

Elektrokemijska i spektrofotometrijska karakterizacija antioksidacijske aktivnosti ekstrakata dalmatinskog bilja

Kondža, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:167:809899>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ELEKTROKEMIJSKA I SPEKTROFOTOMETRIJSKA
KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI
EKSTRAKATA DALMATINSKOG BILJA**

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJA KONDŽA

Matični broj: 443

Split, prosinac 2023.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ELEKTROKEMIJSKA I SPEKTROFOTOMETRIJSKA
KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI
EKSTRAKATA DALMATINSKOG BILJA**

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJA KONDŽA

Matični broj: 443

Split, prosinac 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ELECTROCHEMICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC
CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
DALMATIAN PLANT EXTRACTS**

DIPLOMA THESIS

ANA MARIJA KONDŽA

Parent number: 443

Split, December, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Mentor: doc. dr. sc. Nives Vladislavić

ELEKTROKEMIJSKA I SPEKTROFOTOMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA DALMATINSKOG BILJA

Ana Marija Kondža, 443

Sažetak: Antioksidacijsko djelovanje prirodnih spojeva koji se nalaze u začинима, odnosno bilju procijenjeno je korištenjem elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda. Odabrane su karakteristične biljke dalmatinskog područja: ružmarin, lovor i smilje. U svrhu postizanja što bolje ekstrakcije testirane su 4 metode ekstrakcije bioaktivnih tvari iz vodenih pripravaka. Izrađena je elektroda od pirolitičkog grafita, površine $7,5 \times 10^{-4}$ cm², uz hipotezu kako će upravo izvanredne osobine ovog materijala omogućiti i olakšati prijenos elektrona između analita i elektrode. Optimiranjem parametara diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) pronađeni su uvjeti koji su dali visoku osjetljivost, selektivnost i reproducibilnost rezultata. Faktor 35,8 mA/cm² ukazao je na visoku osjetljivost i dobru linearnost ($R^2=0,980$) predložene metode. Uz odabrane parametre određena je koncentracija galne kiseline u realnim uzorcima DPV metodom. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost određena je i spektrofotometrijskim (SP) metodama. Kao najbolja metoda ekstrakcije prometnula se mikrovalna ekstrakcija za uzorke ružmarina i lovora, a jednostavna ekstrakcija na 100 °C u trajanju od 5 minuta za ekstrakte smilja.

Najveća koncentracija galne kiseline SP metodom uočena je u ekstraktu smilja, 917,1 mg dm⁻³, a najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena je u ekstraktu ružmarina potpomognuto mikrovalovima, 6406,4 μM Fe²⁺. Isti trend slijede i rezultati DPV metode. U svrhu procjene primjene elektrokemijskih metoda za određivanje galne kiseline, odnosno ukupnih fenola, napravljena je matematička korelacija između DPV i SP metoda. Konstantan odnos koncentracije galne kiseline dobiven DPV i SP metodom u iznosu približno 5,62 sugerira kako je predložena metoda pogodna za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima.

Ključne riječi: Diferencijalna pulsna voltametrija, dalmatinsko bilje, galna kiselina.

Rad sadrži: 66 stranica, 32 slike, 12 tablica, 75 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Antonija Čelan	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević	član
3. doc. dr. sc. Nives Vladislavić	mentor

Datum obrane:

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

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Supervisor: assistant professor Nives Vladislavić

ELECTROCHEMICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DALMATIAN PLANT EXTRACTS

Ana Marija Kondža, 443

Abstract: The antioxidant activity of small natural compounds found in spices and herbs was evaluated using electrochemical and spectrophotometric methods. The characteristic plants of the Dalmatian region were selected: rosemary, bay leaf and immortelle. In order to achieve the best possible extraction, 4 methods for the extraction of bioactive substances from aqueous preparations were tested. An electrode was made of pyrolytic graphite with a surface area of $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, hypothesizing that the exceptional properties of this material would enable and facilitate electron transfer between the analyte and the electrode. By optimizing the parameters of differential pulse voltammetry (DPV), conditions were found that ensure high sensitivity, selectivity and reproducibility of results. The factor $35,8 \text{ mA/cm}^2$ indicates a high sensitivity and good linearity ($R^2=0,980$) of the proposed method. Together with the selected parameters, the concentration of gallic acid in real samples was determined using the DPV method. The concentration of total phenols and antioxidant activity were also determined by spectrophotometric methods (SP). The best extraction method was microwave extraction for rosemary and bay leaf samples, simple extraction at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 minutes for the immortelle extract.

The highest gallic acid concentration by SP method was found in immortelle extract ($917,1 \text{ mg dm}^{-3}$) and the highest antioxidant activity in microwave-assisted rosemary extract ($6406,4 \text{ } \mu\text{M Fe}^{2+}$). The results of DPV method follow the same trend. To evaluate the application of electrochemical methods for the determination of gallic acid or total phenolics, a mathematical correlation was established between the DPV and SP methods. The constant ratio of the gallic acid concentration determined by the DPV and SP methods of about 5,62 indicates that the proposed method is suitable for the estimation of total phenols in real samples.

Keywords: Differential pulse voltammetry, Dalmatian herbs, Gallic acid.

Thesis contains: 66 pages, 32 figures, 12 tables, 75 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Antonija Čelan, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Ivana Škugor Rončević, PhD, associate prof. | member |
| 3. Nives Vladislavić, PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date:

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 srpnja do prosinca 2023. godine.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nives Vladislavić na pomoći, prenesenom znanju, beskonačnim savjetima, ljubaznosti te uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također, jedno veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Prirediti mikroelektrodu od pirolitičkog grafita debljine 25 μm , ukupne površine $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, (PGS - *Pyrolytic Graphite Sheet*) i ispitati elektrokemijsko ponašanje galne kiseline u odabranom priređenom umjetnom fiziološkom elektrolitu.
2. Pomoću EPG elektrode elektrokemijskim metodama ispitati pouzdanost, točnost i koncentracijsko područje primjene odabrane elektrode za kvantitativno određivanje galne kiseline, obzirom kako se klasične metode određivanja ukupnih fenola temelje na određivanju sadržaja upravo galne kiseline, kao dominantnog fenola.
3. Ekstrakciju smilja, lovora i ružmarina provesti iz vodenih otopina: u trajanju od 5 minuta na temperaturi 100 °C, te u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, potpomognuto ultrazvukom i potpomognuto mikrovalovima.
4. Svim ekstraktima odrediti koncentraciju galne kiseline diferencijalnom pulsnom voltametrijom, te ukupne fenole (kao elivalent galne kiselina) i antioksidacijsku aktivnost klasičnim spektrofotometrijskim metodama.
5. Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima dobivenim klasičnom metodom izvesti zaključke o mogućnosti primjene elektrokemijskih metoda u procjeni antioksidacijske aktivnosti. Usporedbom korelacijskih faktora procijeniti rezultate i moguću primjenu predložene metode.

SAŽETAK

Antioksidacijsko djelovanje prirodnih spojeva koji se nalaze u začinima, odnosno bilju, procijenjeno je korištenjem elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda. Odabrane su karakteristične biljke dalmatinskog područja: ružmarin, lovor i smilje. U svrhu postizanja što bolje ekstrakcije testirane su 4 metode ekstrakcije bioaktivnih tvari iz vodenih pripravaka. Izrađena je elektroda od pirolitičkog grafita, površine $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, uz hipotezu kako će upravo izvanredne osobine ovog materijala omogućiti i olakšati prijenos elektrona između analita i elektrode.

Optimiranjem parametara diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) pronađeni su uvjeti koji su dali visoku osjetljivost, selektivnost i reproducibilnost rezultata. Faktor 35,8 mA/cm^2 ukazao je na visoku osjetljivost i dobru linearnost ($R^2=0,980$) predložene metode.

Uz odabrane parametre određena je koncentracija galne kiseline u realnim uzorcima DPV metodom. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost određena je i spektrofotometrijskim (SP) metodama. Kao najbolja metoda ekstrakcije prometnula se mikrovalna ekstrakcija za uzorke ružmarina i lovora, a jednostavna ekstrakcija na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 5 minuta za ekstrakte smilja.

Najveća koncentracija galne kiseline SP metodom uočena je u ekstraktu smilja, $917,1 \text{ mg dm}^{-3}$, a najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena je u ekstraktu ružmarina potpomognuta mikrovalovima, $6406,4 \text{ } \mu\text{M Fe}^{2+}$. Isti trend slijede i rezultati DPV metode. U svrhu procjene primjene elektrokemijskih metoda za određivanje galne kiseline, odnosno ukupnih fenola, napravljena je matematička korelacija između DPV i SP metoda. Konstantan odnos koncentracije galne kiseline dobiven DPV i SP metodom u iznosu približno 5,62 sugerira kako je predložena metoda pogodna za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima.

Ključne riječi: Diferencijalna pulsna voltametrija, dalmatinsko bilje, galna kiselina.

ABSTRACT

The antioxidant activity of small natural compounds found in spices and herbs was evaluated using electrochemical and spectrophotometric methods. The characteristic plants of the Dalmatian region were selected: rosemary, bay leaf and immortelle. In order to achieve the best possible extraction, 4 methods for the extraction of bioactive substances from aqueous preparations were tested. An electrode was made of pyrolytic graphite with a surface area of $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, hypothesizing that the exceptional properties of this material would enable and facilitate electron transfer between the analyte and the electrode.

By optimizing the parameters of differential pulse voltammetry (DPV), conditions were found that ensure high sensitivity, selectivity and reproducibility of results. The factor $35,8 \text{ mA/cm}^2$ indicates a high sensitivity and good linearity ($R^2=0,980$) of the proposed method.

Together with the selected parameters, the concentration of gallic acid in real samples was determined using the DPV method. The concentration of total phenols and antioxidant activity were also determined by spectrophotometric methods (SP). The best extraction method was microwave extraction for rosemary and bay leaf samples, simple extraction at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 minutes for the immortelle extract.

The highest gallic acid concentration by SP method was found in immortelle extract ($917,1 \text{ mg GAE/L}$) and the highest antioxidant activity in MVE-assisted rosemary extract ($6406,4 \text{ } \mu\text{M Fe}^{2+}$). The results of DPV method follow the same trend. To evaluate the application of electrochemical methods for the determination of gallic acid, or total phenolics, a mathematical correlation was established between the DPV and SP methods. The constant ratio of the gallic acid concentration determined by the DPV and SP methods of about 5,62 indicates that the proposed method is suitable for the estimation of total phenols in real samples.

Keywords: Differential pulse voltammetry, Dalmatian herbs, Gallic acid.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Fenoli	2
1.2. Antioksidacijska aktivnost	3
1.3. Galna kiselina	5
1.4. Dalmatinsko bilje	7
1.4.1. Lovor	7
1.4.2. Ružmarin	10
1.4.3. Smilje	12
1.5. Ekstrakcija	14
1.5.1. „Zelena ekstrakcija“	16
1.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija	17
1.5.3. Mikrovalna ekstrakcija	19
1.6. Spektrofotometrija	21
1.6.1. Folin-Ciocalteu metoda	21
1.6.2. FRAP metoda	22
1.7. Voltometrija	23
1.7.1. Ciklička voltometrija (CV)	24
1.7.2. Diferencijalna pulsna voltometrija (DPV)	25
1.8. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM analiza)	26
2. EKSPERIMENTALNI DIO	27
2.1. Kemikalije i priprava otopina	27
2.2. Metode	29
2.2.1. Priprava elektroda	29
2.2.2. Pretražna elektronska mikroskopija – SEM	30
2.2.3. Elektrokemijska mjerenja	31
2.2.4. Spektrofotometrijska mjerenja	31
2.3. Priprava i karakterizacija realnih uzoraka	32
2.4. Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola	33
2.5. FRAP metoda (eng. <i>Ferric reducing/Antioxidant power</i>) - određivanje antioksidacijske aktivnosti	34

3.	REZULTATI I RASPRAVA	36
3.1.	Karakterizacija površine pripremljene EPG elektrode pretražnim elektronskim mikroskopom – SEM analiza	36
3.2.	Rezultati cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije	37
3.2.1.	Rezultati cikličke voltametrije	37
3.2.2.	Rezultati diferencijalne pulsne voltametrije	43
3.3.	Analitička primjena voltametrijskih metoda na realnim uzorcima	46
3.4.	Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja	49
3.5.	Usporedbe rezultata	54
4.	ZAKLJUČCI	56
5.	POPIS KRATICA I SIMBOLA	58
6.	LITERATURA	59

UVOD

Dalmacija, bogata autohtonim ljekovitim i ukrasnim biljem, privlači pažnju mnogih industrijskih i istraživačkih grana zbog izuzetnih svojstava koje biljke nude. Zbog otpornosti na jako sunce i oskudno tlo, biljke su razvile ljekovita svojstva, okuse i mirise. Svijest o zdravom načinu života i ujedno zdravoj prehrani, potakle su znanstvenike na istraživanje dobrobiti koje ove biljke posjeduju, a antioksidansi u tome igraju važnu ulogu.

Oksidativni stres je destruktivan za živi organizam te dovodi do razvoja i ubrzanja bolesti u ljudskom organizmu. Ljudsko tijelo u sebi ima ugrađen sustav antioksidacijske obrane koji nije dovoljan kako bi se potpuno obranilo od oštećenja koja nastaju, zbog čega se savjetuje primjena prehrambenih dodataka bogatih antioksidansima kao što su biljni proizvodi. Ključ za razumijevanje zdravstvenih dobrobiti temelji se na određivanju antioksidacijske aktivnosti.

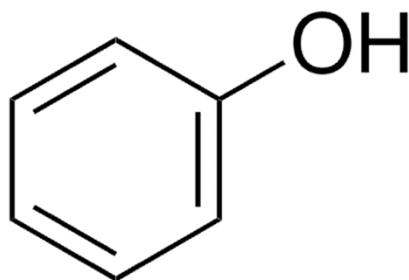
Određivanje antioksidacijskih svojstava biljaka i biljnih proizvoda zahtijeva odgovarajuće metode. Jedan od ciljeva ovog rada je usporediti rezultate ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata dalmatinskog bilja (lovora, ružmarina i smilja) dobivene različitim metodama ekstrakcije. Za određivanje navedenih karakteristika bilja mogu se koristiti spektrofotometrijske metode, odnosno Folin-Ciocalteu metoda i FRAP metoda, te elektrokemijske metode, odnosno ciklička voltometrija (CV) i diferencijalna pulsna voltometrija (DPV). Voltometrijske metode imaju za cilj potvrditi svoju brzinu i jednostavnost, ali i osjetljivost i preciznost. Izrađena EPG mikroelektroda omogućit će iznimnu osjetljivost koju daje pirolitički grafit i miniturizaciju izvedbe ćelije, što omogućava korištenja male količine uzorka.

Cilj ovog rada bio je utvrditi najpogodniju metodu za ekstrakciju bioaktivnih tvari iz odabranih uzoraka, od četiri testirane metode ekstrakcije. Sljedeći cilj istraživanja je bilo ispitati može li se izrađena EPG mikroelektroda pokazati kao osjetljiv senzor u elektrokemijskom istraživanju. Rezultati dobiveni spektrofotometrijskim i elektrokemijskim metodama su uspoređeni, a izvedeni zaključci o odabiru najprikladnije metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti ukazali su na uspješnost odabira metode.

1. OPĆI DIO

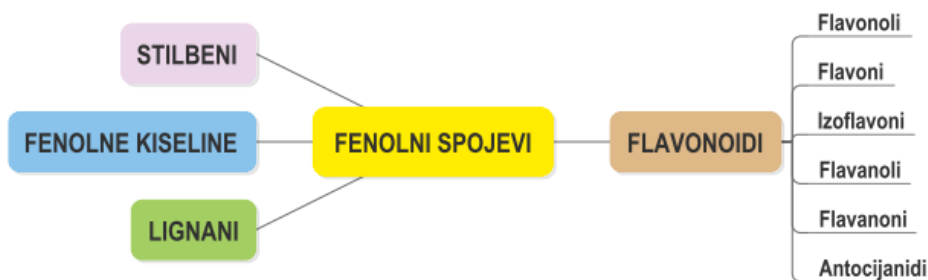
1.1. Fenoli

Fenoli predstavljaju skupinu organskih spojeva kod kojih se jedna ili više hidroksilnih funkcijskih skupina (-OH) izravno povezuje s aromatskim ugljikovodikom. Najjednostavniji predstavnik je fenol, C_6H_5OH , prikazan na Slici 1, a identificirano je više od 8000 strukturnih varijanti.^{1,2}



Slika 1. Struktura fenola.³

S obzirom na kemijsku strukturu, vrstu molekularne povezanosti te broj fenolnih prstenova dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, lignane i stilbene (Slika 2).^{4,5}



Slika 2. Podjela fenolnih spojeva.

Nastaju kao sekundarni metaboliti u tkivima biljke u svrhu zaštite od biotičkih (napadi životinja i patogenih organizama) i abiotičkih čimbenika (ekstremne temperature,

suše, poplave, pH, teški metali, zračenje). Na taj način su uključeni u signalizaciju i obrambene strategije prilikom interakcije biljke i okoliša te imaju strukturnu ulogu u zaštitnim i potpornim tkivima. Odgovorni su za organoleptičku (boja, miris, aroma) i nutritivnu kvalitetu biljke. Fenolni sastav varira s kultivarom te ovisi o stupnju zrelosti, izloženosti svjetlu, temperaturi, mineralnoj ishrani, mehaničkim oštećenjima te drugim faktorima. U glavne prehrambene izvore fenola spadaju začini, voće, povrće, sjemenke i ulja. Unos ovih spojeva u organizam predstavlja bitan čimbenik zaštite zdravlja, a razlikuje se zbog karakterističnih prehrambenih navika različitih kultura diljem svijeta. Također strukture prisutnih fenolnih spojeva u biljci imaju različita funkcionalna svojstva. Sudjeluju u uklanjanju slobodnih radikala, regeneraciji i zaštiti nekih drugih antioksidansa (npr. vitamina E) te keliranju prooksidativnih metalnih iona. Imaju ulogu u prevenciji raka, degenerativnih i kardiovaskularnih bolesti. Zbog svega navedenog ne čudi sve veći interes u znanosti za njihovu karakterizaciju i njihova upotreba i potrošnja u funkcionalnoj hrani i farmaceutskim proizvodima.^{2,6,7}

Za adekvatno proučavanje svojstava fenolnih spojeva od posebne je važnosti njihova analiza u biljnim uzorcima. Brojni antioksidativni testovi se provode u svrhu procjene antioksidacijske aktivnosti, a time i sama vrijednosti biljnog ekstrakta. Faza ekstrakcije je bitan korak koji utječe na otpuštanje analita iz biljne matrice u medij. Problem fenolnih spojeva je njihova nestabilnost i osjetljivost na kisik i svjetlo.^{3,7}

1.2. Antioksidacijska aktivnost

„Bez kisika nema života“, a s druge strane poznato je kako je upravo kisik jedan od krivaca za ubrzano starenje organizma, hrđanje željeza, kvarenje hrane. Oksidacija je proces koji je neizostavni dio prirodnog fiziološkog procesa u tijelu, ali reaktivni spojevi koji se nazivaju slobodni radikali također su dio ovog oksidacijskog procesa. Iako su poznati po svom štetnom djelovanju, tijelo proizvodi reaktivne radikale, upravo kako bi se obranilo od opasnosti iz okoliša, poput mikroorganizama ili zagađenog zraka.

Oksidativni stres predstavlja neravnotežu stanične antioksidativne obrane od pojave dušikovih reaktivnih vrsta (RNS) i kisikovih reaktivnih vrsta (ROS), te je destruktivan za

živi organizam. Povezuje ga se s razvojem i ubrzanjem bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, artritis, neplodnost, starenje i druge. U biološkim sustavima mogu nastati ozbiljne posljedice zbog povećanja oksidativnog stresa, kao što su molekularna oštećenja proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Posljedica je mutacija unutar stanice ili pak apoptoze ili nekroze (smrt) stanica. Problem koji nastaje u potpunom razumijevanju uloge oksidativnog stresa u organizmu povezan je sa kompleksnošću biološke matrice, velikom raznolikošću prisutnih kemijskih spojeva te kratkim životnim vijekom radikalnih spojeva koji imaju ključnu ulogu u mnogim životnim procesima. Razumijevanje je potrebno za kliničke studije, za odabir, optimizaciju i kontrolu kvalitete hrane i terapije te procjenu kvalitete hranjivih tvari, lijekova i kozmetike. Oksidansi se u principu definiraju kao štetne tvari, a antioksidansi ili reducensi, smanjuju ili inhibiraju procese oksidacije, te se smatraju neophodnim i zdravim spojevima. Pri tome uvijek treba imati na umu da u svemu, pa tako i u količini antioksidansa mora postojati ravnoteža u organizmu.⁸⁻¹⁰

Osim štetnih učinaka, ROS i RNS mogu imati i blagotvorne učinke na zdravlje, kao što je njihovo sudjelovanje u signalnim putevima te uključenost u stanične odgovore. To uvelike ovisi o njihovoj količini, funkciji i mjestu. Za životne procese ključna je ravnoteža korisnih i štetnih učinaka slobodnih radikala, dok su antioksidansi tu kako bi osigurali tu ravnotežu. Organizmi općenito imaju ugrađen sustav u smislu antioksidativne obrane i zaštite od oksidativnog stresa koji nije u potpunosti dovoljan zbog čega se savjetuje uporaba prehrambenih dodataka u svrhu smanjivanja oštećenja nastalih u ljudskom organizmu. Biljni proizvodi su vrlo popularni i cijenjeni prirodni antioksidansi koji sadrže karotenoide, minerale, glukozinolate, polifenole te vitamine. Problem prirodnih antioksidansa je njihova ograničena bioraspoloživost zbog niske apsorpcije i brze razgradnje. Bioraspoloživost ovisi o kemijskoj strukturi, učestalosti primjene, metodi prerade, lijekovima i prehrambenim aditivima koji se istodobno primjenjuju te genetskom i spolnom profilu.^{9,10,11}

Antioksidansi djeluju preventivno u smislu stvaranja slobodnih radikala i njihovih derivata, prekidaju reakcije oksidacije radikala ili inaktiviraju proizvode nastale reakcijama slobodnih radikala. Endogeni antioksidansi mogu biti enzimski (npr. katalaza (CAT),

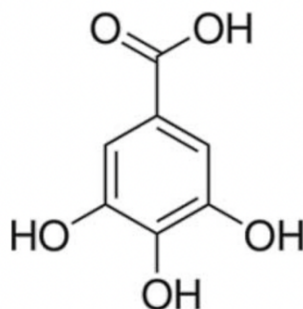
glutation reduktaza (GR), glutation peroksidaza (GPx), superoksidna dismutaza (SOD)) ili ne-enzimski (npr. lipoična kiselina i glutation) koji su nastali kao produkti metabolizma. Enzimski antioksidansi pretvaraju vodikov peroksid i reaktivni superoksid u kisik i vodu. Nadalje, ne-enzimski antioksidansi sudjeluju u obrani od ROS-a na način da velikom brzinom inaktiviraju oksidanse i radikale. Na posljetku, enzimski antioksidansi imaju ulogu detoksikacije. Antioksidativni testovi koji služe za procjenu antioksidacijske aktivnosti fitokemikalija biljnog podrijetla mogu se svrstati u pet kategorija.⁹

- Testovi koji se zasnivaju na prijenosu elektrona između antioksidansa i supstrata (npr. CUPRAC, FRAP te Colin-Ciocalteu metode)
- Testovi koji se zasnivaju na prijenosu atoma vodika s antioksidansa na supstrat (npr. ORAC i TRAP metode)
- Testovi koji se zasnivaju na mehanizmu prijenosa atoma vodika koji se odvija u 2 koraka: (npr. DPPH i TEAC metode)
- Testovi koji se zasnivaju na kelaciji antioksidansa s prijelaznim metalima, kao što su Cu(II) i Fe(II) (npr. metoda određivanja željezo-kelirajuće aktivnosti)
- Testovi koji se zasnivaju na moći koju antioksidansi posjeduju u sprječavanju ili smanjenju oksidacije lipida te čišćenju RNS-a i ROS-a (npr. FTC, TBA, HORAC i SRSA/SOD metode).

Nedostatak ovih testova su smetnje koje mogu nastati s fitokemikalijama i tvarima za bojanje, izbor ekstrakcijskog otapala, različita topljivost antioksidansa u njemu i brzina kemijske reakcije. Također određene metode nisu ekvivalentne, na primjer ORAC vrijednosti se ne mogu pretvoriti u FRAP vrijednosti putem faktora proporcionalnosti.⁹

1.3. Galna kiselina

Galna kiselina ili 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina, $C_6H_2(OH)_3COOH$, prikazana na Slici 3, je kristalna krutina bezbojne do blago žućkaste boje. Topljiva je u vodi, eteru, alkoholu i glicerolu, a netopljiva u kloroformu i benzenu.¹²



Slika 3. Kemijska struktura galne kiseline.¹²

Jedna je od glavnih fenolnih kiselina i nalazi se u mnogim biljkama u slobodnom obliku ili kao derivat u namirnicama, kao što su orašasti plodovi, čaj, vino, voće i povrće. Vezana je za proteine i minerale poput kalcija, cinka i željeza, te utječe na bioraspoloživost tih metala. Količina galne kiseline koja se nalazi u biljkama ovisi o vanjskim čimbenicima kao što su mikrobna kontaminacija, izloženost zračenju i skladištenje. Ekstrakciju iz prirodnih izvora moguće je provesti pomoću polarnih otapala poput etanola, metanola, vode ili njihovih smjesa.¹³

Galna kiselina posjeduje iznimna svojstva (antioksidacijska, antivirusna, anticelularna, antigljivična, antibakterijska, antialergijska) koja su utjecala na njezinu upotrebu u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj industriji i medicini. Štiti od oksidativnog stresa na način da apsorbira reaktivne kisikove vrste. Djeluje protiv tumora tako što izaziva apoptozu tumorskih stanica, a zbog svojih neuroprotektivnih učinaka istražuje se i za razvoj novih lijekova. Kemijskim promjenama u molekuli može utjecati na staničnu toksičnost bez utjecaja na normalne stanice. Služi i kao konzervans u hrani i pićima, koristi se u industriji kože, bojila, fotografiji, proizvodnji pirogalola i tinte.^{14,15}

Galna kiselina konvencionalno nastaje kiselom hidrolizom taninske kiseline. Tako dobivena galna kiselina je niske čistoće i visokih troškova proizvodnje. Moguće ju je proizvesti i mikrobnom hidrolizom taninske kiseline pomoću tanaze, enzima kojeg izlučuju mikroorganizmi, posebno gljivice roda *Penicillium* i *Aspergillus*.^{12,14,16}

1.4. Dalmatinsko bilje

Dalmaciju krasi velik broj samoniklog, ljekovitog, začinskog i aromatičnog bilja. Samo najjače i najotpornije vrste uspjele su preživjeti na siromašnom tlu, uz nedostatak hranjivih tvari i vode pod jakim suncem, čime su razvile jedinstvena ljekovita svojstva, okuse i miris. Generacijama se prenosilo znanje o načinu prikupljanja i samoj upotrebi takvog bilja. Kako prije, tako i u novije vrijeme, najveću primjenu biljke imaju u suhom stanju, a iskorištavat se mogu svi dijelovi biljke: podanak, korijen, stabljika, list, cvijet i plod. Anorganske i organske tvari koje biljci daju ljekovita svojstva predstavljaju najaktivnije i najvažnije sastavnice, a u njih se ubrajaju glikozidi, alkaloidi, tanini, gorke tvari, vitamini, enzimi, organske kiseline i sl. Aromatične biljke sadrže aktivne tvari koje imaju specijalnu aromu i miris. Izuzetna svojstva omogućavaju njihovu primjenu u terapijske svrhe, ali i za farmaceutsko-kemijsku sintezu. U najprepoznatljivije vrste dalmatinskog bilja ubrajaju se ružmarin, smilje, lovor, maslina, bršljan, čuvarkuća, komorač, Gospina trava, kadulja, metvica i druge.¹⁷⁻¹⁹

1.4.1. Lovor

Lovor (lat. *Laurus nobilis* L.) je zimzelena biljka koja pripada istoimenoj porodici lovora (lat. *Lauraceae*). U Tablici 1 prikazana je taksonomija vrste, a na Slici 4 njegova rasprostranjenost.²⁰

Tablica 1. Klasifikacija vrste *Laurus nobilis* L.²⁰

TAKSONOMIJA	NAZIV
Carstvo	<i>Plantae</i>
Koljeno	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lurales</i>
Porodica	<i>Lauraceae</i>
Rod	<i>Laurus</i>
Vrsta	<i>Laurus nobilis</i> L.



Slika 4. Geografska rasprostranjenost lovora u svijetu.

Podrijetlom je iz Male Azije, nastanjuje zemlje Sredozemnog mora, a pronalazi ga se i u Južnoj Americi. U Hrvatskoj je najrasprostranjeniji na otocima te uzduž cijele obale, pogotovo na području Trstena, Opatije, Brijuna i Lovrana. Raste pojedinačno ili uz ostalo zimzeleno grmlje gdje nastanjuje kamenjare i makije do 400 metara nadmorske visine. Odgovara mu vlažno i svježije propusno karbonatno-humusno tlo.^{20,21}

Lovor (Slika 5) može rasti kao grm ili stablo, s gustom i širokom krošnjom do 15 metara visine. Zadebljala kora mu omogućava preživljavanje nepovoljnih životnih uvjeta (oštećenja stabljike, požari, sušni uvjeti ...). Korijen je snažan i razvijen, omogućava veliku stabilnost biljke te prodire duboko u tlo u potrazi za vlagom i hranjivim tvarima. Također zbog razvijenosti štiti tlo od erozija. Kod mlađih stabala kora je glatka, sjajna i pepeljaste boje, dok je kod starijih stabala crna i hrapava. Listovi su usko eliptični sa šiljastim vrhom, na rubovima karakteristično valoviti. S donje strane su svijetlozelene, a s gornje tamnozeleno boje. Cvjeta sitnim žutim cvjetovima u ožujku i travnju, a cvijet vrlo brzo otpada. Plod je ovalnog oblika crne boje i sadrži jednu sjemenku. Može se razmnožavati vegetativno i generativno. Širok spektar korisnih tvari smješten je u lovorovom listu. Bere se tijekom cijele godine, uz izbjegavanje kiše i visoke vlažnosti prilikom branja, jer može doći do promjene boje i ubrzanog propadanja. Okus mu je gorak, aromatičan, ugodan i jak. Bogat je fenolnim spojevima, pogotovo fenolnim kiselinama i flavonoidima. Sadrži maslačnu (djeluje protuupalno, antikancerogeno, neutralizira učinke bakterija i virusa), laurinsku (djeluje antioksidativno, antibakterijski, antivirusno te antimikrobno) i mravlju kiselinu (djeluje antibakterijski i služi kao konzervans hrane). Ekstrakcijom (odnosno

vodenom destilacijom) lovorovog lista dobiva se eterično ulje svijetložute boje koje posjeduje karakterističnu začinsku aromu. Dokazano je da sušenje listova pri sobnoj temperaturi i sušenje u sušari ne utječu na gubitak količine eteričnog ulja.^{20,22}



Slika 5. Lovor (lat. *Laurus nobilis* L.).²³

Kvantitativni i kvalitativni sastav eteričnog ulja ovisi o zemljopisnom položaju, uvjetima tla, ekološkim uvjetima, klimatskim čimbenicima i načinu ekstrakcije. Glavni sastojak je 1,8- cineol, a među ostale najzastupljenije spojeve spadaju α -terpineol, α -terpinil acetat, sabinen, α -pinen, limonen i linalol.^{20, 24,25}

Lovor se u srednjem vijeku zbog svojih ljekovitih svojstava smatrao svetom biljkom, a cijenjen je i omiljen i u narodu. Uzgaja se kao kultivirana vrsta ili raste divlje. Koristi se za liječenje bolesti krvi, želuca, prostate i infekcija mokraćnih puteva i organa. Također se koristi u liječenju bolesti živčanog sustava, tjeskobe, depresije i stresa. Pridonosi oporavku dišnih organa prilikom prehlade i kašlja. Smanjuje razinu kolesterola i glukoze u krvi, te umanjuje rizik obolijevanja od dijabetesa i raka pluća. Sadrži vitamin A koji djeluje protiv očnih bolesti. Odličan je za aromaterapijske tretmane, pozitivno djeluje na limfni sustav i jača imunitet.²³

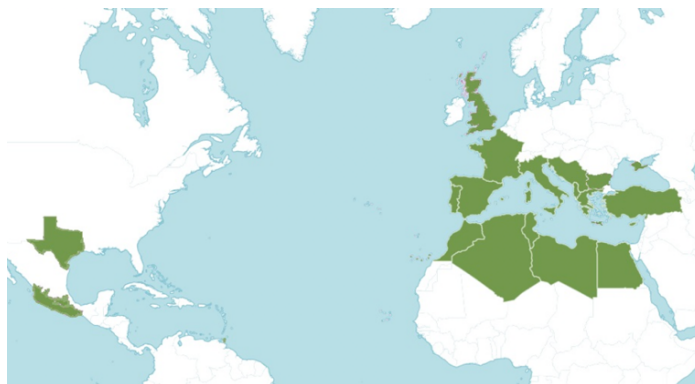
Kao začin se može dodavati juhama, varivima, umacima, ribljim jelima i mliječnim desertima. Koristi se prilikom konzerviranja suhog voća (primjerice smokava), začinjavanja octa i kiseljenja proizvoda za zimnicu. Također se koristi za sušenje ribe i mesa te kao dio gotovih začinskih smjesa. Lovor ima i izrazitu dekorativnu vrijednost zbog podnošenja rezidbe, lakog oblikovanja i zelene boje, a koristi se i kao zaštita od vjetra.²⁶

1.4.2. Ružmarin

Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis* L.) je višegodišnja biljka koja pripada porodici usnatica (lat. *Lamiaceae*). U Tablici 2 prikazana je taksonomija vrste, a na Slici 6 njegova rasprostranjenost.²⁷

Tablica 2. Klasifikacija vrste *Rosmarinus officinalis* L.²⁷

TAKSONOMIJA	NAZIV
Carstvo	<i>Plantae</i>
Koljeno	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>
Rod	<i>Salvia</i>
Vrsta	<i>Salvia rosmarinus</i> L.



Slika 6. Geografska rasprostranjenost ružmarina u svijetu.²⁸

Potječe iz mediteranskih krajeva, a nalazimo ga još u jugozapadnoj Aziji i Sjevernoj Americi. Raste na priobalnim područjima i otocima Mediterana, čiji su krajevi sunčani i kameniti. Njegovo ime potječe od latinskog naziva koje u prijevodu znači „morska rosa“. Pogoduje mu morski zrak, suha klima i tlo bogato kalcijem, a ne podnosi mraz i ne preživljava oštre zime. Danas se uzgaja svugdje na svijetu, pogotovo u Europi i Americi.^{27,29}

Ružmarin (Slika 7) može narasti do 3 metra u visinu u obliku razgranatog grma. Ima tanke, uske i sjajne listove, intenzivnog mirisa i gorkog okusa. Donja strana listova je sivo bijele, a gornja tamnozeleno boje. Stabljika mu je smolasta i drvenasta, a cvjetovi mali,

ljubičasto plave boje. Cvate u proljeće ili sredinom jeseni. Plod je kalavac koji se dijeli na 2 smeđa oraščića. Razmnožava se sjemenom, reznicama ili položenicama.²⁷



Slika 7. Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis* L.).^{30,31}

Uporaba ružmarina u svježem obliku nije toliko česta, dok se više upotrebljavaju suhi oblici. Koriste se cvjetovi, izdanci u cvatu, listovi i ekstrakti listova, u obliku tekućih i viskoznih pripravaka ili prašaka. Mogući su značajni gubitci i štete zbog različitog opterećenja prilikom berbe i daljnje obrade. Sadrži eterično ulje, gorke tvari, tanine, smolu i saponine.^{27,32}

Eterično ulje se dobiva parnom destilacijom biljnog lišća i cvijeta. Bezbojne je ili žućkaste boje čiji sastav ovisi o vlažnosti, klimatskim čimbenicima tokom uzgoja, genetskim čimbenicima i načinu ekstrakcije. Postoje tri kemotipa ružmarina s obzirom na kemijski sastav spojeva eteričnog ulja: verbenon, kamfor i cineol. Generalno najzastupljeniji spojevi su α -pinen, limonen, 1,8-cineol, kamfor, borneol i verbenon. Najznačajniji prisutni fenolni spojevi su karnosol, karnosolna kiselina i ružmarinska kiselina koji imaju izrazito antioksidacijsko djelovanje.^{30,33-35}

Ružmarin kao ljekovita i aromatična biljka ima visoku nutritivnu vrijednost i sadrži razne vitamine, minerale i masne kiseline. Posjeduje antimikrobna, antibakterijska, antireumatska, protuupalna, analgetska, antikancerogena i antioksidacijska svojstva. Predstavlja terapijsko sredstvo kod mnogih bolesti. Koristi se za smanjenje depresije i anksioznosti, a dokazano je da povećava performanse pamćenja. U tradicionalnoj narodnoj medicini koristio se u liječenju hiperglikemije, odnosno za snižavanja razine glukoze u krvi.^{34,36}

Listovi i ekstrakti listova imaju upotrebu u prehrambenoj industriji kao konzervansi hrane i kozmetike. Radi svojih antioksidativnih spojeva uspješno zamjenjuju sintetičke antioksidanse. Dodaje se kao začin ili mirisno sredstvo/aroma prehrambenim proizvodima, pićima i kozmetici. Djeluje kao feromon, odnosno može se koristiti kao ekološki prihvatljivo i učinkovito otapalo u postupku recikliranja polimera i posebnih ambalaža. Sirovo ulje se u zadnje vrijeme koristi kao prirodni insekticid u poljoprivredi, na primjer u suzbijanju lisnih ušiju i gljivica.^{30,33,34}

1.4.3. Smilje

Smilje (lat. *Helichrysum italicum*) je višegodišnja biljka iz porodice glavočika (lat. *Asteraceae*). U Tablici 3 prikazana je taksonomija vrste, a na Slici 8 njegova rasprostranjenost.³⁷

Tablica 3. Klasifikacija vrste *Helichrysum italicum*.³⁹

TAKSONOMIJA	NAZIV
Carstvo	<i>Plantae</i>
Koljeno	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Asterales</i>
Porodica	<i>Asteraceae</i>
Rod	<i>Helichrysum</i>
Vrsta	<i>Helichrysum italicum</i>



Slika 8. Geografska rasprostranjenost smilja u svijetu.

Smilje (Slika 9) je autohtona biljka Mediterana, najviše rasprostranjena u južnom dijelu Europe (Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Portugal, Italija i Španjolska). Također raste u Maloj Aziji i sjeverozapadnoj Africi, dok ga u Hrvatskoj najviše ima na području Dalmacije, Istre i Kvarnerskog primorja. Postoji nekoliko stotina vrsta, a najznačajnije su primorsko smilje (lat. *Helichrysum italicum*) i pješčarsko smilje (lat. *Helichrysum arenarium*). Uspijeva na stjenovitim travnjacima i kamenjarima do 2200 m nadmorske visine.



Slika 9. Smilje (lat. *Helichrysum italicum*).^{38,39}

Pogoduje mu drenirano i vapnenačko tlo, iako ga se pronalazi i na glinenom ili pjeskovitom tlu. Kao kultivirana vrsta može se uzgajati na istom tlu pet do osam godina. U obliku je grma s razgranatom stabljikom, uskim šiljastim listićima i može dosegnuti 20 - 70 cm visine ovisno o vrsti. Tipični je primjer kserofita, zbog gustih dlačica i zadebljale kutikule listova, čime sprječava transpiraciju i prilagođava se sušnim uvjetima. Također ima razgranat podzemni izdanak koji prodire duboko u tlo, sa širokim provodnim nitima kako bi protok vode išao brže. Sitni cvjetići skupljaju se u žuti cvat, nalaze se na vrhu stabljike i cvjetaju od svibnja do srpnja. Naziv „besmrtno cvijeće“ dolazi od antičke Grčke zbog dugog zadržavanja boje cvjetova čak i nakon sušenja. Plod je roška, a sjeme sitno i crno s puno zrna.^{38,40-42}

Smilje se u narodnoj medicini koristilo od davnina zbog brojnih terapijskih vrijednosti te danas postoji povećana potražnja na domaćem, ali i međunarodnom tržištu za izradu farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Smatra se da su prisutni flavonoidi i fenolne kiseline odgovorni za blagotvorne učinke na koži. Imaju visok antioksidacijski potencijal te u različitim fazama zacjeljivanja rana povećavaju sintezu kolagena. Utvrđeno je da ima

protuupalna, antimikrobna i antivirusna svojstva. Iskorištavaju se listovi, cvjetovi i stabljika, te se od njega dobivaju hidrolati, macerati i eterično ulje.^{42,43}

Eterično ulje se dobiva vodenom ili parnom destilacijom i posjeduje sjajna biološka svojstva. Vrlo je cijenjeno zbog svog mirisa zbog čega pronalazi primjenu u kozmetičkim proizvodima i parfemima. Postoji velika varijabilnost sastava eteričnog ulja koja ovisi o nadmorskoj visini, tlu, klimi, biljnoj genetici, vremenu berbe i metodi destilacije. Glavni identificirani spojevi su α -cedren, α -kurkumen, geranil acetat, limonen, nerol, neril acetat i α -pinen.^{38,41}

Hidrolat se upotrebljava u kozmetičkoj industriji gdje prilikom proizvodnje sapuna, losiona i krema služi kao vodena faza te time kozmetičkom pripravku osigurava dodatne aktivne komponente. Također se može nalaziti u toniku za pranje i njegu kože lica jer smiruje upale na koži, ubrzava zarastanje masnica, rana i ožiljaka. U aromaterapiji služi za smanjenje anksioznosti i stresa, a koristi se i u liječenju gingivitisa i paradontoze. Macerati se najviše koriste u kozmetici i medicini za tretiranje iritirane i oštećene kože, psorijaze, ekcema, varikoznih vena, hematoma, ožiljaka, opekлина, upala, strija, mrlja i bora. Smilje se koristi i za liječenje bolesti kardiovaskularnog, respiratornog i probavnog sustava. Služi za pripremu pića i kao začim. U novije doba ima primjenu i u razvoju novih insekticida.^{40,41,42}

1.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda koncentriranja i odjeljivanja tvari. Predstavlja početni korak prilikom izolacije i proučavanja biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Prilikom kvantitativne analize, ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljne matrice otežava njihova neravnomjerna raspoređenost u biljci. Sama učinkovitost ekstrakcije ovisi o kemijskom sastavu fenolnih spojeva, molekulskoj masi, položaju i broju hidroksilnih skupina, vremenu kontakta, interakciji s ostalim komponentama hrane, vrsti otapala, temperaturi i pH. Izbor otapala temelji se na polaritetu i kemijskoj prirodi antioksidacijskih spojeva koji se ekstrahiraju. Ako je riječ o polarnim otapalima onda se koriste voda, aceton, etanol, metanol, propanol te njihove vodene smjese, a ukoliko je riječ o nepolarnim otapalima tada se koriste mješavine heksana s metanolom, etanolom ili acetonom, ili mješavine etil acetata s etanolom, metanolom ili acetonom. U konvencionalne

metode ekstrakcije ubrajaju se vodena destilacija, destilacija vodenom parom, maceracija, hladno prešanje i ekstrakcija uljima. Nekonvencionalne metode ekstrakcije uključuju: tekućinsku ekstrakciju pod tlakom (PLE), superkrićnu tekućinsku ekstrakciju (SFE), ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE), ekstrakciju potpomognutu enzimima (EAE) te ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MAE).⁴⁴

Tablica 4 prikazuje prednosti i nedostatke razlićitih tehnika ekstrakcije fenolnih spojeva.⁴⁵⁻⁴⁸

Tablica 4. Prednosti i nedostatci razlićitih tehnika ekstrakcije fenolnih spojeva.

EKTRAKCIJSKA TEHNIKA	PREDNOSTI	NEDOSTATCI
Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)	<ul style="list-style-type: none"> - Ućinkovitost - Jednostavna upotreba - Široka primjena - Obrada termolabilnih spojeva i azeotropnih smjesa 	<ul style="list-style-type: none"> - Velike kolićine organskog otapala - Stvaranje emulzija - Loša selektivnost
Ekstrakcija ćvrste faze (SPE)	<ul style="list-style-type: none"> - Ne dolazi do stvaranja emulzija - Mogućnost korištenja malih kolićina otapala 	<ul style="list-style-type: none"> - Dugotrajna tehnika
Ultrazvućna ekstrakcija (UZV)	<ul style="list-style-type: none"> - Ućinkovitost i - Selektivnost - Brzina - Tehnika uštede energije - Mogućnost korištenja velikih volumena - Niska cijena 	<ul style="list-style-type: none"> -Ultrazvuk moćže dovesti do oksidacije lipida i nastajanja slobodnih radikala
Superkrićna tekućinska ekstrakcija (SFE)	<ul style="list-style-type: none"> - Brzina - Selektivnost - Proizvod bez zaostalog otapala 	<ul style="list-style-type: none"> - Visoki tlakovi - Veliki troškovi energije
Tekućinska ekstrakcija pod tlakom (PLE)	<ul style="list-style-type: none"> - Brzina - Mala potrošnja otapala 	<ul style="list-style-type: none"> - Loša selektivnost - Skupa oprema - Visoke temperature
Mikrovalna ekstrakcija (MVE)	<ul style="list-style-type: none"> - Jednostavnost - Brzina - Niska potrošnja energije - Mala kolićina otapala 	<ul style="list-style-type: none"> - Potrebno pravilno odabrati snagu u svrhu izbjegavanja visokih temperatura
Ekstrakcija potpomognuta enzimima (EAE)	<ul style="list-style-type: none"> - Niske temperature 	<ul style="list-style-type: none"> - Dugotrajan proces - Teško kontrolirati - Mogućnost otpuštanja nećistoća

1.5.1. „Zelena ekstrakcija“

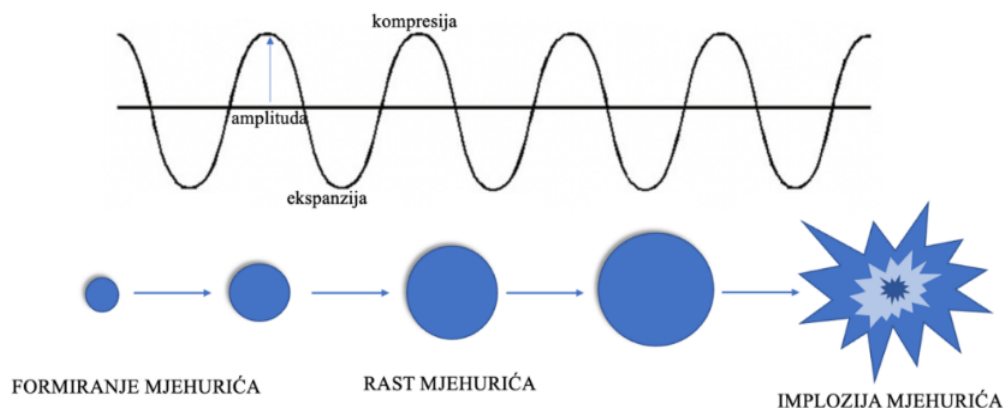
Zelena kemija općenito predstavlja primjenu, dizajn i izum procesa i kemijskih proizvoda za uklanjanje ili smanjenje stvaranja i uporabe opasnih tvari. Zelena ekstrakcija se temelji na dizajnu i otkrivanju procesa ekstrakcije koji omogućavaju upotrebu obnovljivih prirodnih izvora i alternativnih otapala te smanjenju potrošnje energije, kako bi na kraju rezultirala kvalitetnim i sigurnim proizvodom odnosno ekstraktom. Također za cilj ima smanjiti količinu otapala, vrijeme ekstrakcije, količinu otpada, troškove i utjecaj ekstrakcije na okoliš. Trenutačni postojeći propisi pokušavaju umanjiti upotrebu hlapljivih organskih spojeva (HOS) i petrokemijskih otapala. Organska otapala imaju učinak na „efekt staklenika“ i odgovorni su za zagađenje okoliša zbog svoje toksičnosti, hlapljivosti i zapaljivosti. U zamjenu za organska otapala, industrija se pokušava okrenuti zelenim otapalima odnosno „bio-otapalima“ koji su netoksični, nezapaljivi, biorazgradivi i imaju veliku moć otapanja. Najčešće bio-otapalo je etanol. Ima moć ekstrakcije polarnih spojeva iz biljnog materijala. Iako je potencijalno eksplozivan i lako zapaljiv, koristi se zbog svoje potpune biorazgradivosti, ima relativno nisku cijenu i moguće ga je nabaviti u visokoj čistoći. Superkritični fluidi predstavljaju tvari istovremeno komprimirane i zagrijane iznad kritične točke. Superkritični fluid kao što je CO₂ koristi se u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Može zamijeniti organsko otapalo heksan, a njegova upotreba omogućava dobivanje aktivnih sastojaka, mirisa i parfema bez tragova otapala. Primjenu imaju i ionske tekućine zbog svoje toplinske i kemijske stabilnosti, snage otapanja i nestvaranja hlapljivih organskih spojeva (HOS). Dilema je prisutna zbog toga što obuhvaćaju široku kategoriju kemijski različitih otapala i tekućina koje imaju različite karakteristike, dok većina njih pokazuje lošu biorazgradivost i visoku toksičnost. I na kraju kao najsvestranije i najpogodnije otapalo tu je voda, koja se zbog svoje polarne prirode može koristiti kao otapalo u području prirodnih proizvoda poput organskih kiselina, šećera, anorganskih tvari i proteina. Iako je dostupna, ima nisku cijenu i nizak potencijal opasnosti. Dielektričnom konstantom vode moguće je manipulirati promjenom temperature i tlaka čime se može podešavati topljivost organskih tvari. Brzinu reakcije moguće je ubrzati upotrebom superkritične vode ili ekstrakcije vrućom vodom pri visokom tlaku.⁴⁷⁻⁴⁹

Dobiveni ekstrakti moraju imati određena fizikalno-kemijska svojstva, dobiveni iz točno identificiranih sirovina, pravilno skladišteni i ne smiju sadržavati pesticide, mikotoksine, teške metale i dr. Cijeli proces, krenuvši od proizvodnje i žetve biljke, pa sve do konačnog marketinga mora biti kontroliran. Zeleni ekstrakt koji se dobije na kraju ima minimalni utjecaj na okoliš te mora postojati mogućnost njegova recikliranja (npr. biorazgradivosti).⁴⁹

1.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (UZV) primjenjuje ultrazvučne valove visokog intenziteta na tretirani uzorak hrane u cilju poboljšane ekstrakcije spojeva iz različitih matrica kao što su voće, povrće, cvijeće, čajevi i sjemenke. Konačni dobiveni proizvod ima veću čistoću u odnosu na onaj dobiven konvencionalnim metodama. Može se svrstati u tehnike zelene ekstrakcije zbog smanjene upotrebe količine otapala i energije, poboljšane ekstrakcije ciljanog spoja te povećane učinkovitosti ekstrakcije. Tehniku također odlikuje pojednostavljena manipulacija, brzina te je relativno jeftina. Najveću primjenu ima za sustave čvrsto/tekuće.^{50,51}

Prolaskom i širenjem ultrazvučnih valova kroz tekućinu dolazi do stvaranja kavitacijskih mjehurića koji akumuliraju određenu energiju (Slika 10).



Slika 10. Širenje ultrazvučnog vala kroz tekućinu.

Valovi dovode do poremećaja u sustavu i kavitacijski mjehurići dosežu kritičnu točku te implodiraju oslobađajući energiju. Dolazi do intermolekularnih interakcija matrice

uzorka i ciljnih spojeva. Mehanički učinci omogućavaju interakciju između uzorka i otapala, povećavaju topljivost smjese, poboljšavaju prijenos mase, dovode do oštećenja stanica (oslobađanja bioaktivnih spojeva) te smanjivanja veličine čestica.⁴⁷

Potrebno je točno definirati uvjete i kombinacije različitih varijabli procesa ovisno o vrsti uzorka, ultrazvučnoj snazi, temperaturi, vremenu, pripremi i količini uzorka te odabiru, koncentraciji i volumenu otapala. Uzorak koji se koristi može biti u svježem ili sušenom obliku čiji sastav, plastičnost i vlažnost imaju utjecaj na ekstrakciju. Matricu uzorka potrebno je prije ekstrakcije pravilno pripremiti, zbog osjetljivosti određenih spojeva na homogenizaciju, prosijavanje i sušenje, čime se sprječava gubitak određenih spojeva, osigurava potrebna veličina čestica, eliminiraju smetnje i povećava koncentracija analita u smjesi.^{47,52}

Izbor otapala predstavlja primarnu varijablu i odabire se na temelju topljivosti, viskoznosti, polariteta, pH, točke taljenja, točke vrenja, tlaka pare, površinske napetosti, gustoće te učinka na aktivnost i čistoću ekstrahiranog spoja. Fizikalno-kemijska i biokemijska svojstva otapala definiraju prirodu medija i utječu na interakciju s tretiranim materijalom i kasnije ekstrahiranim spojevima. Omjer 1:5 i 1:10 uzorak/otapalo prikladan je za proizvodnju koncentriranog ekstrakta, dok se veća količina otapala (omjer uzorka/otapala od 1:50, 1:100 ili više) koristi prilikom kvantitativne analize, jer omogućava potpuno uklanjanje ciljnih spojeva iz matrice uzorka. Veličina čestica također utječe na učinkovitost ekstrakcije. Prevelike čestice smanjuju difuziju ili propusnost otapala u uzorku, dok premale čestice mogu ostati na površini i tada kavitacijski mjehurići nemaju utjecaja na njih.⁴⁷

Ultrazvuk visokog intenziteta povećava amplitudu, dovodi do veće brzine kemijskih reakcija, veće brzine difuzije, a time i bolje učinkovitosti same ekstrakcije. Snaga ultrazvuka prilagođava se na temelju odabranog otapala, temperature medija te vlažnosti uzorka. Ukoliko se odabere prevelika snaga, može doći do razgradnje ciljnih spojeva. Većinom se nalazi u rasponu od 10 do 1000 W/cm². Najčešće korištena frekvencija kreće se između 20 i 120 kHz, dok najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuju ekstrakti dobiveni s većom frekvencijom (80 kHz). UZV je prikladna za nestabilne i termolabilne

spojeve, a za najbolje učinke koriste se temperature između 20 i 70°C. Potrebno vrijeme ekstrakcije razlikuje se od uzorka do uzorka i određuje se eksperimentalno, a ultrazvučna kupelj je najčešće korištena vrsta opreme.^{47,53}

1.5.3. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija (MVE) je napredna tehnika koja služi za ekstrakciju fenolnih spojeva kombinirajući tradicionalno ekstrakcijsko otapalo sa zagrijavanjem u mikrovalnom polju. Dolazi do izravne interakcije uzorka ili otapala s elektromagnetskim zračenjem, čime se uzorak 20-30 puta brže zagrijava nego što je to slučaj u konvencionalnim sustavima. Tehniku odlikuje minimalna količina otapala, bolji prinosi, smanjeno vrijeme ekstrakcije te povećana čistoća ekstrakta zbog čega se može svrstati u „zelene tehnike“ ekstrakcije. Mane tehnike uključuju velike gubitke energije i topline.⁵³

Elektromagnetski val koji se širi kroz uzorak sastoji se od dva okomita polja: magnetskog i električnog polja. Dvije pojave koje su uključene u proizvodnju topline su rotacija dipola i ionska provodljivost. Dipolna rotacija nastaje kao rezultat prilagođavanja dipolnih molekula izmjeničnom električnom polju. Otopljeni ioni migriraju i mijenjaju svoj tok zbog rotacije dipola, uzrokujući sudare i trenje među molekulama elektromagnetskog vala. Zbog uznemirenosti sustava, oslobađa se energija i temperatura raste. Dolazi do prijelaza mikrovalne energije u toplinsku. Također dolazi do pregrijavanja, isparavanja te oštećenja integriteta tkiva i spojevi od interesa, odnosno sekundarni metaboliti, se prenose u otapalo. Cijeli volumen uzorka se temeljito i ravnomjerno zagrijava konvekcijom čime se postižu veći prinosi ekstrahiranog spoja. Grijanje uz pomoć mikrovalne energije postao je popularan način zagrijavanja hrane upotrebom mikrovalnih pećnica u kućanstvu. Koriste elektromagnetske valove frekvencije od 300 MHz do 300 GHz. MVE je također moguće izvoditi uz pomoć modificirane mikrovalne pećnice, čiji je nedostatak nemogućnost kontroliranja temperature i tlaka u odnosu na komercijalnu MVE opremu. Za proces je potrebno pravilno odabrati kombinaciju varijabli kako bi ekstrakcija bila što učinkovitija. Parametri koju utječu su vrijeme ekstrakcije, temperatura, vrsta otapala, omjer krutine i otapala, mikrovalna snaga, veličina i karakteristike biljnog materijala.⁵³⁻⁵⁵

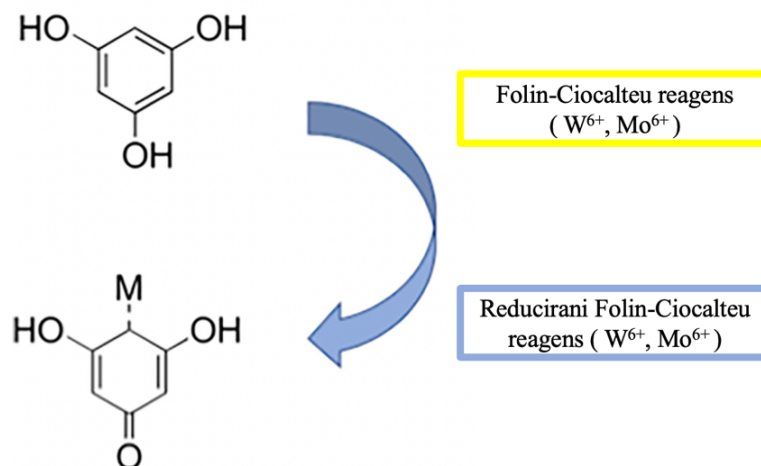
Jedan od osnovnih čimbenika je izbor otapala koji ovisi o točki vrenja, tlaku pare, viskoznosti, reaktivnosti, toksičnosti, sposobnosti otapanja drugih spojeva, trošku i dr. Materijali s visokom dielektričnom konstantom mogu bolje apsorbirati mikrovalnu energiju, pretvoriti je u toplinu i olakšati ekstrakciju ciljnih spojeva. Polarna otapala (metanol, etanol, etil acetat,..) služe za ekstrakciju hidrofilnih sekundarnih metabolita, dok se nepolarna otapala (eter, heksan,..) koriste prilikom ekstrakcije lipofilnih komponenti iz biljaka. Voda je jeftino, netoksično otapalo, poboljšava prodor otapala u biljni materijal i dovodi do boljeg prinosa ekstrakcije. Nedostatci vode uključuju mogućnost razvijanja bakterija i plijesni, razgradnje ili hidrolize biljnog materijala te visoke temperature potrebne za isparavanje. Omjer matrice i otapala mora biti dovoljan kako bi se biljni materijal mogao u potpunosti otopiti u otapalu. Bez dovoljne količine otapala sekundarni metaboliti će se u matrici sporo kretati, a prevelika količina može dovesti do neravnomjerne raspodjele i slabije izloženosti mikrovalnom zračenju. Manja veličina čestica biljnog uzorka omogućuje veću kontaktnu površinu uzorka s otapalom. Biljni materijal koji se koristi za ekstrakciju većinom je u osušenom obliku i sadrži malu količinu zaostale vlage. Rehidriranjem osušenog materijala povećava se osjetljivost na dielektrične učinke, a prisutna voda dovodi i do bubrenja biljne matrice.⁵⁵

Povećanje mikrovalne snage može povećati prinos i smanjit vrijeme potrebno za ekstrakciju, ne prelazeći granicu pri kojoj dolazi do toplinske razgradnje spojeva. Povećanjem snage, povećava se temperatura, a time i topljivost. Preporučeni temperaturni rasponi kreću se od 30 do 140°C i biraju na temelju stabilnosti spoja od interesa. Miješanje sustava dovodi do boljeg oslobađanja i otapanja spojeva u otapalu. Potrebno je kontrolirati vrijeme kako ne bi došlo do oksidacije i toplinske razgradnje spojeva, a također je moguće nadodavati novo otapalo u uzorak određeni broj ciklusa tijekom procesa.⁵⁶

1.6. Spektrofotometrija

1.6.1. Folin-Ciocalteu metoda

Folin-Ciocalteu metoda je spektrofotometrijska metoda koja služi za kvantifikaciju i određivanje ukupnih fenola u širokom rasponu matrica kao što su hrana biljnog podrijetla i biljna tkiva. Za izražavanje rezultata u obliku kvantitativnih podataka koristi se galna kiselina kao najčešća referentna molekula, pa se metoda naziva još i metodom ekvivalencije galne kiseline (GAE). Prvobitno su je Otto Folin i Vintil Ciocalteu 1927. godine osmislili za otkrivanje triptofana i tirozina u proteinima, a danas ima primjenu i u ljudskim biološkim uzorcima kao što su krv i urin. Folin–Ciocalteuov reagens (FCR) predstavlja smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. U nereduciranom obliku reagens je žute boje. Njegovim dodatkom fenolne grupe oksidiraju do kinona, dok se reagens reducira uz nastajanje volframovih i molibdenovih oksida plave boje (Slika 11). Reakcija se odvija u alkalnom mediju.⁵⁷⁻⁶⁰



Slika 11. Redukcija Folin-Ciocalteu reagensa.⁶¹

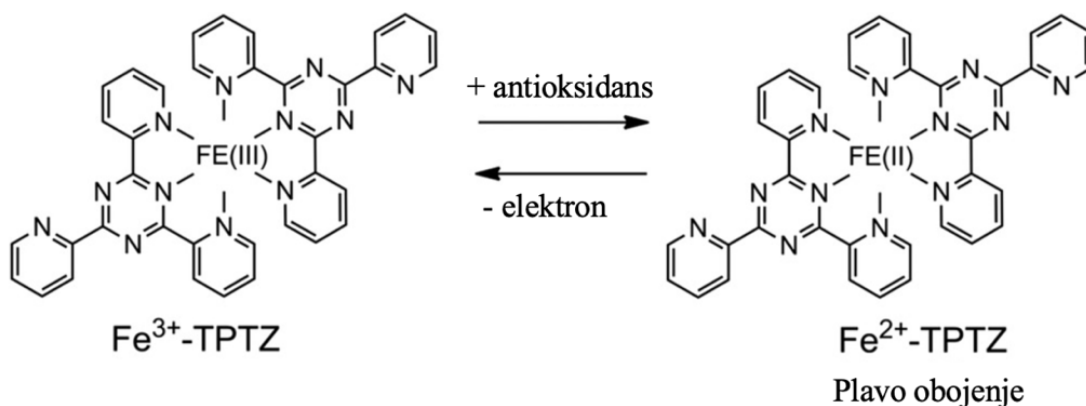
Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije odnosno intenziteta obojenja na oko 760 nm. Fenoli prisutni u otopini odredit će intenzitet plavog obojenja. Boja nije stabilna i tijekom prvih 30 minuta razvija se plavo obojenje koje nakon toga prelazi u tamno plavo obojenje. Test je osjetljiv na vrijeme reakcije, temperaturu i pH zbog čega se, za dobivanje što pouzdanijih rezultata, pažljivo moraju odabrati uvjeti reakcije. Moguće su određene

interferencije sa spojevima kao što su proteini, askorbinska kiselina, aminokiseline, organske kiseline i dr. te oni mogu ometati točnost Folin-Ciocalteu testa. Prednosti ove spektrofotometrijske metode uključuju brzinu, jednostavnost, ponovljivost i nisku cijenu.^{59,61}

1.6.2. FRAP metoda

FRAP metoda – FRAP (*Ferric reducing/Antioxidant power*) je kolorimetrijska metoda kojom se određuje antioksidacijska aktivnost. Razvili su je znanstvenici Benzie i Strain 1996. godine za određivanje antioksidacijske aktivnosti krvne plazme, dok danas ima primjenu u mnogim poljima.⁶²

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, začинима i dr. Također ju je moguće koristiti za otkrivanje onečišćene vode i proučavanje učinka onečišćenja, zračenja i klimatskih promjena na žive organizme. Test se temelji na redukciji kompleksa Fe^{3+} - ligand stvarajući plavo obojeni kompleks Fe^{2+} - ligand nakon interakcije s potencijalnim antioksidansom. Najčešći ligand je TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (Slika 12), ali su mogući i drugi alternativni ligandi, kao što je ferozin koji se koristi za procjenu antioksidacijske aktivnosti askorbinske kiseline. Mjeri se promjena apsorbancije pri 593 nm i rezultati izražavaju u obliku mikromolarnih ekvivalenata Fe^{2+} ili u odnosu na standardni antioksidans. Reakcijski uvjeti moraju biti kiseli (pH = 3,6) kako bi se mogla održati topljivost željeza. FRAP test ne zahtjeva dodatnu opremu i metoda je jednostavna, isplativa i brza.^{63,64}



Slika 12. Formiranje $\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$ kompleksa iz $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$ kompleksa pomoću antioksidansa.⁶⁵

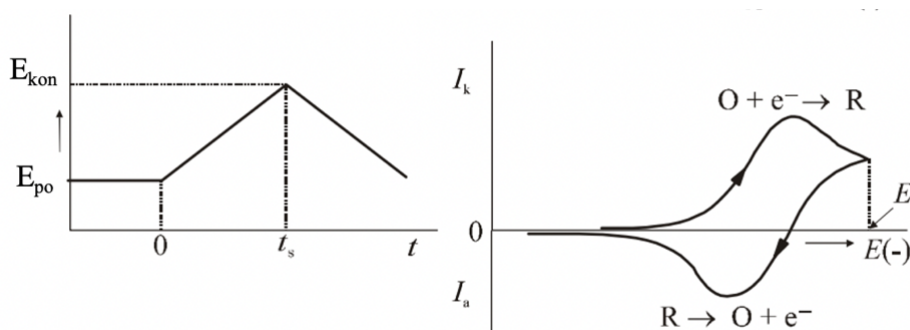
1.7. Voltometrija

Voltometrija, kao elektrokemijska tehnika, pruža informacije o analitu na temelju mjerenja struje prilikom promjene potencijala tj. koncentracija elektroaktivne vrste mijenja se na površini elektrode, oksidacijom ili redukcijom, zbog primijenjenog potencijala. Jedinice voltometrijskog instrumenta uključuju računalo i potenciostat koji su povezani sa elektrokemijskom ćelijom. Potenciostatom se mijenja potencijal i mjeri struja, dok se u ćeliji odvija voltometrijski proces. Ćelija sadrži otopinu analita, ionski elektrolit i 3 uronjene elektrode: radnu, referentnu i protuelektrodu. Radna elektroda trebala bi biti poznatih površinskih karakteristika i dimenzija te se na njoj odvija redoks reakcija. Protuelektroda omogućava tok električne struje i većinom je načinjena od ugljika, grafita, zlata ili platine. Referentnom elektrodom omogućeno je reguliranje pobudnog signala i mjerenje odzivnog signala, a većinom je Ag/AgCl elektroda.⁶⁶

Voltometrija omogućava kvantitativno određivanje organskih i anorganskih tvari, analizu oksidacijskih i redukcijskih procesa u raznim medijima, proučavanje mehanizama prijenosa elektrona, adsorpcijskih procesa te analizu složenih smjesa. Prednosti voltometrijskih tehnika uključuju visoku osjetljivost, mogućnost primjene brojnih elektrolita i otapala, širok raspon koncentracija (10^{-12} do 10^{-1} mol dm^{-3}) i radnih temperatura, procjenu kinetičkih parametara te brzinu analize.⁶⁷

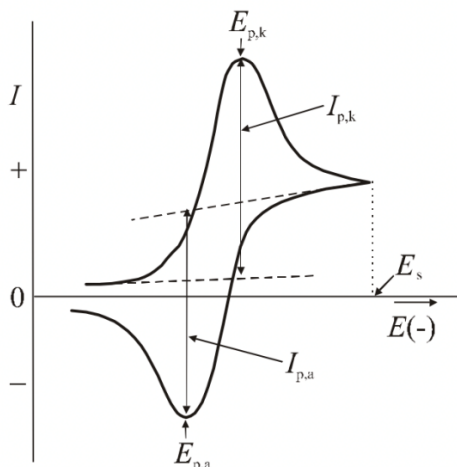
1.7.1. Ciklička voltometrija (CV)

Ciklička voltometrija (CV) je tehnika koja se koristi u mnogim područjima elektroanalitičke kemije. Daje informacije o mehanizmima i kinetici redoks reakcija, služi za određivanje broja izmijenjenih elektrona, određivanje redoks potencijala te proučavanje kemijskih reakcija i adsorpcijskih procesa prilikom prijenosa ili izmjene elektrona. Granica detekcije doseže 10^{-5} do 10^{-6} mol dm^{-3} pa se rijetko primjenjuje za kvantitativnu analizu. Potencijal između radne i referentne elektrode predstavlja signal pobude, a između radne elektrode i protuelektrode protječe struja koja predstavlja signal odziva. Primijenjeni potencijal linearno raste s vremenom od početnog potencijala (E_{po}) do konačnog potencijala (E_{kon}), nakon čega mijenja svoj smjer unatrag, dok se za to vrijeme bilježi struja (Slika 13).^{66,67}



Slika 13. Signal pobude (lijevo) i signal odziva (desno) u cikličkoj voltometriji.⁶⁶

Potencijal se približava redoks potencijalu karakterističnog analita i struja raste, a kada prijeđe redoks potencijal nastaje strujni vrh. Jakost struje zatim opada, jer se koncentracija analita koja je u blizini elektrode smanjuje. Potencijal se vraća nazad na početnu vrijednost i zbiva se oksidacija/redukcija produkata. Oblik dobivenog voltamograma ovisi o kemijskim i redoks reakcijama, ali i brzinama prijenosa elektrona i tvari. Parametri koji se određuju su vršni potencijal anode i katode ($E_{p,a}$ i $E_{p,k}$) te vršna struja anode i katode ($I_{p,a}$ i $I_{p,k}$) (Slika 14).⁶⁶



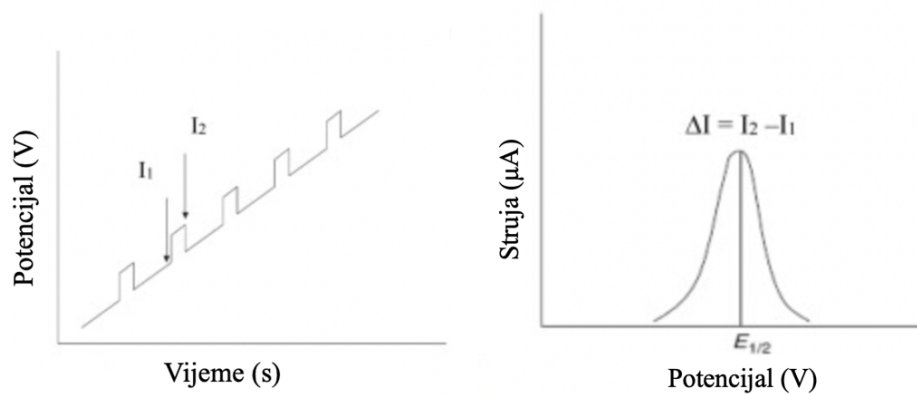
Slika 14. Ciklički voltamogram.⁶⁶

Brzina skeniranja ili brzina promjene potencijala (eng. *scan rate*) većinom je ista naprijed i nazad, a zbog mogućnosti promjene u širokim razmjerima, moguća su ispitivanja sporih, kao i vrlo brzih reakcija. U cikličkoj voltametriji postoje ograničenja zbog niske rezolucije složenih medija, kao što su biološke tekućine ili pića pa se često povezuje sa spektroskopskim metodama, ali se pokazala korisnom i za određivanje antioksidacijskog kapaciteta plazme, tjelesnih tekućina i homogenata biljnih i životinjskih tkiva.⁶⁸

1.7.2. Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV)

Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) je tehnika kod koje se na radnu elektrodu primjenjuju kratkotrajni pulsevi određenih veličina dodani na linearno rastući potencijal. Kratkotrajni pulsevi predstavljaju signal pobude i u trajanju su od 5 do 100 ms i amplitude 10 do 100 mV. Struja se mjeri neposredno prije primjene impulsa te na kraju impulsa, a razlika između tih vrijednosti bilježi se kao funkcija potencijala te predstavlja signal odziva. Voltamogram ima vrlo izražen pik, a najviša proizvedena vršna struja je proporcionalna koncentraciji analita (Slika 15). Prednosti metode uključuju istodobno otkrivanje više različitih tvari, potrebu za malom količinom analita i veliku osjetljivost. Ima nisku granicu detekcije (do 10^{-8} mol dm⁻³) i pogodna je za otkrivanje analita u tragovima. Općenito se koristi za kvantitativno određivanje tvari u uzorcima, biološkim tekućinama i tkivima, proučavanje mehanizama, termodinamike i kinetike reakcija te fenomena

adsorpcije. Kao i ostale elektroanalitičke metode, nedostatak tehnike uključuje ponekad dulje vrijeme mjerenja i poteškoće prilikom istraživanja složenih sustava, zbog različitih signala odziva i nemogućnosti njihova razdvajanja, odnosno diferenciranja.^{67,68}



Slika 15. Signal pobude i signal odziva diferencijalne pulsne voltametrije.⁶⁹

1.8. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM analiza)

Tehnika pretražne elektronske mikroskopije (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) koristi se za dobivanje visokorezolucijske slike istraživnog objekta, odnosno površine uzorka. Koristi snop elektronskih zraka, odnosno signal pobude predstavljaju elektroni koji se reflektiraju od površinu uzorka dajući sliku. Dobivena slika predstavlja morfologiju površine snimljenog dijela uzorka, uz to da je moguće dobiti i trodimenzionalni prikaz. Izuzetno je bitna metoda za istraživanje morfologije i složenih struktura. Visokim uvećanjem moguće je dobiti informacije na molekulskim ili atomskim razinama uzorka, te informacije o njihovom rasporedu unutar uzorka.

Princip rada SEM-a temelji se na propuštanju struje prema katodi gdje se elektroni generiraju. Zbog visokog napona elektroni putuju ubrzano prema anodi i kroz fine otvore formiraju zrake koje odlaze do površine uzorka gdje oslobađaju sekundarne elektrone i povratno raspršene elektrone. Detektor tada prikuplja sekundarne elektrone i pomoću cijevi fotomultiplikatora formira električni signal. Povratno raspršeni elektroni služe za identificiranje područja radi sposobnosti razlikovanja elemenata odnosno kvalitativne analize uzorka ili elemenata.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i priprava otopina

U Tablici 5 su navedene kemikalije korištene za pripravu otopina prilikom izvedbe eksperimenta:

Tablica 5. 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

Otopina dušične kiseline ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$)

U odmjernu tikvicu od 1 dm³ dodati 34,62 cm³ HNO₃ ($W = 65\%$) i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Otopina se koristi za ciklizaciju prilikom čišćenja elektrode i za ispiranje ćelije.

Umjetna želučana kiselina - *Artificial stomach acid* – ASA; pH = 1,45

Želučana kiselina sadrži klorovodičnu kiselinu čija je koncentracija oko 0,155 mol dm⁻³ (pH = 1,45). Također kao jedne od glavnih sastojaka sadrži natrijeve i kalijeve katione. Kako bi se pripremio 1 dm³ želučane kiseline, u čašu odgovarajuće veličine staviti 800 cm³ destilirane vode i 13,31 cm³ klorovodične kiseline. Nakon toga dodati 5 g kalijevog klorida i 5 g natrijevog klorida. Tako pripremljenu otopinu prebaciti u odmjernu tikvicu i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Priprava otopine galne kiseline ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 25 \text{ cm}^3$)

U odmjernu tikvicu od 10 cm^3 dodati $0,17 \text{ g}$ galne kiseline i destiliranom vodom nadopuniti do oznake.

Zasićena otopina natrijeva karbonata

100 g bezvodnog natrijevog karbonata (Na_2CO_3) kuhanjem otopiti u 500 cm^3 vode. Ohladiti na sobnoj temperaturi uz dodatak nekoliko kristala natrijeva karbonata i filtrirati nakon 24 sata.

Priprava acetatnog pufera ($c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$, $\text{pH} = 3,6$)

U odmjernu tikvicu od 1 dm^3 otopiti $3,1 \text{ g}$ natrijevog acetata, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ i 16 cm^3 koncentrirane octene kiseline, CH_3COOH s destiliranom vodom.

Priprava klorovodične kiseline ($c = 0,040 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ dm}^3$)

U odmjernu tikvicu od 1 dm^3 staviti 400 cm^3 $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ HCl i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

Priprava otopine TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin)

$159,4 \text{ mg}$ TPTZ-a otopiti u 50 cm^3 klorovodične kiseline.

Priprava otopine željezova(III) klorida ($c = 0,020 \text{ mol dm}^{-3}$ $V = 0,10 \text{ dm}^3$)

U 100 cm^3 destilirane vode otopiti $551,6 \text{ mg}$ željezo(III) klorida ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$).

Priprava matične otopine standarda Fe^{2+}

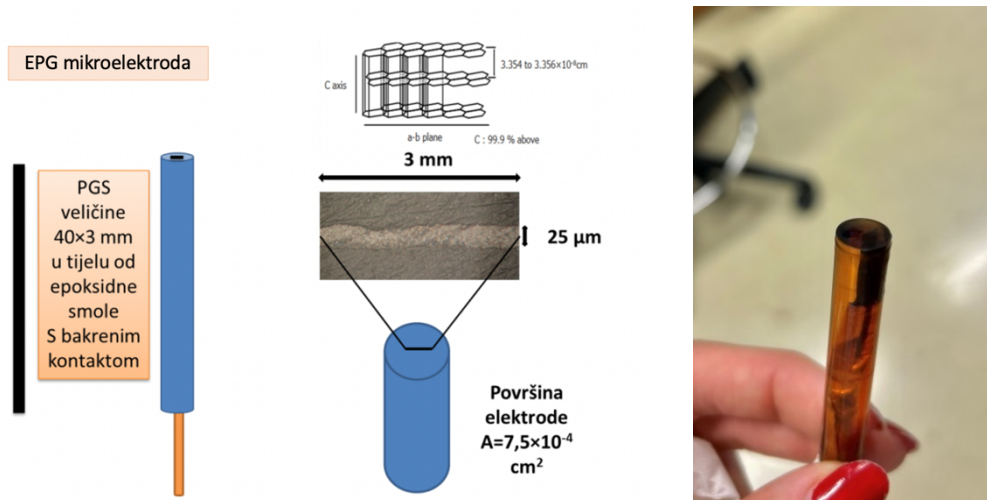
Matična otopina standarda pripravljena je otapanjem željezova(II) sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Od nje su dalje pripravljene otopine različitih koncentracija Fe^{2+} iona, od 100 - $1000 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Priprema radnog FRAP reagensa

FRAP reagens pripravlja se svaki put neposredno prije mjerenja od: 25 cm³ acetatnog pufera, 2,5 cm³ otopine TPTZ-a i 2,5 cm³ otopine FeCl₃ × 6 H₂O.

2.2. Metode

Na Slici 16 prikazano je tijelo radne elektrode.



Slika 16. Tijek pripreme i tijelo radne elektrode - Presjek EPG elektrode - osjetilni dio površine $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ izliven u tijelu od epoksidne smole.

2.2.1. Priprava elektroda

Priprava EPG radne elektrode

$$\text{Površina elektroda: } r^2\pi = 7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 = 0,075 \text{ mm}^2$$

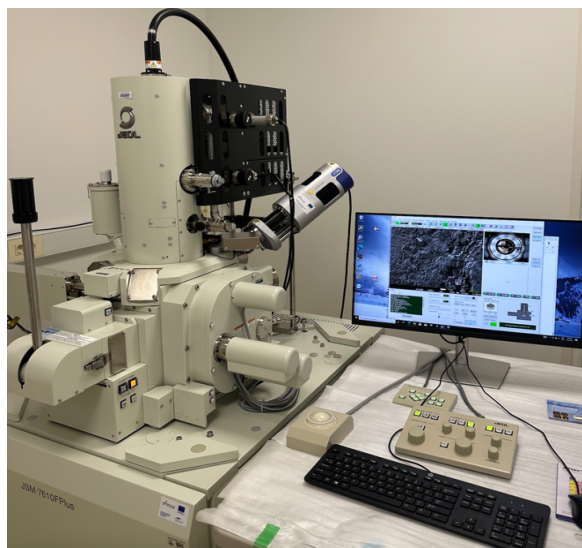
U ovom radu izrađena je mikroelektroda od presjeka lista pirolitičkog grafita. List je dužine 3 mm i debljine 25 μm. U presjeku lista od 25 μm nalazi se približno 75 000 ploha grafita, te je površina mikroelektrode iznosila $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$. Pirolitički grafenski list korišten za njenu izradu (PGS - Pyrolytic Graphite Sheet - Panasonic EYGS121803 Thermal Interface Products) je sintetički izrađen od visoko orijentiranog grafitnog polimernog filma, vrlo tanak i lagan s izvrsnom toplinskom vodljivošću. Materijal je izuzetno fleksibilan i može se jednostavno rezati i obrezivati u prilagodljive oblike. Gustoća: 1,90 g/cm³, toplinska vodljivost od 1600 W/(mK), električna provodljivost

približno 20 000 S/cm, egzistencijalna snaga od 30,0 MPa, koeficijent ekspanzije jednak $9,3 \times 10^{-7}$ 1/K, te toplinska otpornost do 400 °C čine ga izvrsnim materijalom za izradu elektroničkih sklopova.⁷⁰

Neposredno prije mjerenja provedena je mehanička, kemijska i elektrokemijska predobrada površine elektrode u svrhu postizanja njezine jednolične površine. To uključuje brušenje brusnim papirima različite finoće, te finu obradu površine, poliranjem prahovima aluminijevog oksida (Al_2O_3), promjera zrnaca 1,0 i 0,05 μm . Elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom i etanolom, osušiti u atmosferi dušika i pozicionirati na mjesto u elektrokemijskoj ćeliji. Elektroda je elektrokemijski aktivirana u 0,5 mol dm^{-3} dušičnoj kiselini u rasponu potencijala izlučivanja vodika i kisika.

2.2.2. Pretražna elektronska mikroskopija – SEM

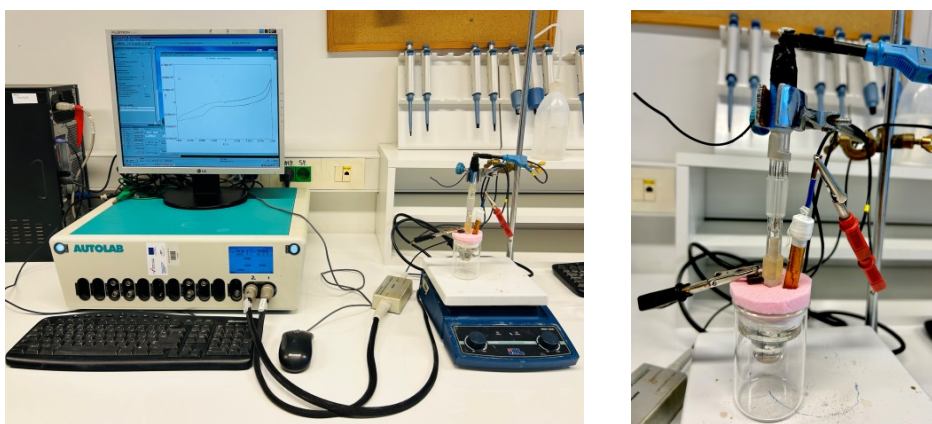
Površina EPG elektrode je karakterizirana pretražnom elektronskom mikroskopijom visoke razlučivosti (SEM). Analiza je napravljena pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (JEOL JSM – 7610F Plus) na 0,5 kV SEI (Slika 17).



Slika 17. SEM/EDS JEOL JSM – 7610F Plus.

2.2.3. Elektrokemijska mjerenja

Svi elektrokemijski eksperimenti izvedeni su pomoću potenciostata u standardnoj troelektrodnoj ćeliji volumena 10 cm³. Na slici 18 prikazana je fotografija potenciostata, Autolab PGSTAT 302N sa softverom za prikupljanje i obradu podataka, GPES 4,9 Softwarea (*Eco Chemie, Eco Utrecht, Nizozemska*) koji je spojen na osobno računalo. Sve promjene su bilježene cikličkom voltametrijom u širokom rasponu potencijala od -1,0 do 1,0 V u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu. Kao protuelektroda korištena je elektroda od platinskog lima.



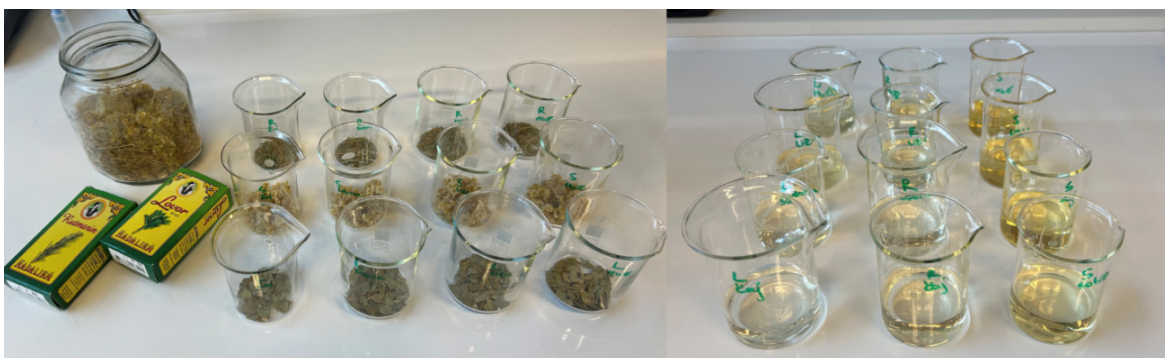
Slika 18. Uređaj Autolab PGSTAT 302N, spojen na računalo i troelektrodna ćelija.

2.2.4. Spektrofotometrijska mjerenja

Za spektrofotometrijska mjerenja korišten je spektrofotometar Cary 5000 UV-Vis-NIR, 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.

2.3. Priprava i karakterizacija realnih uzoraka

Na slici 19 su prikazani odabrani realni uzorci: lovor, ružmarin i smilje.



Slika 19. Odabrani realni uzorci: lovor, ružmarin i smilje i njihovi ekstrakti dobiveni različitim metodama ekstrakcije.

Realni uzorci pripremljeni su ekstrakcijom 5 g biljnog materijala u 200 cm³ redestilirane vode pomoću 4 različite metode ekstrakcije. Tablica 6 prikazuje 4 metode ekstrakcije biljnog materijala korištene u ovom radu.

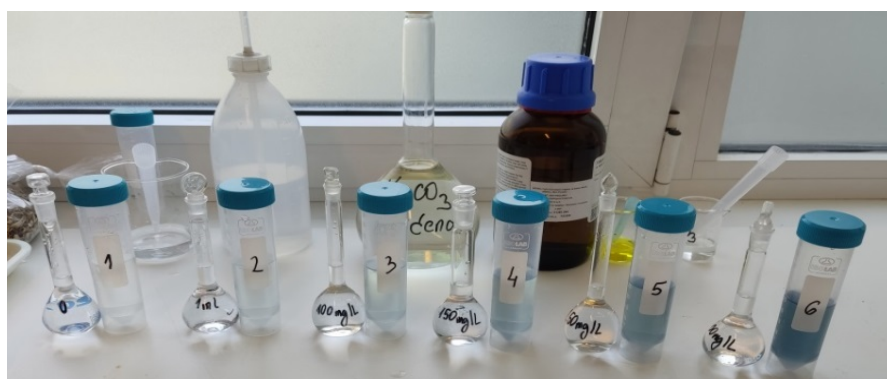
Tablica 6. Metode ekstrakcije biljnog materijala.

METODA EKSTRAKCIJE	TRAJANJE	OPIS
Ekstrakcija u vrućoj vodi	5 minuta	Biljni materijal je preliven vrućom vodom, poklopljen i ostavljen da odstoji 5 minuta (uvjeti spravljanja čaja).
Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi	1 sat	Biljni materijal je preliven vodom sobne temperature i ostavljen da odstoji 1 sat.
Ultrazvučna ekstrakcija	1 sat	Biljni materijal je preliven vodom sobne temperature i stavljen 1 sat u ultrazvučnu kupelj. Temperatura vode u kupelji je kontinuirano održavana na $\leq 37^{\circ}\text{C}$ kako bi se spriječilo pregrijavanje ekstrakta.
Mikrovalna ekstrakcija	1 sat	Biljni materijal je preliven vodom sobne temperature i stavljen u kupelji 1 sat u mikrovalnu pećnicu na najniži stupanj grijanja. Temperatura vode u kupelji je kontinuirano održavana na $\leq 37^{\circ}\text{C}$ kako bi se spriječilo pregrijavanje ekstrakta.

Nakon određenog vremena predviđenog za ekstrakciju, realni uzorci su filtrirani te su filtratima odmah određivani ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost. Uzorci su na isti način pripremljeni za elektrokemijska mjerenja.

2.4. Folin-Ciocalteu metoda - određivanje ukupnih fenola

Za izradu krivulje umjeravanja, otopine galne kiseline (radni standardi) pripremljene su u različitim koncentracijama: 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg dm⁻³ (Slika 20). U odmjernu tikvicu od 25 cm³ dodano je 0,250 cm³ otopine standarda, 15 cm³ destilirane vode i 1,250 cm³ Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj u tikvici je promućkan te je nakon jedne minute dodano još 3,750 cm³ zasićene otopine natrijeva karbonata i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Tikvica je dobro promućkana i ostavljena stajati u mraku pri sobnoj temperaturi 2 sata, nakon čega je izmjerena apsorbancija svake otopine pri 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm.

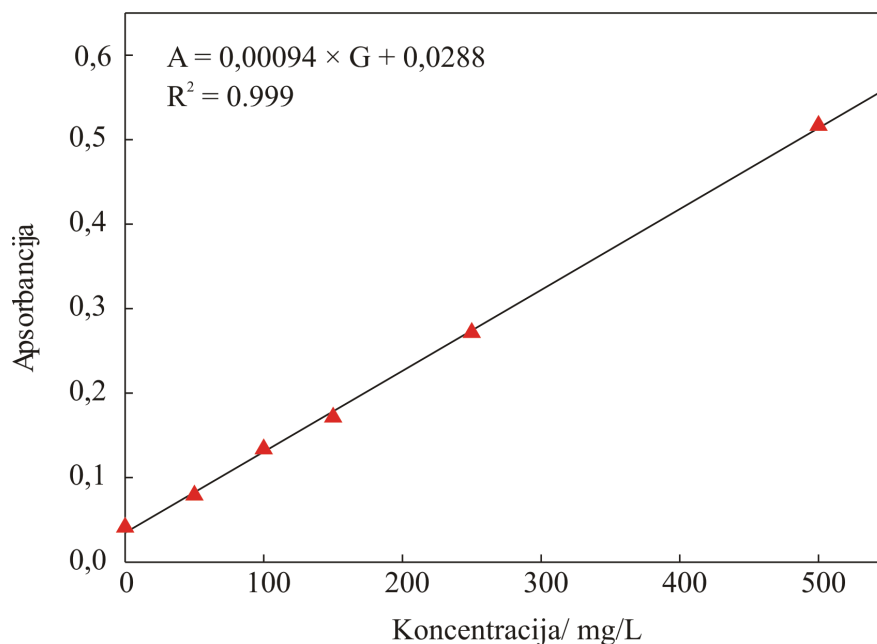


Slika 20. Otopine galne kiseline (radni standardi) korištene za izradu krivulje umjeravanja.

Tablica 7 prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbacije. Konstruirana standardna krivulja koncentracija prema apsorbanciji (Slika 21) koristi se za procjenu ukupnih fenola u uzorcima.

Tablica 7. Vrijednosti apsorbacije za konstruiranje krivulje umjeravanja za standard galnu kiselinu:

Koncentracija, mg/L	Srednja vrijednost apsorbacije	Standardna devijacija
0,00	0,0412	±0,0371
50,00	0,0792	±0,0550
100,00	0,1339	±0,0302
150,00	0,1606	±0,0843
250,00	0,2277	±0,0116
500,00	0,5167	±0,0051



Slika 21. Krivulja umjeravanja za standard galnu kiselinu.

Postupak se ponavlja dodavanjem realnih uzoraka u tikvicu umjesto galne kiseline i nakon 2 sata mjeri apsorbancija. Pomoću dobivene standardne krivulje koncentracije prema apsorbanciji procjenjuju se ukupni fenoli u ekstraktima u odnosu na standard galne kiseline, prema matematičkom izrazu:

$$A = 0,00094 \times G + 0,02880$$

gdje G predstavlja masenu koncentraciju u mg cm^{-3} ekstrakta.

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

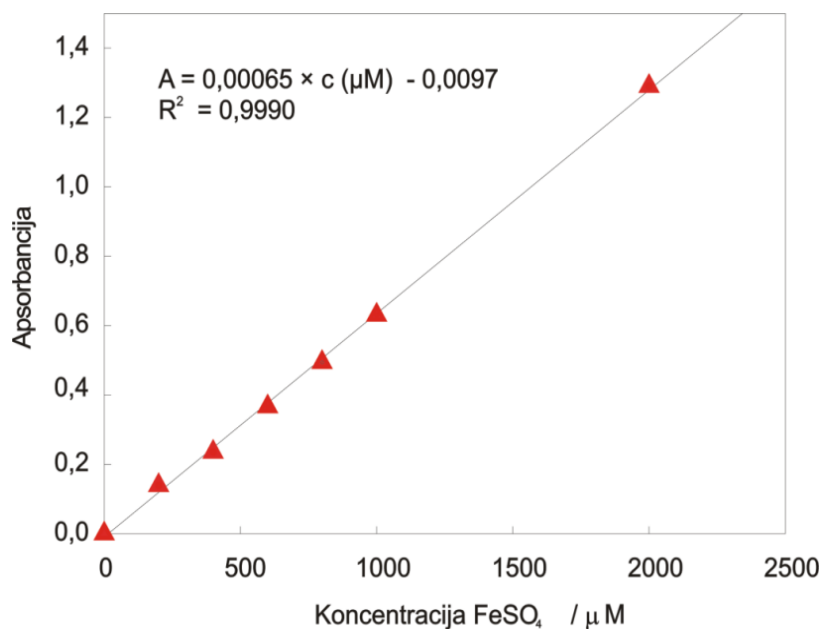
FRAP reagens potrebno je pripremiti svaki dan neposredno prije mjerenja od 25 mL acetatnog pufera, $2,5 \text{ cm}^3$ TPTZ otopine i $2,5 \text{ cm}^3$ $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$. U kivetu širine 1 cm staviti $1,5 \text{ cm}^3$ reagensa i izmjeriti apsorbanciju pri 593 nm (A_0). Zatim u kivetu s reagensom dodati još $0,150 \text{ cm}^3$ destilirane vode i $0,050 \text{ cm}^3$ realnog uzorka. Tijekom 10 minuta kontinuirano pratiti promjenu apsorbancije pri 593 nm i očitati 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 Fe^{2+} , $c(\text{Fe}^{2+})=1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$, ($\Delta A_{\text{Fe}^{2+}}$) te FRAP vrijednost uzorka izračunati prema jednadžbi:

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

U odnosu na signal reakcije Fe^{2+} iona poznate koncentracije, FRAP metodom je izračunat učinak antioksidansa, a reakcija predstavlja izmjenu jednog elektrona. Slika 22 predstavlja krivulju umjeravanja za standardnu otopinu FeSO_4 .



Slika 22. Krivulja umjeravanja za standardnu otopinu FeSO_4 .

Rezultati za antioksidacijsku aktivnost prema standardu FeSO_4 određuju se iz dobivene krivulje umjeravanja standarda FeSO_4 prema matematičkom izrazu:

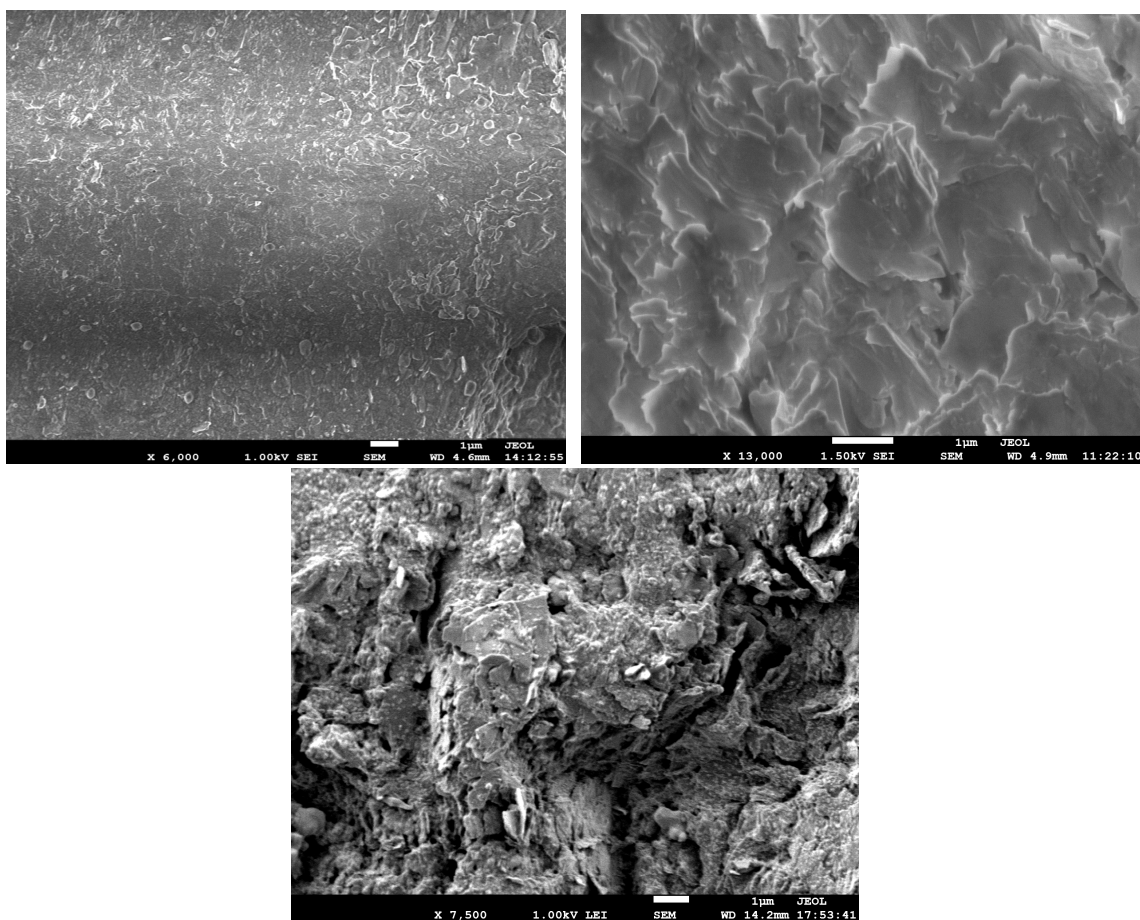
$$A = 0,00065 \times c + 0,0097$$

gdje c predstavlja množinsku koncentraciju u $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ekstrakta.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Karakterizacija površine pripremljene EPG elektrode pretražnim elektronskim mikroskopom – SEM analiza

Površina EPG elektrode je karakterizirana pretražnim elektronskim mikroskopom, te su na Slici 23 prikazane SEM snimke dobivene pomoću dva načina rada: gornji sekundarni detektor elektrona u leći (SEI-način rada) i donji sekundarni detektor elektrona (LEI-način rada).



Slika 23. SEM snimke priređene PGS elektrode - Gornji sekundarni detektor elektrona u leći (SEI) i Donji sekundarni detektor elektrona (LEI).

U SEI-načinu rada elektronski snop stvara "prskanje" elektrona s kinetičkom energijom mnogo nižom od primarnih upadnih elektrona, koji se nazivaju sekundarni

elektroni. Zbog njihove niske energije i niske dubine prodiranja, detekcija sekundarnih elektrona kao funkcija položaja primarne zrake omogućuje postizanje velikih povećanja i visoke razlučivosti.

Za ispitivani uzorak SEI-način rada pokazuje dvodimenzionalnu ravnu površinu presjeka grafitnog lista. Slika ukazuje na nepravilno formirane slojeve grafita u presjeku, bez jasnih granica sloja. Mod snimanja se nije pokazao dobrim izborom i nije pokazao razlučivost slojeva grafita, osobito pri velikim povećanjima. S druge strane LEI-način rada pokazuje trodimenzionalnu topografiju površine, te potvrđuje postojanje velikog broja nepravilnosti unutar strukture u presjeku PGS materijala. Plohe grafita nisu složene precizno kao što je očekivano, ali dobivene slike sugeriraju veliku aktivnu površinu i potvrđuju postojanje većeg broja međuprostora pogodnih za primjenu ovakvih materijala u elektroanalitičke svrhe.

3.2. Rezultati cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije

3.2.1. Rezultati cikličke voltametrije

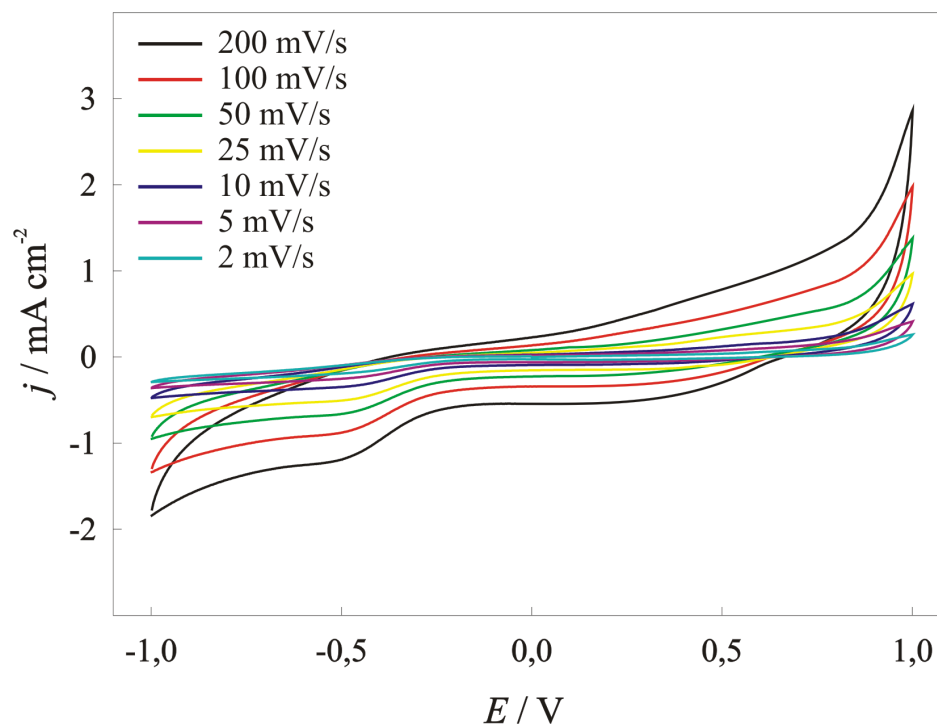
Elektrokemijska karakterizacija konstruirane EPG elektrode provedena je cikličkom voltametrijom u širem (od $-1,0$ V do $+1,0$ V vs. Ag|AgCl) i užem (od $0,0$ V do $0,9$ V vs. Ag|AgCl) području potencijala. Snimljeni su ciklički voltamogrami, kako bi se utvrdilo područje primjene priređene elektrode i ispitao odziv prema galnoj kiselini. Procedura svih mjerenja je uključivala vrijeme uravnotežavanja na potencijalu $E = 0,0$ V, zatim u katodnom smjeru, te povratno u anodnom smjeru i natrag na $E = 0,0$ V. Brzina promjene potencijala prikazana je za cikličke voltamograme kao legenda unutar slike.

Eksperimentalni dio ovog rada je imao za cilj pokazati ponašanje galne kiseline, kao jednog jednostavnog fenola u priređenoj umjetnoj želučanoj kiselini (*Artificial stomach acid* – ASA; pH = 1,45), odnosno u uvjetima gdje neki fenol mora pokazati svoje antioksidacijsko djelovanje, koje je značajno za ljuski organizam. Za ispitivanje mehanizma oksidacije, odnosno studiju antioksidacijskog djelovanja, odabrana je elektroda od pirolitičkog grafita, radi iznimnih osobina tog materijala. Ideja je kako će okomito postavljeni list, čiji je osjetilni dio ustvari presjek PGS, kao tijelo mikroelektrode, dati

veliku aktivnu površinu. Dobivena površina s visokom intersticijskom aktivnošću, odnosno postojanjem aktivnih međuprostora, za cilj ima omogućiti i olakšati prijenos elektrona određene reakcije između elektrolita/analita i elektrode. Postojeći kanali i međuprostori između slojeva grafita u PGS trebali bi osigurati dovoljno kanala za postizanje visoke osjetljivosti EPG elektrode.

SEM analiza pokazala je kako upravo EPG elektroda ima veliku aktivnu površinu, poroznu strukturu, a prema specifikacijama materijal je izuzetnih električnih svojstava. Teorijska površina izračunata je matematički kao presjek priređene EPG elektrode, a osjetilni dio površine iznosi $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$. Svi rezultati cikličke voltametrije izraženi su kao struja po jedinici površine, odnosno kao gustoća struje, mA cm^{-2} .

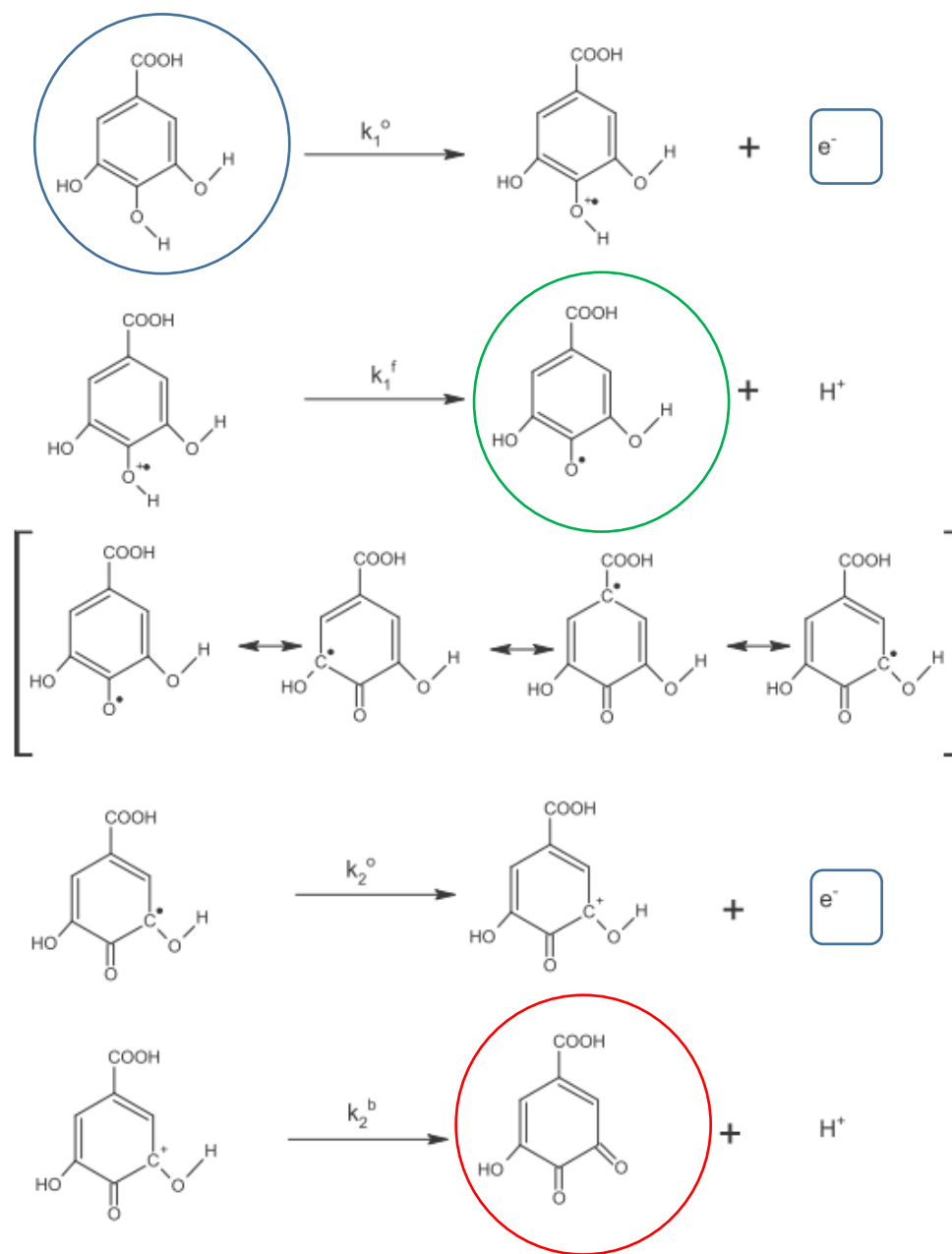
Na Slici 24 prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni na EPG elektrodi u ASA elektrolitu bez prisutnosti galne kiseline. Praćen je utjecaj brzine promjene potencijala na elektrokemijsko ponašanje EPG elektrode u području potencijala između katodne granice -1,0 V, odnosno od reakcije izlučivanja vodika, do anodne granice +1,0 V odnosno do reakcije izlučivanja kisika.



Slika 24. Ciklički voltamogrami EPG elektrode u ottopini ASA - utjecaj brzine promjene potencijala.

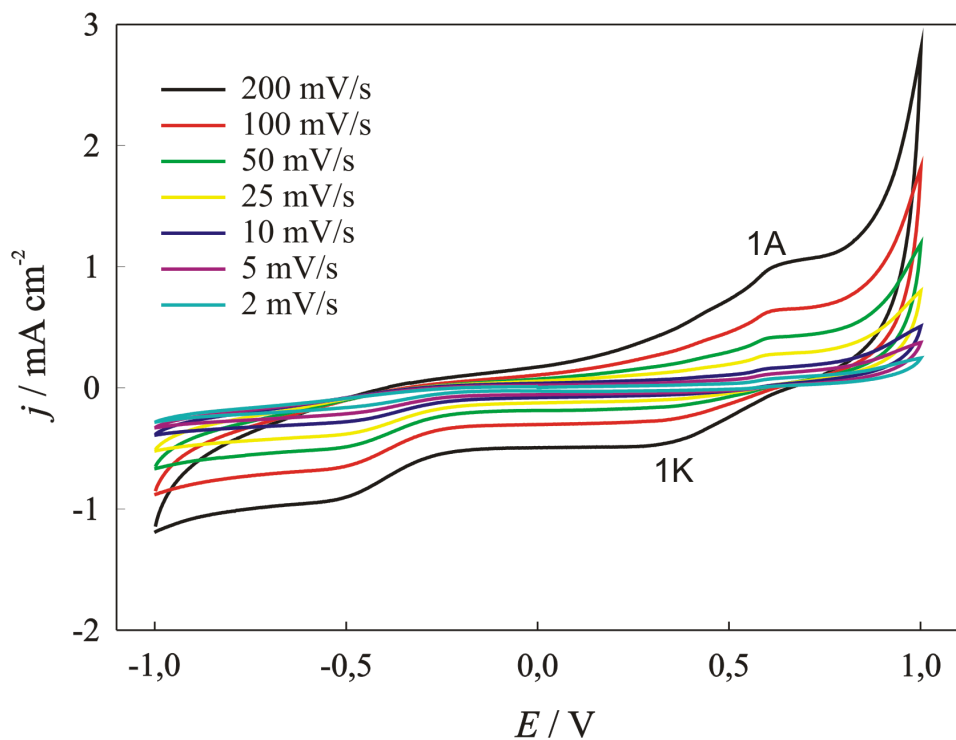
Pri pH 1,45 ne uočavaju se nikakve značajne reakcije u području redukcije. Pri većim brzinama promjene potencijala slabo se uočava katodna reakcija izlučivanja vodika. Porastom brzine promjene potencijala uočava se i porast anodnih vršnih struja. Blagi porast anodnih vršnih struja koje se primjećuju na potencijalu većem od 0,2 V ukazuje na procese u samom elektrodnom materijalu koji mogu potjecati od osnovnog elektrolita. Anodne struje iznad potencijala 0,8 V ukazuju na reakciju izlučivanja kisika. Moguće je zaključiti kako visoke vrijednosti brzine promjene potencijala u danim uvjetima nisu pogodne za ovaj tip elektrode.

Pri ovim uvjetima očekivana reakcija oksidacije galne kiseline može ići u dva stupnja, kao što je prikazano na Shemi 1. Galna kiselina (plavi krug) u prvom stupnju daje semikinonski radikal (zeleni krug), a u drugom kinon (crveni krug). Reakcija oksidacije galne kiseline, kao što se može vidjeti je vrlo složena i ovisi o formiranju međuprodukata reakcije. Za drugi stupanj oksidacije osobito je bitan nastanak aktiviranog radikala na ugljikovom atomu u fenolnom prstenu.

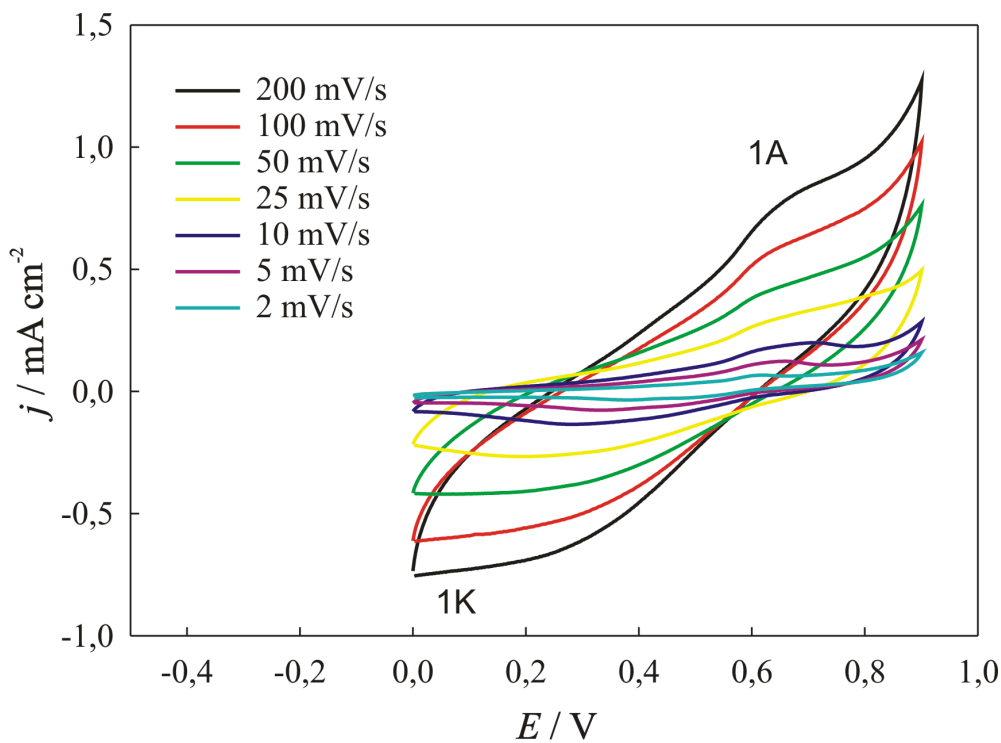


Shema 1. Detaljni shematski prikaz reakcije oksidacije GK.⁷¹

Ciklički voltamogrami u prisutnosti 1×10^{-4} mol dm^{-3} galne kiseline prikazani su na Slikama 25 i 26, u širem i užem području potencijala. Praćen je utjecaj brzine promjene potencijala na elektrokemijsko ponašanje EPG elektrode u prisutnosti galne kiseline.



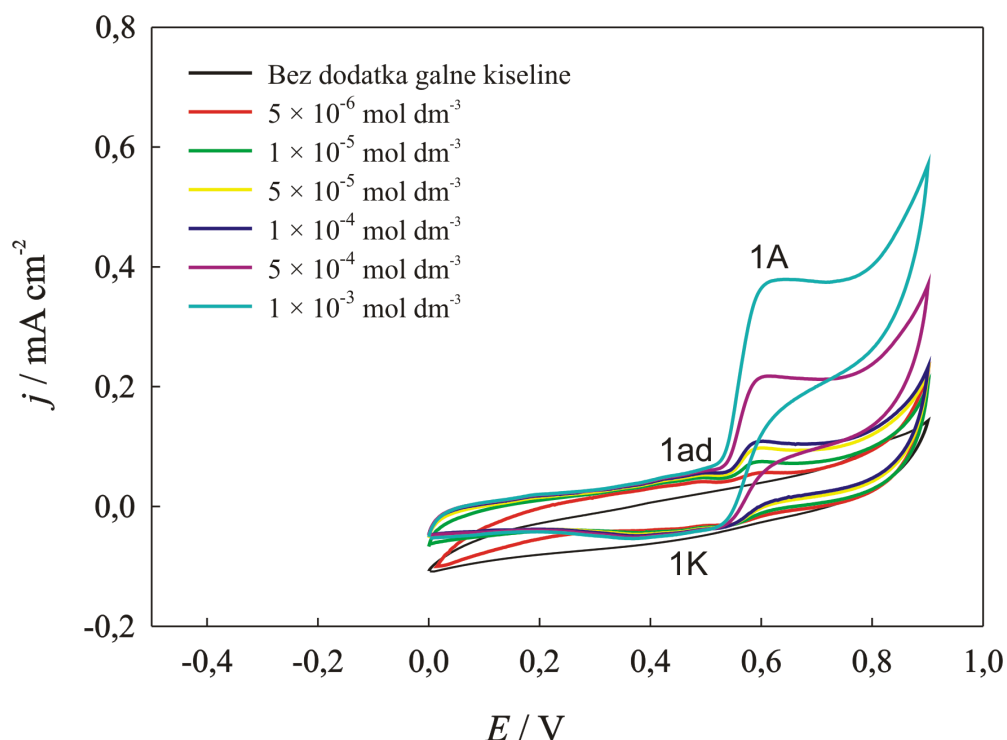
Slika 25. Ciklički voltamogrami EPG elektrode u otopini ASA u prisutnosti GK, 1×10^{-4} mol dm⁻³ – utjecaj brzine promjene potencijala, područje potencijala od -1,0 - 1,9 V.



Slika 26. Ciklički voltamogrami EPG elektrode u otopini ASA u prisutnosti GK, 1×10^{-4} mol dm⁻³ – utjecaj brzine promjene potencijala, područje potencijala od 0,0 - 0,9 V.

Pri pH vrijednosti 1,45 uočavamo anodni pik (1A), koji odgovara prvom stupnju oksidacije galne kiseline, odnosno stvaranju semikinona. U povratnom ciklusu uočava se katodna vršna struja, odnosno slabo uočljiv pik (plato struje) obilježen kao 1K, koji odgovara redukciji semikinona natrag u formu galne kiseline. S porastom brzine promjene potencijala, potencijal oksidacije se pomiče ka pozitivnijim vrijednostima, a redukcije ka negativnijim vrijednostima. Vrijednosti struje redukcije su niže, odnosno ne prate vrijednosti struje oksidacije, stoga je reakcija kvazireverzibilna. Pri većim vrijednostima brzine promjene potencijala raste pozadinska struja i rast struje neposredno prije oksidacije galne kiseline sugerira moguću adsorpciju galne kiseline na odabrani materijal. Pri odabiru optimalne brzine promjene potencijala, struja moguće adsorpcije je uzeta u obzir, te je kao optimalna brzina odabrana 10 mV/s, a rast struje adsorpcije je opažen na približno 0,4 V.

Nakon što je odabrana optimalna brzina promjene potencijala provedeno je mjerenje uz sukcesivni dodatak galne kiseline u užem području potencijala od 0,0 V do 0,9 V (Slika 27). Povećanjem koncentracije galne kiseline uočava se porast anodne vršne struje.



Slika 27. Ciklički voltamogrami EPG elektrode u otopini ASA uz sukcesivni dodatak GK – brzina promjene potencijala 10 mV/s.

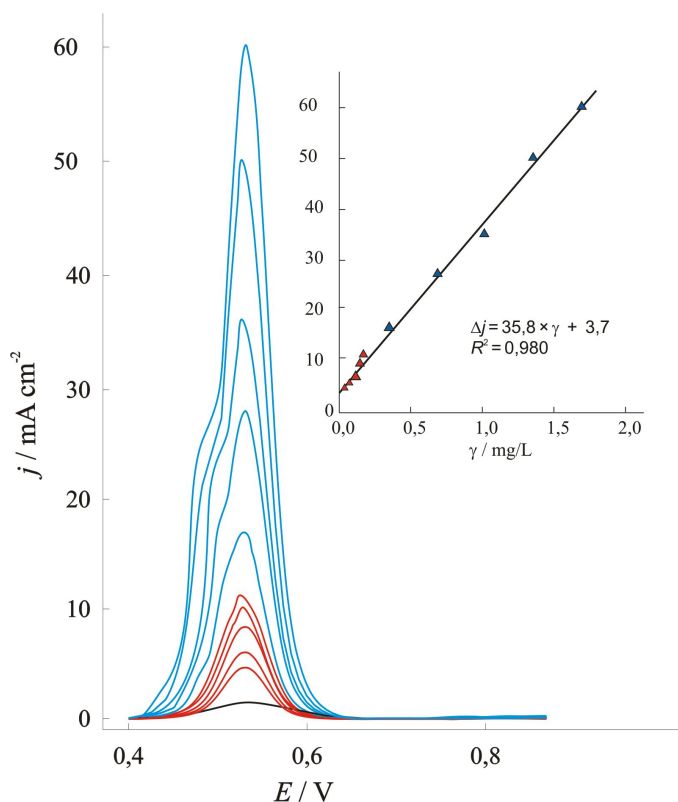
Sukcesivnim dodavanjem galne kiseline uočavamo jedan anodni pik (1A) na cikličkim voltamogramima pri potencijalu 0,6 V, koji kontinuirano i linearno raste s povećanjem koncentracije galne kiseline. Nakon reakcije oksidacije se u povratnom ciklusu slabo uočava kvazireverzibilna reakcija redukcije semikinona (1K). Pri potencijalu približno 0,45 V u polaznom ciklusu uočavamo porast vršne struje (i_{ad}). Taj porast može sugerirati adsorpciju galne kiseline na površini EPG elektrode.

3.2.2. Rezultati diferencijalne pulsne voltametrije

Nakon razmatranja reakcije oksidacije zaključak je kako bi upravo diferencijalna pulsna voltametija bila idealan izbor za određivanje koncentracije galne kiseline. Prvi korak je optimiranje parametara procedure, odnosno odrediti potencijal adsorpcije ili predakumulacije (E_{ad}) i vrijeme adsorpcije (t_{ad}) potrebno za akumuliranje galne kiseline na površinu radne elektrode. Skup početnih uvjeta primjenjuje se na elektrokemijsku ćeliju i ćelija se uravnotežuje pri tim uvjetima, $E_{ad} = 0,4$ V i $t_{ad} = 90$ s (60 s uz miješanje i 30 s u mirujućem elektrolitu). Podaci se ne prikupljaju tijekom tog razdoblja. Nakon perioda adsorpcije slijedi snimanje, odnosno potencijal radne elektrode prolazi kroz niz rastućih impulsa od početnog potencijala 0,4 V do konačnog potencijala 0,9 V. Potencijal se povećava sa svakim sljedećim impulsom u skladu s povećanjem pulsa, pa je amplituda, $\Delta E_p = 50$ mV. Struja se mjeri s vremenom, a dobiveni voltamogrami su korigirani za vrijednost bazne linije.

Za primjenu diferencijalne pulsne voltametrije u svrhu analitičke primjene, ispitana je i linearnost ovisnosti struje oksidacije o koncentraciji galne kiseline. Rezultati DPV u prisutnosti različitih masenih koncentracija GK, odnosno različitih dodataka standardne otopine galne kiseline, prikazani su na Slici 28, s odgovarajućom krivuljom umjeravanja u isječku slike. Voltamogrami su dobiveni metodom standardnog dodatka. Za područje masene koncentracije od 0,034 do 1,70 mg dm³ (područje množinske koncentracije 2×10^{-7} do 1×10^{-5} mol dm⁻³) uočava se jedan izražajan anodni strujni vrh pri potencijalu 567 mV. Osjetljivost predložene metode iznosi 35,8 mA cm⁻² po jedinici masene koncentracije, dok je linearnost predložene metode $R^2 = 0,980$. Za veće koncentracije dolazi do zasićenja

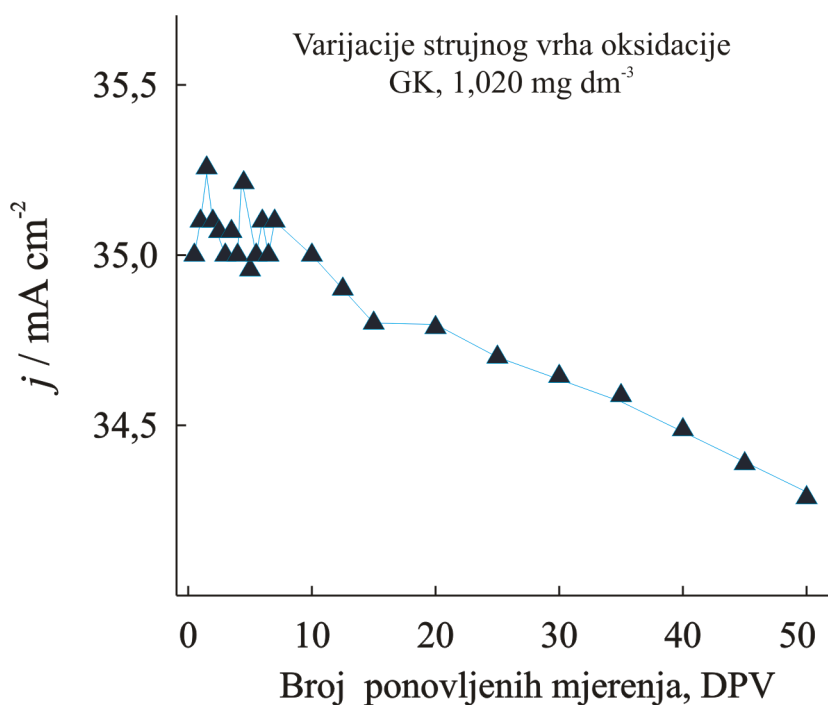
površine, te u ovim uvjetima odziv elektode nije linearan. U slučaju visoke koncentracije galne kiseline potrebno je korigirati dodatak realnog uzorka. (NAPOMENA: množinska koncentracija galne kiseline u otopini $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ odgovara masenoj koncentraciji $0,170 \text{ mg dm}^{-3}$)



Slika 28. Voltamogrami DPV korigirani za vrijednost bazne linije snimljeni na EPG elektrodi u otopini ASA uz sukcesivni dodatak galne kiseline. Krivulja umjerenja prikazana je kao isječak voltamograma.

Za ispitivanje ponovljivosti predložene metodologije, unutar tri sata snimljeno je ukupno 50 ciklusa DPV u istom elektrolitu, pod optimiziranim eksperimentalnim uvjetima (Slika 29). Ograničavajući faktor za određivanje je nestabilnost galne kiseline, odnosno ona se počinje raspadati pod utjecajem svjetlosti i kisika, a raspad rapidno raste nakon 3 sata.⁷⁷ Raspad galne kiseline uočava se jasno samom promjenom boje otopine. Promjena se uočava kao zamućenje, tamnjenje otopine ili pojava modre boje tijekom duljeg vremena izloženosti. Uzastopnim mjerenjem signala odziva nakon pedeset ponovljenih mjerenja u

otopini ASA uz dodatak $1,020 \text{ mg dm}^{-3}$ galne kiseline, unutar približno tri sata dobivena je relativna standardna devijacija (RDS) u iznosu od 1,7%, koja ukazuje na dobru ponovljivost i stabilan odziv elektrode prema galnoj kiselini. Potrebno je istaknuti kako odziv kontinuirano opada nakon 15 ciklusa, odnosno nakon sat vremena mjerenja. Prednost ove vrste elektrode je što ne zahtjeva modifikaciju, te se nakon čišćenja u ultrazvuku može ponovno koristiti. Do blokiranja površine dolazi nakon izloženosti elektrode visokim koncentracijama galne kiseline te se onda elektroda mora ponovno polirati i aktivirati, kako je opisano u Eksperimentalnom dijelu.



Slika 29. Vrijednosti strujnih vrhova DPV voltamograma za oksidaciju galne kiseline - ispitivanje ponovljivosti predložene metode za određivanje galne kiseline uz prisutnu koncentraciju $1,020 \text{ mg dm}^{-3}$ galne kiseline u ASA, unutar približno tri sata.

3.3. Analitička primjena voltametrijskih metoda na realnim uzorcima

Ekstrakcija smilja, lovora i ružmarina provedena je iz vodenih otopina, a svi rezultati prikazani u Tablicama imaju oznake ekstrakcije:

Oznaka 1 – ekstrakcija u trajanju od 5 minuta na temperaturi 100 °C

Oznaka 2 – ekstrakcija u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi

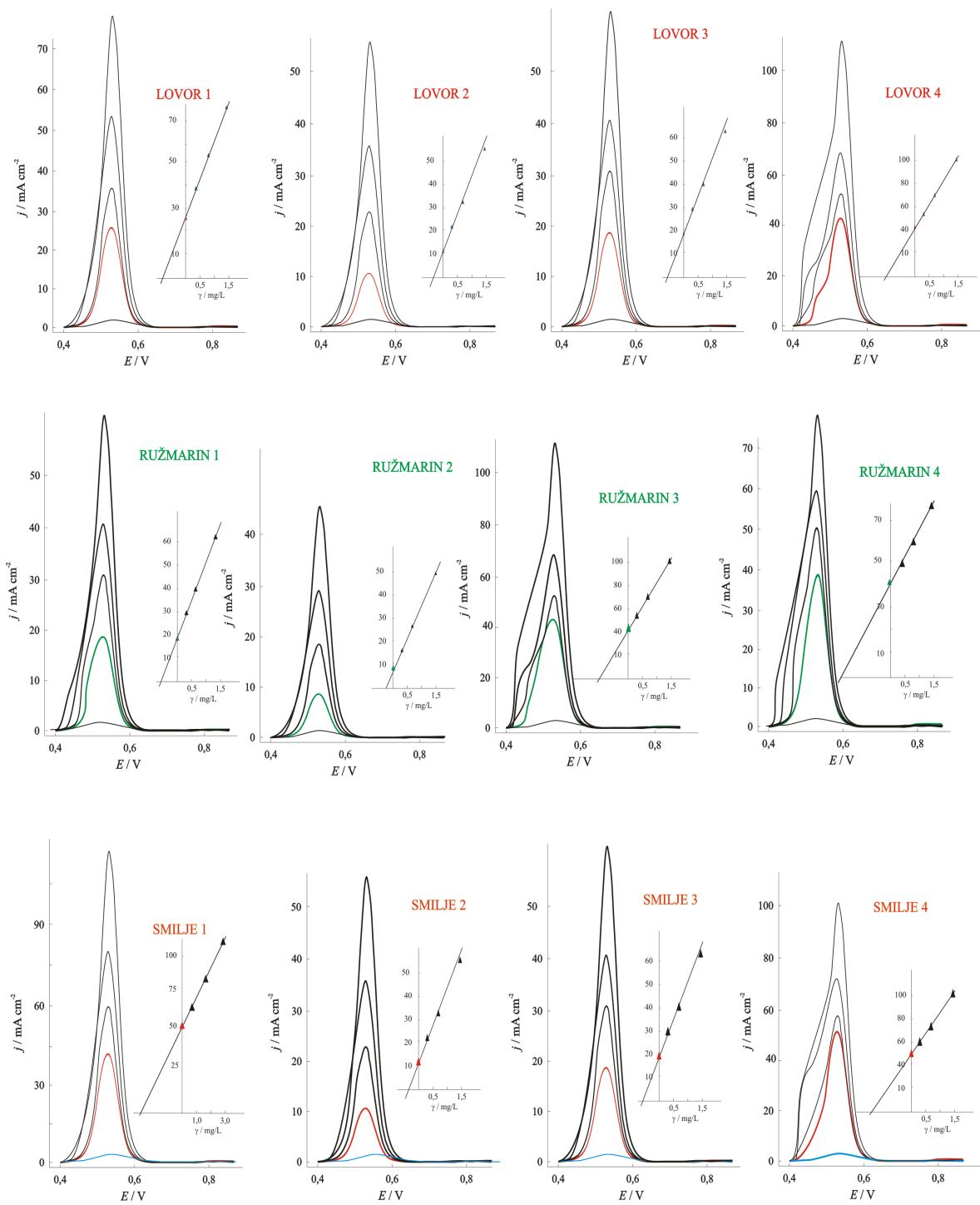
Oznaka 3 – ekstrakcija u trajanju od 1 h potpomognuta ultrazvukom

Oznaka 4 – ekstrakcija u trajanju od 1 h potpomognuta mikrovalovima

Predložena analitička metoda primijenjena je za određivanje galne kiseline u priređenim ekstraktima. Na slici 30 prikazani su DPV voltamogrami i baždarne krivulje za sve uzorke, korelirani prema metodi ekstrakcije. Prvi uzorak je uvijek LOVOR, zatim slijedi RUŽMARIN i na kraju SMILJE. Svi voltamogrami korigirani za vrijednost bazne linije snimljeni su u otopini umjetne želučane kiseline ASA, pH = 1,45. Okomito gledani DPV voltamogrami su razvrstani prema metodama ekstrakcije.

Metode ekstrakcije su opisane u Eksperimentalnom dijelu, u Tablici 6. Svi uzorci sadrže vodenu fazu dobivenu ekstrakcijom 5 g suhog bilja u 200 mL destilirane vode. Uzorci su profiltrirani te je iz ekstrakta određivana koncentracija analita. 1,0 cm³ ekstrakta dodano je izravno u elektrolit, odnosno u ćeliju. Metodom standardnog dodatka pomoću otopine galne kiseline poznate koncentracije određena je koncentracija galne kiseline u ekstraktima bilja. Srednja vrijednost koncentracije nepoznatog uzorka dobivena je na osnovu 3 uzastopna mjerenja.

U Tablici 8 prikazani su rezultati masene koncentracije galne kiseline dobiveni metodom standardnog dodatka. Navedena koncentracija odgovara masi galne kiseline u 1,0 cm³ uzorka odnosno u 1,0 cm³ ekstrakta.



Slika 30. DPV voltamogrami i baždarne krivulje za sve uzorke, korelirani prema metodi ekstrakcije.

Tablica 8. Sadržaj galne kiseline u uzorcima dobiven diferencijalnom pulsnom voltametrijom – vrijednosti izražene prema ekvivalentu 1,0 cm³ ekstrakta (1 cm³ odgovara 25 mg suhe tvari).

Uzorak	Masena koncentracija galne kiseline u uzorcima mg GAE/L	
	u 1,0 cm ³ ekstrakta	u 1 g suhog bilja
Lovor 1	0,858	34,32
Lovor 2	0,344	13,76
Lovor 3	0,682	27,28
Lovor 4	1,012	40,48

Uzorak	Masena koncentracija galne kiseline u uzorcima mg GAE/L	
	u 1,0 cm ³ ekstrakta	u 1 g suhog bilja
Ružmarin 1	0,601	24,04
Ružmarin 2	0,201	8,04
Ružmarin 3	1,206	48,24
Ružmarin 4	2,274	90,96

Uzorak	Masena koncentracija galne kiseline u uzorcima mg GAE/L	
	u 1 cm ³ ekstrakta	u 1 g suhog bilja
Smilje 1	3,231	129,24
Smilje 2	0,549	21,96
Smilje 3	0,744	29,76
Smilje 4	1,171	46,84

3.4. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja

Prethodno opisana Folin-Ciocalteu metoda služi za određivanje ukupnih fenola. Realni uzorci, odnosno biljni ekstrakti dodani su umjesto standarda galne kiseline u tikvicu i nakon dva sata je izmjerena apsorbancija, te su dobivene vrijednosti apsorbancije prikazane u tablici 9.

Tablica 9. Sadržaj ukupnih fenola uzoraka dobiven spektrofotometrijskom metodom - **VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.**

Uzorak	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Lovor 1	0,2138	0,2139	0,2138	0,2138
Lovor 2	0,1201	0,1201	0,1200	0,1201
Lovor 3	0,1701	0,1701	0,1701	0,1701
Lovor 4	0,2473	0,2401	0,2461	0,2445

Uzorak	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Ružmarin 1	0,1462	0,1462	0,1462	0,1462
Ružmarin 2	0,0673	0,0673	0,0673	0,0673
Ružmarin 3	0,4044	0,4030	0,3999	0,4024
Ružmarin 4	0,5030	0,4965	0,4993	0,4996

Uzorak	Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metoda			Srednja vrijednost
Smilje 1	0,8904	0,8904	0,8904	0,8904
Smilje 2	0,1370	0,1369	0,1368	0,1369
Smilje 3	0,1845	0,1845	0,1845	0,1845
Smilje 4	0,2668	0,2690	0,2672	0,2677

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.

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost uzoraka dobivena spektrofotometrijskom metodom.
- VRIJEDNOSTI IZMJERENE APSORBANCIJE.

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
Lovor 1	0,7692	1,1049
Lovor 2	0,5568	0,6404
Lovor 3	0,8095	0,9500
Lovor 4	0,9665	1,1077

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
Ružmarin 1	1,2401	1,4214
Ružmarin 2	2,2741	2,5366
Ružmarin 3	3,5307	4,1787
Ružmarin 4	3,5401	3,9401

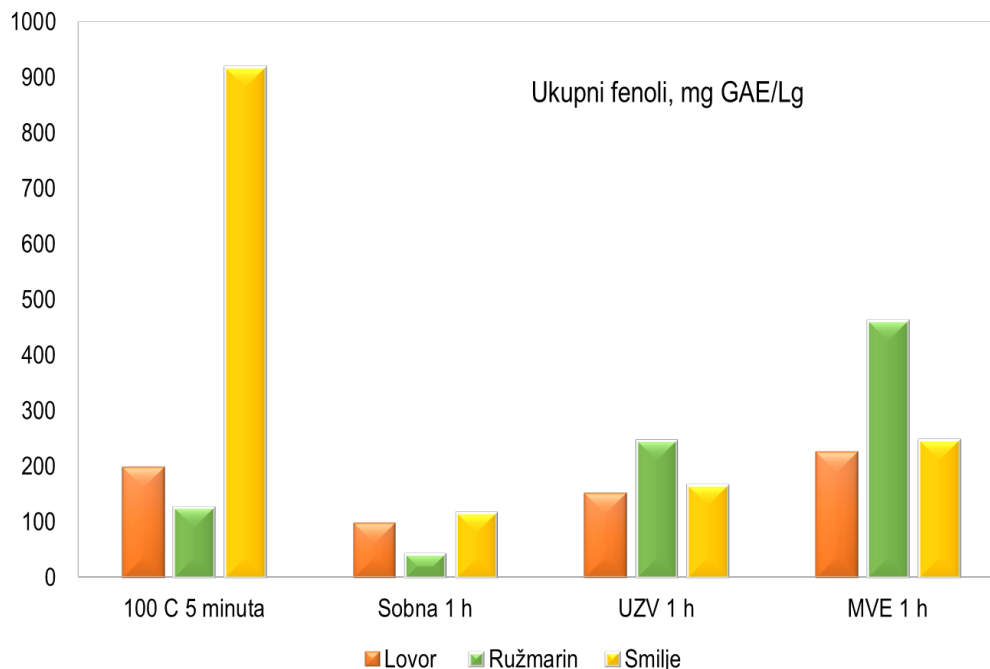
Uzorak	Antioksidacijska aktivnost nakon 4 minute FRAP metoda	Antioksidacijska aktivnost nakon 10 minuta FRAP metoda
	Srednja vrijednost	Srednja vrijednost
Smilje 1	0,7522	0,9010
Smilje 2	0,5001	0,5653
Smilje 3	0,9892	1,1414
Smilje 4	0,9456	1,0012

Svi rezultati spektrofotometrijskih mjerenja ispitanih biljnih ekstrakata prikazani su u tablici 11. 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. Rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu metodom pokazali su da uzorci lovora i ružmarina ekstrahirani mikrovalnom ekstrakcijom pokazuju najveći sadržaj ukupnih fenola (225,1 mg GAE/L za lovor i 460,1 mg GAE/L za ružmarin), dok je uzorak smilja, odnosno ekstrakt dobiven ekstrakcijom vrućom vodom imao najveći udio ukupnih fenola (917,1 mg GAE/L) u odnosu na ostala dva uzorka. Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi pokazala je najniži sadržaj ukupnih fenola kod sva tri uzorka (97,2 mg GAE/L za lovor, 40,9 mg GAE/L za ružmarin i 115,1 mg GAE/L za smilje).

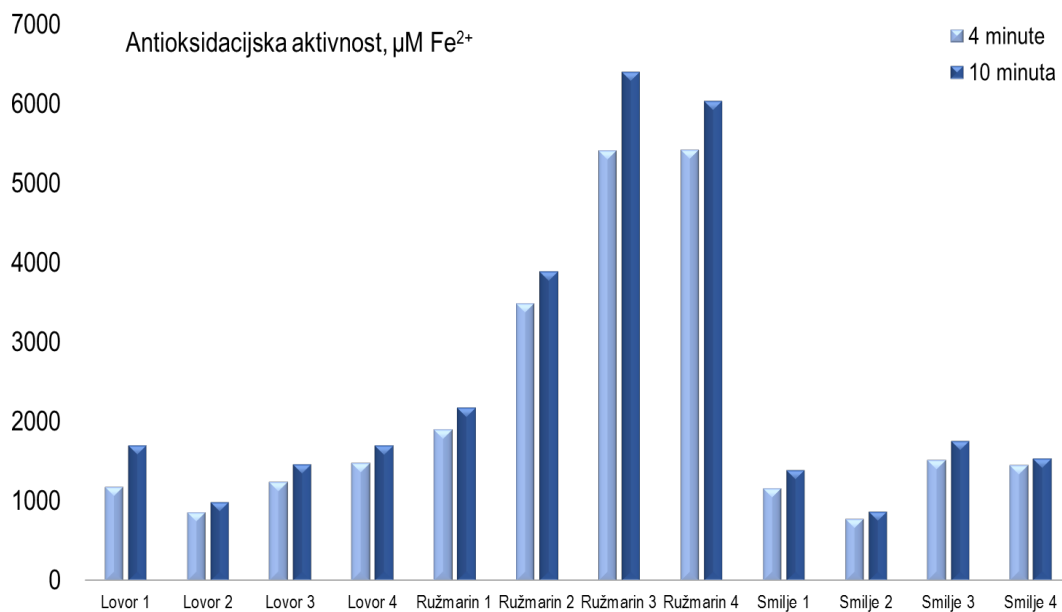
Tablica 11. Slika 31. i Slika 32. prikazuju rezultate ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivene spektrofotometrijskom metodom.

Tablica 11. 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	$\mu\text{M Fe}^{2+}$	$\mu\text{M Fe}^{2+}$
Lovor 1	196,9	1 179,1	1 693,9
Lovor 2	97,2	853,6	981,8
Lovor 3	150,4	1 241,1	1 456,5
Lovor 4	225,1	1 480,7	1 697,0
Ružmarin 1	125,0	1 901,2	2 179,2
Ružmarin 2	40,9	3 486,5	3 888,9
Ružmarin 3	245,5	5 413,0	6 406,4
Ružmarin 4	460,1	5 423,4	6 036,2
Smilje 1	917,1	1 153,2	1 381,3
Smilje 2	115,1	766,7	866,7
Smilje 3	165,7	1 516,6	1 749,9
Smilje 4	246,5	1 448,7	1 533,8



Slika 31. Rezultati ukupnih fenola dobiveni Folin-Ciocalteu metodom



Slika 32. Rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni FRAP metodom

Uspoređujući rezultate dobivene nakon 4 i nakon 10 minuta uočava se da je antioksidacijska aktivnost rasla tijekom vremena. I nakon 4 i nakon 10 minuta FRAP

metodom uočavamo da sva tri uzorka pokazuju najveću antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima gdje je ekstrakcija potpomognuta, bilo mikrovalovima ili ultrazvukom. Rezultati UZV i MVE metode su približno isti. U rezultatima se svakako treba istaknuti kako ružmarin ima od svih odabranih biljaka najveću antioksidacijsku aktivnost, što je potvrđeno svim metodama ekstrakcije (UZV-FRAP-10 min 6406,4 $\mu\text{M Fe}^{2+}$). Sumarno gledano od svih uzoraka smilje pokazuje najmanju antioksidacijsku aktivnost, ali po vrijednostima ne mnogo nižu od lovora. Najniže vrijednosti FRAP-a za smilje i lovor dobivene su na sobnoj temperaturi, dok su za ružmarin najniže vrijednosti dobivene prvom metodom ekstrakcije, odnosno 5 minuta na 100 °C.

Usporedbom ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti za ružmarin u odnosu na druge ekstrakte FRAP-vrijednosti znatno rastu i nekoliko puta više u odnosu na druge ekstrakte, sugerirajući kako dulje vrijeme ekstrakcije pogoduje ekstrakciji drugih bioaktivnih vrsta koje doprinose porastu antioksidacijske aktivnosti.

3.5. Usporedbe rezultata

Cilj rada je bio pronaći korelaciju između voltametrijskih i spektrofotometrijskih metoda sa svrhom validacije predložene metodologije u procjeni ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Nakon provedenih mjerenja i dobivenih i obrađenih rezultata, slijedi usporedba metoda. Na prvi pogled iz Tablice 12 se može uočiti kako je trend kod svih mjerenja potpuno identičan. Jednostavnim dijeljenjem dobivenih rezultata dobiven je faktor korelacije prikazan u Tablici 12.

Tablica 12. Usporedba dobivenih rezultata elektrokemijskim i spektrofotometrijskim metodama.

Uzorak	Omjer FC/DPV	Omjer FRAP(4)/DPV	Omjer FRAP(10)/DPV
Lovor 1	5,74	34,36	49,36
Lovor 2	7,06	62,03	71,35
Lovor 3	5,51	45,49	53,39
Lovor 4	5,56	36,58	41,92
Ružmarin 1	5,20	79,08	90,65
Ružmarin 2	5,09	433,64	483,69
Ružmarin 3	5,09	112,21	132,80
Ružmarin 4	5,06	59,62	66,36
Smilje 1	7,10	8,92	10,69
Smilje 2	5,24	34,91	39,47
Smilje 3	5,57	50,96	58,80
Smilje 4	5,26	30,93	32,75

Gledajući tablicu 12 i omjere dobivenih rezultata za realne uzorke, moguće je zaključiti kako su rezultati dobiveni za ukupne fenole primjenom predloženih metoda komparativni za sve dobivene ekstrakte, jer je omjer dobivenih rezultata konstantan i njegova srednja vrijednost iznosi 5,62 (omjer FC/DPV). Prema dobivenim rezultatima može se reći kako je predložena metoda pogodna za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima.

Omjer FRAP/DPV ne pokazuje konstantnost, osobito za uzorke s velikom vrijednošću FRAP-a. Za ekstrakte sa nižim FRAP vrijednostima predložena metoda nije u potpunosti pogodna, ali slijedi jednak trend. Porastom vrijednosti FRAP-a raste i omjer FRAP/DPV, te bi se matematičkim izrazom mogla opisati njihova ovisnost, što zahtjeva dodatna mjerenja.

Razlog neodgovarajuće metodologije za ukupnu antioksidacijsku aktivnost je najvjerojatnije u tome što je metoda optimirana za određivanje jednostavnih fenola, odnosno galne kiseline. Izborom odgovarajućeg potencijala, predakumulacijom iz ekstrakata bi se mogle oksidirati i druge bioaktivne molekule, što bi onda najvjerojatnije dalo rezultate bliske i po omjeru s rezultatima FRAP-a.

Elektrokemijske metode se uglavnom koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva, a tek u posljednjih pet do sedam godina su se počele intenzivno primjenjivati i za određivanja molekula male mase i jednostavnih fenola. Prvi koraci u primjeni elektrokemijskih metoda sežu iz 2001.godine, kada je profesor Kilmartin sa svojim suradnicima cikličkom voltametrijom na staklastoj ugljikovoj elektrodi procijenio antioksidacijsku aktivnost fenola u vinu.⁷² Firuzi je sa svojim suradnicima uočio već 2005. godine povezanost cikličke voltetrije i spektrofotometrijskih metoda u određivanju antioksidacijskog kapaciteta flavonoida.⁷³ Nadalje, vrlo važan doprinos se treba pripisati našim znanstvenicima, Komorsky-Lovrić i suradnici, koji su razvili voltometrijsku metodu na ugljikovoj elektrodi za određivanje antioksidacijske aktivnosti iz realnih uzoraka.⁷⁴ Kada pogledamo dosadašnja postignuća i probamo ih usporediti s našim rezultatima, možemo izvesti zaključak kako moderne voltometrijske metode omogućuju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu uz korištenje osjetljive, jeftine i lako primjenjive opreme. Cilj daljnjih istraživanja u primjeni elektrokemijskih metoda je predloženu metodu razraditi i validirati, te ukazati na njenu jednostavnost, osjetljivost, pouzdanost i brzinu. Današnji uređaji za potenciometrijska mjerenja su praktičnih veličina, a sama priprema uzorka je vrlo jednostavna i brza. Takva metoda bi svakako bila prikladna za analize u industriji.⁷⁵

4. ZAKLJUČCI

Prednosti elektrokemijskih metoda navedenih u radu su pokazane dizajniranjem EPG elektode, koja je poslužila za istraživanje oksidacije galne kiseline, obzirom kako se klasične metode određivanja ukupnih fenola temelje na određivanju sadržaja upravo galne kiseline, kao dominantnog fenola. Primjena u analizi realnih uzoraka u priređenoj umjetnoj želučanoj kiselini pokazana je u ekstraktima lovora, ružmarina i smilja, priređenim na 4 različita načina. Nakon provedenih mjerenja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Priređena mikroelektroda, površine $7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ ispitana cikličkom voltametrijom pokazala je stabilan odziv u širokom području potencijala. Elektrokemijska mjerenja galne kiseline na EPG elektrodi u priređenoj umjetnoj želučanoj kiselini, pri $\text{pH} = 1,45$, ukazala su na oksidaciju GK kontroliranu adsorpcijom na površini elektrode, iza koje slijedi kvazireverzibilni korak redukcije. Izvanredne osobine PGS materijala olakšavaju adsorpciju i akumulaciju GK i uvelike pojačavaju njezin oksidacijski signal.
2. Diferencijalna pulsna voltetrija galne kiseline pomoću EPG elektrode dala je pouzdane i točne rezultate i pokazala se primjenjivom za kvantitativno određivanje galne kiseline. Osjetljivost predložene metode iznosi $35,8 \text{ mA cm}^{-2}$ po jedinici masene koncentracije, dok je linearnost predložene metode $R^2 = 0,980$.
3. Kao realni uzorci odabrani su ekstrakti dalmatinskog bilja: lovor, ružmarin i smilje. Ekstrakcija bilja, provedena na 4 načina, pokazala je kako najveći utjecaj na količinu ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost, određene elektrokemijski i spektrofotometrijski, ima primjena UZV i MVE. Uzorci dobiveni kratkom ekstrakcijom na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ također su dali izvanredne rezultate, što sugerira velik unos antioksidansa tradicionalnim ispijanjem čaja.
4. DPV metoda je pokazala kako najveću masenu koncentraciju GK posjeduje smilje estrahirano 5 min na $100 \text{ }^\circ\text{C}$, gdje je po gramu suhe tvari određen sadržaj galne kiseline $129,24 \text{ mg GAE/L}$. Slijedi ružmarin estrahiran MVE metodom, $90,96 \text{ mg GAE/L}$. Najmanju vrijednost pokazuje ružmarin estrahiran na sobnoj temperaturi, $8,04 \text{ mg GAE/L}$.
5. Ukupni fenoli Folin-Ciocalteu metodom ukazuju na identične zaključke, što sugerira usporedivost metoda. Najveći sadržaj ukupnih fenola je tako dobiven za ekstrakt smilja

dobiven ekstrakcijom vrućom vodom (917,1 mg GAE/L), dok ga slijede uzorci estrahirani MVE metodom, ružmarin, 460,1 mg GAE/L i lovor 225,1 mg GAE/L. Najmanja koncentracija GK uočena je u ekstraktu ružmarina koji je estrahiran na sobnoj temperaturi, 40,9 mg GAE/L.

6. Antioksidacijska aktivnost je donekle u skladu s koncentracijom fenolnih spojeva. Rezultati pokazuju kako uzorci lovora i smilja s većim sadržajem fenola pokazuju i veću antioksidacijsku aktivnost, dok su te vrijednosti za ružmarin nesrazmjerne u odnosu na drugo bilje. Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom zabilježena je u ekstraktu ružmarina, gdje je ekstrakcija potpomognuta UZV i MVE. Višestruko veće vrijednosti FRAP-a u odnosu na ostale biljke sugeriraju izvanredna svojstva ove biljke.
7. U konačnici pronađena je korelaciju između voltametrijskih i spektrofotometrijskih metoda čija je svrha bila utvrditi mogućnost primjene predložene metodologije u procjeni ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Konstantni omjer rezultata dobivenih primjenom Folin-Ciocalteu metode i diferencijalne pulsne voltametrije u iznosu od 5,62 (prosječna vrijednost svih uzoraka), pokazao je kako je predložena metoda pogodna za procjenu ukupnih fenola u realnim uzorcima. Za procjenu antioksidacijske aktivnosti omjer pokazuje odstupanja, te nije dovoljno pouzdan za procjenu.
8. Analiza ekstrakata bilja ukazuje na izvanrednu aktivnost i važnost skupina –R smještenih na fenolnom prstenu, u sposobnosti molekula da djeluju kao hvatači slobodnih radikala.
9. Elektroanalitička metodologija koja je predstavljena u ovom radu može se koristiti za brzu procjenu ukupnih fenola u ekstraktima suhog bilja, a samim tim i za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Dobivena korelacija između oksidacijskih potencijala i ukupnih fenola je ujedno i korak naprijed u razvoju elektrokemijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva.

Na kraju, ovaj diplomski rad ukazuje na velike prednosti i na važnost upotrebe dalmatinskog bilja u svakodnevnoj rutini. Bogati antioksidansima i drugim biloški aktivnim tvarima imaju niz zdravstvenih blagodati.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

PGS - *Pyrolytic Graphite Sheet*

EPG elektroda – *Edge Pyrolytic Graphite* elektroda

HOS – hlapljivi organski spojevi

ROS - reaktivne kisikove vrste

RNS - reaktivne dušikove vrste

CV - ciklička voltametrij

DPV - diferencijalna pulsna voltametrij

GK - galna kiselina

UZV - ultrazvučna ekstrakcija

MVE - mikrovalna ekstrakcija

ASA - *Artificial stomach acid*

SP metoda - spektrofotometrijska metoda

FC - *Folin-Ciocalteu*

FCR – *Folin-Ciocalteu* reagens

FRAP - *Ferric reducing/Antioxidant power*

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

6. LITERATURA

1. T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9-16, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>.
2. K. Chojnacka, D. Skrzypczak, G. Izydorezyk, K. Mikula, D. Szopa, A. Witek-Krowiak., Antiviral Properties of Polyphenols from Plants, *Foods* 10 (2021) 2277, <https://doi.org/10.3390/foods10102277>.
3. L. Shi, W. Zhao, Z. Yang, V. Subbiah, H.A. Rasul Suleria, Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29 (2022) 81112–81129, <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>.
4. S. K. Ray, S. Mukherjee, Evolving Interplay Between Dietary Polyphenols and Gut Microbiota-An Emerging Importance in Healthcare, *Frontiers in Nutrition* 8 (2021) 634944, doi: 10.3389/fnut.2021.634944.
5. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/516724m> (29.10.2023.)
6. L. Silva, A.C. Gonçalves, J.D. Flores-Félix, A. Falcão, G. Alves, Phenolic Compounds and Its Linkage, *Food Science and Technology* (2022).
7. P. Garcia-Salas, M.S. Aranzazu, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez., Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples, *Molecules* 15 (2010) 8813-8826, doi: 10.3390/molecules15128813.
8. K. Brainina, N. Stozhko, M. Vidrevich, Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations, *Antioxidants* 8 (2019) 297, <https://doi.org/10.3390/antiox8080297>.
9. Khalil, W.A. Yehye, A.E. Etxeberria, A.A. Alhadi, S.M. Dezfooli, N.B.M Julkapli, W.J. Basirun, A..Seyfoddin, Nanoantioxidants: Recent Trends in Antioxidant Delivery Applications, *Antioxidants* 9 (2020) 24, doi: 10.3390/antiox9010024.
10. R. R. Kotha, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative Stress and Antioxidants- A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays, *Antioxidants* 11 (2022) 2388, doi: 10.3390/antiox11122388.
11. E. A. Abourashed, Bioavailability of Plant-Derived Antioxidants, *Antioxidants* 2 (2013) 309-325, doi: 10.3390/antiox2040309.

12. F. H. Alencar Fernandes, H. R. Nunes Salgado, Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 257-265, doi: 10.1080/10408347.2015.1095064.
13. B. Badhani, N. Sharma, R. Kakkar, Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, *RSC Adv* 5 (2015) 27540-27557, <https://doi.org/10.1039/C5RA01911G>.
14. S. Shabani, Z. Rabiei, H. Amini-Khoei, Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review, *Int. J. Food Prop.* 23 (2020) 736-752, <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1753769>.
15. C. O. Chikere, Electrochemical determination of gallic acid in food matrices using novel materials, Robert Gordon University, Aberdeen (2020).
16. B. Bajpai, S. Patil, A new approach to microbial production of gallic acid, *Brazilian J. Microbiol.* 39 (2008) 708-711, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400021>.
17. Kolak. Z. Šatović, H. Rukavina, I. Rozić, Ljekovito bilje na hrvatskim prostorima, *Sjemenarstvo* 14 (1997) 341-353.
18. M. Krželj, I. Vitasović-Kosić, Etnobotanička primjena samoniklog bilja: Hrana i lijek za ljude i životinje na području općine Šestanovac (Dalmatinska zagora, Hrvatska), *Krmiva* 1 (2020) 3-13.
19. Ł. Łuczaj, M. Jug-Dujaković, K. Dolina, M. Jeričević, I. Vitasović-Kosić, Pharmacopoeias: Ethnobotanical Characteristics of Medicinal Plants Used on the Adriatic Islands, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 623070, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.623070>.
20. Paparella, B. Nawade, L. Shaltiel-Harpaz, M.A. Ibdah, A Review of the Botany, Volatile Composition, Biochemical and Molecular Aspects, and Traditional Uses of *Laurus nobilis*, *Plants* 11 (2022) 1209, doi: 10.3390/plants11091209.
21. S. Dudaš, L. Venier, Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L., *Glasnik zaštite bilja* 32 (2009) 46-55.
22. Ž. Španjol, B. Dorbić, M. Vučetić, Planika i lovor – značajne (važne) vrste našeg mediteranskog krša, *Vatrogastvo i upravljanje požarima* 2 (2021) 29-71.
23. URL:<https://jurassicplants.co.uk/products/laurus-nobilis-bay-tree-bay-laurel> (05.11.2023.)

24. F. Awada, K. Hamade, M. Kassir, Z. Hammoud, F. Mesnard, H. Rammal, O. Fliniaux, *Laurus nobilis* Leaves and Fruits: A Review of Metabolite Composition and Interest in Human Health, *App. Sci.* 13 (2023) 4606, <https://doi.org/10.3390/app13074606>.
25. Marques, B. Teixeira, M. L. Nunes. Bay Laurel (*Laurus nobilis*) Oils, Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Print 26 (2016) 239-245.
26. S. Bolarić, V. Dunkić, N. Bezić, D. Kremer, K. Karlović, A. Katuković, L. Jelak, S. Srećec, Influence of Geographic Position, Leaf Surface and Genetic Variability on Content of Total Essential Oils in 12 Distinct Populations of Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.), *Agric. Conspec. Sci* 84 (2019) 83-89.
27. D. Yilmaz, M. E. Gökdoğan, Determination of threshing and separation unit performance of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) plants, *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 14 (2021) 237-243, DOI: 10.25165/j.ijabe.20211406.64616.
28. <https://www.kew.org/plants/rosemary> (07.11.2023.)
29. W. P. Silvestre, F.R. Medeiros, F. Agostini, D. Toss, G.F. Pauletti, Fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation, *J. Food Sci. and Tech.* 56 (2019) 5422–5434, <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04013-z>.
30. URL: <https://blog.migk.hr/2023/08/28/ruzmarin/>(09.11.2023.)
31. URL:<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:457138-1> (09.11.2023.)
32. Visentin, S. Rodríguez-Rojo, A. Navarrete, D. Maestri, M.J. Cocero,, Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process, *J. Food Eng.* 109 (1) (2012) 9-15, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.015>.
33. H.I. Ali, M. Dey, A. Kazal Alzubaidi, S.J.A. Alneamah, A.B. Altemimi, A. Pratap-Singh, Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Supplementation on Probiotic Yoghurt: Physicochemical Properties, Microbial Content, and Sensory Attributes, *Foods* 10 (2021) 2393, doi: 10.3390/foods10102393.
34. V. Petričević, M. Lukić, Z. Škrbić, S. Rakonjac, V. Dosković, M. Petricevic, A. Stanojković, The effect of using rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in broiler nutrition on production parameters, slaughter characteristics, and gut microbiological population, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 42 (2018) 658-664, doi: 10.3906/vet-1803-53.

35. Y.S. Yun, S. Noda, G. Shigemori, R. Kuriyama, S. Takahashi, M. Umemura, Y. Takahashi, H. Inoue, Phenolic Diterpenes from Rosemary Suppress cAMP Responsiveness of Gluconeogenic Gene Promoters, *Phytother. Res.* 27 (2013) 906-910, doi: 10.1002/ptr.4794.
36. Zeroual, E.H. Sakir, F. Mahjoubi, M. Chaouch, Effects of Extraction Technique and Solvent on Phytochemicals, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Cultivated and Wild Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Taounate Region (Northern Morocco), *Biointerface Res. Appl. Chem.* 12 (2022) 8441-8452, doi: 10.33263/BRIAC126.84418452.
37. N. Kunc, A. Frlan, D. Baričević, N. Kočevar Glavač, M. Kokalj Ladan, Essential Oil and Hydrosol Composition of Immortelle (*Helichrysum italicum*), *Plants* 11 (2022) 2573, doi: 10.3390/plants11192573.
38. URL: <https://pansgardenojai.com/products/immortelle-curry-plant-helichrysum-italicum> (15.11.2023)
39. URL: <https://www.vrtlarica.hr/smilje-sadnja-uzgoj/>(17.11.2023.)
40. M. Aćimović, Seasonal Variations in Essential Oil Composition of Immortelle Cultivated in Serbia, *Horticulturae* 8 (2022) 1183, <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121183>.
41. M. Čagalj, I. Grgić, M. Zrakić, M. Ivanković, Economic evaluation (efficiency) of investment in organically grown immortelle [*Helichrysum italicum ssp. italicum*] in Bosnia and Herzegovina. The first report from Mediterranean, *J. Cent. Eur. Agric.* 20 (2019) 524-541, <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.1.2164>.
42. S. Kovačić, Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga, Zagreb (2008).
43. V.M. Tadić, A. Žugić, M. Martinović, M. Stanković, S. Maksimović, A. Frank, I. Nešić Enhanced Skin Performance of Emulgel vs. Cream as Systems for Topical Delivery of Herbal Actives (Immortelle Extract and Hemp Oil), *Pharmaceutics* 13 (2021) 1919, doi: 10.3390/pharmaceutics13111919.
44. M. Herrero, Towards green extraction of bioactive natural compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* (2023), <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04969-0>.

45. D.P. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, J.J. Zhang, H.B. Li., Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 96, doi: 10.3390/ijms18010096.
46. Lama-Muñoz, M.d.M. Contreras, Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A Review, *Foods* 11 (2022) 3671, <https://doi.org/10.3390/foods11223671>.
47. F. Chemat, M. A. Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8615-8627, doi: 10.3390/ijms13078615.
48. F. Chemat, M. Abert-Vian, A. Sy. Fabiano-Tixier, J. Strube, L. Uhlenbrock, V. Gunjevic, G. Cravotto, Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges, *TrAC Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 248-263, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>.
49. K. Hackl, W. Kunz, Some aspects of green solvents, *C. R. Chim.* 21 (2018) 572-580, <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>.
50. Sridhar, M. Ponnuchamy, P.S. Kumar, A. Kapoor, D.N. Vo, S. Prabhakar, Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 3409–3443, doi: 10.1007/s10311-021-01217-8.
51. S. A. Siddiqui, Factors Affecting the Extraction of (Poly)Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction, *Crit Rev Anal Chem.* 2023. <https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2266846>.
52. T. Maher N.A. Kabbashi, M.E.S. Mirghani, M.Z. Alam, et al, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Acacia Seyal Gum Using Response Surface Methodology and Their Chemical Content Identification by Raman, FTIR and GC-TOFMS, *Antioxidants* 10 (2021) 1612, <https://doi.org/10.3390/antiox10101612>.
53. 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>.

54. M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis* 27 (3) (1999) 259-271, doi:10.1051/analisis:1999116.
55. H. Lopez-Salazar, B. H. Camacho-Díaz, M. L. A. Ocampo, A. R. Jiménez-Aparicio, Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review, *Bioresources* 18 (2023) 6614-6638, doi: 10.15376/biores.18.3.Lopez-Salazar.
56. B. Ondruschka, J. Aasghar, Microwave-Assisted Extraction – A State-of-the-Art Overview of Varieties, *Chimia* 60 (2006) 321-325, doi: 10.2533/chimia.2012.712.
57. Dominguez-López, M. Pérez, R. M. Lamuela-Raventós, Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 7 (2023) 1-7, doi: 10.1080/10408398.2023.2220031.
58. G. Rocha Martins, A. Ferreira Monteiro, F. R. Lopes do Amaral, A. Sant'Ana da Silva, A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolic quantification of condensed tannin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract, *J. Food Sci. Technol.* 58 (2021) 4693-4702, <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04959-5>.
59. E. Attard, A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols, *Cent. Eur. J. Biol.* 8 (2013) 48-53, <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0107-3>.
60. O. R. Bancuta, A. Chilian, I. Bancuta, R.M. Ion, R. Setnescu, T. Setnescu, A. Gheboianu, Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations, *Rom. Journ. Phys* 61 (2016) 1255-1264.
61. URL: https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-Folin-Ciocalteu-method-Ford-et-al-2019_fig1_364212254. (18.11.2023.)
62. Bolanos de la Torre, T. Henderson, P.S. Nigam, R.K. Owusu-Apenten, A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey, *Food Chem.* 174 (2015) 119-123, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.009.
63. 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>.

64. M. Spiegel, K. Kapusta, W. Kołodziejczyk, J. Saloni, B. Żbikowska, G-A. Hill, Z. Sroka, Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids–Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features, *Molecules* 25 (2020) 3088, doi:10.3390/molecules25133088.
65. B. Nigović, S. Behetić, Elektroanalitika u farmaciji, *Farmaceutski glasnik* 63 (2007) 163-175, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:612420>.
66. I. Piljac. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, Mediaprint tiskara Hrastić, Zagreb (2015).
67. M. Pisoschi, C. Cimpanu, G. Predoi, Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review, *Open Chem.* 13 (2015) 824–856, <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0099>.
68. Q. Zhang, Y. Lu, S. Li, J. Wu, Q. Liu, Peptide-based biosensors, *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier (2018) 565-601. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00024-7>
69. G. Ghosh, Sensing of Deadly Toxic Chemical Warfare Agents, Nerve Agent Simulants, and their Toxicological Aspects, Elsevier, Chapter 27 Graphene oxide-nanocomposite-based electrochemical sensors for the detection of organophosphate pesticides, (2023) 635-658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90553-4.00009-3>.
70. URL: <https://industrial.panasonic.com/ww/products/pt/pgs> (25.11.2023.)
71. 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>.
72. P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1957-65, doi: 10.1021/jf001044u.
73. O. Firuzi, S. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry, *Biochim. Biophys. Acta.* 18 (2005) 174-184, doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.001.

74. Ruđer Bošković Institute. Development of voltammetric methods for the characterisation of natural antioxidant [Internet]. [citirano 5.12. 2023.]
75. F. A. Settle, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. 1. Izdanje. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR (1997), doi: 10.1080/10826079808006889.