

# Ekstrakcija ciljanih bioaktivnih komponenti iz unutarnjih pregrada oraha

---

**Burilo, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:109:863058>

*Rights / Prava:* [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-12**

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**

**Anamarija Burilo**

**EKSTRAKCIJA CILJANIH BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ UNUTARNJIH  
PREGRADA ORAHA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, rujan, 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje  
**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj dana 17. srpnja 2023. godine  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*  
**Komentor:** doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Silvija Šafranko, Snježana Keleković*, dipl. ing.

### Ekstrakcija ciljanih bioaktivnih komponenti iz unutarnjih pregrada oraha

Anamarija Burilo 0113144496

#### Sažetak:

Primarni cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost iskorištenja nusproizvoda koji nastaju tijekom prerade oraha primjenom inovativnih tehnika ekstrakcije. Prvi korak istraživanja uključio je ekstrakciju masnih kiselina iz unutarnjih pregrada oraha primjenom ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) pri tlaku od 300 bar i temperaturi 40°C. Sastav masnih kiselina analizirao se pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID), a najznačajnije masne kiseline su linolna, oleinska, α-linoleinska i palmitinska kiselina. Nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, zaostao je materijal bogat fenolnim spojevima (u najvećem udjelu elagična kiselina, peonidin 3 arabinozid, epigalokatehin, herniarin, galna kiselina) koji su se iz unutarnjih pregrada oraha ekstrahirali primjenom ultrazvuka korištenjem ultrazvučne sonde pri različitim procesnim uvjetima (otapalo, amplituda, impuls). Identifikacija i kvantifikacija fenola provela se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). Najveći udio ukupnih fenola u ekstraktima dobiven je primjenom 96%-tnog etanola, amplitude 100% te impulsa 60%, a najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena je u ekstraktima koji su pripremljeni sa 96%-tnim etanolom, amplitudom 20% i impulsom 60%.

**Ključne riječi:** Unutarnje pregrade oraha, bioaktivne komponente, DPPH, ukupni fenoli

**Rad sadrži:** 51 stranica  
22 slika  
11 tablica  
32 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i>	predsjednik
2.	prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	član-mentor
3.	doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>	član-komentor
4.	izv. prof. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 27. rujna 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of process engineering**  
**Subdepartment of process design and pharmaceutical engineering**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technological design

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X 2022/2023. held on 17, July, 2023.

**Mentor:** *Stela Jokić*, PhD, full prof.

**Co-mentor:** *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** *Silvija Šafranko*, PhD, *Snježana Keleković*, dipl. Ing.

### Extraction of targeted bioactive components from the walnut septum

*Anamarija Burilo, 0113144496*

#### Summary:

The primary aim of this paper was to research the possibilities of utilizing the by-products which are produced during walnuts processing using innovative extraction techniques. The first step of the research included the extraction of fatty acids from the inner partitions of the walnut using supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) at a pressure of 300 bar and a temperature of 40°C. The composition of fatty acids was analysed using gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), and the most important fatty acids were linoleic, oleic,  $\alpha$ -linoleic and palmitic acids. After SC-CO<sub>2</sub> extraction, the remaining material was rich in phenolic compounds (mainly ellagic acid, peonidin 3 arabinoside, epigallocatechin, herniarin, gallic acid) which were extracted from the internal partitions of the walnut by applying ultrasound using an ultrasound probe under different process conditions (solvent, amplitude, impulse). Identification and quantification of phenols was carried out using high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The highest content of total phenols in the extracts was obtained using 96% ethanol, amplitude 100% and impulse 60%, and the highest antioxidant activity was recorded in extracts prepared with 96% ethanol, amplitude 20% and impulse 60%.

**Key words:** Walnut inner partitions, bioactive components, DPPH, total phenols

**Thesis contains:** 51 pages  
22 figures  
11 tables  
32 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:** September 27, 2023

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof.           | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.           | supervisor   |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | member       |
| 4. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, associate prof.    | stand-in     |

**Defense date:** September 27, 2023

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

*Najprije se zahvaljujem svojoj dragoj profesorici i mentorici prof. dr.sc. Steli Jokić, koja mi je pokazala i dokazala da samo nebo može i treba biti granica. Hvala Vam draga profesorice na svakom savjetu, prenesenom znanju i prilici.*

*Hvala i dragoj gospođi Snježani Kekeković, dipl.ing. i dr.sc. Silviji Šafranko za pomoć i asistenciju u laboratoriju kao i svom komentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću koji je imao puno strpljenja i koji je uvijek bio dostupan za sva moja pitanja i podpitanja.*

*Hvala mojoj obitelji, ostaloj rodbini, prijateljima, kolegama i svim divnim ljudima koji su me pratili uz more podrške, ohrabrenja i ljubavi.*

*Pred kraj, želim se zahvaliti svojim roditeljima, najvećim i najjačim navijačima na svemu što su mi omogućili, na svemu što su učinili, što čine i što će učiniti za mene.*

*I na kraju, želim zahvaliti Stjepanu koji je bezuvjetno vjerovao u mene i bio najbolja podrška i oslonac koje sam mogla poželjeti.*

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	4
2.1.	UNUTARNJE PREGRADE ORAHA.....	5
2.2.	EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA .....	6
2.2.1.	SUPERKRITIČNI CO <sub>2</sub> .....	9
2.3.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM .....	11
2.4.	OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA .....	11
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1.	ZADATAK.....	15
3.2.	MATERIJALI .....	16
3.2.1.	UNUTARNJE PREGRADE ORAHA.....	16
3.2.2.	UREĐAJI .....	16
3.2.3.	KEMIKALIJE .....	17
3.3.	METODE RADA .....	17
3.3.1.	PRIPREMA UZORKA .....	17
3.3.2.	EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM CO <sub>2</sub> .....	18
3.3.3.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (UAE) .....	19
3.3.4.	ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA.....	21
3.3.5.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI .....	22
3.3.6.	IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA PRIMJENOM HPLC-a.....	23
3.3.7.	ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA PRIMJENOM GC/FID .....	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	29
4.1.	EKSTRAKCIJA MASNIH KISELINA IZ UNUTARNJIH PREGRADA ORAHA PRIMJENOM SUPERKRITIČNOG CO <sub>2</sub> .....	30
4.2.	UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA UDIO FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST UNUTARNJIH PREGRADA ORAHA.....	32
4.2.1.	UTJECAJ PROCESNIH UVJETA NA UDIO FENOLA U EKSTRAKTIMA.....	32
4.2.2.	UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST.....	34
4.2.3.	STATISTIČKA ANALIZA PARAMETARA UAE .....	35
4.3.	IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA POJEDINIH FENOLA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOLOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI S DETEKTOROM NIZA DIODA (HPLC-DAD).....	40
5.	ZAKLJUČCI.....	45
6.	LITERATURA.....	47

## POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

IL-6	Interleukin 6 ( <i>engl.</i> Interleukin)
CXC-R1	Kemokinski receptor tipa 1
SFE	Ekstrakcija superkritičnim fluidima ( <i>engl.</i> Supercritical fluid extraction)
SC-CO <sub>2</sub>	Ekstrakcija superkritičnim CO <sub>2</sub> ( <i>engl.</i> Supercritical CO <sub>2</sub> extraction)
CO <sub>2</sub>	Ugljikov dioksid ( <i>engl.</i> Carbon dioxide)
UAE	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ( <i>engl.</i> Ultrasound-assisted extraction)
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ( <i>engl.</i> High-Performance Liquid Chromatography)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ( <i>engl.</i> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
A	Apsorbancija ( <i>engl.</i> Absorbance)
GAE	Ekvivalent galne kiseline ( <i>engl.</i> Gallic acid equivalents)
DAD	Detektor niza dioda ( <i>engl.</i> Diode-array detector)
FID	Plameno ionizacijski detektor ( <i>engl.</i> Flame ionization detector)
R <sup>2</sup>	Koeficijent determinacije ( <i>engl.</i> Predicted R <sup>2</sup> )
RSM	Metoda odzivnih površina ( <i>engl.</i> Response surface methodology)
UV/VIS	Ultraljubičasto/Vidljivo ( <i>engl.</i> Ultraviolet-visible)
v/v	Volumni udio ( <i>engl.</i> Volume per volume)
X <sub>i,j</sub>	Ispitivane nezavisne varijable (Procesni uvjeti)
Y	Promatrani (praćeni) odziv
PTFE	Politetrafluoroetilen ( <i>engl.</i> Polytetrafluoroethylene)
HepG2	Stanična linija ljudskog raka jetre

## 1. UVOD



U današnje vrijeme orašasti plodovi zauzimaju važno mjesto u prehrani zbog mnogobrojnih prednosti. Bogat su izvor prehrambenih vlakana, nezasićenih masnih kiselina, mikrohranjivih sastojaka i fitokemikalija te imaju raznu primjenu u prehrambenoj industriji.

Orasi (lat. *Juglans regia*) su voćna vrsta biljaka koja je vrlo rasprostranjena u svijetu i od velike je gospodarske važnosti. Plodovi oraha su jestivi i vrlo su popularni te cijenjeni u prehrambenoj industriji zbog svojih nutritivnih, senzorskih i zdravstvenih vrijednosti (Martínez i sur., 2010).

Jezgra oraha (**Slika 1**) bogata je hranjivim tvarima, osobito masnim kiselinama (omega-3 i omega-6 masnim kiselinama), visoko probavljivim proteinima (udio oko 20%), esencijalnim aminokiselinama, vitaminima (vitamin K, vitamini B-kompleksa, tokoferol, tiamin, riboflavin, niacin), topivim i netopivim vlaknima te mineralima (magnezij, bakar, selen, kalij) (Santos i sur., 2018).



**Slika 1** Orahova jezgra (Izvor: autor)

Svakoj industriji je, kao i prehrambenoj, u cilju proizvesti što bolji i kvalitetniji proizvod, a da je pri tome količina otpada minimalna. Nusproizvodi prehrambene industrije mogu predstavljati potencijalnu opasnost za onečišćenje okoliša, ali također veliki dio nusproizvoda prehrambene industrije predstavlja bogati izvor hranjivih sastojaka i biološko aktivnih komponenti koje se mogu koristiti u različite svrhe. U novije vrijeme porastao je interes za promoviranje zdravlja konzumirajući funkcionalnu hranu pa je i samim time povećana potražnja za prirodnim bioaktivnim komponentama hrane kao i istraživanja za novim izvorima ovih vrijednih sastojaka (Abhipriya i sur., 2022). Veliki problem predstavlja nestabilnost bioaktivnih spojeva u prehrambenim proizvodima tijekom pripreme i prerade, slaba topljivost u vodi te mala bioraspoloživost zbog čega je upotreba ograničena.

Nakon prerade oraha, zaostaje nekoliko nusproizvoda, a to su: unutarnje pregrade oraha, ljuska te lišće koji predstavljaju jeftinu sirovinu za ekstrakciju vrlo važnih bioaktivnih komponenata. Prešanjem jezgre dobiva se jestivo ulje, a kao nusproizvod zaostaje pogača koju je moguće samljeti u brašno te primjenjivati u pekarskoj i konditorskoj industriji. S druge strane ljuska, lišće i unutarnje pregrade sadrže prirodne fitokemikalije s antioksidacijskim i antimikrobnim svojstvima koje se separiraju iz nusproizvoda te koriste za stabiliziranje animalnih masti te biljnih ulja. Osim toga, koriste se kao zamjena za sintetske antioksidanse. (Mingzheng i sur., 2021). **Slika 2** prikazuje potencijalne nusproizvode prerade oraha, ljusku i pregradu.



**Slika 2** Potencijalni nusproizvodi prerade oraha (Izvor: autor)

## 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. UNUTARNJE PREGRADE ORAHA

Pregrada oraha je opna koja dijeli dvije polovice orahove jezgre i bogata je polifenolnim spojevima. Dok se ljuske oraha uglavnom koriste u svrhu pročišćavanja i obrade otpadnih voda zbog svoje čvrste strukture, pregrade oraha nemaju široku primjenu. Tradicionalno su se koristile kao lijek protiv prehlade ili za suzbijanje kašlja, a u novije vrijeme porastao je interes za proizvodnju ekstrakata od unutarnjih pregrada oraha zbog velikog biološkog potencijala i visokog antioksidacijskog kapaciteta. Ovaj nusproizvod može se koristiti u kozmetičkoj industriji za dobivanje proizvoda za liječenje hiperpigmentacije kože kao i za proizvodnju krema protiv bora (Rusu i sur., 2020). **Slika 3** prikazuje unutarnju pregradu oraha.



**Slika 3** Unutarnja pregrada oraha (Izvor: autor)

Unutarnje pregrade oraha, vrlo bogate polifenolnim spojevima, pokazale su hipoglikemijski učinak i učinak protiv starenja kože, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje te potencijal za stimulaciju procesa hematopoeze (stvaranje krvnih staničnih komponenti) kako u *in vitro* istraživanjima, tako i u *in vivo* istraživanjima. Rezultat eksperimenta pokazao je značajan učinak ekstrakta (otapalo 50%-tna vodena otopina acetona) unutarnjih pregrada oraha što bi moglo biti posljedica zaštitnog i protuupalnog učinka na stanice putem stimulacije antioksidansa enzimskog sustava i smanjene koncentracije interleukina 6 (IL-6) i kemokinskog

receptora tipa 1 (CXC-R1) u plućnom tkivu štakora kojima se oralno davao ekstrakt od unutarnjih pregrada oraha. Pri tome je uočeno povećanje otpornosti staničnih membrana i eritrocita (crvenih krvnih stanica) tijekom izlaganja aerosolima limunske kiseline. Ekstrakt nije pokazao subakutne ili akutne toksične učinke na organizme štakora pri dozama od 1000 mg/kg tjelesne težine. Ekstrakt unutarnjih pregrada oraha se smatra bioaktivnim izvorom koji bi se mogao koristiti u liječenju respiratornih bolesti (Fizasan i sur., 2021).

Zhou i sur. (2022) dobili su rezultate koji pokazuju da su unutarnje pregrade oraha bolji prekursori za dobivanje aktivnog ugljena u odnosu na druge izvore ugljika iz biomase. Također, dokazali su da učinkovito pojačavaju elektrokemijska svojstva superkondenzatora stoga imaju potencijal da budu vrhunski materijal za elektrode u proizvodnji istih.

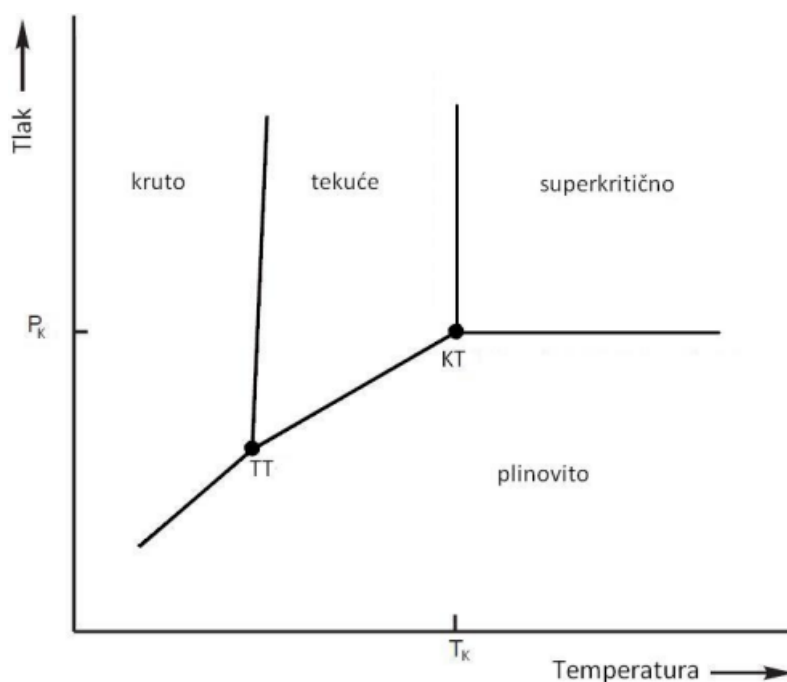
Također, unutarnje pregrade oraha bi se mogle koristiti za proizvodnju briketa za gorivo, a primjenu nalaze i kao sastojak koji se dodaje za bojanje domaćih, smeđih alkoholnih pića. Još jedna od važnih uloga unutarnjih pregrada oraha je zaštita jezgre od smanjena senzorskih svojstava (gorak okus i tamna boja) za koje su zaslužni oksidirani polifenoli (Sandu i sur., 2021).

## 2.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Ekstrakcija je glavni separacijski postupak za brojne prehrambene industrije, a podrazumijeva izdvajanje pojedinih komponenti iz smjese krutih i tekućih ili samo tekućih ili samo krutih tvari na osnovi različite topivosti u nekom otapalu. Tvar koja se izdvaja ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese. Kako bi došlo do ekstrakcije, potrebna je razlika u koncentraciji tvari u graničnom sloju i u glavnoj masi otapala prilikom čega dolazi do izjednačavanja koncentracija otopljenih tvari, odnosno do uspostavljanja ravnoteže (Aladić i sur., 2014; Jokić i sur., 2014).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (*engl.* Supercritical fluid extraction, SFE) je dobra alternativa u odnosu na ekstrakciju s organskim otapalima gdje se toksična organska otapala zamjenjuju ugljikovim dioksidom (CO<sub>2</sub>) koji nije toksičan i nije opasan za okoliš, a po završetku ekstrakcije ne nastaju sekundarni, ekološki neprihvatljivi produkti (Jokić, 2011).

Zagrijavanjem plinova iznad kritične točke ili komprimiranjem iznad kritičnog tlaka, plinovi se prevode u superkritično stanje gdje imaju svojstva i plina i tekućine čime postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva. **Slika 4** prikazuje fazni dijagram temperatura-tlak (Aladić, 2015).



Slika 4 Fazni dijagram temperatura-tlak (Aladić, 2015)

Iz dijagrama je vidljivo da tvar nikada neće prijeći u superkritično stanje ukoliko joj je temperatura niža od kritične temperature neovisno o stalnom povećanju tlaka. U **Tablici 1** prikazana su fizikalno-kemijska svojstva pojedinih fluida.

Tablica 1 Fizikalno-kemijska svojstva pojedinih fluida (Jokić, 2011)

OTAPALO	$T_c$ (K)	$P_c$ (MPa)	$\rho_c$ (g/cm <sup>3</sup> )
Metan	191	4,06	0,162
Ugljikov dioksid	304	7,38	0,468
Heksan	507	3,05	0,23
Aceton	508	4,70	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Voda	647	22,00	0,322

Prednost ekstrakcije superkritičnim fluidima je u tome što plinovi kao takvi bolje prodiru u materijal, otapanje se vrši uz bolju difuziju, nižu viskoznosti te manju površinsku napetost (Tablica 2).

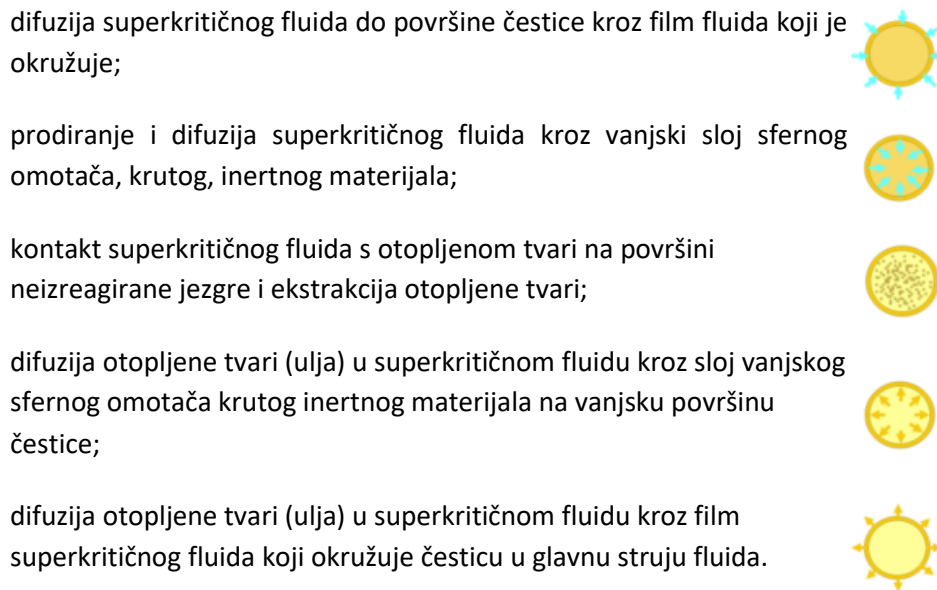
**Tablica 2** Fizikalna svojstva za plinovito, tekuće i superkritično stanje (Jokić, 2011)

STANJE FLUIDA	PLIN	TEKUĆINA	SUPERKRITIČNI FLUID
Gustoća (kg/m <sup>3</sup> )	1	300-900	1000
Koeficijent difuzije (cm <sup>2</sup> /s)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Viskoznost (Pa*s)	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>

Osim toga, ovu metodu separacije karakterizira visoka selektivnost, jednostavnije uklanjanje otapala koja su jeftina, koja nisu otrovna i koja su neopasna za okoliš, a ekstrahiranje je moguće na sustavima različitih kapaciteta. Separacija je jednostavna i brza zbog mogućnosti kontrole topivosti komponenata promjenom tlaka i temperaturama jer je kritična temperatura ugljikovog dioksida relativno niska čime se omogućuje separacija termolabilnih i izrazito hlapivih substanci niske relativne molekulske mase i visokog tlaka pare. Neki od nedostataka ekstrakcije superkritičnim fluidima su: složenost procesa, skupoća procesne opreme, veliki utrošak energije za komprimiranje plinova, rad pri visokim tlakovima te kompleksna regeneracija otapala (Aladić, 2015; Bruner, 2005; Senjković i Stanić, 1994).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima odvija se kroz pet uzastopnih faza. U prvoj fazi, superkritični fluid difuzijom prolazi kroz film fluida do površine čestice. U drugoj fazi, superkritični fluid prolazi i difundira kroz vanjski sloj omotača krutog materijala nakon čega slijedi treća faza u kojoj dolazi do kontakta fluida i otopljene tvari nakon čega slijedi ekstrakcija otopljene tvari koja zatim difundira u superkritičnom fluidu kroz vanjski sloj krutog materijala na vanjsku površinu čestice (četvrta faza). U petoj fazi, dolazi do difuzije otopljenih tvari u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnoj struji fluida.

**Slika 5** prikazuje faze ekstrakcije (Jokić, 2011).



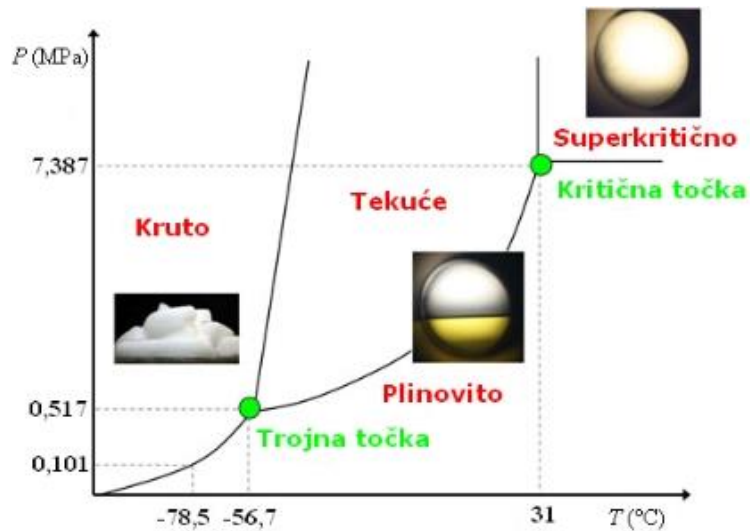
**Slika 5** Pet faza ekstrakcije superkritičnog fluida (Jokić, 2011)

Selektivnost pri procesu osigurava se povećanjem tlaka pri čemu dolazi do velike promjene gustoće plina. Nakon što je faza otapanja završena, fluid se iz superkritičnog stanja prevodi u stanje tlaka nižeg od superkritičnog te gubi moć otapanja (Wakao i Kaguei, 1982). Primjenom ekstrakcije superkritičnim fluidima, posebno upotrebom superkritičnog ugljikovog dioksida, omogućeno je da se iz biljnog materijala dobiju začini, biljna i eterična ulja, aromatične komponente te komponente s antioksidacijskim i antibakterijskim djelovanjem (Aladić, 2015).

### 2.2.1. SUPERKRITIČNI CO<sub>2</sub>

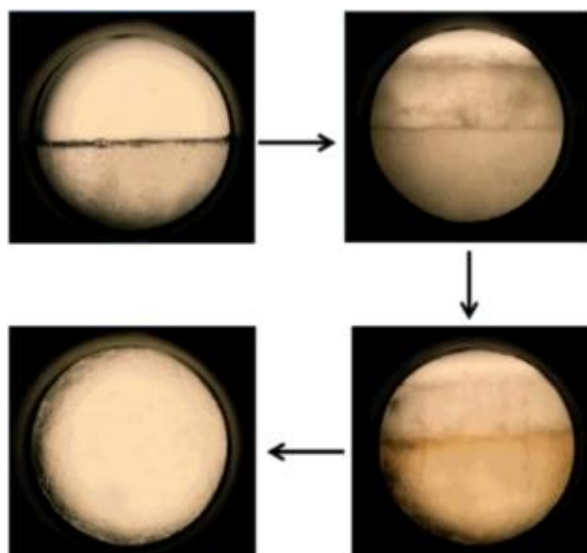
Superkritični ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) je najpoželjnije otapalo za proces ekstrakcije superkritičnim fluidima jer zadovoljava sve uvjete za izbor otapala, a to su: nije otrovan, nema niti mirisa niti okusa, ekološki je prihvatljiv, nije zapaljiv, dostupan je i u velikim količinama, nije skup i ima nisku kritičnu temperaturu koja iznosi 31,1°C što omogućava ekstrakciju termolabilnih sastojaka (Bucić-Kojić i sur., 2013). **Slika 6** prikazuje fazni dijagram temperatura-tlak za ugljikov dioksid (Jokić, 2011).





Slika 6 Fazni dijagram temperatura-tlak za CO<sub>2</sub> (Jokić, 2011)

Slika 7 prikazuje prijelaz CO<sub>2</sub> u superkrično stanje. Ispod kritičnih vrijednosti tlaka i temperature, CO<sub>2</sub> postoji u tekućoj i plinovitoj fazi. Povećanjem temperature gustoća plinovite faze i gustoća tekuće faze postaju sve sličnije, prilikom čega se vidljivost granice faza smanjuje. Kada se postigne kritična temperatura od 31,1°C i kritični tlak od 7,4 MPa, faze formiraju novu homogenu fazu odnosno superkrično otapalo, a razlika između tekuće i plinovite faze postaje uočljiva (Jokić, 2011).



Slika 7 Prikaz prijelaza CO<sub>2</sub> u superkrično stanje (Jokić, 2011)

### 2.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ULTRAZVUKOM

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*engl.* Ultrasound assisted extraction - UAE) je nekonvencionalna, novija tehnika koja se sve češće primjenjuje u ekstrakciji bioaktivnih komponenata zbog visoke učinkovitosti, jednostavnosti i niske cijene u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, ekstrakcije mikrovalovima te ekstrakcije superkritičnim fluidom (Bucić-Kojić, 2013). Kod ove metode, prolaskom ultrazvučnih valova kroz otapalo dolazi do poboljšanja prijenosa mase što uzrokuje nastajanje kavitacije. Djelovanjem ultrazvuka dolazi do nastajanja longitudinalnih valova koji uzrokuju nagle promjene tlaka i nastajanje velikog broja mikroskopskih mjehurića koji rastu i nakon određenog vremena pucaju što dovodi do pucanja staničnih stijenki biljnog materijala te kao rezultat toga dolazi do bržeg prijenosa mase i smanjenja potrošnje otapala (Vinatoru, 2001).

Prednosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su: jednostavno rukovanje, korištenje nižih temperatura, korištenje manjih količina otapala, smanjenje potrošnje energije, veći prinos ekstrakcije te niske cijene opreme. S druge strane postoje i određeni nedostaci kao što su nastajanje slobodnih radikala i degradacijskih produkata zbog stvaranja mikrookruženja s visokim tlakom i visokom temperaturom kao posljedica implozije kavitacijskih mjehurića. Optimizacijom procesnih uvjeta ekstrakcije kao što su frekvencija, snaga, vrijeme, temperatura, vrsta otapala, omjer otapala i biljnog materijala, moguće je poboljšati iskorištenje ekstrakcije, kinetiku ekstrakcije te poboljšati selektivnost ekstrakcije. U odnosu na uobičajene metode ekstrakcije, UAE traje kraće i provodi se na relativno niskim temperaturama (do 70 °C). Dokazano je da najveći utjecaj na selektivnost i efikasnost ekstrakcije ima odabir otapala (Banožić, 2022).

### 2.4. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Metoda odzivnih površina (*engl.* Response Surface Methodology - RSM) je jedan od najčešće korištenih eksperimentalnih planova koji se koristi za optimizaciju, a čija je svrha pronalazak optimalnih uvjeta za dobivanje optimalnog odziva. Također, ova metoda daje mogućnost procjene učinka više čimbenika i interakcije istih na jednu ili više varijabli odaziva.

Za određivanje i istovremeno rješavanje multivarijantne jednadžbe se koriste kvantitativni podaci iz odgovarajućih eksperimentalnih dizajna. Ove jednadžbe se mogu grafički prikazati kao površine odziva, a mogu se koristiti na sljedeće načine:

1. Za opisivanje utjecaja testnih varijabli na odgovor,
2. Za određivanje međusobnog odnosa među testnim varijablama te
3. Za opisivanje kombiniranog učinka svih testnih varijabli na odgovor (Radojković i sur., 2012).

Eksperimentalni dizajn ili plan pokusa je set eksperimenata koji je određen matricom, a daje podatke o različitim kombinacijama nezavisnih varijabli. RSM je multivarijantna statistička tehnika koja se vrlo često koristi kako bi se procijenio utjecaj nezavisnih varijabli na zavisne. Nezavisne varijable predstavljaju parametre koji utječu na proces, dok se zavisne varijable nazivaju odzivi. Dva najčešće korištena eksperimentalna dizajna koji se koriste u RSM metodi su:

1. Behnkenov plan pokusa (*engl.* Box-Behnken design - BBD) koji je i korišten u ovom radu i
2. Centralno-kompozitni dizajn (*engl.* Central composite rotatable design - CCD).

RSM metoda zahtjeva manji broj eksperimenata i manje vremena u odnosu na druge statističke tehnike za opisivanje modelnog sustava. Provođenje metode se odvija u tri koraka:

1. Korak- preliminarna faza: određivanje nezavisnih parametara i njihove razine,
2. Korak- odabir eksperimentalnog dizajna te formiranje i verificiranje modela koji opisuje odnos između nezavisnih i zavisnih varijabli na osnovi eksperimentalnih podataka,
3. Korak- aproksimacija rezultata funkcijama prvog ili drugog reda ovisno o složenosti procesa, ali i o odabiru i razini nezavisnih varijabli.

U modelima u kojima eksperimentalni podaci ne tvore krivulju, interakcije nezavisnih varijabli ne utječu na odziv. Tada se podaci mogu aproksimirati linearnom funkcijom, a dobivena aproksimacija modela prvog reda glasi (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_ix_i + \varepsilon \quad (1)$$

gdje  $Y$  predstavlja zavisnu varijablu,  $x$  nezavisne varijable,  $\beta$  koeficijente modela, a  $\varepsilon$  pogrešku koja se javlja u odzivu.

Ako se eksperimentalni podaci ne mogu aproksimirati linearnom funkcijom, koristi se polinom drugog reda (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{k=1}^K \beta_k X_k + \sum_{k=1}^K \beta_{kk} X_k^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

$Y$  – promatrani odziv

$\beta_0$  – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

$\beta_k$  – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

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







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

$X_i$  i  $X_j$  – kodirane nezavisne varijable (tlak i temperatura) (Banožić, 2022).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada je:

-  Provesti ekstrakciju masnih kiselina iz unutarnjih pregrada oraha primjenom ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>),
-  Analizirati sastav masnih kiselina pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID),
-  Ekstrahirati fenolne spojeve iz odmašćene pogače unutarnjih pregrada oraha nakon CO<sub>2</sub> ekstrakcije primjenom ultrazvuka, korištenjem ultrazvučne sonde pri različitim procesnim uvjetima (otapalo, amplituda, impuls),
-  Odrediti antioksidacijsku aktivnost te udio ukupnih fenola u ekstraktima spektrofotometrijskim metodama,
-  Optimizirati proces ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa Design Expert<sup>®</sup>,
-  U dobivenim ekstraktima identificirati i kvantificirati pojedine fenole primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD).

## 3.2. MATERIJALI

### 3.2.1. UNUTARNJE PREGRADE ORAHA

Osušene pregrade oraha (*J.regia*) dobivene su od OPG-a Lidija Burilo (Đakovo, Hrvatska) 2022. godine (**Slika 8A**). Biljni materijal je samljeven pomoću laboratorijskog mlina neposredno prije samih ekstrakcija (**Slika 8B**).



**Slika 8** Osušene pregrade oraha (A); usitnjene pregrade oraha prije ekstrakcije (B)

### 3.2.2. UREĐAJI

- Analitička vaga Crystal - 200 CAL CE (Gibertini Elettronica, Italija),
- Uređaj za usitnjavanje uzorka SM-4500C (mrc Sample mill, Njemačka),
- Ekstraktor sa superkritičnim CO<sub>2</sub> (ručno izrađen uređaj, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska),
- HPLC sustav Agilent 1260 Infinity 0 II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD),
- Uređaj za plinsku kromatografiju (GC/FID) Agilent, GC 7890A (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
- Spektrofotometar UV/VIS LLG-uniSPEC 2 (LLG Labware, Wilmington, Delaware, SAD)
- Sušionik Heratherm (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD),

- Ultrazvučna sonda UP400St (Hielscher Ultrasonics GmbH),
- Vakuum uparivač SpeedVac SPD1030 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

### 3.2.3. KEMIKALIJE

- Ultračista Millipore voda,
- 95%tni etanol Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska),
- 50%tna vodena otopina etanola (vodene otopine reagensa pripremljene s ultračistom Milli-Q vodom, Millipore/Simplicity 185 sustav),
- 1,1-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Njemačka),
- Galna kiselina, čistoće 97,5 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Gram-mol d.o.o., Hrvatska).

## 3.3. METODE RADA

### 3.3.1. PRIPREMA UZORKA

Prije ekstrakcije, 100 g uzorka je usitnjeno u uređaju za usitnjavanje uzorka SM-4500C (mrc Sample mill, Njemačka) prikazanom na **Slici 9** u trajanju od 1 minute na 4000 rpm kako bi se povećala površina uzorka i samim time ubrzao i poboljšao postupak ekstrakcije. Nakon usitnjavanja, uzorak je podvrgnut postupku ekstrakcije sa CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju.



**Slika 9** Uređaj za usitnjavanje uzorka SM-4500, mrc Sample mill (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2022)

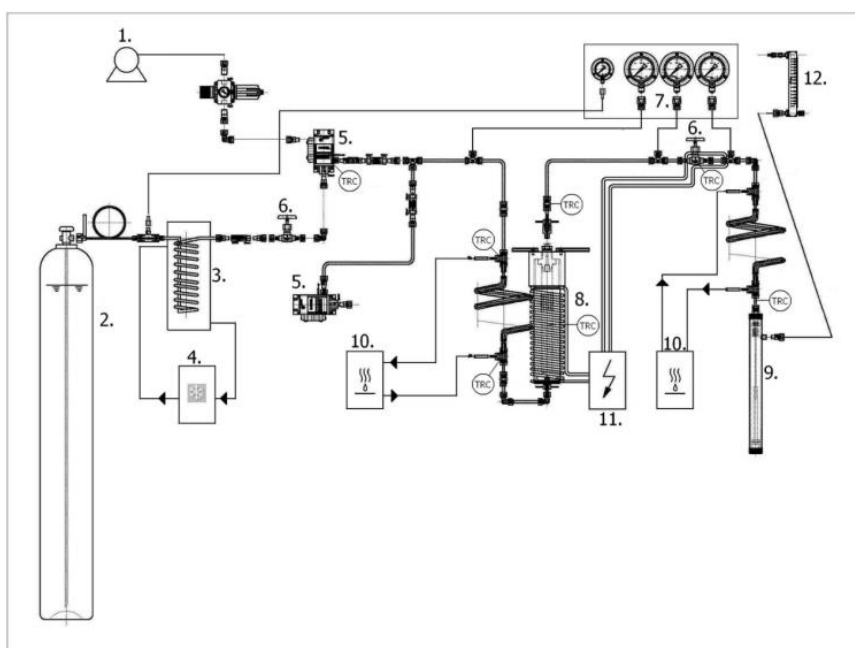


### 3.3.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM CO<sub>2</sub>

Ekstrakcija ulja iz usitnjenih pregrada oraha superkričnim CO<sub>2</sub>, čistoće 99,95% (v/v), proizvođača Messer (Ruše, Slovenija), provedena je pri sljedećim procesnim uvjetima:

- tlak u ekstraktoru: 300 bar,
- temperatura ekstrakcije: 40 °C ,
- protok fluida: 1,4 kg/h.

Ekstrakcija je trajala 60 minuta, a procesna shema ekstraktora dana je na **Slici 10**.



**Slika 10** Procesna shema uređaja za ekstrakciju superkričnim CO<sub>2</sub> (Aladić, 2015)

1. Kompresor; 2. CO<sub>2</sub> spremnik; 3. Izmjenjivač toplote od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

Po završetku ekstrakcije, dobivena je odmašćena pogača koje se dalje koristila kao polazni materijal u postupku ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, a u dobivenom CO<sub>2</sub> ekstraktu odredio se sastav masnih kiselina korištenjem plinskog kromatografa GC 7890A (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD).

### 3.3.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA ULTRAZVUKOM (UAE)

Nakon CO<sub>2</sub> ekstrakcije, odvagano je 1,5 g odmašćene pogače te pomiješano sa 30 mL otapala u falkon epruvete od 50 mL. Kao otapalo koristila se 48%-tna vodena otopina etanola, 96%-tni etanol te destilirana voda prema BBD. Za ultrazvučnu ekstrakciju koristila se ultrazvučna sonda UP400St (Hielscher Ultrasonics GmbH) (**Slika 11**) minimalne snage 400 W, frekvencije minimalno 24 kHz, radne amplitude 20-100% te impulsa podesivog od 20-100%, a vrijeme ekstrakcije bilo je 60 sekundi. Radni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom su prikazani u **Tablici 3**.

**Tablica 3** Radni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (prema BBD)

Eksp.	Otapalo (%)	Amplituda (%)	Impuls (%)
1	0	60	100
2	48	60	60
3	48	20	20
4	96	60	20
5	48	60	60
6	48	100	100
7	0	60	20
8	96	60	100
9	0	20	60
10	96	20	60
11	0	100	60
12	96	100	60
13	48	60	60
14	48	20	100
15	48	100	20
16	48	60	60
17	48	60	60

(0=destilirana voda, 48% = 48%-tna vodena otopina etanola, 96= 96%-tni etanol)



**Slika 11** Ultrazvučna sonda UP400St (Izvor: autor)



**Slika 12** Tekući ekstrakti dobiveni primjenom ultrazvuka nakon filtracije (Izvor: autor)

Nakon ultrazvučne ekstrakcije, uzorci su profiltrirani preko filter papira, a potom je odpipetirano 8 mL filtrata i prebačeno u izvagane falkon epruvete od 15 mL koje su uparene na SpeedVac SPD1030 uređaju (**Slika 13**). Nakon uparavanja, dobiven je suhi ekstrakt koji je korišten za daljnju analizu.



Slika 13 SpeedVac SPD1030 (Izvor: autor)

### 3.3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

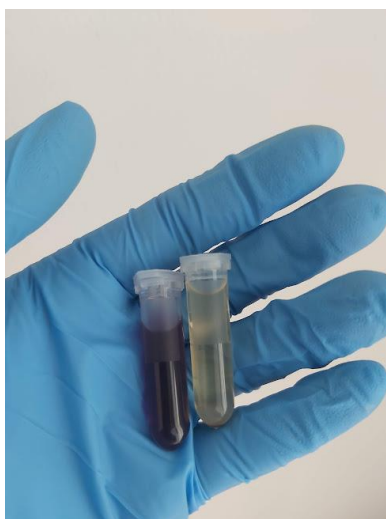
Određivanje ukupnih fenola vršilo se prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi (Jakobek i sur., 2007) prilikom koje se kao kalibracijski standard koristio Folin-Ciocalte reagens i galna kiselina. Prvo su pripremljene otopine za mjerenje na način da je 20  $\mu\text{L}$  uzorka koncentracije 1 mg/mL razrijeđeno sa 1580  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Potom je otopinama dodano 100  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog Folin-Ciocalte reagensa te nakon 3 minute 200 g/L otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  koja se dodala kako bi se reakcija zaustavila. Otopina natrijeva karbonata pripremljena je na način da se 200 g bezvodnog natrijeva karbonata kuhalo u 1 L vode. Takvi pripremljeni uzorci su potom termostatorirani kroz 30 minuta na temperaturi od 40°C, a potom mjereni. Mjerenje apsorbancije je provedeno pri 765 nm kroz tri paralele na UV/VIS Spektrofotometru (LLG-uniSPEC 2). Dobiveni rezultati su izraženi kao % ekvivalenta galne kiseline (GAE) po masi suhog ekstrakta, izračunati prema kalibracijskoj krivulji koja je konstruirana za različite koncentracije galne kiseline (5-5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Slika 14 prikazuje uzorke nastale tijekom određivanja ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima.



Slika 14 Uzorci nastali tijekom određivanja ukupnih fenola u ekstraktima od pregrada oraha (Izvor: autor)

### 3.3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata je određena DPPH metodom koja se zasniva na redukciji slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) u prisutnosti antioksidansa (Bisby i sur., 2008). Ova reakcija je praćena promjenom boje iz ljubičaste u žutu (**Slika 15**).



**Slika 15** Promjena boje uzorka nakon dodatka DPPH otopine (Izvor: autor)

Otopine za mjerenje su dobivene na način da se u 1,2 mL ekstrakta, koncentracije 0,25 mg/mL, dodavalo 0,5 mL svježe pripremljene DPPH otopine. Nakon 30 minuta stajanja uzorka u mraku, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm na spektrofotometru UV/VIS LLG Labware (model: LLG-uniSPEC). Rezultati su izračunati prema jednadžbi (3):

$$\% DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (3)$$

Gdje je:

$A_{DPPH}$ - kontrola apsorbancije gdje je umjesto uzorka dodan metanol,

$A_b$ - apsorbancija uzorka (umjesto DPPH je dodan metanol),

$A_s$ - apsorbancija uzorka koji je pomješšan sa DPPH otopinom,

Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije DPPH radikala ( $\%DPPH$ ).

### 3.3.6. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA PRIMJENOM HPLC-a

Dobiveni ekstrakt ultrazvučne ekstrakcije (1:20) podvrgnut je analizi, a najprije se proveo postupak filtracije kroz politetrafluoroetilen (PTFE) filtere s veličinom pora 0,45  $\mu\text{m}$  u vialu od 6 mL. Ovim postupkom su uklonjene krute čestice koje bi potencijalno mogle oštetiti cijeli HPLC sustav.

Korištenjem HPLC sustava Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) analizirali su se fenoli u dobivenim ekstraktima. HPLC sustav je opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektora (G7115A), autosamplerom (automatskog uzorkivača) (G7129A) kapaciteta od 36 viala od 6 mL sakupljača frakcija (G1364E). Pomoću računalnog programa ChemStation vršila se obrada podataka i upravljanje sustavom.

Navedeni sustav korišten je za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenola iz ekstrakata unutarnjih pregrada oraħa. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone InfinityLab Inertsil ODS-3V, duljine 250 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 5  $\mu\text{m}$ .

Odvajanje analiziranih spojeva provedeno je gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 1 mL/min tijekom 65 minuta, pri čemu je kao faza A korištena 0,1% mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka), a kao faza B 0,1% mravlja kiselina u metanolu. Gradijent je postavljen kako slijedi: 0,00-8,00 min 90% A; 8,00-16,00 min 75% A; 16,00-28,00 min 55% A; 28,00-55,00 min 20% A; od 55,00-65,00 min 10% A nakon čega je uslijedilo period od 15 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen injektiranja bio je 10  $\mu\text{L}$ , valna duljina UV detekcije bila je 240, 250, 260, 270, 280, 330 i 360 nm, a analiza je provedena na 50 °C.

**Slika 16** prikazuje visoko djelotvoran tekućinski kromatograf s detektorom s nizom dioda (Agilent Technologies 1260 Infinity, SAD) koji je korišten za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenola iz ekstrakata unutarnjih pregrada oraħa.



**Slika 16** Visoko djelotvoran tekućinski kromatograf s detektorom s nizom dioda (Agilent Technologies 1260 Infinity, SAD) (Izvor: Stela Jokić)

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova s dostupnim standardima, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Vrijeme zadržavanja pojedinog fenolnog spoja dano je u **Tablici 4**.

Tablica 4 Vrijeme zadržavanja pojedinog fenolnog spoja

FENOLNI SPOJ	VRIJEME ZADRŽAVANJA (min)	R <sup>2</sup>
Galna kiselina	6,724	0,99904
Protokatehnična kiselina	10,646	1,00000
Epigalokatehin	12,406	0,99505
Neoklorogenska kiselina	12,613	0,99997
Katehin	12,952	0,99997
Pelargonin 3 glukozid	13,418	0,99995
Procijanidin B2	13,780	0,99997
Peonidin 3 arabinozid	15,612	0,99167
Klorogenska kiselina	16,420	0,99999
Kafeinska kiselina	17,673	0,99983
Epikatehin	17,773	0,99736
Siringična kiselina	19,840	0,99995
2,3, dihidroksi benzojeva kiselina	22,590	0,99760
7-hidroksi kumarin	24,436	0,99998
p- kumarinska kiselina	24,962	0,99992
Procianidin A2	25,130	0,99996
Skopoletin	25,309	0,99999
Trans ferulična kiselina	27,076	0,99998
Sinapična kiselina	27,522	0,99986
Benzojeva kiselina	29,833	0,99997
Narginin	30,574	0,99999
Rutin	30,664	0,99984
Kvercetin 3-β-D-glukozid	30,878	0,99999
Resveratrol	31,503	0,99939
Elargična kiselina	31,708	0,95516
Floridzin dihidrat	32,345	0,99993
Miricetin	33,402	0,98601
Herniarin	34,035	0,99777
Kvercetin	38,707	0,99996
Naringenin	38,918	0,99997
Hesperetin	40,103	1,00000
Apigenin	42,200	0,99990
Krisin	47,644	0,99774
Flavon	47,962	0,99988



Vrijeme zadržavanja za galnu kiselinu bilo je 6,724 min, za protokatehničnu kiselinu 10,646 min, za epigalokatehin 12,406 min, za neoklorogensku kiselinu 12,613 min, za katehin 12,952 min, za pelargonin 3 glukozid 13,418 min, za procijanidin B2 13,780 min, peonidin 3 arabinozid 15,612 min, za klorogensku kiselinu 16,420 min, za kafeinsku kiselinu 17,673 min, za epikatehin 17,773 min, za siringičnu kiselinu 19,840 min, za 2,3,dihidroksi benzojevu kiselinu 22,592 min, za 7-hidroksi kumarin 24,436 min, za p-kumarinsku kiselinu 24,962 min, za procijanidin A2 25,130 min, za skopoletin 25,309 min, za trans feruličnu kiselinu 27,076 min, za sinapičnu kiselinu 27,522 min, za benzojevu kiselinu 29,833 min, za narginin 30,574 min, za rutin 30,664 min, za kvercetin 3- $\beta$ -D-glukozid 30,878 min, za resveratrol 31,503 min, za elagičnu kiselinu 31,708 min, za floridzin dihidrat 32,345 min, za miricetin 33,402 min, za herniarin 34,035 min, za kvercetin 38,707 min, za naringenin 38,918 min, za hesperetin 40,103 min, za apigenin 42,200 min, za krisin 47,644 min i za flavon 47,962 min.

Standardne kalibracijske krivulja za sve standarde fenola pripremljene su u rasponu od 1,00-50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Linearost kalibracijske krivulje potvrđena je s  $R^2 = 0,99904$  za galnu kiselinu,  $R^2=1,00000$  za protokatehničnu kiselinu,  $R^2=0,99505$  za epigalokatehin,  $R^2=0,99997$  za neoklorogensku kiselinu,  $R^2=0,99997$  za katehin,  $R^2=0,99995$  za pelargonin 3 glukozid,  $R^2=0,99997$  za procijanidin B2,  $R^2=0,99167$  za peonidin 3 arabinozid,  $R^2=0,99999$  za klorogensku kiselinu,  $R^2=0,99983$  za kafeinsku kiselinu,  $R^2=0,99736$  za epikatehin,  $R^2=0,99995$  za siringičnu kiselinu,  $R^2=0,99760$  za 2,3, dihidroksi benzojevu kiselinu,  $R^2=0,99998$  za 7-hidroksi kumarin,  $R^2=0,99992$  za p-kumarinsku kiselinu,  $R^2=0,99996$  za procijanidin A2,  $R^2=0,99999$  za skopoletin,  $R^2=0,99998$  za trans feruličnu kiselinu,  $R^2=0,99986$  za sinapičnu kiselinu,  $R^2=0,99997$  za benzojevu kiselinu,  $R^2=0,99999$  za narginin,  $R^2=0,99984$  za rutin,  $R^2=0,99999$  za kvercetin 3- $\beta$ -D-glukozid,  $R^2=0,99939$  za resveratrol,  $R^2=0,95516$  za elagičnu kiselinu,  $R^2=0,99993$  za floridzin dihidrat,  $R^2=0,98601$  za miricetin,  $R^2 = 0,99777$  za herniarin,  $R^2=0,99996$  za kvercetin,  $R^2=1,00000$  za hesperetin,  $R^2=0,99990$  za apigenin,  $R^2=0,99774$  za krisin i  $R^2=0,99988$  za flavon.

### 3.3.7. ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA PRIMJENOM GC/FID

Priprema metilnih estera masnih kiselina provedena je prema normi [HRN EN ISO 12966-2](#). Prvo je odvagano 100 mg ekstrahiranog uzorka CO<sub>2</sub> ekstrakta unutarnjih pregrada, potom dodano 10 mL heksana i mučkano u tresilici (HS260 control, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka) dok se nije otopila sva mast. Za pripremu metilnih estera masnih kiselina, dodano je 200 µL 2M metanolne otopine kalij hidroksida (bazno katalizirana transesterifikacija). Uzorci su mučkani 30 s, a potom centrifugirani 15 min na 3000 rpm i temperaturi od 15°C.

Nakon toga, 200 µL uzorka je filtrirano kroz PTFE filter prije injektiranja u plinski kromatograf. Pripravljene metilni esteri masnih kiselina analizirani su plinskom kromatografijom prema normi [HRN EN ISO 12966-4](#), a korišten je plinski kromatograf 7890B (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD) po temperaturnom programu prikazanom u **Tablici 5**.

**Tablica 5** GC/FID uvjeti za određivanje sastava masnih kiselina

<b>KOLONA:</b>	Kapilarna kolona HP88 100 x 0,25 mm x 0,20 µm (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
<b>DETEKTOR:</b>	FID detektor
<b>AUTOINJEKTOR:</b>	Agilent 7683 A
<b>TEMPERATURA INJEKTORA:</b>	250 °C
<b>VOLUMEN INJEKTIRANJA:</b>	1 µL
<b>SPLIT/ SPLITLESS MOD:</b>	Split 1:50
<b>PLIN NOSAČ I PROTOK:</b>	Helij 5.0; 2 mL/min
<b>TEMPERATURNI PROGRAM:</b>	120°C, 1 min; 10°C/min do 175°C zadržavanje 10 min; 5°C / min do 210°C zadržavanje 5 min; 5°C/min do 230°C zadržavanje 5 min
<b>FID PARAMETRI:</b>	Helij 40 mL/min; Zrak 450 mL/min; Dušik 30 mL/min
<b>VRIJEME URAVNOTEŽENJA KOLONE IZMEĐU ANALIZA:</b>	2 minute na 120°C

Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja (*engl.* retention time) 37 metil estera masnih kiselina standardne smjese analizirane pri istim uvjetima. Pri svakoj analizi, uz uzorke i standard, korišten je i certificirani referentni materijal koji je pripremljen i analiziran na isti način kao i uzorci. Rezultat je izražen kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline. Granica detekcije

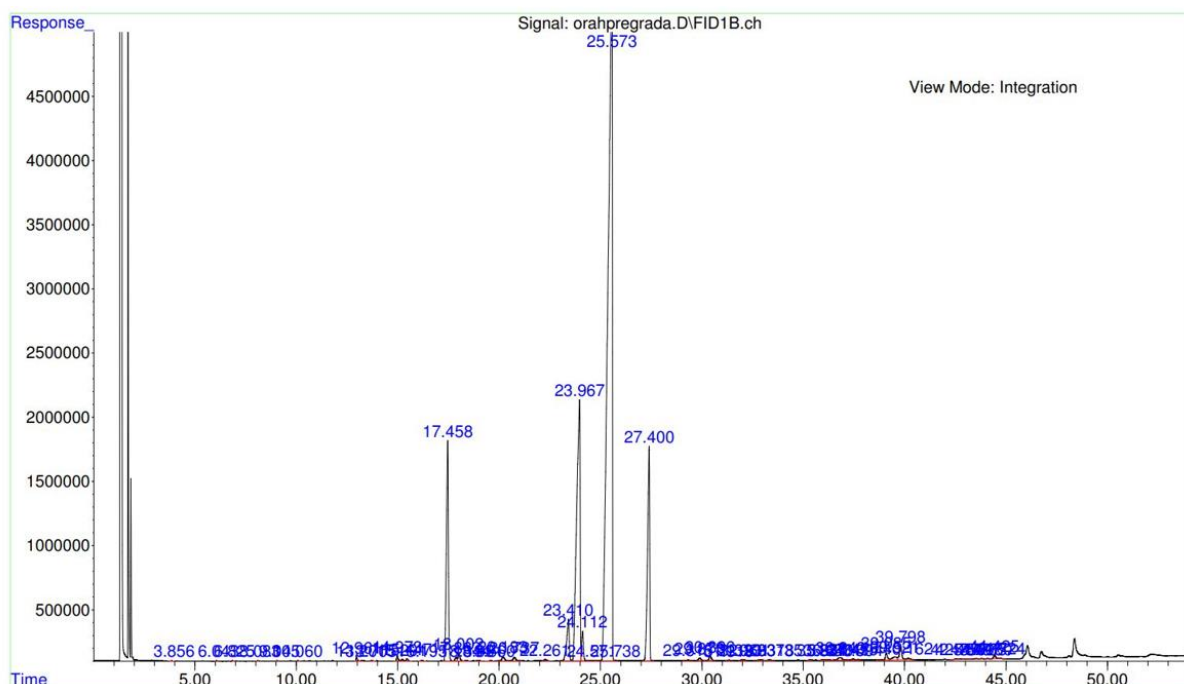
metode je bila 0,1%. Vrijednosti utvrđene u validacijskom postupku za parametar istinitosti su uspoređivane s kriterijem definiranim [Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata \(NN 2/2005\)](#), koji za dokazivanje istinitosti pri udjelu mase >10 µg/kg može odstupati od -20% do +10% u odnosu na certificiranu vrijednost (Aladić, 2015).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Sve veće potrebe za iskorištenje nusproizvoda prehrambene industrije su rezultirale usavršavanjem već postojećih tehnologija prerade te zanimanje za nove tehnologije kako bi sam proces bio što učinkovitiji čime se počinju koristiti i razne inovativne tehnike ekstrakcije za separiranje bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda. Unutarnje pregrade oraħa su bogat izvor fenolnih spojeva kao što su polifenoli, flavonoidi i tanini, ali literatura o njihovom sastavu još uvijek je oskudna. Stoga je primarni cilj rada bio istražiti mogućnost iskorištenja ovog vrijednog nusproizvoda koji nastaje tijekom prerade oraħa, primjenom inovativnih tehnika ekstrakcije te naglasiti mogućnosti iskorištenja otpada prehrambene industrije kao bogatog izvora visokovrijednih bioaktivnih spojeva s potencijalnom primjenom u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima.

#### 4.1. EKSTRAKCIJA MASNIH KISELINA IZ UNUTARNJIH PREGRADA ORAħA PRIMJENOM SUPERKRITIČNOG CO<sub>2</sub>

Prvi korak istraživanja uključivao je ekstrakciju masnih kiselina iz unutarnjih pregrada oraħa primjenom ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) pri tlaku od 300 bar i temperaturi 40°C. Sastav masnih kiselina analiziran je pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID), a dobiveni kromatogram je prikazan na **Slici 17**.



**Slika 17** Kromatogram masnih kiselina dekantiranih u ekstraktu unutarnjih pregrada oraħa

Sastav detektiranih masnih kiselina nalazi se u **Tablici 6**.

**Tablica 6** Sastav masnih kiselina u CO<sub>2</sub> ekstraktu unutarnjih pregrada oraha

MASNA KISELINA	(%)
<b>C15:0</b>	0,147
<b>C16:0</b>	8,753
<b>C16:1</b>	0,285
<b>C17:0</b>	0,216
<b>C17:1</b>	0,206
<b>C18:1n9t + C18:1n9c</b>	18,376
<b>C18:2n6c</b>	61,951
<b>C18:3n3</b>	9,339
<b>C20:1</b>	0,217
<b>C22:0</b>	0,222
<b>C23:0</b>	0,108

Iz **Tablice 6** je uočljivo da najveći udio u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktu unutarnjih pregrada oraha ima linolna kiselina (C18:2n6c) 61,951%, potom oleinska kiselina (C18:1n9t+C18:1n9c) 18,376%,  $\alpha$ -linoleinska kiselina (C18:3n3) 9,339%, palmitinska kiselina (C16:0) 8,753%, a potom u manjim udjelima slijede palmitooleinska kiselina (C16:1) 0,285%, behenska kiselina (C22:0) 0,222%, *cis*-11-eikozenska kiselina (C20:1) 0,217%, heptadekanska kiselina (C17:0) 0,216%, *cis*-10-heptadekanska kiselina (C17:1) 0,206%, pentadekanska kiselina (C15:0) 0,147% te trikazanoična masna kiselina (C23:0) 0,108%.

U istraživanju Hu Q. i sur. (2020) na unutarnjim pregradama oraha udio detektiranih zasićenih masnih kiselina je iznosio 1099,10 mg/kg s.tv., s najvećim udjelom palmitinske kiseline (C16:0) koja se često koristi za proizvodnju kozmetike te kao emulgator u prehrambenoj industriji. Također, palmitinska kiselina ima sposobnost smanjenja kolesterola te se koristi u terapijske i preventivne svrhe kod bolesti poput ateroskleroze. Od nezasićenih masnih kiselina, linolna i oleinska, koje su ujedno i esencijalne s dobrom oksidacijskom stabilnošću, su bile najzastupljenije što se slaže sa eksperimentalnim podacima dobivenim u ovome radu.

## 4.2. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA UDIO FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST UNUTARNJIH PREGRADA ORAHA

### 4.2.1. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA NA UDIO FENOLA U EKSTRAKTIMA

Nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije zaostaje materijal bogat fenolnim spojevima koji su se iz unutarnjih pregrada oraha u daljnjem eksperimentu ekstrahirali primjenom ultrazvuka korištenjem ultrazvučne sonde pri različitim procesnim uvjetima (otapalo, amplituda, impuls). Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost u ekstraktima odredila se spektrofotometrijskim metodama. Za određivanje ukupnih fenola korištena je metoda po Folin-Ciocalteu. Kod ove metode, nakon dodatka Folin-Ciocalteu reagensa, nastaje obojeni produkt plave boje zbog oksidacije fenolnih grupa iz uzorka dok je ostatak nereduciranog reagensa žute boje (Bogadi, 2021). **Tablica 7** prikazuje udio ukupnih fenola u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktu unutarnjih pregrada oraha (mg/L) u ovisnosti od procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije (otapalo, amplituda, impuls) prema BBD iz koje je uočljivo da je najveća koncentracija ukupnih fenola zabilježena korištenjem 96%-tnog etanola kao otapala, amplitude 100% i impulsa 60% (1444,67 mg/L), dok je najmanje ukupnih fenola zabilježeno u ekstraktu u kojem se kao otapalo koristila voda s amplitudom 60% i impulsom 20% (126,00 mg/L). Stoga je za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljaka vrlo bitan pravilan izbor otapala, a odabire se ono otapalo koje ima sličnu polarnost kao tvar koja se želi ekstrahirati (Altemimi i sur., 2017).

Lapornik i sur. (2005) proveli su istraživanje utjecaja vode i vodenih otopina metanola i etanola na ekstrakciju fenolnih spojeva iz nusproizvoda grožđa te crnog i crvenog ribizla. Rezultati su pokazali da je prinos fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije vodenim otopinama metanola i etanola bolji, nego kod primjene ekstrakcije čistom vodom. Rezultat se pripisuje manjoj polarnost vodenih otopina što je u skladu s eksperimentalnim podacima dobivenim u ovom radu.

**Tablica 7** Udio ukupnih fenola u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktu unutarnjih pregrada oraħa prema BBD

Eksp.	OTAPALO	AMPLITUDA	IMPULS	UKUPNI FENOLI
	%	%	%	GAE mg/L
1	0	60	100	148,00
2	48	60	60	707,33
3	48	20	20	757,33
4	96	60	20	1381,33
5	48	60	60	805,33
6	48	100	100	777,33
7	0	60	20	126,00
8	96	60	100	1166,67
9	0	20	60	140,00
10	96	20	60	1166,00
11	0	100	60	149,33
12	96	100	60	1444,67
13	48	60	60	942,67
14	48	20	100	886,00
15	48	100	20	795,33
16	48	60	60	888,00
17	48	60	60	801,33

Rusu i sur. (2018) su istraživali fitokemijski sastav ekstrakata unutarnjih pregrada oraħa u cilju optimizacije metode ekstrakcije kojom bi se dobio ekstrakt s visokim sadržajem aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Također, u cilju im je bila analiza fitokemijskog profila ekstrakta unutarnjih pregrada oraħa uz primjenu tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti-tandemna spektometrija (LC-MS/MS). Ekstraktu unutarnjih pregrada koji je sadržavao najveći udio polifenola, ispitana je antioksidacijska aktivnost (DPPH metodom i metodama inhibicije tirozinaze te FRAP metodom *engl.* ferric reducing antioxidant power). Rezultati istraživanja su pokazali da su primjenom Ultera-Turrax i acetonske ekstrakcijske metode dobiveni ekstrakti s najvećim udjelom biološki aktivnih spojeva iz čega se može zaključiti da na udio fenola u ekstraktu uvelike utječe i sam postupak ekstrakcije.



#### 4.2.2. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta pregrada oraha koristila se DPPH metoda koja se temelji na redukciji DPPH iona. Antioksidacijska tvar ima mogućnost doniranja atoma vodika ili prijenos elektrona na DPPH• molekulu koja time prelazi u stabilni reducirani oblik DPPH-H prilikom čega dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. S obzirom da svjetlo izravno ometa reakciju DPPH• radikala s tvari, ubrzavajući smanjenje apsorbancije i mijenjajući konačne rezultate, ovu metodu je potrebno provoditi u mraku. Mjerenjem apsorbancije prati se promjena intenziteta boje pri valnoj duljini od 517 nm (Mishra i sur., 2012). U **Tablici 8** je prikazana antioksidacijska aktivnost (%) SC-CO<sub>2</sub> ekstrakata unutarnjih pregrada oraha u ovisnosti od procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije prema (BBD).

**Tablica 8** Antioksidacijska aktivnost SC-CO<sub>2</sub> ekstrakta unutarnjih pregrada oraha u ovisnosti od procesnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije (prema BBD)

Eksp.	OTAPALO	AMPLITUDA	IMPULS	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST
	%	%	%	%
<b>1</b>	0	60	100	95,557
<b>2</b>	48	60	60	97,263
<b>3</b>	48	20	20	98,274
<b>4</b>	96	60	20	99,246
<b>5</b>	48	60	60	97,679
<b>6</b>	48	100	100	99,207
<b>7</b>	0	60	20	94,830
<b>8</b>	96	60	100	97,858
<b>9</b>	0	20	60	95,294
<b>10</b>	96	20	60	99,821
<b>11</b>	0	100	60	96,608
<b>12</b>	96	100	60	99,187
<b>13</b>	48	60	60	98,473
<b>14</b>	48	20	100	99,048
<b>15</b>	48	100	20	99,306
<b>16</b>	48	60	60	98,552
<b>17</b>	48	60	60	98,909

Iz **Tablice 8** je vidljivo da je antioksidacijska aktivnost u svim uzorcima slična neovisno o promjeni procesnih parametara (otapalo, amplituda, impuls). Ipak, najbolje rezultate pokazuje ekstrakt koji je pripremljen sa 96%-tnim etanolom, uz amplitudu 20% te impuls 60% (99,821%). Najslabija antioksidacijska aktivnost je dobivena primjenom vode kao otapala pri amplitudi od 60% i impulsu od 20% (94,830%). S obzirom na dobivene vrijednosti za ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost, vidljivo je da je primjena 96%-tnog etanola kao otapala rezultirala najvećim vrijednostima te ako se pogledaju dobivene vrijednosti može se zaključiti da su ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost u međusobnoj koleraciji.

Nekoliko je autora istraživalo antioksidacijsku aktivnost unutarnjih pregrada oraħa. Chen i sur. (2022) su procjenjivali antioksidacijski učinak ekstrakta unutarnjih pregrada oraħa na rafinirano sojino ulje tijekom postupka dubokog prženja. Ekstrakt je uspješno odgodio toplinsku oksidaciju nezasićenih masnih kiselina i inhibirao potencijalno stvaranje toksičnih komponenti kao što su toksični aldehidi ili polimeri triglicerida. Ovi rezultati mogu biti posljedica antioksidacijskih i sinergističkih sposobnosti.

Zhang i sur. (2020) su dokazali da se antioksidacijski kapacitet unutarnjih pregrada oraħa povećava u ovisnosti o koncentraciji fenola. Također, na antioksidacijsku aktivnost je utjecala i primijenjena metoda ekstrakcije. Rezultati su pokazali da su ekstrakti unutarnjih pregrada oraħa dobiveni ekstrakcijom metanolnom kondenzacijom uz refluks bili aktivniji u usporedbi s ekstraktima dobivenim ekstrakcijom potpomognutom enzimima i ultrazvučnim valovima.

Hu i sur. (2021) su analizirali antioksidacijsko djelovanje dva različita ekstrakta. Prvi ekstrakt je bio pripravljen vrućom vodom (temperature 80°C, 1:20 w/v), a drugi 70%-tnom vodenom otopinom etanola (sobna temperatura). Oba ekstrakta pokazala su visoko antioksidacijsko djelovanje i sposobnost zaštite HepG2 stanica. Također, navedeni ekstrakti su pokazali učinkovito djelovanje u uklanjanju DPPH iona i ABTS (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>).

#### 4.2.3. STATISTIČKA ANALIZA PARAMETARA UAE

Provedena je i optimizacija procesa ultrazvučne ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa Design Expert®. Svrha optimizacije bila je pronalazak optimalnih uvjeta u odnosu na ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost. Ova metoda se često

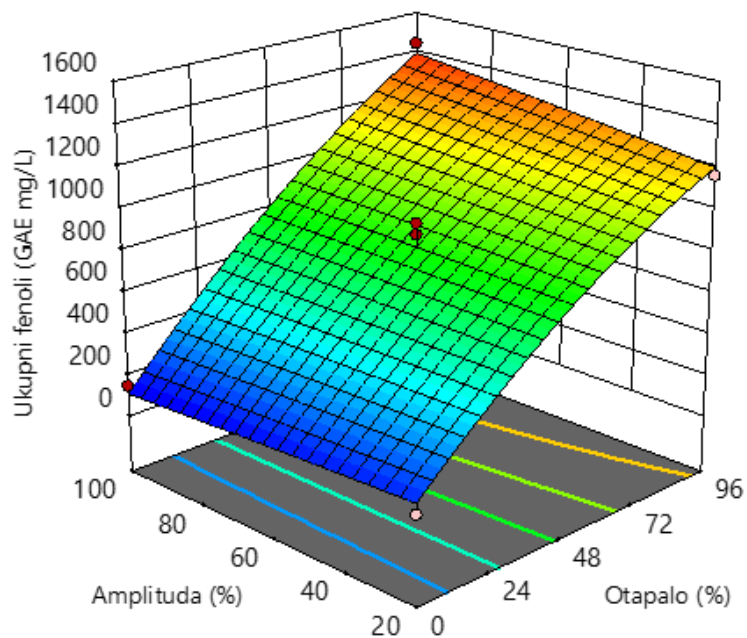
koristi u prehrambenoj industriji za poboljšanje procesa i iskorištenja, a da pri tome ne dođe do povećanja troškova i vremena. **Tablica 9** prikazuje statističku analizu (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za ukupne fenole pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije.

**Tablica 9** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za ukupne fenole

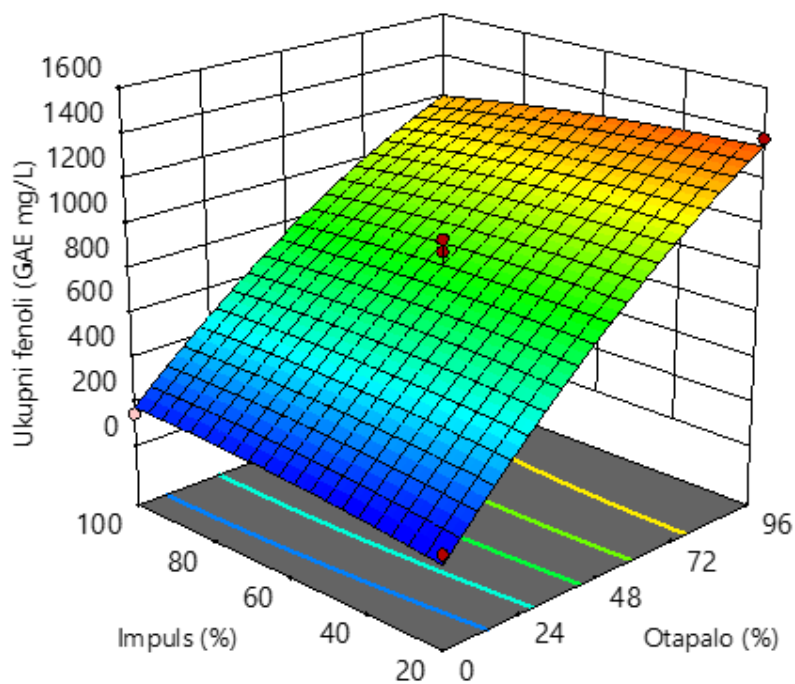
IZVOR VARIJABILNOSTI	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<b>Model</b>	2,731E+06	9	3,034E+05	35,17	< 0,0001
<b><math>X_1</math>-Otapalo</b>	2,640E+0,6	1	2,640E+06	305,95	< 0,0001
<b><math>X_2</math>-Amplituda</b>	5904,04	1	5904,04	0,6843	0,4354
<b><math>X_3</math>-Impuls</b>	840,30	1	840,30	0,0974	0,7641
<b><math>X_1X_2</math></b>	18136,01	1	18136,01	2,10	0,1904
<b><math>X_1X_3</math></b>	14001,99	1	14001,99	1,62	0,2433
<b><math>X_2X_3</math></b>	5378,02	1	5378,02	0,6234	0,4557
<b><math>X_1^2</math></b>	43134,42	1	43134,42	5,00	0,0604
<b><math>X_2^2</math></b>	31,09	1	31,09	0,0036	0,9538
<b><math>X_3^2</math></b>	2078,34	1	2078,34	0,2409	0,6386
<b>Ostatak</b>	60393,12	7	8627,59		
<b>Nedostatak modela</b>	27861,79	3	9287,26	1,14	0,4335
<b>Pogreška</b>	32531,33	4	8132,83		
<b>Ukupno</b>	2,791E+06	16			
<b><math>R^2</math></b>				0,9784	

Iz **Tablice 9** je vidljivo da regresijski model za ispitivani odziv pokazuje statistički značajni utjecaj s obzirom na promatranu p-vrijednost (<0,0001) uz vrijednost  $R^2$  0,9784. Nedostatak modela nije bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ) za promatrani odzivi što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda. Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara na udio fenola, jedino otapalo ima statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u ekstraktu unutarnjih pregrada oraħa ( $p < 0,05$ ). **Slika 18** prikazuje trodimenzionalan dijagram odzivnih površina za ukupne fenole u ovisnosti otapalo-amplituda, a **Slika 19**

trodimenzionalan dijagram odzivnih površina za ukupne fenole u ovisnosti otapalo-impuls pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom.



**Slika 18** Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina za ukupne fenole u ovisnosti otapalo-amplituda pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom



**Slika 19** Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina za ukupne fenole u ovisnosti otapalo-amplituda pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za ukupne fenole, vidljivo je da vrijednosti istih rastu povećanjem vrijednosti amplitude i udjela (%) etanola. Također, povećanje vrijednosti impulsa i otapala povećava udio ukupnih fenola u ekstraktu.

Kalogiour i sur. (2021) su analiziranjem pojedinačnim flavonoida sa ANOVA-om dokazali da na sadržaj flavonoida u pregradama oraha značajan utjecaj ima sorta.

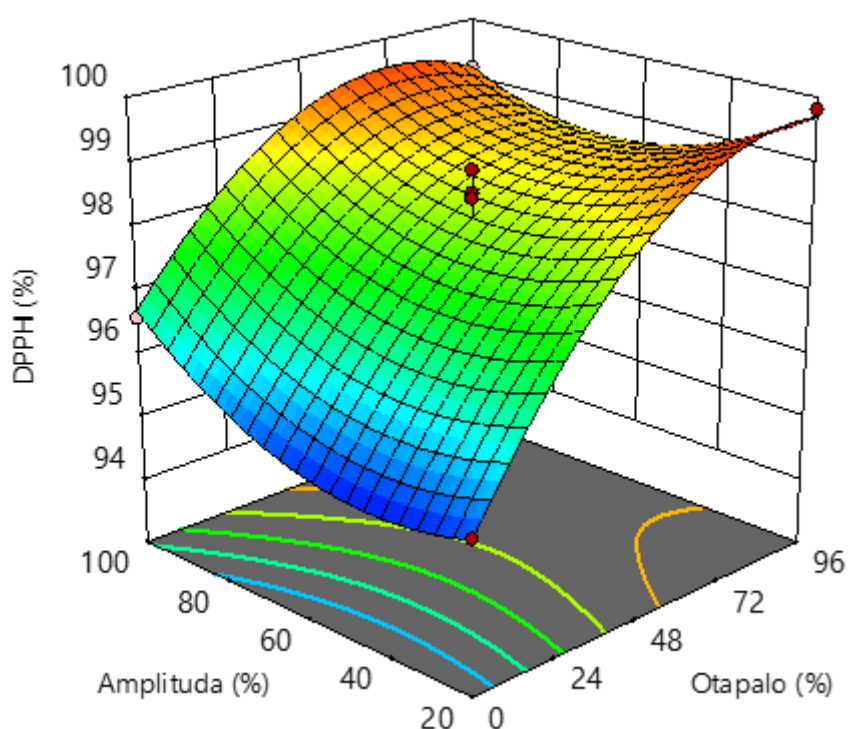
**Tablica 10** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za antioksidacijsku aktivnost

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
<b>Model</b>	35,74	9	3,97	13,10	0,0013
<b><math>X_1</math>-Otapalo</b>	23,88	1	23,88	78,78	<0,0001
<b><math>X_2</math>-Amplituda</b>	0,4376	1	0,4376	1,44	0,2687
<b><math>X_3</math>-Impuls</b>	0,0000	1	0,0000	0,0001	0,9931
<b><math>X_1X_2</math></b>	0,9487	1	0,9487	3,13	0,1202
<b><math>X_1X_3</math></b>	1,12	1	1,12	3,69	0,0962
<b><math>X_2X_3</math></b>	0,1905	1	0,1905	0,6285	0,4539
<b><math>X_1^2</math></b>	6,76	1	6,76	22,29	0,0022
<b><math>X_2^2</math></b>	2,83	1	2,83	9,32	0,0185
<b><math>X_3^2</math></b>	0,0053	1	0,0053	0,0176	0,8982
<b>Ostatak</b>	2,12	7	0,3032		
<b>Nedostatak modela</b>	0,2747	3	0,0916	0,1982	0,8926
<b>Pogreška</b>	1,85	4	0,4619		
<b>Ukupno</b>	37,87	16			
<b><math>R^2</math></b>				0,9440	

Iz **Tablice 10** je vidljivo da je regresijski model za ispitivani odziv statistički značajan s obzirom na promatranu p-vrijednost (0,0013) sa  $R^2$  vrijednosti 0,9440. Nedostatak modela nije značajan za promatrani odzivi što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda.

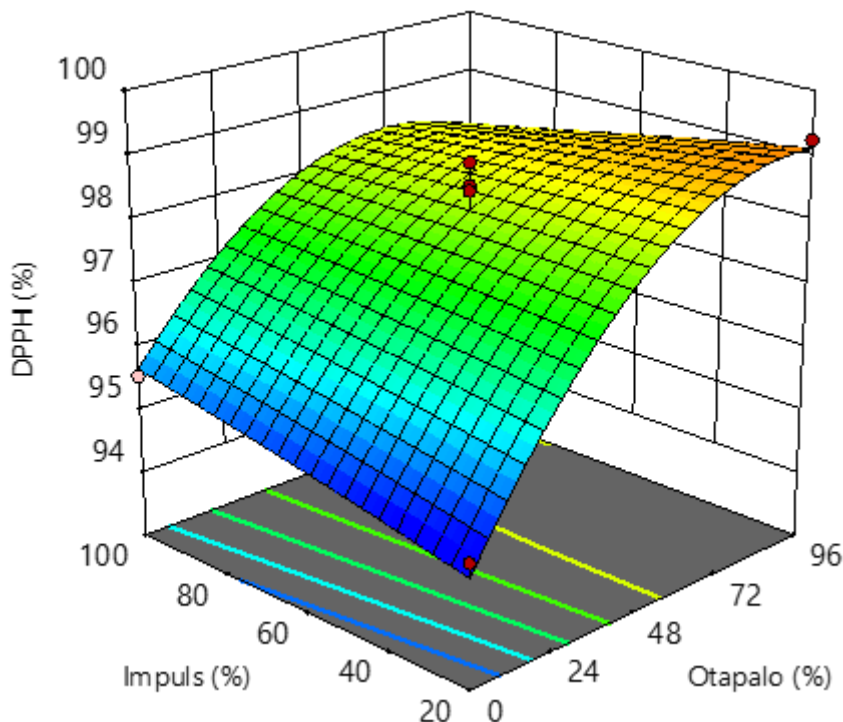
Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, otapalo ima statistički značajan utjecaj na odziv ( $<0,0001$ ). Kvadratni član otapala ( $X_1^2$ ) i kvadratni član amplitude ( $X_2^2$ ) također imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odziv.

**Slika 20** prikazuje trodimenzionalan dijagram odzivnih površina za antioksidacijsku aktivnost u ovisnosti otapalo-amplituda. Iz 3D dijagrama je uočljivo da povećanjem postotka etanola u vodenoj otopini dolazi do značajnog rasta DPPH (%) u odnosu na udio DPPH u čistoj vodi. Povećanjem vrijednosti amplitude također dolazi do blagog porasta antioksidacijske aktivnosti.



**Slika 20** Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina za antioksidacijsku aktivnost u ovisnosti otapalo-amplituda pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

**Slika 21** prikazuje trodimenzionalan dijagram odzivnih površina za antioksidacijsku ovisnost otapalo-impuls pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za unutarnje pregrade oraħa.



**Slika 21** Trodimenzionalan dijagram odzivnih površina za antioksidacijsku ovisnost otapalo-impuls pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za antioksidacijsku aktivnost vidljivo je da otapalo najznačajnije utječe na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, što je veći udio etanola, veće su i vrijednosti DPPH (%). Također, povećanjem impulsa i amplitude povećava se udio DPPH u ekstraktu unutarnjih pregrada oraha.

#### 4.3. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA POJEDINIH FENOLA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI S DETEKTOROM NIZA DIODA (HPLC-DAD).

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa dostupnim standardima, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Rezultati identifikacije i kvantifikacije pojedinih fenola, primjenom HPLC-DAD uređaja, su prikazani u **Tablici 11**.

Tablica 11 Ukupni fenoli iz ekstrakata unutarnjih pregrada

Rezultati mg/L		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
RT	SPOJ	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN	RUN
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
6,724	Galna kiselina	2,06	7,18	10,51	-	7,09	3,87	-	-	-	-	-	-	5,29	7,56	9,02	6,27	6,70
10,646	Protokatehnična kiselina	1,18	4,36	4,11	0,86	4,37	4,99	2,42	1,45	3,42	1,01	4,04	1,06	0,63	0,77	0,62	0,74	0,59
12,406	Epigalokatehin	27,71	-	9,93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,83	18,49	-	-	14,52
12,613	Neoklorogenska kiselina	0,32	1,64	1,15	0,44	1,06	1,63	0,97	-	0,37	0,36	0,23	0,54	1,39	0,25	0,22	1,78	1,91
12,952	Katehin	5,25	25,60	21,22	10,18	25,97	30,34	3,22	16,44	3,35	11,47	0,63	10,97	26,77	24,91	21,60	25,84	26,53
13,418	Pelargonin 3 glukozid	-	2,24	1,17	0,57	2,27	2,94	-	1,04	-	0,62	-	0,63	2,13	1,83	1,61	1,97	2,12
13,780	Procijanidin B2	4,94	5,69	4,70	0,93	5,69	5,11	4,49	-	4,84	-	-	-	7,67	3,60	3,24	3,58	4,32
15,612	Peonidin 3 arabinozid	-	9,94	5,39	10,17	9,62	12,01	4,31	11,05	3,20	7,98	-	10,61	11,48	56,61	45,97	64,72	73,57
16,420	Klorogenska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17,673	Kafeinska kiselina	1,06	0,1	0,11	-	0,11	0,20	1,11	-	1,16	-	-	-	0,09	0,11	0,09	0,13	0,14
17,773	Epikatehin	6,94	7,06	7,57	-	4,75	4,44	7,78	-	10,44	-	-	-	2,33	2,21	1,98	2,48	2,69
19,840	Siringična kiselina	2,78	0,63	0,51	-	0,57	0,62	2,29	-	2,23	-	-	-	1,68	0,80	0,67	0,73	0,70
22,590	2,3 dihidroksi benzojeva kiselina	6,24	5,24	4,91	0,47	5,39	5,90	0,00	1,20	0,00	0,64	4,55	0,73	5,58	5,68	4,67	5,67	5,61
24,436	7-hidroksni kumarin	0,45	-	-	0,35	-	-	0,49	0,84	0,48	0,58	-	0,32	0,35	0,50	0,35	-	-
24,962	p- kumarinska kiselina	-	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,86	0,25	0,32	-	-
25,130	Procijanidin A2	1,85	0,67	2,81	-	1,91	0,71	1,43	-	1,30	-	-	-	1,23	0,53	0,48	0,71	0,66
25,309	Skopoletin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27,076	Trans ferulična kiselina	-	0,37	0,47	0,14	0,37	0,42	-	0,16	0,21	0,13	-	0,16	0,39	0,37	0,49	0,39	0,41

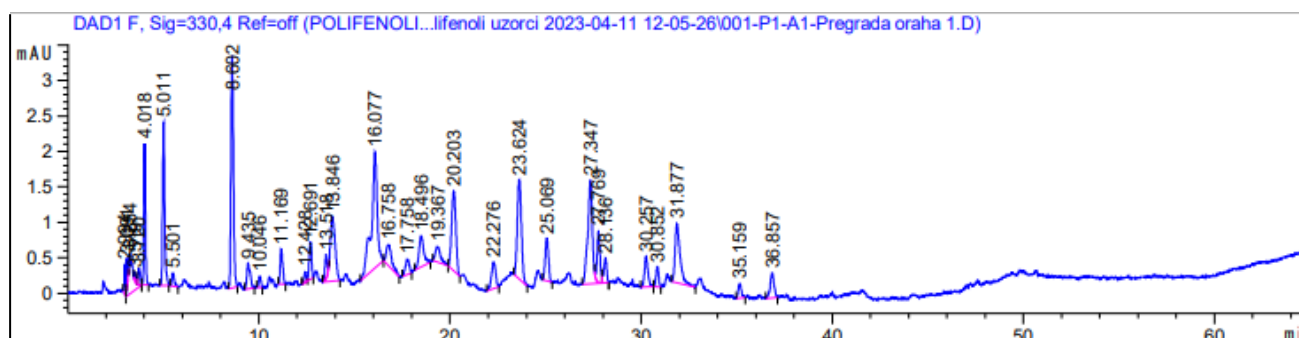


27,522	<b>Sinapična kiselina</b>	2,01	2,93	2,55	1,14	2,93	4,65	1,37	1,39	1,12	1,24	0,88	0,57	3,85	2,99	2,95	3,79	3,51
29,833	<b>Benzojeva kiselina</b>	-	1,35	1,81	-	1,97	1,29	-	0,63	-	-	-	-	2,77	4,37	3,62	5,34	5,97
30,574	<b>Narginin</b>	-	0,71	1,07	-	0,80	0,79	-	-	-	-	-	-	1,44	1,27	2,07	2,24	2,29
30,664	<b>Rutin</b>	-	1,26	1,72	-	1,64	1,23	-	-	-	-	-	-	3,48	2,75	2,18	1,35	0,60
30,878	<b>Kvarcetin 3-β-D- glukozid</b>	1,30	2,31	2,39	0,61	2,16	2,81	1,08	0,64	1,31	0,39	1,22	0,56	1,24	2,11	3,18	3,63	3,82
31,503	<b>Resveratrol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,708	<b>Elagična kiselina</b>	7,78	73,96	76,17	15,10	77,60	81,12	1,94	23,52	3,12	14,95	-	17,59	92,87	86,32	88,45	92,06	95,95
32,345	<b>Florodizin dihidrat</b>	-	0,95	0,03	-	-	2,12	-	-	-	-	-	-	-	1,76	-	1,69	-
33,402	<b>Miricetin</b>	-	3,78	3,78	-	3,78	3,80	-	-	-	-	-	-	3,75	3,78	3,78	3,80	3,80
34,035	<b>Herniarin</b>	-	10,71	9,81	3,36	10,72	12,00	-	4,63	-	-	-	-	11,76	10,46	9,13	1,93	11,27
38,707	<b>Kvercetin</b>	0,34	0,56	0,62	0,28	0,58	0,41	0,26	0,32	0,25	0,29	-	0,30	0,60	0,65	0,63	0,74	0,83
38,918	<b>Naringenin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40,103	<b>Hesperetin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42,200	<b>Apigenin</b>	-	0,01	0,1	0,08	0,12	0,14	-	-	-	-	-	-	0,75	0,20	-	0,34	0,56
47,644	<b>Krisin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47,962	<b>Flavon</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Identifikacijom i kvantifikacijom pojedinačnih fenola na HPLC-DAD uređaju utvrđena je prisutnost 27 fenolnih spojeva, a najveći rezultat pokazala je elagična kiselina (95,95 mg/L) i to u UAE ekstraktu koji je pripremljen 50%-tnim etanolom, amplitudom 60% te impulsom 60%. Potom su nađene velike količine peonidina 3 arabinozida (73,57 mg/L; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 60%, impuls 60%), katehina (30,34 mg/L; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 100%, impuls 100%), epigalokatehina (27,71 mg/L; otapalo voda, amplituda 60%, impuls 100%), herniarina (12,00 mg/L otapalo 50%-tni etanol, amplituda 100%, impuls 100%), galne kiseline (10,51 mg/L; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 20%, impuls 20%), epikatehina (7,78 mg/L; otapalo voda, amplituda 60%, impuls 20%), procijanidina B2 (7,67 mg/L; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 60%, impuls 60%), 2,3, dihidroksi benzojeve kiseline (6,24 mg/L; otapalo voda, amplituda 60%, impuls 100%), benzojeve kiseline (5,97 mg/L otapalo 50%-tni etanol, amplituda 60%, impuls 60%), protokatehnične kiseline (4,99 mg/L; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 100, impuls 100%), sinapične kiseline (4,65 mg/L otapalo 50%-tni etanol, amplituda 100%, impuls 100%) i miricetina (3,80 mg/L otapalo 50%-tni etanol, amplituda 100%, impuls 100%; otapalo 50%-tni etanol, amplituda 60%, impuls 60%).

Ostali identificirani fenolni spojevi (neoklorogenska kiselina, pelargonin 3 glukozid, kafeinska kiselina, siringična kiselina, 7-hidroksi kumarin, p-kumarinska kiselina, procijanidin A2, trans ferulična kiselina, narginin, rutin, kvarcetina 3-β-D- glukozid, florodizin dihidrat, kvarcetin, apigenin) nađeni su nešto nižim koncentracijama. Iz dobivenih rezultata (**Tablica 11**) je vidljivo da procesni uvjeti UAE imaju značajan utjecaj na pojedinačne fenole.

**Slika 22** prikazuje kromatogram ukupnih fenola dobivenih HPLC analizom na visoko djelotvornom tekućinkom kromatografu s detektorom s nizom dioda (Agilent Tehnologies 1260 Infinity, SAD).



**Slika 22** Kromatogram ekstrakta unutarnjih pregrada oraha (eksperiment broj 1)

Zhan i sur. (2023) detaljno su opisali različite tipove ekstrakcija (voda, etanol, metanol) gdje svako od ispitivanih otapala ima različite ekstrakcijske afinitete prema bioaktivnim spojevima različitih bioloških aktivnosti. Rezultati su pokazali da i vodeni i etanolni ekstrakti pokazuju slične rezultate među kojim su najznačajniji udjeli elagične kiseline, galne kiseline, protokatehnične kiseline, kvercetina, katehina, niringenina iz skupine fenolnih kiselina i epigalokatehina iz skupine flavonoida, a slični rezultati su dobiveni i u ovom radu.

Također, autori su naveli da su u etanolnom ekstraktu unutarnjih pregrada oraha, ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (materijal:otapalo omjer 1:40 g/mL, s koncentracijom etanola od 30%, trajanjem ekstrakcije 15 min, pri temperaturi od 50°C), dobili ukupnu količinu fenola u vrijednosti 56,46 mg GAE/g.

Lui i sur. (2019) su istraživali profil unutarnjih pregrada oraha, a rezultati su potvrdili 75 pojedinačnih fenolnih spojeva u koje spadaju flavonoidi, tanini i fenolne kiseline. Također, u etanolnom ekstraktu unutarnjih pregrada oraha ukupan sadržaj polifenola je iznosio  $122,78 \pm 2,55$  GAE.

Također, Chen i sur. (2022) su u ekstraktu oraha identificirali 31 fenolni spoj od kojih su u najvećem udjelu bili katehin, kvercitrin, taksifolin, kvercetin 3- $\beta$ -d-glukozid, epikatehin, galna kiselina i 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina.

## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata u ovome istraživanju izvode se sljedeći zaključci:

- SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija provedena pri tlaku 300 bar i temperaturi 40°C pokazala je visoku selektivnost prema nepolarnim spojevima (masne kiseline).
- Najveći udio u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktu unutarnjih pregrada oraha dobiven GC-FID analizom ima linolna masna kiselina.
- Nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije zaostala je pogača bogata fenolnim spojevima koji su se ekstrahirali primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE).
- 96%-tni etanol kao otapalo, uz uvjete amplitude 100% i impulsa 60% prilikom UAE rezultirali su najvećim udjelom ukupnih fenola.
- Procesni uvjeti pri kojima je dobivena najveća antioksidacijska aktivnost su sljedeći: 96%-tni etanola kao otapalo, amplituda 20% i impuls 60%.
- Prema statističkoj značajnosti (ANOVA) utjecaja različitih procesnih uvjeta na ekstrakciju ukupnih fenola iz UAE ekstrakata unutarnjih pregrada oraha, vidljivo je da je otapalo imalo najveći utjecaj na ukupne fenole, dok amplituda i impuls nisu pokazali statistički značajan utjecaj na udio fenola.
- Analiza varijance (ANOVA) je pokazala da otapalo ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost u ekstraktu unutarnjih pregrada oraha dok amplituda i impuls nisu pokazali statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku vrijednost.
- Identificiranjem i kvantificiranjem pojedinačnih fenola primjenom HPLC-a dokazano je da najveći udio u ekstraktu dobivenom primjenom ultrazvuka ima elagična kiselina.
- Pregrade oraha mogu se smatrati novim vrijednim izvorima bioaktivnih spojeva, što može biti jedna od osnova njihove primjene u prehrambenoj industriji.

## 6. LITERATURA

- Abhipriya P, Abdullah S, Rama CP: Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, 9, 14, 2022.
- Aladić K, Jokić S, Moslavac T, Tomas S, Vidović S, Vladić J, Šubarić, D: Cold pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 28, 4, 1-10, 2014.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa L.*) ulja superkričnim CO<sub>2</sub> iz pogače nakon hladnog prešanja. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA: Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6, 42, 2017.
- Banožić M: Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S: Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1003-1007, 2008.
- Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33, 2005.
- Bucić-Kojić A, Sovova H, Planinić M, Tomas S: Temperature dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136, 1136-1140, 2013.
- Chen J, Zhang L, Li Q, Gao Y, Yu X: Utilization of Diaphragma Juglandis Extract as a Natural Antioxidant for Improving the Oxidative Stability of Soybean Oil during Deep Frying. *Food Chemistry*, 14, 100359, 2022.
- Fizeşan I, Rusu ME, Georgiu C, Pop A, Stefan MG, Muntean DM, Mirel S, Vostinaru O, Kiss B i Popa DS: Antitussive, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Effects of a Walnut (*Juglans regia L.*) Septum Extract Rich in Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 10 (1), 119, 2021.

- Hu G, Gao S, Mou D: Water and Alcohol Extracts from *Diaphragma juglandis* on Anti-Fatigue and Antioxidative Effects in Vitro and Vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 3132–3139, 2021.
- Hu Q, Liu J, Li J, Liu H, Deng N, Geng YY, Lu Y, Wang, Y: Phenolic Composition and Nutritional Attributes of *Diaphragma Juglandis Fructus* and Shell of Walnut (*Juglans regia L.*). *Food Science Biotechnology*, 29(2), 187–196, 2020.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 103, 369–377, 2007.
- Jokić S, Vidović S, Aladić K: Supercritical Fluid Extraction of Edible Oils. U *Supercritical Fluids: Fundamentals, Properties and Applications*, str. 205-228. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2014.
- Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO<sub>2</sub>. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Kalogiouri NP, Samanidou VE: A Validated Ultrasound-Assisted Extraction Coupled with SPE-HPLC-DAD for the Determination of Flavonoid sin by-Products of Plant Origin: An application Study for the Valorization of the Walnut Septum Membrane. *Molecules*, 26(21), 6418, 2021.
- Lapornik B, Prosek M, Wondra, AG: Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222, 2005.
- Liu R, Zhao Z, Dai S, Che X, Liu W: Identification and Quantification of Bioactive Compounds in *Diaphragma juglandis Fructus* by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 3811–3825, 2019.
- Martínez ML, Labuckas DO, Lamarque AL, i Maestri DM: Walnut (*Juglans Regia L.*): Genetic Resources, Chemistry, by-Products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (12), 1959–67, 2010.



- Mingzheng L, Change L, Chengmao C, Liqiang W, Xinping L, Ji C, Huimin Y, Xiaowei Z, Huayang Z, Guangzan H, Xiangdong L: Walnut Fruit Processing Equipment: Academic Insights and Perspectives. *Food Engineering Reviews*, 13, 822-857, 2021.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036–1043, 2012.
- Radojković M, Zeković Z, Jokić S, Vidović S, Lepojević Ž, Milošević S: Optimization of Solid-Liquid Extraction of Antioxidants from Black Mulberry Leaves by Response Surface Methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 50 (2), 167-176, 2012.
- Rusu M, Ionel F, Anca P, Andrei M, Gheldiu AM, Babota M, Vodnar DC i sur.: Walnut (*Juglans Regia L.*) Septum. Assessment od Bioactive Moleculer an In Vitro Biological Effects, *Molecules* 25 (9), 2187, 2018.
- Rusu ME, Gheldiu AM, Mocan A, Moldovan C, Popa DS, Tomuta I, Vlase L: Process Optimization for Improved Phenolic Compounds Recovery from Walnut (*Juglans regia L.*) Septum: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Molecules*, 23, 2814, 2020.
- Sandu I, Baerle A, Tatarov P, Macari A: International Conference INTELLIGENT VALORISATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES, Chisinau, 7-8. 10. 2021. ([https://www.researchgate.net/publication/355327279\\_VALORISATION\\_OF\\_WALNUT\\_SEPTUM\\_POLYPHENOLS](https://www.researchgate.net/publication/355327279_VALORISATION_OF_WALNUT_SEPTUM_POLYPHENOLS))
- Santos J, Alvarez-Ortí M, Sena-Moreno E, Rabadán A, Pardo JE i Oliveira M.: Effect of Roasting Conditions on the Composition and Antioxidant Properties of Defatted Walnut Flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (5), 1813–20, 2018.
- Senjković R, Stanić Z: Extraction with supercritical carbon dioxide. *Farmaceutski glasnik*, 50, 123-128, 1994.
- Vinatoru M: An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8,303-313, 2001.
- Wakao N, Kagueli S: Heat and Mass transfer in Packed Beds. Gordon and Breach, New York, str. 156, 1982.

- Zhang Y, Ma M, Chen Z, Ma A, Li S, Xia J, Jia Y: A Review on Extracts Chemical Composition and Product Development of Walnut *Diaphragma Juglandis* Fructus. *Foods*, 12 (18), 3379, 2023.
- Zhang YG, Kan H, Chen SX, Thakur K, Wang S, Zhang JG, Shang YF, Wei ZJ: Comparison of Phenolic Compounds Extracted from *Diaphragma Juglandis* Fructus, Walnut Pellicle, and Flowers of *Juglans regia* Using Methanol, Ultrasonic Wave, and Enzyme Assisted-Extraction. *Food Chemistry*, 321, 126672, 2020.
- Zhou M, Yan SX, Wang W, Tan MX, Wang Q, Yu ZQ, Luo SH, Zhang YH, Liu X: Walnut septum-derived hierarchical porous carbon for ultra-high-performance supercapacitors. *Rare Metals*, 41 (6), 2280-2291, 2022.