

Optimiranje procesa ultrazvučne ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina metodom odzivnih površina

Stanić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:796561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Katarina Stanić

**OPTIMIRANJE PROCESA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE KARNOZINSKE
KISELINE IZ RUŽMARINA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

Diplomski rad

Osijek, rujan, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološke operacije
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij procesnog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Jedinичne operacije u procesnom inženjerstvu

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u ak. god. 2017./2018. održanoj 26. travnja 2018.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Pomoć pri izradi: Gordana Šelo, mag. ing.

Optimiranje procesa ultrazvučne ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina metodom odzivnih površina

Katarina Stanić, 356-DI

Sažetak: U radu je ispitivan utjecaj sastava otapala (volumni udio 96%-tnog etanola u vodenoj otopini etanola: 40-70-100 %, v/v), omjera kruto-tekuće (20-30-40 mL/g) i vremena ekstrakcije (10-20-30 minuta), te njihove interakcije na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina. Ekstrakcija je provedena na ultrazvučnoj kupelji. Metodom odzivnih površina određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije (otapalo: 100 % etanol, vrijeme: 10 minuta, omjer kruto-tekuće: 20 mL/g) i optimalni uvjeti za antioksidacijsku aktivnost (otapalo: 40 % etanol v/v, vrijeme: 10 minuta, omjer kruto-tekuće: 40 mL/g). Modelom predviđeni maksimalni prinos karnozinske kiseline iznosio je 26,52 mg/g_{s.t.}, a maksimalna antioksidacijska aktivnost iznosila je 0,19 mg_{inh.} DPPH/g_{s.t.}. Prinos karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina određen je HPLC metodom, a antioksidacijska aktivnost je određena spektrofotometrijskom metodom. Proces ekstrakcije karnozinske kiseline u navedenim uvjetima najbolje je opisivao linearni model ($R = 0,984$), a utjecaj uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina je najbolje opisivao kvadratni polinom ($R=0,977$).

Ključne riječi: ružmarin, karnozinska kiselina, ultrazvučna ekstrakcija, metoda odzivnih površina, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 63 stranica
15 slika
9 tablica
88 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. Marina Tišma	član
4.	izv. prof. dr. sc. Lidija Jakobek	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

graduate thesis

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of tehnological operations
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of process engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Unit operations in Process engineering

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VII held on April 26, 2018.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof.

Technical assistance: Gordana Šelo, mag. ing.

Optimization of ultrasound-assisted extraction of carnosic acid from rosemary using response surface methodology

Katarina Stanić, 356-DI

Summary: The effects of solvent composition (40-70-100 % v/v-96 % ethanol/water), solid-liquid ratio (L/S: 20-30-40 mL/g) and the extraction time (10-20-30 min) such as their interaction on extractability of carnosic acid (CA) from rosemary and on antioxidant activity (AA) of rosemary extracts were studied. The optimal conditions for the carnosic acid extraction and antioxidant activity of rosemary extracts were determined by response surface methodology (CA extraction: 100 % ethanol, 10 minutes, L/S: 20 mL/g; AA of rosemary extracts: 40 % v/v ethanol/water, 10 min, L/S: 40 mL/g). At this conditions the yield of carnosic acid was 26.52 mg/g_{db} and the maximum antioxidant activity was 0.19 mg_{inhib.DPPH}/g_{db}. The carnosic acid content was determined by HPLC method and antioxidant activity was determined by the spectrophotometric method. Solid-liquid extraction of carnosic acid was properly described by linear model ($R = 0.984$) and the impact of the extraction conditions on the antioxidant activity of rosemary extracts were properly described by quadratic model ($R = 0.977$).

Key words: rosemary, carnosic acid, ultrasound-assisted extraction, response surface methodology, antioxidant activity

Thesis contains: 63 pages
15 figures
9 tables
88 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|---------------------------------------|--------------|
| 1. | Mirela Planinić, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. | Ana Bucić-Kojić, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. | Marina Tišma PhD, associate prof. | member |
| 4. | Lidija Jakobek PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: September 27, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić na pruženoj prilici za izradu diplomskoga rada na temi koja me osobito zanimala. Hvala na prenesenom znanju i savjetima!

Zahvaljujem se svojim suradnicima u laboratoriju Gordani Šelo i Dariju Šibaliću. Hvala na pomoći, strpljivosti i mnogobrojnim korisnim savjetima koji su mi uistinu olakšali rad u labosu! Hvala na vremenu koje ste mi posvetili!

Zahvaljujem se svojoj obitelji, svojim roditeljima, sestri i braći što su mi bili podrška tijekom studiranja u Mostaru i Osijeku! Hvala što ste uvijek bili uz mene!

Zahvaljujem se svojim prijateljicama Mariji, Ivi, Marini, Andrei što su me bodrile tijekom svih godina učenja koje smo prošle zajedno neke od vas čak od osnovnoškolskih dana. Hvala vam što ste uljepšavale moje studentske dane i činile podnošljivim i one najteže svojim porukama, savjetima i molitvama osobito onda kad sam bila udaljena 380 km od svog rodnog grada. Hvala što ste zajedno sa mnom prebrodile dvije ipo godine studiranja u drugom gradu!

Hvala mojim cimericama Anamariji i Adeli što su mi uljepšale dane studiranja u Osijeku!

Nakraju, zahvaljujem se svim djelatnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku na savjetima, uputama i pomoći!

Sadržaj

1.UVOD	2
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. RUŽMARIN (Rosmarinus officinalis L.)	3
2.1.1. Nutritivni sastav	5
2.2. FENOLNI SPOJEVI.....	6
2.2.1. Karnozinska kiselina	7
2.2.2. Karnozinska kiselina kao antioksidans	9
2.2.3. Antimikrobna svojstva karnozinske kiseline	11
2.2.4. Primjena karnozinske kiseline u prehrambenoj industriji	11
2.2.5. Primjena karnozinske kiseline u drugim granama.....	12
2.3. EKSTRAKCIJA	13
2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće	14
2.3.2. Prijenos mase u procesu ekstrakcije kruto-tekuće	16
2.4. ULTRAZVUK	17
2.5. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI.....	18
2.5.1. Spektrofotometrijske metode	19
2.5.2. Kromatografske metode.....	20
2.6. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	23
2.6.1. Box-Behnken dizajn	26
3. EKPERIMENTALNI DIO	28
3.1. ZADATAK	28
3.2. MATERIJALI I METODE.....	28
3.2.1. Materijal.....	28
3.2.2. Priprema materijala.....	28
3.2.3. Određivanje suhe tvari	30

3.2.4. Preliminarno istraživanje	30
3.2.5. Kruto-tekuća ekstrakcija karnozinske kiseline iz ružmarina	31
3.2.6. Centrifugiranje	32
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima ružmarina	33
3.2.8. Određivanje koncentracije karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina.....	34
3.2.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina	36
4. REZULTATI.....	39
4.1. ODREĐIVANJE SUHE TVARI.....	39
4.2. KALIBRACIJSKA KRUVULJA ZA ODREĐIVANJE MASENE KONCENTRACIJE KARNOZINSKE KISELINE.....	39
4.3. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA KARNOZINSKE KISELINE U EKSTRAKTIMA RUŽMARINA.....	40
4.4. IZRAČUNAVANJE POSTOTKA INHIBICIJE DPPH RADIKALA U EKSTRAKTIMA RUŽMARINA.....	41
4.5. REZULTATI PRELIMINARNOG ISTRAŽIVANJA.....	41
4.6. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST KARNOZINSKE KISELINE IZ RUŽMARINA TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA.....	42
4.6.1. Modeliranje procesa ekstrakcije karnozinske kiseline	44
4.6.2. Optimiranje procesa ekstrakcije karnozinske kiseline.....	48
4.6.3. Provjera uspješnosti optimiranja ekstrakcije	49
5. RASPRAVA	49
6. ZAKLJUČCI	54
7. LITERATURA.....	56

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

A – apsorbancija

A_{eks} – apsorbancija ekstrakta

$\bar{A}$ – površina granice kruto - tekuće [m^2]

AA – antioksidacijska aktivnost [$\text{g}_{\text{inhib. DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

c_m – masena koncentracija [kg/m^3]/[kmol/m^3]

c – masena koncentracija karnozinske kiseline u ekstraktu [mg/mL]

c' – masena koncentracija otopine u glavnoj masi otopine [kg/m^3]

c_a – množinska koncentracija tvari [mol/m^3]

c_s – masena koncentracija zasićene otopine u graničnom sloju [kg/m^3]

C – maseni udio karnozinske kiseline u ekstraktu [$\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

D – koeficijent difuzije [m^2/s]

k – broj varijabli

k_t – koeficijent prijenosa tvari (koeficijent difuzije, koeficijent ekstrakcije) [m/s]

l – dužina optičkog puta [m]

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

L/S – omjer kruto-tekuće

m_{uz} – masa uzorka [g]

m/t – masa otopljene tvari prenesene u jedinici vremena (brzina prijenosa mase) [kg/s]

N – brzina prijenosa mase [kg/s]/[kmol/s]

p – razina signifikantnosti

R' – omjer kruto-tekuće [mL/g]

R – koeficijent korelacije

t – vrijeme ekstrakcije [min]

V_e – ukupni volumen dobivenog ekstrakta [mL]

$w_{\text{s.t.}}$ – udio suhe tvari u uzorku (%)

x – dužina puta difuzije [m]

$x_{i,j}$ – ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

x_1 – ispitivani volumni udio etanola u vodenoj otopini [% v/v]

x_2 – ispitivano vrijeme ekstrakcije [t]

x_3 – ispitivani omjer kruto-tekuće [mL/g]

Y – modelom predviđeni maseni udio karnozinske kiseline [$\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$]

Y' – modelom predviđena funkcija

KRATICE

db – suha tvar

df – stupnjevi slobode

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

F vrijednost – faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge

GLC – plinsko-tekućinska kromatografija

GSC – kromatografija kruto-plinovito

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

inhib. DPPH – inhibirana DPPH

LLC – kromatografija tekuće-tekuće

LSC – kromatografija kruto-tekuće

MS – varijanca – prosječno odstupanje varijanata od prosječne vrijednosti uzorka

^{ns} – nesignifikantno

s.t. – suha tvar

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti

SIMBOLI

ε - koeficijent molarne apsorbancije (ekstinkcije)

φ - volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [% , v/v]

1.UVOD

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je dobro rasprostranjena, grmolika zimzelena višegodišnja biljka. Rabi se svjež, osušen ili u obliku ekstrakta. Ružmarin je veoma bogat prirodni izvor bioaktivnih komponenti među kojima se posebno ističu fenolni spojevi karnozinska kiselina, ružmarinska kiselina i karnosol. Karnozinska kiselina pokazuje snažnu antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost zbog čega predstavlja predmet interesa u medicini i prehrambenoj industriji (Birtić i sur., 2015).

Kako bi se karnozinska kiselina i drugi fenolni aktivni spojevi sadržani u ružmarinu najbolje iskoristili potrebno je pravilno provesti njihovu izolaciju. Fenolni spojevi se iz biljnog materijala najčešće izoliraju procesom kruto-tekuće ekstrakcije ili ekstrakcije otapalom. Fenolne tvari i biljni materijali se strukturno uvelike razlikuju i ne postoji univerzalna metoda za ekstrakciju fenolnih tvari iz biljnog materijala (Naczki i Shadidi, 2006). Karnozinska kiselina se iz biljnog materijala uglavnom izolira na dva načina. Prvi način provođenja izolacije je ekstrakcija otapalom tj. kruto-tekućom ekstrakcijom uz primjenu različitih otapala kao što su etanol, aceton ili pak etanol u kombinaciji sa heksanom. Poznato je da ekstraktibilnost kod kruto-tekuće ekstrakcije ovisi o čitavom nizu procesnih uvjeta kao što su način pripreme materijala, temperaturi ekstrakcije, vremenu ekstrakcije, omjeru kruto tekuće i dr. (Tsao i Deng, 2004). Drugi i u novije vrijeme najčešće korišten način izolacije karnozinske kiseline je putem superkritične CO₂ ekstrakcije (Birtić i sur., 2015). U ovome radu primjenjivan je postupak kruto-tekuće ekstrakcije karnozinske kiseline potpomognute ultrazvukom uz primjenu vodene otopine etanola kao otapala.

Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije (koncentracija otapala tj. etanola, vrijeme ekstrakcije i omjer kruto-tekuće) na sadržaj karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata te određivanje optimalnih uvjeta procesa ekstrakcije metodom odzivnih površina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RUŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je aromatična biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*. Ostali nazivi biljke su rozmarin, rusmarin, lužmarin, žmurod, ruzman, rožmarin i zimorad.

Prije dvije tisuće godina ružmarin je donesen u Europu, najprije u Veliku Britaniju, Grčku i Italiju gdje je tada bilo uvriježeno mišljenje da pomaže poboljšanju pamćenja. Danas je ružmarin kultiviran diljem svijeta (Europa, Azija, Afrika) i ponajviše je poznat kao vrtna biljka zbog svog veoma ugodnog mirisa (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

Naziv ružmarin izveden je iz latinskih riječi *ros-rosis* (rosa) i *marinus* (more) što bi u prijevodu značilo morska rosa. Pored *R. officinalis*, koji se još naziva i vrtnim ružmarinom te koji je ujedno i najrasprostranjeniji, postoje i druge vrste ružmarina: *Rosmarinus eriocalyx*, *Rosmarinus tomentosus*, *Rosmarinus lavandulaceus* i *Rosmarinus laxiflorus*. Postoji više od 20 različitih kultivara *Rosmarinus officinalis*-a koji se razlikuju na osnovu morfoloških obilježja (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

R. officinalis je kseromorfna vrsta koja prirodno obitava na pjeskovitom ili kamenitom tlu bogatom kalcijem, raste na stijenama najčešće u blizini mora. Pogoduje mu suha klima i slani zrak. *R. officinalis* je zimzelena višegodišnja biljka koja raste u obliku grma dosežući i do 2 m visine. Listovi su igličasi, kožasti, linearni i aromatični sa istaknutim srednjim rebrom. Gornja strana lista je tamnozelene, a donja strana sive boje. Listovi su dužine od 1-2,5 cm i do 4 cm široki, te postižu debljinu od 1-3 mm. Cvjetovi ružmarina su maleni, svijetloplave ili lila boje. Listovi i cvjetovi imaju snažan karakterističan miris zahvaljujući eteričnim uljima akumuliranim u trihomima (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

Koristi se već tisućama godina u kulinarstvu, te u medicinske svrhe. Rabi se kao svjež, osušen ili obliku ekstrakta. U kuhinji ima primjenu u obliku svježih i osušenih usitnjenih listova. Ima gorak opor okus i aromatičan je. Osobito je česta njegova upotreba u tradicionalnoj mediteranskoj kuhinji. Dodaje se u kuhanu ribu, svinjetinu, meso peradi, kobasice, juhe, variva, preljeve i džemove. Poznat je kao izvrstan prirodni konzervans zbog svojih izraženih

antioksidacijskih i antimikrobnih aktivnosti. Te aktivnosti posjeduje zahvaljujući prisutnosti fenolnih spojeva uglavnom ružmarinske kiseline te fenolnih diterpena kao što su karnozinska kiselina i karnosol. Ekstrakt ružmarina je učinkovit prirodni konzervans koji se koristi u stabilizaciji suncokretovog ulja (Birtić i sur., 2015).

Ružmarin se od davnina koristi i u narodnoj medicini. Nadzemni dijelovi ružmarina se uglavnom unose oralno te koriste kod upala, glavobolje, boli u trbuhu, artritisa, gihta, a poznato je i da se ružmarin primjenjuje i kao anelgetik, diuretik, antireumatik, antidepresiv i kao pomoć pri zarastanju rana. Čitava biljka u obliku infuzije, ekstrakta (za vanjsku primjenu) i dekokta se koristi u suzbijanju probavnih smetnji, respiratornih bolesti, bolesti srca, upala, vrtoglavice i za poboljšanje pamćenja (Ribeiro-Santos i sur., 2015).



Slika 1. Ružmarin u cvatu (listopad 2017.)



Slika 2. Grmoliki izgled biljke ružmarin (lipanj 2018.)

2.1.1. Nutritivni sastav

Variranje u sadržaju mikro i makronutrijenata uvelike je povezano sa vrstom ružmarina, uvjetima rasta biljke, vremenu berbe, karakteristikama tla, klimi, podrijetlu i geografskim značajkama podneblja. Nutrijenti, kao i spojevi koji su odgovorni za aromu i boju mogu biti degradirani uslijed povišenih temperatura te dugog trajanja procesa sušenja biljke (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

Aromatične biljke općenito su bogate proteinima, vlaknima, hlapljivim komponentama, vitaminima (A, C i B), mineralima (Ca, P, Na, K i Fe) te kemijskim spojevima za koje je poznato da imaju učinak sprečavanja nastanka pojedinih bolesti i poboljšavanja čovjekovog zdravlja (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

Aromatične biljke bogate su hlapljivim uljima koja im daju ugodne arome. Bitni spojevi zaslužni za aromu ružmarina su monoterpeni ugljikovodici, oksidirani monoterpeni, seskviterpenski ugljikovodici, oksidirani seskviterpeni, esteri, ketoni, fenoli, alkoholi i dr. Na varijabilnost ovih spojeva u biljnom materijalu utječe nekoliko faktora kao što su vrsta procesa ekstrakcije, vrsta ružmarina, geografsko podrijetlo biljke, vrijeme berbe, stadij razvoja biljke, starost biljke kao i dio biljke korišten kao sirovina. Veći sadržaj hlapljivih

komponenti pronađen je u listovima i cvjetovima nego u stabljikama (Ribeiro-Santos i sur., 2015).

Tablica 1. Nutritivni sastav ružmarina (Birtić i sur., 2015)

Komponenta	Mjerna jedinica	Svježi ružmarin		Suhi ružmarin	
Energetska vrijednost	kcal	131	96	331	331
Voda	g/100g	67,7	73,6	9,31	9,3
Proteini	g/100g	3,31	1,4	4,88	4,9
Ukupni lipidi	g/100g	5,86	4,4	15,22	15,2
Ukupni ugljikohidrati	g/100g	20,7	-	64,06	-
Ukupna vlakna	g/100g	14,1	7,7	42,6	17,7
Masne kiseline					
Ukupne zasićene	g/100g	2,84	1,14	7,371	3,94
Ukupne mononezasićene	g/100g	1,16	0,29	3,014	0,99
Ukupne polinezasićene	g/100g	0,90	2,25	2,339	7,76
Vitamini					
Ukupna askorbinska kiselina	mg/100g	21,8	29	61,2	0,00
Tiamin	mg/100g	0,036	0,10	0,514	0,10
Riboflavin	mg/100g	0,152	0,21	0,428	0,32
Niacin	mg/100g	0,912	1,0	1,0	1,0
Vitamin B ₆	mg/100g	0,336	0,09	0,09	1,740
Vitamin E	mg/100g	-	1,50	1,50	-
Folna kiselina	μg/100g	109	0,00	0,00	307
Vitamin B ₁₂	μg/100g	0,00	-	-	0,00
Vitamin A	μg/100g	146	92	92	156
Vitamin D (D ₂ +D ₃)	μg/100g	0,00	0,00	0,00	0,00
Izvori		USDA	BDA	USDA	BDA

USDA – United States Department of Agriculture; BDA – Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici

Na kemijski sastav ružmarina utječe i sam način skladištenja (skladištenje u svježem, sušenom ili zamrznutom obliku), metoda sušenja i vrsta otapala korištenog u procesu ekstrakcije.

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenoli su najraširenija skupina spojeva u biljnom svijetu. Spadaju u skupinu sekundarnih biljnih metabolita. Primarni biljni metaboliti su neophodni za život i razvoj stanice, dok sekundarni metaboliti izravno sudjeluju u fotosintezi i metabolizmu disanja, te su nužni za preživljavanje biljke u okolišu. Sekundarni metaboliti su zaslužni za blagotvoran i pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi stoga ih se često naziva i bioaktivnim komponentama. Sekundarni metaboliti se dijele na polifenole, spojeve sa sumporom, terpene i alkaloide.

Polifenoli ili fenolni spojevi se dijele na flavonoide i neflavonoide. U flavonoide se ubrajaju flavonoli, antocijani, flavoni, flavaoni, izoflavoni i flavan-3-oli. U neflavonoide se ubrajaju fenolne kiseline, stilbeni i hidroksicinamati (Lovrić, 2014).

Fenoli spojevi u svojoj kemijskoj strukturi posjeduju jedan ili više aromatskih prstena na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina. Poznato je oko 8000 struktura fenolnih spojeva. Nalaze se u vakuolama biljnih stanica gdje se uglavnom javljaju kao glikozidi topljivi u vodi. Dokazano je da snižavaju tlak, smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, sprečavaju promjene uzrokovane oksidacijom, zaslužne su smanjenje stanica tumora i ujedno sprečavaju njihov rast (Erjavec, 2017).

Fenolni spojevi štite biljku od UV zračenja, služe kao signalni spojevi, kao biljni pigmenti i imaju zaštitnu ulogu (antifungalno djelovanje i inducirana otpornost prema bolestima). Biosintetski put fenolnih spojeva u biljci uključuje puteve šikiminske kiseline, fenil propanoida i flavonoida (Lovrić, 2014).

Od fenolnih spojeva ružmarin je bogat fenolnim kiselinama (vanilinska, ružmarinska, ferulinska, kafeinska i dr.), fenolnim diterpenima (karnozinska kiselina, karnosol, rosmadial, rosmanol i dr.) i flavonoidima (apigenin, genkvanin, cisimaritin, hesperitin i dr.).

2.2.1. Karnozinska kiselina

Karnozinsku kiselinu prvi je otkrio znanstvenik Linde 1964. godine u kadulji (*Salvia officinalis* L.). Wenkert sa suradnicima (1965.) je identificirao karnozinsku kiselinu u znatno većoj količini u ružmarinu (*Rosmarinus officinalis* L.). Karnozinska kiselina je također pronađena u drugim vrstama kadulje i u drugim rodovima porodice *Lamiaceae* (Luis, 1991).

Karnozinska kiselina je fenolni diterpen sa formulom $C_{20}H_{28}O_4$. Pojedini ju ubrajaju terpene, a drugi pak u polifenole zbog toga što posjeduje fenolnu skupinu. Terpeni su najveća skupina sekundarnih biljnih metabolita koja broji preko 50 000 spojeva. Po svojem biosintetskom putu, smještaju unutar stanice, topivosti i ulozi u biljci karnozinska kiselina je najbližnja tokoferolima i karotenoidima (Birtić i sur., 2015).

Karnozinska kiselina je identificirana u svega nekoliko vrsta, a koje sve pripadaju porodici *Lamiaceae*. *Rosmarinus officinalis* L. smatra se najbogatijim izvorom karnozinske kiseline, a

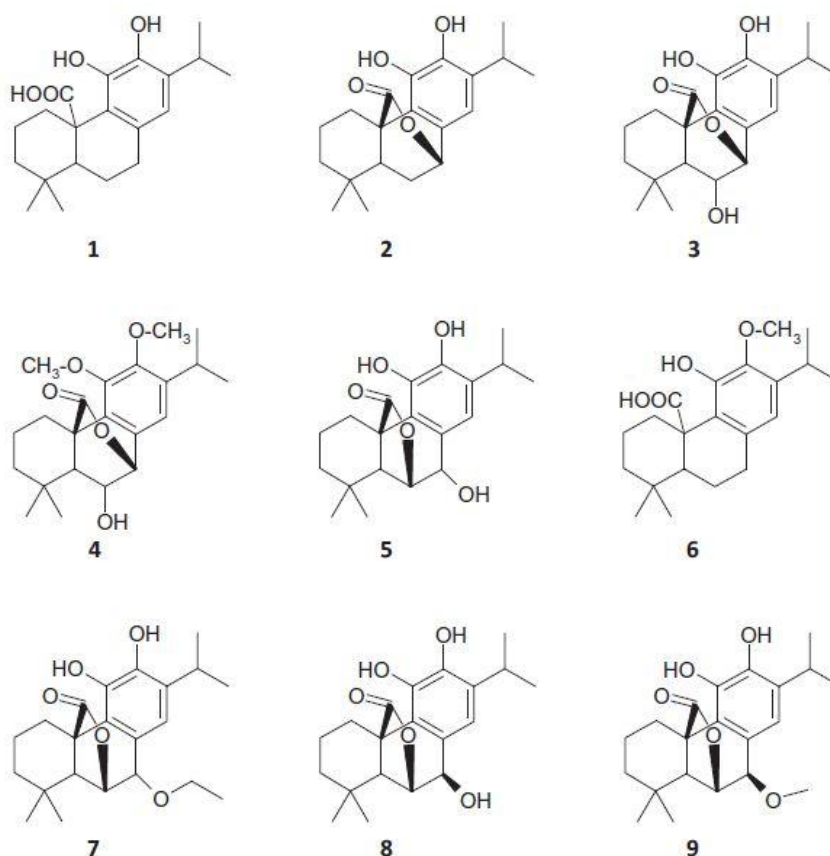
slijede ga različite vrste kadulje. Istraživanja na kadulji pokazala su da 50 od 62 ispitane vrste kadulje sadržavale su karnozinsku kiselinu u koncentraciji od 0.1-21.8 mg/g (Abreu i sur., 2008) dok su određene duplo više koncentracije karnozinske kiseline (3-50 mg/g) u ružmarinu (Richheimer i sur., 1996.; Schwarz i Ternes, 1992; Wenkert i sur., 1965).

Biosintetski put karnozinske kiseline još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da se biosinteza odvija po biogenetskom izoprenskom pravilu (Ružička, 1953).

Karnozinska kiselina nije podjednako raspoređena u biljci, te je najviše prisutna u nadzemnim dijelovima biljke. U ružmarinu je pronađena u fotosintetskim tkivima: listovima, listićima čašice i laticama. Najviše je prisutna u listovima (del Bano i sur., 2003; Luis i Johnson, 2005). Unutar stanice prisutna je u plastidima. Istraživanja koja su proveli Munne-Bosch i Alegre (2001) dovela su do zaključka da je 6 puta više karnozinske kiseline smješteno u kloroplastima lista ružmarina nego li u čitavom listu ružmarina. Karnozinska kiselina nije pronađena u endoplazmatkom retikulumu, Golgijevom aparatu niti u plazminoj membrani (Munne-Bosch i Alegre, 2001).

Okolišni uvjeti imaju velik utjecaj na sadržaj karnozinske kiseline u biljci. Njena koncentracija se smanjuje povišenjem temperature i smanjenjem sadržaja vode u biljci (Munne-Bosch i Alegre, 2000; 2003). Engleska klima pogoduje sintezi karnozinske kiseline više nego topla, suha mediteranska klima gdje ružmarin obično i raste. Ružmarin podvrgnut većem stupnju UV-B zračenja posjeduje veći sadržaj karnozinske kiseline nego biljke ružmarina koje nisu tretirane na isti način. Nadalje slanoća, intenzivna svjetlost te toplinski stres negativno utječu na sadržaj karnozinske kiseline u biljci. Stresni uvjeti promatrani zasebno utječu na smanjenje koncentracije karnozinske kiseline no kada se biljka njima podvrgne u isto vrijeme istodobno utječu na povećanje koncentracije karnozinske kiseline (Tounekti i Munne-Bosch, 2012). Sadržaj karnozinske kiseline značajno opada starenjem listova ružmarina (Bruckner i sur., 2014).

Fenolni diterpeni po strukturi slični karnozinskoj kiselini su karnosol, rosmanol i rosmaridifenol koji su ujedno i osnovni produkti razgradnje karnozinske kiseline. Svi navedeni spojevi uspješno su izolirani iz različitih vrsta kadulje i ružmarina (Brieskorn i sur., 1964).



Slika 3. Kemijska struktura karnozinske kiseline (1) i fenolnih diterpena sličnih karnozinskoj kiselini: karnosol (2), izorosmanol (3), 11,12-di-O-metilisorosmanol (4), rosmanol (5), 12-O-metilkarnosinska kiselina (6), rosmanol-9-etil eter (7), epirosmanol (8), 7-metil-epirosmanol (9) (Birtić i sur., 2015)

2.2.2. Karnozinska kiselina kao antioksidans

Karnozinska kiselina je najzastupljeniji lipofilni antioksidans u listovima ružmarina (Birtić i sur., 2015).

Smatra se da karnozinska kiselina hvata slobodne radikale po principu drugih antioksidansa kao što je primjerice α -tokoferol. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala zahvaljuje prisutnosti dviju *O*-fenolnih hidroksilnih skupina koje su vezane na C₁₁ i C₁₂ atomu (Richhelmer i sur., 1999).

Karnozinska kiselina i α -tokoferol pokazuju različitu sposobnost antioksidacije u različitim uvjetima. Sposobnost antioksidacije ovih dvaju molekula ovisi i lipidnom sastavu matriksa u

kojeg su uklopljene te o uvjetima oksidacije. U emulzijama pri 37 °C α -tokoferol bolje štiti lipide od oksidacije nego karnozinska kiselina. Pri višim temperaturama (60°C) α -tokoferol nije efikasan u zaštiti lipida od oksidacije kao karnozinska kiselina (Huang i sur., 1996). Pri višim temperaturama karnozinska kiselina u biljci se troši brže nego α -tokoferol što upućuje na to da su produkti oksidacije karnozinske kiseline ti koji u konačnici doprinose većoj antioksidacijskoj aktivnosti (Schwarz i sur., 2000).

Uzimajući u obzir smještaj karnozinske kiseline u tkivu, smatra se da karnozinska kiselina ima ulogu zaštite kloroplasta i membrana organela od oksidacijskog stresa (Birtić i sur., 2015). Kadulja i ružmarin rastu u veoma sunčanim područjima te njihova fotosintetska tkiva trpe od fotooksidacije (Munne-Bosch i Alegre, 2001). Karotenoidi i tokoferoli veoma učinkovito štite fotosintetske lipide od fotooksidacije budući da imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Fukuzawa i sur., 1998). Ekstrakti ružmarina sadrže čitav niz spojeva, uključujući i karnozinsku kiselinu, koji imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala i O₂ no još uvijek nije poznato u kojoj mjeri karnozinska kiselina štiti lipide od slobodnih radikala (Birtić i sur., 2015). Biljne vrste koje sadrže karnozinsku kiselinu sadrže značajno manju količinu tokoferola. Smatra se da je to upravo stoga jer karnozinska kiselina preuzima njihovu antioksidacijsku ulogu (Penuelas i Munne-Bosch, 2005).

Dokazano je da karnozinska kiselina posjeduje veću antioksidacijsku aktivnost nego sintetski antioksidansi široke primjene butilirani hidroksitoluen (BHT) i butilirani hidroksianisol (BHA) u suncokretovom ulju i sojinom ulju (Cuvelier i sur., 1994; Luis i Johnson, 2005; Erkan i sur., 2009), te veću antioksidacijsku aktivnost od tokoferola u kukuruznom ulju (Cuvelier i sur., 1994; Hopia i sur., 1996; Huang i sur., 1996).

Istraživanjem je utvrđeno da je karnozinska kiselina u kombinaciji sa ostalim spojevima prisutnim u ekstraktu ružmarina veoma učinkovita u hvatanju slobodnih radikala (Wada i sur., 2004).

2.2.3. Antimikrobna svojstva karnozinske kiseline

Ekstrakti ružmarina bogati karnozinskom kiselinom pokazali su svojstvo antimikrobne aktivnosti. Provedena su istraživanja na različitim patogenima kako bi se ustanovilo koji je kemijski spoj unutar ekstrakta ružmarina odgovoran za antimikrobnu aktivnost (Campo i Amiot, 2000).

Antimikrobna aktivnost karnozinske kiseline ispitivana je na način da su upotrijebljena dva ekstrakta ružmarina od kojih je jedan sadržavao 20 %, a drugi 40 % karnozinske kiseline. Oba ekstrakta su pokazala antimikrobnu aktivnost, ali u većoj mjeri onaj koji je sadržavao veću količinu karnozinske kiseline (Romano i sur., 2009). Karnozinska kiselina posjeduje najveću antimikrobnu aktivnost u usporedbi s ostalim polifenolima prisutnim u ružmarinu. Prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti 8 glavnih fenola u ružmarinu karnozinska kiselina je pokazala najveću antimikrobnu aktivnost. Testiranje je provedeno na 24h pri temperaturi 30 °C nakon inokulacije (Campo i sur., 2003). Karnozinska kiselina je pokazala snažan antimikrobni utjecaj na gram pozitivne bakterije *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*, također i na gram negativne bakterije kao što su *Escherichia*, *Salmonella* i *Campylobacter* (Horiuchi i sur., 2007; Bernandes i sur., 2010).

Mehanizam djelovanja antimikrobne aktivnosti fenolnih diterpena još uvijek nije objašnjen, a jedno od predloženih rješenja je da lipofilna struktura ovih spojeva omogućava njihovo umetanje u membrane bakterija (Cowan, 1999) prilikom čega skupine donori vodika fenolnih diterpena ulaze u interakciju sa fosforiliranim skupinama unutar bakterijskih membrana (Souza i sur., 2011). Drugo predloženo objašnjenje je da karnozinska kiselina djeluje kao modulator otpuštanja etidij bromida koji je odgovoran za permeabilnost membrane (Ojeda-Sana i sur., 2013).

2.2.4. Primjena karnozinske kiseline u prehrambenoj industriji

Ekstrakti ružmarina se koriste kao antioksidansi u prehrambenoj industriji preko 20 godina. Prvi ekstrakti ružmarina su korišteni u svrhu poboljšanja okusa hrane, ali i u svrhu konzerviranja hrane. Deodorirani ekstrakti ružmarina sa točno određenim sadržajem karnozinske kiseline su postali uvelike dostupni od 1990., te su korišteni kako bi se različite

matrice hrane zaštitile od procesa oksidacije (Birtić i sur., 2015). Kao priznanje za njihovu učinkovitost i na zahtjev prehrambene industrije 2010. godine su ekstrakti ružmarina uvršteni na listu prehrambenih aditiva od strane Europske komisije i dodijeljena im je oznaka E392 (Commission Directives 2010/67/EU i 2010/69/EU).

Antioksidans-ekstrakt ružmarina se proizvodi jednim od četiri načina provođenja procesa ekstrakcije: putem ekstrakcije otapalom (otapala: etanol, aceton, etanol u kombinaciji sa heksanom) ili putem superkritične CO₂ ekstrakcije pritom zadovoljavajući propisane kriterije čistoće (Birtić i sur., 2015).

Prema EU propisima samo deodorirani ekstrakti ružmarina koji sadrže karnozinsku kiselinu i karnosol se smatraju aditivima. Karnozinska kiselina i njezin derivat karnosol su navedeni kao ključne antioksidativne komponente prisutne u ekstraktu ružmarina i granice doziranja aditiva E392 su izražene kao koncentracije karnozinske kiseline i karnosola. Primjenjuju se u matricama hrane uključujući ulja, životinjske masti, meso, riblje proizvode, umake, pekarske proizvode i sl. (Birtić i sur., 2015).

Pojedini tipovi nedeodoriranih ekstrakata ružmarina, primjerice eterično ulje ružmarina, se i dalje koriste u prehrambenoj industriji no samo u svrhu začinjavanja (Birtić i sur., 2015).

Europska Unija nije jedina koja je odobrila primjenu ekstrakata ružmarina kao prehrambenih aditiva. U Japanu se ekstrakti ružmarina nalaze pod brojem 365 na „Listi postojećih aditiva“. U Kini je također odobrena upotreba ekstrakata ružmarina kao aditiva. U većini drugih zemalja, uključujući i SAD ekstrakti ružmarina još uvijek nemaju službeni status prehrambenog aditiva (Birtić i sur., 2015).

2.2.5. Primjena karnozinske kiseline u drugim granama

Karnozinska kiselina ima fotozaštitnu funkciju protiv UVA oksidacije dermalnih fibroblasta što bi moglo učiniti karnozinsku kiselinu sastavnim dijelom proizvoda za tretiranje kože (Offord i sur., 2002).

Karnozinskoj kiselini ekstrahiranoj iz ružmarina, ali i iz kadulje, su pripisana antikancerogena svojstva (Barni i sur., 2012; Costa i sur., 2007; Dickmann i sur., 2012; Einbond i sur., 2012; Lee i sur., 2007). Biljni ekstrakti koji sadrže karnozinsku kiselinu su se pokazali kao

antikarcinogeni zbog svojih proapoptotskih (Tsai i sur., 2011), antiproliferativnih (Kontogianni i sur., 2013), antiangiogeničnih (Lopez-Jimenez i sur., 2013), kemoprotektivnih (Costa i sur., 2007), antitumorskih (Aoyagi i sur., 2006; Sharabani i sur.; 2006) ili antitrombotskih svojstava.

Mnoga istraživanja koja su provedena pokazuju da biljni ekstrakti koji sadrže karnozinsku kiselinu posjeduju preventivna (Nabekura i sur., 2010; Ngo i sur., 2011) i inhibitorna svojstva (Barni i sur., 2012; Bauer i sur., 2012; Dickmann i sur., 2012) protiv tumora. Također je ustanovljeno da biljni ekstrakti sa karnozinskom kiselinu pokazuju antiupalna svojstva što ih čini primjenjivim u zdravstvu (Bauer i sur., 2012; Hadad i Levy, 2012; Kamatou i sur., 2009) i kozmetičkoj industriji (Oh i sur., 2012).

Biljni ekstrakti sa karnozinskom kiselinom pokazuju antiadipogena svojstva omogućavajući gubitak težine, te su se također pokazali učinkovitim u tretiranju hiperglikemije (Dickmann i sur., 2012; Ibarra i sur., 2011; Wang i sur., 2012).

Ekstrakti ružmarina koji sadrže karnozinsku kiselinu su pokazali da posjeduju potencijal sprečavanja starenja na način da sprečavaju oksidativne promjene lipida prisutnih u površinskom dijelu kože (Calabrese i sur., 2000; Kosaka, 2012).

Oralna zaštita je još jedan od načina primjena karnozinske kiseline. Studije su pokazale da je karnozinska kiselina veoma učinkovita protiv kariogenih mikroorganizama (Bernardes i sur., 2010).

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese primjenom odgovarajućeg otapala tj. otapala u kojem se tvar koja se ekstrahira veoma dobro otapa u odnosu na ostale sastojke smjese. Proces ekstrakcije temelji se na principu molekularne difuzije prilikom koje dolazi do izjednačavanja koncentracija tvari u sustavima koji su u kontaktu što je matematički opisano Fickovim zakonom:

$$N = - D \cdot \frac{dc_m}{dx} \quad (1)$$

gdje je:

N – brzina prijenosa mase [kg/s] ili [kmol/s]

c_m – masena koncentracija [kg/m³] ili [kmol/m³]

x – dužina puta difuzije [m]

D – koeficijent difuzije [m²/s]

Iz formule (1) je vidljivo da je količina prodifundirane tvari po jedinici površine i vremena proporcionalna koeficijentu difuzije te razlici koncentracija u graničnom sloju, a obrnuto proporcionalna dužini puta difuzije (Lovrić, 2003).

2.3.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Ekstrakcija kruto – tekuće označava proces izdvajanja neke željene tvari iz čvrste smjese pomoću otapala koje tvar otapa selektivno ili približno selektivno, a obuhvaća i sam proces pripreme sirovine, odvajanja ekstrakta nakon provedbe ekstrakcije a u nekim slučajevima i odvajanje topive tvari iz ekstrakta (Vilčić, 1980).

Proces kruto - tekuće ekstrakcije odvija se u tri koraka:

1. difuzija otapala u krutu tvar te otapanje topive tvari
2. difuzija otopljene tvari na površinu krute čestice
3. prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja u glavnu masu otopine (Coulson i sur., 1978).

Na proces kruto – tekuće ekstrakcije utječe nekoliko čimbenika kao što su veličina čestica, otapalo, temperatura, miješanje i materijal. U slučaju veličine čestica bitno je znati da manje čestice imaju veću ukupnu površinu što ujedno znači i veću kontaktnu površinu otapala i krute tvari, a što nakraju dovodi do brže provedbe procesa ekstrakcije budući da je brži prijenos mase i kraći put kojeg otopljena tvar prelazi kada izlazi iz krutine. Čestice trebaju biti određenog stupnja usitnjenosti te ne smiju biti veoma male jer tada dolazi do sljepljivanja čestica i degradacije spojeva prisutnih u krutom materijalu. Također usitnjavanje na čestice veoma male veličine zahtjeva veliki utrošak energije što proces čini neekonomičnim (Coulson i sur., 1978).

Otapalo je najbitniji čimbenik pri provedbi kruto – tekuće ekstrakcije. Poželjno je da bude što selektivnije za željenu tvar čija se ekstrakcije provodi kako bi se postigao što veći prinos. Otapalo treba imati malu viskoznost kako bi lakše prodiralo u krutu tvar (Spigno i sur., 2007). Osim toga otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ne smije imati preveliko vrelište kako bi ga se nakon provedbe ekstrakcije moglo lako odvojiti te treba biti nezapaljivo, neotrovno i jeftino. Najčešće korištena otpala su metanol, etanol, kloroform, dietil-eter i dr. Pravilnim odabirom otapala moguće je uvelike smanjiti interferencije ostalih tvari prisutnih u uzorku stoga je njegov pravilan odabir od presudne važnosti (Jerković i Radonić, 2009).

Porastom temperature raste brzina difuzije otapala u čvrstu tvar i učinkovitost ekstrakcije se u većini slučajeva povećava budući da se smanjuje viskoznost otapala, stanične membrane postaju propusnije, povećava se topivost tvari, raste koeficijent difuzije otopljenih tvari koji pridonosi povećanju brzine ekstrakcije (Coulson i sur., 1978). No utjecaj temperature se ipak ne može generalizirati budući da se mnoge aktivne komponente degradiraju povšenjem temperature. Utjecaj temperature na učinkovitost provedbe kruto – tekuće ekstrakcije ovisi i o svojstvima tvari koju se ekstrahira te o njihovoj kemijskoj strukturi (Stangler Herodež i sur., 2003).

Miješanje je odgovorno za povećanje turbulencije, a povećanjem turbulencije se povećava prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja u glavnu masu otapala čime je omogućena daljnja difuzija otopljene tvari kroz pore krute tvari na njezinu površinu, a također osigurava homogenost otopine i sprečava nastanak taloga (Coulson i sur., 1978).

Kada se govori o utjecaju materijala na odvijanje procesa kruto – tekuće ekstrakcije misli se na pripremu materijala i način njegova čuvanja. U slučaju prirodnih materijala potrebno je osigurati mjesto bez svjetlosti, kisika, visoke temperature tj. mračnu i hladnu prostoriju bez cirkulacije zraka jer su biljni materijali uglavnom osjetljivi na te čimbenike (Escribano – Bailon i Santos – Buelga, 2004).

2.3.2. Prijenos mase u procesu ekstrakcije kruto-tekuće

Budući da je nemoguće odrediti veličinu pora kroz koje se odvija prijenos tvari nemoguće je odrediti i brzinu prijenosa tvari kroz poroznu strukturu. Moguće je samo otprilike odrediti brzinu prijenosa mase sa površine čestica u otopinu. Za vrijeme kontakta krute i tekuće tvari odvija se prijenos mase otopljene tvari iz materijala u otapalo, sve do uspostave ravnotežne koncentracije, opisan sljedećim matematičkim izrazom:

$$\frac{dm}{dt} = k_t \cdot \bar{A} \cdot (c_s - c') \quad (2)$$

gdje je:

$\bar{A}$ – površina granice kruto – tekuće [m^2]

c' - masena koncentracija otopine u glavnoj masi otopine [kg/m^3]

c_s - masena koncentracija zasićene otopine u graničnom sloju [kg/m^3]

m/t – masa otopljene tvari prenesene u jedinici vremena (brzina prijenosa mase) [kg/s]

k_t – koeficijent prijenosa tvari (koeficijent difuzije, koeficijent ekstrakcije) [m/s]

Iz formule (2) je vidljivo da je količina topljivog materijala koja u jedinici vremena prelazi iz graničnog sloja u tekućinu proporcionalna veličini dodirne plohe, razlici masene koncentracije otopine u graničnom sloju i masene koncentracije otopine u glavnoj masi otopine i koeficijentu prijenosa tvari kojeg je moguće povećati povišenjem temperature te usitnjavanjem materijala. Kada je otopina zasićena tj. kada je postignuto da je $c_s - c' = 0$ otapanje prestaje bez obzira na to koliko velika bila dodirna površina granice kruto – tekuće (Tomas, 1997).

2.4. ULTRAZVUK

Ultrazvuk je zvučni val koji obuhvaća zvučni spektar od 20 kHz do 100 MHz te se nalazi iznad područja čujnosti ljudskog uha (Juretić, 2007). Svaki zvučni val je određen svojom amplitudom, frekvencijom, valnom duljinom i koeficijentom prigušenja. Glavni uzorci pojave prigušenja su adsorpcija i raspršivanje (Režek Jambrak i sur., 2010).

Razlikuju se ultrazvuk niske snage i visoke frekvencije (intenzitet manji od 1 W/cm^2 , frekvencije više od 100 kHz) i visoke snage i niske frekvencije (intenzitet veći od 1 W/cm^2 , frekvencije 18 – 100 kHz). Ultrazvuk niske snage ima primjenu u površinskom čišćenju hrane, ekstrakciji, kristalizaciji, emulgiranju, te operaciji sušenja, smrzavanja i omekšavanja mesa.

Princip rada ultrazvuka velike snage se zasniva na pretvorbi električne energije u ultrazvuk velike snage i visokih amplituda. Na generatoru visoke frekvencije (HF – generator) vrši se pretvorba frekvencije električne energije (50/60 Hz) u visoku frekvenciju (20 kHz). Generator visoke frekvencije je povezan sa ultrazvučnim pretvaračem na kojem se električna energija visoke frekvencije prevodi u ultrazvuk. Ovakvi elektroakustični sustavi su uglavnom piezoelektrični. U promjenjivom električnom polju dolazi do širenja i kontrakcije piezoelektričnih kristala. Polarizirane molekule se privlače uslijed čega nastaju mehaničke vibracije koje se po potrebi mogu pojačavati na pojačalu, a ultrazvučni valovi se sandom emitiraju u medij. Ultrazvuk visoke snage i niske frekvencije je pronašao primjenu u emulgiranju, sterilizaciji, ekstrakciji, odzračivanju, filtriranju, sušenju, pojačanju oksidacije, a veoma je značajno i to da može uzrokovati fizičke promjene na biološkom materijali te pojavu kavitacije na kojoj se i temelji princip razbijanja stanične stjenke materijala (Režek Jambrak i sur., 2010).

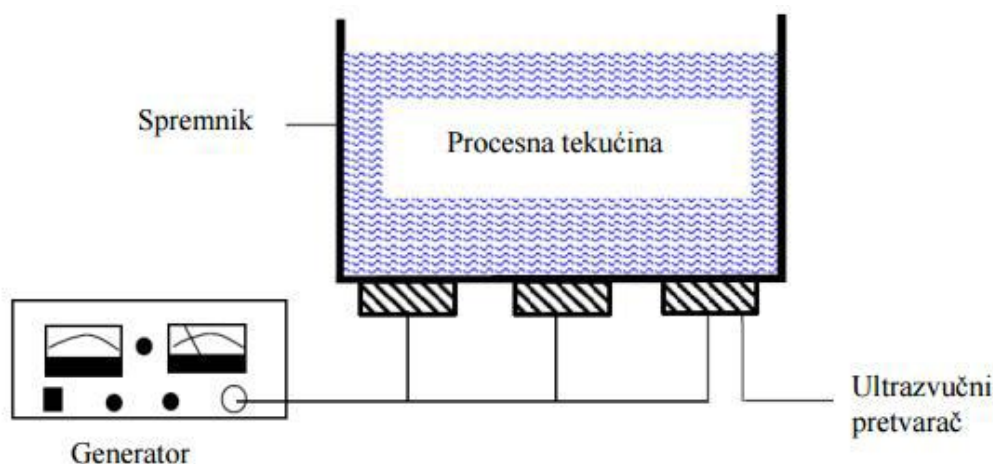
Kavitacija podrazumjeva nastajanje, rast i raspad malih mjehurića uslijed fluktuacije tlaka. Do fluktuacije dolazi kada val prolazi kroz suspenziju prilikom čega nastaju područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, a kao posljedica čega nastaju mjehurići plina koji rastu uslijed ekspanzije. Ukoliko energija ultrazvuka nije dovoljno velika da zadrži plinsku fazu unutar mjehurića, mjehurić postiže svoju maksimalnu veličinu, a potom dolazi do kondenzacije. Uslijed kondenzacije molekule se sudaraju i nastaju udarni valovi koji imaju

veliku energiju koja može dovesti i do dezintegracije stanične stijenke. Kako bi se postigla dezintegracija stanične stijenke suspenziju je potrebno neko određeno vrijeme tretirati ultrazvukom (Režek Jambrak i sur., 2010).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ili ultrazvučna ekstrakcija je učinkovitija od većine klasičnih metoda ekstrakcije. Ovim tipom ekstrakcije postiže se bolji kontakt između otapala i čvrste tvari. Uslijed kavitacije nastaju različite fizičke i kemijske promjene u mediju. Ultrazvuk mehanički djeluje na staničnu stjenku te joj smanjuje čvrstinu, dovodi do proširenja staničnih pora, a to sve poboljšava proces difuzije otapala u čvrsti materijal i prijenos mase željene tvari pri čemu konačno dolazi i do pucanja stanične stijenke. Sve navedeno dovodi do povećanja brzine ekstrakcije (Drljača i Mrča, 2009).

Ultrazvučna razgradnja/dezintegracija se može odvijati pri kontinuiranom načinu rada gdje je intenzitet ultrazvuka stalan i pulsirajućem načinu rada gdje postoje aktivni i pasivni intervali. Prilikom pasivnih intervala djelovanje ultrazvuka se prekida. Svrha postojanja pasivnih intervala je u sprečavanju pretjeranog zagrijavanja otopine prilikom djelovanja ultrazvuka (Režek Jambrak i sur., 2010).

Ultrazvučna kupelj predstavlja spremnik koji sadrži procesni medij sa jednim ili više pretvarača koji se nalaze na dnu tj. na bazi (Režek Jambrak, 2008). Česta je upotreba ultrazvučnih kupelji u laboratorijima budući da su lako dostupne i jeftine. Većina ultrazvučnih kupelji koristi frekvencijski raspon od 20-40 kHz, no postoje izvedbe i u višim frekvencijskim područjima (Brnčić i sur., 2009). Klasične ultrazvučne kupelji rade pri nižem intenzitetu kako bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika koje uzrokuje kavitacija, a također i pri manjim akustičnim snagama budući da su volumeni tekućine koja se tretira u spremniku najčešće veliki (Brnčić i sur., 2009).



Slika 4. Ultrazvučna kupelj (Gretić, 2016)

2.5. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI

Prilikom analize fenolnih tvari koriste se spektrofotometrijske i kromatografske metode.

2.5.1. Spektrofotometrijske metode

Apsorpcijska metoda koja se zasniva na praćenju ovisnosti valne duljine zračenja koje je prošlo kroz analiziranu tvar o apsorbanciji naziva se spektrofotometrija. Sve spektrofotometrijske metode se zasnivaju na Lambert – Beerovom zakonu:

$$\log \left(\frac{I_0}{I_p} \right) = A = \varepsilon \cdot l \cdot c_a \quad (3)$$

gdje je:

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

A – apsorbancija

c_a – množinska koncentracija tvari [mol/m^3]

l - dužina optičkog puta [m]

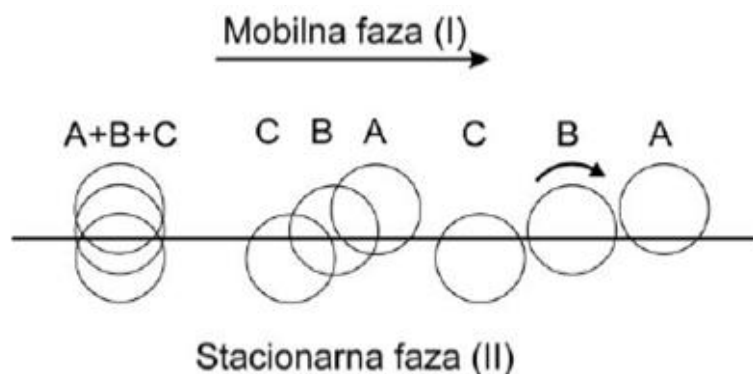
ε - koeficijent molarne apsorbancije (ekstinkcije) [$\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{m})$].

Iz formule (3) je vidljivo da je apsorbancija (A) proporcionalna koeficijentu molarne apsorbancije (ϵ) koji je specifičan za svaku tvar, dužini optičkog puta tj. svjetlosnom putu kroz uzorak (l) i koncentraciji tvari (c_a). Apsorbancija svjetlosnog zračenja ovisna je između ostalog i o vrsti tvari koja apsorbira zračenje, temperaturi, debljini sloja, valnoj duljini upadne svjetlosti, a u slučaju otopina i o koncentraciji tvari u otopini.

Prilikom mjerenja apsorbancije uspoređuje se intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz ispitivanu tvar sa intenzitetom svjetlosti koja prolazi kroz standardnu otopinu tj. ne mjere se apsolutni iznosi apsorbancije (Šeruga, 1988).

2.5.2. Kromatografske metode

Kromatografija je analitička metoda koja se zasniva na raspodjeli komponenti neke smjese na osnovu njihovog različitog afiniteta prema vezivanju na određenu čvrstu fazu. Separacija komponenata u smjesi se odvija između dvije faze: pokretne (mobilne) faze koja može biti u tekućem ili plinovitom stanju i stacionarne faze koja se nalazi u tekućem ili čvrstom stanju (Vujić, 2013).



Slika 5. Princip odvijanja kromatografije (Vujić, 2013)

Faza I (mobilna faza) teče u smjeru strelice preko faze II (stacionarne faze). Komponente A, B i C se pri tome razdvajaju.

Podjela kromatografije se vrši prema agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze. Razlikuju se 4 osnovna tipa kromatografije.

Tablica 2. Osnovna podjela kromatografije (Vujić, 2013)

Agregatno stanje mobilne faze		Agregatno stanje stacionarne faze
plinovito plinovita kromatografija (GC)	1	tekuće kromatografija plinovito-tekuće (GLC)
	2	čvrsto kromatografija plinovito-kruto (GSC)
tekuće tekućinska kromatografija (LC)	3	tekuće kromatografija tekuće-tekuće (LLC)
	4	čvrsto kromatografija tekuće-čvrsto (LSC)

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

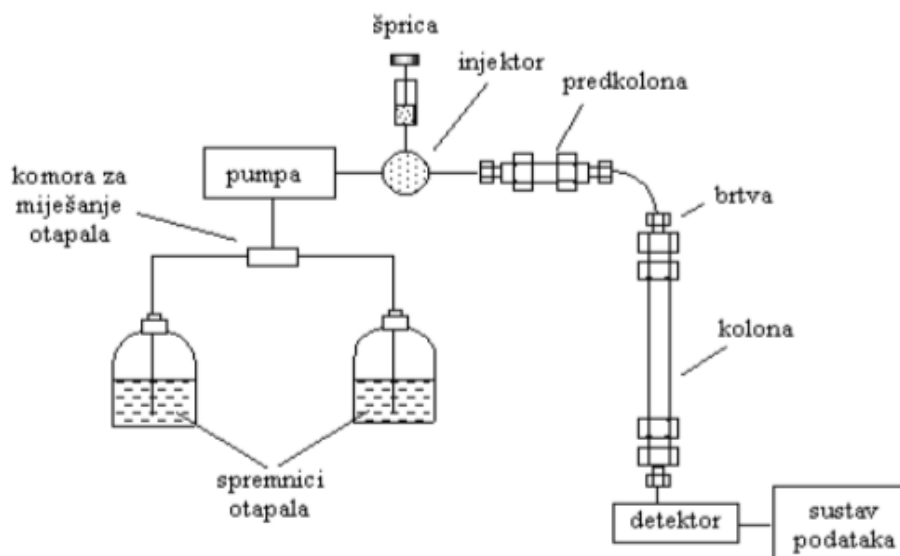
Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) je djelotvorna separacijska tehnika kojom se mogu analizirati nehlapljive i termolabilne tvari, anorganski ioni, makromolekule i nestabilni prirodni produkti. Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, kolona za odjeljivanje i detektor (Ursić, 2017).

Uzorak se preko komore za injektiranje uzorka raspršuje te zajedno sa mobilnom fazom ulazi u kolonu gdje se na osnovu različite apsorpcije vrši razdvajanje komponenata smjese. Mobilnu fazu čine otapala visoke čistoće, bez prisustva suspendiranih čestica ili otopljenih plinova. Kako bi se postigla tražena čistoća u većini slučajeva je potrebno provesti filtriranje i otplinjavanje mobilne faze prije početka rada na HPLC-u (Ursić, 2017).

Mobilna faza se koristi za eluiranje komponenti. Ovisno o tipu primjenjene kromatografske metode može se koristiti izokratna i gradijentna metoda eluiranja. Ovisno o broju mobilnih faza razlikujemo izokratne metode i binarne gradijentne metode. Izokratna metoda je metoda u kojoj se primjenjuje samo jedna mobilna faza, a binarna gradijentna koristi dvije mobilne faze (Nollet i Toldrá, 2013).

Pumpa ubacuje mobilnu fazu u sustav pod visokim tlakom stalnom brzinom (0,1 mL/min – 10,0 mL/min). Volumni protok mobilne faze kreće se u rasponu od nL-mL/min sa relativno

visokim tlakom. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil u kolonu. Kolone su najčešće načinjene od čelika (mogu biti načinjene i od stakla), a međusobno se razlikuju po duljini, unutrašnjem promjeru i vrsti punjenja. Dužina kolone kreće se od 10 do 30 cm, a promjera je od 4 mm. Stacionarna faza je najčešće silika gel veličine čestica od 3 do 10 μm (Uršić, 2017).



Slika 6. Shematski prikaz HPLC uređaja (Uršić, 2017)

Nakon separacije pojedine komponente zajedno sa mobilnom fazom stižu do detektora koji daje odgovarajući odaziv u ovisnosti o vremenu zadržavanja komponente u koloni, te koncentraciji (Nollet i Toldrá, 2013). Detektor se nalazi na samom izlazu iz kolone i uloga mu je da neku fizikalno-kemijsku promjenu pretvori u električni signal. Detektorima se prate karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis području, fluorescencija, struja na elektrodi ili indeks refrakcije (RI). Najčešće korišteni detektori su detektori s diodnim nizom (HPLC-DAD) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog analita u UV/Vis području (Uršić, 2017).

Separacija pikova se postiže odabirom odgovarajućeg tipa kolone, temperature kolone i pH mobilne faze. Pokretna faza i otapalo trebaju biti odabrani u skladu sa tvari koju se detektira, produktima razgradnje i potencijalnim onečišćenjima. Kromatografski profil otopina uzoraka

se uspoređuju s otopinama slijepe probe da bi se odredilo podrijetlo pikova. Odabrana analitička metoda treba biti dovoljno osjetljiva da detektira onečišćenja na niskim nivoima (primjerice pikove na nivou $\leq 0,05\%$ u odnosu na koncentraciju ispitivane supstancije) s time da površine detektiranih pikova trebaju biti unutar linearnog dometa detektora (Ursić, 2017).

2.6. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija općenito označava poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa na način da se postiže maksimalni prinos (odaziv) uz što manje troškove. Optimizacija se provodi empirijskim ili statističkim metodama.

Ukoliko se prati i mijenja samo jedan procesni parametar uz konstantne ostale parametre prikaz utjecaja parametara na promatrani proces neće biti stvaran budući da je tehnološki proces najčešće ovisan o većem broju procesnih parametara. Pristup „jedan faktor u vremenu“ prilikom optimizacije procesa je uvelike napušten jer zahtjeva veliki broj eksperimenata i ne uzima u obzir interakciju parametara promatranog procesa. Noviji pristup optimizaciji procesa je metoda odzivnih površina (eng. *Response surface methodology*) koja između ostalog uzima u obzir i interakciju promatranih parametara ispitivanog procesa (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005). Metodu je razvio Box sa suradnicima sredinom 20. stoljeća, a obuhvaća skup matematičkih i statističkih metoda koje se temelje na aproksimaciji eksperimentalnih podataka empirijskim modelom (npr. jednadžbom pravca). Primjenjuje se u slučajevima kada više varijabli utječe na karakteristike nekog procesa. Prvi korak u primjeni metode je odabir odgovarajućeg dizajna eksperimenta kojim se definiraju eksperimenti koje je potrebno provesti u ispitivanom eksperimentalnom području. Odabir dizajna eksperimenta ovisi o očekivanoj odzivnoj funkciji. Ukoliko eksperimentalni podatci ne tvore krivulje odnosno mogu se opisati linearnom funkcijom koristi se dizajn eksperimenta za modele prvog reda (npr. faktorijalni dizajn). U takvim modelima na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove međusobne interakcije. Kako bi se aproksimirali eksperimentalni podatci koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom

primjenjuje se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine tj. dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) npr. trofaktorijalni pokus na tri razine, Box-Behnken dizajn, centralni kompozitni dizajn i dr. Navedeni modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te o njihovoj interakciji, pritom također dajući informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Navedeni modeli razlikuju se s obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka i razinu ispitivanih varijabli (Bezerra i sur., 2008).

Nakon provedbe pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti tzv. odzivna ploha. Odzivna funkcija je ona funkcija koja opisuje odzivnu plohu. Odzivna funkcija pokazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoj funkciji može se pridružiti odgovarajući polinom i izračunati koeficijente jednadžbe (Bezerra i sur., 2008).

Najvažniji termini u metodi odzivnih površina:

- eksperimentalna domena - područje ispitivanja odnosno raspon minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (uvjeta, parametara)
- dizajn eksperimenta (plan pokusa) – set eksperimenata određenih matricom koja nastaje raličitim kombinacijama ispitivanih varijabli
- faktori ili nezavisne varijable - varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedne od drugih i koje se kontroliraju tijekom procesa npr. temperatura, vrijeme, protok i sl.
- razina varijabli – različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperiment provesti (npr. varijabla temperature na 3 razine: 20, 40 i 60 °C) kako bi se provela optimizacija procesa
- odziv ili zavisne varijable – izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija)
- ostatak (eng. *residual*) – razlika između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka tj. onaj dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom, dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom uvijek je predstavljena niskim vrijednostima ostataka (Bezerra i sur., 2008).

Metoda odzivnih površina predstavlja skup matematičkih i statističkih alata koji se koriste u svrhu modeliranja i optimiranja procesnih uvjeta u svrhu dobivanja odgovarajućeg odaziva kao funkcije ulaznih nezavisnih varijabli prikazano izrazom:

$$y = f(x_1, x_2) + e \quad (4)$$

gdje su x_1, x_2 nezavisne varijable koje utječu na odaziv y .

Funkcija f je nepoznata prilikom definiranja odaziva zbog međusobnog utjecaja nezavisnih varijabli na odaziv što i predstavlja glavni problem metode odzivnih površina. Kako bi se uspješno definirao odgovarajući model potrebno je provesti odgovarajuću aproksimaciju eksperimentalnih podataka funkcije f . U početnim fazama istraživanja najčešće se primjenjuju polinomi nižeg stupnja u uskom području ispitivanja. Ukoliko se odaziv može definirati kao linearna funkcija nezavisnih varijabli u tom slučaju je aproksimacija funkcija modela prvog reda. Model prvog reda s dvije nezavisne varijable definira se izrazom:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + e \quad (5)$$

Ako prilikom linearne aproksimacije eksperimentalnih podataka funkcije f s dvije nezavisne varijable dolazi do velike statističke pogreške, primjenjuje se model drugog reda:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e \quad (6)$$

Razina pojedinog faktora (varijable) je kod svakog modela nezavisna u odnosu na razinu drugih faktora. Kako bi se dobio statistički što značajni model prilikom aproksimacije eksperimentalnih podataka modelom višeg reda (polinom) sa što manjom statističkom pogreškom modela potrebno je definirati plan (matricu) eksperimenata u nastojanju da se prikupi što je više moguće značajnih eksperimentalnih podataka. Nakon provedenih

eksperimenata primjenjuje se model najmanjih kvadrata u svrhu procjene parametara polinoma (Bradley, 2007).

Odnos između odaziva y i nezavisnih varijabli često je nepoznat. Model koji definira odziv funkcije f je polinom nižeg reda koji se najčešće primjenjuje za aproksimaciju podataka ukoliko je ispitivano područje podataka malo. Prilikom aproksimacije funkcije f model prvog reda se primjenjuje kad se odziv nezavisnih varijabli može opisati linearnom funkcijom. U većini slučajeva odziv modela se ne može opisati linearnom funkcijom zbog velikog nedostatka modela (eng. *lack of fit of the first-order model*). U pojedinim slučajevima model drugog reda bolje aproksimira eksperimentalne podatke parabolom. Model drugog reda osim kvadratnih članova, obuhvaća sve članove modela prvog reda. Prilikom definiranja modela drugog reda, najčešće su primjenjivani centralni kompozitni dizajn, te Box-Behnken dizajn (Bradley, 2007).

2.6.1. Box-Behnken dizajn

Box-Behnken dizajn predlaže kako odabrati točke eksperimenta u slučaju kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj tip dizajna je mnogo učinkovitiji od trofaktorijskog dizajna (3^k) uglavnom zbog mogućnosti ispitivanja više varijabli (3-10) dok se trofaktorijski dizajn primjenjuje za ispitivanje 4 varijable te zahtjeva puno više pokusa.

Box-Behnken dizajn pokusa spada u skupinu nezavisnih planova pokusa koji ne sadrži točke na vrhovima pokusa. Kombinacije razina faktora sačinjavaju glavna stanja pokusa koja su smještena na polovicama stranica eksperimentalnog prostora uz samu centralnu točku. Box-Behnken dizajn može se smatrati rotabilnim s naglaskom da se koriste 3 razine svakog faktora (Bezzeri i sur., 2008).

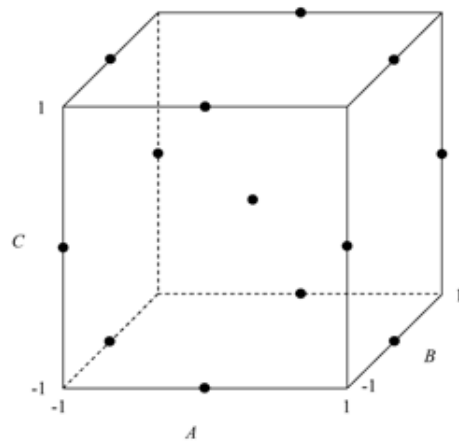
Osnovne karakteristike ovog tipa dizajna su:

1. zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu

$$N = 2^k (k-1) + c_p \quad (7)$$

gdje je k broj faktora, c_p broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki, te

2. sve razine faktora se moraju svesti na 3 razine (-1, 0, 1) sa jednakim intervalom između razina (Bezzeri i sur., 2008).



(a)

Run	Factors		
	A	B	C
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0

(b)

Slika 7. Box-Behnken dizajn za 3 faktora: a) geometrijski prikaz b) tablica dizajna (Thes, 2012)

3. EKPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj provedenog istraživanja bio je ispitivanje utjecaja procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina te određivanje optimalnih procesnih uvjeta za provedbu ekstrakcije karnozinske kiseline.

Provedeno je ispitivanje utjecaja sastava otapala (volumni udio 96-% tnog etanola u vodenoj otopini; 40, 70 i 100 % v/v), omjera kruto-tekuće (20, 30 i 40 mL/g) i vremena trajanja ekstrakcije (10, 20 i 30 min) na ultrazvučnoj kupelji.

Procjena ispitivanih uvjeta na promatrani proces te njihovo optimiranje provedeno je uz primjenu programa Design Expert 10 metodom odzivnih površina (eng. *Response surface methodology*) na osnovu eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijal

U ovom istraživanju korištene su ručno ubrane, svježe grančice ružmarina. Uzorci su ubrani u vrtovima domaćinstava (nesamonikle biljke ružmarina) na području Hercegovačko-neretvanske županije, Općina Mostar, u svibnju 2017.

3.2.2. Priprema materijala

Svježe ubrane grančice ružmarina sušene su 1 - 2 tjedna na sobnoj temperaturi u zatvorenoj prostoriji. Nakon sušenja grančice su ručno izlomljene, a potom usitnjene do čestica veličine 1 mm na mlinu Retsch ZM 200 (rad pri 14 000 rpm). Usitnjeni uzorci ružmarina čuvani su u plastičnim vrećicama u zamrzivaču na temperaturi -20 °C. Neposredno prije provođenja ekstrakcije usitnjeni uzorci ružmarina su vađeni iz zamrzivača, temperirani na sobnu temperaturu, odvagivani za provođenje analiza, a potom ponovno spremeni u zamrzivač.



Slika 8. Osušena grančica ružmarina



Slika 9. Usitnjeni uzorak (čestice veličine 1 mm)



Slika 10. Čuvanje uzorka

3.2.3. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari u usitnjenim uzorcima ružmarina određivan je termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko infracrveno sušenje HR 73 Halogen Moisture Analyzer na način da je 1 g usitnjenog uzorka ružmarina odvagano na aluminijsku pliticu uređaja postavljenu na integriranu vagu. Sušenje je provedeno brzom metodom do konstantne mase, a uvjeti sušenja bili su: standardna metoda, temperatura sušenja 105 °C i kriterij završetka procesa (eng. switch off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur., 2004). Rađena su tri ponavljanja. Udio suhe tvari ($w_{s.t.}$) izražen je u postotku (%).

3.2.4. Preliminarno istraživanje

Preliminarno istraživanje provedeno je u svrhu određivanja uvjeta pri kojima će se odvijati ekstrakcije prilikom optimizacije procesa ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina. Provedeno je ukupno 16 ekstrakcija.

U staklene bočice odvagano je 1 g uzorka i dodano 20 mL 96 % - tnog EtOH. Ekstrakcije su provedene kombinirano na ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P 120H) i vodenoj kupelji (Julabo SW-23) ili pak samo na ultrazvučnoj kupelji ili vodenoj kupelji.

Ispitivan je utjecaj vremena, frekvencije (ultrazvučna kupelj), i uređaja (vodena kupelj i/ili ultrazvučna kupelj) na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz uzorka. Uvjeti pri kojima su se odvijale ekstrakcije predloženi su u **Tablici 3**. Sve ekstrakcije na ultrazvučnoj kupelji provedene su na *pulse* načinu rada.

Tablica 3. Uvjeti provođenja ekstrakcija u preliminarnom istraživanju

	Ultrazvučna kupelj		Vodena kupelj		
	t [min]	f [kHz]	t [h]	T [°C]	n [rpm]
Eksperiment 1	/	/	3	27	200
Eksperiment 2	5	80	3	27	200
Eksperiment 3	10	80	3	27	200
Eksperiment 4	15	80	3	27	200
Eksperiment 5	5	80	/	/	/
Eksperiment 6	10	80	/	/	/
Eksperiment 7	15	80	/	/	/
Eksperiment 8	30	80	/	/	/
Eksperiment 9	5	37	/	/	/
Eksperiment 10	10	37	/	/	/
Eksperiment 11	15	37	/	/	/
Eksperiment 12	30	37	/	/	/
Eksperiment 13	5	80	20	27	200
Eksperiment 14	10	80	20	27	200
Eksperiment 15	15	80	20	27	200
Eksperiment 16	30	80	20	27	200

t – vrijeme, f – frekvencija, T – temperatura, n – broj okretaja tresilice

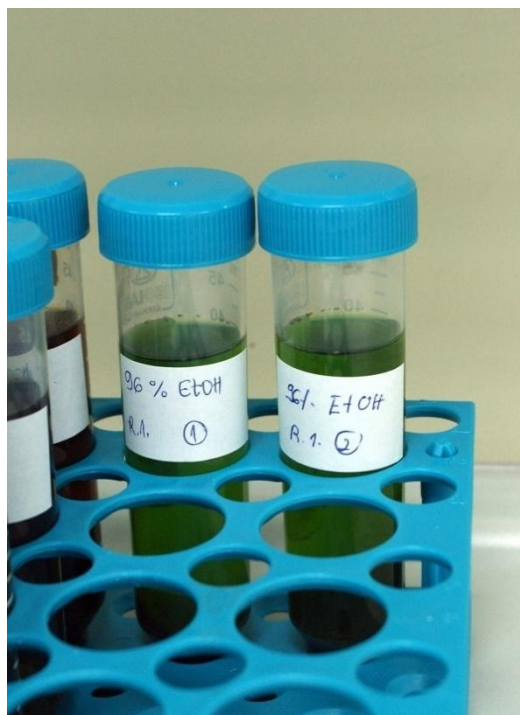
3.2.5. Kruto-tekuća ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom karnozinske kiseline iz ružmarina

Ekstrakcija se provodila na ultrazvučnoj kupelji Elmasonic P 120H koja je namijenjena za laboratorijsku upotrebu. Kupelj ima mogućnost podešavanja načina rada (*pulse*, *degas*, *sweep*), frekvencije (37 i 80 kHz), vremena (1-60 min), temperature (30-80 °C) i jačine rada (30-100 %). Način rada *pulse* koristi se za povećanje snage ultrazvučnih valova do 20 %, *degas* za učinkovito otplinjavanje i pripremu tekućina za HPLC te *sweep* za jednoliku raspodjelu ultrazvučnih valova unutar kupelji.

Ultrazvučna ekstrakcija je provedena na način da su u vodenu kupelj uronjene staklene bočice s usitnjenim uzorkom i otapalom (1g uzorka te odgovarajući volumen etanola određen prema planu pokusa). Ekstrakcija se odvijala na *pulse* načinu rada, sobnoj temperaturi, frekvenciji 37 kHz i jačini rada 60 %. Ispitivan je utjecaj sastava otapala (različiti volumni udio 96 %-tnog etanola u vodenoj otopini etanola: 40, 70 i 100 % v/v), omjera kruto tekuće (20, 30 i 40 mL/g) i vremena trajanja ekstrakcije (10, 20, 30 min) na ekstraktibilnost karnozinske kiseline. Eksperimenti su provedeni pri različitim kombinacijama ispitivanih uvjeta određenim prema Box-Behnken dizajnu (15 pokusa) na osnovu čega su nakon određivanja koncentracije karnozinske kiseline u ekstraktima određeni optimalni uvjeti ekstrakcije. Svaka ekstrakcija je rađena u dvije paralele.

3.2.6. Centrifugiranje

Nakon provedene ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana na Z 326K (Hermle) centrifugi. Z 326K centrifuga ima mogućnost podešavanja vremena (10 s do 100 h), temperature (-20 °C do 40 °C) i relativne centrifugalne sile (eng. *relative centrifugal force* - rcf: 20 g do maksimalne dopuštene centrifugalne sile pripadajućeg rotora). Suspenzija uzorka ružmarina i otapala etanola centrifugirana je na 11 000 g, pri sobnoj temperaturi i vremenu centrifugiranja 10 minuta. Nakon provedenog centrifugiranja supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem. Tako pripremljeni uzorci su spremni u zamrzivač i čuvani na temperaturi -20 °C.



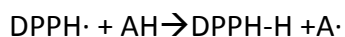
Slika 11. Odvojeni supernatant i talog nakon provedenog centrifugiranja

3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima ružmarina

Antioksidacijska aktivnost određivana je spektrofotometrijski DPPH metodom na spektrofotometru UV-1280 (Shimadzu, Japan). Metoda je odabrana zbog stabilnosti DPPH radikala, te jednostavnosti i brzine metode. DPPH radikal posjeduje stabilnost zbog delokalizacije slobodnog elektrona preko cijele molekule, a pri tome se molekula ne dimerizira za razliku od većine drugih slobodnih radikala.

Princip

Metoda se temelji na redukciji sintetskog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH $\cdot$) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa (AH) koji donira jedan atom vodika i hvata slobodni DPPH $\cdot$ radikal, a prilikom čega nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A $\cdot$) kako prikazuje jednadžba:



Prilikom redukcije DPPH $\cdot$ radikala nakon određenog vremena dolazi do smanjenja apsorpcije (mjerene pri 515 nm) reakcijske otopine zbog smanjenja koncentracije zaostalog slobodnog DPPH $\cdot$ radikala što je vidljivo po promjeni ljubičaste boje otopine prema žutoj.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

U epruvetu je otpipetirano 0,1 mL alikvota razrijeđenog ekstrakta (razrjeđenje se radi ukoliko je potrebno i to sa otapalom sa kojim je vršena ekstrakcija), a potom 3,9 mL DPPH otopine koncentracije 0,026 mg DPPH/mL. DPPH otopina se priprema u 96%-tnom etanolu. Reakcijska otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu 30 minuta, nakon čega joj je spektrofotometrijski određena apsorpcija (A_{eks}) pri valnoj duljini 515 nm u odnosu na slijepu probu (96%-tni etanol). Otopina DPPH je pripremana uvijek svježa neposredno prije provođenja analiza te je upotrebljavana unutar 24 h. Između mjerenja čuvana je u frižideru na 4 °C zaštićena aluminijskom folijom. Apsorpcija DPPH otopine očitavana je pod istim uvjetima kao i uzorci u odnosu na slijepu probu tj. 96 %-tni etanol.

3.2.8. Određivanje koncentracije karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina

Određivanje koncentracije karnozinske kiseline u prethodno pripremljenom supernatantu provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) na uređaju Nexera XR UHPLC (Shimadzu). Osnovni dijelovi uređaja su vakuum otplinjavač (DGU-20A_{5R}), dvije pumpe (LC-20ADXR), automatski uzorkivač (SIL-20ACXR), kolonska pećnica (CTO-20AC), PDA detektor (SPD-M20A), detektor indeksa loma (RID-20A), kontroler (CBM-20A), računalo i odgovarajući softver za obradu podataka (LabSolution).

Određivanje koncentracije karnozinske kiseline rađeno je po binarnoj gradijentnoj metodi koju su opisali Zobot i sur. (2014). Korištena je kolona Kinetex 2.6 μm C18 100 A. Korištene su dvije mobilne faze: A i B. Mobilnu fazu A činila je ultračista voda sa 0,1 % (v/v) octene

kiseline, a mobilnu fazu B acetonitril sa 0,1 % (v/v) octene kiseline. Mobilna faza A pripremana je na način da je u 999 mL redestilirane vode dodan 1 mL ledene octene kiseline (CH_3COOH), a mobilna faza B na način da je u 999 mL acetonitrila dodan 1 mL ledene octene kiseline. Acetonitril je odabran zbog svoje niske viskoznosti i stoga što ne stvara visok protutlak u koloni. Protok mobilnih faza (A+B) kroz kolonu iznosio je 2.5 mL/min, volumen ubrizgavanja 10 μL . Temperatura kolonske pećnice iznosila je 55°C. Detekcija karnozinske kiseline vršena je na PDA detektoru (eng. *photodiode array detector*). Ukupno vrijeme trajanja analize po uzorku bilo je 10 minuta.

Prije provedene analize na HPLC uređaju uzorci su profiltrirani kroz membranski filter promjera 0,22 μm u viala koje su zatim postavljene u automatski uzorkivač. Za otplinjavanje mobilnih faza korištena je ultrazvučna kupelj Elmasonic P 120H.

Dobiveni kromatogrami korišteni su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu koncentracije karnozinske kiseline u uzorcima. Kvalitativna analiza ili identifikacija komponente je provedena na način da je uspoređeno retencijsko vrijeme karnozinske kiseline u uzorku ružmarina (u konkretnom slučaju za karnozinsku kiselinu ono je iznosilo 3,35 min) s retencijskim vremenom nakon injektiranja standarda karnozinske kiseline poznate koncentracije. Kvantitativna analiza karnozinske kiseline u uzorcima provedena je pomoću softvera LabSolution na način da je određivana površina ispod pikova na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje.

Postupak izrade kalibracijske krivulje za kvantitativnu analizu karnozinske kiseline u uzorku

Za izradu kalibracijske krivulje pripremljena je temeljna otopina standarda karnozinske kiseline u koncentraciji 500 mg/L (standard otapan umetanolu HPLC čistoće).

Od standardne otopine pripremljene su sljedeće koncentracije otopina za karnozinsku kiselinu:

- 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1000 mg/L

Nakon provedene tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti određena je površina ispod pikova na dobivenim kromatogramima. Linearna ovisnost površine ispod pikova o promjeni koncentracije karnozinske kiseline procijenjena je linearnom regresijskom analizom pomoću regresijskog modela najmanjih kvadrata.

3.2.9. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

Prilikom primjene metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta slijede se sljedeći osnovni koraci:

- odabir nezavisnih varijabli (parametara, faktora) koje utječu na promatrani proces sa definiranim rasponom ispitivanih parametara (parametri se odabiru ovisno o cilju ispitivanja ili na temelju iskustva istraživača)
- izbor dizajna eksperimenta i provođenje eksperimenta prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom) primjenom matematičko-statističkih metoda
- evaluacija prikladnosti modela
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli

U konkretnom primjeru za optimizaciju ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina korišten je Box-Behnken-ov plan pokusa kako bi se procijenio utjecaj glavnih procesnih parametara (sastav otapala: etanol/voda, vrijeme ekstrakcije, omjer kruto/tekuće) na ekstraktibilnost karnozinske kiseline (**Tablica 5.**).

Ispitivane varijable su prevedene u kodirane prema sljedećem izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{\max} + x_{\min})}{2}}{\frac{(x_{\max} - x_{\min})}{2}} \quad (8)$$

Tablica 4. Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za ekstrakciju karnozinske kiseline iz ružmarina

Faktor	Donja razina	Centralna razina	Gornja razina
Kodirane varijable	-1	0	1
sastav otapala (x_1 , % v/v, etanol/voda)	40	70	100
vrijeme (x_2 , min)	10	20	30
omjer kruto/tekuće (x_3 , mL/g)	20	30	40

Tablica 5. Dizajn eksperimenta kruto-tekuće ekstrakcije karnozinske kiseline potpomognute ultrazvukom prema Box – Behnken-ovom planu pokusa

broj pokusa	sastav otapala [%]	vrijeme [min]	omjer kruto- tekuće [mL/g]
1	40	20	20
2	100	30	30
3	70	30	40
4	70	10	20
5	70	20	30
6	40	20	40
7	40	10	30
8	100	20	20
9	70	20	30
10	40	30	30
11	100	20	40
12	100	10	30
13	70	20	30
14	70	10	40
15	70	30	20

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je petnaest eksperimenata ekstrakcije sa tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja.

Dobiveni podatci aproksimirani su matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y' = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (9)$$

gdje su:

Y' -modelom predviđena funkcija

β_0 -konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i -koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} -koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$x_{i,j}$ -ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

k - broj varijabli

Na osnovi dobivenog matematičkog modela konstruirana je odzivna površina koja omogućuje vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese. Odzivna površina može se predstaviti kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 10. Program omogućuje rad sa kodiranim i nekodiranim varijablama.

Provjera uspješnosti optimiranja procesa ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina provedena je na način da su uspoređeni rezultati dobiveni metodom odzivnih površina i eksperimentalno dobiveni rezultati pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije.

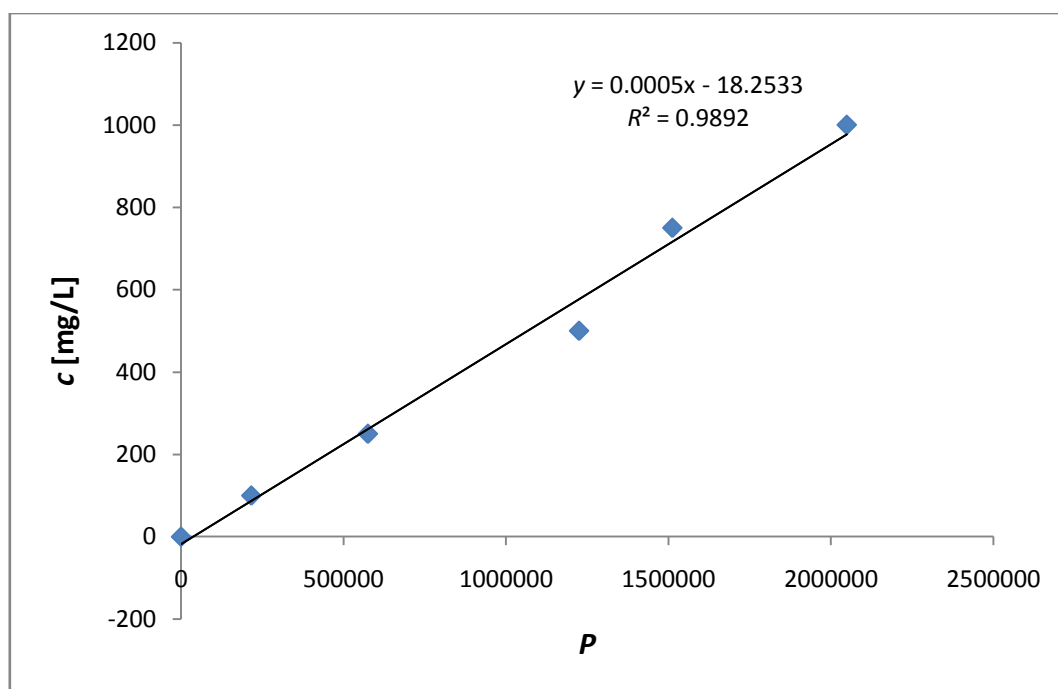
4. REZULTATI

Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati prikazani su u tablicama i dijagramima. Dizajn eksperimenta i statistička obrada dobivanih podataka u proučavanim procesima provedeni su uz pomoć programskog paketa Design Expert 10. Korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

4.1. ODREĐIVANJE SUHE TVARI

Nakon sušenja grančice ružmarina su najprije ručno izlomljene, a potom usitnjene na čestice veličine 1 mm pomoću mlina, nakon čega im je određena suha tvar koja je iznosila 92,43%.

4.2. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE MASENE KONCENTRACIJE KARNOZINSKE KISELINE



Slika 12. Kalibracijska krivulja za određivanje masene koncentracije karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina

Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 0,0005 \cdot x - 18,2533 \quad (10)$$

odnosno:

$$c \text{ (karnozinska kiselina)} = y = 0,0005 \cdot P - 18,2533 \text{ [mg/L]} \quad (11)$$

koja je korištena za određivanje masene koncentracije karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina.

4.3. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA KARNOZINSKE KISELINE U EKSTRAKTIMA RUŽMARINA

Prema jednačbi (12) izračunata je koncentracija karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina koja je preračunata na suhu tvar uzorka na sljedeći način:

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.tv.}} \quad (12)$$

C – maseni udio karnozinske kiseline u ekstraktu [mg/g_{s.t.}]

c – masena koncentracija karnozinske kiseline u ekstraktu [mg/mL]

V_e – ukupni volumen dobivenog ekstrakta [mL]

m_{uz} – masa uzorka [g]

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari u uzorku (%).

4.4. IZRAČUNAVANJE POSTOTKA INHIBICIJE DPPH RADIKALA U EKSTRAKTIMA RUŽMARINA

Inhibicija DPPH uslijed antioksidacijske aktivnosti ekstrakta ružmarina izračunata prema sljedećem izrazu, a izražena je u postotku (%):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[\frac{A_{DPPH} - A_{ekstrakta}}{A_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (13)$$

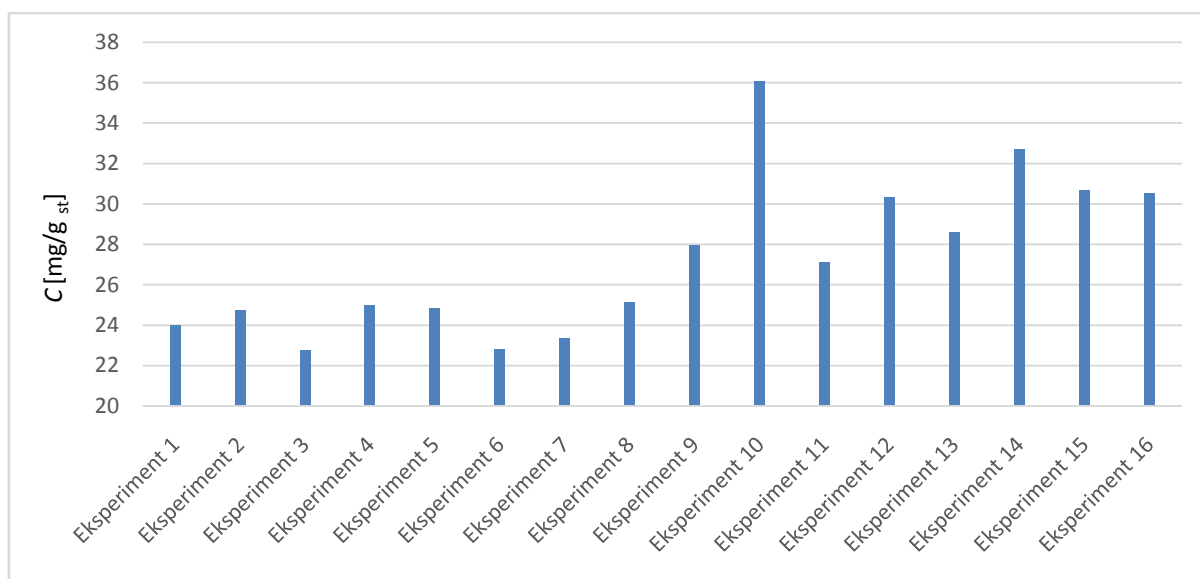
Postotak (%) inhibiranog DPPH izražen je po masi suhe tvari ružmarina na sljedeći način:

$$AA = \frac{m_{\text{inhibiranog DPPH}}}{m_{\text{suhe tvari}}} [g_{\text{inhibiranog DPPH}} / g_{\text{suhe tvari}}] \quad (14)$$

Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u dvije paralele po tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti određivanja.

4.5. REZULTATI PRELIMINARNOG ISTRAŽIVANJA

Koncentracija karnozinske kiseline u pripremljenom supernatantu određena je postupkom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti. Maseni udio karnozinske kiseline (C) u ekstraktu ružmarina određen je prema formuli (12) te prikazan na **Slici 12**.



Slika 13. Maseni udio karnozinske kiseline u uzorcima ružmarina u preliminarnim istraživanjima provedenim pri procesnim uvjetima navedenim u u **Tablici 3.**

4.6. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKTIBILNOST KARNOZINSKE KISELINE IZ RUŽMARINA TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Eksperimentalno je ispitan utjecaj tri procesna uvjeta ekstrakcije u tri razine (sastav otapala tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola: 40-70-100% v/v, omjer kruto-tekuće: 20-30-40 mL/g i vrijeme: 10-20-30 minuta) na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina. Dizajn eksperimenata i statistička obrada podataka provedeni su pomoću programa Design Expert 10. Primjenjena je Box-Behnken metoda odzivnih površina.

Tablica 6. Srednje vrijednosti masenih udjela karnozinske kiseline (C) u ekstraktima ružmarina te antioksidacijska aktivnost ekstrakata, dobiveni pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (udio etanola u vodenoj otopini etanola - φ , vrijeme – t omjer kruto-tekuće – R') u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 φ [% v/v]	Faktor X_2 t [min]	Faktor X_3 R' [mL/g]	Odziv 1 C [mg/g _{s.t.}]	Odziv 2 AA [g _{inhib. DPPH} /g _{s.t.}]
1	40	20	20	6,70	0,18
2	100	30	30	29,44	0,14
3	70	30	40	14,15	0,10
4	70	10	20	16,59	0,10
5	70	20	30	13,61	0,11
6	40	20	40	0,21	0,17
7	40	10	30	0,04	0,18
8	100	20	20	23,85	0,13
9	70	20	30	14,39	0,12
10	40	30	30	4,55	0,16
11	100	20	40	24,18	0,13
12	100	10	30	25,79	0,11
13	70	20	30	13,78	0,09
14	70	10	40	17,60	0,12
15	70	30	20	15,53	0,13

4.6.1. Modeliranje procesa ekstrakcije karnozinske kiseline

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom prema jednadžbi (9) dobivena je odzivna funkcija odnosno funkcionalna ovisnost masene koncentracije karnozinske kiseline (linearni model) i antioksidacijske aktivnosti (kvadratni model) o ispitivanim procesnim uvjetima i o njihovoj interakciji kako slijedi:

$$Y_{\text{karnozinska kiselina}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 = 13,92 + 11,47 X_1 \quad (15)$$

$$Y_{\text{antioksidacijska aktivnost}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1^2 X_1^2 + \beta_2^2 X_2^2 + \beta_3^2 X_3^2 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 = 0,11 - 0,025 X_1 + 0,039 X_1^2 \quad (16)$$

gdje su:

Y – modelom predviđeni maseni udio karnozinske kiseline [mg/g_{s.t.}] / modelom predviđena antioksidacijska aktivnost

x_1 – ispitivani volumni udio etanola u vodenoj otopini [%, v/v]

x_2 – ispitivano vrijeme ekstrakcije [t]

x_3 – ispitivani omjer kruto-tekuće [mL/g].

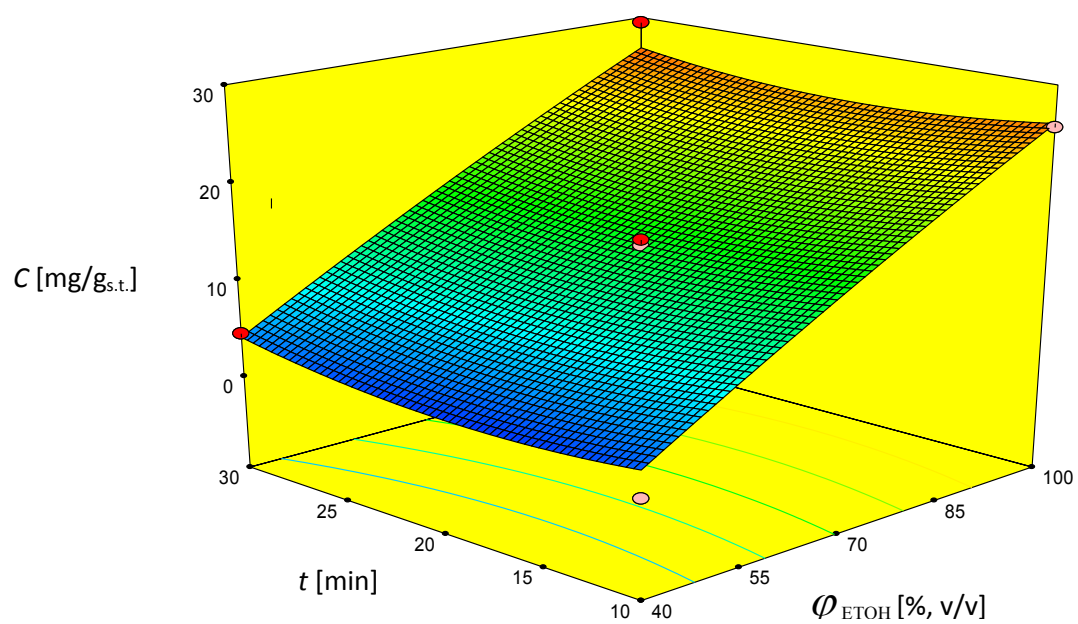
Tablica 7. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> vrijednost	<i>Prob > F</i> (<i>p</i> < 0,05)
Model	1085,01	9	120,56	16,80*	0,0032
X₁-otapalo	1052,60	1	1052,60	146,65*	< 0,0001
X₂-vrijeme	1,66	1	1,66	0,23^{ns}	0,6511
X₃-omjer kruto-tekuće	5,31	1	5,31	0,74^{ns}	0,4291
X₁ X₂	0,18	1	0,18	0,025^{ns}	0,8796
X₁ X₃	11,60	1	11,60	1,62^{ns}	0,2595
X₂ X₃	1,42	1	1,42	0,20^{ns}	0,6746
X₁²	1,33	1	1,33	0,19^{ns}	0,6847
X₂²	9,85	1	9,85	1,37^{ns}	0,2942
X₃²	0,62	1	0,62	0,087^{ns}	0,7803
Ostatak	35,89	5	7,18		
Nedostatak modela (P)	35,55	3	11,85	70,77*	0,0140
Pogreška	0,33	2	0,17		
Ukupno	1120,90	14			
R	0,984				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df* – stupnjevi slobode;

MS – varijanca; *R* – koeficijent korelacije

* utjecaj faktora je statistički značajan (*p*=0.05); ^{ns} – ujecaj faktora nije statistički značajan



Slika 14. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos karnozinske kiseline (C) u ovisnosti o volumnom udjelu etanola u vodenoj otopini etanola (ϕ_{EtOH}) i vremenu ekstrakcije (t) i pri konstantnom omjeru kruto tekuće 30 mL/g

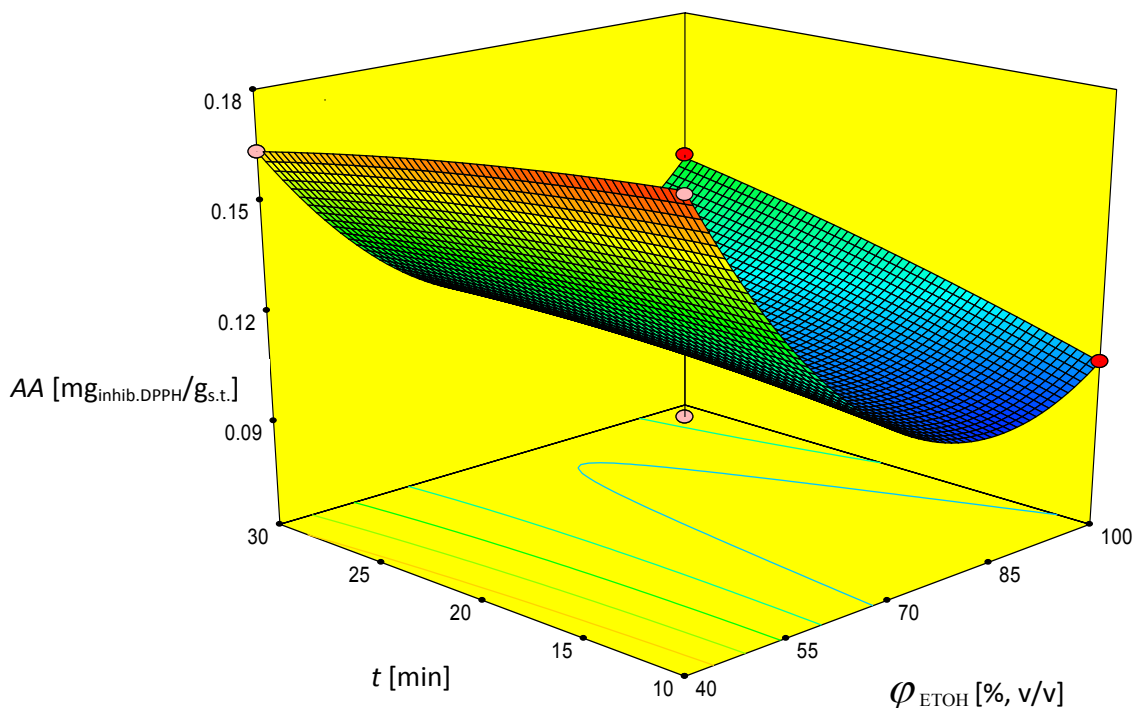
Tablica 8. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene antioksidacijske aktivnosti ekstrakata ružmarina polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> vrijednost	<i>Prob > F</i> (<i>p</i> < 0,05)
Model	0,012	9	0,00132	12,80*	0,0068
X₁-otapalo	0,00494	1	0,00494	45,30*	0,0011
X₂-vrijeme	0,00011	1	0,00011	1,00 ^{ns}	0,3624
X₃-omjer kruto-tekuće	0,00005	1	0,00005	0,46 ^{ns}	0,5270
X₁ X₂	0,00054	1	0,00054	4,92 ^{ns}	0,0773
X₁ X₃	0,00002	1	0,00002	0,18 ^{ns}	0,6877
X₂ X₃	0,00038	1	0,00038	3,44 ^{ns}	0,1227
X₁²	0,00357	1	0,00571	52,39*	0,0008
X₂²	0,00001	1	0,00001	0,12 ^{ns}	0,7469
X₃²	0,00010	1	0,00001	0,92 ^{ns}	0,3812
Ostatak	0,00055	5	0,00011		
Nedostatak modela	0,00001	3	0,000003	0,013 ^{ns}	0,9973
Pogreška	0,00053	2	0,00027		
Ukupno	0,012	14			
R	0,977				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df* – stupnjevi slobode;

MS – varijanca; *R* – koeficijent korelacije

* utjecaj faktora je statistički značajan (*p*=0.05); ^{ns} – utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 15. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost (AA) ekstrakata ružmarina u ovisnosti o uvjetima ekstrakcije: volumnom udjelu etanola u vodenoj otopini etanola (φ_{ETOH}) i vremenu ekstrakcije (t) i pri konstantnom omjeru kruto tekuće 30 mL/g

4.6.2. Optimiranje procesa ekstrakcije karnozinske kiseline

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je moguće postići maksimalni prinos karnozinske kiseline i najbolju antioksidacijsku aktivnost za ispitivano eksperimentalno područje provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 10. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih varijabli, a kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (*engl. desirability*) kao kriterij za optimalno provođenje procesa bila najbliže vrijednosti 1.

Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije karnozinske kiseline uz poželjnost 0,949 su: 100 %-tni etanol, 10 minuta ultrazvučna ekstrakcija i omjer kruto-tekuće 20 mL/g. Pri navedenim uvjetima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos karnozinske kiseline 26,52

mg/g_{s.t.}. U slučaju antioksidacijske aktivnosti određeni optimalni uvjeti ekstrakcije uz poželjnost 1 su: 40 % vodena otopina etanola, 10 minuta ultrazvučna ekstrakcija i omjer kruto-tekuće 40 mL/g.

4.6.3. Provjera uspješnosti optimiranja ekstrakcije

Nakon određenih optimalnih uvjeta ekstrakcije karnozinske kiseline i za postizanje najbolje antioksidacijske aktivnosti metodom odzivnih površina, ponovno je provedena ekstrakcija pri utvrđenim optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti optimiranja ekstrakcije, a rezultati su prikazani u **Tablici 9**.

Tablica 9. Provjera uspješnosti optimiranja ekstrakcije metodom odzivnih površina usporedbom eksperimentalno dobivenih podataka s modelom predviđenim vrijednostima nakon provedene ekstrakcije prema definiranim optimalnim uvjetima

Eksperimentalno određeno		Modelom predviđeno	
Karnozinska kiselina	AA	Karnozinska kiselina	AA
C= 26,52 mg/g _{s.t.}	C= 0,19 mg _{inhib.DPPH} /g _{s.t.}	C= 29,49 mg/g _{s.t.}	C= 0,12 mg _{inhib.DPPH} /g _{s.t.}

5. RASPRAVA

Ekstrakcija je značajan proces u izolaciji pojedinih aktivnih spojeva, a učinkovitost provedbe procesa ekstrakcije ovisi o različitim procesnim parametrima koji mogu djelovati zavisno i nezavisno (Marinova i sur., 2005). Potrebno je odrediti parametre koji najviše utječu na sam proces ekstrakcije budući da gotovo nikad nije moguće kontrolirati sve parametre procesa. Definiranje optimalnih procesnih uvjeta je veoma bitan korak prilikom optimizacije nekog procesa kako bi se postigla ekonomska i energetska ušteda procesa, minimalni utrošak kemikalija, vremena i rada uz postizanje što većeg prinosa. Metoda odzivnih površina je veoma učinkovit alat za poboljšanje i optimiziranje procesa budući da zahtjeva relativno mali broj eksperimenata iz definiranog plana pokusa prema kojem se provode samo neki eksperimenti sa određenim kombinacijama procesnih parametara na osnovu kojih je na kraju moguće odrediti optimalne parametre datog procesa (Carley i sur., 2004).

U ovome radu je ispitivan utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina. Plan pokusa i statistička obrada podataka provedeni su uz pomoć programskog paketa Design Expert 10, a primjenjena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. U tablicama i dijagramima prikazani su podatci eksperimentalno određeni i izračunati prema primjenjenom matematičkom modelu.

Prvi dio eksperimentalnog rada bio je usmjeren na preliminarna ispitivanja koja su uključivala pokuse kruto-tekuće ekstrakcije u vodenoj kupelji i u ultrazvučnoj kupelji ili njihovoj kombinaciji pri uvjetima navedenim u **Tablici 3**. Preliminarna istraživanja provedena su u svrhu određivanja uvjeta pri kojima će se provoditi ekstrakcije prilikom optimizacije procesa ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina. Provedeno je 16 eksperimenata u dvije paralelne probe. Nakon provedbe ekstrakcije karnozinska kiselina u ekstraktima ružmarina određena je UHPLC metodom. Kalibracijska krivulja (**Slika 12.**) za izračunavanje karnozinske kiseline dobivena je iz vrijednosti koncentracija standardne otopine karnozinske kiseline i površine ispod pikova na dobivenom kromatogramu. Iz tako izrađene kalibracijske krivulje dobivena je regresijska jednadžba za karnozinsku kiselinu (jednadžbe 10 i 11) na temelju

kojih je izračunata masena koncentracija karnozinske kiseline. Na temelju masenih koncentracija karnozinske kiseline izračunat je maseni udio karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina prema jednadžbi (12) čije su vrijednosti prikazane na **Slici 13**. Maseni udio karnozinske kiseline kretao se od 22,73 do 36,07 mg/g_{s.t.} pri čemu je maksimalni udio karnozinske kiseline (36,07mg/g_{s.t.}) postignut primjenom ultrazvučne kupelji pri 37 kHz tijekom 10 minuta, primjenom "pulse" moda (eksperiment 10). Na osnovu preliminarnih istraživanja dizajniran je drugi dio eksperimentalnog rada.

Drugi dio eksperimentalnog rada odnosio se na ispitivanje utjecaja 3 procesna uvjeta ekstrakcije u 3 razine (sastav otapala tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola: 40-70-100 % v/v, omjer kruto-tekuće: 20-30-40 mL/g i vrijeme: 10-20-30 min) na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina te na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina (**Tablica 4.**). Primjenom programskog paketa Design Expert 10 definiran je Box-Behnkenov plan pokusa (**Tablica 5.**).

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 15 pokusa sa 3 ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja u dvije paralelne probe. Nakon provedbe ekstrakcije koncentracija karnozinske kiseline je kao i u prvom slučaju određena UHPLC metodom. Iz kalibracijske krivulje dobivena je regresijska jednadžba (jednadžbe 10 i 11) na temelju kojih je izračunata masena koncentracija karnozinske kiseline u ekstraktima, a iz koje je izračunat maseni udio karnozinske kiseline u ekstraktima ružmarina prema jednadžbi (12) čije su vrijednosti prikazane u **Tablici 6**. Maseni udio karnozinske kiseline se kretao u rasponu od 0,04 do 29,44 mg/g_{s.t.}

Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem određena je antioksidacijska aktivnost ekstrakata ružmarina prema jednadžbi (14), a čije su vrijednosti prikazane u **Tablici 6**. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata ružmarina kretala se u rasponu od 0,09 do 0,18 g_{inhib. DPPH}/g_{s.t.}

Kako bi se procijenio utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije i njihove interakcije (sastav otapala, omjer kruto-tekuće, vrijeme) na zavisnu varijablu (prinos karnozinske kiseline i antioksidacijsku aktivnost) te provjerila uspješnost optimizacije procesa ekstrakcije karnozinske kiseline iz ružmarina provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka

matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema jednadžbi (9) koja se sastoji od linearnog i kvadratnog člana. Kvadratni član predstavlja interakciju ispitivanih varijabli. Model može biti linearni, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora.

Statistička analiza prikladnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka ekstraktibilnosti karnozinske kiseline i antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima ružmarina prikazana je u **Tablici 7. i Tablici 8.** Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. U idealnom slučaju R iznosi 1. U većini slučajeva odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje stoga se provodi i detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovu koje je moguće utvrditi opravdanost primjenjivosti dabrano modela. Članovi odzivnog polinoma čije su vrijednosti „Prob > F“ manje od 0,05 (p -vrijednost) su statistički značajni što znači da je vjerovatnost (*eng. Probability*) dobivanja velike F vrijednosti uslijed šuma manja od 5%.

Za proces ekstrakcije karnozinske kiseline najprihvatljiviji se pokazao linearni model ($R = 0,984$) prikazan jednadžbom (15) što znači da je statističkom analizom (ANOVA) utvrđeno da samo linearni član (sadrži ispitivane članove) polinomnog modela statistički značajan, a ostali članovi (kvadratni i interaktivni) su statistički neznačajni. Iz **Tablice 7.** se mogu očitati regresijski koeficijenti za članove modela. Za aproksimacijski model prinosa karnozinske kiseline analizom varijance je utvrđeno da je model značajan ($F = 16,80$ uz vjerovatnost 0,32% da potječe od šuma). Nedostatak modela (*eng. Lack of fit*) je statistički značajan ($P = 70,77$) za $p < 0,05$. Iz tablice je također vidljivo da je na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz ružmarina najveći utjecaj imalo otapalo što je potvrđeno statistički značajnim linearnim članom modela ($p < 0,05$), a utjecaj vremena i omjera kruto-tekuće se nije pokazao statistički značajnim.

Vizualni prikaz parametara i njihova utjecaja na prinos karnozinske kiseline dan je 3D dijagramom odzivne površine (**Slika 14.**) gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđeni prinos karnozinske kiseline za ispitivane kombinacije sastava otapala i vremena

ekstrakcije pri konstantnom omjeru kruto-tekuće 30 mL/g. Iz dijagrama je vidljivo da porastom udjela etanola u vodenoj otopini etanola linearno raste prinos karnozinske kiseline dok vrijeme trajanja ekstrakcije nema utjecaj na prinos karnozinske kiseline.

Kao najprihvatljiviji model u slučaju ispitivane antioksidacijske aktivnosti pokazao se kvadratni model ($R = 0.977$). Za aproksimacijski model antioksidacijske aktivnosti analizom varijance je utvrđeno da je model značajan ($F = 12,80$ uz vjerovatnost 0,68 % da potječe od šuma; nedostatak modela nije statistički značajan za $p < 0,05$) (**Tablica 8.**). Volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola se pokazao statistički značajnim ($p < 0.05$) i uvelike je utjecao na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina dok su se vrijeme ekstrakcije i omjer kruto-tekuće pokazali statistički neznačajnim. Volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola je uz linearni imao i kvadratni utjecaj na porast antioksidacijske aktivnosti u ispitivanim ekstraktima ružmarina što je grafički prikazano trodimenzionalnim dijagramom odzivne površine (**Slika 15.**).

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 10, a prema jednadžbi (15) izračunato je da su optimalni uvjeti ekstrakcije, za ispitivano eksperimentalno područje, karnozinske kiseline iz ružmarina uz poželjnost 0,949: 100%-tna otopina etanola, 10 minutna ekstrakcija i omjer kruto-tekuće 20 mL/g. Pri navedenim uvjetima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos karnozinske kiseline od 29,49 mg/g_{s.t.}.

Numeričkom optimizacijom prema jednadžbi (16) određeno je da su optimalni uvjeti za najbolju antioksidacijsku aktivnost, za ispitivano eksperimentalno područje, uz poželjnost 1: 40 % vodena otopina etanola, 10 minutna ekstrakcija i omjer kruto-tekuće 40 mL/g. Pri navedenim uvjetima određeno je da bi se mogla ostvariti maksimalna antioksidacijska aktivnost od 0,12 mg_{inhib.DPPH}/g_{s.t.}.

Prema izračunatim optimalnim uvjetima ekstrakcije karnozinske kiseline i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata ružmarina provedena je ekstrakcija pri određenim optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti modeliranja i optimiranja procesa ekstrakcije karnozinske kiseline i antioksidacijske aktivnosti. Eksperimentalni rezultati koji su dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima za ekstrakciju i antioksidacijsku aktivnost pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim modelom što je prikazano u **Tablici 9.**

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka, njihove statističke obrade i rasprave za uvjete provedbe eksperimenata izvedeni su sljedeći zaključci:

- ✓ U preliminarnom istraživanju u ekstraktima osušenog ružmarina utvrđen je sadržaj karnozinske kiseline od 22,73 do 36,07mg/g_{s.t.}. Najveći sadržaj karnozinske kiseline (36,07mg/g_{s.t.}) imao je ekstrakt pripremljen ekstrakcijom na ultrazvučnoj kupelji pri 37 kHz, tijekom 10 min.
- ✓ Prilikom rada prema Box-Behnkenovom planu pokusa u ekstraktima osušenog ružmarina dokazano je 0,04 do 29,44 mg/g_{s.t.} karnozinske kiseline.
- ✓ Sastav otapala je značajno utjecao na ekstraktibilnost karnozinske kiseline iz osušenog ružmarina kao i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina dok je utjecaj vremena ekstrakcije i omjera kruto-tekuće bio statistički neznačajan.
- ✓ Za opisivanje procesa ekstrakcije karnozinske kiseline najprihvatljiviji se pokazao linearni model. Ispitivani matematički model pokazao je dobra slaganja eksperimentalnih i aproksimiranih vrijednosti karnozinske kiseline i visok stupanj korelacije ($R = 0,984$) no nedostatak modela je bio statistički značajan ($P = 70,77$) za $p < 0,05$ što ukazuje na to da model nije u potpunosti prikladan za opisivanje kruto-tekuće karnozinske kiseline iz osušenog ružmarina.
- ✓ Optimalni uvjeti ekstrakcije za postizanje maksimalnog prinosa karnozinske kiseline pri ispitivanim uvjetima su: 100 %-tna otopina etanola, 10 minuta i omjer kruto-tekuće 20 mL/g. Modelom predviđeni maksimalni prinos karnozinske kiseline koji bi se mogao postići pri navedenim uvjetima je 29,49 mg/g_{s.t.}
- ✓ U ekstraktima osušenog ružmarina utvrđena je antioksidacijska aktivnost od 0,09 do 0,18 g_{inhib.} DPPH/g_{s.t.}.
- ✓ Sastav otapala je značajno utjecao na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina dok je utjecaj vremena i omjera kruto-tekuće, kao i kod karnozinske kiseline, bio statistički neznačajan.

- ✓ Za razliku od procesa ekstrakcije karnozinske kiseline, utjecaj uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina najbolje je opisao kvadratni model koji je pokazao dobra slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka ($R = 0,977$) dok je nedostatak modela pri aproksimaciji bio statistički neznačajan za $p < 0.05$. Model se pokazao kao prikladan za opisivanje utjecaja uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ružmarina.
- ✓ Optimalni uvjeti za postizanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti su: 40 % vodena otopina etanola, 10 minuta i omjer kruto-tekuće 40 mL/g. Modelom predviđena maksimalna antioksidacijska aktivnost ekstrakata iznosila je $0,12 \text{ mg}_{\text{inhib.DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$.

7. LITERATURA

Abreu M E, Muller M, Alegre L, Munne-Bosch S: Phenolic diterpene and atocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:2648–2653, 2008.

Aoyagi Y, Tahashashi Y, Satake Y, Takeya K, Aiyama R, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kurihara T: Cytotoxicity of abietane diterpenoids from *Perovskia abrotanoides* and of their semisynthetic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14:5285-5291, 2006.

Ašić S. : *LJEKOVITO BILJE*. Dušević i Kršovnik, Rijeka, 1999.

Barni M V, Carlini M J, Cafferata E G, Puricelli L, Moreno S: Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncology Reports* 27:1041-1048, 2012.

Bauer J, Kuehn S, Rollinger J M, Scherer O, Northoff H, Stuppner H, Werz O, Koeberle A: Carnosol and carnosic acid from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342:169-176, 2012.

Bernardes W A, Lucarini R, Tozatti M G, Souza M G, Silva M L, Filho A A, Martins C H, Crotti A E, Pauletti P M, Groppo M, Cunha W R: Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry&Biodiversity* 7:1835–1840, 2010.

Bezerra MA, Santelli R E, Oliveira E P, Villar L S, Escaliera L A: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.

Birtić S, Dussort P, Pierre F-X, Bily A C, Roller M: Carnosic acid. *Phytochemistry* 115:9-19, 2015.

Bradley N: *The response surface methodology; master of science in applied mathematics & computer science*. Department of Mathematical Sciences Indiana University of SouthBend, 2007.

Brieskorn C H, Fuchs A, Bredenberg J B, McChesney J D, Wenkert E: The structure of carnosol. *The Journal of Organic Chemistry* 29:2293–2298, 1964.

Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karlović D, Ježek D, Vikić Topić D, Karlović S, Bosiljkov T: Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 4:32-37, 2009.

Bruckner K, Božić D, Manzano D, Papaefthimiou D, Pateraki I, Scheler U, Ferrer A, de Vos R C, Tissier A: Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary *Rosmarinus officinalis* glandular trichomes. *Phytochemistry* 101:52–64, 2014.

Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno–tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 2008.

Calabrese V, Scapagnini G, Catalano C, Dinotta F, Geraci D, Morganti P: Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *International journal of tissue reactions* 22:5–13, 2000.

Campo J D, Amiot M J: Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection* 63:1359–1368, 2000.

Campo J D, Sergeant M, Amiot M J: Determination of the most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: influence of concentration, pH, and NaCl. *Journal of Food Science* 68:2066–2071, 2003.

Carley K M, Kamneva N Y, Reminga J: Response surface methodology. U *CASOS Technical Report*. Carnegie Mellon University, 2004.

Costa S, Utan A, Speroni E, Cervellati R, Piva G, Prandini A, Guerra M C: Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. *Journal of Applied Toxicology* 27:152–159, 2007.

Coulson J M, Richardson J F, Backhurst J R, Hurker J H: *Chemical Engineering*. Pergamon Press, New York, 1978.

Cowan M M: Plant products as antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* 12:564–582, 1999.

Cuvelier M E, Berset C, Richard H: Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:665–669, 1994.

del Bano M J, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, del Rio J A, Ortuno A, Quirin K W, Gerard D: Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4247–4253, 2003.

Dickmann L J, VandenBrink B M, Lin Y S: In vitro hepatotoxicity and cytochrome P450 induction and inhibition characteristics of carnosic acid, a dietary supplement with antiadipogenic properties. *Drug Metabolism & Disposition* 40:1263–1267, 2012.

Drljača i Mrča: *Ultrazvučna ekstrakcija epikatehina i procijandina B₂ iz čokolade*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.

Einbond L S, Wu H A, Kashiwazaki R, He K, Roller M, Su T, Wang X, Goldsberry S: Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative humanbreast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* 83:1160–1168, 2012.

Erjavec F: Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u algine nosače s dodatkom kakaovog praha i rogača. *Završni rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.

Erkan N, Ayranci G, Ayranci E: A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: effect of natural antioxidants. *Food Research International* 42:1171–1177, 2009.

Escribano-Bailon M T, Santos-Buelga C: *Polyphenols Extraction from Foods*. Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2004.

Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A: Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and α -tocopherol in liposomes. *Lipids* 33:751–756, 1998.

Gretić M: Ultrazvučna, mikrovalna i tlačna ekstrakcija otapalom. *Završni rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.

Hadad N, Levy R: The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, β -carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 53:1381–1391, 2012.

Hopia A I, Huang S W, Schwarz K, German J B, Frankel E N: Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:2030–2036, 1996.

Horiuchi K, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T: Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30:287–290, 2007.

Huang S W, Frankel E N, Schwarz K, Aeschbach R, German J B: Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:2951–2956, 1996.

Ibarra A, Cases J, Roller M, Chiralt-Boix A, Coussaert A, Ripoll C: Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* 106:1182–1189, 2011.

Jerković I, Radonić A: *Ekstrakcija (praktikum iz organske kemije)*. Sveučilište u Splitu, Split, 2009.

Juretić H: Napredni oksidacijski postupci u obradi brodskih balastnih voda. *Doktorski rad*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2007.

Kamatou G P P, Viljoen A M, Steenkamp P: Antioxidant, anti inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry* 119:684–689, 2009.

Kontogianni V G, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki A A, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Gerothanassis I P, Tzakos A G: Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *OO* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry* 136:120–129, 2013.

Kosaka K: Anti-ageing effect of rosemary by the biophylaxis mechanism: activation of Nrf2 biophylaxis mechanism and suppression of the glycation stress. *Food Style* 21(16):46–49, 2012.

Lee J J, Jin Y R, Lee J H, Yu J Y, Han X H, Oh K W, Hong J T, Kim T J, Yun Y P: Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica* 73:121–127, 2007.

Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47–56, 2005.

Lopez-Jimenez A, Garcia-Caballero M, Medina M A, Quesada A R: Antiangiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European Journal of Nutrition* 52:85–95, 2013.

Lovrić S: Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci. *Završni rad*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2014.

Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.

Luis J G: Chemistry, biogenesis, and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* 63–82, 1991.

Luis J C, Johnson C B: Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Spanish Journal Of Agricultural Research* 3:106–112, 2005.

Marinova D, Ribarova F, Atanassova M: Total phenolic and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40:255-260, 2005.

Munne-Bosch S, Alegre L: Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210:925–931, 2000.

Munne-Bosch S, Alegre L: Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiology* 125:1094–1102, 2001.

Munne-Bosch S, Alegre L: Drought-induced changes in the redox state of atocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of *Labiatae* species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* 131:1816–1825, 2003.

Nabekura T, Yamaki T, Hiroi T, Ueno K, Kitagawa S: Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. *Pharmacological Research* 61:259-263, 2010.

Naczki M, Shahidi F: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography* 1054:95-111, 2004.

Ngo S N T, Williams D B, Head R J: Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51:946–954, 2011.

Nollet M L, Toldra L: *Food analysis by HPLC (third edition)*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2003.

Offord E A, Gautier J C, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Kramer K, Applegate L A: Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 32:1293–1303, 2002.

Oh J, Yu T, Choi S J, Yang Y, Baek H S, An S A, Kwon L K, Kim J, Rho H S, Shin S S, Choi W S, Hong S, Cho J Y: Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. *Mediators of Inflammation* 1–13, 2012.

Ojeda-Sana A M, Repetto V, Moreno S: Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29:137–144, 2013.

Pejić M: Utjecaj uvjeta sušenja i ekstrakcije na sadržaj fenolnih tvari u ekstraktima ploda divlje ruže. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2010.

Thes I: Utjecaj uvjeta krute-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost proteina iz pšeničnog brašna s različitim udjelom mineralnih tvari. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2012.

Penuelas J, Munne-Bosch S: Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* 10:166–169, 2005.

Planinić M, Bucić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. U *Proceedings of International Congress Flour-Bread'03 and 6. Croatian Congress of Cereal Technologists*, str. 102-108. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2004.

Režek Jambrak A: Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.

Režek Jambrak A, Lelas V, Herceg Z, Badanjak M, Werner Z: Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kemija u industriji* 59(4):169-177, 2010.

Režek Jamrak A, Lelas V, Herceg Z, Badanjak M, Batur V, Muta M: Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59(4):267-281, 2009.

Ribeiro – Santos R, Carvalho – Costa D, Cavaleiro C, Costa H S, Albuquerque T G, Castilho M C, Ramos F, Melo N R, Sanches – Silva A: A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology* 45:355-368, 2015.

Richheimer S L, Bernart M W, King G A, Kent M C, Bailey D T: Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society* 73:507–514, 1996.

Richhelmer S L, Bailey D T, Bernart M W, Kent M, Vininski J V, Anderson L D: Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Research Developments in Oil Chemistry* 3:45–58, 1999.

Romano C S, Abadi K, Repetto V, Vojnov A A, Moreno S: Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry* 115:456–461, 2009.

Ružička L: The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9:357–367, 1953.

Schwarz K, Huang S W, German J B, Tiersch B, Hartmann J, Frankel E N: Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4874–4882, 2000.

Schwarz K, Ternes W: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *European Food Research and Technology* 195:95–98, 1992.

Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski G P, Danilenko M: Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *International Journal of Cancer* 118:3012–3021, 2006.

Souza A B, de Souza M G M, Moreira M A, Furtado N A J C, Martins C H G, Bastos J K, dos Santos R A, Heleno V C G, Ambrosio S R, Veneziani R C S: Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules* 16:9611–9619, 2011.

Spigno G, Tramelli L, De Faveri D M: Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81:200–208, 2007.

Stangler Herodež Š, Hadolin M, Škerget M, Knez Ž: Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food chemistry* 80:275–282, 2003.

Šeruga M: *Kolorimetrija (laboratorijske vježbe iz fizikalne kemije)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 1988.

Tomas S: *Ekstrakcija (izluživanje) i otapanje, kristalizacija i destilacija (interna skripta)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 1997.

Tounekti T, Munne-Bosch S: Enhanced phenolic diterpenes antioxidant levels through non-transgenic approaches. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31:505–519, 2012.

Tsai C W, Lin C Y, Wang Y J: Carnosic acid induces the NAD(P)H: quinoneoxidoreductase 1 expression in rat clone 9 cells through the p38/nuclear factor erythroid-2 related factor 2 pathway. *The Journal of Nutrition* 141:2119–2125, 2011.

Tsao R, Deng Z: Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B* 812:85–99, 2004.

Ursić I: Prednost tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće napafenaka. *Specijalistički rad*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Vilčić Ž: Luženje. U *Tehnička enciklopedija*, str. 572–580. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1980.

Vujić B: *Analitičke metode u monitoringu kvaliteta životne sredine*. Tehnički fakultet Mihajlo Pupin, Zrenjanin, 2013.

Wada M, Kido H, Ohyama K, Kishikawa N, Ohba Y, Kuroda N, Nakashima K: Evaluation of quenching effects of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts against active oxygen species by chemiluminescent assay. *Food Chemistry* 87:261–267, 2004.

Wang T, Takikawa Y, Tabuchi T, Satoh T, Kosaka K, Suzuki K: Carnosic acid (CA) prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway. *Journal of Gastroenterology* 47:805–813, 2012.

Wenkert E, Fuchs A, McChesney J D: Chemical artifacts from the family *Labiatae*. *The Journal of Organic Chemistry* 30:2931–2934, 1965.

Zabot G L, Moraes M N, Rostagno M A, Meireles M A A: Fast analysis of phenolic terpenes by high performance liquid chromatography using a fused core column. *Analytical Methods* 6:7457–7468, 2014.