

# Optimiranje ultrazvučne ekstrakcije fenolnih kiselina iz pljevice ječma metodom odzivnih površina

---

Oršolić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:438393>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ivan Oršolić

**OPTIMIRANJE ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE FENOLNIH KISELINA IZ  
PLJEVICE JEČMA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološke operacije  
Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Jedinične operacije u prehrambenom inženjerstvu  
**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj dana 30. 5. 2019.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić  
**Pomoć pri izradi:** Gordana Šelo, mag. ing. i Josipa Grgić. mag. ing.

**Optimiranje ultrazvučne ekstrakcije fenolnih kiselina iz pljevice ječma metodom odzivnih površina  
Ivan Oršolić, 0113140658**

**Sažetak:** U radu je ispitivan utjecaj temperature ekstrakcije (40, 60 i 80 °C), vremena ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta), koncentracije otapala (50, 70 i 90%-tna vodena otopina etanola) i snage ultrazvuka (40, 60 i 80 % max. efektivne snage) te njihova međusobna interakcija na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz pljevice ječma pomoću kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Uzorci pljevice ječma koji su korišteni u eksperimentima dobiveni su preradom ječma "Favorit" na BC institutu. Nadalje, metodom odzivnih površina su određeni optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije fenolnih kiselina iz uzorka (50 %-tna vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije 10 minuta, temperatura ekstrakcije 80 °C i snaga ultrazvuka 40 % pri 37 kHz i *sweep* modu) pri kojima je modelom predviđen maksimalni prinos ukupnih fenolnih kiselina od 156 µg/g<sub>s.t.</sub>. Radi provjere uspješnosti optimiranja metodom odzivnih površina, ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji je provedena pri utvrđenim optimalnim uvjetima pri čemu je prinos ukupnih fenolnih kiselina iznosio 160,1 µg/g<sub>s.t.</sub>, na osnovu čega se može zaključiti da su eksperimentalni podaci dobiveni provedbom eksperimenta pokazali dobro slaganje s podacima predviđenim modelom.

**Ključne riječi:** pljevica ječma, ultrazvučna ekstrakcija, fenolne kiseline, optimiranje, metoda odzivnih površina

*Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost "Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)*

**Rad sadrži:** 44 stranice  
16 slika  
7 tablica  
25 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Mirela Planinić           | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić           | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić | član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. Marina Tišma         | zamjena člana |

**Datum obrane:** 27. rujna 2019.

**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

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Faculty of Food Technology Osijek**

**Department of Process Engineering**

**Sub-department of Unit Operations**

Franje Kuhača 20, HR-31 000 Osijek, Croatia

**Graduate program:** Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Unit Operations in Food Engineering

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 30, 2019.

**Mentor:** Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.

**Technical assistance:** Gordana Šelo, mag. ing. and Josipa Grgić, mag. ing.

**Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Acids from Barley Husk by Response Surface Methodology**  
**Ivan Oršolić, 0113140659**

**Summary:** The effects of extraction temperature (40, 60 and 80 °C), time of extraction (10, 20 and 30 minutes), solvent concentration (50, 70 and 90 %, v/v ethanol/water) and ultrasound power (40, 60 and 80 % of max. effective power) as well as their interaction on phenolic acids extractability from barley husk by ultrasound assisted extraction were studied. Barley husk samples used in experiment were obtained by processing of barley variety "Favorit" cultivated on a BC institute. Response surface methodology was used to determine the optimal extraction conditions of phenolic acids (ethanol/water ratio in solvent 50%, extraction time 10 minutes, temperature of extraction 80 °C and ultrasound power of 40 % on 37 kHz at sweep mode). The content of phenolic acids obtained under the above optimum extraction conditions was 156 µg/g<sub>db</sub>. The efficiency of optimization with response surface methodology was tested using the recommended optimal conditions for ultrasound extraction where 160.1 µg/g<sub>db</sub> of total phenolic acids was achieved. Based on this, it can be concluded that experimental results obtained under optimal extraction conditions were found to be in good agreement with the predicted ones.

**Key words:** barley husk, ultrasound extraction, phenolic acids, optimization, response surface methodology

*Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project "Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)*

**Thesis contains:** 44 pages  
16 figures  
7 tables  
25 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

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

**Defense date:** 27<sup>th</sup> September 2019.

**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 profesorici Ani Bucić-Kojić na pomoći i mentoriranju pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem i asistenticama Gordani Šelo i Josipi Grgić na tehničkoj pomoći prilikom izrade rada.

Zahvaljujem se i roditeljima što su uvijek bili uz mene i pružili mi nesebičnu podršku tijekom mog studiranja.

Zahvale idu i svima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi rada.

# Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2.1. JEČAM.....</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1.1. Struktura zrna ječma.....  | 2         |
| 2.1.2. Klasifikacija ječma.....   | 3         |
| <b>2.2. FENOLNE TVARI.....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.2.1. Fenolne kiseline.....  | 4         |
| 2.2.2. Antioksidansi.....   | 5         |
| 2.2.3. Antioksidativna svojstva fenolnih tvari.....                     | 5         |
| <b>2.3. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI.....</b>                      | <b>7</b>  |
| 2.3.1. Određivanje fenolnih tvari primjenom spektrofotometrije.....     | 7         |
| <b>2.4. EKSTRAKCIJA.....</b>  | <b>9</b>  |
| 2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....                                     | 11        |
| 2.4.2. Kruto-tekuća ekstrakcija.....                                    | 12        |
| 2.4.3. Prijenos mase u operaciji kruto-tekuća ekstrakcija.....          | 13        |
| <b>2.5. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA.....</b> | <b>14</b> |
| 2.5.1. Metoda odzivnih površina.....                                    | 14        |
| 2.5.2. Box-Behnken dizajn.....  | 16        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>                                      | <b>17</b> |
| <b>3.1. ZADATAK.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3.2. MATERIJALI I METODE.....</b>                                    | <b>17</b> |
| 3.2.1. Određivanje suhe tvari.....                                      | 17        |
| <b>3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH KISELINA IZ PLJEVICE JEČMA.....</b>        | <b>18</b> |
| 3.3.1. Kruto-tekuća ekstrakcija u vodenoj kupelji.....                  | 18        |
| 3.3.2. Kruto-tekuća ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji.....             | 19        |
| 3.3.3. Centrifugiranje.....   | 20        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.4. Određivanje ukupnih fenolnih tvari.....   | 20        |
| 3.3.5. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari.....   | 21        |
| 3.3.6. Postupak određivanja ukupnih fenolnih tvari.....  | 21        |
| 3.3.7. Određivanje flavonoida.....   | 22        |
| 3.3.8. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje flavonoida.....   | 22        |
| 3.3.9. Postupak određivanja flavonoida.....  | 22        |
| 3.3.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima pljevice ječma.....  | 23        |
| 3.3.11. Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti.....   | 23        |
| 3.3.12. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti.....  | 23        |
| 3.3.13. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma.....   | 24        |
| 3.3.14. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina.....   | 25        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>   | <b>27</b> |
| 4.1. Određivanje suhe tvari.....   | 27        |
| 4.2. Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari.....   | 27        |
| 4.3. Kalibracijska krivulja za određivanje flavonoida.....   | 28        |
| 4.4. Izračunavanje masenog udjela ukupnih fenolnih tvari i flavonoida.....   | 29        |
| 4.5. Preliminarna istraživanja.....  | 30        |
| 4.6 Utjecaj procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz pljevice ječma te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina..... | 30        |
| 4.7. Modeliranje procesa ekstrakcije fenolnih kiselina .....   | 32        |
| 4.8. Optimiranje ekstrakcije ukupnih kiselina.....   | 34        |
| 4.9. Provjera uspješnosti optimiranja procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije metodom odzivnih površina.....  | 35        |
| 4.10. Profil i udio fenolnih kiselina u ekstraktu pljevice ječma pri optimalnim uvjetima ekstrakcije.....  | 36        |
| 4.11. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta ječma.....  | 37        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>6. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b>  | <b>43</b> |

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>A</i>                | apsorbancija  |
| <i>AA</i>               | antioksidacijska aktivnost [ $\text{g}_{\text{inhibiranog DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ]        |
| <i>c</i>                | masena koncentracija fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}/\text{mL}$ ]                    |
| <i>c</i>                | maseni udio fenolnih tvari [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ]                               |
| <i>C<sub>UFK</sub></i>  | maseni udio ukupnih fenolnih kiselina [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ]                    |
| <i>C<sub>GAE</sub></i>  | masena koncentracija galne kiseline [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ]                        |
| <i>C<sub>CE</sub></i>   | masena koncentracija (+)-katehina [ $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$ ]                           |
| <i>k</i>                | broj varijabli  |
| <i>P<sub>_UZV</sub></i> | snaga ultrazvuka  |
| <i>p</i>                | razina signifikantnosti   |
| <i>R</i>                | koeficijent korelacije  |
| <i>T</i>                | temperatura ekstrakcije [ $^{\circ}\text{C}$ ]  |
| <i>t</i>                | vrijeme ekstrakcije [min]   |
| <i>v/v</i>              | volumni omjer 96 % etanol:voda  |
| <i>X<sub>1</sub></i>    | ispitivano otapalo [% , v/v]  |
| <i>X<sub>2</sub></i>    | ispitivano vrijeme ekstrakcije [min]  |
| <i>X<sub>3</sub></i>    | ispitivana temperatura ekstrakcije [ $^{\circ}\text{C}$ ]   |
| <i>X<sub>4</sub></i>    | ispitivana snaga ultrazvuka [%]   |
| <i>Y<sub>UFK</sub></i>  | modelom predviđeni maseni udio ukupnih fenolnih kiselina [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ] |

### KRATICE:

|      |                              |
|------|------------------------------|
| CE   | ekvivalenti (+)-katehina     |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| db   | suha tvar                    |
| df   | stupnjevi slobode            |



|                      |   |
|----------------------|---|
| EtOH                 | etanol  |
| <i>F</i> -vrijednost | faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge      |
| GAE                  | ekvivalenti galne kiseline  |
| HPLC                 | tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti                    |
| inhib. DPPH          | inhibirani DPPH   |
| MS varijanca         | prosječno odstupanje varijanata od prosječne vrijednosti uzoraka  |
| s.t.                 | suha tvar   |
| SS                   | suma kvadrata odstupanja svih varijanata od prosječne vrijednosti |
| UFK                  | ukupne fenolne kiseline   |

**SIMBOLI:**

$\varphi$  volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola [%, v/v]

## **1.UVOD**

Ječam je široko rasprostranjena žitarica koja se uglavnom koristi za prehranu životinja i kao sirovina u proizvodnji piva, dok se za prehranu ljudi koristi svega 2 % od ukupne svjetske proizvodnje ove žitarice. Novija istraživanja su pokazala da zrna ječma sadrže brojne komponente koje su korisne za održavanje zdravlja poput  $\beta$ -glukana, esencijalnih masnih kiselina, minerala, vitamina i bioaktivnih spojeva poput fenolnih kiselina. Tijekom prerade ječma nastaje određena količina proizvodnih ostataka u kojima zaostaje nutritivnih tvari, stoga je neophodno vršiti daljnja istraživanja u svrhu iskorištavanja potencijala proizvodnih ostataka kao izvora korisnih nutritivnih tvari (Šimić i sur., 2017).

Fenolne tvari su skupina kemijskih spojeva koji se dijele u različite grupe s obzirom na kemijsku strukturu i prisutni su u većini hrane biljnog podrijetla u malim količinama (0,1-0,3 %). Brojna istraživanja su potvrdila njihov koristan utjecaj na zdravlje kroz njihova antioksidativna svojstva i modulaciju velikog broja enzima i staničnih receptora, pa je danas razvijen veliki broj metoda za ekstrakciju fenolnih tvari iz različitih biljnih izvora (Manach i sur., 2004).

Za pravilnu provedbu procesa ekstrakcije potrebno je izabrati odgovarajuću metodu. Izbor metode ovisi o kemijskim svojstvima tvari koja se želi ekstrahirati, veličini čestica uzorka i drugim fizikalno-kemijskim svojstvima uzorka, dok prinos ekstrakcije ovisi o procesnim parametrima poput temperature, vremena i sastava ekstrakcijskog otapala (Mojzer i sur., 2016).

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj različitih procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (temperatura, vrijeme, koncentracija ekstrakcijskog otapala i snaga ultrazvuka) na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz proizvodnog ostatka prerade ječma (pljevica ječma) te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. JEČAM

Ječam (*Hordeum vulgare*) je jednogodišnja biljka iz porodice travi (*Poaceae*) koja potječe iz Azije. Koristi se za ishranu životinja, izvor fermentabilnih tvari za pivo i određena destilirana alkoholna pića i za ishranu čovjeka.

Središnja Europa je regija s najvećim uzgojem ječma na svijetu, a posebno se ističu Njemačka i Češka koje su inače i jedne od najvećih proizvođača piva, za što se većina uzgojenog ječma i koristi.

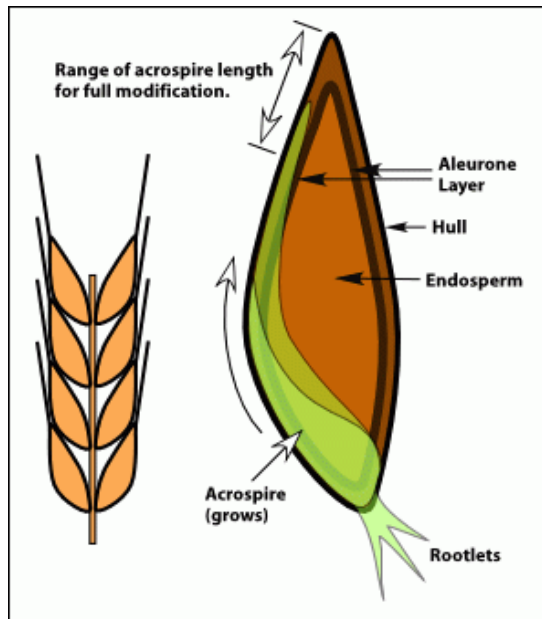
Ječam je izuzetno prilagodljiva biljka koja se uzgaja diljem svijeta, a posebno se ističe njegova adaptacija na slanija tla, na što je većina žitarica kao npr. pšenica, jako osjetljiva. Kao ljetni usjev se uzgaja u područjima s umjerenom klimom, dok se kao zimski usjev uzgaja u tropskim područjima (Kunze, 2003).

### 2.1.1. Struktura zrna ječma

Zrno ječma sastoji se od 3 dijela: embrionalni dio, endosperm i omotač (**Slika 1**). Embrionalni dio sadrži embrio iz kojega klijanjem nastaje nova biljka, nodije i korijenčići. Embrionalni dio je odvojen od endosperma s tankim slojem tkiva koje se sastoji od stanica palisadnog oblika.

Endosperm se sastoji od stanica koje u sebi sadrže škrob. Debljina staničnog zida stanica škroba zavisi od vrste ječma i uvjeta razvoja. Pivske vrste ječma imaju tanje stanične zidove od ječma za ishranu stoke. Endosperm je okružen s aleuronskim slojem koji se sastoji od stanica bogatih proteinima, mastima, fenolnim tvarima i obojenim tvarima, te je on najvažniji dio zrna za produkciju enzima tijekom gnječenja u proizvodnji slada za pivo.

Omotač se sastoji od sedam različitih slojeva koja se jednostavnije mogu podijeliti u 3 sloja. Unutarnji sloj ili *testa* je sloj koji okružuje aleuronski omotač. To je polupropusni sloj koji dopušta prolazak vode kroz zrno. Sljedeći omotač je perikarp koji je izvana okružen s dvije ljuske koje štite zrno. Ljuske se u najvećem dijelu sastoje od celuloze u koju su smještene manje količine tvari kao što su fenolne tvari, testinska kiselina i tvari koje daju gorčinu (Kunze, 2003).



**Slika 1** Zrno ječma

### 2.1.2. Klasifikacija ječma

Sve vrste ječma mogu se podijeliti u ovisnosti o vremenu uzgoja na zimske i ljetne vrste. Daljnje podjele ječma uključuju dvoredni i šestoredni ječam (broj redova zrna na svakom šiljku), ječam s ljuskom i bez ljuske. Ječam bez ljuske zahtjeva minimalno procesiranje i zadržava većinu endosperma i klice, stoga je pogodniji za prehranu ljudi kao cjelovito zrno ili u obliku brašna. S druge strane ječam s ljuskom je pogodniji za proizvodnju piva zbog ljuske koja doprinosi okusu piva i služi kao filtersko sredstvo tijekom proizvodnje.

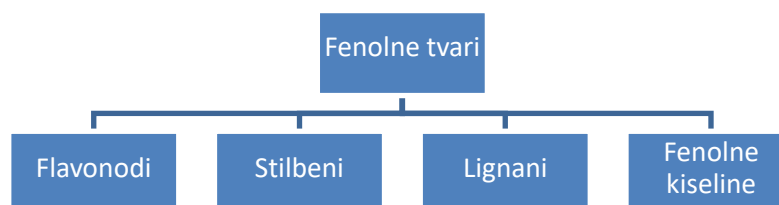
S obzirom na kemijski sastav zrna razlikujemo:

- normalni ječam
- visokoamilozni škrobni ječam
- ječam s povećanom količinom  $\beta$ -glukana
- ječam s zrnima bez proantocijanidina (Gangopadhyay i sur., 2015).

## 2.2. FENOLNE TVARI

Fenolne tvari predstavljaju veliku grupu različitih spojeva koji se, gledajući kemijsku strukturu, sastoje od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom ili više vezanih hidroksilnih skupina. Riječ je o sekundarnim metabolitima čiji su izvori razne vrste voća, povrća i žitarica gdje su uglavnom uključeni u procese obrane protiv raznih vrsta stresa (štetno UV zračenje, napad patogena, parazita i štetni utjecaj reaktivnih kisikovih i dušikovih tvari). Osim zaštite biljaka od stresa, polifenoli u znatnoj mjeri doprinose i poboljšanju organoleptičkih svojstava biljaka (Mojzer i sur., 2016).

S obzirom na kemijsku strukturu, fenolne tvari možemo podijeliti u 4 velike skupine: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (**Slika 2**). Flavonoidi, koji se sastoje od 2 aromatska prstena spojena s 3 ugljikova atoma, dijele se u 6 podskupina: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli. Različita kemijska struktura je uzrok različitih karakteristika među skupinama fenolnih tvari (metabolizam, apsorpcija, izlučivanje), ali i sposobnosti da se vežu s ugljikohidratima, organskim kiselinama te međusobno u veće molekule (Manach i sur., 2004).



**Slika 2** Podjela fenolnih tvari

### 2.2.1. Fenolne kiseline

Sve fenolne kiseline se mogu podijeliti u dvije skupine: derivati benzojeve kiseline i derivati cimetne kiseline. Galna kiselina je najpoznatiji predstavnik derivata hidroksibenzojeve kiseline koje u biljkama nalazimo u slobodnom obliku ili esterskim vezama povezane s drugim molekulama kao što su tanini. One se mogu pronaći samo u nekoliko biljaka koje ljudi koriste za prehranu, stoga nisu od prevelikog interesa u prehrambenoj industriji.

Cimetna kiselina i njezini derivati su u značajno većoj količini prisutni u gotovo svim jestivim biljkama, a od njih najčešće i u najvećim količinama se nalaze *p*-kumarinska, kofeinska, sinapinska i ferulinska kiselina. Ostale kiseline kao što su gentizinska i siringinska mogu se pronaći u specijalnim prirodnim izvorima (Stalikas, 2007). Ove kiseline se rijetko nalaze u

slobodnom obliku, uglavnom se povezuju s drugim molekulama, ali i međusobno pomoću glikozidnih i esterskih veza. Iznimka je procesirana hrana gdje tijekom procesa smrzavanja, sterilizacije ili fermentacije dolazi do kidanja veza i oslobađanja kiselina u slobodnom obliku.

Najveće koncentracije fenolnih kiselina, 0.5-2 g/kg svježeg voća, pronađene su u borovnicama, kiviju, šljivama, trešnjama, višnjama i jabukama. Kafeinska kiselina je najčešće prisutna kiselina koja u većini voća predstavlja najveći udio od ukupnog udjela fenolnih kiselina, dok je ferulinska kiselina u mnogim žitaricama najčešće prisutna u najvećoj količini u odnosu na druge fenolne kiseline (Manach i sur., 2004).

### **2.2.2. Antioksidansi**

Antioksidansi su molekule koje imaju sposobnost inhibicije reakcija slobodnih radikala i time sprječavanja oštećenja stanica. U ovisnosti o njihovoj aktivnosti, antioksidansi mogu postojati u enzimatskom i neenzimatskom obliku u intracelularnom ili ekstracelularnom okruženju. Enzimatski antioksidansi razgrađuju slobodne radikale i uklanjaju ih, dok neenzimatski u prisutnosti kofaktora kao bakar, cink, mangan ili željezo, radikale konvertiraju do vodikova peroksida ( $H_2O_2$ ), a zatim i do molekula vode, odnosno oni prekidaju lančane reakcije radikala. Vitamini C i E, fenolne tvari, karotenoidi i glutationi spadaju u neenzimatske antioksidanse (Nimse i Pal, 2015).

Glavni izvori radikala u organizmu su reaktivni oblici kisika koji se stvaraju kao posljedica postepene redukcije molekularnog kisika u jednoelektronskim reakcijama. Radikali u nizu lančanih reakcija imaju sposobnost oksidirati membranske proteine, lipide i nukleinske kiseline, a moguće posljedice su starenje stanica ili razvoj bolesti kao što su Parkinsonova ili Alzheimerova bolest. Oni također povećavaju rizik od obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti, vjerojatno destabilizacijom staničnih membrana ili oksidacijom LDL lipoproteina (Kurek-Gorecka i sur., 2014).

### **2.2.3. Antioksidativna svojstva fenolnih tvari**

Antioksidativna aktivnost fenolnih tvari je jedna od njihovih najvažnijih osobina. Učinkovitost fenolnih spojeva kao anti radikala i antioksidanasa je različita i ovisi o mnogim faktorima kao



što je broj hidroksilnih grupa vezan za aromatske prstenove (Kurek-Gorecka i sur., 2014; Sroka i Cisowski, 2003).

Fenolni spojevi u biljkama su glavni izvori antioksidativnih tvari zato što imaju potencijal davanja elektrona zbog rezonantne strukture (Yoon Kim i sur., 2018). Unosom kroz hranu mogu biti apsorbirani u nepromjenjivom obliku ili metabolizirani kroz reakcije hidroksilacije, metilacije, sulfatacije. Njihova biodostupnost ovisi o obliku u kojemu se nalaze u hrani, pa tako proteini s kojima tvore veze smanjuju njihovu aktivnost, dok vezani alkoholi povećavaju aktivnost fenolnih tvari. Fenolne tvari se uglavnom razgrađuju u gastrointestinalnom traktu pomoću crijevne mikroflore do raznih fenolnih kiselina što ovisi o strukturi originalne fenolne tvari, dok se manji dio apsorbira u obliku aglikona ili glikozida. Bez obzira na razgradnju, nastali metaboliti fenolnih tvari zadržavaju svoju antioksidativnu aktivnost.

Fenolne tvari mogu djelovati kao antioksidativne tvari kroz različite mehanizme:

- inhibicija aktivnosti enzima i prema tome inhibicija nastanka reaktivnih kisikovih oblika (ROS)
- vezanje kelatnih iona koji sudjeluju u nastanku slobodnih radikala
- hvatanje reaktivnih kisikovih oblika i sprječavanje kaskadnih reakcija koje vode do peroksidacije lipida
- sinergizam s ostalim antioksidansima.

Fenolne tvari imaju sposobnost inhibicije aktivnosti enzima koji sudjeluju u reakcijama stvaranja slobodnih radikala. Primjerice, one smanjuju aktivnost ksantin oksidaze koja oksidira reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), pri čemu nastaje kisikov anionski radikal. Također inhibiraju aktivnost protein kinaze C, askorbinska kiselina oksidaze, ciklooksigenaze i lipooksigenaze (Kurek-Gorecka i sur., 2014).

Fenolne kiseline imaju antioksidativnu aktivnost kao kelatori i hvatači slobodnih radikala, posebno hidroksilnih i peroksidnih radikala. Galna kiselina, jedna od najprisutnijih i najistraženijih fenolnih kiselina, pokazala je puno potencijala na području istraživanja liječenja

od raka prostate. Glavni izvori galne kiseline su jagode, ananas, banane, limuni, crveno i bijelo vino (Mojzer i sur., 2016).

## **2.3. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI**

Usprkos velikom broju istraživanja, kvantifikacija različitih grupa fenolnih spojeva je teška, stoga se razvijaju metode koje su specijalizirane za određivanje specifične grupe fenolnih spojeva.

Najpoznatije tehnike za kvalitativno i kvantitativno određivanje fenolnih spojeva su:

- UV/VIS spektrofotometrija – najpoznatije su Folin-Denis i Folin-Ciocalteu metode
- plinska kromatografija
- HPLC (visokodjelotvorna tekućinska kromatografija)
- TLC (tankoslojna kromatografija) (Khoddami i sur., 2013).

### **2.3.1. Određivanje fenolnih tvari primjenom spektrofotometrije**

Spektrofotometrija je tehnika koja se koristi za karakterizaciju i kvantifikaciju tvari u analitičke svrhe. Svjetlosno zračenje različitih valnih duljina (ultravioletno i vidljivo zračenje) se propušta kroz uzorak, a ovisno o česticama koje se nalaze u uzorku, apsorbira se dio zračenja. Ostatak svjetla koje prođe kroz uzorak određuje se kao funkcija valne duljine s prigodnim detektorom dajući UV/VIS spektar uzorka. Svaka čestica apsorbira svjetlosno zračenje različitih valnih duljina, stoga se može uspostaviti specifična veza između pojedine čestice i njezinog UV/VIS spektra koji se koristi za određivanje čestice. Apsorpcijski spektar je krivulja koja nastaje mjerenjem apsorbancije pri različitim valnim duljinama, a najbolje je odabrati valnu duljinu pri kojoj će mjerenje biti najosjetljivije. Na odabranoj valnoj duljini se mjeri nekoliko različitih koncentracija tvari koje se grafički prikazuju u ovisnosti o apsorbanciji. Baždarni dijagram je

dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine molekula o koncentraciji ili količini molekula u otopini, a priprema se na način da se napravi niz otopina nekog standarda poznate koncentracije, a potom se u pripremljene otopine dodaje specifični reagens koji stupa u reakciju s tvarima koje se žele kvantificirati i dovodi do nastanka obojene reakcije. Intenzitet obojenja mjeri se pri specifičnoj valnoj duljini na spektrofotometru, a rezultati mjerenja dobivenih apsorbancija se koriste za izračun koncentracije željene tvari u uzorku (Strelec i Kovač, 2014; De Carro i Haller, 2015).

Princip spektrofotometrijskog određivanja koncentracije tvari temelji se na sljedećim koracima:

#### **Mjerenje apsorbancije slijepe probe:**

1. Otapalo (voda ili alkohol) se dodaje u prigodnu kivetu koja je transparentna i ne apsorbira zračenje
2. Pomoću izvora svjetla emitira se svjetlosno zračenje kroz kivetu s otapalom
3. Intenzitet odašiljanog svjetla pri različitim valnim duljinama mjeri se detektorom koji se nalazi nakon kivete s otapalom i bilježi.

Slijepa proba nam je potrebna za izračun tvari koja se određuje.

#### **Mjerenje apsorbancije uzorka:**

1. Uzorak se otapa u otapalu i dodaje u kivetu
2. Svjetlosno zračenje emitira se i prolazi kroz kivetu s uzorkom
3. Tijekom prolaska dio zračenja biva apsorbiran od strane uzorka
4. Mjeri se količina svjetla koja je prošla kroz uzorak
5. Intenzitet promjene svjetla pri različitim valnim duljinama se mjeri dijeljenjem svjetla koje je prošlo kroz uzorak s odgovarajućom vrijednosti slijepe probe.

Za razumijevanje same spektrofotometrije bitno je poznavati Lambert - Beerov zakon **(1)**.

$$\log \frac{I_0}{I_p} = A = \varepsilon \cdot s \cdot c_a \quad \mathbf{(1)}$$

gdje je:

$I_0$  – intenzitet ulazne svjetlosti

$I_p$  – intenzitet propuštene svjetlosti

$A$  – apsorbancija

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

$s$  – dužina optičkog puta [m]

$c_a$  – množinska koncentracija tvari [ $\text{mol}/\text{m}^3$ ].

Lambert – Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije uzorka iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije, ako su poznati koeficijent molarne ekstinkcije i dužina optičkog puta. Da bi se zakon mogao koristiti za izračun, apsorbancije bi trebale biti u linearnom rasponu. Optimalni raspon za mjerenja u kome je apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji dan je kao  $0.3 < A < 2.5$ . Stoga je preporučljivo izbjegavati apsorbancije izvan navedenog raspona koje bi dovele do nelinearnog oblika kalibracijske krivulje (De Carro i Haller, 2015).

## 2.4. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje se razlikuju po stupnju topivosti u različitim otapalima. Proces ekstrakcije ovisi o:

- vrsti otapala - o polaritetu tvari ovisi izbor otapala, generalno vrijedi pravilo „slično voli slično“, pa se tako polarne tvari ekstrahiraju s polarnim otapalima
- vremenu ekstrakcije - prilikom povećanja količine tvari potrebno je produljiti vrijeme ekstrakcije
- temperaturi ekstrakcije - povećanjem temperature se povećava količina ekstrahirane tvari
- omjeru uzorak : otapalo

- fizikalnim i kemijskim karakteristikama uzorka iz kojeg se želi ekstrahirati željena komponenta (npr. kod čvrstih tvari treba povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama usitnjavanjem uzorka i homogenizacijom).
- viskoznosti otapala
- volumnom protoku otapala

Za vrijeme mirovanja odvija se prijenos mase, odnosno otopljene tvari prelaze iz uzorka u otapalo.

Prijenos mase odvija se u 3 stupnja:

1. željena komponenta se otapa u otapalu
2. smjesa otopljene tvari i otapala prelazi iz uzorka na površinu
3. otopljena tvar se raspršuje u volumenu otapala.

Za pravilno provođenje ekstrakcije izuzetno je važan izbor otapala. Otapalo koje se koristi za ekstrakciju bi trebalo ispunjavati sljedeće kriterije:

- polarnost – otapalo mora biti slične polarnosti kao i tvar koja se želi ekstrahirati
- točka ključanja – mora biti što niža da olakša odvajanje otapala od komponente
- reaktivnost – otapalo ne smije reagirati s ekstraktom, niti se smije razgrađivati
- viskozitet – otapalo mora imati nizak viskozitet
- stabilnost – stabilno na toplinu, kisik i svjetlo
- nezapaljivo, neškodljivo za okoliš, dostupno u dovoljnim količinama, jeftino.

Za ekstrakciju se najviše koriste heksan, metanol, etanol, aceton i etil acetat. Mogu se koristiti kao pojedinačna otapala, smjesa otapala ili u različitim koncentracijama kao vodene otopine. Metanol se pokazao kao dobro otapalo za ekstrakciju fenolnih tvari s manjom molekularnom težinom, dok se fenolne tvari s većom molekularnom težinom kao što su flavanoli najbolje ekstrahiraju s vodenom otopinom acetona. Nakon provođenja ekstrakcije, otapalo je potrebno ukloniti i to uz pomoć grijanja, destilacije, otparavanja ili neke druge prikladnije tehnološke operacije (Dai i Mamper, 2010; Drmić i Jambrak, 2010).

Sve procese ekstrakcije možemo podijeliti na:

- ekstrakciju kruto-tekuće
- ekstrakciju tekuće-tekuće.

Veliki broj metoda ekstrakcije je razvijen tijekom prošlosti kao što su ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija s mikrovalovima, ultrazvučne ekstrakcija ili ekstrakcija sa stlačenom tekućinom (Garcia-Salas i sur., 2010).

### **2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija**

Potencijal korištenja ove metode za ekstrakciju komponenata iz biljnih materijala je ogroman. Riječ je o metodi koja ne zahtijeva preskupe instrumente i relativno je laka za izvesti u laboratorijskim uvjetima; usitnjeni uzorak se miješa s otapalom i stavlja u ultrazvučnu kupelj koja ima mogućnost postavljanja točne temperature i vremena ekstrakcije.

Ultrazvuk se može stvoriti na različite načine: pokretanjem tekućine, mlazom plina ili najčešće pomoću električne snage.

U prehrambenoj industriji frekvencija ultrazvuka određuje njegovu primjenu za različite svrhe. Visokofrekventni ultrazvučni valovi (100 kHz – 1 MHz) se koriste u analitičkim tehnikama za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava hrane poput tvrdoće, zrelosti, kiselosti i udjela šećera, dok se ultrazvučni valovi nižih frekvencija (16 – 100 kHz) koriste za tehnološke operacije kao što je ekstrakcija (Soria i Willamel, 2010).

Mehanizam djelovanja ultrazvuka visoke snage pri nižim frekvencijama (18-40 kHz) bazira se na stvaranju kavitacijskih mjehurića koji nakon određenog broja ciklusa kontrakcije i ekspanzije implodiraju, pri čemu nastaju udarni valovi koji uzrokuju velike temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa). Nastali tlak i temperatura dovode do promjena u fizikalno-kemijskim svojstvima okolnih molekula; molekule koje grade stanične stijenke se denaturiraju, dolazi do pucanja i razgradnje staničnih stijenki uslijed čega stanični sadržaj prelazi u otapalo i povećava se brzina prijenosa mase (Dai i Mamper, 2010; Drmić i Jambrak, 2010).

### 2.4.2. Kruto-tekuća ekstrakcija

Kruto-tekuća ekstrakcija se odnosi se na sve operacije prijenosa mase u kojima se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala otapalom koje ima sličnu polarnost kao željeni sastojak. Najpoznatije metode kruto-tekuće ekstrakcije su: Soxhlet ekstrakcija, perkolacija i maceracija.

Soxhlet ekstrakcija se najčešće koristi za ekstrakciju i određivanje ukupnog sadržaja lipida u nekom uzorku hrane. Metoda se izvodi na način da se fino samljeveni uzorak stavlja u poroznu vrećicu napravljenu od filter papira ili celuloze koja se smješta u naprstak komore aparata po Soxhletu. Smjesa ekstrakcijskih otapala se zagrijava do temperature ključanja u tikvici iz koje pare isparavaju u komoru s uzorkom, zatim se pare kondenziraju u kondenzatoru i kapi se vraćaju natrag preko uzorka. Kada tekućina napuni sifon, sadržaj se tekućine isprazni natrag u tikvicu i proces se ponavlja sve dok se uzorak ne iscrpi.

Maceracija je tehnika koja se najčešće koristi u proizvodnji vina, a uključuje natapanje krutog materijala (npr. grožđe u proizvodnji vina) s otapalom pri sobnoj temperaturi, uključujući i često miješanje. Svrha procesa je omekšati i razbiti stanične stijenke da bi se oslobodio stanični sadržaj u kome se nalazi željena komponenta. Nakon određenog vremena, smjesa se preša i odvaja se tekući dio (otapalo s ekstraktom) od iskorištenog krutog materijala koji se smatra otpadom.

Perkolacija je proces u kome se suhi uzorak u prahu stavlja u perkolator i ekstrakcija se vrši s kipućom vodom kroz 2 sata. Nakon što je ekstrakcija gotova, otapalo se isparava sve dok se ne dobije koncentrirani ekstrakt.

Na proces kruto-tekuće ekstrakcije utječu:

- temperatura ekstrakcije
- topljivost krute tvari
- veličina čestica krute tvari – manje čestice imaju ukupno veću površinu i time veću dodirnu površinu s otapalom, stoga je ubrzan prijenos otopljene tvari iz krutine u otapalo

- miješanje – povećava se prijenos otopljene tvari iz graničnog sloja oko čestica u glavnu masu otapala zbog turbulencija te se povećava brzina difuzije otopljene tvari kroz pore krute tvari na površini čestica (Azwanida, 2015).

### 2.4.3. Prijenos mase u operaciji kruto-tekuća ekstrakcija

Na površini krutih tvari koje se nalaze u kontaktu s otapalom stvara se sloj zasićene otopine, tj. sloj otopine u kojem koncentracija ima ravnotežnu vrijednost za danu temperaturu ( $c_s$ ). Da bi se proces ekstrakcije nastavio, potrebno je ukloniti otopljenu tvar iz graničnog sloja. To uklanjanje se zbiva na dva načina: difuzijom i konvekcijom. Difuzija je prijenos tvari u molekularnom razmjeru, dok se konvekcija odnosi na prijenos tvari u molarnom razmjeru gdje se skupina molekula giba s mjesta više prema mjestu niže koncentracije.

Brzina otapanja, odnosno količina materijala koja u jedinici vremena prolazi kroz granični sloj iz krute tvari u otapalo, proporcionalna je prije svega veličini kontaktne površine između krute tvari i otapala ( $A$ ), a zatim razlici u koncentraciji između graničnog sloja i srednje koncentracije otapala ( $c_s - c$ ), stoga za brzinu otapanja pišemo formulu **(2)**:

$$\frac{dw}{dt} = K \cdot A \cdot (c_s - c) \quad (2)$$

gdje je:

$w/t$  – brzina prijenosa mase u otapalo [kg/s],

$A$  - dodirna površina između krute tvari i otapala [ $m^2$ ]

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

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

$K$  - koeficijent prijenosa mase [m/s] (Tomas i sur., 2013).



## **2.5. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

Optimizacija je poboljšanje performansi sustava, procesa ili nekog proizvoda s ciljem da se postigne maksimalni benefit uz uštedu energije, sredstava, vremena i postizanje maksimalne kvalitete. U analitičkoj kemiji optimizacija se koristi za otkrivanje uvjeta pri kojima analitičke metode daju najbolje moguće rezultate. Tradicionalno se za optimizaciju analitičkih metoda koristilo praćenje utjecaja jednog parametra kroz vrijeme na eksperimentalne rezultate. Međutim, ovakav pristup zahtjeva previše vremena i zanemaruje se interakcija među parametrima koja u stvarnosti ima utjecaj na sam proces i rezultat tog procesa. Da bi se izbjegli nedostaci ovakvog pristupa za optimizaciju analitičkih procedura, koristi se multivarijabilna statistička tehnika poznata kao metoda odzivnih površina (Bezzera i sur., 2008; Liyana-Pahirana i Shadidi, 2005).

Metoda odzivnih površina je zbirka matematičkih i statističkih tehnika koja se koristi za optimizaciju parametara ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljaka. Glavna prednost u odnosu na ostale metode je u tome što uzevši u obzir sve parametre i njihove međusobne interakcije reducira broj eksperimenata potrebnih za postizanje željenih rezultata što dovodi do uštede vremena, materijala i kemikalija (Jing i sur., 2015).

### **2.5.1. Metoda odzivnih površina**

Metoda odzivnih površina (eng. response surface methodology) sastoji se od matematičkih i statističkih tehnika koje su bazirane na uklapanju empirijskih modela u odnosu na eksperimentalne podatke dobivene odgovarajućim eksperimentalnim dizajnom. Za modeliranje i premještanje procesnih parametara u svrhu optimizacije koriste se linearna funkcija ili funkcija kvadratnog polinoma.

Koraci u primjeni metode odzivnih površina za optimizaciju su: izbor varijabli, izbor eksperimentalnog dizajna, matematičko-statistička obrada podataka, evaluacija prigodnog modela, određivanje optimalnih uvjeta.

Veliki broj parametara ima utjecaj na proces i praktički je nemoguće odrediti sve parametre i vršiti kontrolu nad njima. Stoga je potrebno odabrati procesne parametre koji imaju najveći

utjecaj i koji se mogu relativno lako kontrolirati te na osnovu njihovih međusobnih interakcija odraditi optimizaciju procesa.

Prije upotrebe metode odzivnih površina potrebno je izabrati odgovarajući eksperimentalni dizajn za određivanje eksperimenata koji se trebaju provesti. Provedbom eksperimenta u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta dobiva se odzivna ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, te prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Za aproksimaciju podataka koji se mogu opisati linearnom funkcijom koriste se faktorijalni dizajni, a za one koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su Box-Behnken dizajn, središnji kompozitni dizajn i Doehlert dizajn.

Kodiranje razina parametra sastoji se od transformacije svakog parametra u koordinate unutar skale  $s$  bezdimenzionalnim vrijednostima. Nakon prikupljanja podataka povezanim s pojedinom eksperimentalnom točkom izabranog dizajna, potrebno je pronaći matematičku jednadžbu koja opisuje odgovor u odnosu na razine izabranih parametara.

Model je prigodan za aproksimaciju eksperimentalnih podataka ako je veliki dio promatranih varijacija opisan jednadžbom regresije, a ostali dio varijacija izražen kroz ostatak koji se javlja zbog čiste pogreške (slučajne fluktuacije mjerenja)

Za bolje razumijevanje metode odzivne površine, potrebno je definirati neke osnovne pojmove:

- područje ispitivanja zadano rasponom minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli.
- dizajn eksperimenta – set eksperimenata određenih matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli.
- nezavisne varijable – varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedna od druge i koje se kontroliraju tijekom procesa (temperatura, vrijeme, tlak).
- razina varijabli – različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperimenti provoditi da bi se optimizirao proces.

- odziv ili zavisne varijable – predstavljaju izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija).
- ostatak – razlika između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka, tj. dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti matematičkim modelom. Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom u korelaciji je s niskim vrijednostima ostatka (Bezzeri i sur., 2008).

### 2.5.2. Box-Behnken dizajn

Box-Behnken dizajn predlaže kako izabrati točke eksperimenta kada se ispituje utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenta matematičkog modela prvog i drugog reda.

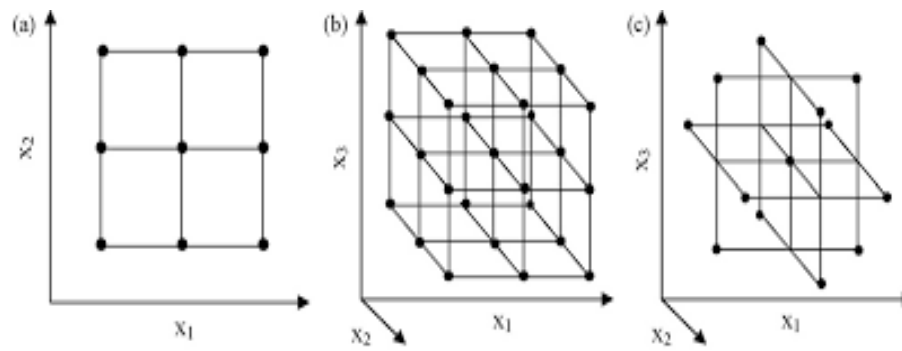
Osnovne karakteristike ovog dizajna su:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu:

$$N = 2k(k - 1) + c_p \quad (3)$$

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

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



**Slika 3** Trofaktorijalni dizajn za optimizaciju (a) dvije varijable i (b) tri varijable i (c) Box-Behnken dizajn za optimizaciju tri varijable (Bezzera i sur., 2008)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj istraživanja je bio ispitivanje utjecaja procesnih parametara kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz pljevice ječma te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije fenolnih kiselina.

Ispitivan je utjecaj temperature ekstrakcije (40-80 °C), koncentracije ekstrakcijskog otapala (etanol/voda: 50-90 % v/v), snage ultrazvuka (40-80 % max. efektivne snage) i vremena trajanja ekstrakcije (10-30 min) te njihove interakcije tijekom ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Eksperimentalni podaci koji su korišteni za planiranje pokusa dobiveni su Box-Behnken dizajnom, a procjena utjecaja ispitivanih parametara na ekstrakciju i njezino optimiranje provedeno je upotrebom programa Design Expert 11 metodom odzivnih površina (eng. response surface methodology ili skraćeno RSM).

Podaci dobiveni optimizacijom u programu Design Expert su provjereni provođenjem ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji pri utvrđenim optimalnim uvjetima u svrhu provjere uspješnosti optimiziranja u navedenom programu.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

U istraživanju su korišteni samljeveni proizvodni ostaci prerade ječma (pljevica ječma) sorte Favorit BC instituta.

#### 3.2.1. Određivanje suhe tvari

Određivanje suhe tvari provedeno je sušenjem uzoraka pljevice ječma termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (**Slika 4**). Uzorak je stavljen na aluminijsku pliticu (oko 3 g), koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje gdje se sušenje provodi do konstantne mase. Uvjeti sušenja su:

- standardna metoda
- temperatura sušenja 105 °C
- kriterij završetka procesa (eng. switch off 3) – gubitak mase od 1 grama u 50 sekundi (Planinić i sur., 2004).

Sušenje ispitivanih uzoraka pljevice ječma se provodilo u dva ponavljanja.



**Slika 4** Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

### **3.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH KISELINA IZ PLJEVICE JEČMA**

U prvom dijelu eksperimentalnog rada provedeno je preliminarno istraživanje s ciljem izbora metode ekstrakcije i određivanja intervala ispitivanih procesnih uvjeta. Uzorak pljevice ječma ekstrahiran je kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji i kruto-tekućom ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji, a zatim su u dobivenim ekstraktima određene ukupne fenolne tvari i flavonoidi. Na osnovu usporedbe rezultata određivanja fenolnih tvari i flavonoida, za daljnje istraživanje i optimizaciju izabrana je metoda kruto-tekuće ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji.

#### **3.3.1. Kruto-tekuća ekstrakcija u vodenoj kupelji**

U staklene bočice je odvagano 1,5 g uzorka pljevice ječma i dodano je 20 ml ekstrakcijskog otapala (70%-tna vodena otopina etanola). Tikvice su začepjene i položene u vodenu kupelj (**Slika 5**) s tresilicom, te je provedena ekstrakcija pri 200 rpm, temperaturi 60 °C i vremenu od 30 minuta u dvije paralele.



**Slika 5** Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23)

### **3.3.2. Kruto-tekuća ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji**

U staklene bočice je odvagano 1,5 g uzorka pljevice ječma i dodano je 20 ml ekstrakcijskog otapala (70%-tna vodena otopina etanola) te je ekstrakcija provedena u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic P 120H (**Slika 6**) pri frekvenciji 37 kHz primjenom dva različita moda (*degas* i *sweep* modovi). *Degas mode* se koristi za brzo otplinjavanje HPLC uzoraka i otapala, a *sweep mode* za homogenu raspodjelu ultrazvučnih valova unutar kupelji. Ekstrakcije na oba moda provedene su pri temperaturi 60 °C, snazi ultrazvuka 60 % u trajanju 30 minuta.



**Slika 6** Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 120H



### 3.3.3. Centrifugiranje

Nakon ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala s ekstraktom je centrifugirana na centrifugi Hermle Z 326 K (**Slika 7**) pri 10 000 x g 10 minuta. Nakon provedenog centrifugiranja supernatant (tekući ekstrakt) je odvojen od taloga. Za određivanje ukupnih fenolnih tvari i flavonoida pripravljeno je odgovarajuće razrjeđenje ekstrakta u ovisnosti o rasponu koncentracija baždarne krivulje.



**Slika 7** Centrifuga Hermle Z 326 K

### 3.3.4. Određivanje ukupnih fenolnih tvari

U ekstraktima pljevice ječma ukupne fenolne tvari određene su Folin-Ciocalteuovom metodom koja spada u grupu kolorimetrijskih metoda. Fenolne tvari iz ekstrakta reagiraju sa specifičnim redoks reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) pri čemu se stvara plavo obojeni kompleks koji se može kvantificirati mjerenjem spektrofotometrom pri vidljivom svjetlosnom zračenju. Nastanak plavo obojenog kompleksa temelji se na oksidaciji fenolnih spojeva i redukciji Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenove kiseline) u wolframov i molibdenov oksid u alkalnoj sredini (Blainski i sur., 2013).

### **3.3.5. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih fenolnih tvari**

Galna kiselina poznate koncentracije korištena je kao standard za izradu kalibracijske krivulje. Otopina galne kiseline je pripravljena otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96 %-tne otopine etanola te nadopunjavanjem otopine destiliranom vodom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL. Zatim su pripravljena različita razrjeđenja tako što je u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom. Postupkom za određivanje ukupnih fenolnih tvari određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline. Iz dobivenih apsorbancija izrađena je krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline (kalibracijska krivulja).

### **3.3.6. Postupak određivanja ukupnih fenolnih tvari**

U epruvetu je otpipetirano 40  $\mu\text{L}$  pripremljenog ekstrakta pljevice ječma, 3160  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon stajanja između 30 sekundi i 8 minuta dodano je 600  $\mu\text{L}$  20 %-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Slijepa proba pripravljena je na isti način, ali umjesto ekstrakta dodano je 40  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Uzorci su promiješani na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 min na 40 °C da se kroz reakciju razvije boja. Apsorbancija je mjerena na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-1280 (**Slika 8**) pri valnoj duljini od 765 nm.

Dobivene apsorbancije su korištene za izračun koncentracije ukupnih fenolnih tvari prema kalibracijskoj krivulji. Koncentracije ukupnih fenolnih tvari izražene su na suhu tvar uzorka ( $\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$ ). Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u dvije paralele po tri ponavljanja.



**Slika 8** Spektrofotometar Shimadzu UV-1280

### **3.3.7. Određivanje flavonoida**

Ukupni flavonoidi su određivani spektrofotometrijskom metodom korištenjem aluminijevog klorida.

### **3.3.8. Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje flavonoida**

Za izradu kalibracijske krivulje korišten je standard (+)-katehina. Otopina (+)-katehina pripremljena je otapanjem 0,2 g katehina u krutom stanju s 10 mL 95 %-tne otopine etanola te nadopunjavanjem destiliranom vodom do oznake na tikvici. Pripremljena su različita razrjeđenja tako da je u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; 2,5 mL i 5 mL pripremljene otopine (+)-katehina te se nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Prema postupku za određivanje flavonoida određena je apsorbancija pripremljenih otopina, a zatim je izrađena i kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji (+)-katehina.

### **3.3.9. Postupak određivanja flavonoida**

U 2 mL destilirane vode dodano je 0,5 mL ekstrakta pljevice ječma, a zatim 0,15 mL 5 %-tnog natrijevog nitrita te je nakon 5 minuta dodano 0,15 mL 10 %-tne vodene otopine

aluminij (III)-klorida-heksahidrata. Nakon 5-8 minuta dodan je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 5 mL. Slijepa proba je pripremljena na isti način jedino što je umjesto ekstrakta dodan jednak volumen destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija ekstrakata na 510 nm.

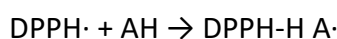
Koncentracija flavonoida u ekstraktima je određena korištenjem kalibracijske krivulje (+)-katehina i preračunata na suhu tvar uzorka (mg/g<sub>s.t.</sub>). Uzorci su analizirani u dvije paralele po tri ponavljanja.

### **3.3.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima pljevice ječma**

Antioksidacijska aktivnost određivana je DPPH metodom na spektrofotometru UV-1280 (Shimadzu), a odabrana je zbog stabilnosti DPPH radikala i brzine metode.

### **3.3.11. Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti**

Metoda se temelji na redukciji sintetskog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH $\cdot$ ) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa (AH) koji u reakciji s radikalom donira jedan atom vodika, a kao produkt nastaje DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A $\cdot$ ) što je prikazano jednadžbom:



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

### **3.3.12. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti**

U epruvetu je otpipetirano 0,1 mL alikvota razrijeđenog ekstrakta (razrjeđenje se radi s otapalom korištenim za ekstrakciju), 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 je spektrofotometrijski

određena apsorbanacija pri valnoj duljini 515 nm u odnosu na slijepu probu (96 %-tna vodena otopina etanola). Otopina DPPH je uvijek pripremana neposredno prije analize i upotrebljavana unutar 24 h, a između mjerenja je čuvana u frižideru na 4 °C zaštićena aluminijskom folijom.

### 3.3.13. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina u ekstraktima provedena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) na uređaju Nexera XR UHPLC (Shimadzu).

Uređaj (**Slika 9**) se sastoji od vakuum otplinjača, dvije binarne pumpe, automatskog uzorkivača, kolonska pećnice, PDA detektora, detektora indeksa loma, kontrolera, računala i odgovarajućeg softvera za obradu podataka (LabSolution).



**Slika 9** Nexera XR UHPLC, Shimadzu

Na HPLC uređaju su određivane koncentracije sljedećih kiselina: 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksifeniloctena kiselina, vanilinska kiselina, kofeinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina i *o*-kumarinska kiselina.

Kromatogrami koji su dobiveni provlačenjem uzoraka kroz HPLC uređaj korišteni su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina u uzorcima. Kvalitativna analiza je provedena usporedbom retencijskog vremena (vrijeme između injektiranja uzorka i pojave odziva na detektoru) fenolnih kiselina u uzorku s retencijskim vremenom nakon injektiranja standarda određene fenolne kiseline poznate koncentracije. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina (određivanje koncentracije) u uzorcima provedena je pomoću softvera LabSolution određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje za svaku fenolnu kiselinu koja je analizirana.

### 3.3.14. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

Za procjenu utjecaja glavnih procesnih parametara ekstrakcije (temperatura i vrijeme ekstrakcije, snaga ultrazvuka i koncentracija otapala za ekstrakciju) i njihove interakcije na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz ekstrakata pljevice ječma (**Tablica 1**) korišten je Box-Behnkenov plan pokusa.

**Tablica 1.** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za ekstrakciju fenolnih kiselina iz ekstrakta pljevice ječma

| Faktor                        | Donja razina | Centralna razina | Gornja razina |
|-------------------------------|--------------|------------------|---------------|
| Kodirane varijable            | -1           | 0                | 1             |
| Otapalo ( $X_1$ , %)          | 50           | 70               | 90            |
| Temperatura ( $X_2$ , °C)     | 40           | 60               | 80            |
| Vrijeme ( $X_3$ , min)        | 10           | 20               | 30            |
| Snaga ultrazvuka ( $X_4$ , %) | 40           | 60               | 80            |

Aproksimacijom eksperimentalnih rezultata pomoću matematičkog modela tj. polinoma drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

gdje je:

$Y$  - modelom predviđena odzivna funkcija

$\beta_0$  – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_j$  – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{jj}$  – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{ij}$  – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

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

$k$  – broj varijabli

konstruirana je odzivna površina koja omogućuje vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara. Odzivna površina može se predstaviti kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara i statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert 11.

Provjera uspješnosti optimiranja procesa ekstrakcije fenolnih kiselina iz pljevice ječma provedena je usporedbom rezultata dobivenih metodom odzivnih površina pomoću softvera s eksperimentalno dobivenim rezultatima pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije.

## **4. REZULTATI**



Eksperimentalno dobiveni podaci kao i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima. Pomoću programskog paketa Design Expert 11 provedeni su dizajn eksperimenta i statistička obrada dobivenih rezultata u ispitivanim procesima, a korištena je metoda odzivnih površina.

#### 4.1. Određivanje suhe tvari

Suha tvar uzorka izmjerena je u dvije paralele na uređaju za određivanje vlage Mettler Toledo standardnom metodom na 105 °C, a suha tvar je izračunata i izražena kao srednja vrijednost dvije paralele. Suha tvar uzorka pljevice ječma iznosila je 90,42%.

#### 4.2. Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari

**Tablica 2.** Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm za pripadajuće koncentracije otopine galne kiseline (GAE)

| $c_{GAE}$ [mg/mL] | 0,05  | 0,1   | 0,15  | 0,2   | 0,25  | 0,5   | 0,75  | 1     |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A (765 nm)        | 0,028 | 0,075 | 0,126 | 0,180 | 0,239 | 0,474 | 0,726 | 0,956 |

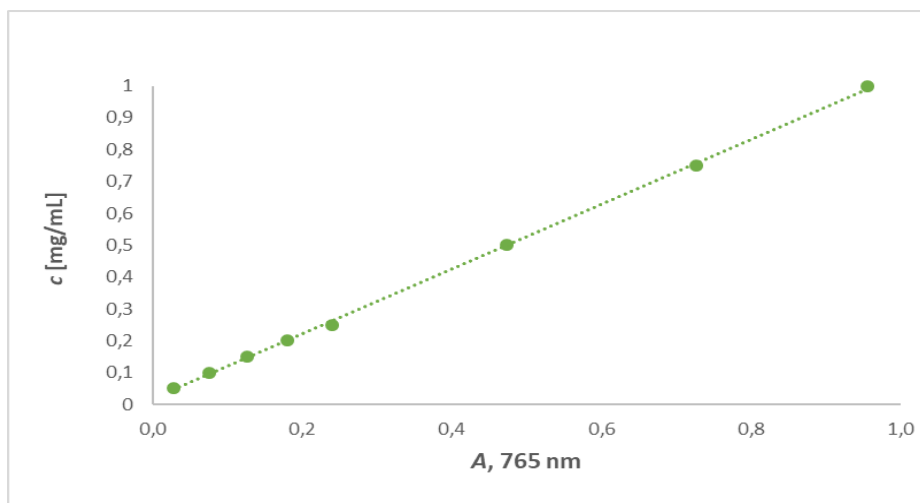
Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

$$y = 1,0188x + 0,018 \quad (5)$$

odnosno :

$$c (\text{ukupne fenolne tvari}) = 1,0188 \cdot A + 0,018 \quad [\text{mg/mL}] \quad (6)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancije.



**Slika 10** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari

### 4.3. Kalibracijska krivulja za određivanje flavonoida

**Tablica 3.** Vrijednosti apsorbanca na valnoj duljini od 510 nm za pripadajuće koncentracije (+)-katehina

| $c_{CE}$ [mg/mL] | 0,02  | 0,04  | 0,06  | 0,08  | 0,1   | 0,2   |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A (510 nm)       | 0,048 | 0,107 | 0,168 | 0,223 | 0,285 | 0,598 |

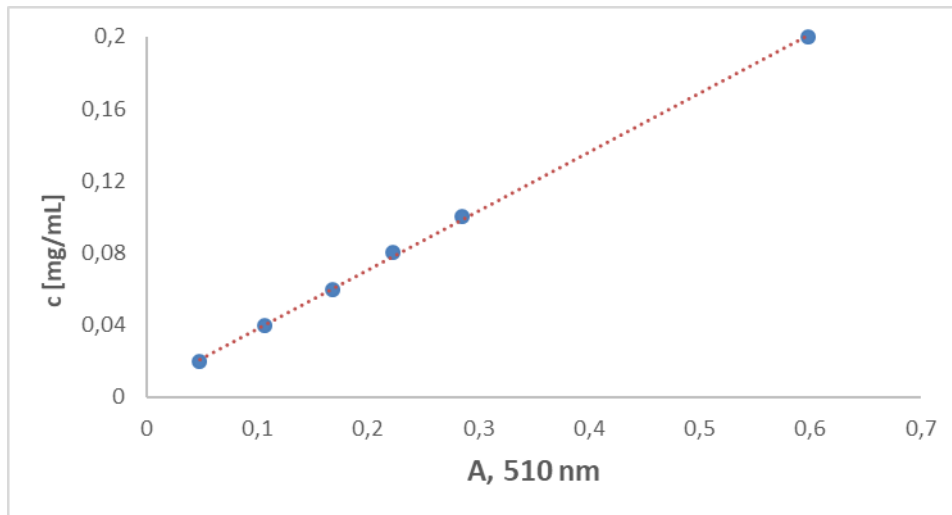
Metodom linearne regresije dobivena je jednačba:

$$y = 0,3267x + 0,0056 \quad (7)$$

odnosno:

$$c (\text{flavonoidi}) = 0,3267 \cdot A + 0,0056 \quad [\text{mg/mL}] \quad (8)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije flavonoida u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbanca.



Slika 11 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih flavonoida

#### 4.4. Izračunavanje masenog udjela fenolnih tvari

Prema jednadžbama (6) i (8) izračunati su maseni udjeli ukupnih fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ], ukupnih flavonoida [ $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$ ] i udjeli fenolnih kiselina koje su preračunate na suhu tvar uzorka prema jednadžbi (9).

$$C = \frac{c \cdot V}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \quad [\text{mg}/\text{g}_{s.t.}] \quad (9)$$

gdje je:

$C$  – maseni udio fenolnih tvari [ $\text{mg}/\text{g}_{s.t.}$ ]

$c$  – masena koncentracija fenolnih tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE (CE)}}/\text{mL}$ ]

$V$  – volumen otapala [mL]

$m_{uz}$  – masa uzorka korištenog za ekstrakciju [g]

$w_{s.t.}$  – udio suhe tvari [%].

#### 4.5. Preliminarna istraživanja

U preliminarnim istraživanjima provedena je ekstrakcija u vodenoj kupelji s tresilicom i ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (*degas* i *sweep* mod) u svrhu odabira metode ekstrakcije za optimizaciju. U **Tablici 4** su prikazani rezultati istraživanja u kojima se može vidjeti da je najveći prinos ukupnih fenolnih tvari ostvaren ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji (*sweep* mod), stoga je navedena metoda izabrana za optimizaciju metodom odzivnih površina.

**Tablica 4.** Ekstrakcija ukupnih fenolnih tvari i flavonoida metodom kruto-tekuće ekstrakcije u vodenoj kupelji i kruto-tekuće ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji

|   | Flavonoidi                     | Ukupne fenolne tvari            |
|---|--------------------------------|---------------------------------|
|   | $C_{CE}[\mu\text{g/g}_{s.t.}]$ | $C_{GAE}[\mu\text{g/g}_{s.t.}]$ |
| Kruto-tekuća ekstrakcija u vodenoj kupelji                          | 1898,00                        | 6262,00                         |
| Kruto-tekuća ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji ( <i>degas</i> mod) | 2276,00                        | 6883,00                         |
| Kruto-tekuća ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji ( <i>sweep</i> mod) | 1945,00                        | 7098,00                         |

#### 4.6. Utjecaj procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz pljevice ječma te određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije metodom odzivnih površina

Eksperimentalno je ispitan utjecaj četiri procesna uvjeta ekstrakcije u tri razine (sastav otapala tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola (50-70-90 %, v/v), temperatura ekstrakcije (40-60-80 °C,  $T$ ), vrijeme trajanja ekstrakcije (10-20-30 min,  $t$ ) i snaga ultrazvuka (40-60-80 %,  $P_{UZV}$ ) na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz ekstrakta pljevice ječma. Za planiranje pokusa korišten je Box-Behnken dizajn eksperimenta, a za statističku obradu dobivenih podataka i optimiziranje ekstrakcije korišten je program Design Expert 11 i metoda odzivnih površina.

**Tablica 5.** Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih kiselina ( $C_{UFK}$ ) u ekstraktima pljevice ječma te antioksidacijska aktivnost ekstrakata, dobivenih pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (udio etanola u vodenoj otopini etanola –  $\varphi$ , vrijeme ekstrakcije –  $t$ , temperatura ekstrakcije –  $T$  i snaga ultrazvuka –  $P_{UZV}$ ) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnken dizajnom (eksperimentalna matrica)

|                   | Faktor $X_1$         | Faktor $X_2$ | Faktor $X_3$ | Faktor $X_4$     | Odziv 1                                 | Odziv 2                                   |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|------------------|---|---|
| broj eksperimenta | $\varphi$<br>[% v/v] | $T$<br>[°C]  | $t$<br>[min] | $P_{UZV}$<br>[%] | $C_{UFK}$<br>[ $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ ] | AA<br>[ $\text{g}_{inh. DPPH/g_{s.t.}}$ ] |
| 1                 | 70                   | 40           | 10           | 60               | 85,00                                   | 0,013                                     |
| 2                 | 90                   | 80           | 20           | 60               | 63,00                                   | 0,012                                     |
| 3                 | 70                   | 60           | 10           | 40               | 77,00                                   | 0,011                                     |
| 4                 | 90                   | 60           | 20           | 80               | 45,00                                   | 0,010                                     |
| 5                 | 50                   | 60           | 10           | 60               | 125,00                                  | 0,010                                     |
| 6                 | 50                   | 60           | 20           | 80               | 110,00                                  | 0,012                                     |
| 7                 | 70                   | 60           | 30           | 40               | 92,00                                   | 0,011                                     |
| 8                 | 90                   | 40           | 20           | 60               | 43,00                                   | 0,010                                     |
| 9                 | 90                   | 60           | 20           | 40               | 51,00                                   | 0,008                                     |
| 10                | 50                   | 80           | 20           | 60               | 156,00                                  | 0,013                                     |
| 11                | 70                   | 60           | 10           | 80               | 80,00                                   | 0,012                                     |
| 12                | 70                   | 40           | 30           | 60               | 90,00                                   | 0,012                                     |
| 13                | 70                   | 60           | 20           | 60               | 86,00                                   | 0,013                                     |
| 14                | 70                   | 80           | 20           | 80               | 101,00                                  | 0,013                                     |
| 15                | 70                   | 60           | 30           | 80               | 84,00                                   | 0,013                                     |
| 16                | 70                   | 60           | 20           | 60               | 84,00                                   | 0,013                                     |
| 17                | 90                   | 60           | 10           | 60               | 52,00                                   | 0,010                                     |
| 18                | 70                   | 40           | 20           | 40               | 86,00                                   | 0,012                                     |
| 19                | 70                   | 80           | 20           | 40               | 88,00                                   | 0,013                                     |
| 20                | 50                   | 40           | 20           | 60               | 129,00                                  | 0,009                                     |
| 21                | 70                   | 49           | 20           | 80               | 86,00                                   | 0,012                                     |
| 22                | 50                   | 60           | 30           | 60               | 137,00                                  | 0,012                                     |
| 23                | 90                   | 60           | 30           | 60               | 86,00                                   | 0,010                                     |
| 24                | 50                   | 60           | 20           | 40               | 140,00                                  | 0,011                                     |
| 25                | 70                   | 80           | 10           | 60               | 108,00                                  | 0,013                                     |
| 26                | 70                   | 60           | 20           | 60               | 83,00                                   | 0,012                                     |
| 27                | 70                   | 80           | 30           | 80               | 78,00                                   | 0,012                                     |

#### 4.7. Modeliranje procesa ekstrakcije fenolnih kiselina

**Tablica 6.** Regresijski koeficijenti za članove modela, koeficijent korelacije ( $R$ ),  $p$  vrijednost za nedostatak modela (linearni model) korištenog za aproksimaciju eksperimentalnih vrijednosti udjela ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma

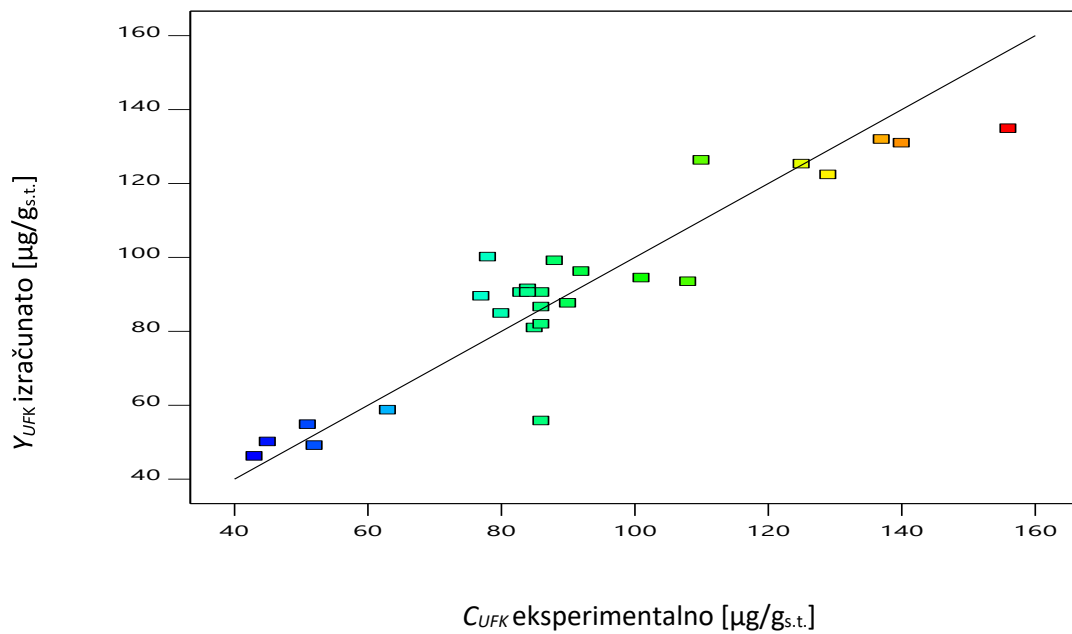
| Koeficijenti                          | Ukupne fenolne kiseline |
|---------------------------------------|-------------------------|
| $\beta_0$ – model                     | 90,56                   |
| $\beta_1$ – otapalo                   | -38,08                  |
| $\beta_2$ – temperatura ekstrakcije   | 6,25                    |
| $\beta_3$ – vrijeme ekstrakcije       | 3,33                    |
| $\beta_4$ – snaga ultrazvuka          | -2,33                   |
| $R$                                   | 0,85                    |
| $p$ – vrijednost za nedostatak modela | < 0.0001                |

**Tablica 7.** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma primjenom višestruke linearne regresije

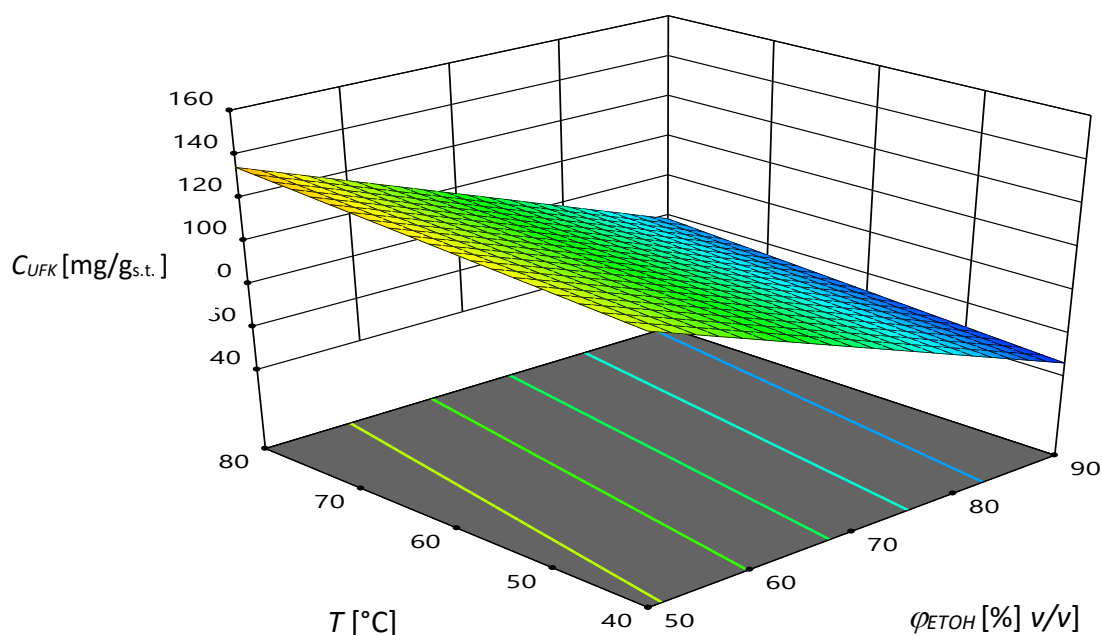
| Izvor varijabilnosti     | SS       | df | MS       | F-vrijednost | p-vrijednost |
|--------------------------|----------|----|----------|--------------|--------------|
| <b>Model</b>             | 18071,50 | 4  | 4517,18  | 31,70        | < 0,0001     |
| $X_1$ - $\varphi$        | 17404,08 | 1  | 17404,08 | 122,13       | < 0,0001     |
| $X_2$ - $T$              | 468,75   | 1  | 468,75   | 3,29         | 0,0834       |
| $X_3$ - $t$              | 133,33   | 1  | 133,33   | 0,9356       | 0,3439       |
| $X_4$ - $W$              | 65,33    | 1  | 65,33    | 0,4585       | 0,5054       |
| <b>Ostatak</b>           | 3 135,17 | 22 | 142,51   |              |              |
| <b>Nedostatak modela</b> | 3130,50  | 20 | 156,52   | 67,08        | 0,0148       |
| <b>Pogreška</b>          | 4,67     | 2  | 2,33     |              |              |
| <b>Ukupno</b>            | 21206,67 | 26 |          |              |              |
| <b><math>R</math></b>    | 0,85     |    |          |              |              |

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti,  $df$  – stupnjevi slobode, MS - varijanca

- **F-vrijednost** modela (31,70) podrazumijeva da je model značajan. Šansa da se ovako velika F-vrijednost pojavila usred greške iznosi svega 0,01%.
- **p-vrijednost** manja od 0,05 ukazuje na značajnost faktora modela. U ovom slučaju utjecaj faktora  $X_1-\varphi$  je statistički značajan, dok utjecaji ostalih faktora nisu statistički značajni.



**Slika 12** Međusobna ovisnost eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih kiselina ( $C_{UFK}$ ) i izračunatih ( $Y_{UFK}$ ) prema aproksimacijskom modelu



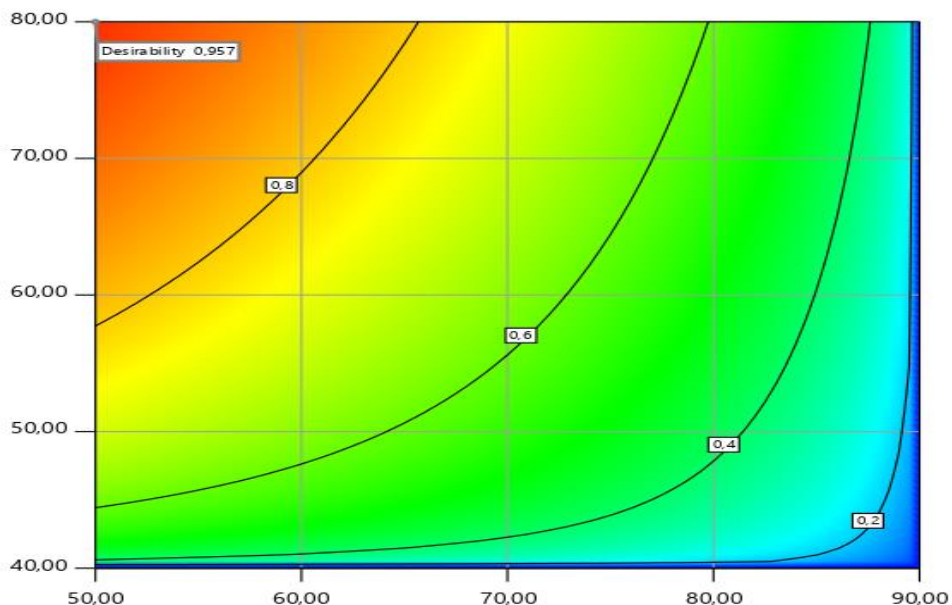
**Slika 13** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenolnih kiselina u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije i volumnom udjelu etanola u vodenoj otopini etanola pri konstantnom vremenu ekstrakcije od 10 min i snazi ultrazvuka od 40 %

#### 4.8. Optimiranje ekstrakcije ukupnih kiselina

Za određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije pri kojima se postiže najveći prinos ukupnih fenolnih kiselina za određeno eksperimentalno područje provedena je numerička optimizacija procesa pomoću programa Design Expert 11. Dobiveno je više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih parametara, a kao najbolje rješenje odabrani su procesni uvjeti kod kojih je poželjnost (eng. *desirability*) kao kriterij za optimalno provođenje procesa bila najbliže vrijednosti 1.

Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina uz poželjnost 0,957 su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo, vrijeme ekstrakcije 10 minuta, temperatura ekstrakcije 80 °C, snaga ultrazvuka 40 % pri 37 kHz korištenjem *sweep* moda. Pri navedenim uvjetima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos ukupnih fenolnih kiselina 156  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .





**Slika 14** Optimalno područje (crveno obojeno) ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije 10 minuta, temperatura ekstrakcije 80 °C, 50 %-tna vodena otopina etanola, snaga ultrazvuka 40 % pri 37 kHz, *sweep* mod) za dobivanje maksimalnog prinosa ukupnih fenolnih kiselina iz uzorka pljevice ječma

#### 4.9. Provjera uspješnosti optimiranja procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije metodom odzivnih površina

Nakon utvrđenih optimalnih uvjeta ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz ekstrakta pljevice ječma metodom odzivnih površina, provedena je ekstrakcija pri utvrđenim optimalnim uvjetima radi provjere uspješnosti optimiranja ekstrakcije.

Metodom odzivnih površina određen je maksimalni mogući prinos ukupnih fenolnih kiselina iz uzorka pri optimalnim uvjetima ekstrakcije od 156  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , a eksperimentalnom provedbom ekstrakcije pri optimalnim uvjetima dobiveno je 160,1  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .

#### 4.10. Profil i udio fenolnih kiselina u ekstraktu pljevice ječma pri optimalnim uvjetima ekstrakcije



**Slika 15** Grafički prikaz prinosa fenolnih kiselina identificiranih i kvantificiranih u ekstraktu pljevice ječma dobivenom ekstrakcijom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije

#### 4.11. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta ječma

Antioksidacijska aktivnost ječma prikaza je u **Tablici 5**. Inhibicija DPPH uslijed antioksidacijske aktivnosti ekstrakta pljevice ječma izračunata je prema sljedećem izrazu i izražena u postotku (%):

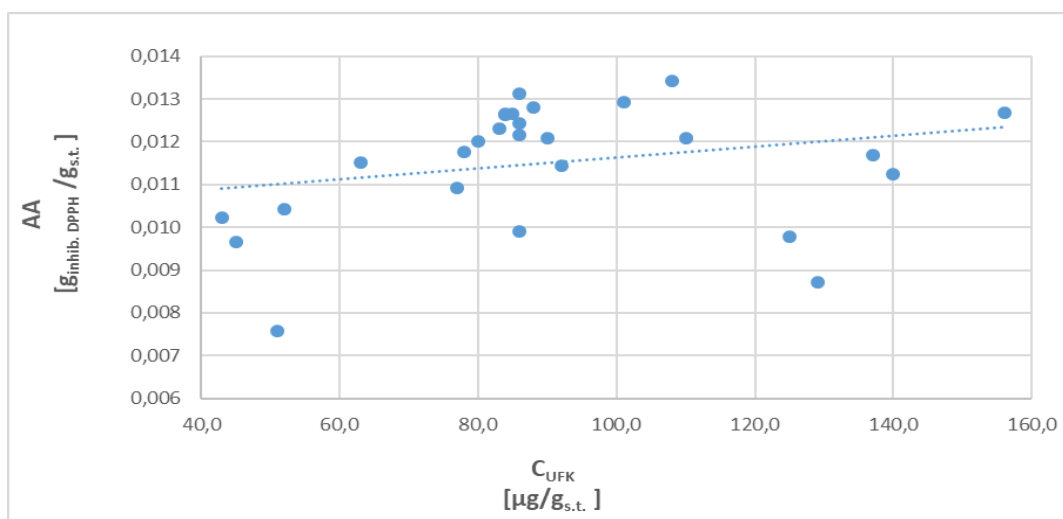
$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[ \frac{A_{DPPH} - A_{ekstrakta}}{A_{DPPH}} \right] \cdot 100 \quad (10)$$

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

$$AA = \frac{m_{\text{inhibiranog DPPH}}}{m_{s.t.}} \quad (11)$$

Za svaki ekstrakt odrađena su tri mjerenja apsorbancije iz kojih je izračunata srednja vrijednost koja je korištena za izračun antioksidacijske aktivnosti.

S obzirom na to da je poznato da fenolne tvari pozitivno utječu na antioksidacijsku aktivnost ispitana je i korelacija između prinosa ukupnih fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata (Slika 16).



**Slika 16** Grafički prikaz korelacije ukupnih fenolnih kiselina i njihove antioksidacijske aktivnosti

## **5. RASPRAVA**

Ekstrakcija je proces koji se koristi za izolaciju brojnih bioaktivnih spojeva iz biljaka koji imaju brojne pozitivne karakteristike. Uspješna provedba ekstrakcije ovisi o različitim procesnim parametrima i njihovim međusobnim interakcijama. Budući da je nemoguće imati kontrolu nad svakim parametrom, potrebno je odrediti parametre koji najviše utječu na proces ekstrakcije i vršiti nadzor nad tim parametrima u svrhu postizanja najbolji mogućih rezultata. Jednom kada se odrede ključni parametri, moguće je izvršiti optimizaciju procesa i na taj način poboljšati rezultate te uštediti vrijeme i resurse. Metoda odzivnih površina je široko rasprostranjena metoda koja se koristi za optimizaciju procesa. Glavna prednost ove metode je reducirani broj eksperimenata koje je potrebno odraditi za evaluaciju procesnih parametara i njihovih interakcija (Bai i sur., 2007; Jing i sur., 2015).

U ovom radu je ispitivan utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz proizvodnih ostataka prerade ječma (pljevica ječma) i optimizacija parametra ekstrakcije u svrhu dobivanja maksimalnog prinosa fenolnih kiselina iz uzorka. Plan pokusa je dizajniran upotrebom Box-Behnken metode, a rezultati dobiveni provedbom pokusa su statistički analizirani u programskom paketu Design Expert 11 i za optimizaciju procesa ekstrakcije je korištena metoda odzivnih površina (eng. response surface methodology).

U tablicama i dijagramima prikazani su eksperimentalno određeni podaci i podaci izračunati prema primijenjenom matematičkom modelu.

U prvom dijelu eksperimentalnog rada provedena su preliminarna istraživanja koja su uključivala provedbu kruto-tekuće ekstrakcije u ultrazvučnoj i vodenoj kupelji i mjerenje ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida u ekstraktima uzorka. Svrha preliminarnog istraživanja bila je usporedba rezultata dobivenih ekstrakcijom dvjema različitim metodama: kruto-tekuća ekstrakcija u vodenoj kupelji i kruto-tekuća ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (*degas* i *sweep* mod), na osnovu čega je izabrana metoda ekstrakcije koja se koristila za optimizaciju. Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem pomoću regresijskih jednadžbi **(5-8)** dobivenih iz kalibracijskih krivulja **(Slike 10 i 11)** koje su izrađene na osnovu podataka iz **Tablica 2 i 3**, izračunate su masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari [ $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ], a za ukupne flavonoide [ $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$ ] u ekvivalentima (+)-katehina. Konačni maseni udio ukupnih fenolnih tvari, odnosno ukupnih flavonoida, izražen je prema jednadžbi **(9)** i

izražen po masi suhe tvari uzorka (**Tablica 4**). Na osnovu prinosa ukupnih fenolnih tvari i flavonoida izraženih u **Tablici 4**, vidljivo je da je ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji pri *sweep* modu iz uzorka dobiven najveći prinos ukupnih fenolnih tvari (7098,00  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ) u usporedbi s ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji pri *degas* modu (6883,00  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ) i ekstrakciji u vodenoj kupelji (6262,00  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ), dok je maksimalni prinos flavonoida dobiven ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji pri *degas* modu (2276,00  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ). S obzirom na sve dobivene rezultate u pogledu prinosa ukupnih fenolnih tvari i flavonoida zaključeno je da je ultrazvučna ekstrakcija bolja metoda za ekstrakciju fenolnih tvari, stoga je i izabrana za optimizaciju procesnih uvjeta ekstrakcije fenolnih kiselina.

Drugi dio eksperimentalnog rada odnosio se na ispitivanje utjecaja četiri procesna parametra ekstrakcije u tri razine (sastav otapala, tj. volumni udio etanola u vodenoj otopini etanola: 50-70-90 % v/v, vrijeme ekstrakcije: 10-20-30 min, temperatura ekstrakcije: 40-60-80 °C i snaga ultrazvuka: 40-60-80 %) na ekstraktibilnost fenolnih kiselina iz proizvodnih ostataka u preradi ječma i određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata uzorka. Kombinacijom faktora upotrebom Box-Behnkenovog dizajna definiran je plan pokusa koji je uključivao dvadeset sedam eksperimenata (**Tablica 5**).

Nakon provedbe ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji prema planu pokusa (svaki pokus proveden je u tri paralele) provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina prikazanih na **Slici 15** u ekstraktima uzorka UHPLC metodom. Kvalitativna analiza je izvršena usporedbom retencijskog vremena pojedine fenolne kiseline s retencijskim vremenom nakon injektiranja određene fenolne kiseline poznate koncentracije (standard), a kvantitativna analiza je provedena pomoću softvera LabSolution određivanjem površine ispod pikova na temelju kalibracijske krivulje izrađene za svaku fenolnu kiselinu koja je identificirana. Ukupni maseni udjeli fenolnih kiselina u ekstraktima dobiveni pri različitim procesnim uvjetima prikazani su u **Tablici 5**.

Maseni udio ukupnih fenolnih kiselina u pljevici ječma kretao se u rasponu od 43 do 156  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ . Pod pojmom ukupne fenolne kiseline u ovom radu se podrazumijeva suma udjela pojedinačnih fenolnih kiselina određenih UHPLC-om. Pri optimalnim uvjetima ekstrakcije najveći udio u ukupnoj količini fenolnih kiselina imala je siringinska kiselina s 43,3  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ , dok je najmanji udio imala kofeinska kiselina s 1,1  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$  (**Slika 15**).

Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem izračunata je antioksidacijska aktivnost ekstrakata pljevice ječma prema jednadžbama **(10)** i **(11)** čije su vrijednosti prikazane u **Tablici 5**. Antioksidacijska vrijednost ekstrakata pljevice ječma kretala se u rasponu od 0,08 do 0,013  $\text{g}_{\text{inhibiranog DPPH}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ . Na osnovi **Slike 16** može se zaključiti da je između masene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti riječ o slaboj pozitivnoj korelaciji, odnosno da fenolne kiseline određene u ekstraktima nisu značajno doprinijele ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata. Procjena utjecaja nezavisnih varijabli ekstrakcije i njihove interakcije (sastav otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije i snaga ultrazvuka) na zavisnu varijablu (prinos ukupnih fenolnih kiselina) i provjera uspješnosti optimizacije procesa ekstrakcije provedene su pomoću aproksimacije eksperimentalnih podataka matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda po jednadžbi **(4)** koja se sastoji od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju parametara. Statistička analiza prikladnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka ekstraktibilnosti fenolnih kiselina modelom prikazana je u **Tablici 7**. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije ( $R$ ) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka (**Slika 12**). Koeficijent korelacije je iznosio 0,85; u idealnom slučaju iznosi 1. U većini slučajeva odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje pa se zato provodi i detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovu koje je moguće ispitati primjenjivost odabranog modela. Članovi odzivnog polinoma čija je  $p$ -vrijednost manja od 0,005 su statistički značajni. Za proces ekstrakcije fenolnih kiselina iz uzorka najbolje se pokazao linearni model ( $R = 0,85$ ) čiji su regresijski koeficijenti za članove modela prikazani u **Tablici 6**. što znači da je statističkom analizom utvrđeno da je samo linearni član polinomnog modela statistički značajan, a ostali članovi (kvadratni i interaktivni) su statistički neznačajni.  $F$ -vrijednost modela od 31,70 implicira da je model značajan, a šansa da navedena  $F$ -vrijednost potječe od šuma iznosi svega 0,01%.  $p$ -vrijednost manja od 0,05 ukazuje na statističku značajnost faktora modela, pa je iz **Tablice 7** vidljivo da sastav otapala ima najveći utjecaj na proces ekstrakcije ( $p < 0.0001$ ) kao statistički značajan linearni član modela, dok ostali parametri: temperatura ( $p$ -vrijednost 0,0834), vrijeme ekstrakcije (0,3439) i snaga ultrazvuka (0,5054) nisu statistički značajni. Vizualni prikaz parametara i njihovih utjecaja na prinos ukupnih fenolnih kiselina dan je 3D dijagramom odzivne površine (**Slika 13**) gdje odzivna

površina predstavlja modelom predviđeni prinos ukupnih fenolnih kiselina za ispitivane kombinacije sastava otapala i temperature ekstrakcije pri konstantnom vremenu ekstrakcije 10 minuta i snazi ultrazvuka od 40 %. Iz dijagrama je vidljivo da porastom temperature pri kojoj se provodi ekstrakcija linearno raste prinos ukupnih fenolnih kiselina, dok je najbolji prinos ostvaren upotrebom 50 %-tne vodene otopine etanola.

Upotrebom programskog paketa Design Expert 11 i metodom odzivnih površina određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije za ispitivano eksperimentalno područje: 50 %-tna vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije 10 minuta, temperatura ekstrakcije 80 °C i snaga ultrazvuka 40 % pri 37 kHz, *sweep* modu, pri kojima je postignut maksimalni prinos ukupnih fenolnih kiselina uz poželjnost od 0,957 (1 je maksimalna vrijednost) što je prikazano na **Slici 14**.

Prema matematički izračunatim optimalnim uvjetima ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz ekstrakata pljevice ječma provedena je ekstrakcija radi provjere uspješnosti modeliranja i optimiranja procesa ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz uzorka. Eksperimentalni podaci koji su dobiveni pri navedenim optimalnim uvjetima za ekstrakciju pokazali su dobra slaganja s podacima predviđenim modelom. Maksimalni prinos ukupnih fenolnih kiselina predviđen modelom iznosio je 156  $\mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , dok je eksperimentalnim putem dobiveno 160,1  $\mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ .



## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka i njihove statističke obrade mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ✓ U preliminarnom istraživanju najveći prinos ukupnih fenolnih kiselina iz ekstrakata pljevice ječma postignut je provedbom kruto-tekuće ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji pri *sweep* načinu rada (7098,00  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ),
- ✓ Prilikom rada prema Box-Behnkenovom planu pokusa u ekstraktima pljevice ječma dokazano je od 43 do 156  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .
- ✓ Sastav otapala je bio jedini statistički značajan parametar ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz uzorka.
- ✓ Za opisivane procesa ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz uzorka najboljim se pokazao linearni model. Ispitivani matematički model pokazao je dobra slaganja eksperimentalnih i aproksimiranih vrijednosti ukupnih fenolnih kiselina i visok stupanj korelacije ( $R = 0,85$ ). Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih fenolnih kiselina su: 50 %-tna vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije 10 minuta, temperatura ekstrakcije 80 °C i snaga ultrazvuka 40 % pri 37 kHz i *sweep* mod, pri kojima je postignut prinos od 160,1  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ .
- ✓ U ekstraktima pljevice ječma utvrđena je antioksidacijska aktivnost u rasponu od 0,08 do 0,013 g inhibiranog DPPH/ $\text{g}_{\text{s.t.}}$ .
- ✓ Metoda odzivnih površina pokazala se kao pogodna metoda za optimizaciju procesa ekstrakcije.

## **7. LITERATURA**

- Azwanida NN: A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* 4:196, 2015.
- Bai X, Qiu A, Guan J: Optimization of microwave-assisted extraction of antihepatotoxic triterpenoid from *Actinidia deliciosa* root and its comparison with conventional extraction methods. *Food Technology & Biotechnology* 45:174-180, 2007.
- Bezzer MA, Santelli RE, Oliviera EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Blainski A, Lopes GC, Mello JCP: Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense L.*: *Molecules* 18:6852-6865, 2013.
- Dai J, Mumper RJ: Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352, 2010.
- De Caro CA: UV/VIS spectrophotometry-fundamentals and applications. Mettler-Toledo International, 2015.
- Drmić H, Jambrak AR: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2:22-33, 2010.
- Gangopadhyay N, Hossain MB, Rai DK, Brunton NP: A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules* 20:10884-10909, 2015.
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carettero A, Fernandez-Gutierrez A: Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15:8813-8826, 2010.
- Jing CL, Dong XF, Tong JM: Optimization of ultrasound assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method. *Molecules* 20:15550-15571, 2015.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH: Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18:2328-2375, 2013.
- Kunze W, *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin, Berlin, 2004.
- Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G: Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19:78-101, 2014
- Liyana-Pathirana C, Shadidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry* 93:47-56, 2005.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.

- Mojzer EB, Hrnčić MK, Škerget M, Knez Ž, Bren U: Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 21:901, 2016.
- Nimse SB, Pal D: Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanisms. *The royal society of chemistry* 5:27986-28006, 2015.
- Planinić M, Bucić-Kojić 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*, str. 102-108. Faculty of Food Technology, Osijek, 2004.
- Soria AC, Villamiel M: Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology* 21:323-331, 2010.
- Strelec I, Kovač T: Praktikum iz biokemije. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Sroka Z, Cisowski W: Hydroxide peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41:753-758, 2003.
- Stalikas C: Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30:3268-3295, 2007.
- Šimić G, Horvat D, Dvojković K, Abičić I, Viljevac-Vuletić M, Tucak M, Lalić A: Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of malting and hulless barley grain and malt extracts. *Czech Journal of Food Science* 35:73-78, 2017.
- Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: Jedinične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.
- Yoon Kim J, Wang Y, Hun Song Y, Uddin Z, Peng Li Z, Jun Ban Y, Hun Park K: Antioxidant activities of phenolic metabolites from *Flemingia philippinensis merr. et rolfe* and their application to DNA damage protection. *Molecules* 23:816, 2018.