

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni, 2017.

Ivana Bendelja

829/N

**UTJECAJ VELIČINE ČESTICA
NA FIZIKALNA I KEMIJSKA
SVOJSTVA VODENIH
EKSTRAKATA BILJAKA IZ
PORODICE USNAČA (*Lamiaceae*)**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Maje Benković, te uz pomoć dr.sc. Tamare Jurina iz Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Benković na strpljenju, razumijevanju i pristupačnosti tijekom izrade diplomskog rada. Također, hvala doc.dr.sc. Davoru Valingeru na strpljenju i uloženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Posebna zahvala mojim roditeljima koji su sve ovo omogućili, i koji su me uvijek poticali i podržavali tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

**UTJECAJ VELIČINE ČESTICA NA FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA
VODENIH EKSTRAKATA BILJAKA IZ PORODICE USNAČA (*Lamiaceae*)**

Ivana Bendelja, 829/N

Sažetak: U novije doba biljke su prepoznate kao bogati izvori fitokemikalija, od kojih mnoge posjeduju i važna antioksidativna svojstva. Epidemiološka istraživanja pokazala su da konzumacija biljne hrane bogate antioksidansima ima povoljne učinke na zdravlje jer usporava mnoge degenerativne procese i može značajno sniziti rizik od raka i kardiovaskularnih bolesti. U ovom radu provedeno je istraživanje na samoniklim biljkama iz porodice usnača, tj. na vodenim ekstraktima melise, mente, kadulje, lavande i majčine dušice. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj veličine čestica na fizikalna i kemijska svojstva biljnih ekstrakata. Vodeni ekstrakti svake biljke pripremljeni su od usitnjenog sušenog bilja veličina čestica <100 µm, 100 µm, 250 µm, 355 µm, 500 µm, 800 µm i 1000 µm. Ekstraktima su izmjereni pH, vodljivost, TDS, ukupna suha tvar, antioksidacijski kapacitet pomoću ABTS i DPPH metoda, ukupni polifenoli, te UV-VIS i NIR kontinuirani spektri. Utjecaj veličine čestica na fizikalna svojstva ekstrakata utvrđen je za ekstrakte svih pet biljaka. Povećanje veličine čestica uzrokovalo porast antioksidacijske aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola ekstrakata mente, kadulje i lavande, dok je kod majčine dušice i melise utvrđen suprotan trend.

Ključne riječi: samoniklo ljekovito bilje, veličina čestica, antioksidacijski kapacitet, polifenoli, spektroskopija

Rad sadrži: 73 stranice, 44 slika, 6 tablica, 117 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Maja Benković*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Tamara Jurina*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
3. Doc.dr.sc. *Davor Valinger*
4. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević* (zamjena)

Datum obrane: 30. studeni, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Section for Fundamental Engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

INFLUENCE OF PARTICLE SIZE ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF AQUEOUS EXTRACTS OF PLANTS FROM *Lamiaceae* FAMILY

Ivana Bendelja, 829/N

Abstract: In the modern age, plants are recognized as rich sources of phytochemicals, and many of them have shown important antioxidant traits. Epidemiological studies have shown that consumption of herbal food, rich in antioxidants, has favorable impact on human health, it slows down degenerative processes and reduces risk of cancer and cardiovascular diseases. In this study water extracts of thyme, sage, mint, lemon balm and lavender were prepared. The aim of the study was to determine the influence of particle size on physical and chemical characteristics of plant material. Water extracts of each plant were prepared with particle sizes <100 µm, 100 µm, 250 µm, 355 µm, 500 µm, 800 µm and 1000 µm and pH, conductivity, TDS, dry matter, antioxidant capacity, total polyphenolic content and continuous UV-VIS and NIR spectra of each extract were recorded. Influence of particle size on physical properties of the extracts was determined for all five analysed plants. Furthermore, an increase in particle size caused an increase in antioxidant capacity and total polyphenolic content of mint, lavender and sage extracts, while lemon balm and thyme extracts exhibited the opposite trend.

Keywords: *wild medicinal plants, particle size, antioxidant capacity, polyphenols, spectroscopy*

Thesis contains: 73 pages, 44 figures, 6 tables, 117 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Maja Benković, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Tamara Jurina.*

Reviewers:

1. PhD. *Jasjenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
3. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 30. november, 2017.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Ljekovito bilje	3
2.1.1. Menta (<i>Mentha piperita</i> L.)	4
2.1.2. Majčina dušica (<i>Thymus serpyllum</i>)	5
2.1.3. Kadulja (<i>Salvia officinalis</i>)	7
2.1.4. Lavanda (<i>Lavandula</i>)	8
2.1.5. Melisa (<i>Melissa officinalis</i>)	9
2.2. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva ljekovitog bilja	10
2.2.1. Faktori koji utječu na iskorištenje ekstrakcije	13
2.2.2. Veličina čestica i njen utjecaj na ekstrakciju	14
2.2.3. Sastav biljnih ekstrakata	15
2.3. Metode analize fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata	16
2.3.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta	16
2.3.1.1. ABTS metoda	16
2.3.1.2. DPPH metoda	17
2.3.1.3. FRAP metoda	17
2.3.1.4. Briggs-Rauscher metoda	18
2.3.2. Metode određivanja fizikalnih svojstava	18
2.3.2.1. Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost	18
2.3.2.2. Suha tvar	19
2.3.2.3. pH	19
2.3.3. Spektrofotometrijske metode	20
2.3.3.1. UV –VIS spektroskopija	20
2.3.3.2. NIR spektroskopija i kemometrija	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. MATERIJALI	23
3.1.1. Otapala i reagensi	23
3.1.2. Aparatura i pribor	24
3.2.	
METODE	25
3.2.1. Usitnjavanje	25
3.2.2. Prosijavanje	25
3.2.3. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata	25
3.2.4. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja	26
3.2.5. pH vrijednost ekstrakata	27
3.2.6. Ukupne otopljene tvari (TDS)	27
3.2.7. Vodljivost	27
3.2.8. Određivanje udjela ukupnih polifenola	27
3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	28
3.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	30
3.2.11. UV- VIS spektroskopija	31
3.2.12. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)	31
3.2.13. Obrada podataka i modeliranje	32
4. REZULTATI	33

4.1.	Fizikalna svojstva ekstrakta.....	33
4.1.1.	Suha tvar.....	33
4.1.2.	Vodljivost.....	35
4.1.3.	Ukupne otopljene tvari (TDS).....	37
4.1.4.	pH vrijednost.....	38
4.2.	Antioksidacijski kapacitet i ukupni polifenoli.....	40
4.3.	UV I NIR Spektroskopija.....	47
4.4.	PCA analiza.....	50
4.5.	PLS modeli.....	56
5.	ZAKLJUČCI	60
6.	LITERATURA	62

1. UVOD

U ljekovito bilje ubrajamo one biljne vrste i kultivare čiji barem jedan dio sadrži biološki aktivne spojeve koji se mogu koristiti u liječenju ili za farmaceutsko-kemijske analize (Pahlow, 1989). U novije doba biljke su prepoznate kao bogati izvori fitokemikalija, od kojih mnoge posjeduju i važna antioksidativna svojstva (Dragland i sur., 2003). Mnogi biljni spojevi imaju dugoročan blagotvoran utjecaj na zdravlje ljudi. Upotreba ljekovitog bilja je vjerojatno najstarija metoda liječenja raznih bolesti (Kosalec i sur., 2009).

Globalna svijest o štetnosti sintetičkih lijekova potaknula je istraživanje terapijskih svojstava biljnih pripravaka (Bashi i sur., 2012). Epidemiološka istraživanja pokazala su da konzumacija biljne hrane bogate antioksidansima ima povoljne učinke na zdravlje jer usporava mnoge degenerativne procese i može značajno sniziti rizik od raka i kardiovaskularnih bolesti (Arabshahi-Delouee i Urooj, 2007). Prirodni antioksidansi iz biljnog materijala su vrlo učinkoviti u prevenciji oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima (Bashi i sur., 2012).

Od 35000 biljnih vrsta na Zemlji, 12000 se koristi u medicinske svrhe (Šilješ i sur., 1992). U Hrvatskoj je poznato više od 600 divljih ljekovitih biljnih vrsta, od kojih se 120 tradicionalno koristi u narodnoj medicini, kao hrana, u proizvodnji meda, praškova, sokova, eliksira, tinktura, ulja, vina itd. (Kolak i sur., 2002). Mnogo faktora utječe na ljekovitost određene biljke a neki od njih su: tip okoliša, klima i kvaliteta zemlje. Ljekovito bilje pokazalo se učinkovitim u liječenju i ublažavanju mnogih bolesti i stanja, poput astme, alergije, karcinoma, ekcema, hormonalnih poremećaja, migrene, artritisa, kroničnog umora, probavnih smetnji, depresije, tjeskobe, nesаницe itd. Porodica *Lamiaceae* (usnače) je bogata fitokemijskim svojstvima te se mnoge vrste koriste kao ljekovite i začinske biljke (Režan, 2017).

U ovom radu provedeno je istraživanje na samoniklim biljkama iz porodice usnača, tj. na vodenim ekstraktima melise, mente, kadulje, lavande i majčine dušice kako bi se utvrdilo postoji li povezanost između veličine čestica biljaka i njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava, tj. utječe li veličina čestica na vodljivost, pH, postotak suhe tvari, udio polifenola i antioksidativni kapacitet ekstrakata navedenih biljaka. Ovih pet vrsta samoniklog bilja

izmljeveno je na sedam različitih veličina čestica (<100 μm , 100 μm , 250 μm , 355 μm , 500 μm , 800 μm i 1000 μm), te je za svaku veličinu čestica napravljena vodena ekstrakcija. Na vodenim ekstraktima izmjerena su fizikalna svojstva; pH, vodljivost, TDS i suha tvar, i kemijska svojstva. Određen je antioksidacijski kapacitet pomoću ABTS i DPPH metoda, određeni su ukupni polifenoli, te su korištene i spektroskopske metode UV-VIS i NIR, na temelju kojih su napravljene analiza glavnih komponenata (PCA) i „partial least squares“ (PLS) modeli kako bi se bolje uočile razlike između uzoraka uzrokovane razlikama u veličini čestica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJEKOVITO BILJE

U ljekovito bilje ubrajamo one biljne vrste i kultivare čiji barem jedan dio sadrži biološki aktivne spojeve koji se mogu koristiti u liječenju ili za farmaceutsko-kemijske analize (Pahlow, 1989). Ljekovito bilje se često definira i kao dio biljke koji se koristi u prehrani zbog svojih ljekovitih svojstava (Smith i Winder, 1996).

Ljekovito bilje koristi se u medicinske, farmaceutske i kozmetičke svrhe. Povijesni izvori smatraju da je ljekovito bilje u upotrebi u okviru narodne medicine punih 16000 godina, a prvi pisani zapis o ljekovitim svojstvima biljaka potječe od starih Sumerana, 3000 godina prije Krista (Anonymus 1, 2017). Ljekovito bilje danas se prodaje u različitim oblicima kao što su čajevi, sirupi, ulja, tinkture, tablete i kapsule. Proizvodi biljne medicine uglavnom su jeftiniji i smatraju se sigurnijim za upotrebu od sintetičkih lijekova. Ljekovite biljke prodaju se svježe, sušene ili kao ekstrakti, gdje su otopljene u vodi, alkoholu ili drugim ekstraktima koji čine određene kemijske spojeve dostupnijim. Ekstrakti sadrže mnoge spojeve uključujući masne kiseline, sterole, alkaloidne, flavonoide, glikozide, saponine itd. Biljke sadrže mnoge kemijske spojeve od kojih su mnogi sekundarni metaboliti i uključuju aromatične spojeve od kojih je najviše fenola ili njihovih oksigeniranih derivata kao što su tanini (Hartmann, 2007). Mnogi od tih spojeva imaju antioksidativna svojstva. Iako se biljke smatraju sigurnijima od sintetičkih lijekova, mogu imati i nuspojave zbog svojih aktivnih sastojaka (npr. hepatotoksični alkaloidi, u gavezu), kontaminanata ili interakcije s drugim lijekovima (Bent, 2008).

Porodica *Lamiaceae* (usnače) je bogata fitokemijskim svojstvima te se mnoge vrste koriste kao ljekovite i začinske biljke (Režan, 2017).

U ovom radu provedeno je istraživanje na samoniklim biljkama iz porodice usnača, tj. na vodenim ekstraktima melise, mente, kadulje, lavande i majčine dušice.

2.1.1. Menta (*Mentha piperita* L.)



Slika 1. *Mentha piperita* L. (Anonymous 2, 2017)

Paprena metvica, (prikazana na slici 1), je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*), koja raste u Europi, sjevernoj Americi i Kanadi, a uzgaja se diljem svijeta (McKay i Blumberg, 2006). Paprena metvica je prirodni hibrid dvije biljke; klasaste metvice (*Mentha spicata* L.) i vodene metvice (*Mentha aquatic* L.) (Iscan i sur., 2002). Odgovara joj pjeskovito vlažno tlo, a razmnožava se vriježama koje rastu iz podzemnih dijelova biljke. Cvate od lipnja do kolovoza. Koriste se najviše listovi (svježi ili sušeni), ali i cijela nadzemna biljka. Listovi su jakog aromatičnog mirisa po mentolu. Paprena metvica koristi se u mnogim receptima, te kao prirodan lijek za smirenje, kod probavnih tegoba, akutnog i kroničnog gastritisa i enteritisa. Najčešće se koristi u obliku čajeva, tinktura, ulja, a mogu se i koristiti suhi i svježi listovi. Također djeluje kao relaksant, karminativ (blagotvorno djeluje na prekomjerno nakupljanje plinova u probavnom sustavu i na grčeve u crijevima), analgetik te ima i antibakterijska svojstva. Međutim, može imati i određeno nepovoljno djelovanje, kao na primjer kod uzimanja nekih lijekova, alergija, trudnoće, gastroezofagealne žučne bolesti, i žučnih kamenaca.

Listovi sadrže 1-4 % eteričnog ulja koje se ekstrahira destilacijom vodenom parom, a to ulje ima široku primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji pa se tako koristi za poboljšanje okusa zubnih pasta, za izradu čokolada, žvakaćih guma, krema za masnu kožu i krema s učinkom hlađenja, u kulinarstvu itd. Esencijalno ulje sadrži slijedeće spojeve: mentol (33-60 %), menton (15-32 %), izomenton (2-8 %), limonen (1-7 %), 1,8-cineol (eukaliptol) (5-13 %), mentofuran (1-10 %), mentil acetat (2-11 %), pulegon i karvon (Gherman i sur., 2000).

U sastavu masnih kiselina lipidne frakcije lišća paprene metvice prevladavaju palmitinska, linolenska i linolna kiselina (Maffei i Scannerini, 1992). Lišće sadrži 1,2- 3,9 % esencijalnog ulja (Pićurić-Jovanović i sur., 1997), dok infuzija sušenog lišća sadrži 21 % originalnog ulja.

List paprene metvice sadrži oko 19-23 % polifenola, od čega najviše ima eriocitrina i ružmarinske kiseline, luteolina, 7-O-rutinozida, hesperidina, te u manjim količinama 5,6-dihidroksi-7,8,3',4'-tetrameoksiflavona, pebrelina, gardenina B i apigenina (Zheng i Wang, 2001). Oko 75 % sadržaja polifenola prisutnih u lišću, prisutno je u ekstrahiranoj infuziji (750 mg L⁻¹) (Duband i sur., 1992).

Zahvaljujući velikim količinama triptofana, aminokiseline od kojeg se sintetizira serotonin, hormon odgovoran za dobro raspoloženje, menta ima i svojstvo ublažavanja stresa. Sadrži i vitamine A, C te druge aktivne tvari poput ružmarinske kiseline, a upravo ovi nutrijenti čine organizam otpornijim na upale i infekcije. Neutralizira slobodne radikale i sprečava proizvodnju upalnih tvari te ima antioksidativna svojstva. Sadrži i perililni alkohol što se u nekim istraživanjima pokazalo kao bitnim spojem za antikancerogeno djelovanje.

Mentol je jedan od najpoznatijih sastojaka mente, a on je i analgetik. Eterično ulje metvice ima uravnoteženiji kemijski sastav od čistog mentola ili ulja japanske metvice, te je time manje štetno, zahvaljujući tome što osim mentola sadrži i spojeve poput mentona, mentilacetata i mentofurana koji pospješuju djelovanje mentola, pogotovo kod grčeva u mišićima.

2.1.2. Majčina dušica (*Thymus serpyllum*)



Slika 2. *Thymus serpyllum* (Anonymous 3, 2017)

Majčina dušica, (prikazana na slici 2), raste na suhim i sunčanim mjestima, na livadama, pašnjacima i na kamenju. Raste kao samonikla biljka na Mediteranu i u Sjevernoj Africi, a u Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena. Često se pojavljuje u većim skupinama na suhim rubovima šuma, sunčanim mjestima bez stalne vlage i sjene. Cvate tokom cijelog ljeta i bere se cijela biljka bez korijenja i osušenih dijelova biljke. Osušena biljka sadrži oko 0,6 % eteričnog ulja (*Oleum serpylli*), koje se sastoji pretežno od cineola, a najvažniji sastojak ulja, timol, zastupljen je u manjoj količini. Majčina dušica sadrži još karvakrol, tanin, gorke tvari i flavone. Ljekoviti sastojci nalaze se jedino i isključivo u listu i cvijetu majčine dušice. Bere se u svibnju, lipnju, srpnju, kolovozu i rujnu. Za liječenje se sabiru mladice s cvjetovima prije i za vrijeme cvatnje, a najdjelotvornija je ako se bere po podnevnom suncu.

Majčina dušica sadrži 44,0 % ugljikohidrata, 24,3 % celuloze, 13,2 % ukupnog pepela, 6,8 % bjelančevina, 4,6 % lipida i dr. Sadrži 0,5 % (divlja) do 2,5 % (uzgojena ili vrtna) eteričnog ulja. Sadržaj eteričnog ulja majčine dušice poznat je od šezdesetih godina, te obuhvaća; geraniol, terpineol, citronelol, borneol, linalol, nerolidol, citral, cineol, karvakrol, timol, kamfen, alfa pinen, limonen i druge spojeve (Schratz i sur., 1965). Prema nekim autorima u ulju se nalazi najviše timola (do 30 %) i karvakrola (do 20 %) (Thompson i sur., 2003), dok drugi smatraju da ima više γ -terpinena (<22%) i p-cimena (<20 %) (Rasooli i Mirmostafa, 2002). Takve razlike u sastavu ulja objašnjene su činjenicom da udio komponenata ovisi o uvjetima rasta biljke, a najviše o nadmorskoj visini (Raal i sur., 2004).

Ova aromatična biljka ima brojna ljekovita svojstva, pa tako djeluje kao antiseptik, analgetik, karminativ, diuretik, dijaforetik (pojačava lučenje znoja), te se također koristi u vodicama za ispiranje usta, te protiv kašlja i prehlade (Farooqi i sur., 2005). Majčina dušica obiluje željezom i kalcijem. Pozitivno djeluje na razna oboljenja kao npr. kod neuroza, depresije i alkoholizma.

Bitno je naglasiti da ljekoviti sastojci lako isparavaju: najveći dio se gubi već pri mljevenju, a ostatak nakon proizvodnje. Kuhanjem u otvorenoj posudi oni ispare, te tako pripremljen čaj je izgubio sva ljekovita svojstva. Čaj pripremljen s nedovoljnom količinom biljke također nema ljekovita svojstva.

2.1.3. Kadulja (*Salvia officinalis*)



Slika 3. *Salvia officinalis* (Anonymous 4, 2017)

Kadulja, (prikazana na slici 3), raste u kamenjarima Mediterana u niskim grmovima. Za uspješan rast potrebno joj je puno sunca i topline, a jako je osjetljiva na mraz i previše vlage. Sije se u travnju i svibnju, a sjeme se malo pokrije zemljom. Gnoji se svakih mjesec i pol dana mješavinom dušika, fosfora i kalija.

Pri korištenju kadulje za čajeve najkorisniji su usitnjeni suhi listovi, a tinktura od kadulja se priprema tako da se u decilitar 70-postotnog etilnog alkohola stavi 20 grama usitnjenog kaduljinog lista.

Ima protuupalna, antivirusna, antibakterijska (Horiuchi i sur., 2007) i antifungalna svojstva te je i snažan antioksidans. Čisti i stimulira rad limfe, poboljšava cirkulaciju, regulira hormone te djeluje lipolitički, adstringentno i spazmolitičko, a ima i određena analgetička svojstva. Također, istražuje se i pozitivan učinak kadulje na liječenje Alzheimerove bolesti (Akhondzadeh i sur., 2003).

U sastavu kadulje su minerali te vitamini A, B₁, B₂ i C te alfa i beta tujon, limonen, cineol, kamfor, kamfen, alfa pinen, borneol, beta pinen, alfa humulen, viridiflorol. Listovi kadulje sadrže eterično ulje, flavonoide, antioksidanse, fenole, salviol, salven, tanin, gorke tvari, bjelančevinu, škrob, kalcijev oksalat, soli fosforne kiseline, kalijeve i kalcijeve soli. Glavno antioksidativno djelovanje imaju karnozična kiselina, karnozol i metil karnozat (Pizzale i sur., 2002).

Najljekovitija svojstva ima list koji se bere kada kadulja počne cvjetati, a to je najčešće u svibnju. List se bere, suši i čuva. Glavni ljekoviti sastojak lista je isparljivo mirisno eterično ulje, kojeg ima od 1,5 do 2,5 %. Kadulja je sastavni dio mnogih lijekova koji služe za

ispiranje usta i grla kod upala jer jača sluznicu i djeluju antiseptično. Čaj od kadulje se dugo vremena koristio protiv znojenja za oboljele od tuberkuloze jer smanjuje lučenje znojnih žlijezda.

2.1.4. Lavanda (*Lavandula*)



Slika 4. *Lavandula* (Anonymous 5, 2017)

Lavanda, (prikazana na slici 4), je podrijetlom iz Grčke, a raste diljem Mediterana pa sve do Afrike i jugoistočnih predjela Indije.

Neke vrste podnose i hladniju klimu (do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), ali bolje uspijevaju u toplijim klimama. Lavanda se sadi na suhim i zaklonjenim mjestima. Cvijeta od lipnja do rujna, a sjeme dozrijeva od kolovoza do listopada.

Lavanda sadrži eterično ulje, a njegovi glavni sastojci su: linalil-acetat, geranil-acetat, geraniol, linalil, geranil-butirat, kamfor, citronelal te sadrži i derivate propionske i valerijanske kiseline, te tanina (Woronuk i sur., 2011). Eterično ulje ima veću vrijednost što je veći postotak estera (linalil-acetata i linalola). Lavandu se preporuča brati u ranim jutarnjim satima, a tokom razdoblja kada je polovica cvjetova otvoreno kako bi se što veća količina aktivnih tvari zadržala.

Eterično ulje lavande je jedno od rijetkih koje se može nerazrijeđeno nanositi na kožu jer potiče njezinu regeneraciju, odlično je sredstvo pri zacjeljivanju rana i ožiljaka, te akni, ekcema i opekotina kao i pomoć u liječenju svih bakterijskih i gljivičnih infekcija kože.

Lavanda djeluje kao holagog (potiče lučenje žuči), holeretik (pomaže stvaranje žuči), antispazmodik (smanjuje mišićni spazam) (Ghelardini i sur., 1999), antifungicid (D'Auria i sur., 2005), diuretik, emenagog (povoljno djeluje na menstrualni ciklus kod žena) i

antireumatik. Također, dokazano je da aromaterapija lavandom pomaže kvaliteti sna kod odraslih (Hudson, 1996).

2.1.5. Melisa (*Melissa officinalis*)



Slika 5. *Melissa officinalis* (Anonymous 6, 2017)

Melisa ili matičnjak, (prikazana na slici 5), raste na području južne Europe i mediteranske regije. Kao samonikla biljka raste među grmljem, uz rubove šuma, uz živice i ograde u blizini naselja. Matičnjak je fotofilna i termofilna biljka, što znači da joj je potrebno puno svjetlosti i topline. Tlo ne smije biti jako suho i toplo te ne smije biti ustajale vode. Nije preporučljivo saditi ga na nizinama gdje je česta magla ili je slaba cirkulacija zraka jer to povećava vjerojatnost pepelnice i pjegavosti listova. Polusjenovita mjesta joj pogoduju, a sjenovita smanjuju sadržaj eteričnog ulja. Ljekoviti su listovi i lisni izdanci koji se trebaju brati neposredno prije cvatnje jer je u njima tada najviši sadržaj eteričnog ulja. Nikad se ne bere vlažna biljka. Nakon što se ubere osjetljiva je na pritiske i nagnječenja. Suši se prirodno, u hladu i na prozračnom prostoru. Osušeni matičnjak se čuva u papirnatim vrećicama, kartonskim kutijama ili staklenkama, ali nikako u plastičnim vrećicama. Eterično ulje matičnjaka dobiva se destilacijom pomoću vodene pare svježih listova i vršnih dijelova matičnjaka. Iskorištenje je vrlo malo (oko 0,05 %).

Listovi matičnjaka sadrže 4 - 7 % derivata hidroksicimetne kiseline, prije svega ružmarinske kiseline, ali i klorogensku kiselinu, kavenu kiselinu i eterično ulje od 0,05 do 0,3 %, kod uzgojnih vrsta i do 0,8 %. Najvažniji sastojci: citral (40 - 70 %, kao mješavina geraniola i nerala), citronelal (1 - 20 %) i β -kariofilen (5 - 15 %). Ostali sastojci: linalol, geraniol, kariofilen epoksid, germakren D, metilcitronelal, 6-metil-5-hepten-2-on, geranil acetat, α -kopaen i nerol (Carnat i sur., 1998). Sastav eteričnog ulja ovisi o mjestu rasta, klimi, vremenu

sakupljanja te o starosti biljke. Ostali su sastojci: gorke tvari, smola, sluzi, glukozidi, saponini i timol. U svježoj biljci ima i do 253,0 mg/100 g vitamina C.

Po kemijskom sastavu, eterično ulje melise je aldehidno ulje. Glavni kemijski sastojci su monoterpenski aldehidi geranial i neral te aldehid citronelal koji čine od 60 do 70 % sastojaka ulja. Ostatak su monoterpenski alkoholi, monoterpeni i seskviterpeni (Kreis i Mosandl, 1994).

Smatra se da ima antibakterijsko, spazmolitičko i umirujuće djelovanje, te da povoljno djeluje na anksioznost, stres, poremećaje spavanja i gastrointestinalne poremećaje (Bisset i Wichtl, 1994), a do danas nisu zabilježene nuspojave (Wong i sur., 1998). Također, ova biljka se istražuje u svrhu liječenja Alzheimerove bolesti (Perry i sur., 1999) i poboljšanja kognitivnih procesa i raspoloženja (Kennedy i sur., 2002).

2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA LJEKOVITOG BILJA

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala je prvi korak korištenju fitokemikalija kod pripreme dodataka prehrani, sastojaka hrane, farmaceutskih pripravaka i kozmetičkih proizvoda. Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili sušenih biljki. Najpoznatija metoda ekstrakcije je svakodnevna kućna priprema čaja u vreloj vodi. Čaj je prepoznat kao napitak koji ima značajan zaštitan utjecaj na zdravlje zbog visokog udjela polifenola (Manzocco i sur., 1998). Polifenoli su najznačajnija skupina kemijskih spojeva koje nalazimo u čaju, te imaju antioksidativnu, antikancerogenu ulogu te mogu zaštitno djelovati protiv ateroskleroze (Atoui i sur., 2005). Sve ekstrakcijske metode imaju zadatak olakšati otpuštanje unutarstaničnih komponenata u ekstrakcijski medij (Bashi i sur., 2012). Kao rezultat velikog tehnološkog napretka, farmaceutska industrija, proizvođači aditiva u hrani i pesticida postali su zainteresirani za bioaktivne molekule iz prirodnih izvora (Anklam i sur., 1998). Prije same ekstrakcije biljni materijal se obično suši i melje, drobi i homogenizira.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata može biti provedena različitim ekstrakcijskim metodama. Sve ekstrakcijske metode imaju isti cilj; izdvojiti ciljane bioaktivne komponente iz biljnog uzorka, povećati selektivnost analitičkih metoda, povećati osjetljivost bioloških analiza povećanjem koncentracije spojeva koje se želi istražiti, prevesti bioaktivne komponente u prikladniji oblik za detekciju i separaciju, i osigurati reproducibilnu metodu neovisnu o razlikama u uzorcima (Smith, 2003).

Odabir ekstrakcijske metode ovisi primarno o vrsti spojeva koji zanimaju istraživača, te o vrsti i fizikalnom stanju uzorka. Tekući uzorci ne zahtijevaju ekstrakciju prije analize, iako se ona može provesti kako bi se izolirali određeni spojevi. Najčešće korištena ekstrakcijska metoda za ekstrakciju antioksidansa iz hrane je maceracija ili homogenizacija uzorka s otapalom, a koriste se i alternativne metode (nekonvencionalne). Najveća ograničenja konvencionalnih metoda su dugo vrijeme ekstrakcije, zahtijevaju otapalo visoke čistoće, isparavanje velike količine otapala, slaba selektivnost ekstrakcije i uništavanje termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013). Nekonvencionalne metode, razvijene u posljednjih 50 godina, prihvatljivije su za okoliš zbog smanjene upotrebe sintetičkih i organskih kemikalija, smanjenog vremena provođenja, energetski su učinkovitije, koriste obnovljive sirovine, te osiguravaju veći prinos i kvalitetu ekstrakta (Mustafa i Turner, 2011). Neke od tih metoda su ekstrakcija pomoću ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja, probavnih enzima, ekstruzije, zagrijavanje mikrovalovima, superkričnih tekućina, i ubrzanih otapala (Azmir i sur., 2013). Ipak, konvencionalne ekstrakcijske metode kao što je Soxhletova metoda i dalje se smatra referentnom metodom, sa kojom se uspoređuju rezultati dobiveni novim metodama. U tradicionalne metode ekstrakcije ubrajamo Soxhletovu ekstrakciju, maceraciju i hidrodestilaciju. Soxhletov ekstraktor je prvo napravljen za ekstrakciju lipida, no nije više ograničen na njih, već se uvelike koristi za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz prirodnih izvora. Soxhletova metoda neprestano dovodi svježe otapalo u kontakt sa biljnim materijalom, ne zahtijeva filtraciju i jednostavna je za provođenje. Međutim, ova metoda koristi mnoga otapala upitne sigurnosti, zahtijeva mnogo vremena, daje mali prinos i nije selektivna (Herrero i sur., 2006). Maceracija je nastala kao kućni proces dobivanja tonika. Popularna je i jeftina metoda za dobivanje esencijalnih ulja i bioaktivnih komponenata. Vodena destilacija je tradicionalna metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenata i esencijalnih ulja iz biljaka. Ne zahtijeva korištenje organskih otapala, te se može izvesti i prije sušenja biljnog materijala. Razlikujemo tri vrste vodene ekstrakcije; vodena destilacija, vodena i parna destilacija, i direktna destilacija parom (Vankar, 2004). Nedostatak ovih metoda je da prilikom ekstrakcije na visokoj temperaturi neki spojevi mogu promijeniti svoju strukturu i biti uništeni, stoga je vodena ekstrakcija ograničena na termostabilne komponente. Vodena ekstrakcija se ističe jer voda nije zapaljiva, nije toksična, lako je dostupna i prihvatljiva je za okoliš. S druge strane, voda je vrlo polarno otapalo, te ne može otopiti većinu organskih spojeva, kao što su polifenoli (Ong i sur., 2006). Karakteristike vode kao što su polarnost, površinska napetost, viskozitet i konstanta disocijacije podložne su manipulaciji promjenom temperature, što je korisno jer se na taj način može utjecati na prinos ekstrakcije (Srinivas i sur., 2010).

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom je metoda novog doba koja koristi to svojstvo, osiguravajući tako veću selektivnost i kraće vrijeme ekstrakcije, te izbjegava korištenje potencijalno opasnih otapala, stoga je to metoda koja je dobra alternativa uobičajenim metodama ekstrakcije fitokemikalija organskim otapalima (King, 2000).

Iskorištenje ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala, veličini čestica uzorka, udjelu čvrste i tekuće faze, kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama uzorka te uvjetima ekstrakcije kao što su vrijeme i temperatura. Kako bi se provela uspješna ekstrakcija, spojevi koje želimo ekstrahirati moraju biti otopljeni u otapalu dok se ne postigne ravnotežna koncentracija. Stoga povećanje omjera čvrste i tekuće faze može povećati prinos ekstrakcije. Tijekom ekstrakcije antioksidansi se prenose iz biljnog materijala u tekuću fazu zahvaljujući svom afinitetu prema odabranom otapalu. Antioksidansi su strukturno različiti spojevi, te se razlikuju i po svojoj polarnosti; većina je tek umjereno topljiva u vodi, pa su stoga potrebna organska otapala za njihovu ekstrakciju. Odabir otapala je ključni korak za ekstrakciju, s obzirom da različiti spojevi zahtijevaju otapala različite polarnosti. Obično se za polarnije antioksidanse koriste vodene otopine metanola, etanola i acetona, a za manje polarne se koristi etil acetat ili kloroform. Vodene otopine se češće upotrebljavaju od čistih otapala zbog sposobnosti vode da hidratizira uzorak hrane i da olakša ekstrakciju. Ne postoji univerzalno otapalo koje bi bilo pogodno za ekstrakciju svih antioksidativnih fitokemikalija iz hrane, stoga se za procjenu antioksidativnog kapaciteta preporuča napraviti bar dvije ekstrakcije koristeći otapala različite polarnosti. Za ekstrakciju biljnih materijala najčešće se koriste voda, vodene otopine etanola, metanola i acetona (Sun i Ho, 2005). Za ekstrakciju polifenola iz čajeva najčešće se koristi vrela voda (Filip i Feraro, 2003). Za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala često se koriste polarna otapala (Arabshahi-Delouee i Urooj, 2007). Metanol i etanol često se koriste za ekstrakciju antioksidansa iz raznih biljaka i hrane kao na primjer: šljive, jagode, brokule, ružmarina, kadulje, manga, riže, pšenice itd. Neka istraživanja pokazala su učinkovitost etil acetata na ekstrakciju spojeva iz luka i kore citrusa (Peschel i sur., 2006), (Rehman, 2006), (Li i sur., 2006). dok se za ekstrakciju fenolnih spojeva iz ječma najučinkovitije pokazala smjesa etanola i acetona, vodena otopina metanola za ekstrakcije iz riže i zobenog griza i ljuske, kave, lišća guave (Anwar i sur., 2006)

2.2.1. Faktori koji utječu na iskorištenje ekstrakcije

Faktori koji najčešće utječu na ekstrakciju su karakteristike biljnog materijala, otapalo, temperatura, tlak i vrijeme (Hernandez i sur., 2009).

Uloga otapala nije da samo poboljša fizičke karakteristike ekstrakcijskog sustava, već mora i ukloniti produkte koji bi mogli stupiti u interakciju s spojevima iz uzorka (Manzak i Sonmezoglu, 2010) Pri izboru otapala vrijedi pravilo „slično otapa slično“, što znači da se za polarne analite koriste polarna otapala, a za nepolarne nepolarna. Glavni faktori pri izboru otapala su sposobnost otapanja spojeva koje se žele ispitati, njihova difuzivnost u otapalu i karakteristike uzorka. Cilj je dobiti ekstrakt visoke čistoće i selektivnosti, što može biti postignuto ako je analit dobro topljiv u otapalu, a druge komponente uzorka nisu. Pri ekstrakciji analita male koncentracije, brzina ekstrakcije nije pod utjecajem koncentracije već brzinom prijenosa mase, stoga odabrano otapalo mora osigurati otapanje i otpuštanje analita. Prilikom izbora otapala treba uzeti u obzir i cijenu, sigurnost, i održivost, što znači da treba birati manje toksična, bezopasna otapala, koja se lako uklanjaju. Jednostavni alkoholi (etanol, metanol) ili alkani (heptan, heksan) su prihvatljiviji za okoliš od dioksana, acetonitrila, kiselina, formaldehida i tetrahidrofurana. Također, smjese vode i etanola ili vode i metanola su bolji izbor za očuvanje okoliša od čistih alkohola ili smjesa propanola i vode. Smjese otapala povećavaju prinos ekstrakcije tako da poboljšavaju topljivost i povećavaju interakcije ciljanih spojeva i otapala. Korištenje smjese otapala povećava učinkovitost ekstrakcije. Jedan od načina zbog čega se to događa je da jedno otapalo iz smjese poboljšava topljivost analita, a drugo poboljšava desorpciju analita.

Korištenje visokih temperatura povećava učinkovitost ekstrakcije tako što pomaže u uništavanju interakcija između analita i uzorka, uzrokovanih van der Waalsovima silama, vodikovim vezama i dipolnim vezama (Richter i sur., 1996). Upotreba toplinske energije pomaže prebroditi kohezivne interakcije između molekula i adhezivne interakcije između različitih molekula, tako da smanjuje aktivacijsku energiju potrebnu za proces desorpcije. Također, povišena temperatura smanjuje površinsku napetost otapala, otopine i uzorka i pospješuje upijanje otapala u uzorak. Smanjenje površinske napetosti omogućava analitu da se brže otopi u otapalu (Möckel i sur., 1987). Povišena temperatura smanjuje viskozitet otapala te stoga olakšava penetraciju u matricu čestica što rezultira učinkovitijom ekstrakcijom (Perry i sur., 1984). Temperatura povećava brzinu difuzije otapala i prienos mase molekula u otapalo što omogućava bržu ekstrakciju. Ipak, povišena temperatura može

imat i nepovoljan učinak, moguće je da se uz željene spojeve u otapalu ekstrahiraju i neki drugi spojevi, tj smanjuje se selektivnost otapala. Također, može utjecati na termolabilne komponente koje se mogu degradirati (Moreno i sur., 2007).

Manzak i Sonmezoglu (2010) su zapazili kako se količina octene kiseline u ekstraktu povećava povećanjem brzine miješanja s 250 na 400 rpm. Isto su potvrdili i Hirato i sur. (1991) koji navode kako brzina miješanja smanjuje veličinu kuglica emulzije dispergiranih u vanjskoj fazi, što povećava dodirnu površinu i prijenos mase, pa se povećava brzina ekstrakcije. Ipak, veća brzina miješanja utječe i na stabilnost emulzije što može dovesti do lomova, stoga prilikom duljeg miješanja treba prilagoditi brzinu.

Najveća prednost primjene povišenog tlaka tijekom ekstrakcije je što se ona može provoditi na temperaturama iznad temperature vrelišta, pri čemu otapalo ostaje u tekućem stanju. Primjena povišenog tlaka i temperatura te smanjena površinska napetost otapala pomaže ulazak otapala u pore uzorka i kontakt s analitom, te se tako pospješuje ekstrakcija. Također, potpomaže se prijenos mase analita iz uzorka u otapalo. Povišen tlak kontrolira problem s mjehurićima zraka u uzorku koji otežavaju kontakt otapala i analita (Mustafa i Turner, 2011).

2.2.2. Veličina čestica i njen utjecaj na ekstrakciju

Veličina čestica je jedan od ključnih faktora koji utječe na prinos ekstrakcije (Ab Rahman i sur., 2012). U istraživanju Al-Rawi i sur. (2013) pokazalo se da je veći prinos ekstrakcije donijela manja veličina čestica, što bi moglo biti uzrokovano povećanjem dodirne površine smanjenjem čestica, zbog povećanja postotka oštećenih stanica. Ulje iz stanice je lakše dostupno otapalu, pa je veći prinos ekstrakcije. S druge strane, veće čestice imaju manju dodirnu površinu i otapalo koje difundira kroz uzorak nailazi na veći otpor pri ekstrakciji ulja iz unutarnjih dijelova neoštećenih stanica, što rezultira manjim prinosom ekstrakcije (del Valle i Uquiche, 2002). Veći prinos ekstrakcije pri manjim veličinama čestica zabilježili su i Machmudah i sur. (2007) pri istraživanju ružmarinovog ulja. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata događa se i u ljudskom organizmu tijekom konzumiranja hrane. Veličina čestica hrane bitna je s obzirom na to da manje čestice omogućavaju veću dodirnu površinu, te tako lakšu ekstrakciju i apsorpciju bioaktivnih komponenata hrane u ljudskom organizmu. To su potvrdili i Snow i O'Dea (1981) u istraživanju u kojem navode da smanjenje veličine čestica mljevenjem povećava dodirnu površinu što rezultira bržom probavom i apsorpcijom riže.

Žvakanje smanjuje čestice hrane što omogućava bržu probavu i olakšava crijevima apsorpciju nutrijenata i energije zbog njihove lakše dostupnosti. Cassady i sur. (2009) su u istraživanju biodostupnosti masti iz badema došli do zaključka da usitnjavanje hrane žvakanjem značajno utječe na apsorpciju energije i na apetit.

2.2.3. Sastav biljnih ekstrakata

Prema literaturnim podacima, biljne ekstrakte karakterizira visok sadržaj bioaktivnih spojeva, od kojih su najzastupljenije skupine antioksidansa (polifenoli i fenolne kiseline) i polifenolnih spojeva (fenoli i flavonoidi). Pored bioaktivnih komponenata, biljni ekstrakti mogu sadržavati i određenu količinu proteina (oko 1,9 g/100 g), ugljikohidrata (12,3 g/100 g) i masti (0,1 g/100 g) (Eltayeib i Hamade, 2014; Da-Costa-Rocha i sur., 2014), koja se mijenja ovisno o vrsti biljke koja se koristi za ekstrakciju. Oko 10 % sadržaja biljnih ekstrakata čine ugljikohidrati, a neki od pronađenih u istraživanjima su arabinoza, galaktoza, glukoza, ramnoza, i u manjim količinama galakturonska kiselina, glukuronska kiselina, manoza i ksiloza (Eltayeib i Hamade, 2014).

Neki od flavonoida pronađenih u biljnim ekstraktima: apigenin, luteolin, apigenin-7-O-glikozid, luteolin-7-O-glikozid, galokatehin, floridzin, kvercetin, rutin, kirsimaritin, metil apigenin, izorhamnetin itd.

Biljni ekstrakti mente sadrže: eriocitrin, ružmarinsku kiselinu, luteolin, rutinozid, hesperidin, apigenin (Zheng i Wang, 2001). Esencijalno ulje mente sadrži slijedeće spojeve: mentol (33-60 %), menton (15-32 %), izomenton (2-8 %), limonen (1-7 %), 1,8-cineol (eukaliptol) (5-13 %), , mentofuran (1-10 %), mentil acetat (2-11 %), pulegon i karvon (Gherman i sur., 2000).

Ekstrakti kadulje sadrže flavonoide, antioksidanse, fenole, salviol, salven, tanin, gorke tvari, bjelančevinu, škrob, kalcijev oksalat, soli fosforne kiseline, kalijeve i kalcijeve soli. Glavno antioksidativno djelovanje imaju karnozična kiselina, karnozol i metil karnozat (Pizzale i sur., 2002).

Antioksidansi su kemijski spojevi koji predstavljaju jedan oblik obrambenog mehanizma sa svrhom održavanja ravnoteže između oksidativnih i redukcijskih procesa u živom organizmu. Prekomjerna prisutnost kisika u stanici može izazvati različite oblike oštećenja, pa i uništenje cjelokupne stanice, a antioksidansi služe kako bi smanjili ili onemogućili takvu štetu. Oni

procesom davanja elektrona neutraliziraju slobodne radikale. Antioksidansi djeluju pozitivno smanjenjem energije slobodnih radikala, sprječavanjem nastanka slobodnih radikala i prekidanjem lančane reakcije oksidacije. U ljudskom organizmu antioksidansi djeluju na tri načina (Noorhajati i sur., 2012): sprečavaju ili inhibiraju nastanak lipidnih peroksida, neutraliziraju slobodne radikale i popravljaju štetu izazvanu djelovanjem slobodnih radikala. Razlikuju se endogeni i egzogeni antioksidansi. Endogeni antioksidansi su oni koji nastaju u ljudskom organizmu, a egzogeni su oni koji se nalaze u hrani, biljkama i lijekovima. Antioksidansi se također mogu podijeliti i na: endogene enzimske antioksidanse, neenzimske, metaboličke i hranljive materije antioksidanasa, metal vezujuće proteine (ferritin, lakoferin, albumin i ceruloplazmin), fitosupstance i fitonutritijente (Rogić, 2014). Tirzitis i Bartosz (2010) naglašavaju razliku između antiradikalne i antioksidativne aktivnosti. Antiradikalna aktivnost je sposobnost molekule da reagira sa slobodnim radikalima, dok antioksidativna predstavlja sposobnost inhibiranja procesa oksidacije te često jedna aktivnost ne podrazumijeva drugu. Dakle, antiradikalno svojstvo nije nužno uvijek i antioksidativno. (Re i sur., 1999).

2.3. METODE ANALIZE FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA EKSTRAKATA

2.3.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

2.3.1.1. ABTS metoda

Kako bi se što preciznije mogao prikupiti podatak o antioksidativnoj aktivnosti provode se određene metode, a jedna od njih je ABTS metoda. U ovoj metodi se koriste dva slobodna radikala: 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline). Taj radikal je plavo-zelene boje, a dodavanjem antioksidansa dolazi do gubitka boje, a to se utvrđuje spektrofotometrijski na valnoj duljini 734 nm. Ono što ABTS metodu čini pogodnijom od drugih metoda je njeno svojstvo prilagodljivosti jer nije toliko osjetljiva na promjenu pH, pa se može koristiti pri različitim razinama pH, za razliku od DPPH metode koja je izrazito osjetljiva na pH kiselost. Ovo svojstvo je korisno ako se želi ispitati utjecaj promjene pH na antioksidativnu aktivnost određenih spojeva kao i prilikom mjerenja iste te aktivnosti ako su uzorci uronjeni u kisela otapala. ABTS metoda se može koristiti jednako i u organskim i

vodenim otapalima pa je njena prednost što se može koristiti u različitim medijima. U vodenim otapalima dolazi do jako brze reakcije, dok je u alkoholnim nešto sporija (Shalaby i Shanab, 2013).

2.3.1.2. *DPPH metoda*

DPPH je metoda koja se često koristi pri istraživanju antioksidativnog kapaciteta biljnih ekstrakata (Pinelo i sur., 2004). Temelji se na redukciji alkoholne DPPH otopine pri 517 nm u prisutnosti antioksidansa koji je donor vodikovog iona, a kod biljnih materijala ti antioksidansi su polifenoli (Turkmen i sur., 2006). Nespareni elektron iz dušikovog atoma u stabilnom slobodnom radikalu DPPH (α -difenil- β -pikrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) se reducira primanjem vodikovog atoma iz antioksidansa. Miješanjem DPPH otopine s uzorkom koji može donirati vodikov atom, dolazi do gubitka ljubičaste boje. Metoda provodi reakciju uzorka s DPPH u metanolu ili vodi, što olakšava ekstrakciju antioksidansa iz uzorka. Prednost DPPH metode pri određivanju antioksidansa je što dopušta reakciju DPPH s cijelim uzorkom, te metoda dozvoljava dovoljno vremena da DPPH reagira i sa slabim antioksidansima (Prakash, 2001). Može se koristiti u vodenim i nepolarnim organskim otapalima, te za ispitivanje hidrofилnih i lipofilnih antioksidansa (Prior i sur., 2005). Smatra se točnom, jednostavnom i ekonomičnom metodom za procjenu antioksidativnog kapaciteta (Kedare i Singh, 2011). Rezultati su visoko reproducibilni i mogu se uspoređivati s drugim metodama. Ipak, DPPH metoda ima i neka ograničenja, pa je tako DPPH osjetljiv na neke Lewisove baze i otapala te na kisik, ne može mjeriti antioksidativnu aktivnost plazme i emulzija. DPPH može biti otopljen jedino u organskom otapalu, te interferencija apsorbancije iz spojeva iz uzorka može smetati pri kvantitativnoj analizi (Arnao, 2000). Može se koristiti za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta iz hrane npr. pšenice, povrća, konjugirane linoleične kiseline, biljaka, ulja iz jestivih sjemenki, brašna, i to otopljenih u raznim otapalima kao što su etanol, smjesa acetona i vode, metanol, smjesa alkohola i voda, benzen i slično. (Yu, 2001).

2.3.1.3. *FRAP metoda*

Reduktanti tj. antioksidansi iz uzorka reduciraju žuto obojen željezo-2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (TPTZ) kompleks u njegov reducirani Fe(II)-oblik (plave boje). Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima

smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta, a redukcija se prati porastom apsorbancije pri valnoj duljini 593 nm (Živko, 2012).

2.3.1.4. *Briggs-Rauscher metoda*

Briggs-Rauscher reakcija jedna je od najčešće proučavanih oscilirajućih reakcija koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih otopina. Tijekom reakcije komponente prolaze kroz periodične oscilacije popraćene promjenom boje reakcijske smjese. Dodatkom antioksidansa iz biljaka dolazi do naglog prigušenja (inhibicije) osciliranja. Reakcija se prati potenciometrijski kako bi se precizno izmjerilo vrijeme inhibicije oscilacije reakcije koje je proporcionalno koncentraciji antioksidansa u uzorku.

Specifičnost metode je u tome što se reakcija odvija pri pH vrijednosti oko 2, što odgovara fiziološkoj pH vrijednosti želuca gdje se odvija glavina procesa probave, pa se smatra kako ova metoda može dati informacije o tome što se zapravo događa sa antioksidansima nakon ingestije i time pomoći u boljem razumijevanju uloge bioaktivnih komponenata u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti (Gajdoš Kljusurić i sur., 2005).

2.3.2. Metode određivanja fizikalnih svojstava

2.3.2.1. *Ukupne otopljene tvari (TDS) i električna vodljivost*

Električna vodljivost je sposobnost otopine da provodi električnu struju. Ta sposobnost ovisi o određenim čimbenicima: prisutnosti iona, ukupnoj koncentraciji iona, pokretljivosti i valenciji iona i o temperaturi mjerenja. Većina anorganskih spojeva u obliku otopina su dobri vodiči, dok organski spojevi ili imaju slabu električnu vodljivost ili je ni nemaju. Mjerna jedinica električne vodljivosti je mikrosimens po centimetru ($\mu\text{S cm}^{-1}$), a to je recipročna vrijednost jedinici otpora, mikroohmu po centimetru tj.: $1 \mu\text{S cm}^{-1} = 1/1 \mu\text{mho cm}^{-1}$ (Dadić, 2001). Ako je koncentracija iona niska mjerenje vodljivosti je kompliciranije i manje točno, pouzdano te se tada koristi skala otpora. Rezultati su suprotni. Recipročna vrijednost od 0.10

$\mu\text{S cm}^{-1}$ ili $1/(0.10 \cdot 10^{-6} \text{ S cm}^{-1})$ je tada $10 \cdot 10^6 \text{ ohms} \cdot \text{cm}$ ($10 \text{ MO} \cdot \text{cm}$). Tok struje iona u tekućini različit je od toka struje ionskih metala, gdje se struja prenosi slobodnim ionima. Ioni u otopinama pridonose toku struje i tako pridonose mjerenju konduktivnosti. Konduktivnost je mjera koncentracije iona prisutnih u uzorku. Ukupne otopljene tvari (TDS) su gravimetrijska mjera, ali s obzirom da su krute tvari u otopini uglavnom u formi iona, oni se mogu izmjeriti preko električne vodljivosti. TDS skala koristi $2 \mu\text{S cm}^{-1} = 1 \text{ ppm}$ (part per million), prikazan kao 1 mg L^{-1} TDS. Metoda mjerenja je ista, mjerači konduktivnosti rade konverziju i izražavaju rezultate mjerenja u jedinicama TDS-a.

2.3.2.2. *Suha tvar*

Ukupnu suhu tvar definiramo kao cjelokupnu količinu tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod određenim uvjetima. Standardna metoda sušenja podrazumijeva određivanje mase uzorka nakon sušenja na temperaturi od $105 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Suha tvar često predstavlja mjeru iskorištenja ekstrakcije koje ovisi o brojnim faktorima: temperaturi, vremenu trajanja ekstrakcije, metodi, otapalu i sl. (Hernandez i sur., 2009).

2.3.2.3. *pH*

pH je mjera kiselosti ili lužnatosti nekog medija. Vodeni mediji kojima se izmjeri pH manji od 7 na sobnoj temperaturi su kiseli, a oni sa pH većim od 7 su lužnati. Neutralna točka pH na sobnoj temperaturi je 7 jer je tada koncentracija OH^- iona jednaka koncentraciji H_3O^+ iona u vodi. pH vrijednost biljnih ekstrakata kreće se uglavnom u rasponu od 4 do 6,5, te uglavnom ovisi o spojevima koji su ekstrahirani u određenim fazama ekstrakcije te o primijenjenom otapalu i procesu ekstrakcije. Antioksidativni kapacitet biljnih ekstrakata se smanjuje u lužnatom mediju (Bayliak i sur., 2016).

2.3.3. Spektrofotometrijske metode

2.3.3.1. *UV–VIS spektroskopija*

Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (VIS) apsorpcijska spektroskopija metoda je koja se najčešće koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih svojstava nekog materijala s obzirom na valne duljine. Spektrofotometrija može mjeriti u vidljivoj svjetlosti, ultraljubičastom području ili infracrvenom području elektromagnetskog spektra (Cvetković, 2017).

Spektroskopske instrumentalne metode služe za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva. Temelje se na interakciji elektromagnetskog zračenja s uzorkom, pri čemu promatrana tvar emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se mjeri i interpretira. Molekule uzorka apsorbiraju elektromagnetsko ultraljubičasto (100-380 nm) i/ili vidljivo (380-800 nm) zračenje, te ono pobuđuje elektrone i dolazi do promjene elektronske gustoće unutar ispitivanog uzorka, tj. to zračenje u molekuli uzrokuje prijelaz valentnih elektrona u više nepopunjene energetske orbitale. Dio molekule koji apsorbira zračenje naziva se kromofor. Apsorbicija zračenja dana je Lambert Beerovim zakonom, a uzorak je apsorbirao zračenje kad je intenzitet zrake prošle kroz uzorak manji od intenziteta ulazne zrake.

Spektrofotometar je uređaj kojim mjerimo intenzitet svjetlosnih zraka koje prolaze kroz uzorak pri različitim valnim duljinama, a mora sadržavati izvor zračenja (volframova ili deuterijeva lampa), monokromator koji omogućuje izbor valnih duljina i detektor koji mjeri intenzitet zraka.

Prolaskom zračenja kroz otopinu uzorka dio se apsorbira a dio prolazi kroz uzorak. Spektrofotometar skenira Uv/Vis spektar i na detektoru registrira valne duljine (nm) pri kojoj nastupa apsorpcija zračenja. Ti se podaci uspoređuju s referencama kako bi se saznalo koji spojevi su prisutni u uzorku.

2.3.3.2. *NIR spektroskopija i kemometrija*

Blisko infracrvena spektroskopija (engl. Near Infrared spectroscopy, in-line NIR) se koristi za praćenje te kontrolu fizičkih, ali i kemijskih procesa kao i brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva u procesu. Odnosi se na $12\,500\text{ cm}^{-1}$ do 4000 cm^{-1} , gdje se „pojavljuju vrpce

viših tonova i kombinacijske vrpce“ (Jednačak i Novak, 2013). Ova metoda se može izvesti na više različitih načina od čega je najčešća transmisivna in-line-NIR. Transmisivna in line spektroskopija prati proces in situ NIR-sondom koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom. Zračenje koje upada se prenosi preko optičkog vlakna do leća koje ga onda usmjeravaju prema uzorku, te tamo dolazi do djelomične apsorpcije. Zračenje koje se propustilo preko optičkih vlakana prenosi se do detektora. Sonda je zaštićena od vanjskih utjecaja jer ima „obloge od inertnog metala“ (Jednačak i Novak, 2013) i safirne prozore. Nedostatak je što su vrpce u NIR-spektrima manje informativne te može doći do njihovog preklapanja pa je preporuka napraviti više oblika analize. NIR-spektroskopija in-line se koristi u: polimernom inženjerstvu kako bi se uspješno pratile ekstruzije polimera i kako bi se dobile informacije o sastavu polimera, udjelu vlage i viskoznosti smjese; praćenje biokemijskih procesa kao što je kultivacija monoklonih antitijela; u mesnoj industriji za kontrolu kvalitete mesnih prerađevina tokom njihove obrade te u farmaceutskoj industriji za praćenje procesa razvoja lijeka kao i u određivanju sastava farmaceutskih pastila tijekom procesa proizvodnje te klasifikaciji uzoraka prema količini djelatne tvari (Jednačak i Novak, 2013). Blisko infracrvena spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valne duljine u rasponu od 780 do 2500 nm (Huang i sur., 2008; Jakelić M., 2016.). Glavna prednost NIR-a je u tome što nije potrebna (pred)priprema uzorka, a analiza je jednostavna i brza te traje između 15 i 90 sekundi, te ne uništava uzorak. Omogućava istovremeno mjerenje nekoliko sastojaka tvari (Nicolai i sur., 2007; Jakelić, M., 2016). U prehrambenoj industriji je korisna kod funkcionalne i senzorske analize sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i gotovih proizvoda (Hernández Gómez i sur., 2006). Poljoprivredne kulture kao npr. žitarice, prate se NIR metodom, ali je pogodna i za praćenje emulzija (Gajdoš i sur., 2015; Jakelić, M., 2016), vina (Budić Leto i sur., 2011; Jakelić, M., 2016), i voća (Hernández Gómez i sur., 2006; Jakelić, M., 2016). NIR spektar obuhvaća veliku količinu podataka, a kako bi se utvrdilo između kojih uzoraka postoje razlike, potrebno je kombinirati podatke NIR spektra s drugim kemometrijskim metodama. Jedna od kemometrijskih metoda je analiza glavnih komponenata - PCA (principal component analysis), koja se koristi za obradu velikog broja podataka dobivenih NIR metodom. PCA uočava razlike u snimljenim spektrima uzoraka, te ih obrađuje tako da se dobiju najvažnije karakteristike iz kojih se dobivaju nove ortogonalne varijable koje zovemo „principal components“. Iz njih se računaju „faktori“ za svaki uzorak, koji je linearna kombinacija intenziteta određene karakteristike uzorka koji je od relativne važnosti za model (Valinger i sur., 2017). Faktori se pozicioniraju u kvadrante na grafu. Zbog toga što je faktor ovisan i izračunat na temelju spektralnih karakteristika, uzorci koji su prema

određenim komponentama slični, biti će prikazani blizu jedan drugoga na grafu, a što se više razlikuju, bit će udaljeniji (Valinger i sur., 2017). Abdi i Williams (2010) navode kako PCA daje uvid u sličnostima i različitostima između podataka, tako da ih smješta na određenu poziciju na grafu. Faktori predstavljaju razlike u karakteristikama uzorka, tj. u njihovom kemijskom sastavu, no ne može se točno znati o kojim spojevima se radi.

Kako bi se bolje utvrdile razlike između uzoraka, koriste se i PLS modeli. PLS metoda (partial least squares) je tehnika koja kombinira karakteristike iz PCA analize i višestruke linearne regresije (Abdi, 2010). PLS analiza temelji se na povezanosti intenziteta signala i svojstava uzorka. Ova analiza omogućuje bolje razumijevanje povezanosti podataka, jer uspijeva prevladati smetnje i preklapanje spektralnih informacija analizom više komponenata. Ona omogućava sofisticiran statistički pristup koristeći cijelu regiju spektra umjesto izoliranih analitičkih vrpca. Koristi se za predviđanje skupa zavisnih varijabli iz skupa nezavisnih varijabli ili prediktora (Abdi, 2010). Prvo se radi kalibracijski model, što uključuje sakupljanje određenog broja podataka iz snimljenog spektra, koji bi trebali sadržavati sve kemijske i fizičke varijacije koje se kasnije mogu očekivati u nepoznatim uzorcima. Ostali podaci koriste se za validaciju. Metoda se temelji na principu računanja „faktori“ X i „faktori„ Y iz matrica nezavisnih varijabli X i zavisnih varijabli Y. Nove varijable, faktori X su prediktori Y-a, i istovremeno modeliraju X. X faktori su linearne kombinacije originalnih X varijabli, modelirane za određene koeficijente (Wold i sur., 2001).

PLS je vrlo korisna tehnika ukoliko je potrebno predvidjeti skup zavisnih varijabli iz jako velikog skupa nezavisnih varijabli (prediktora) (Abdi, 2010). Prednost PLS-a pred drugim regresijskim metodama je što se može koristiti na multikolinearnim podacima, može se uključiti velik broj predvidljivih varijabli te se istovremeno može modelirati više izlaznih varijabli (Wold i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao materijal u ovom radu korištene su osušene biljke:

- Kadulja (*Salvia officinalis*) iz Šibensko-Kninske županije; berba 2014.
- Lavanda (*Lavandula x hybrida* L.) iz Međimurske županije; berba 2015.
- Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) iz Koprivničko-Križevačke županije; berba 2015.
- Melisa (*Melissa officinalis*) iz Virovitičko-Podravske županije; berba 2014.
- Menta (*Mentha piperita* L.) iz Osječko- Baranjske županije ; berba 2015

Biljke su nabavljene od proizvođača Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska).

3.1.1. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), pa. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Njemačka)
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Etanol (Kefo d.o.o., Slovenija)
- Galna kiselina, 98 % (AcrosOrganics, SAD)
- Trolox (Fluka, Švicarska)

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Vodena kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimeter, Poljska)
- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Latvija)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- Potencijometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- Konduktometar (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska)
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m,

Pribor:

- Filter papir od celuloze (veličina pora 20 μ m)
- Stakleni ljevak
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Menzura volumena 100 mL
- Metalna špatulica
- Aluminijske posudice s poklopcem
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Mikropipete volumena 100 μ L i 500 μ L
- Kiveta od kvarcnog stakla

3.2. METODE

3.2.1. Usitnjavanje

Usitnjavanje se provodi mljevenjem na mlinovima IKA Tube Mill (IKA, Njemačka) i Gorenje TGO (Gorenje, Slovenija) mlin pri brzini okretaja oštrice od 15000 rpm, sa prilagođenim vremenom mljevenja ($t = 10-40$ s) kako bi se dobile različite veličine čestica biljaka.

3.2.2. Prosijavanje

Nakon mljevenja, frakcije se odvajaju prosijavanjem na standardiziranim DIN sitima (Fritsch, Njemačka) koja se slažu na laboratorijsku tresilicu Analysette 3 Pro (Fritsch, Njemačka). Sita imaju promjere pora 1000, 800, 500, 355, 250 i 100 μm . Tresilica trese sita 10 minuta u intervalima od 3 sekunde i amplitudom od 3 mm, a nakon toga svaka se frakcija pakira u posebnu ambalažu i skladišti pri sobnim uvjetima ($T=20$ °C i $RH=40$ %) do provedbe ekstrakcija.

3.2.3. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata

Ekstrakcijom dolazi do denaturacije stanične membrane biljaka, s posljedicom otpuštanja molekula s biološkom aktivnošću. Ona se provodi tako da se odvaži 2 g usitnjenog sušenog samoniklog bilja u staklenu laboratorijsku čašu volumena 200 mL, što se zatim prelije s 100 mL destilirane vode koja se prethodno zagrije na temperaturu od 80 °C. Tako pripremljena smjesa stavi se u uljnu kupelj s integriranom miješalicom u kojoj se termostatira na 80 °C, 90 minuta pri brzini miješanja od 500 rpm. Nakon 90 minuta, vruća smjesa se profiltrira pomoću staklenog lijevka i filter papira, kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Zatim se u vodenim ekstraktima mjere određena fizikalna i kemijska svojstva (pH, vodljivost, ukupna otopljena suha tvar, koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijski kapacitet) kako bi se saznalo više o svojstvima samoniklog bilja.

3.2.4. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Standardna metoda sušenja podrazumijeva određivanje mase uzorka nakon sušenja na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Ukupnu suhu tvar definiramo kao cjelokupnu količinu tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod određenim uvjetima. Postupak se provodi tako da se u suhu označenu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi kvarcni pijesak tako da se pokrije cijelo dno posudice te se ona suši u sušioniku (InkoLab ST60T, Hrvatska) (sa skinutim poklopcem) sat vremena nakon što se postigne temperatura 105 °C. Nakon sat vremena, posudice se s poklopcima izvade iz sušionika te se ostave hladiti oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu na analitičkoj vagi s točnošću $\pm 0,0002$ g, te se zabilježi masa svake posudice. U ohlađene i izvagane posudice s kvarcnim pijeskom otpipetira se volumen od 3 mL ekstrakta (dvije paralele za svaki uzorak), te se zabilježi masa posudice sa uzorkom prije sušenja. Zatim se uzorci suše 4 sata na 105 °C u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Nakon sušenja, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi. Na kraju se posudice s uzorkom ponovno važu te se bilježi masa nakon sušenja kako bi se mogao izračunati udio suhe tvari i vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi:

$$\% \text{ vode} = (a - b) * 100 / m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

3.2.5. pH vrijednost ekstrakata

Nakon provedene ekstrakcije, i nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, svakom je uzorku izmjeren pH pomoću pH-metra (Jenco 601A, SAD) u dvije paralele, tako što je sonda uređaja uronjena u ekstrakt, te je izmjereni pH očitani sa zaslona uređaja kada se ustalio.

3.2.6. Ukupne otopljene tvari (TDS)

Nakon hlađenja uzoraka na sobnu temperaturu, uranjanjem elektrode konduktometra (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska) u ekstrakte, svakom je dva puta izmjerena i očitana vrijednost ukupnih otopljenih tvari prikazana na zaslonu uređaja.

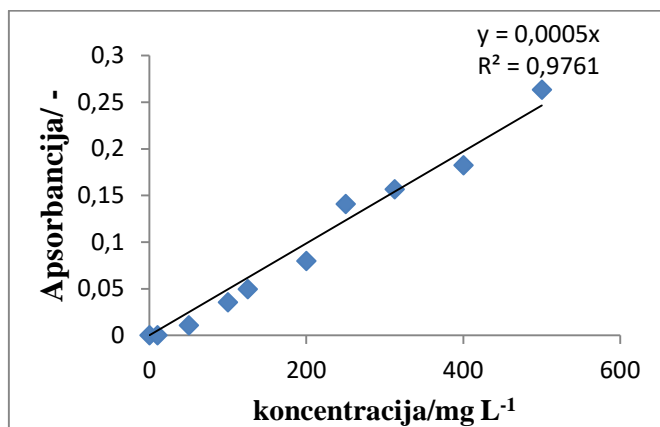
3.2.7. Vodljivost

Nakon hlađenja ekstrakata na sobnu temperaturu, uranjanjem elektrode konduktometra (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska) u ekstrakte, svakom je dva puta izmjerena i očitana vrijednost ukupnih otopljenih tvari prikazana na zaslonu uređaja.

3.2.8. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Količina ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijski korištenjem Folin- Ciocalteu reagensa koji reagira s fenolima u kolorimetrijskoj reakciji. Folin-Ciocalteu reagens (koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibden kiseline) reagira s fenoksid ionom iz uzorka koji se oksidira, pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira do pojave plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Smjesa se priprema tako da se u epruvetu otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 mL uzorka i 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa te se dodatkom 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata pokreće reakcija nakon čega uzorci stoje dva sata na sobnoj temperaturi. Za svaki uzorak rade se dvije paralelne probe, a za rezultat uzima se srednja vrijednost. Osim smjese sa uzorcima, priprema se i slijepa proba tako da se umjesto 100 mL uzorka stavlja 100 mL destilirane vode. Zatim se spektrofotometrijski mjeri apsorbanacija, tj. intenzitet plavog obojenja pri 765 nm koji je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku. Udio polifenolnih spojeva računa se na osnovi baždarnog

pravca galne kiseline (0 – 100 mg L⁻¹), te se rezultati izraze kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri, ili gramu uzorka.



Slika 6. Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0005x \quad [3]$$

gdje je:

x = koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

y= apsorbancija pri 765 nm

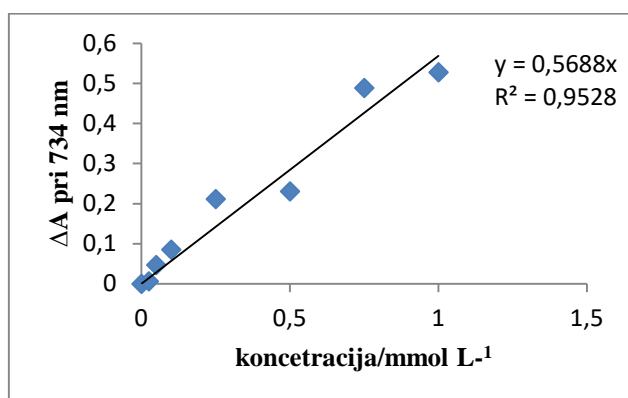
R²- koeficijent determinacije

3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju plavo zelenog ABTS radikal kationa antioksidansima iz uzorka, a udio „ugašenog“ radikala mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje s smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilen kiseline (Troloxa, analoga vitamina E topljivog u vodi) pri istim uvjetima.

Kako bi se odredio antioksidacijski kapacitet ovom metodom, potrebno je pripremiti otopinu ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS. Otopina radikala pripremi se tako da se preko noći ostavi stajati 7 mM vodene otopine ABTS u koju se doda 140 mM amonijevog peroksodisulfata, nakon čega se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS

kation radikala od 1%, pri čemu apsorbanacija otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$. Zatim se alikvot od 40 μL razrijeđenih biljnih uzoraka pomiješa s 4 mL otopine ABTS kation radikala u kiveti te se nakon 6 minuta mjeri apsorbanacija na 734 nm. Kao slijepa proba dodaje se etanol umjesto uzorka. Oduzimanjem apsorbanacije uzorka od apsorbanacije slijepa probe dobiva se vrijednost ΔA koja se prema baždarnom pravcu za Trolox preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa), a rezultati se izražavaju kao molarni (mmol/g) ili maseni udjel ($\mu\text{g/g}$ uzorka) ekvivalenta Trolox-a.



Slika 7. Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,5688x \quad [4]$$

gdje je:

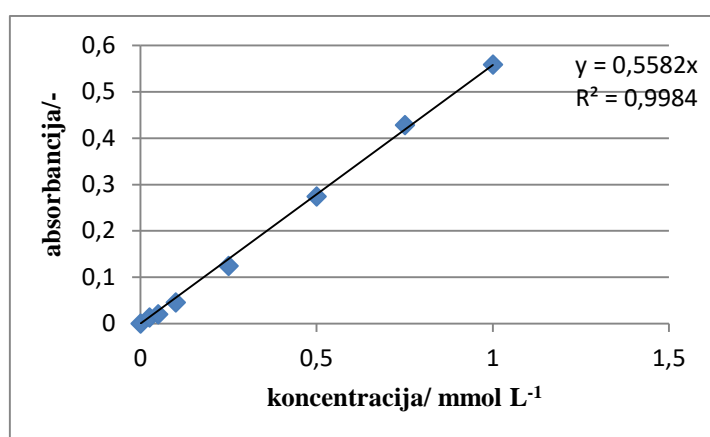
y = razlika kontrole i apsorbanacije uzorka pri 734 nm

x = ekvivalent troloxa (TAE) (mM L^{-1})

R^2 - koeficijent determinacije

3.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidativni kapacitet može se odrediti redukcijom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) koji u metanolnoj otopini zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora, antioksidansa, dolazi do sparivanja elektrona, stabilizacije DPPH radikala, te do promjene iz ljubičaste boje otopine u žutu. Ta promjena boje koja je uzrokovana prelaskom radikala iz oksidiranog u reducirani oblik mjeri se promjenom apsorbanције reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilen kiseline (Troloxa, analoga vitamina E topljivog u vodi)). Eksperiment se provodi tako da se pripremi 0,094 mM otopina 1,1,-difenil-2-pikrilhidrazil radikala u metanolu. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 3,9 mL pripremljene otopine i 100 μ L biljnog uzorka kojeg se želi ispitati te se smjesa homogenizira i ostavi 30 minuta u mraku kako bi se odvila reakcija. Kao slijepa proba uzima se otopina DPPH kojem se dodaje metanol umjesto uzorka. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 515 nm spektrofotometrom (Biochrom Libra S11, Engleska) te se iz dobivenih vrijednosti i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a (koji se uzima kao standard) konstruira baždarni pravac. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se promjena apsorbancije DPPH radikala (ΔA) nakon reakcije. Rezultati ΔA preračunavaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mmol/g) ili maseni udjel (μ g/g uzorka) ekvivalenta Troloxa.



Slika 8. Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,5582x \quad [5]$$

gdje je:

y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 515 nm

x = ekvivalent troloxa (TAE) (mM L^{-1})

R²- koeficijent determinacije

3.2.11. UV- VIS spektroskopija

Za snimanje UV-VIS spektra korišten je UV-spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska) sa instaliranim programom Acquire LITE. Prije samog početka snimanja spektra vodenih ekstrakata samoniklog bilja potrebno je izvršiti kalibraciju uređaja. Prilikom snimanja spektra vodenih ekstrakata potrebno je uzorak uliti u kvarcnu kivetu koja se stavlja u spektrofotometar te se klikom na Wavescan pokreće snimanje spektra. UV-VIS spektar svakog uzorka snima se dva puta, a kao rezultat se uzima jedan spektar koji predstavlja srednju vrijednost.

3.2.12. Blisko infracrvena spektroskopija (NIR)

Metoda se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u bliskom infracrvenom području spektra (valne duljine u rasponu od 780 do 2500 nm), a analiza snimljenih uzoraka može se provoditi pomoću kombinacije raznih kemometrijskih metoda, dok je u ovom slučaju korištena PCA analiza podataka (principle component analysis). Pomoću NIR spektrometra Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , snimi se NIR spektar uzoraka vodenih ekstrakata samoniklog bilja. Sustav za snimanje NIR spektra sastoji se od računala sa instaliranim Control Development softverom Spec32, NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm spektrometra, polikromatskog izvora svjetlosti, optičkih kablova i postolja s poklopcem u koji se stavlja kiveta s uzorkom.

Postupak snimanja provodi se tako da se određena količina uzorka ulije u kivetu te se stavi u postolje sa poklopcem koje omogućuje snimanje spektra bez prisutstva okolne svjetlosti iz prostorije. Svaki se uzorak vodenog ekstrakta snima se tri puta.

3.2.13. Obrada podataka i modeliranje

Eksperimentalno dobiveni podaci korišteni su za provedbu PCA analize upotrebom softverskih paketa CAMO Unscrambler X, probna verzija (Camo software, Oslo, Norveška) i StatSoft Statistica (StatSoft, Tulsa, SAD). Također je provedena i regresijska analiza u vidu PLS (Partial Least Squares) modela upotrebom programa CAMO Unscrambler. Prikladnost modela procijenjena je temeljem vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 1).

Tablica 1. Chadockova ljestvica

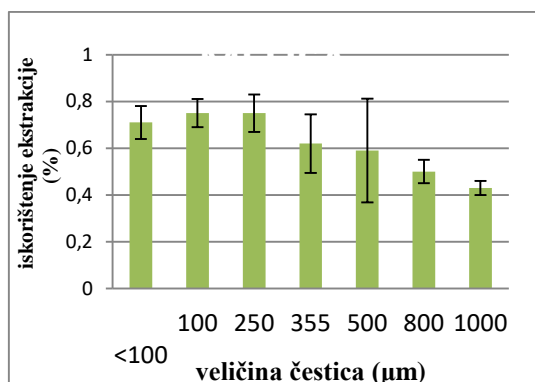
R^2	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

4. REZULTATI

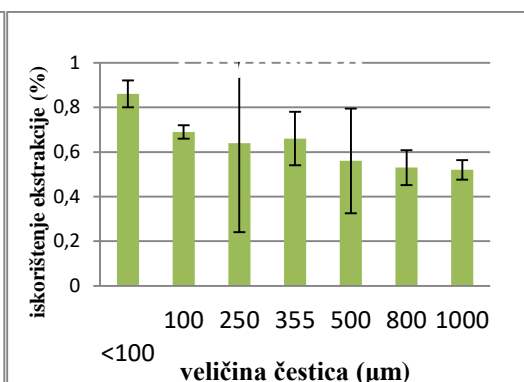
4.1. FIZIKALNA SVOJSTAVA EKSTRAKTA

Na slikama 9-29 prikazana su izmjerena fizikalna svojstva biljnih ekstrakata (pH, TDS, vodljivost i postotak suhe tvari), nakon provedene vodene ekstrakcije na temperaturi od 80 °C pri 500 rpm u trajanju od 90 minuta.

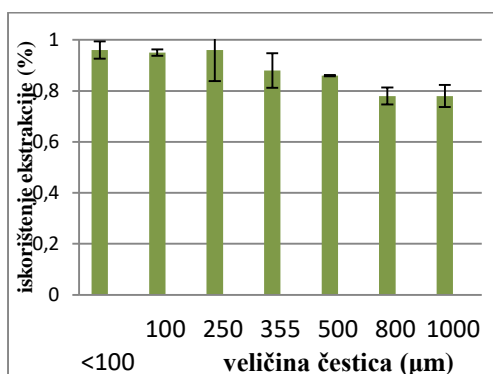
4.1.1. Suha tvar



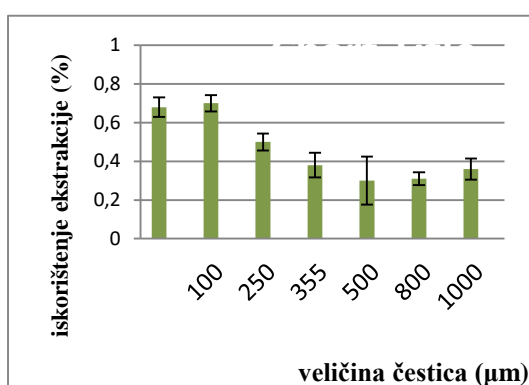
Slika 9. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za suhu tvar pri različitim veličinama čestica za melisu



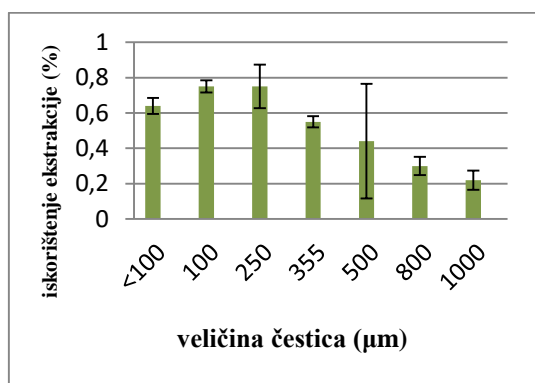
Slika 10. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za suhu tvar pri različitim veličinama čestica za lavandu



Slika 11. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za suhu tvar pri različitim veličinama čestica za mentu



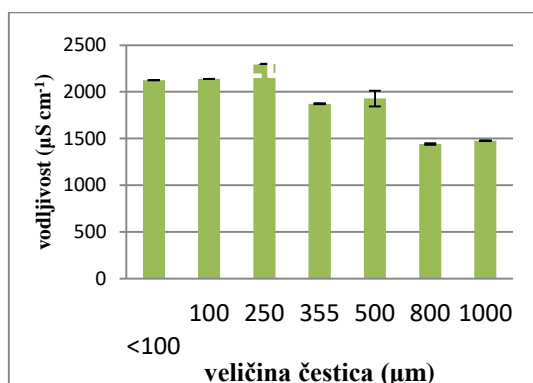
Slika 12. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za suhu tvar pri različitim veličinama čestica za majčinu dušicu.



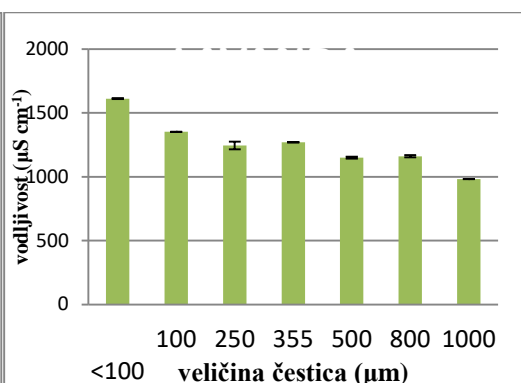
Slika 13. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za suhu tvar pri različitim veličinama čestica za kadulju

Prema rezultatima prikazanim na slikama 9-13, postotak suhe tvari obrnuto je proporcionalan veličini čestica: povećanjem veličine čestica dolazi do smanjenja postotka suhe tvari u ekstraktima, tj. manje je iskorištenje ekstrakcije. Naime, prema literaturnim podacima, praškasti materijali koji su sastavljeni od čestica manjih promjera imaju veću specifičnu dodirnu površinu (Barbosa-Canovas i sur., 2005). S obzirom da veća specifična dodirna površina pogoduje procesima prijenosa mase, u ovom je slučaju također utvrđeno da su ekstrakti proizvedeni od čestica biljnog materijala manjih veličina čestica sadržavali viši postotak suhe tvari.

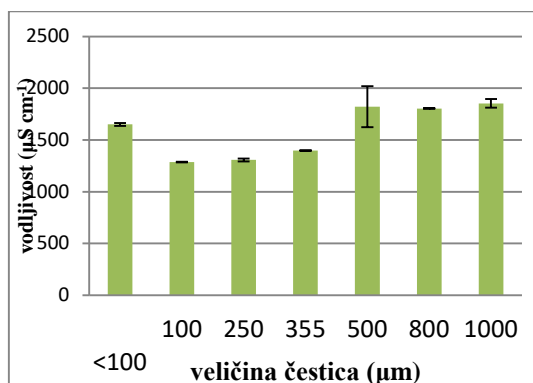
4.1.2. Vodljivost



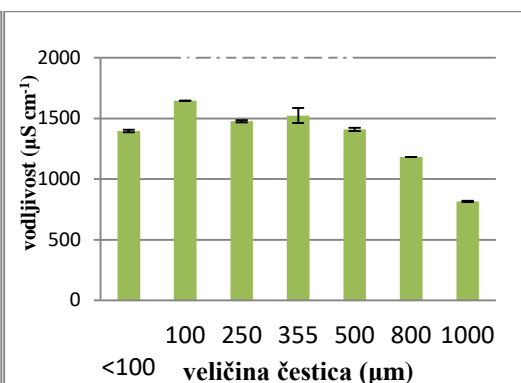
Slika 14. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost pri različitim veličinama čestica za melisu



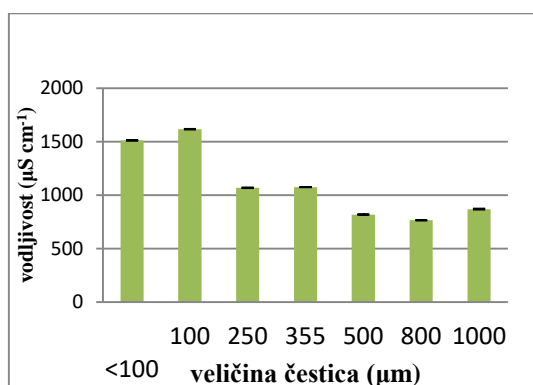
Slika 15. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost pri različitim veličinama čestica za lavandu



Slika 16. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost pri različitim veličinama čestica za mentu



Slika 17. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost pri različitim veličinama čestica za kadulju

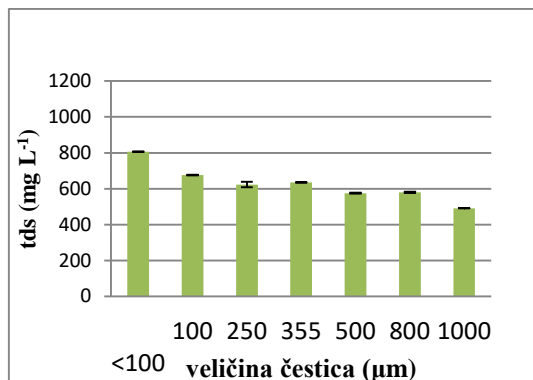


Slika 18. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za vodljivost pri različitim veličinama čestica za majčinu dušicu

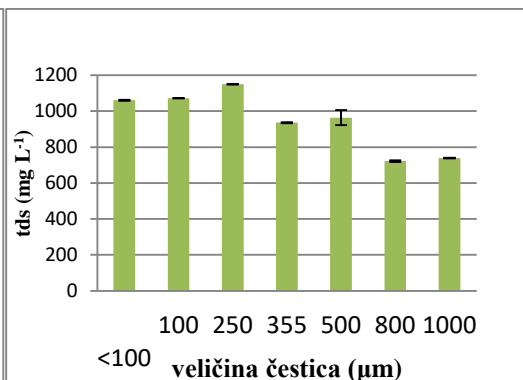
Vodljivost se smanjila povećanjem čestica kod svih biljaka osim mente (slike 14-18), kod koje je zabilježen nagli rast kod veličine čestica od 500 μm , nakon čega se nastavila povećavati proporcionalno porastu veličine čestica.

Kao što je prikazano na slici 14, u slučaju melise, primijećeno je smanjenje vodljivosti sa povećanjem veličine čestica, što je pokazatelj da se manja količina spojeva koji provode električnu struju izdvojila u otapalo prilikom ekstrakcije provedene sa česticama većih promjera. Isto je utvrđeno za lavandu, kadulju i majčinu dušicu, uz iznimke vrijednosti električne vodljivosti za ekstrakte čestica kadulje i majčine dušice manjih od 100 μm , kod kojih je moguće da je došlo do sljepljivanja čestica tijekom ekstrakcije te stvaranja većih nakupina u kojima je otežan prijenos mase. U slučaju mente nije primijećen univerzalan trend pada ili rasta vodljivosti sa promjenom veličine čestica. Naime, najveće vrijednosti električne vodljivosti za mentu utvrđene su za ekstrakte čestica promjera 1000 μm , što ukazuje na negativan utjecaj procesa mljevenja biljnog materijala na kasniji proces ekstrakcije.

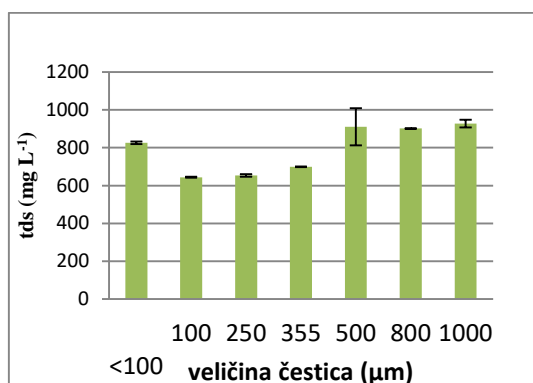
4.1.3. Ukupne otopljene tvari (TDS)



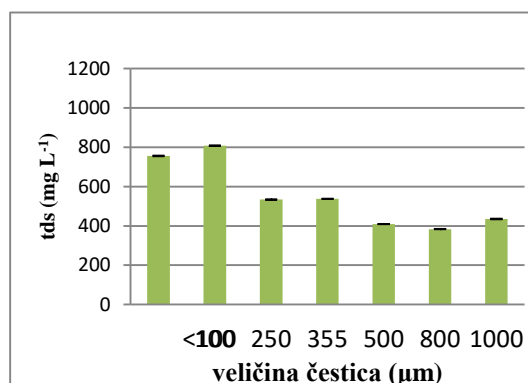
Slika 19. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS pri različitim veličinama čestica za lavandu



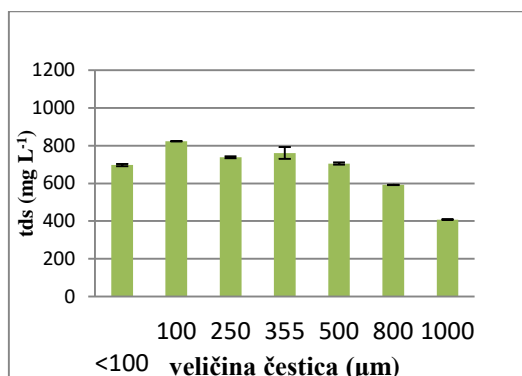
Slika 20. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS pri različitim veličinama čestica za melisu



Slika 21. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS pri različitim veličinama čestica za mentu



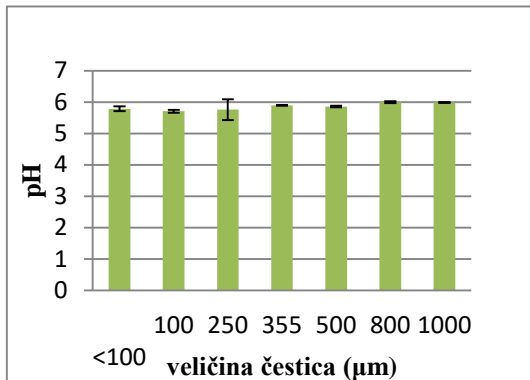
Slika 22. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS pri različitim veličinama čestica za majčinu dušicu



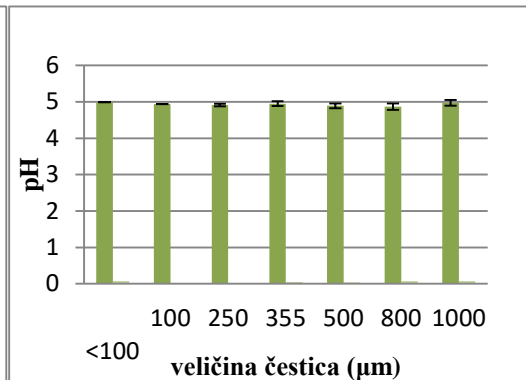
Slika 23. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za TDS pri različitim veličinama čestica za kadulju

Mjerenje TDS-a, kao što se vidi na slikama 19-23, očekivano je dalo proporcionalne rezultate u ovisnosti o veličini čestica kao i mjerenje vodljivosti. Izmjerene srednje vrijednosti za TDS smanjile su se povećanjem čestica za sve biljke, osim mente, koja je pokazala gotovo isti trend kao i za vodljivost.

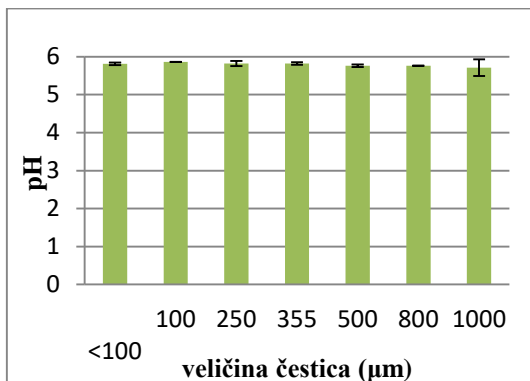
4.1.4. pH vrijednost



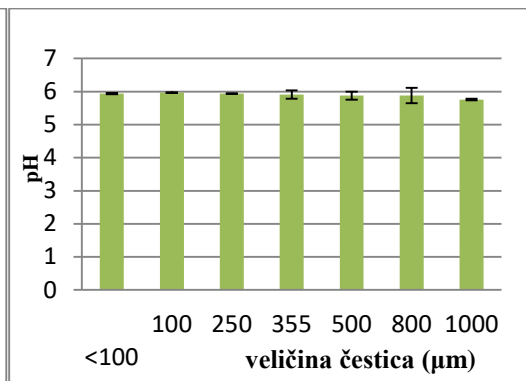
Slika 24. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH pri različitim veličinama čestica za melisu



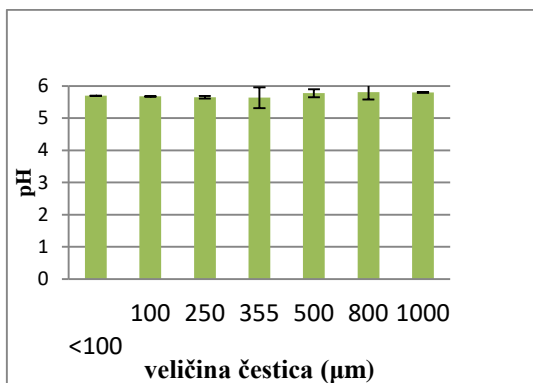
Slika 25. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH pri različitim veličinama čestica za lavandu



Slika 26. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH pri različitim veličinama čestica za mentu



Slika 27. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH pri različitim veličinama čestica za majčinu dušicu



Slika 28. Grafički prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti za pH pri različitim veličinama čestica za kadulju

Na slikama 24-28 prikazane su izmjerene pH vrijednosti za sve biljne ekstrakte. Kod majčine dušice i mente pH se smanjio povećanjem veličine čestica. Kod kadulje i melise se neznatno povećao. Mjerenja pH za ekstrakte lavande nisu dala određen trend pada ili rasta promjenom veličine čestica. Raspon pH vrijednosti ekstrakata kretao se od 5,71 do 6,00 kod melise, 4,87 do 4,99 kod lavande, od 5,71 do 5,86 kod mente, 5,64 do 5,81 kod kadulje i 5,76 do 5,97 kod majčine dušice. Bitno je napomenuti da su razlike u pH vrijednostima ekstrakata bile izrazito male ovisno o promjeni veličine čestica, te je najveća razlika u pH vrijednosti bila utvrđena između pojedinih vrsta biljaka. Primjerice, najniže pH vrijednost imali su ekstrakti lavande (pH<5), dok su najviše vrijednosti pokazali ekstrakti melise.

4.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET I UKUPNI POLIFENOLI

Najveća vrijednost antioksidacijske aktivnosti izmjerena DPPH metodom (tablica 2) kod kadulje je izmjerena pri veličini čestica 800 μm (0,909 mmol g^{-1} suhe tvari), a najmanja pri 250 μm (0,675 mmol g^{-1} suhe tvari), no ne može se ustanoviti pravilan trend rasta ili pada antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 2. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i ABTS metodama te ukupni polifenoli vodenih ekstrakata kadulje

VELIČINA ČESTICA (μm)	DPPH (mmol g^{-1} suhe tvari)	ABTS (mmol g^{-1} suhe tvari)	POLIFENOLI (mg g^{-1} suhe tvari)
<100	0,829 \pm 0,076	0,362 \pm 0,014	7,839 \pm 0,326
100	0,695 \pm 0,009	0,323 \pm 0,067	9,107 \pm 0,489
250	0,675 \pm 0,030	0,266 \pm 0,030	10,086 \pm 0,897
355	0,884 \pm 0,076	0,369 \pm 0,023	8,300 \pm 0,000
500	0,835 \pm 0,141	0,490 \pm 0,057	5,360 \pm 0,571
800	0,909 \pm 0,244	0,854 \pm 0,004	3,573 \pm 0,163
1000	0,742 \pm 0,052	1,240 \pm 0,085	4,150 \pm 0,489

Izmjerena antioksidacijska aktivnost ABTS metodom kadulje je najveća pri najvećoj veličini čestica (kod 1000 μm iznosi 1,240 mmol g^{-1} suhe tvari), a najmanja pri veličini čestica 250 μm (0,266 mmol g^{-1} suhe tvari).

Pri mjerenju ukupnih polifenola najmanja vrijednost je izmjerena pri veličini čestica 800 μm (3,573 mg g^{-1} suhe tvari), a najveća pri 250 μm (10,086 mg g^{-1} suhe tvari). Iako nema određenog trenda rasta ili pada ukupnih polifenola u ovisnosti o veličini čestica, može se primijetiti kako su izmjerene veće vrijednosti polifenola pri manjim veličinama čestica. Folin-Ciocalteu reagens koji se koristi kod ove metode ne razlikuje fenolne strukture (Adom i sur.,

2003), pa može reagirati i sa šećerima i peptidima, koji ako su topivi u vodenim otopinama mogu biti ubrojani pod polifenole kod mjerenja ovom metodom.

Kadulja pri korištenim metodama nije pokazala određene pravilnosti u ovisnosti veličine čestica i antioksidacijske aktivnosti, čemu uzrok mogu biti pogreške pri izvođenju istraživanja, no ni jedna metoda mjerenja koncentracije antioksidansa sama za sebe ne može dati uvid u aktivnost i kapacitet prisutnih antioksidansa, zbog njihove kemijske raznolikosti (Ou i sur., 2002).

Bitno je napomenuti da u ovom slučaju nisu dobiveni jednaki trendovi ponašanja antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja ukupnih polifenola. Iako je ovakav rezultat izrazito neuobičajen, s obzirom da je u literaturi zabilježeno da polifenoli i antioksidacijski kapacitet slijede isti trend rasta ili pada, do ovakvih neslaganja moguće je doći prilikom ekstrakcije ukoliko je pri različitim frakcijama veličine čestica prisutan različiti dio biljke. Naime, nakon mljevenja i prilikom prosijavanja bilo je vidljivo da se na sitima odvajaju različiti dijelovi biljke. Dok su manje frakcije sadržavale više fragmenata stabljike kadulje, veće su frakcije sadržavale više fragmenata cvijeta. Upravo je zbog tog pri različitim veličinama čestica došlo do ekstrakcije različitih bioaktivnih komponenata koje pak su dale različite rezultate mjerenja antioksidacijskog kapaciteta i ukupnih polifenola. Kako bi se utvrdilo o kojim se dijelovima biljaka radi, u budućim je istraživanjima potrebno provesti analizu svjetlosnom mikroskopijom, te HPLC analizu svakog ekstrakta kako bi se točno znalo koji su spojevi ekstrahirani kod koje frakcije.

Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom za mentu raste porastom veličine čestica do 250 μm gdje je najveća (1,234 mmol g^{-1} suhe tvari), te zatim pada sve do veličine čestica 800 μm gdje je izmjerena najmanja antioksidacijska aktivnost (0,581 mmol g^{-1} suhe tvari) (tablica 3). Ne može se ustanoviti određen trend rasta ili pada antioksidacijske aktivnosti promjenom veličine čestica. Istraživanje Mhemdi i sur. (2011) o povezanosti veličine čestica i ekstrakcije pokazalo je da se smanjenjem čestica značajno pospješuje ekstrakcija, što se može pripisati povećanju dodirne površine i smanjenju u ograničenjima prijenosa mase.

Tablica 3. Rezultati dobiveni određivanjem antioksidacijske aktivnosti DPPH, ABTS metodama i koncentracija ukupnih polifenola mente

VELIČINA ČESTICA (μm)	DPPH (mmol g⁻¹ suhe tvari)	ABTS (mmol g⁻¹ suhe tvari)	POLIFENOLI (mg g⁻¹ suhe tvari)
<100	0,719±0,040	0,183±0,019	13,429±0,408
100	1,087±0,141	0,158±0,046	15,504±0,571
250	1,234±0,078	0,181±0,029	18,444±1,141
355	1,103±0,107	0,191±0,041	15,216±0,652
500	0,862±0,157	0,270±0,072	13,084±0,245
800	0,581±0,069	0,238±0,002	8,530±0,326
1000	0,849±0,128	0,208±0,016	9,741±0,245

Pri mjerenju ABTS metodom, najveću antioksidacijsku aktivnost pokazala je frakcija veličine čestica od 500 μm (0,270 mmol g⁻¹ suhe tvari), no usprkos tome može se primijetiti da povećanjem veličine čestica antioksidacijska aktivnost raste.

Mjerenjem ukupnih polifenola također možemo primijetiti da je najveća vrijednost izmjerena pri veličini čestica od 250 μm (18,444 mg g⁻¹ suhe tvari). Povećanjem veličine čestica nakon 250 μm , izmjerena vrijednost polifenola se smanjuje, a najmanja je izmjerena pri veličini čestica 800 μm (8,530 mg g⁻¹ suhe tvari). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Maksimovića i sur. (2012), koji navode kako je mljevenjem mente prije ekstrakcije dobivena veća koncentracija ispitivanih spojeva zbog manje veličine čestica.

Mjerenjem DPPH metodom i mjerenjem ukupnih polifenola najmanja vrijednost izmjerena pri veličini čestica 800 μm , a najveća pri veličini čestica 250 μm , što ukazuje na to da su kod tih metoda vjerojatno detektirani isti spojevi koji su bili najdostupniji za ekstrakciju pri istoj veličini čestica, dok je ABTS metoda dala drugačije rezultate, moguće zbog detekcije drugih spojeva ili zbog pogrešaka pri mjerenju.

Ovi su rezultati u skladu sa rezultatima električne vodljivosti i TDS-a, budući da niti kod tih fizikalnih veličina nije utvrđen trend pada ili rasta sa promjenom veličine čestica.

Izmjerene antioksidacijske aktivnosti lavande određene DPPH metodom (tablica 4) kreću se u rasponu od 0,544 mmol g⁻¹ suhe tvari pri veličini čestica 250 μm do 0,819 mmol g⁻¹ suhe tvari pri veličini čestica 1000 μm. Može se primijetiti blagi trend rasta antioksidacijske aktivnosti porastom veličine čestica.

Tablica 4. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i ABTS metodom i koncentracija ukupnih polifenola vodenih ekstrakata lavande

VELIČINA ČESTICA (μm)	DPPH (mmol g⁻¹ suhe tvari)	ABTS (mmol g⁻¹ suhe tvari)	POLIFENOLI (mg g⁻¹ suhe tvari)
<100	0,634±0,046	0,160±0,002	5,994±0,163
100	0,711±0,128	0,216±0,045	6,282±0,082
250	0,544±0,164	0,298±0,006	6,225±0,163
355	0,774±0,158	0,264±0,013	7,032±0,163
500	0,819±0,221	0,378±0,009	6,974±0,082
800	0,779±0,156	0,432±0,129	7,954±0,163
1000	0,819±0,276	0,331±0,005	9,453±0,163

Najveća antioksidacijska aktivnost (ABTS metoda) izmjerena je kod frakcije od 800 μm (0,432 mmol g⁻¹ suhe tvari), a najmanja kod veličine čestica manjih od 100 μm (0,160 mmol g⁻¹ suhe tvari), što je najvjerojatnije rezultat sljepljivanja čestica malih promjera u veće nakupine za koje je karakterističan otežan prijenos mase tijekom ekstrakcije. Pri većim veličinama čestica primijećena je i viša izmjerena antioksidacijska aktivnost ekstrakata.

Određivanje ukupnih polifenola pokazalo je da je najveća koncentracija polifenola zabilježena pri veličini čestica 1000 μm (9,453 mg g⁻¹ suhe tvari), dok je najmanja koncentracija ukupnih polifenola zabilježena u ekstraktu pripremljenom od sušenog biljnog materijala lavande

veliĉine manjih od 100 μm . U ovom je sluĉaju zabilježen porast antioksidacijske aktivnosti i ukupnih polifenola sa porastom veliĉine ĉestica.

Izmjerene antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom kod melise (tablica 5) pokazuju smanjenje antioksidacijske aktivnosti porastom veliĉine ĉestica (ako zanemarimo odstupanje pri 250 μm , koje je moglo nastati zbog grešaka pri izvođenju pokusa). Najveća izmjerena antioksidacijska aktivnost pri veliĉini ĉestica od 250 μm mogla bi se protumaĉiti teorijom da smanjenje veliĉine ĉestica pospješuje ekstrakciju, ali do određene granice, jer ako su ĉestice presitne, one poĉnu tvoriti nakupine koji usporavaju prijenos mase tijekom ekstrakcije (Wei i Yang, 2014). Također, budući da je proces mljevenja dovodi do oslobađanja topline zbog velikih smiĉnih sila potrebnih da se materijal usitni (Barbosa-Canovas et al., 2005), u ovom je sluĉaju moguće da melisa sadrži bioaktivne spojeve koji su izrazito osjetljivi na porast temperature tokom mljevenja. Također je moguće da je tijekom mljevenja došlo do izrazito velikog oštećenja staniĉne strukture koja je dovela do pada antioksidacijskog kapaciteta.

Tablica 5. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i ABTS metodom i koncentracija ukupnih polifenola vodenih ekstrakata melise

VELIĀINA ĀESTICA (μm)	DPPH (mmol g⁻¹ suhe tvari)	ABTS (mmol g⁻¹ suhe tvari)	POLIFENOLI (mg g⁻¹ suhe tvari)
<100	1,281±0,150	0,115±0,004	14,755±0,163
100	1,142±0,192	0,086±0,002	17,867±0,489
250	1,322±0,015	0,059±0,058	16,657±0,734
355	0,988±0,073	0,272±0,046	11,066±0,489
500	0,746±0,066	0,359±0,002	6,801±0,000
800	0,465±0,077	0,527±0,005	4,322±0,408
1000	0,470±0,012	0,536±0,047	4,496±0,815

Porastom veliĉine ĉestica ekstrakta melise antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom prvo pada, do veliĉine ĉestica 250 μm (gdje je izmjerena najmanja antioksidacijska

aktivnost, 0,0584 mmol g⁻¹ suhe tvari), a zatim raste, te je najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena pri veličini čestica od 1000 μm (0,536 mmol g⁻¹ suhe tvari).

Koncentracija ukupnih polifenola najveća je pri veličini čestica od 100 μm (17,867 mg g⁻¹ suhe tvari), a najmanja pri veličini čestica od 800 μm (4,323 mg g⁻¹ suhe tvari), te se može primijetiti da su veće koncentracije izmjerene pri manjim veličinama čestica, što je u skladu sa istraživanjima Maksimović i sur. (2012), Giãn i sur. (2009), te istraživanjem Hemery i sur. (2010), koji su pokazali da su pri manjoj veličini čestica fenolne kiseline biološki dostupnije. Slični rezultati dobiveni su i kod mjerenja DPPH metodom, dok su kod mjerenja ABTS metodom vjerojatno detektirani različiti spojevi nego kod preostale dvije metode mjerenja, što bi objasnilo različite trendove rasta i pada koncentracija u ovisnosti o veličini čestica.

Izmjerene antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom kod majčine dušice (tablica 6) pokazuju pravilan trend rasta pada promjenom veličine čestica, uz iznimku ekstrakta 800 μm, koji se može objasniti kao analitička pogreška, budući da ne slijedi isti trend promjene kao što je to slučaj sa polifenolima. Najmanja izmjerena vrijednost utvrđena je za najveće promjere čestica i iznosi (0,907 mmol g⁻¹ suhe tvari).

Tablica 6. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i ABTS metodom i koncentracija ukupnih polifenola vodenih ekstrakata majčine dušice

VELIČINA ČESTICA (μm)	DPPH (mmol g^{-1} suhe tvari)	ABTS (mmol g^{-1} suhe tvari)	POLIFENOLI (mg g^{-1} suhe tvari)
<100	1,210 \pm 0,060	0,203 \pm 0,007	13,372 \pm 0,163
100	1,229 \pm 0,078	0,184 \pm 0,028	12,795 \pm 0,163
250	1,141 \pm 0,058	0,313 \pm 0,013	9,741 \pm 0,082
355	1,040 \pm 0,007	0,581 \pm 0,007	6,282 \pm 0,082
500	1,200 \pm 0,060	0,784 \pm 0,008	5,245 \pm 0,245
800	1,561 \pm 0,317	0,694 \pm 0,032	4,265 \pm 0,163
1000	0,908 \pm 0,028	0,599 \pm 0,010	5,072 \pm 0,163

Povećanjem veličine čestica majčine dušice antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom raste, sve do frakcije veličine čestica 500 μm koja je pokazala najveću antioksidacijsku aktivnost (0,784 mmol g^{-1} suhe tvari), nakon čega povećanjem veličine čestica antioksidacijska aktivnost blago opada. U ovom slučaju rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom nisu u skladu. U literaturi su zabilježeni slučajevi u kojima DPPH i ABTS metode nisu dale usporedive rezultate za antioksidacijsku aktivnost. Primjerice, Floegel i sur. (2010) navode da je prilikom analize ekstrakata hrane bogate antioksidansima (borovnice, jagode, šljive, jabuke, brokula itd.), utvrđena razlika u redoslijedu određenog tipa hrane prema antioksidacijskoj aktivnosti određenoj prema DPPH i ABTS metodi.

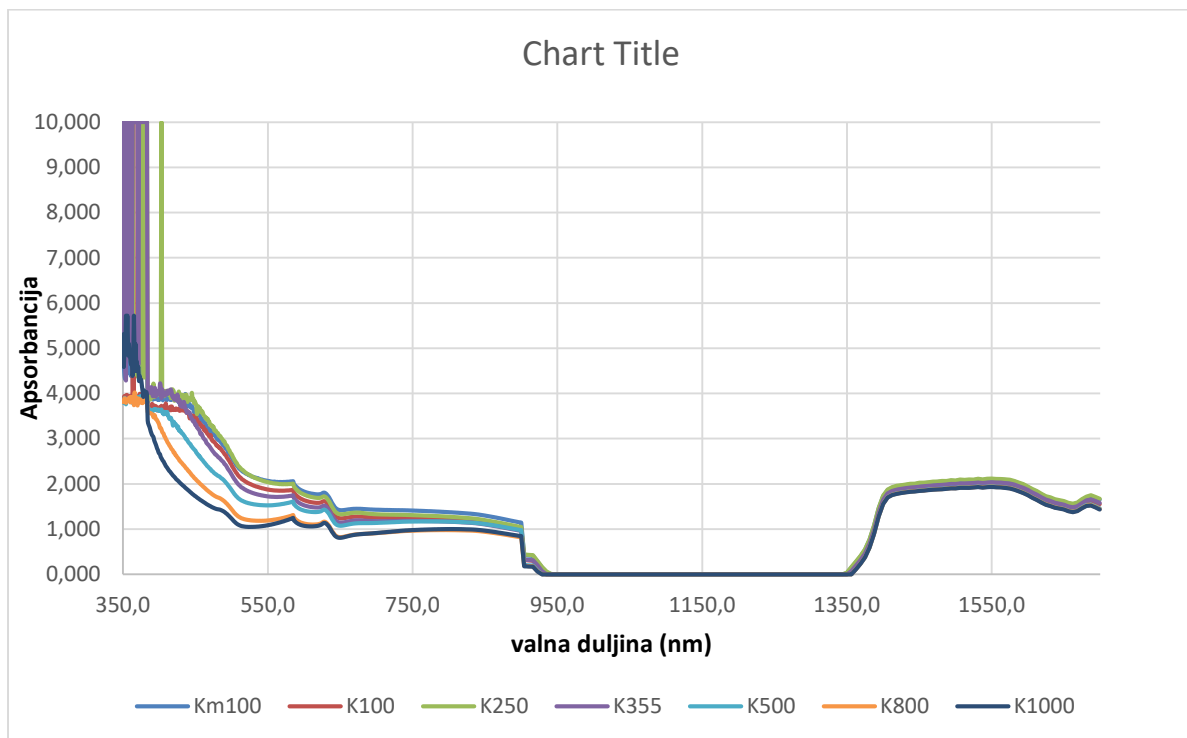
Najveća koncentracija ukupnih polifenola izmjerena je pri najmanjoj veličini čestica, <100 (13,372 mg g^{-1} suhe tvari), te postoji trend pada koncentracije ukupnih polifenola povećanjem veličine čestica.

Podaci dobiveni mjerenjem DPPH i ABTS metodom ne pokazuju određenu korelaciju ili povezanost, moguće zbog grešaka tijekom izvođenja pokusa, ili zbog razlika u osjetljivosti metoda na određene spojeve. Moguće je da se redoks potencijal DPPH razlikuje od onog

Folin-Ciocalteu reagensa. Slične rezultate je pokazalo i istraživanje Brewer i sur. (2014), u kojem je povećana dostupna površina dobivena smanjenjem veličine čestica utjecala na koncentraciju ukupnih polifenola, ali ne i na inhibiciju DPPH.

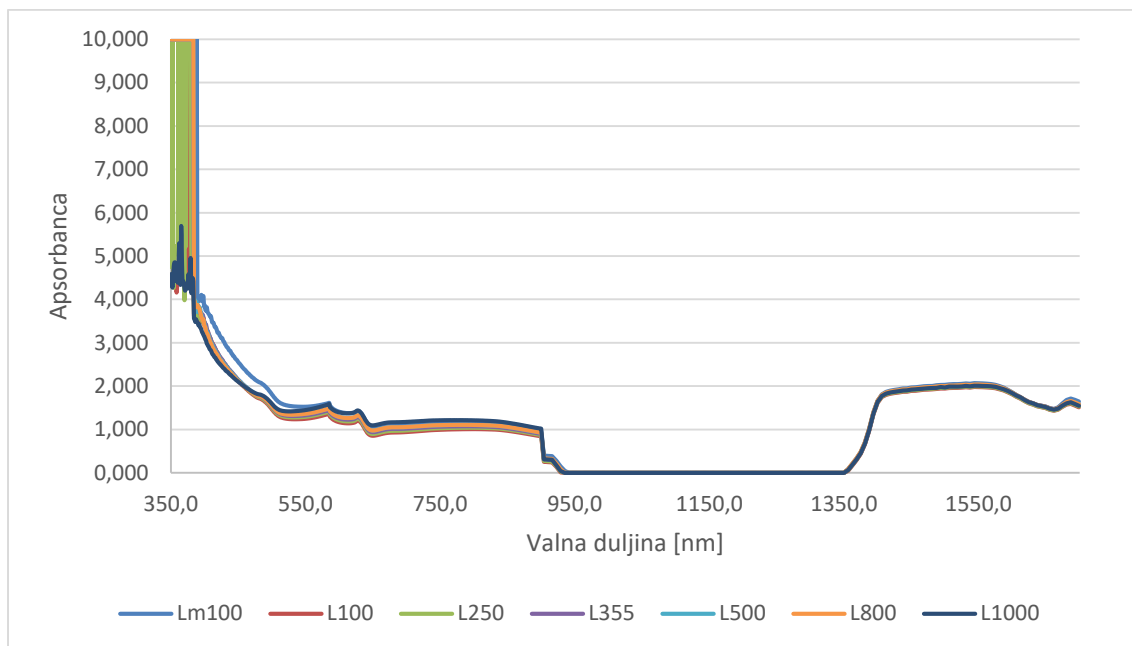
4.3. UV I NIR SPEKTROSKOPIJA

Na slici 29 prikazani su spojeni spektri ekstrakata kadulje za UV i NIR područje. Vidljive su najveće razlike u dijelovima UV spektra valnih duljina od 350 do 500 nm, a u NIR području pri valnim duljinama od 1650 do 1699 nm.



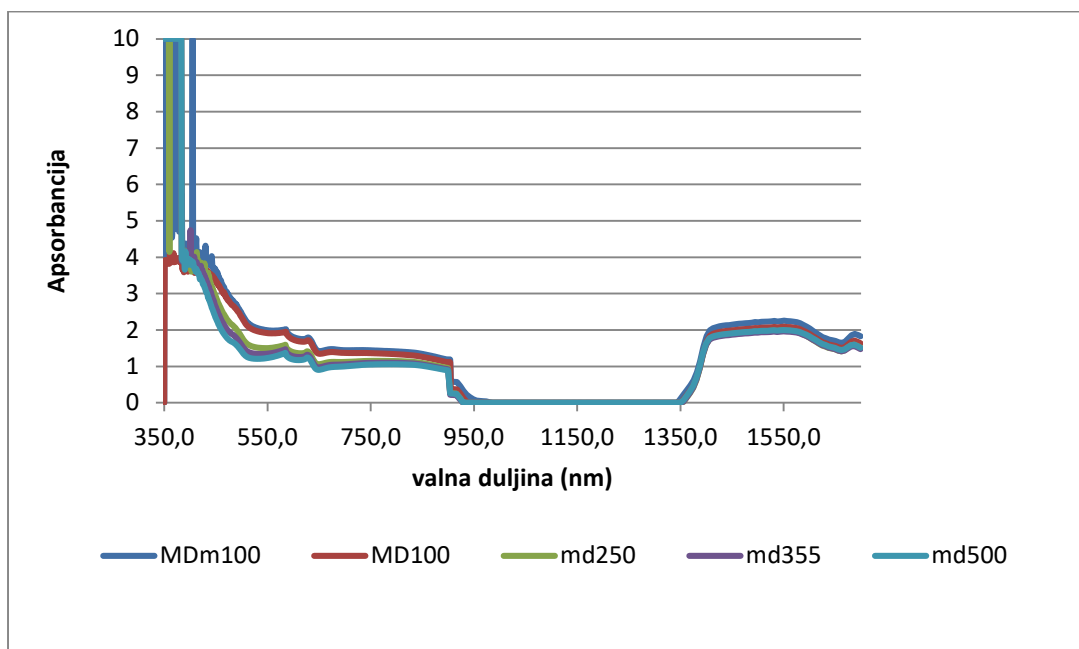
Slika 29. Grafički prikaz spojenih UV i NIR spektara za kadulju

Pri analizi UV i NIR spektara ekstrakata lavande (slika 30) također su vidljive razlike u djelu UV spektra koji odgovara valnim duljinama 350 – 550 nm, dok razlike u NIR dijelovima spektra nisu toliko izražene.



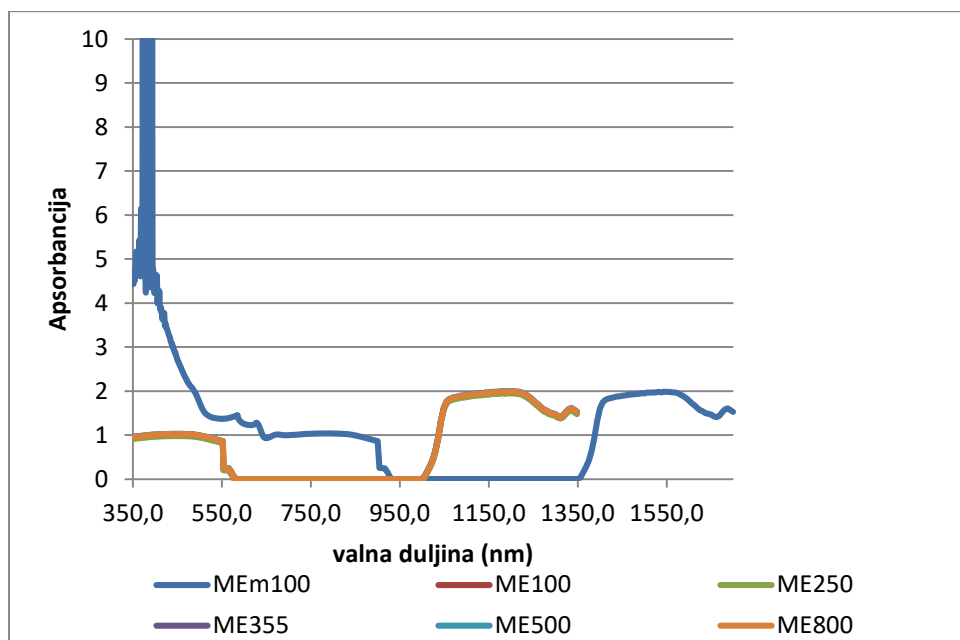
Slika 30. Grafički prikaz spojenih UV i NIR spektara za lavandu

Spektri ekstrakata majčine dušice (slika 31) najveće su razlike pokazali u dijelovima UV spektara 350 – 600 nm te je primijećen spektralni pomak spektara zabilježenih u NIR području.



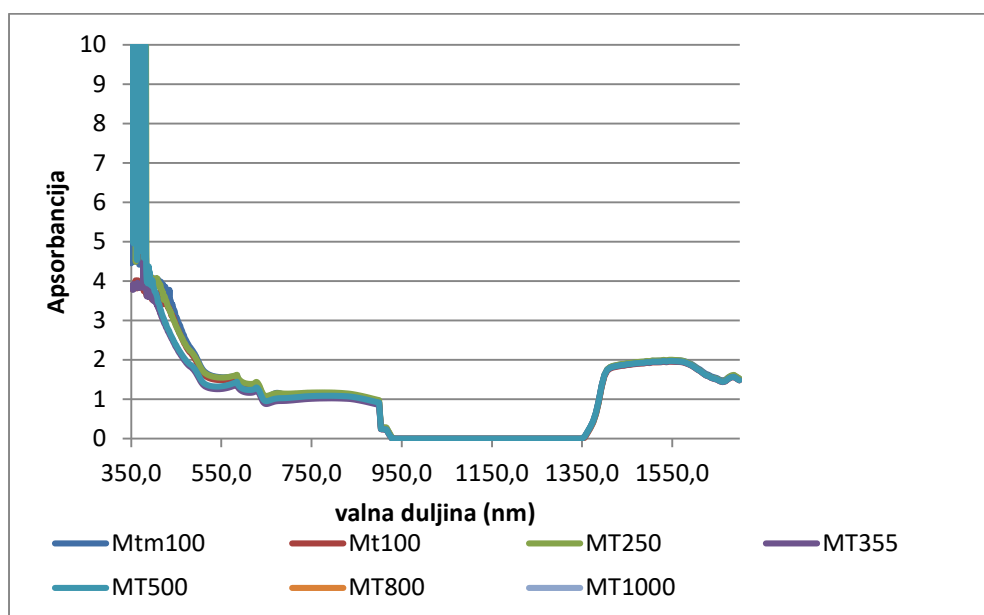
Slika 31. Grafički prikaz spojenih UV i NIR spektara za majčinu dušicu

Kod spektara melise (slika 32) zabilježene su najveće razlike u UV djelu spektra 350 – 600 nm, dok NIR spektri nisu pokazali golim okom vidljive razlike ili spektralne pomake.



Slika 32. Grafički prikaz spojenih UV i NIR spektara za melisu

Analizom spektara mente (slika 33) utvrđene su najmanje razlike između pojedinačnih spektara ekstrakata u usporedbi sa spektrima ostalih biljnih ekstrakata. Najveća je razlika vidljiva u uskom djelu UV spektra koji obuhvaća područje od 550 do 600 nm.

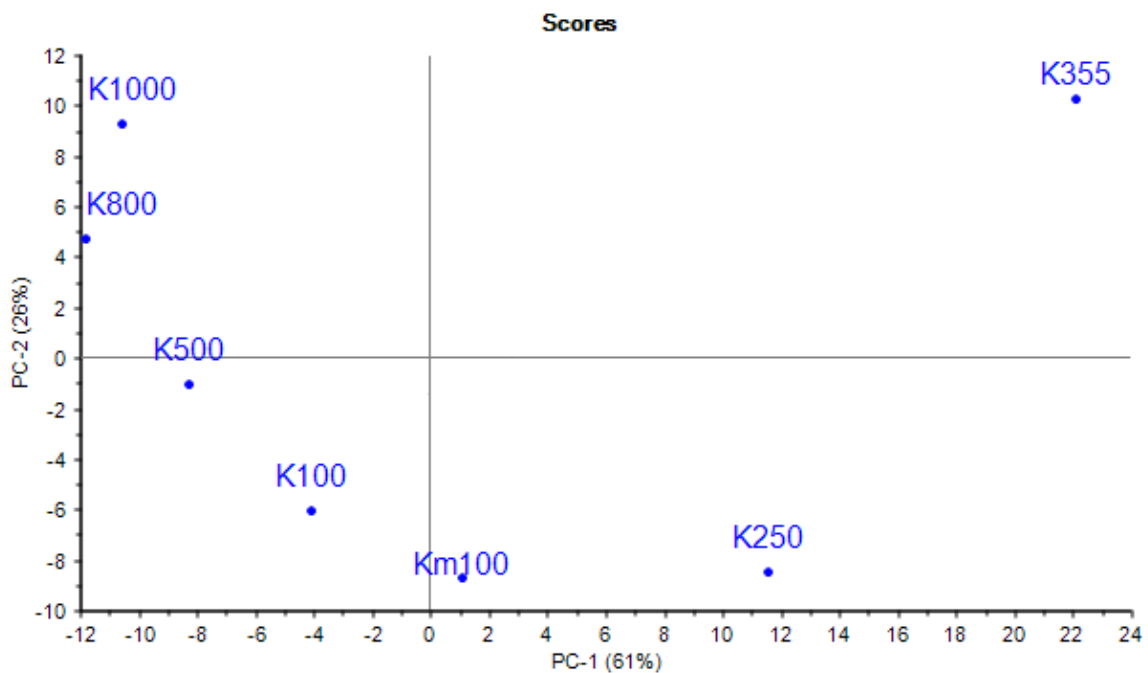


Slika 33. Grafički prikaz spojenih UV i NIR spektara za mentu

S obzirom da se snimanjem kontinuiranih UV i NIR spektara prikuplja velika količina podataka čest je slučaj da određene minimalne razlike u dijelovima spektara ostanu nezamijećene. Upravo je zbog tog razloga primijenjena PCA analiza prikupljenih spektara kojom je omogućeno utvrđivanje sličnosti ili razlika između velikih setova podataka.

4.4. PCA ANALIZA

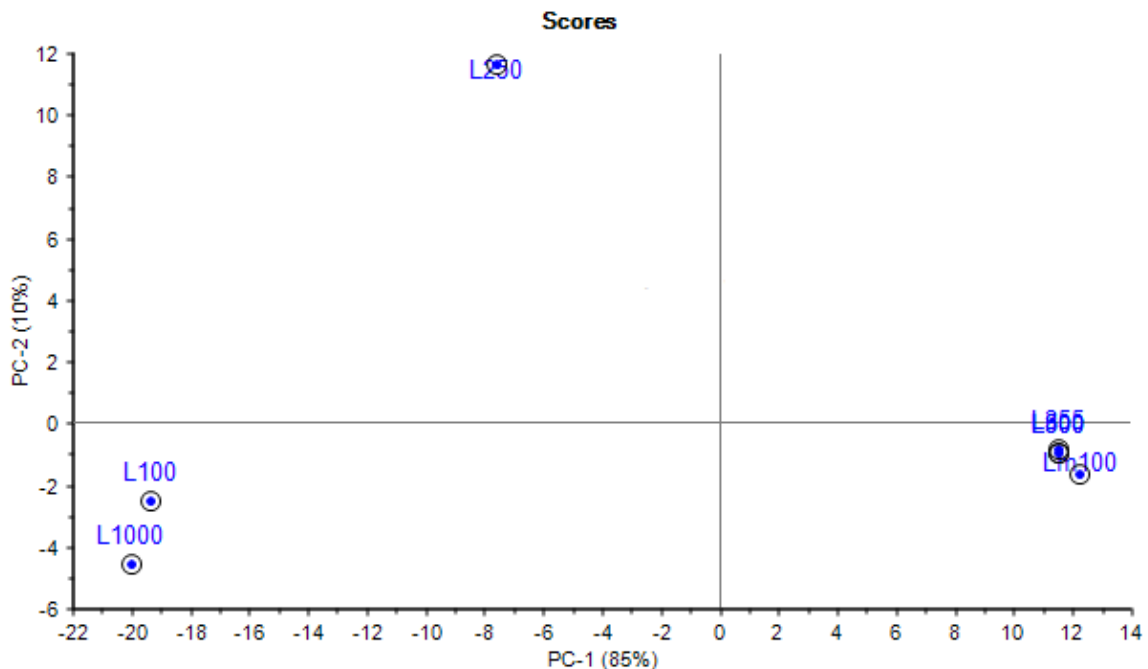
Snimljeni UV i NIR spektri obuhvaćaju valne duljine od 350 do 1699 nm, što čini veliku količinu podataka, za čiju obradu je potrebno primjeniti jednu od kemometrijskih metoda, pa se ti podaci analiziraju pomoću PCA analize. Rezultati su prikazani na Slikama 34-38.



Slika 34. PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka kadulje

PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka kadulje (slika 34) je pokazala raspodjelu po prvom i drugom faktoru. Pronađene su razlike između uzoraka, i oni su grupirani tako da su uzorci s manjim veličinama čestica smješteni u donjim kvadrantima, te se može primijetiti kako su ekstrakti proizvedeni od čestica većih promjera smješteni u gornja dva kvadranta.

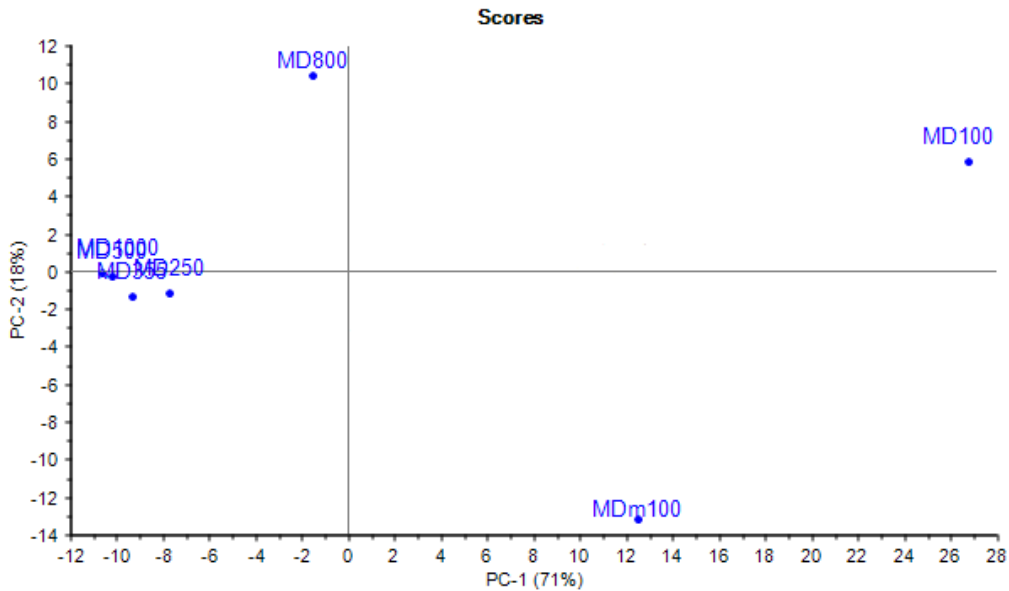
Uzorci sa najvećom veličinom čestica (800 i 1000 μm) smješteni su u drugom kvadrantu, te se prema njihovoj blizini može zaključiti da su vrlo slični s obzirom na ispitivane faktore, i da postoji značajna razlika između uzoraka veličine čestice 1000 μm i manjih od 100 μm jer su se dijagonalno raspodijelili po kvadrantima. PCA analiza utvrdila je da postoje razlike između uzoraka, no ne daje informaciju temeljem kojih kemijskih spojeva su razdvojeni, već bi za to trebalo provesti dodatna ispitivanja drugim metodama.



Slika 35. PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka lavande

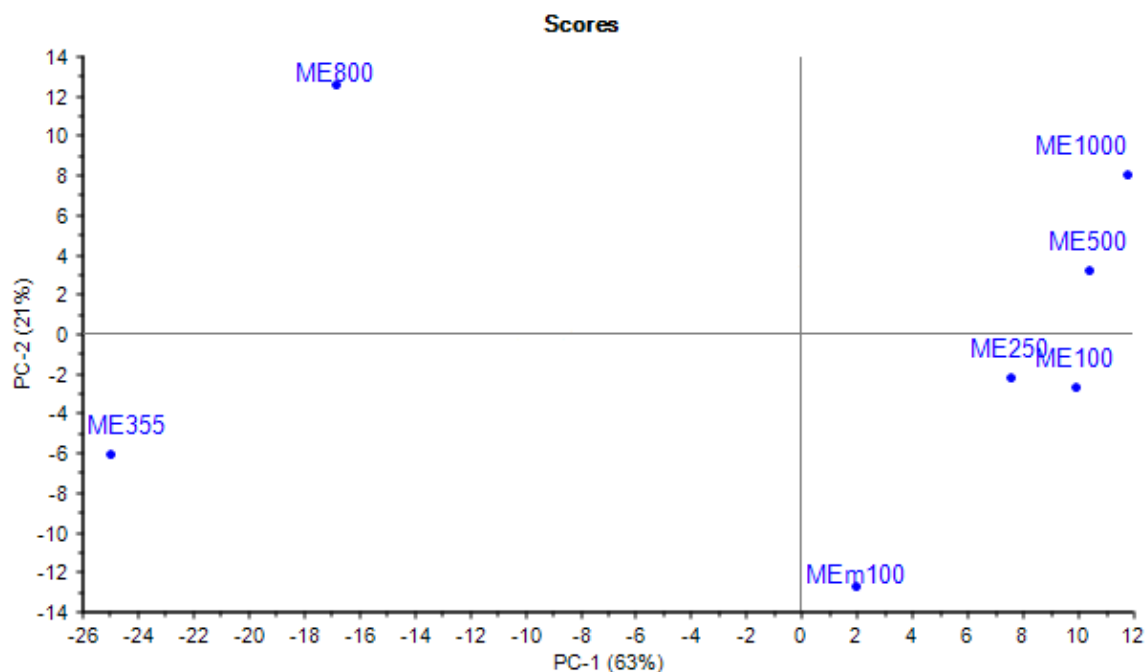
Uzorci lavande nisu pokazali dobro razdvajanje temeljem veličine čestica (slika 35) . Naime, u trećem je kvadrantu vidljivo grupiranje ekstrakata proizvedenih od veličina čestica od 100 μm te veličine 1000 μm . Prema rezultatima ostalih analiza (antioksidacijski kapacitet TDS, vodljivost, suha tvar) ti su uzorci međusobno značajno različiti. Isto je zabilježeno i sa ekstraktima veličina čestica manjih od 100 μm , 355, 500 i 800 μm koji su zajednički grupirani

u četvrtom kvadrantu, usprkos tome da su između njih utvrđene značajne razlike u fizikalnim karakteristikama.



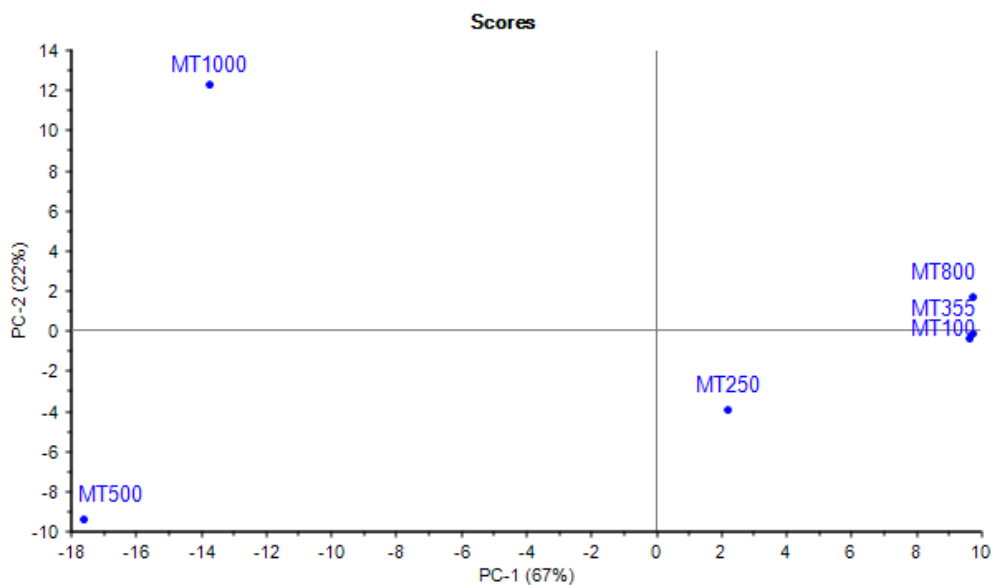
Slika 36. PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka majčine dušice

Iz PCA analize uzoraka majčine dušice (slika 36) vidi se da postoji razlika između uzoraka s manjim veličinama čestica koje su smještene u prvom i četvrtom kvadrantu, dok su one s većim veličinama čestica u drugom i trećem kvadrantu, te možemo primijetiti kako su uzorci s veličinama čestica 250, 355, 500 i 1000 μm grupirane oko iste točke, što ukazuje na veliku sličnost ispitivanih faktora.



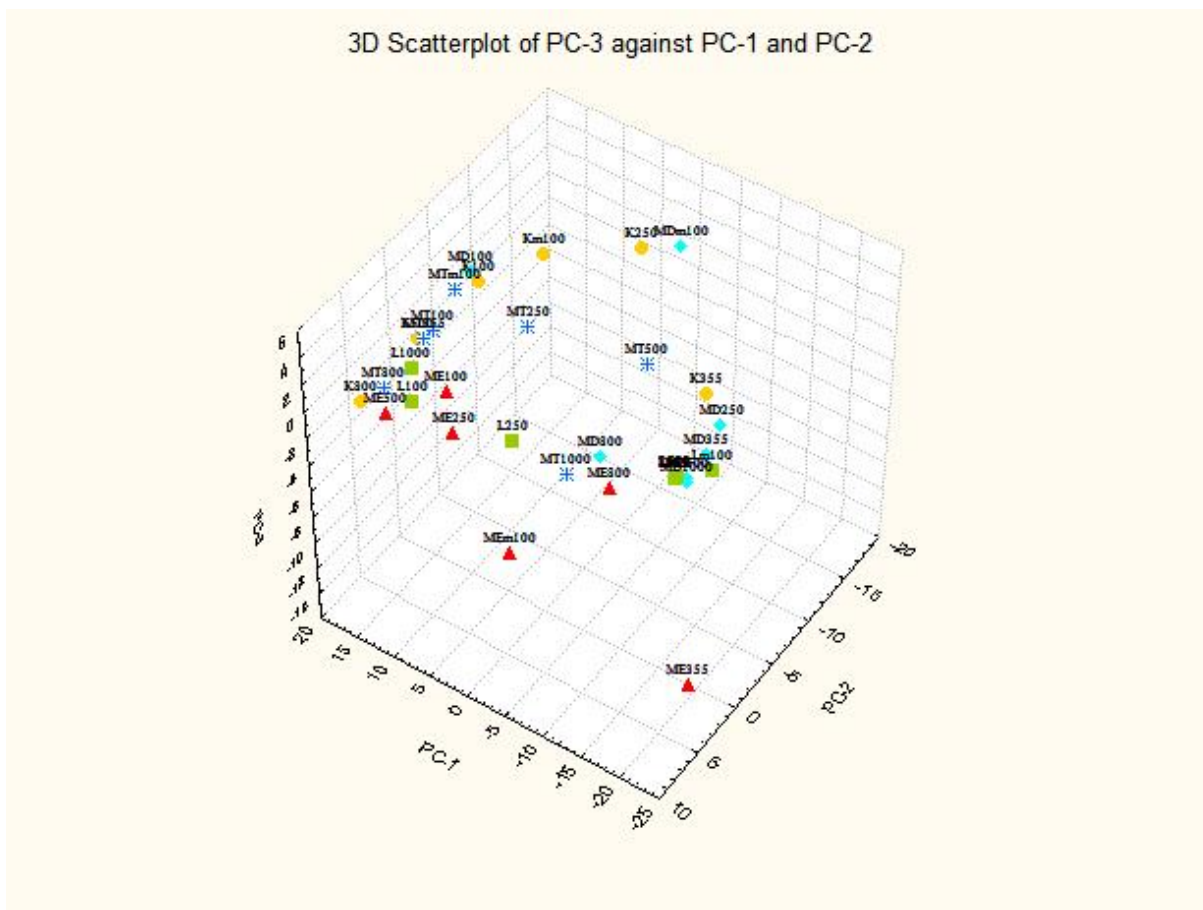
Slika 37. PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka melise

PCA analiza uzorke melise (slika 37) manje veličine čestica smjestila je u donjim kvadrantima, i to uglavnom u četvrtom kvadrantu, pri čemu vidimo veliku sličnost između uzoraka veličine čestica 100 i 250 μm s obzirom na njihovu blizinu na grafu. Uzorci većih veličina čestica smješteni su u prvom i drugom kvadrantu, što ukazuje na to da se razlikuju prema ispitivanim faktorima od onih s manjom veličinom čestica.



Slika 38. PCA analiza spojenih UV i NIR spektara uzoraka mente

PCA analiza smjestila je uzorke mente (slika 38) s manjom veličinom čestica u desne kvadrante a s većom u lijeve (izuzev uzorak veličine čestica 800 μm , što može biti uzrokovano greškom pri mjerenju ili drugim smetnjama). Iz grafa se vidi da su uzorci veličine čestica 500 i 1000 μm prilično udaljeni od drugih uzoraka, što ukazuje na značajne razlike s obzirom na faktore po kojima su uzroci podijeljeni.

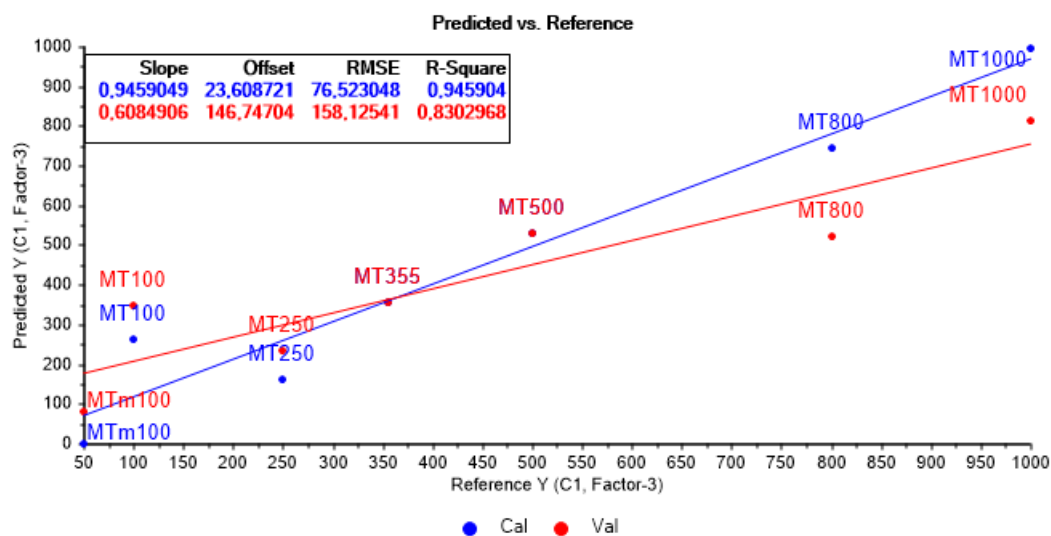


Slika 39. 3D prikaz PCA analize

Na slici 39 prikazana je PCA analiza svih uzoraka u trodimenzionalnom prikazu kako bi se bolje uočilo da postoje određene krivulje po kojima se uzorci odvajaju i da bi se bolje uočilo odvajanje prema faktorima u određenom dijelu grafa. Može se primijetiti kako se kadulja (označeno žutom bojom) odvaja po određenoj gornjoj krivulji, uzorci melise (označeno crvenom bojom) se odvajaju u donjem prostoru, majčina dušica se izdvojila na desnoj strani (označeno svijetlo plavom bojom), a za uzorke mente i lavande se ne može ustanoviti određen trend zbog raspršenosti podataka. Time je potvrđena opravdanost upotrebe PCA analize u pronalaženju razlika između velikih setova podataka kao što su rezultati spektralnih analiza.

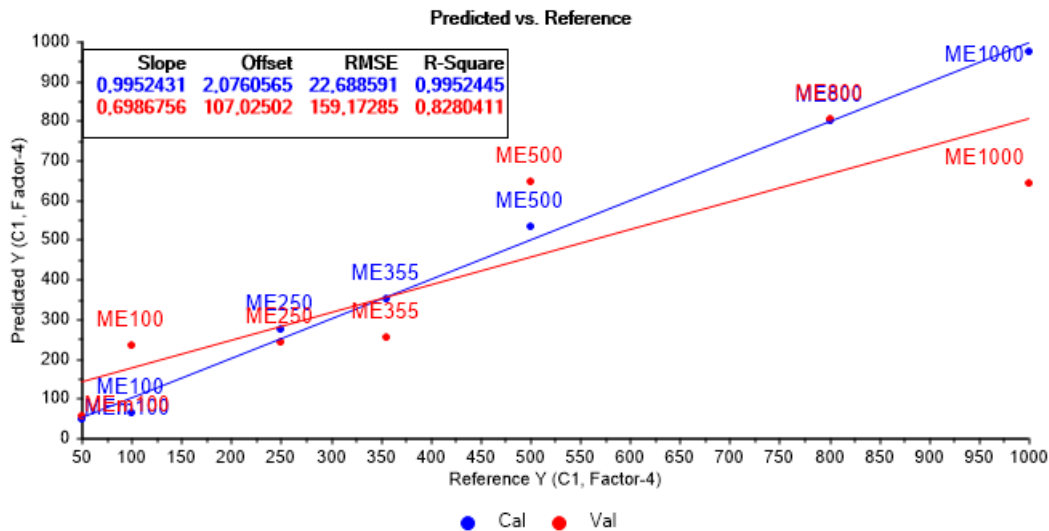
4.5. PLS MODELI

Kako bi se bolje utvrdile razlike između uzoraka, i kako bi se vidjelo postoji li linearna ovisnost između vrijednosti apsorbancija određenih spektralnom analizom i veličine čestica, korišteni su PLS modeli, pri čemu je uzet u obzir cijeli UV i NIR spektar. PLS modeli daju linearnu regresiju između eksperimentalnih podataka. Plava linija prikazuje predikcijski model, a crvena validacijski. R^2 ukazuje na uspješnost modela te vrijednost R^2 čim bliža 1 ukazuje na značajnu povezanost između eksperimentalno određenih vrijednosti i vrijednosti određenih modelom.



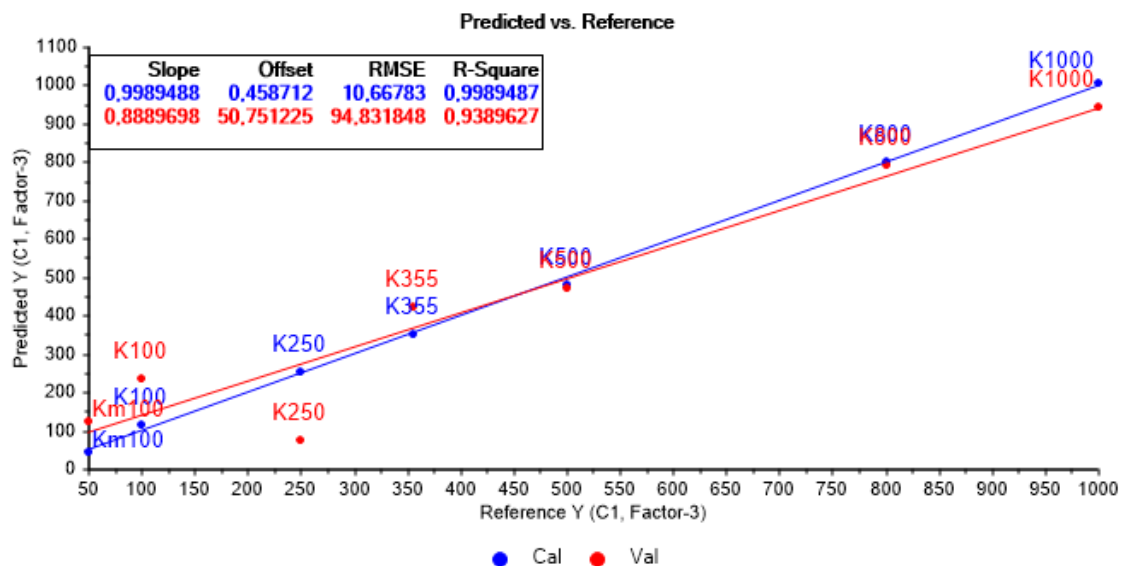
Slika 40. PLS model za uzorke mente

Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između podataka dobivenih UV i NIR spektroskopijom i veličine čestica mente (slika 40). R^2 je prilično visok što ukazuje na dobru povezanost podataka i modela. Bitno je napomenuti da je R^2 za validaciju predloženog modela niža u odnosu na kalibracijski, tj. predikcijski model.



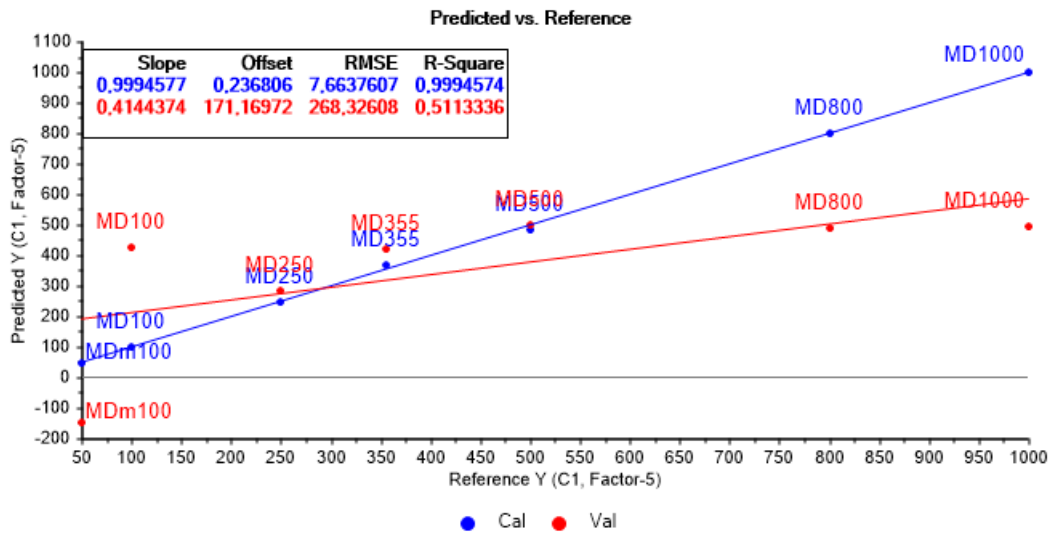
Slika 41. PLS model za uzorke melise

Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između UV i NIR spektralnih podataka i veličine čestica melise (slika 41). R^2 je prilično visok, i za kalibraciju, i za validaciju, što ukazuje na dobru povezanost podataka i modela. I u ovom je slučaju utvrđena bolja povezanost kalibracijskih podataka sa veličinom čestica nego što je slučaj sa validacijom modela.



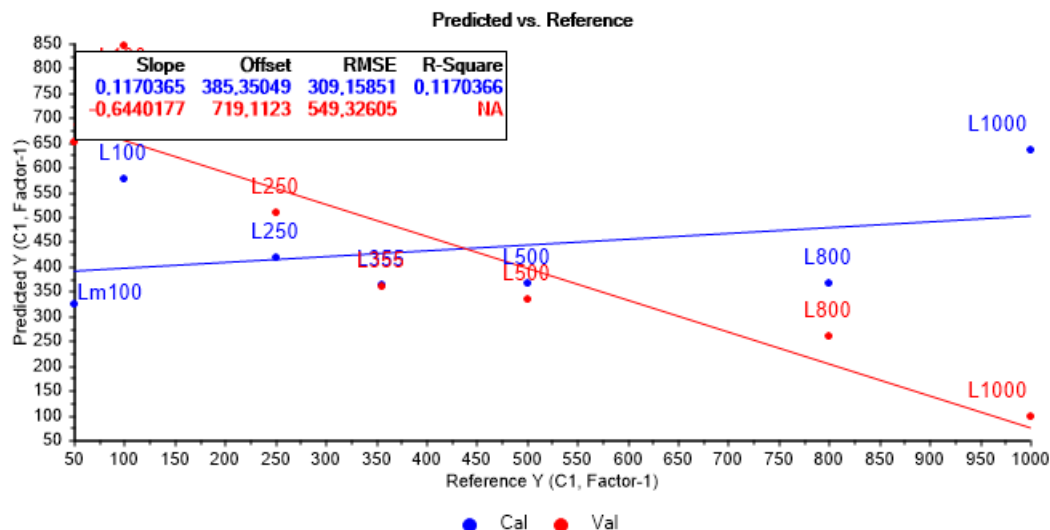
Slika 42. PLS model za uzorke kadulje

Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između UV i NIR spektralnih podataka i veličine čestica kadulje (slika 42). R^2 je i za kalibraciju, i za validaciju, prilično visok što ukazuje na dobru povezanost podataka i modela, te na valjanost PLS modela za kadulju. Kadulja je pokazala najveću linearnu zavisnost tj. najuspješniji PLS model od svih uzoraka.



Slika 43. PLS model za uzorke majčine dušice

Iako je primjena PLS modela pokazala da postoji linearna zavisnost između NIR i UV spektara i veličine čestica (slika 43), s obzirom na visoku dobivenu vrijednost za R^2 a nisku za R^2 , može se zaključiti kako se uzorci majčine dušice mogu pomoću PLS modela kalibrirati, no ne mogu se koristiti kod buduće predikcije.



Slika 44. PLS modeli za uzorke lavande

PLS modeli za uzorke lavande nisu pokazali linearnu zavisnost (slika 44). Naime, bitno je napomenuti da je tijekom prosijavanja došlo do odvajanja različitih dijelova biljke na sitima, tako da je određena frakcija sadržavala više dijelova cvijeta, a druge više dijelova stabljike. To je rezultiralo ekstraktima različitih dijelova biljaka, što se moglo i primijetiti tijekom NIR analize. Slične je rezultate dobila Režan (2017) koji su potvrđeni snimkama uzoraka svjetlosnim mikroskopom.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivani vodeni ekstrakti melise pokazali su smanjenje ukupne suhe tvari (iskorištenja ekstrakcije), smanjenje vodljivosti i TDS-a te povećanje pH porastom veličine čestica. Ispitivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom utvrđeno je da se antioksidacijski kapacitet smanjuje povećanjem veličine čestica, kao i količina ukupnih polifenola.
2. Ispitivani vodeni ekstrakti lavande pokazali su smanjenje ukupne suhe tvari (iskorištenja), smanjenje vodljivosti i TDS-a, a mjerenje pH nije pokazalo ovisnost o veličini čestica. Ispitivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodom utvrđeno je da antioksidacijski kapacitet raste povećanjem veličine čestica, kao i količina ukupnih polifenola.
3. Ispitivani vodeni ekstrakti kadulje pokazali su smanjenje ukupne suhe tvari (iskorištenja), te smanjenje vodljivosti, TDS-a, i pH porastom veličine čestica. Ispitivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodom utvrđeno je da se antioksidacijski kapacitet povećava povećanjem veličine čestica, a koncentracija ukupnih polifenola smanjuje povećanjem veličine čestica. S obzirom da ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet ne slijede isti trend, moguće je da je tijekom ekstrakcije došlo do interferencije i odvajanja različitih dijelova biljke.
4. Ispitivani vodeni ekstrakti mente pokazali su smanjenje ukupne suhe tvari (iskorištenja), povećanje vodljivosti i TDS-a te smanjenje pH porastom veličine čestica. Ispitivanjem antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom utvrđeno je da se antioksidacijski kapacitet raste povećanjem veličine čestica.
5. Ispitivani vodeni ekstrakti majčine dušice pokazali su smanjenje ukupne suhe tvari (iskorištenja), smanjenje vodljivosti i TDS-a te smanjenje pH porastom veličine čestica. Ispitivanjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom i sadržaja ukupnih polifenola utvrđeno je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta povećanjem veličine čestica.
6. S obzirom da rezultati dobiveni ABTS metodom ne prate trendove rasta ukupnih polifenola, može se zaključiti kako to i nije najprikladnija metoda za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata istraživanih biljaka.

7. Provedbom PCA analize utvrđeno je dobro razdvajanje ekstrakata prema veličini čestica za kadulju, melisu i mentu, dok uzorci ekstrakata lavande i majčine dušice nisu pokazali dobro razdvajanje.
8. Primjenom PLS modela utvrđeno je da postoji linearna zavisnost prema veličini čestica kod uzoraka majčine dušice, melise, mente i kadulje, dok za lavandu ista nije utvrđena. Također se može zaključiti kako se prema dobivenom PLS modelu za uzorke majčine dušice podaci mogu kalibrirati, no model se ne može koristiti kod buduće predikcije.

6. LITERATURA

1. Ab Rahman, N.N., Al-Rawi, S.S., Ibrahim, A.H., Ben Nama, M.M., Ab Kadir, M.O. (2012) Supercritical carbon dioxide extraction of the residual oil from palm kernel cake. *Journal of Food Engineering*. **108**, 166–170.
2. Abdi, H. (2010) Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley interdisciplinary reviews: Computational statistics*. **2**, 97-106.
3. Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal Component Analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. **2**, 433-459.
4. Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2003) Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 7825–7834.
5. Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M. (2003) *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. **28**, 53–59.
6. Al-Rawi, S.S., Ibrahim, A.H., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., Kadir, M.O.A. (2013) Comparison of yields and quality of nutmeg butter obtained by extraction of nutmeg rind by soxhlet and supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). *Journal of food engineering*. **119**, 595-601.
7. Anklam, E., Berg, H., Mathiasson, L., Sharman, M., Ulberth, F. (1998) Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants*. **15**, 729–750.
8. Anonymous 1 (2017) Ljekovito bilje. <http://alternativa-zavas.com/index.php/tutorials/vodic/ljekovito-bilje>. Pristupljeno 13.11.2017
9. Anonymous 2 (2017) <<http://ljekovitolilje.weebly.com/menta-mentha-piperita.html>> [Pristupljeno 13](#). studenog 2017

10. Anonymous 3 (2017) <https://med.over.net/hr/clanek/majcina-dusica/> Pristupljeno 22. Studenog 2017
11. Anonymous 4 (2017) <http://ljekovitebiljke.blogspot.hr/2008/02/kadulja-salvia-officinalis.html> Pristupljeno 13. studenog 2017
12. Anonymous 5 (2017) < <https://www.radio-banovina.hr/lavanda-prirodni-lijek/>> Pristupljeno 13. Studenog 2017
13. Anonymous 6 (2017) < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Die_Zitronenmelisse,_Melissa_officinalis_01.jpg> Pristupljeno 22. Studenog 2017
14. Anwar, F., Jamil, A., Iqbal, S., Sheikh, M.A. (2006) Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. *Grasas Aceites Sevilla*. **57**, 189-197.
15. Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007) Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* **102**, 1233-1240.
16. Arnao, M.B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals:a practice case. *Tr. Food. Sc. Tehnol.* **11**,419–421.
17. Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. **89**, 27–36.
18. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*. **117**, 426-436.
19. Barbosa-Canovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Pablo, J. & Hong, Y. (2005). Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality, 1.izd., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

20. Bashi, D.S., Bazzaz, B.S.F., Sahebkar, A., Karimkhani, M.M., Ahmadi, A. (2012) Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* and *A. wilhelmsii*. *Pharmaceutical biology*. **50**, 1168-1176.
21. Bayliak, M.M., Burdyliuk, N.I., Lushchak, V.I. (2016) Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open life sci.* **11**, 298-307.
22. Bent, S. (2008) Herbal medicine in the united states: review of efficacy, safety, and regulation. *J. Gen. Intern. Med.* **23**, 854–859.
23. Bisset, N.G., Wichtl M. (1994) Herbal drugs and phytopharmaceuticals, 2.izd., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, str. 91-95.
24. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M.F. (2004) Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic acids. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5195-5200.
25. Brewer, L.R., Kubola, J., Siriamornpun, S., Herald, T.J., Shi, Y.C. (2014) Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. *Food Chemistry*. **152**, 483–490.
26. Budić-Leto, I., Gajdoš Kljusurić, J., Zdunić, G., Tomić-Potrebuješ, I., Banović, M., Kurtanjek, Ž., Lovrić, T. (2011) Usefulness of near infrared spectroscopy and chemometrics in screening of the quality of dessert wine Prošek. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 9-15.
27. Carnat., A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L. (1998) The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*. **72**, 301-305.
28. Cassady, B.A., Hollis, J.H., Fulford, A.D., Considine, R.V., Mattes, R.D. (2009) Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 794–800.

29. Chatha, S.A.S., Anwar, F., Manzoor, M., Bajwa, J.R.(2006) Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. *Grasas Aceites Sevilla*. **57**, 328-335.
30. Cvetković, A. (2017) Modeliranje i optimiranje fizikalno-kemijskih karakteristika i UV spektara vodenih ekstrakata lavande i melise. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
31. Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M. (2014) Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. **165**, 424-443.
32. Dadić, Ž. (2001). Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj. 1.izd., Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb.
33. D'Auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., Mazzanti, G. (2005) Antifungal activity of Lavandula angustifolia essential oil against Candida albicans yeast and mycelial form. *Medical Mycology*. **43**, 391–396.
34. del Valle, J. M., Uquiche, E. L. (2002) Particle size effects on supercritical CO₂ extraction of oil-containing seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **79**, 1261-1266.
35. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R. (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *American society for nutritional sciences*. **133**, 1286-90.
36. Duband, F., Carnat, A.P., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Clair, G., Lamaison, J.L., (1992) Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, Mentha piperita L. *Ann Pharm Fr* . **50**, 146–155.
37. Eltayeib, A. A., Hamade, H. (2014) Phytochemical and chemical composition of water extract of Hibiscus Sabdariffa (red karkade calyces) in North Kordofan state-Sudan. *Hypertension*. **2**, 4.
38. Farooqi, A.A., Sreeramu, B.S., Srinivasappa, K.N. (2005) Cultivation of Spice Crops, 3.izd., Universities Press India, Hyderabad.
39. Filip, R., Ferraro, G. E. (2003). Researching on new species of ‘Mate’: Ilex brevicuspis. *European Journal of Nutrition*. **42**, 50–54.

40. Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Chunm O.K. (2010) Comparison of ABTS/DPPH assays for the detection of antioxidant capacity in foods. *FASEB J.* **24**, 535-539.
41. Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M., Bauman, I. (2015) Classification and processing optimization of barley milk production using NIR spectroscopy, particle size, and total dissolved solids analysis. *J. Chem.* **201(5)**, 1-7.
42. Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, G., Mazzanti, G. (1999) Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica.* **65**, 700-703.
43. Gherman, C., Culea, M., Cozar, O. (2000) Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta.* **53**, 253–262.
44. Gião, M.S., Pereira, C.I., Fonseca, S.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2009) Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. *Food Chem.* **117** , 412-416.
45. Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemical.* **68**, 2831–46.
46. Havlikova, L., Mikova, K. (1985) Heat stability of anthocyanins. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **181**, 427-432.
47. Hemery, Y. M., Anson, N. M., Havenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., Rouau, X. (2010) Dry fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolics acids. *Food Research International.* **43**, 1429–1438.
48. Hernández Gómez A., He Y., García Pereira A. (2006) Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* **77**, 313–319.
49. Hernandez, Y., Lobo, M.G., Gonzalez, M. (2009) Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry.* **114**,734–741.
50. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food chemistry.* **98**, 136-148.

51. Hirato, T., Kishigami, I., Awakura, Y., Majima, H. (1991) Concentration of uranyl sulfate solution by an emulsion-type liquid membrane process. *Hydrometallurgy*. **26**, 19.
52. Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2007) Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1147—1149.
53. Huang, H., Yu H., Xu, H., Ying, Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J. Food Eng.*, **87**, 303–313.
54. Hudson R. (1996) The value of lavender for rest and activity in the elderly patient. *Complement Ther Med.* **4**, 52-57.
55. Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuglu, M., Baser, H. C. K., Demirci, F. (2002) Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 3943-3946.
56. Jakelić, M. (2016) Jednostavni i parcijalno-linearni regresijski modeli primjenjeni na različitim svojstvima vodenih biljnih ekstrakata. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
57. Jednačak, T., Novak, P. (2013): Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line. *Kem. Ind.* **62**, 71–80.
58. Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-422.
59. Kennedy, D.O. , Scholeya, A.B., Tildesleya, N.T.J., Perryb, E.K., Wesnes, K.A. (2002) Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **72**, 953 – 964.
60. King, J.W. (2000) Advances in critical fluid technology for food processing. *Food science and technology today*. **14**, 186-191.
61. Kolak, I., Šatović, Z., Rozić, I., Ivanković, M. (2002) Novi trendovi u proizvodnji ljekovitog i aromatičnog bilja. *Sjemenarstvo*. **19**, 2019-225.

62. Kosalec, I., Cvek, J., Tomić, S. (2009) Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arh Hig Rada Toksikol.* **60**, 485-501.
63. Kreis, P., Mosandl, A. (1994) Chiral compounds of essential oils. Part XVI. Enantioselective multidimensional gas chromatography in authenticity control of balm oil (*Melissa officinalis* L.). *Flavour and fragrance journal.* **9**, 249-256.
64. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006) Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* **96**, 254-260.
65. Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M., Goto, M., (2007) Supercritical CO₂ extraction of roship seed oil: fatty acids composition and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids* **41**, 421–428.
66. Maffei, M., Scannerini, S. (1992) Seasonal variations in fatty acids from non-polar lipids of developing peppermint leaves. *Phytochemistry.* **31**, 479–484.
67. Maksimović, S., Ivanović, J., Skala, D. (2012) Supercritical extraction of essential oil from mentha and mathematical modelling– the influence of plant particle size, *Procedia Eng.* **42**, 1767-1777.
68. Manzak, A., Sonmezoglu, M. (2010) Extraction of acetic acid from aqueous solutions by emulsion type liquid membranes using Alamine 300 as a carrier. *Indian journal of chemical technology.* **17**, 441-445.
69. Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* **31**, 694–698.
70. McKay, D., Blumberg, J. B. (2006) A Review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L). *Phytotherapy research.* **20**, 619-633.
71. Mhemdi, H., Rodier, E., Kechaou, N., Fages, J. (2011). A supercritical tuneable process for the selective extraction of fats and essential oil from coriander seeds. *Journal of Food Engineering,* **105**, 609–616.
72. Möckel, H.J., Welter, G., Melzer, H. (1987) Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area: I. Theoretical outlines and retention of various hydrocarbon classes. *Journal of Chromatography.* **388**, 255–266.

73. Moreno, E., Reza, J., Trejo, A. (2007) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*. **27**, 239–260.
74. Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica chimica acta*. **703**, 8-18.
75. Nicolai B. M, Beullens K., Bobelyn E., Peirs A., Saeys W., Theron K. I., Lammertyn J. (2007) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Tec.* **46**, 99-118
76. Noorhajati, H., Tanjung, M., Aminah, N.S., Suwandi, J.S.A. (2012) Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *International Journal of Basic & Applied Sciences*. **12**, 85-89.
77. Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D. (2006) Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *J. Chromatogr. A*. **1112**, 92-102.
78. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 3122–3128.
79. Pahlow, M. (1989) Velika knjiga ljekovitog bilja, 1.izd., Cankarjeva založba, Ljubljana.
80. Perry, R.H., Green, D.W., Maloney, J.O. (1984) Perry's Chemical Engineers' Handbook, 1.izd., McGraw-Hill, New York.
81. Perry, R.J., Hodges, J.R. (1999) Attention and executive deficit in Alzheimer's disease: A critical review. *Brain*, **122**, 383-404.
82. Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F. W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela Raventos, R., Buxaderas, S., Condina, C. (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **97**, 137-150.

83. Pićurić-Jovanović, K., Milovanović, M., Poludyonny, L.V. (1997) Chemical composition of essential oils of several wildgrowing species of *Mentha piperita* L. *Zbornik Radova Poljop Fak.* **42**, 243–248.
84. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry.* **85**, 267–273.
85. Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegger, E., Conte, L. S. (2002) Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **82**, 1645–1651.
86. Prakash, A. (2001) Antioxidant activity. *Med. Lab. Anal. Prog.* **19**, 1–6.
87. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agri. Food. Chem.* **53**, 4290–4302.
88. Raal, A., Paaver, U., Arak, E., Orav, A. (2004) Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Medicina.* **40**, 795-800.
89. Rasooli, I., Mirmostafa, S.A. (2002) Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia.* **73**, 244-50.
90. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine,* **26**, 1231-1237.
91. Rehman, Z.U. (2006) Citrus peel extract- A natural source of antioxidant. *Food Chem.* **99**, 450-454.
92. Režan, A. (2017) Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u detekciji usitnjenosti ljekovitog bilja. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
93. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996) Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry.* **68**, 1033–1039.

94. Rogić, R. (2014) Antioksidacijska svojstva nekih biljnih svojiti s područja Blidnja (Bosna I Hercegovina). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet.
95. Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. R. (2010) ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **61**, 109–124
96. Schratz, E., Qédan, S. (1965) Die Zusammensetzung des ätherischen Öles in der Sammelart Thymus serpyllum. (Composition of the essential oil of Thymus serpyllum). *Pharmazie*. **20**, 710-803.
97. Shalaby, E. A., Shanab, S. M. M. (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of Spirulina platensis. *Indian journal of geo-marine sciences*. **42**, 556-564.
98. Siddhuraju, P., Becker, K. (2003) Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera lam.*) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2144-2155.
99. Smith, R. J., Winder, M. L. (1996) Medicinal garden. In: *The National Herb Garden Guidebook*, The Herb Society of America, Springfield.
100. Smith, R.M. (2003) Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography A*. **1000**, 3-27.
101. Snow, P., O'Dea, K. (1981) Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in food. *The american journal of clinical nutrition*. **34**, 2721-2727.
102. Srinivas, K., King, J.W., Howard, L.R., Monrad, J.K. (2010) Solubility of Gallic Acid, Catechin, and Protocatechuic Acid in Subcritical Water from (298.75 to 415.85) K. *J. Chem. Eng. Data*. **55**, 3101-3108.
103. Sun, T., Ho, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*. **90**, 743–749.
104. Supercritical carbon dioxide extraction of the residual oil from palm kernel cake. *Journal of Food Engineering*. **108**, 166–170.

105. Šilješ, I., Grozdanić, Đ., Grgesina, I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja. Školska knjiga i Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb.
106. Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B. (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene cooccurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J Chem Ecol* . **29**, 859-880.
107. Tirzitis, G., Bartosz, G. (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta biochimica polonica*. **57**, 139-142.
108. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, S.Y. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food chemistry*. **99**, 835-841.
109. Valinger, D., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I. (2017) Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *Journal on processing and energy in agriculture* **21**, 17-22.
110. Vankar, P.D. (2004) Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 30-42.
111. Wei, M.C., Yang, Y.C. (2014) Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. *Sep. Purif. Technol.* **130**, 182-192.
112. Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **58**, 109–130.
113. Wong, A.H.C., Smith, M., Boon, H.S. (1998) Herbal remedies in psychiatric practice. *Archives of general psychiatry*. **155**, 1033 – 44.
114. Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S. (2011) Biosynthesis and Therapeutic Properties of *Lavandula* Essential Oil Constituents. *Planta Medica*. **77**, 7-15.
115. Yu, L.L. (2001) Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 3452–3456.

116. Zheng, W., Wang, S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* **49**: 5165– 5170.
117. Živko, T. (2012) Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.