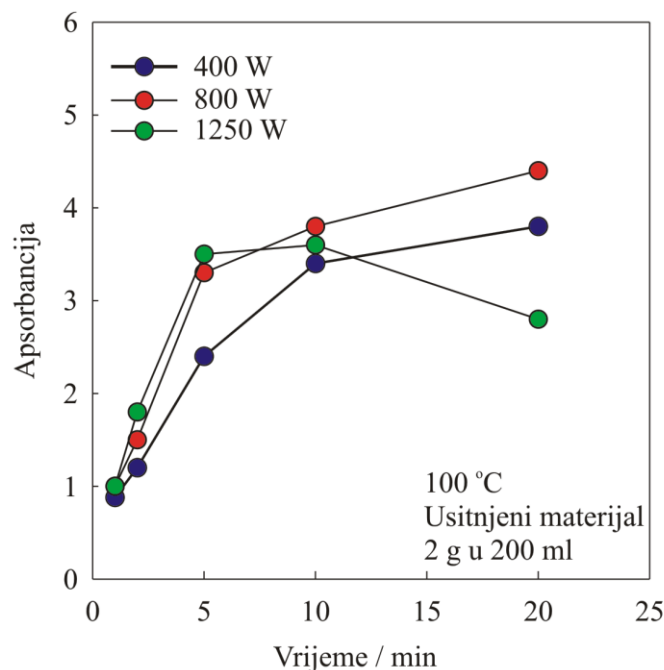
Učinkovitost grijanja otapala mikrovalovima također treba uzeti u obzir znajući da će isparavanje otapala (gubitak) ovisiti o brzini zagrijavanja. Stoga je optimizacija ovog parametra od primarne važnosti kod MVE.

U radu je volumen otapala bio određen aparaturom. Ekstrakcija iz 200 ml je optimalna količina otapala za tikvicu. Aparatura je složena s povratnim hladilom i priključena na dovod vode radi hlađenja čime je spriječen gubitak otapala. Predgrijanje 2 minuta i vrijeme zagrijavanja maksimalno 20 min osiguravaju maksimalnu učinkovitost.

3.1.3. Vrijeme ekstrakcije

Kao i kod drugih tehnika ekstrakcije, vrijeme je još jedan parametar čiji utjecaj treba uzeti u obzir. Općenito, povećanjem vremena ekstrakcije, količina ekstrahiranih bioaktivnih tvari je povećana, iako postoji rizik da dođe do degradacije. Najčešće vrijeme ekstrakcije suhih biljnih materijala je 5-20 minuta. Vrijeme ovisi o otapalu, ali i o ciljanoj vrsti koju želimo ekstrahirati. Za neke slučajeve dovoljno vrijeme MVE je 30 s. Otapala poput vode, etanola i metanola se mogu jako zagrijati pri dužem izlaganju, čime se riskira stabilnost termolabilnih sastojaka. Povećano vrijeme ekstrakcije može dovesti do toplinske degradacije sastojaka. Iz tog razloga je obavezan korak u MVE optimiranje vremena ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije može ovisiti i o dijelovima i veličini suhog uzorka. Preporučena veličina materijala je 0,11-2 mm za suhi list ili usitnjeni prah kada je to moguće. Drvenasti dio biljke, list i cvijet zahtijevaju svaki različito vrijeme ekstrakcije.²⁰ Jedan od primjera je vrijeme ekstrakcije za polifenole i kofein do 4 minute u smjesi etanol/voda.³⁴

U radu je ispitan utjecaj vremena ekstrakcije 1, 2, 5, 10 i 20 minuta uz primjenu različite snage mikrovalova i uz konstantne parametre kako je prikazano na slici 19.



Slika 19 Optimiranje vremena ekstrakcije.

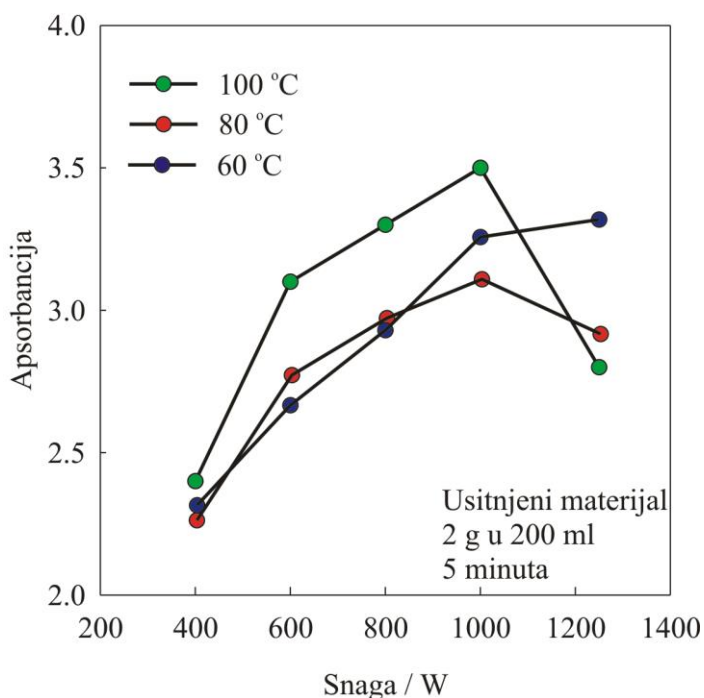
Nameće se zaključak kako dulje vrijeme ekstrakcije i viša snaga ne pogoduje ovom materijalu, je apsorbancija opada. Uzrok je najvjerojatnije pucanje veza u bioaktivnim spojevima, odnosno toplinska degradacija uzorka. Na ovaj način eliminirali smo dugo vrijeme za ekstrakciju, a vremena 2, 5, i 10 minuta su dodatno istražena za sve uzorke.

3.1.4. Mikrovalna snaga

Mikrovalna snaga i vrijeme izlaganja mikrovalovima, odnosno vrijeme ekstrakcije dva su važna faktora, koji u velikoj mjeri utječu jedni na druge. Kombinacija niske ili umjerene snage mikrovalova uz produljeno vrijeme ekstrakcije je optimalan izbor kada u pitanju imamo spojeve sklone degradaciji. Velika snaga s produljenim vremenom ekstrakcije uvijek uključuje rizik od toplinske degradacije. Općenito, učinkovitost ekstrakcije poboljšana je podizanjem snage mikrovalova. Snaga mikrovalnog uređaja može biti vrlo raznolika, od konvencionalne kućne mikrovalne pećnice (30-270 W) pa do modernih mikrovalnih reaktora (30-1250 W). Korištena snaga uz kratko vrijeme izlaganja ovisi i o samom otapalu, a ne samo o biljnoj vrsti. Kod osjetljivih dijelova biljke, poput cvijeta, dolazi do brzog pucanja stanične stjenke na višoj temperaturi i uz veću snagu, a kao rezultat zajedno sa željenim analitima ispiru se i neželjene komponente u otapalo. Na niskim razinama snage pucanje stjenke se

odvija postupno, što omogućuje selektivno estrahiranje. Stoga, snaga mora biti pravilno odabrana kako bi se izbjegla degradacija bioaktivnih spojeva.²⁰

U radu je snaga optimirana samo za srednje vrijeme ekstrakcije, 5 minuta, te s tri temperature. Rezultati su prikazani na slici 20. Možemo zaključiti kako zaista visoka snaga čak i u tako kratkom vremenu za sve tri temperature dovodi do znatne degradacije matrice, dok niska snaga za uzorak ružmarina nema veći utjecaj bez obzira na temperaturu. Najveća apsorbancija je postignuta pri 100 °C. Primjenom snage 600 W eliminiramo mogućnost degradacije, dok je vrijednost apsorbancije dovoljno visoka, čak i pri temperaturi vrenja vode.



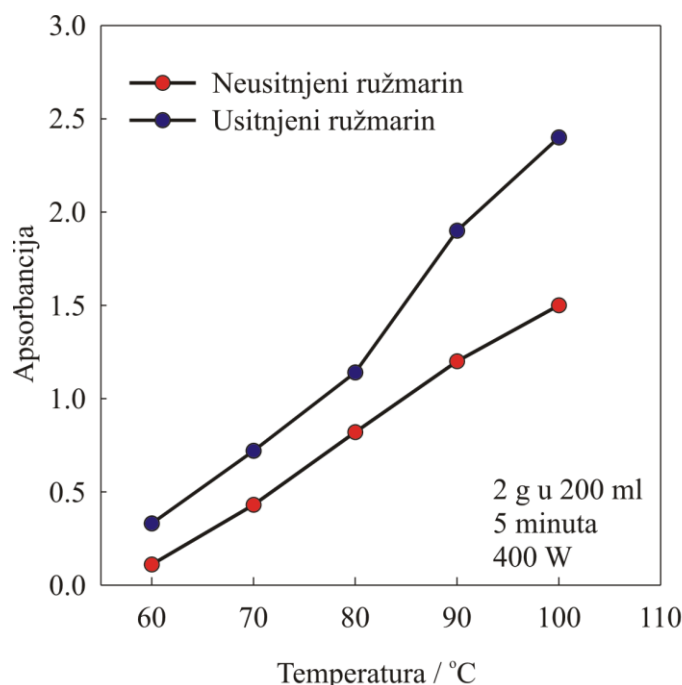
Slika 20 Optimiranje snage ekstrakcije.

3.1.5. Karakteristike matrice

Veličina čestica biljke i stanje u kojem se nalazi može imati značajan učinak na ekstrakciju spojeva. Veličine čestica ekstrahiranih materijala općenito su u rasponu od 100 µm do 5 mm. Fini prah može poboljšati ekstrakciju radi veće površine, što omogućuje bolji kontakt između matrice biljke i otapala. Također, finije čestice omogućit će efikasnije

djelovanje mikrovalova, odnosno dublji prodor. Jedan od nedostataka povezanih s ekstrakcijom iz finih prahova je teškoća odvajanja matrice od otapala nakon mikrovalnog zračenje. Stoga se primjenjuje centrifugiranje ili filtracija kako bi se izbjeglo dobivanje mutnog uzorka ekstrakta ili zaostatak matrice u ekstraktu. S druge strane, ta postobrada u konačnim ekstraktima može dati netočan rezultat, uslijed izloženosti vanjskim čimbenicima ili duljeg zadržavanja matrice u ekstraktu. Jedna od mogućnosti izbjegavanja ovakvog scenarija je prethodno namakanje praškastog uzorka u otapalo, kako bi se povećala vlažnost uzorka i dovelo prah u stanje bubrenja. Taj se fenomen naziva izvlačenje predispiranjem. Vrijeme prethodnog ispiranja na sobnoj temperaturi prije MVE prosječno je 2 minute, dok je maksimalno 45 minuta, ovisno o dijelu biljke koji se estrahira.²⁰

Za optimiranje karakteristika matrice odabrana su dva uzorka, neusitnjeni i usitnjeni ružmarin. Rezultati provedeni s prahom ružmarina dali su mutne ekstrakte, nepogodne za spektrofotometrijska mjerenja. Rezultati su prikazani na slici 21. Možemo zaključiti kako je nešto bolje rezultate dao usitnjeni ružmarin. Količina uzorka od 2 g na 200 ml također je nakon 5 minuta dala vrlo visoke vrijednosti apsorbancije za neusitnjeni i usitnjeni ružmarin.



Slika 21 Optimiranje karakteristika matrice – prosječna veličina listića ružmarina.

3.1.6. Temperatura

Snaga i temperatura mikrovalnog reaktora međusobno su povezani i potrebno im je posvetiti posebnu pozornost, osobito pri radu sa sustavom zatvorenih posuda. U zatvorenom sustavu temperatura može doseći vrijednosti znatno iznad vrenja točka otapala. Ova povišena temperatura doista rezultira poboljšanom učinkovitosti ekstrakcije, jer desorpcija analita s aktivnih mjesta u matrici se povećava. Osim toga, otapala imaju veću sposobnost otopiti analite na višoj temperaturi, jer površinska napetost i viskoznost otapala opadaju s temperaturom. To dovodi do poboljšanog vlaženje uzorka i prodiranja otapala u matricu. Povećanje temperature također je povezano s povećanje tlaka u zatvorenim sustavima, što može povećati rizik rada. Povećana temperatura može utjecati i na dipolni karakter otapala, snižava ga, pa tako superkrična voda (voda na vrlo visokoj temperaturi) poprima neke karakteristike nepolarnog otapala. Temperatura može biti učinkovito kontrolirana u sustavu otvorenih posuda pravilnim kombinacije otapala.^{20, 35}

Kako na MVE utječu mnogi čimbenici i kako su ti čimbenici u ozbiljnoj interakciji jedan s drugim potrebno je usvojiti strategiju statističkog optimiranja radnih uvjeta. U literaturi postoji više primjera strategije optimiranja parametra MVE.^{36, 37} Kao rezultat niza eksperimenata i statističke obrade faktora dolazi se putem prikladnog softvera do optimalnih rezultata. Nije uvijek jasno kako dizajnirati eksperiment kako bi se postigao optimalni učinak ekstrakcije. Neki od statističkih softvera koji se koriste za svrhu optimiranja su STATGRAHICS, MINITAB, STATGRAPHICS PLUS, DOE softver.

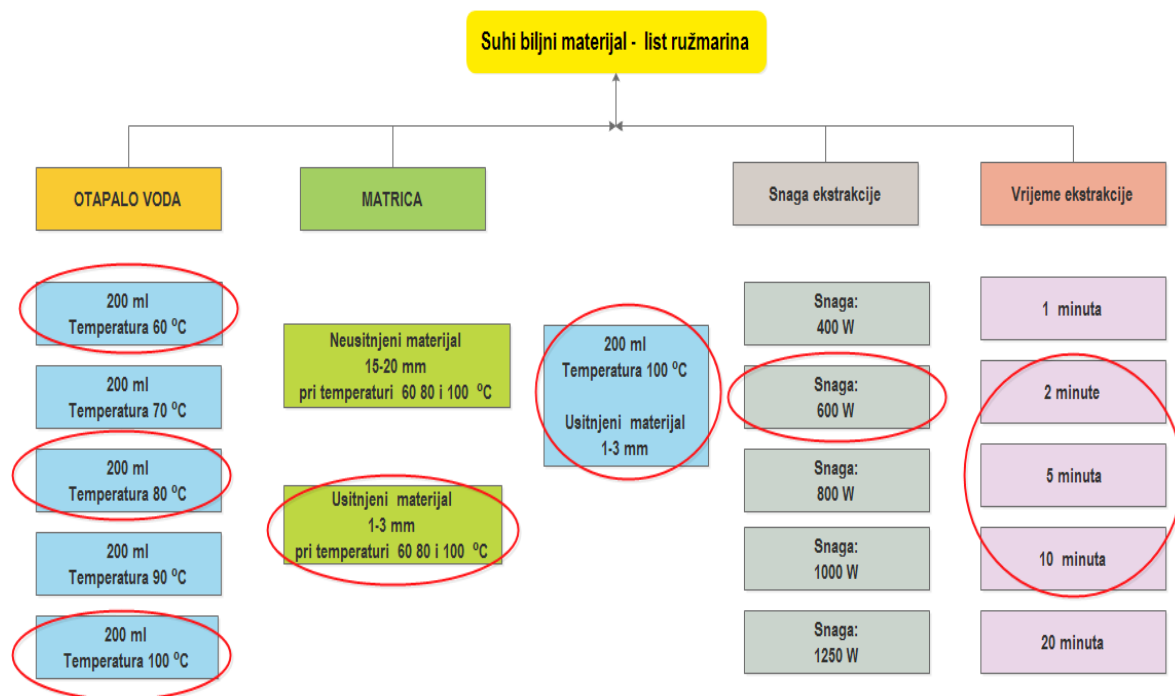
Modeliranje mikrovalne ekstrakcije odnosno dizajn eksperimenta je svakako najizazovniji dio svake analize. Nakon niza provedenih mjerenja i svih razmatranja izvedeni su zaključci o utjecaju parametara na antioksidacijsku aktivnost nakon 5 minuta. Optimiranje parametara i zaključci svih koraka su prikazani, a Sheme 1 i 2 predstavljaju korake optimiranja MVE sa zaključcima.

Izbor otapala - Priroda i volumen otapala - Na osnovu svih navedenih parametara i pregledom literature³⁸ zaključeno je kako je **VODA** kao otapalo optimalan izbor. Cilj je dobivene ekstakte primijeniti kao dodatke u farmaceutskoj industriji i za njegu kože. Važno je i procijeniti njihov sadržaj koji se unosi kuhanjem hrane u prehrambenoj industriji i kao nutraceutik. Nutraceutici su prirodni spojevi koji povoljno djeluju na ljudsko zdravlje, npr.

vitamini C i E, likopen, omega-3 masne kiseline, glukozamin. Izdvajaju se iz hrane ili biljnih vrsta (npr. iz bora) te dodaju hrani u kojoj se izvorno ne nalaze, a mogu biti i koncentrirani u obliku praha, kapsula ili tableta.

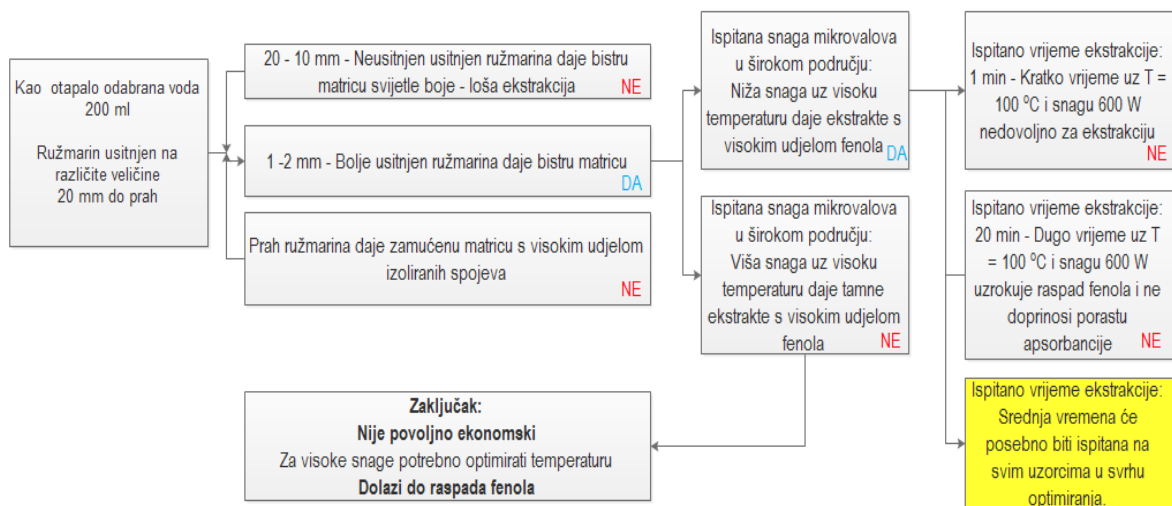
Volumen otapala - Obzirom na reaktor volumen otapala je također odabran **200 ml**.

Karakteristike matrice – Odabrana masa biljnog materijala za optimiranje je **2 g**.



Shema 1 Koraci optimiranja

Suhi biljni materijal - Shema optimiranja parametara



Shema 2 Zaključci optimiranja.

3.2. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja

3.2.1. Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola

Prethodno opisana Folin-Ciocalteu metoda služi za određivanje ukupnih fenola. Dobiveni biljni ekstrakti dodani su umjesto standarda galne kiseline u tikvicu i nakon dva sata je izmjerena apsorbancija. Na osnovu tri mjerenja nađena je srednja vrijednost apsorbancije. Svim uzorcima je prethodno određena apsorbancija bez potpomognute ekstrakcije mikrovalovima.

Dobiveni rezultati bez primjene mikrovalova u trajanju od 5 minuta prikazani su u Tablici 8, a dobiveni rezultati uz primjenu MVE u trajanju od 2, 5 i 10 minuta prikazani su u Tablici 9.

Tablica 8 Sadržaj ukupnih fenola uzoraka estrahirani klasičnim grijanjem uzoraka i određen spektrofotometrijskom metodom - VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.

Uzorak 1	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			
				Srednja vrijednost
Makarska - MA 5	0,1004	0,1058	0,1047	0,1036
Zadar - ZD 5	0,0957	0,0816	0,0966	0,0913

Sinj - SI 5	0,0883	0,0719	0,0681	0,0761
Milna - MN 5	0,3197	0,3429	0,3336	0,3321
Imotski - IM 5	0,0994	0,0947	0,0999	0,0979
Split - ST 5	0,0729	0,0756	0,0757	0,0747
Kaštel Kambelovac - KK 5	0,0777	0,0702	0,0701	0,0727

Tablica 9 Sadržaj ukupnih fenola uzoraka dobivenih MVE i određen spektrofotometrijskom metodom - VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.

Uzorak 1	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Makarska				
MA 2	0,1163	0,1162	0,1161	0,1162 (0,0946)
MA 5	0,2409	0,2408	0,2409	0,2409 (0,0421)
MA 10	0,3291	0,3289	0,3289	0,3290 (0,0316)

Uzorak 2	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Zadar				
ZD 2	0,1090	0,1092	0,1091	0,1091 (0,0624)
ZD 5	0,1875	0,1877	0,1879	0,1877 (0,1119)
ZD 10	0,2634	0,2643	0,2634	0,2634 (0,0153)
Uzorak 3	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Sinj				
SI 2	0,1006	0,1004	0,1006	0,1006 (0,1016)
SI 5	0,1566	0,1654	0,1567	0,1566 (0,0453)
SI 10	0,2458	0,2458	0,2458	0,2458 (0,0070)

Uzorak 4	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Milna otok Brač				
MN 2	0,4006	0,4007	0,4008	0,4007 (0,0249)
MN 5	0,7673	0,7684	0,7672	0,7676 (0,0584)
MN 10	0,9238	0,9235	0,9235	0,9236 (0,0651)

Uzorak 5	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Imotski				
IM 2	0,1117	0,1117	0,1118	0,1117 (0,0869)
IM 5	0,1894	0,1893	0,1894	0,1894 (0,0399)
IM 10	0,3005	0,3004	0,3006	0,3005 (0,0416)

Uzorak 6	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost

Split Kampus				Srednja vrijednost
ST 2	0,1172	0,1171	0,1172	0,1172 (0,0256)
ST 5	0,1743	0,1739	0,1742	0,1741 (0,0924)
ST 10	0,2476	0,2475	0,2476	0,2476(0,0265)

Uzorak 7	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Kaštel Kambelovac				Srednja vrijednost
KK 2	0,0957	0,0957	0,0958	0,0957 (0,0422)
KK 5	0,1614	0,1614	0,1613	0,1613 (0,0473)
KK 10	0,2549	0,2549	0,2549	0,2549 (0,0059)

Odabranim uzorcima je izračunata i antioksidacijska aktivnost prethodno opisanom FRAP metodom. Praćena je promjena apsorbancije nakon 4 minute i nakon 10 minuta, te su FRAP vrijednosti očitane nakon 4 i nakon 10 minuta i prikazane u tablici 10 za uzorke bez potpomognute ekstrakcije i u Tablici 11 za MVE.

Tablica 10 Antioksidacijska aktivnost uzoraka estrahiran klasičnim grijanjem uzoraka i određen spektrofotometrijskom metodom - VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBNCIJE.

UZORAK	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
Makarska - MA 5	0,6846	0,9686
Zadar - ZD 5	0,4647	0,6496
Sinj - SI 5	0,3659	0,4499
Milna - MN 5	0,5149	0,7177
Imotski - IM 5	0,4311	0,5994
Split - ST 5	0,4067	0,5514
Kaštel Kambelovac - KK 5	0,4026	0,5174

Tablica 11 Antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom. - VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIE

Uzorak 1	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
Makarska		

MA 2	0,5060	0,5690
MA 5	1,2546	1,4501
MA 10	1,7680	2,0465

Uzorak 2	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Zadar	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
ZD 2	0,4826	0,5323
ZD 5	0,9759	1,1043
ZD 10	1,4667	1,6644

Uzorak 3	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Sinj	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
SI 2	0,3886	0,4304
SI 5	0,6801	0,7648
SI 10	1,2042	1,4095

Uzorak 4	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Milna otok Brač	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
MB 2	0,4714	0,5342
MB 5	0,9032	1,2274
MB 10	1,2775	1,8850

Uzorak 5	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Imotski	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
IM 2	0,4814	0,5302
IM 5	0,9052	1,0190
IM 10	1,4528	1,6301

Uzorak 6	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Split Kampus	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
ST 2	0,5303	0,5842
ST 5	0,8541	0,9373
ST 10	1,1884	1,3227

Uzorak 7	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
Kaštel Kambelovac	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
KK 2	0,4178	0,4485
KK 5	0,7560	0,8913
KK 10	1,1424	1,2898

Svi rezultati spektrofotometrijskih mjerenja ispitanih biljnih ekstrakata prikazani su u tablicama 12 i 13. Iz krivulje umjeravanja za standard galnu kiselinu, odnosno prema matematičkom izrazu za jednadžbu pravca izračunata je ili očitana koncentracija fenola u uzorku. Dobiveni rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE /L), budući da je ona korištena kao standard.

Tablica 12 Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom - REZULTATI

UZORAK	Ukupni fenoli Folin- Ciocalteu reagens mg GAE/L	Antioksidacijska aktivnost 4 minute FRAP metoda $\mu\text{M Fe}^{2+}$	Antioksidacijska aktivnost 10 minuta FRAP metoda $\mu\text{M Fe}^{2+}$
Makarska - MA 5	39,5	686,9	972,7
Zadar - ZD 5	25,8	465,6	651,7
Sinj - SI 5	9,0	366,2	450,7
Milna - MN 5	292,5	516,1	720,2
Imotski - IM 5	33,2	431,8	601,2
Split - ST 5	7,5	407,3	552,9
Kaštel Kambelovac -KK 5	5,2	403,1	518,7

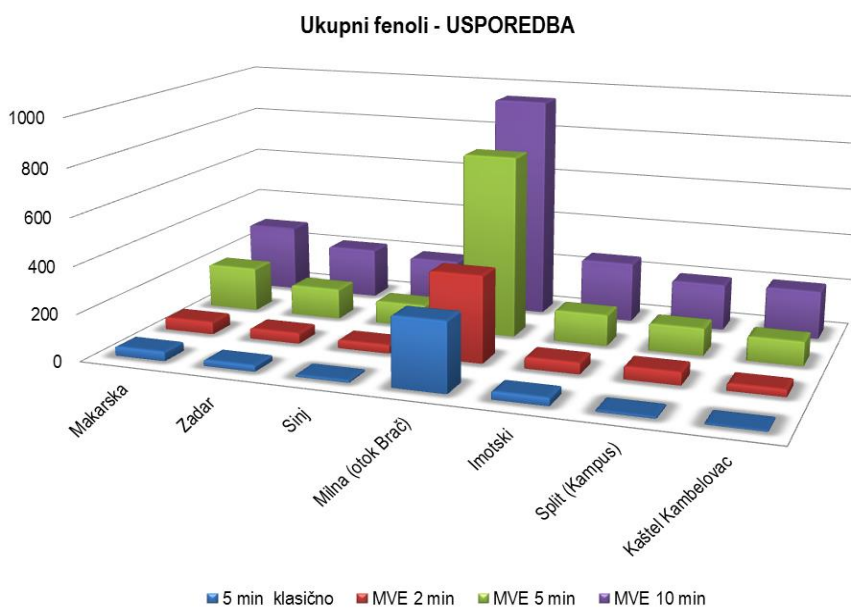
Tablica 13 Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom - REZULTATI

UZORAK	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu reagens	Antioksidacijska aktivnost - 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost - 10 minuta FRAP metoda
	mg GAE/L	$\mu\text{M Fe}^{2+}$	$\mu\text{M Fe}^{2+}$
Makarska			
MA 2	53,4	301,9	365,6
MA 5	191,5	1080,5	1278,3
MA 10	289,1	1576,6	1858,4
Zadar			
ZD 2	45,4	268,9	319,2
ZD 5	132,6	763,6	893,8
ZD 10	216,5	1254,6	1454,6
Sinj			
SI 2	36,1	218,3	260,6
SI 5	98,1	508,6	594,3
SI 10	196,9	1025,7	1233,4
Milna (otok Brač)			
MN 2	368,6	273,3	336,8
MN 5	775,0	713,9	1041,9
MN 10	947,8	1088,6	1703,3
Imotski			
IM 2	48,4	290,1	339,4
IM 5	134,5	716,2	831,3
IM 10	257,6	1263,4	1442,7
Split (Kampus)			
ST 2	54,5	331,0	385,6
ST 5	117,5	649,6	733,8
ST 10	198,9	986,8	1122,6
Kaštel Kambelovac			
KK 2	30,7	198,6	229,7
KK 5	103,4	532,9	669,8
KK 10	207,0	916,9	1066,1

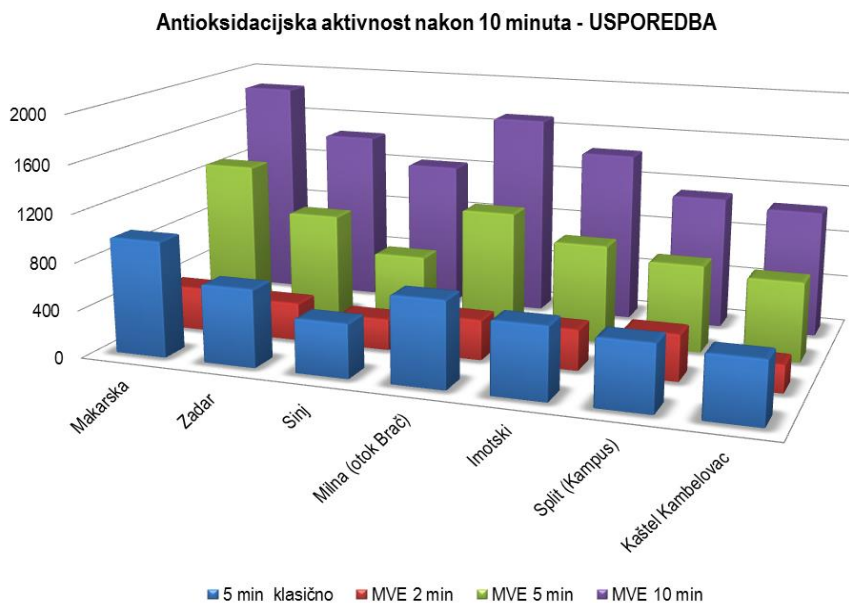
Rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu metodom pokazali su da uzorak ružmarina sa Milne (otok Brač) ekstrahiran mikrovalnom ekstrakcijom pokazuje najveći sadržaj ukupnih fenola (947,8 mg GAE/L). Uzorak Makarska pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost (1576,6 i 1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). S porastom sadržaja ukupnih fenola raste i antioksidacijska aktivnost, što ukazuje upravo fenoli daju najveći doprinos antioksidacijskoj aktivnosti za uzorak Milna, dok kod ostalih uzoraka drugi antioksidansi nefenole strukture imaju veliki doprinos.

3.3. Usporedba dobivenih rezultata – procjena utjecaja različitih parametara

Uvidom u ukupne rezultate prikazane u tablicama 12 i 13 i na slikama 22 i 23 u obliku stupčastih dijagrama, primjećuje se povećanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti s povećanjem vremena ekstrakcije. Gledajući rezultate za uzorke estrahirane samo klasičnim zagrijavanjem, rezultati dokazuju učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Naime, sadržaj ukupnih fenola uzoraka prilikom klasičnog grijanja na 100 °C u trajanju od 5 minuta je dva do tri puta manji u odnosu na sadržaj ukupnih fenola prilikom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima uz isto vrijeme. Taj rezultat je niži i od najnižeg vremena MVE. Antioksidacijska aktivnost slijedi isti trend.



Slika 22 Usporedba dobivenih rezultata za ukupne fenole za sve ekstrakte.



Slika 23 Usporedba dobivenih rezultata za antioksidacijsku aktivnost za sve ekstrakte.

Iz navedenih rezultata najbolje se može ocijeniti učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, te performanse korištenog uređaja. Potrebno je istaknuti kako je klasičnim grijanjem na 100 °C utrošena mnogo veća energija, jer je snaga kuhala približno 1500 W, a postignuta je mnogo manja učinkovitost. Primjenom mikrovalova uz nižu temperaturu ekstrakcije, nižu snagu postignuta je veća učinkovitost. MVE uključujući brže grijanje, bolji energetske učinak (nema gubitaka otapala i topline), smanjuje vrijeme zagrijavanja, omogućuje preciznu kontrolu procesa i sigurniji proces, pa možemo zaključiti kako je i ekonomski znatno povoljnija.^{39 40}

Rezultati ekstrakcije ukupnih fenola F-C optimiranom MVE-metodom pokazuju trend povećanja koncentracije ukupnih fenola s povećanjem vremena ekstrakcije, što znači da dulje vrijeme ekstrakcije omogućava veću ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Primjerice, uzorci s najdužim vremenom ekstrakcije, poput Milne (otok Brač) i Makarske, pokazuju najviše koncentracije ukupnih fenola, redom 947,8 i 289,1 mg GAE/L.

Nadalje, analizirajući podatke, uočava se da uzorci Makarske pokazuju visoke koncentracije ukupnih fenola i najveću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi uzorcima s ostalih lokacija. Slično se može reći i za uzorak Milna (otok Brač). Razlog tomu možda leži u geografskim i mikroklimatskim obilježjima terena i uvjeta u kojima je ovaj ružmarin rastao.

Uzorci Split (Kampus) i Sinj pokazuju nešto niže vrijednosti ukupnih fenola. Naime, neposredna blizina mora i višesatna izloženost suncu najvjerojatnije doprinose povećanju udjela bioaktivnih vrsta u ružmarinu. Time se može zaključiti kako su blizina mora i sunčeva svjetlost najvažniji čimbenici za visoku antioksidacijsku aktivnost ružmarina. Stoga ne čudi i podatak s početka ovog rada o podrijetlu imena, ružmarin, *rossamaris*, što na latinskom jeziku znači *morska rosa*.

4. ZAKLJUČCI

Zaključci rada podijeljeni su u dva dijela: **A** - zaključci modeliranja mikrovalne ekstrakcije i **B** - zaključci utjecaja mikrolokacije i uvjeta rasta na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost.

A - Prednosti primjene mikrovalne ekstrakcije su brža, učinkovitija, preciznija, sigurnija i ekonomski povoljnija ekstrakcija u usporedbi s tradicionalnim metodama. Prilikom optimiranja parametara mikrovalne ekstrakcije ružmarina, izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Korištenje vode kao otapala nudi brojne prednosti, uključujući visoku učinkovitost apsorpcije mikrovalne energije, ekološku prihvatljivost vode kao otapala, sigurnost, pristupačnost i usklađenost s mnogim bioaktivnim spojevima što čini vodu idealnim otapalom za mnoge primjene u industriji i istraživanju.
2. Volumen otapala od 200 ml osigurao je potpuno potapanje uzorka i ravnomjerno zagrijavanje u pripadajućem reaktoru, što je omogućilo bolji prijenos mikrovalne energije. Bolja efikasnost je postignuta iz usitnjenih listova ružmarina.
3. Vrijeme ekstrakcije u velikoj mjeri doprinosi rezultatima što pokazuje kako dugo vrijeme ekstrakcije ne pogoduje ispitivanom uzorku. Uzorci s vremenom ekstrakcije 10 minuta, poput Milne (otok Brač) i Makarske, pokazuju najviše koncentracije ukupnih fenola, redom 947,8 i 289,1 mg GAE/L, u odnosu na 2 i 5 minuta.
4. Optimiranjem snage i temperature ekstrakcije, izveden je zaključak kako je najveća apsorbanca postignuta pri 100 °C i pri snazi 600 W, jer se pri navedenim vrijednostima eliminira mogućnost degradacije, ali su još uvijek vrijednosti apsorbancaje dovoljno visoke, što rezultira izvanrednim rezultatima.
5. Usitnjeni ružmarin mase 2g daje najbolje rezultate apsorbancaje, koja doseže vrlo visoke vrijednosti pri 100 °C, za razliku od neusitnjenog ružmarina ili ružmarina u prahu, uslijed kojih se kao produkt dobija matrica svijetle boje, odnosno zamućena matrica.
6. Niža snaga s visokom temperaturom je optimalna kombinacija koja daje ekstrakte s izrazito visokim sadržajem fenola. Ukoliko se koristi visoka snaga, potrebno je optimirati odnosno sniziti temperaturu, jer suprotno rezultira tamnim ekstraktom u kojemu dolazi do raspada fenola i do ekonomski nepovoljnog procesa.

B - Zaključci su izvedeni i na temelju karakteristika okoline rasta pojedinog uzorka ružmarina odnosno geografskim i mikroklimatskim obilježjima na kojima je pojedini ružmarin rastao:

1. Uzorci Milne (otok Brač) i Makarske su rasli uz more ili neposrednu blizu mora, bili su cjelodnevno osunčani, te su bili zalijevani i pokazuju najviše koncentracije ukupnih fenola, redom 947,8 i 289,1 mg GAE/L. Uspoređujući sa, primjerice, uzorkom Kaštel Kambelovac, koji je rastao također u neposrednoj blizini mora, ali nije bio cjelodnevno osunčan, te nije bio zalijevan ili sa uzorkom Split-Kampus, koji poput uzorka Kaštel Kambelovac je djelomično bio izložen suncu, ali je bio zalijevan, uočavaju se niže vrijednosti ukupnih fenola, redom 207,0 i 198,9 mg GAE/L. Ključan parametar za koncentraciju ukupnih fenola u ružmarinu je prema tome vrijeme izloženosti suncu i blizina prometnice.
2. Osim uzorka Milna (otok Brač) svi uzorci su rasli uz prometnice. Utjecaj onečišćenja potvrđuje i sadržaj ukupnih fenola, jer je poznato kako su upravo fenolni spojevi ključni za obranu od oksidacijskog stresa i polutanata kojim je biljka bila izložena.
3. Uzorak Makarska pokazuje najvišu antioksidacijsku aktivnost (1858,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ nakon 10 minuta FRAP metode) i to je ujedno uzorak koji je rastao najbliže moru, točnije jedini uzorak koji je rastao uz more. Uzorak je prilikom rasta bio izložen sitnim kapljicama morske vode koje su se nakupljale na listićima biljke uslijed vjetra i valova, te je upravo to zajedno sa doprinosom sunca i zalijevanjem dalo idealan spoj prirode, koji rezultira izuzetnom antioksidacijskom aktivnošću. Sukladno tomu, ključan parametar za antioksidacijsku aktivnost ružmarina je blizina mora.

Idealan spoj prirode ne opravdavaju samo dobiveni rezultati, već i porijeklo imena ružmarina, spomenuto još na početku rada, lat. *Rosmarinus* što znači *morska rosa*. Ružmarin, riznica antioksidanasa i biološki aktivnih spojeva može se smatrati darom podneblju Dalmacije, zbog svojih blagodati i širokog spektra upotrebe u medicini, kozmetici, aromaterapiji i kulinarstvu.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

ROS - reaktivne kisikove vrste, slobodni kisikovi radikali, *Reactive Oxygen Species*

RNS - reaktivne dušikove vrste, slobodni dušikovi radikali, *Reactive Nitrogen Species*

GK - galna kiselina

MVE - mikrovalna ekstrakcija, *Microwave Assisted Extraction*

SP metoda - spektrofotometrijska metoda

FC - *Folin-Ciocalteu metoda*

FCR - *Folin-Ciocalteu reagens*

FRAP - *Ferric reducing/Antioxidant power*

6. LITERATURA

1. K.J.A. Davies. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems, *IUBMB Life*, 50 (2000) 279-289. <https://doi.org/10.1080/713803728>
2. B. Sasikumar. 25 - Rosemary, *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*, Woodhead Publishing, (2012) 452-468. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.452>
3. Izvor: https://www.agromatica.es/plantas-de-terrenos-salinos/#google_vignette (pristupljeno 10. 5. 2024.)
4. P.N. Dinh, L.M.T. Thuy, T.P. Quoc. The extraction of rosemary essential oil by microwave-assisted hydrodistillation method, *OP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 991 (2020) 012051, IOP Publishing. [doi:10.1088/1757-899X/991/1/012051](https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012051)
5. Z. Rappoport. *The Chemistry of Phenols*, Wiley & Sons, ISBN: 978-0-470-86945-1 (2004).
6. N.V. Zagoskina, M.Y. Zubova, T.L. Nechaeva, V.V. Kazantseva, E.A. Goncharuk, V.M. Katanskaya, E.N. Baranova, M.A. Aksenova. Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
7. C.M. Santana, Z.S. Ferrera, M.E. Torres Padrón, J. Juan, S. Rodríguez. Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches, *Molecules*, 14 (2009) 298-320. <https://doi.org/10.3390/molecules14010298>
8. W. Kaim, B.Schwederski, A. Klein. *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life: an introduction and guide / 2nd ed.* Wiesbaden: Wiley, cop. 2013.
9. P. Newsholme, V.F. Cruzat, K.N. Keane, R. Carlessi, P.I. Homem de Bittencourt. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes, *Biochem. J.* 473 (2016) 4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
10. O.I. Aruoma. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants in Human Health and Disease, *JAOCS*, 75 (1998) <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>

-
11. Izvor: <https://ndnr.com/fertility/antioxidants-male-infertility-can-supplements-make-a-difference/> (pristupljeno 25. 6. 2024.)
 12. F. Shahidi, Y. Zhong. Measurement of antioxidant activity, *J. Funct. Foods*, 18 (2015) 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
 13. I.G. Munteanu, C. Apetrei. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
 14. F.H.A. Fernandes, H.R. Salgado. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 3 (2016) 257-265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>
 15. izvor: <https://sielc.com/shikimic-acid> (pristupljeno 25. 6. 2024.)
 16. R. Abdel-Hamid, E.F. Newair. Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 657 (2011) 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.03.030>
 17. F. Chemat, M.A. Vian, G. Cravotto. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
 18. V. Yogesh Mohan, S. Hemalatha. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Phcog. Rev.* 1 (2007) 7-18. <https://www.researchgate.net/publication/237218276>
 19. J. Švarc-Gajić, Z. Stojanović, A. Segura Carretero, D. Arráez Román, I. Borrás, I. Vasiljević. Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*, *J. Food Eng.* 119 (2013) 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.030>
 20. V. Mandel, Y. Mohan, S. Hemalatha. Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1 (2007), 7-18.
 21. V. Orsat, W. Routray. Chapter 8 - Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids-Water Extraction of Bioactive Compounds, Elsevier (2017) Pages 221-244. ISBN 9780128093801. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00008-5>

-
22. M. Letellier, H. Budzinski. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis*. 27 (1999) 259-71. [DOI: 10.1051/analisis:1999116](https://doi.org/10.1051/analisis:1999116)
23. M. Letellier, H. Budzinski, L. Charrier, S. Capes, A.M. Dorthe. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *J. Anal. Chem.* 364 (1999) 228-37.
24. A. Pastor, E. Vazquez, R. Ciscar, M. De la Guardia. Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments, *Anal. Chim. Acta.* 344 (1997) 241-49. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00012-3)
25. J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro. Focused microwave assisted Soxhlet extraction: devices and applications, *Talanta*, 64 (2004) 571-77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.054>
26. Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, OSNOVE ZNANOSTI O HRANI.
27. M. Pérez, I. Dominguez-López, R.M. Lamuela-Raventós. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern, *J. Agric. Food Chem.* 71 (2023) 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
28. S. Chamutpong, C.J. Chen, E.O. Chairateep. Optimization ultrasonic-microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Clinacanthus nutans* using response surface methodology, *J. adv. pharm. technol res.* 12 (2021) 190-195. [doi: 10.4103/japtr.JAPTR_344_20](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_344_20).
29. C. Latha. Microwave assisted extraction of embelin from *Embelia ribes*. *Biotechnol. Lett.* 9243 (2006) 10529. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9243-z>
30. O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernandez, J.M. Madariaga. Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*. 50 (1999) 345-57. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00028-4)
31. L. Wang, C.L. Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends. Food Sci. Technol.* 17 (2006) 300-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

-
32. M. Kingston, L. B. Jassie. (eds.) Introduction to Microwave Sample Preparation, American Chemical Society, Washington, DC, (1988).
33. M. Gao, B. Song, C. Lin. Dynamic microwave assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim. Cultured cells. *Biochem. Eng. J.* 332 (2006) 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.004>
34. X. Pan, G. Niu, H. Liu. Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process.* 42 (2003) 129-33. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(02)00037-5)
35. A. Singh, G.R. Nair, P. Liplap, Y. Garipey, V. Orsat, V. Raghavan. Effect of Dielectric Properties of a Solvent-Water Mixture Used in Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Potato Peels. *Antioxidants* 3 (2014) 99-113. <https://doi.org/10.3390/antiox3010099>
36. R.K. Roy. Design of Experiments using Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process, J. Willey and Sons, (2001). ISBN: 0471361011.
37. D.M. Osborne, R.L. Armacost. Review of techniques for optimizing multiple quality characteristics in product development, *Comput. Ind. Eng.* 31 (1996) 107-10. [https://doi.org/10.1016/0360-8352\(96\)00089-7](https://doi.org/10.1016/0360-8352(96)00089-7)
38. P. Rodríguez Seoane, N. Flórez-Fernández, E. Conde Piñeiro, H. Domínguez González, Chapter 6 - Microwave-Assisted Water Extraction, *Water Extraction of Bioactive Compounds*, Elsevier, (2017) Pages 163-198. ISBN 9780128093801. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00006-1>
39. G.C. Vidana Gamage, W.S. Choo. Effect of hot water, ultrasound, microwave, and pectinase-assisted extraction of anthocyanins from black goji berry for food application, *Heliyon*, 9 (2023) 14426. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14426>.
40. T. N. Pham, X.T. Le, V.T. Pham, H.T. Le. Effects of process parameters in microwave-assisted extraction on the anthocyanin-enriched extract from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and its storage conditions on the kinetic degradation of anthocyanins in the extract, *Heliyon*, 8 (2022) 09518. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09518>