Modificirana metoda ekstrakcije u proizvodnji pripravaka od sikavice i artičoke

Kolar, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:210130

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

MODIFICIRANA METODA EKSTRAKCIJE U PROIZVODNJI PRIPRAVAKA OD SIKAVICE I ARTIČOKE

DIPLOMSKI RAD

Martina Kolar

Zagreb, rujan, 2018

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Ekološka poljoprivreda i agroturizam

MODIFICIRANA METODA EKSTRAKCIJE U PROIZVODNJI PRIPRAVAKA OD SIKAVICE I ARTIČOKE

DIPLOMSKI RAD

Martina Kolar

Mentor: prof. dr. sc. Stjepan Pliestić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Martina Kolar**, 0178112786, rođena 04. siječnja 1995. godine u Mostaru, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

MODIFICIRANA METODA EKSTRAKCIJE U PROIZVODNJI PRIPRAVAKA OD SIKAVICE I ARTIČOKE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Martina Kolar, 0178112786 ,

MODIFICIRANA METODA EKSTRAKCIJE U PROIZVODNJI PRIPRAVAKA OD SIKAVICE I ARTIČOKE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: Potpisi:

1. Prof. dr. sc. Stjepan Pliestić mentor _____
2. Doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur član _____
3. Doc. dr. sc. Martina Grdiša član _____

Zahvala

Ovim putem htjela bih izraziti par riječi zahvale ljudima koji su mi omogućili da danas budem tu gdje jesam, te onima koji su mi pomagali prilikom izrade ovoga rada. Zahvaljujem se svome mentoru prof. dr. sc. Stjepanu Pliestiću na posvećenom vremenu, prenošenju svoga znanja, na iskazanom povjerenju, te na smjernicama i pomoći prilikom izrade ovoga rada. Veliko hvala asistentici doc. dr. sc. Jani Šic Žlabur, na strpljenju, prenošenju svoga znanja, te na pomoći tijekom izrade cjelokupnog rada. Zahvaljujem se i asistentu doc. dr. sc. Anti Galiću, na povjerenju, i pomoći prillikom izrade rada , posebice na praktičnom dijelu koji mi je uvelike objasnio i pomogao. Hvala i kemijskoj tehničarki-laborantici Martini Krilčić, na pomoći prilikom obavljanja praktičnog dijela vezan za rad u laboratoriju. Zahvaljujem se i svima iz poduzeća Suban, od samog biljnog materijala kojeg su mi omogućili za diplomski rad, te na svakoj pomoći i znanju kojeg su mi prenijeli i radujem se daljnoj suradnji. Hvala puno mojoj najvećoj podršci, mojim roditeljima Slađani i Luki, braći Marku i Damiru, koji su bili od prvog dana uz mene, vjerovali u mene, pomagali i omogućili da budem tu gdje jesam. Hvala i prijateljicama Tei i Miji, za podršku, savjet, pomoć, radost, utjehu i dečku Draganu koji su tu uz mene. Hvala puno tetki Željki i tetku Milenku na svakoj pomoći, pažnji, razumijevanju. Samoj sebi kao daljnji poticaj i pokazatelj da mogu i da znam. I Bogu koji sve započinje, svime upravlja i sve dovršava.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Cilj rada 1
2. Pregled literature 2
2.1. Sikavica (*Silybum marianum*) – morfologija, stanište, kemijski sastav, upotreba 2
2.2 Artičoka (*Cynara scolymus* L.) – morfologija, stanište, kemijski sastav, upotreba 3
2.3. Ekstrakcija 6
2.4. Ultrazvuk 6
3. Materijali i metode rada 9
3.1. Biljni materijal 9
3.2. Priprema biljnog materijala 9
3.3. Priprema uzoraka za klasičnu ekstrakciju 10
3.4. Priprema uzoraka za ultrazvučnu ekstrakciju 12
3.5. Metode rada 15
3.5.1. Određivanje raspodjele veličine 15
3.5.2. Određivanje gustoće, topljive suhe tvari i volumnog sadržaja alkohola otopine 16
3.5.3. Električna vodljivost 16
3.5.4. Određivanje boje ekstrakata 16
3.5.5. Određivanje ukupne kiselosti 16
3.5.6. Određivanje pH – vrijednosti 17
3.5.7. Određivanje vitamina C 17
3.5.8. Određivanje ukupnih fenola 19
3.5.9. Određivanje flavonoida i neflavonoida 20
3.5.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom 21
3.5.11. Određivanje ukupnih klorofila i karotenoida 22
3.5.11. Statistička obrada podataka 23
4. Rezultati i rasprava 24
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata sikavice 24
4.2. Bioaktivne komponente ekstrakata sikavice 29
4.3. Fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata artičoke 32
4.4. Bioaktivne komponente ekstrakata artičoke 36
4.5. Pigmenti spojevi esktrakata artičoke 38
4.6. Prikaz određivanja raspodjele veličine čestica kod sikavice 39
5. Zaključci 41
6. Popis literature 42
Životopis 45

Sažetak

Diplomskoga rada studentice Martina Kolar, naslova

MODIFICIRANA METODA EKSTRAKCIJE U PROIZVODNJI PRIPRAVAKA OD SIKAVICE (*SILYBUM MARIANUM*) I ARTIČOKE (*CYNARA SCOLYMUS* L.)

Sikavica (*Silybum marianum*) i artičoka (*Cynara scolymus* L.) su poznate ljekovite biljke iz porodice glavočika (Asteraceae). Imaju široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj proizvodnji te medicini. Sikavica je poznata po ljekovitoj tvari silimarinu koji povoljno djeluje na jetru. Artičoka je također značajno ljekovito povrće koje djeluje povoljno pri oboljenju jetre i poboljšava rad bubrega kao učinkovit diuretik, a poznata je i kao prehrambena namirnica u pripremi raznih jela.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih spojeva u etanolnom i vodenom ekstraktu sikavice i artičoke. Ispitati primjenjivost ultrazvuka u postupcima ekstrakcije biološki aktivnih spojeva. Analizirani su slijedeći fizikalni i kemijski parametri vodenih i etanolnih ekstrakata praha sikavice i artičoke: gustoća, električna vodljivost, volumni udio (%) alkohola, boja, topljiva suha tvar, sadržaj ukupnih kiselina, pH vrijednost, vitamin C, ukupni fenoli (flavonoidi i neflavonoidi), antioksidacijski kapacitet, te sadržaj pojedinih pigmentnih spojeva. Ultrazvuk visokog intenziteta u usporedbi s klasičnim načinom ekstrakcije značajno je pridonio izolaciji bioaktivnih spojeva iz praha sikavice i artičoke, a posebice je utjecao na povećanje prinosa ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida, te antioksidacijskog kapaciteta. Ultrazvuk nije značajno utjecao na promjene pojedinih fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata, poput gustoće otopine, topljive suhe tvari, sadržaja ukupnih kiselina te pH- vrijednosti, dok su značajno veće vrijednosti električne vodljivosti i boje ekstrakata sikavice i artičoke utvrđene kod uzoraka tretiranih ultrazvukom. Od istraživanih bioaktivnih spojeva tretman ultrazvukom nije pokazao značajan utjecaj na promjene sadržaja pigmentnih spojeva artičoke i to ukupnih klorofila i karotenoida.

Ključne riječi: sikavica, artičoka, ultrazvuk visokog intenziteta, klasična ekstrakcija, bioaktivni spojevi

Summary

of master's thesis by student Mrtina Kolar, titled

THE MODIFIED METHOD OF EXTRACTION IN THE MANUFACTURE OF PREPARATIONS OF MILK THISTLE (SILYBUM MARIANUM) AND ARICHOKE (CYNARA SCOLYMUS)

Milk thistle (*Silybum marianum*) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) are well known medicinal herbs belonging to the family Asteraceae. They have a wide application in the pharmaceutical, cosmetic, food industry and medicine. Milk thistle is known for drug substance called silymarin which exhibits a beneficial effect on the liver. Artichoke is also a valuable medical vegetableas that acts favourably during the liver illness, improves the kidneys functioning as an effective diuretic, and is also known as food ingredients in the preparation of various foods.

The aim of this study was to determine the influence of ultrasound assisted extraction on the bioactive compounds content in ethanolic and aqueous extract of milk thistle and artichoke. Also, to determine the ultrasound applicability in the extraction of biologically active compounds. Following physico-chemical parameters of aqueous and ethanolic milk thistle and arthicoke extracts were analyzed: density, electrical conductivity, volume percentage of alcohol, color, total soluble solids, total acid content, pH value, vitamin C, total phenols (flavonoids and non-flavonoids), antioxidant capacity and pigment compounds content. High intensity ultrasound compared to the classical extraction significantly contributed to the isolation of bioactive compounds from milk thistle and artichoke powder, and in particular has led to significant increase of total phenols, flavonoids and non-flavonoids content as well as on increase of antioxidant capacity. Ultrasound did not significantly affect on the changes of some physico-chemical parameters of extracts, such as the density, total soluble solids, total acid content and pH value, while significantly higher values of electrical conductivity and cromaticity parameters of milk thistle and artichoke extracts was determined in ultrasound treated samples.

Key words: milk thistle, arthicoke, high intensity ultrasound, classical extraction, bioactive compounds

1. Uvod

Sikavica (*Silybum marianum*) je ljekovita biljka koja se već tisućama godina koristi kao lijek za različite bolesti posebice vezano uz bolesti jetre. Pripada porodici Asteracea (glavočike), te je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka. Ljekoviti spojevi sikavice nalaze se u sjemenu biljke, a od kojih je najznačajniji silimarin. Sjeme sadrži najveću količinu silimarina, a cijela se biljka zbog navedenog spoja koristi u medicinske svrhe. Silimarin je dokazano učinkovit u liječenju bolesti jetre, jak je antioksidans čime utječe na regeneraciju jetrenih stanica, smanjenje kolesterola u krvi i sprječava razvoj stanica raka (Bijak i sur., 2017).

Artičoka, kao i sikavica pripada porodici Asteracea (glavočike) te spada u višegodišnje trajnice. Artičoka je vrlo ljekovito povrće. Djeluje pri oboljenju jetre, poboljšava rad bubrega kao učinkovit diuretik. Iz toga razloga preporučuje se slabokrvnim osobama, ali i u liječenjima angine pectoris i astme. Smanjuje razinu kolesterola u krvi, a preporučuje se koristiti i za smanjenje šećera u krvi (glukoze) kod osoba oboljelih od dijabetesa (Gizdić, 1998).

Aktivni spojevi prisutni u pojedinim biljnim materijalima često su vrlo značajni za ljudsko zdravlje te se takva sirovina vrlo često preporuča u svakodnevnoj prehrani u svrhu prevencije brojnih oboljenja. No, da bi pojedina aktivna tvar iz sirovine bila u konačnici dostupna organizmu pripremaju se različiti pripravci putem kojih je olakšana njihova biodostupnost. Često se kao postupak u navedene svrhe koristi ekstrakcija definirana kao tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari. Smjesa se obrađuje otapalom da bi se iz nje izdvojila željena komponenta (Drmić i sur., 2010). U današnjim postupcima izolacije još uvijek se najčešće koriste klasične (konvencionalne metode) i to prvenstveno zbog manjih troškova prilikom izvođenja i jednostavnih metoda korištenja. Najveći nedostaci klasične izolacije očituju se u duljem vremenskom periodu, smanjenom prinosu izolirane komponente kao i u čestom korištenju organskih otapala štetnih za ljudsko zdravlje i okoliš (Šic Žlabur i sur., 2015).

Osim opisanih klasičnih metoda, u posljednje vrijeme sve više se koriste i nove, neinvazivne metode izolacije poput ultrazvuka. Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj proizvodnji može se podijeliti u dva glavna polja, a to su ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta prilikom čega se u tehnološkim procesima isključivo koristi ultrazvuk visokog intenziteta (Herceg i sur., 2009). Jedna od glavnih značajki ultrazvuka visokog intenziteta je upotreba intenziteta viših od 1 W/cm^2 (u rasponu od 10-1000 W/cm^2) i frekvencija između 18 i 100 kHz (Knorr i sur., 2004).

1.1. Cilj rada

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih spojeva u etanolnom i vodenom ekstraktu sikavice i artičoke. Ispitati primjenjivost ultrazvuka u postupcima ekstrakcije biološki aktivnih spojeva.

2. Pregled literature

Kroz pregledni dio literature, opisane su poznate ljekovite biljke, sikavica i artičoka, koje pripadaju porodici glavočike (Asteraceae). Imaju široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj proizvodnji te medicini.

2.1. Sikavica (*Silybum marianum*) – morfologija, stanište, kemijski sastav, upotreba

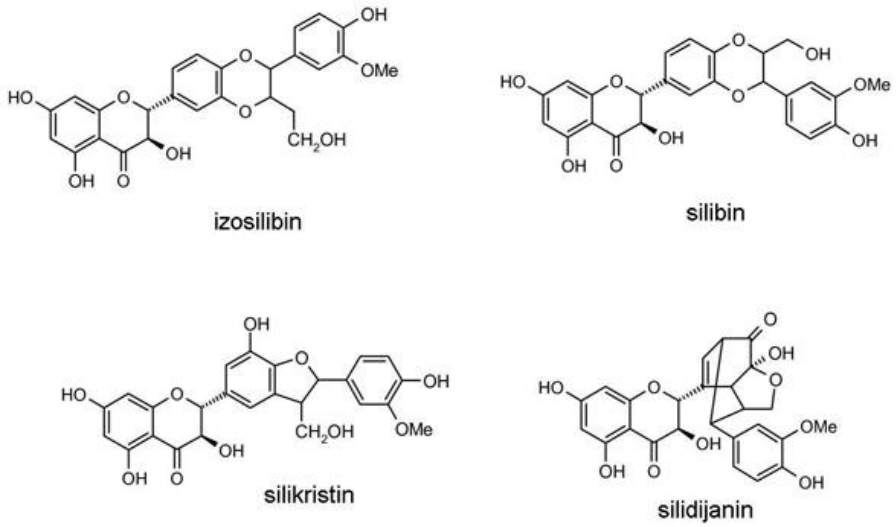
Sikavica je poznata ljekovita biljka koja se tisućama godina koristi kao lijek za različite bolesti. Uz botanički naziv *Silybum marianum* (L.) Gaertn., postoji i nekoliko sinonima, a to su: *Carduus marianus* L., *Carduus mariae* Crantz i *Mariana mariana* (L.) Hill. Pored tih naziva, postoji još i nekoliko regionalnih naziva poput: obični oslobod, osljebad, badelj, divlja artičoka, šarena badeljka. Raste kao jednogodišnja ili dvogodišnja biljka. Cvate u srpnju i kolovozu, a cvat je karakterističnog crvenkasto-ljubičastog obojenja (Karkanis i sur., 2011).

Slika 1. Cvat sikavice (www.inpharma.com)

Za sikavicu je poželjno da raste u toploj atmosferi i na suhom tlu, prilikom čega može narasti i do 3 m visine. Najčešće dosegne visinu od 0,9 do 1,8 m. Prve domovine sikavice su: južna Europa, južna Rusija, Mala Azija, sjeverna Afrika. Danas se može naći i u Sjevernoj i u Južnoj Americi, kao i u južnoj Australiji. Kod nas je možemo naći uzduž Jadrana, osobito na Biokovu. Cvjetne glavice imaju promjer 4-8 cm, a sadrže 50-200 cjevastih cvjetova koji imaju dimenziju od 13-25 mm. Listovi imaju mliječno bijele vene, a mogu biti duljine 50-60 cm i širine 20-30 cm (Bijak i sur., 2017). Sikavica ima stabljiku visoku 40-200 cm, a sjeme je smeđe do crne boje. Cvjetna glavica proizvodi oko 190 sjemenki s prosječno 6350 sjemenki po biljci. U tlu, sjeme može ostati održivo i do devet godina (Karkanis i sur., 2011).

Što se tiče kemijskog sastava, plodovi sikavice sadržavaju flavonoidni kompleks, silimarin. Silimarin je smjesa koja se sastoji od parova diasteroizomera, a to su silibin A i B, izosilibin A i B (slika 2), a izoliran je i taksifolin, najjači prirodni antioksidans te flavonoidi flavonolskog tipa, posebno kvercetin (Karkanis i sur., 2011). Sadržaj silimarina u sjemenkama sikavice kreće se od 1-3 %, ali u nekim slučajevima može premašiti i 8 %. Te razlike mogu biti uzrokovane različitim genetskim materijalom, ali i zbog klimatskih prilika u kojima su

biljke uzgojene. Toksičnost silimarina je vrlo niska, nije topljiv u vodi i obično se primjenjuje u kapsulama kao ekstrakt (Karkanis i sur., 2011). Sjemenke sikavice sadrže male količine flavonoida, te 20-35 % masnih kiselina i drugih polifenolnih spojeva. Identificiran je i niz flavonolignana u sjemenu, a to su izosilicin, dehidrozilbin, desoksicil kristal (Karkanis i sur., 2011).



Slika 2. Strukture izomera silimarina (www.inpharma.com)

Sikavica se još od srednjeg vijeka koristi pri kroničnom hepatitisu i toksičnim ozljedama jetre. Na farmaceutskom tržištu, može se naći značajan broj biljnih lijekova koji sadrže suhi ekstrakt plodova sikavice karakterističnih po značajnom sadržaju silimarina. Preparat koji sadrži suhi ekstrakt sikavice regenerira strukturu i funkciju jetrenih stanica, te je indiciran za liječenje toksičnih oštećenja jetre, kao što su masna jetra, uzrokovana uzimanjem alkohola, različitih lijekova, te kao dodatna terapija pri akutnom hepatitisu, kronično perzistirajućem i kronično agresivnom hepatitisu i cirozi jetre. Prema brojnim farmakološkim studijama dokazano je antihepatoksično i zaštitno djelovanje silimarina. Kompleks silimarina stabilizira membrane stanica i smanjuje mogućnost prodiranja hepatotoksičnih tvari u stanice jetre (Kuštrak, 2005).

2.2 Artičoka (*Cynara scolymus* L.) – morfologija, stanište, kemijski sastav, upotreba

Artičoka, kao i sikavica, pripada porodici Asteracea (glavočike) i spada u višegodišnje trajnice. Korijenov sustav artičoke je vrlo razvijen, dok je stabljika prepoznatljiva po tome što je uspravna i razgranata. Listovi artičoke su dekorativni, s gornje strane glatki, te srebrnasto – bijelozeleni, dok su s donje strane putenasto bijeli s mekanim gustim dlačicama (Gizdić, 1998) (slika 3).

Slika 3. List artičoke (www.bodieko.com)

Cvjetovi su prepoznatljivi po plavo-ljubičastoj boji, dok je cvat uglavnom ili duguljast ili okrugao. Za jelo, cvat se bere u tehnološkoj zrelosti, odnosno kada se počne rastvarati. Cvate ili prve ili druge godine, ovisno o načinu razmnožavanja, u razdoblju od lipnja do kolovoza, a što ovisi o mjestu, načinu uzgoja, te o sorti. Sjeme je jednosjemeni oraščić sive boje sa smeđe crnim šarama (slika 4) (Gizdić, 1998).

Slika 4. Sjeme artičoke (www.vrt.com)

Artičoka se razmnožava generativno sjemenom i vegetativno iz reznica, a prilikom čega se veća prednost daje vegetativnom razmnožavanju zbog bržeg razmnožavanja, a i kultivirana svojstva se bolje nasljeđuju. Biljke koje su uzgojene iz sjemena putem presadnica cvatu kasnije, daju manje cvjetne glave, gube izgled kultivirane forme prilikom čega podsjećaju na divlju artičoku. Za potrebe proizvodnje sjemena artičoke za reprodukciju, u proljeće se odaberu najbolje i najjače majčinske biljke koje su u protekloj godini dale najveće cvjetne glavice. Krajem lipnja ili početkom srpnja cvijet se potpuno rascvate, biljka ulazi u fiziološku zrelost (slika 5) te je sjeme zrelo za berbu u kolovozu ili rujnu (Gizdić, 1998).

Slika 5. Fiziološka zrelost (www.plantae.com)

Artičoka je biljka umjerenog i toplijeg podneblja. Osjetljiva je na niske temperature i velike temperaturne razlike, dok je najpovoljnija temperatura za uzgoj iznad 20 °C. Najbolje uspijeva uz obalu Sredozemlja: Alžir, Španjolska, Francuska, Italija, Grčka. Može se uzgajati i u kontinentalnim dijelovima uz dobru zimsku zaštitu i uzgoj sadnica u klijalištima ili drugim zaštićenim prostorima. Od tipova tala, najpovoljnija su duboka, lagana i tla bogata humusom. Takva tla su tla tipa černozema, prosušena tla uz morsku obalu, prosušena močvarna tla, ilovasto-pjeskovita tla i duboke crvenice (Gizdić, 1998). U uzgoju artičoka zahtijeva primjerenu agrotehniku. Nakon što se obavi berba cvjetnih glava, režu se stabljike, lišće, te se biljka zagrće kako bi se pupovi zaštitili od hladnoće. Ovisno o sortimentu i klimatskim prilikama, nasad se redovno čisti od korova, po potrebi se navodnjava i ako je potrebno štiti od bolesti i štetnika, iako je artičoka poznata kao jedna od najotpornijih povrtnih kultura u pogledu bolesti i štetnika. Nasad može napasti plamenjača. Na početku napadnuta mjesta su svjetlozelene do žute boje, a poslije ta mjesta potamne. Čim se zaraza primijeti odmah je potrebno odstraniti zaražene dijelove biljke (Gizdić, 1998). Sorte se razlikuju po duljini vegetacije, boji i obliku cvjetnih glavica, visini biljke i otpornosti na sušu i visoke temperature. Po duljini vegetacije, razlikuju se sorte s kraćim i duljim vegetacijskim razdobljem. Prema boji cvjetnih glavica, razlikuju se sorte s tamnozelenom, svjetlozelenom i ljubičastom glavom. Prema obliku mogu biti sferične ili u potpunosti okrugle. Poznatije sorte su 'venecijanska ljubičasta', 'bretanjska okrugla', 'laonska zelena', 'pariška ili francuska', 'zelena provansalska', 'ligurijska' itd. (Gizdić, 1998).

Što se tiče kemijskog sastava, listovi artičoke sadrže: 79,59 % vode, 12 % bjelančevina, 0,08 % masti, 12,75 % saharoze, 1,51 % mineralnih tvari, 0,74 % celuloze i 1,92 % inulina. Od minerala sadrži 51 mg/100 g kalcija, 69 mg/100g fosfora, 1,1 mg/100 g željeza, 30 mg/100 g natrija i 310 mg/100 g kalija (Gizdić, 1998).

Artičoka pokazuje niz ljekovitih svojstava, a djeluje povoljno pri oboljenju jetre, poboljšava rad bubrega kao učinkovit diuretik. Smanjuje razinu kolesterola u krvi, a preporuča se i za snižavanje šećera u krvi kod osoba oboljelih od dijabetesa. Artičoka se preporuča i u liječenju žutice, gihta, protiv gojaznosti, urtikarije, ekcema (Gizdić, 1998).

Od lista artičoke može se pripremati svježi sok, tinktura, te vodeni pripravak od lišća artičoke. Koristi se pri pripremi raznih jela, salata (slika 6), umaka, može se prerađivati, a od nje se proizvode i aromatična pića (Gizdić, 1998).

Slika 6. Salata od artičoke (www.ritualcuisine.com)

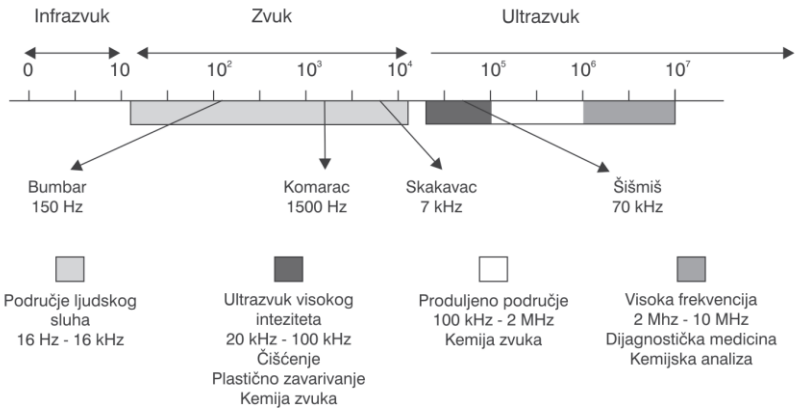
2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je izdvajanje tvari iz homogenih smjesa na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcija tekuće-tekuće je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Ekstrakcija se često provodi pri povišenim temperaturama, kako bi se ubrzao sam proces, a vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi, površini uzorka izloženog otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Uglavnom, temperature koje se koriste prilikom ekstrakcije ne prelaze preko 100 °C jer pri tako visokim temperaturama ipak može doći do oštećenja željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Pri izboru otapala treba obratiti pažnju na niz čimbenika, a to su: polarnost, točka vrelišta (koja treba biti što niža da olakša odvajanje otapala od komponente), reaktivnost (pri čemu otapalo ne smije reagirati s ekstraktom niti se smije razgrađivati), viskoznost otapala (mora biti dovoljno niska da otapalo može lako prijeći sloj krutih čestica), stabilnost otapala na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi (po mogućnosti nezapaljivo, neškodljivo za rukovatelja i konzumenta, prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš, mora biti dostupno u dovoljnim količinama i cijenom) (Drmić i sur., 2010).

2.4. Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz (slika 7). Ultrazvučni valovi su slični zvučnim valovima, s tim da su iznad granice ljudskog sluha (16 Hz do 16 kHz). Ultrazvuk se dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta (Brnčić i sur., 2009).

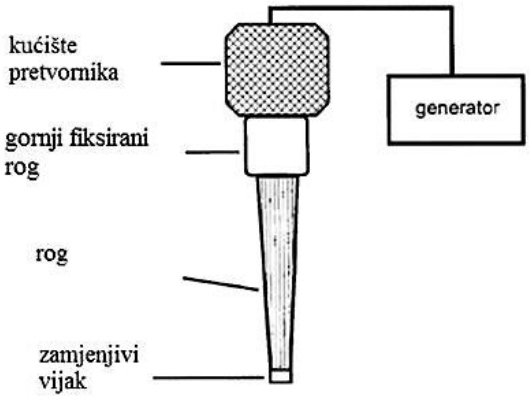
Ultrazvuk niskog intenziteta podrazumijeva frekvencije u rasponu od 2 MHz pa na više. To je nerazorna tehnika sa značajkama visokih frekvencija i niskih intenziteta (manje od 1W/cm^2), koja ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima materijala. Koristi se kao analitička metoda za kontrolu obrade poljoprivrednih sirovina i proizvoda, mjerenjima teksture, sastava, viskoznosti, brzine protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanje koncentracije tvari u poljoprivrednim sirovinama i proizvodima i drugim. Ultrazvuk visokog intenziteta podrazumijeva frekvencije od 20 do 100 kHz uz prošireno područje do 2 MHz, karakterističan je po visokim intenzitetima, u rasponu od 1 do 1000 W/cm^2, pa zbog navedenog može uzrokovati fizikalne promjene materijala kao i određene kemijske promjene u materijalima na kojima je primijenjen. Koristi se za čišćenje, odzračivanje tekućina, sušenje, ekstrakciju, destilaciju, uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama u nizu tehnoloških postupaka u obradi poljoprivredno prehrambenih proizvoda (Herceg i sur., 2009).



Slika 7. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

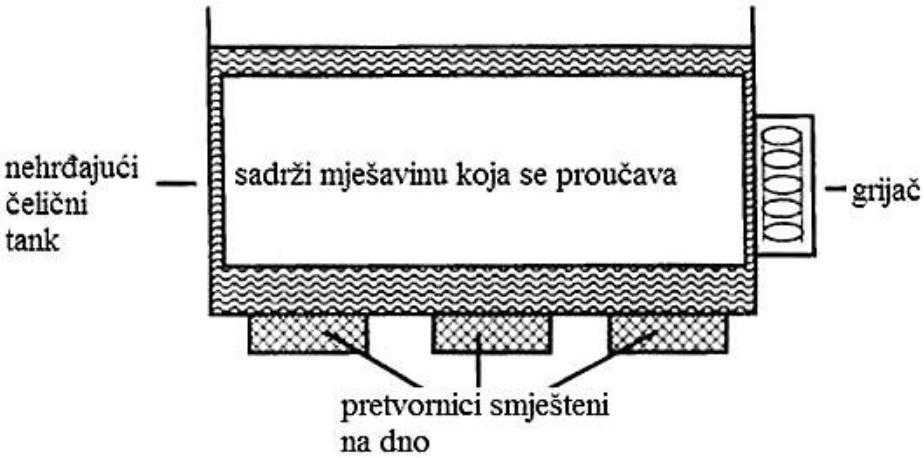
Prilikom širenja ultrazvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi i to dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije te nastajanja ekspanzivnih vrtloga u otopini. Uslijed djelovanja ultrazvuka niskog intenziteta, odnosno niske razine snage (manje od 1 W/cm^2) dolazi do pojave stabilne kavitacije koja uzrokuje nastajanje mjehurića u tekućini, no njihova veličina tijekom nastajanja vrtloga izmjeničnog tlaka tek neznatno oscilira, odnosno promjer mjehurića se minimalno mijenja (Suslick i sur., 2011). Kod prijelazne kavitacije veličina mjehurića raste tijekom svakog ciklusa sve dok ne postignu kritičnu veličinu unutar koje energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinovita faza u mjehuriću i mjehurići implodiraju. Molekule oko mjehurića se snažno sudaraju pa se razvijaju mikropodručja u vrlo visokih temperatura (iznad 5000°C) i tlakova (oko 50 MPa do 100 MPa) (Knorr i sur., 2004). Frekvencije više od 1 MHz su male za kavitaciju, a iznad 2,5 MHz nema kavitacije. Pojava kavitacije ovisi i o svojstvima proizvoda kao što su viskoznost medija, gustoća, površinska napetost medija, te prisutnost otopljenih plinova (Herceg i sur., 2009). Kavitacija u tekućem mediju može uzrokovati i potpuno odzračivanje, te inicirati različite kemijske reakcije i pri tome stvoriti slobodne radikale, ubrzati kemijske reakcije poboljšavajući miješanje raktanata, potaknuti polimerizaciju i depolimerizaciju, povećati brzinu difuzije, pomoći u ekstrakciji tvari, te ukloniti i uništiti različite mikroorganizme (Chemat i sur., 2011).

Većina ultrazvučnih uređaja visokog intenziteta temelji se na elektroakustičnim sustavima, odnosno piezoelektričnom ili magnetnostriktivnom pretvorniku. Klasični ultrazvučni postav sadrži generator koji će pretvoriti električnu energiju u traženu visoku frekvenciju izmjenične struje i pretvornik koji će pretvoriti visoku frekvenciju izmjenične struje u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitaciju (Herceg i sur., 2009). U prehrambenoj tehnologiji od ultrazvučnih uređaja najčešće se koristi sustav s direktnim uranjanjem ultrazvučne sonde (slika 8) te ultrazvučna kupelj (slika 9).



Slika 8. Sustav sa direktno uronjenom sondom (Herceg i sur., 2009)

Kod ultrazvučne kupelji pretvornik je spojen na dno spremnika i dostavlja vibracije direktno tekućini koja je u spremniku. Upravo ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno jeftine. Većina ultrazvučnih kupelji radi na frekvenciji od 20 do 40 kHz (Brnčić i sur., 2009).



Slika 9. Ultrazvučna kupelj (Brnčić i sur., 2009)

3. Materijali i metode rada

3.1. Biljni materijal

Za potrebe istraživanja nabavljen je suhi materijal sjemena sikavice i artičoke iz tvrtke Suban d.o.o. Sjeme sikavice i artičoke pakirano je u papirnate vrećice na kojima je jasno istaknuta deklaracija proizvoda (slika 10 i 11). Prema deklaraciji s navedenih pakiranja, sjeme sikavice porijeklom je iz Ukrajine, dok je artičoka iz Mađarske.

Slika 10. Pakiranje suhog sjemena sikavice

Slika 11. Pakiranje suhe artičoke

3.2. Priprema biljnog materijala

Suhi materijal sjemena sikavice i artičoke dopremljen je u Zavod za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, gdje su provedena sva istraživanja. Sjeme sikavice (slika 12) usitnjeno je mlinom čekićarom do dviju dimenzija.

Slika 12. Sjeme neusitnjene sikavice

Suha artičoka korištena za potrebe istraživanja prije daljnjih istraživanja usitnjena je laboratorijskim homogenizatorom (slika 13).

Slika 13. Neusitnjeni i usitnjeni uzorak artičoke

3.3. Priprema uzoraka za klasičnu ekstrakciju

Za potrebe klasične ekstrakcije na tehničkoj vagi s točnošću ±0,01 odvagano je 2 g praha sikavice te dodano 150 mL otapala. Za potrebe istraživanja korištene su dvije dimenzije čestica praha sikavice: 160 i 630 µm, dvije vrste otapala: destilirana voda (dH_2O) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) te pri temperaturi od 40 °C i etanol 50 % (v/v) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) te pri temperaturi od 40 °C. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su stajati uz povremeno miješanje 30 minuta, nakon čega su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filtar papira (slika 14) kako bi se zaustavila daljnja esktrakcija biljnog materijala. Potpuni plan eksperimenta klasične ekstrakcije praha sikavice prikazan je u tablici 1.

Slika 14. Filtriranje uzoraka praha sikavice nakon klasične ekstrakcije

Tablica 1. Plan eksperimenta klasične ekstrakcije praha sikavice

Dimenzija čestica (µm)	**Otapalo**	**Volumen otapala (mL)**	**Vrijeme (min)**	**Temperatura (°C)**	**Uzorak**
160	dH_20	150	30	21,4	S_1
630	dH_20	150	30	21,4	S_2
160	EtOH	150	30	21,4	S_3
630	EtOH	150	30	21,4	S_4
160	dH_20	150	30	40	S_5
630	dH_20	150	30	40	S_6
160	EtOH	150	30	40	S_7
630	EtOH	150	30	40	S_8

Kod artičoke za potrebe klasične ekstrakcije odvagano je na tehničkoj vagi s točnošću ±0,01 po 2 g suhog materijala te dodano 150 mL otapala. Za potrebe ekstrakcije korištene su dvije vrste otapala i to: destilirana voda (dH_2O) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) te pri temperaturi od 40 °C i etanol 50 % (v/v) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) te pri temperaturi od 40 °C. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su stajati uz povremeno miješanje 30 minuta, nakon čega su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filtar papira kako bi se zaustavila daljnja esktrakcija biljnog materijala. Potpuni plan eksperimenta klasične ekstrakcije praha sikavice prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Plan eksperimenta klasične ekstrakcije artičoke

Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Uzorak
dH_20	150	30	21,4	A_1
EtOH	150	30	21,4	A_2
dH_20	150	30	40	A_3
EtOH	150	30	40	A_4

3.4. Priprema uzoraka za ultrazvučnu ekstrakciju

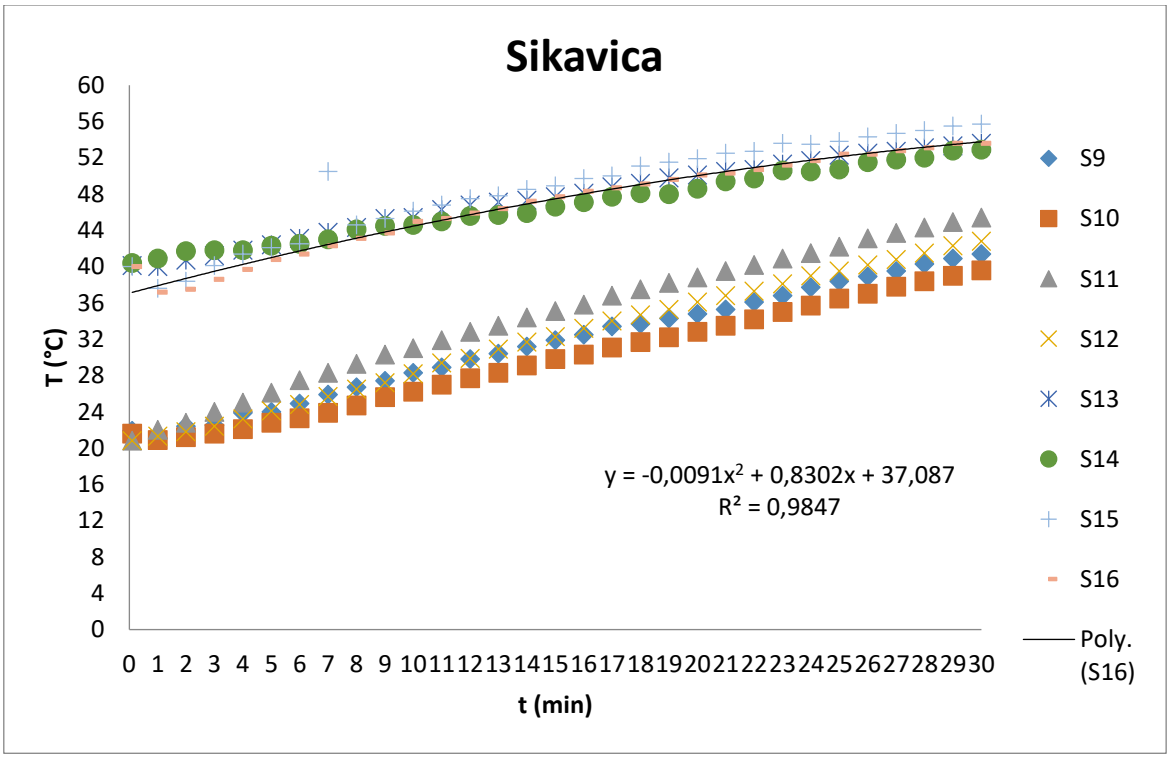
Za potrebe ultrazvučne ekstrakcije uzorci sikavice pripremani su na isti način kao i za klasičnu ekstrakciju. a čiji je plan eksperimenta prikazan u tablici 3. Odmah nakon dodavanja otapala na odvagani prah sikavice uzorci su uronjeni u ultrazvučnu kupelj (RK 103 H, Bandelin) (slika 15) frekvencije 35 kHz, snage 140 W i ekstrahirani u vremenskom trajanju od 30 minuta.

Slika 15. Ultrazvučna kupelj “Bandelin” RK 103H

Tablica 3. Plan eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije praha sikavice

Dimnezija čestica (µm)	Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	UZV kupelj	Uzorak
160	dH_20	150	30	21,4	35 kHz 140 W	S_9
630	dH_20	150	30	21,4	35 kHz 140 W	S_{10}
160	EtOH	150	30	21,4	35 kHz 140 W	S_{11}
630	EtOH	150	30	21,4	35 kHz 140 W	S_{12}
160	dH_20	150	30	40	35 kHz 140 W	S_{13}
630	dH_20	150	30	40	35 kHz 140 W	S_{14}
160	EtOH	150	30	40	35 kHz 140 W	S_{15}
630	EtOH	150	30	40	35 kHz 140 W	S_{16}

Tijekom ultrazvučne ekstrakcije mjerena je temperatura uzoraka svakih 60 sekundi, pomoću ubodnog termometra. Promjena temperature ekstrakata sikavice prikazana je u grafikonu 1. Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su profiltrirani pomoću Whatmanovog filtar papira.



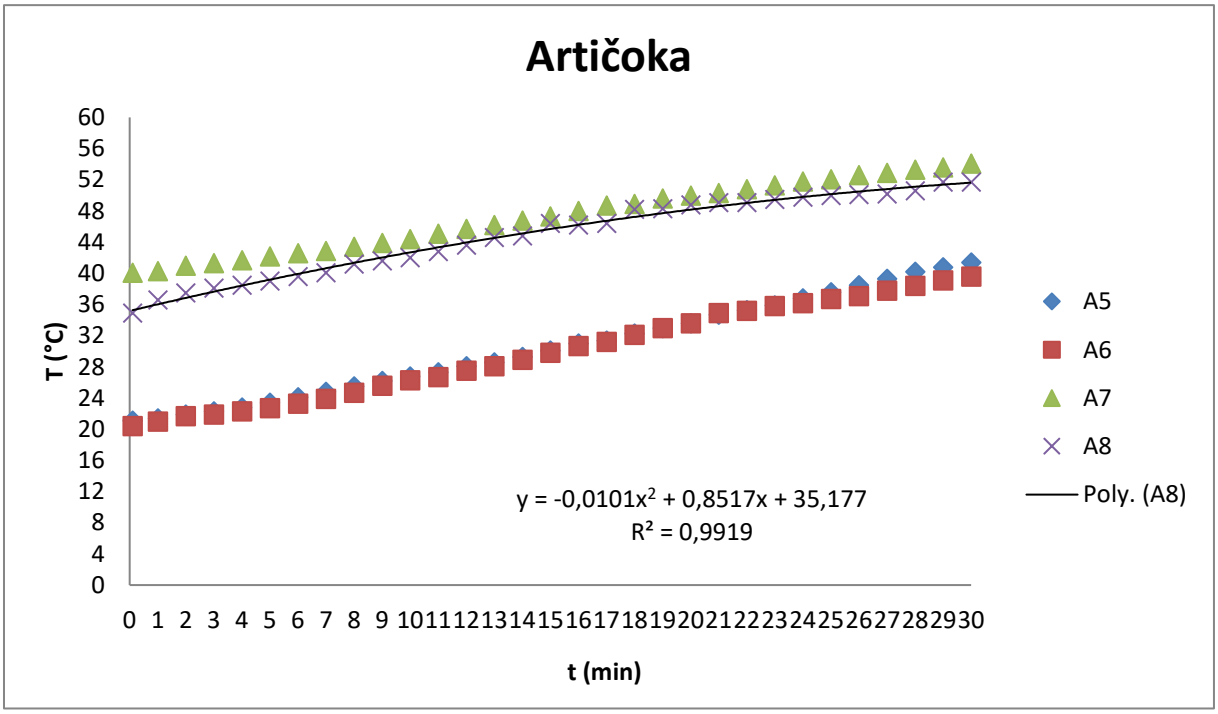
Grafikon 1. Promjena temperature (°C) vodenih i etanolnih ekstrakata praha sikavice tijekom ultrazvučnog tretmana

Priprema uzoraka artičoke za potrebe ultrazvučne ekstrakcije uključivala je vaganje suhog materijala (2 g) na tehničkoj vagi točnosti ±0,01 te dodavanjem 150 mL otapala. Također su korištene dvije vrste otapala: destilirana voda (dH_2O) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) i pri temperaturi od 40 °C te etanol 50 % (v/v) pri sobnoj temperaturi (21,4°C) i pri temperaturi od 40 °C. Nakon dodavanja otapala na odvagani uzorak artičoke, uzorci su uronjeni u ultrazvučnu kupelj (RK 103 H, Bandelin) frekvencije 35 kHz, snage 140 W i ekstrahirani u vremenskom trajanju od 30 minuta. Plan eksperimenta ultrazvučne ektrakcije suhog materijala artičoke prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Plan eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije artičoke

Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	UZV kupelj	Uzorak
dH_20	150	30	21,4	35 kHz 140 W	A_5
EtOH	150	30	21,4	35 kHz 140 W	A_6
dH_20	150	30	40	35 kHz 140 W	A_7
EtOH	150	30	40	35 kHz 140 W	A_8

Tijekom ultrazvučne ekstrakcije uzoraka artičoke također je mjerena temperatura svakih 60 sekundi, pomoću ubodnog termometra. Promjena temperature ekstrakata artičoke prikazana je u grafikonu 2. Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su profiltrirani pomoću Whatmanovog filtar papira.



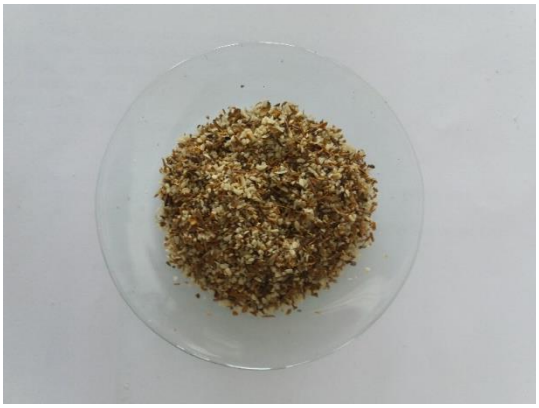
Grafikon 2. Promjena temperature (°C) vodenih i etanolnih ekstrakata artičoke tijekom ultrazvučnog tretmana

3.5. Metode rada

3.5.1. Određivanje raspodjele veličine

Sjeme sikavice (sadržaja vode od 9 %) usitnjeno je mlinom čekićarom, a koji se sastoji od kućišta, radnih elemenata (čekića, sita), regulatora protoka, magneta za odvajanje metalnih čestica i elektro-motora (Kušec i Pliestić, 2006). Granulometrijski sastav utvrđen je prema modificiranoj metodi standarda ASAE S319.4 (2008). Promjer otvora na situ mlina čekićara iznosio je Ø = 1.0 mm, dok mu je broj okreta iznosio n = 930 min^{-1}. Svaki pojedini uzorak prosijavan je na tresilici pri 220 min^{-1}, a prosijavanje je trajalo 10 minuta. U postupku prosijavanja upotrebljen je slog sita postavljenih u nizu sljedećih promjera otvora: 2000 µm, 1250 µm, 630 µm, 315 µm, 160 µm i 40 µm i dno. Dimenzije odabrane za potrebe istraživanja su: 160 µm (slika 16) i 630 µm (slika 17).

Slika 16. Prah sikavice dimenzije čestica 160 µm



Slika 17. Prah sikavice dimenzije čestica 630 µm

3.5.2. Određivanje gustoće, topljive suhe tvari i volumnog sadržaja alkohola otopine

Gustoća otopine (g/cm^3) kao i sadržaj topljive suhe tvari (%) istraživanih vodenih uzoraka određeni su digitalnim denziometrom „Mettler-Toledo“ Densito 30PX (Švicarska) direktnim očitanjem vrijednosti s uređaja. Etanolnim ekstraktima osim gustoće određen je i volumni sadržaj alkohola (vol. %) također spomenutiom digitalnim denziometrom.

3.5.3. Električna vodljivost

Električna vodljivost vodenih (µS/cm) i etanolnih ekstrakata provedena je digitalnim konduktometrom „Mettler-Toledo“ SevenEasy (Švicarska) uranjanjem elektrode direktno u otopinu.

3.5.4. Određivanje boje ekstrakata

Boja vodenih i etanolnih ekstrakata sikavice i artičoke određena je pomoću kolorimetra PCE-CSM 4 (PCE Instruments, UK). Određivanje boje navedenih uzoraka uključivalo je derfiniranje kromatokrafskih parametara: L, a, B, C i h.

3.5.5. Određivanje ukupne kiselosti

Metoda određivanja ukupne kiselosti temelji se na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijeva hidroksida (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor: pipeta, odmjerna tikvica (volumena 100 mL), analitička vaga (Sartorius), bireta (volumena 100 mL), graduirana pipeta (volumena 25 i 100 mL), potenciometar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, Sevenmulti), čaše, magneti, magnetska mješalica (MM-510).

Reagensi: puferna otopina poznatog pH, natrijev hidroksid, otopina c (NaOH) = 0,1 mol/L.

Priprema uzorka: Odvagne se 10 g uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom te se sadržaj dobro promućka. U čašu u kojoj se nalazi magnet koji će pospješiti miješanje uzorka, otpipetira se 20 mL uzorka. Čaša se prenese na magnetsku miješalicu koja je prethodno puštena u rad. pH–metar se umjerava pomoću standardne puferne otopine. Kada se pH-metar ustabili iz birete se dodaje otopina natrijevog hidroksida sve dok pH ne bude od 7,90 do 8,01.

Konačni sadržaj kiselina određuje se prema formuli:

$$Ukupne\ kiseline\ (\%) = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

Gdje je:
V (mL) - volumen otopine NaOH utrošene pri titraciji
F - faktor otopine NaOH c = 0,1 mol/L
G (g/mL) - faktor najzastupljenije kiseline u uzorku
D (g) – masa uzorka u100 mL razrijeđenog homogeniziranog uzorka

3.5.6. Određivanje pH – vrijednosti

pH-vrijednosti uzoraka određene su pH-metrom, uranjanjem kombinirane elektrode u uzorak i očitavanjem vrijednosti (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor: pH-metar (Mettler Toledo, Sevenmulti, Švicarska), analitička vaga (Sartorius), čaša volumena 25 mL, magnetska miješalica (MM-510), magneti za miješanje.

Priprema uzorka: postupak pripreme uzoraka za određivanje pH vrijednosti isti je kao i za ukupne kiseline.

Postupak određivanja: Prije samog mjerenja pH-metar se umjerava pufernom otopinom kod sobne temperature. Uranjanjem elektrode u uzorak ispituje se pH vrijednost.

3.5.7. Određivanje vitamina C

2,6-diklorindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa služi istovremeno i kao indikator ove redoks reakcije (AOAC, 2002).

Aparatura i pribor: analitička vaga (Sartorius), bireta 50 mL, odmjerna tikvica volumena 100 mL, Erlenmeyerova tikvica volumena 250 mL.

Reagensi: 2%-tna oksalna kiselina, 2,6-p-diklorindofenol

Priprema uzorka: U odmjernu tikvicu volumena 100 mL odvaže se 10 g uzorka. Tikvica se do oznake nadopuni 2%-tnom oksalnom kiselinom.

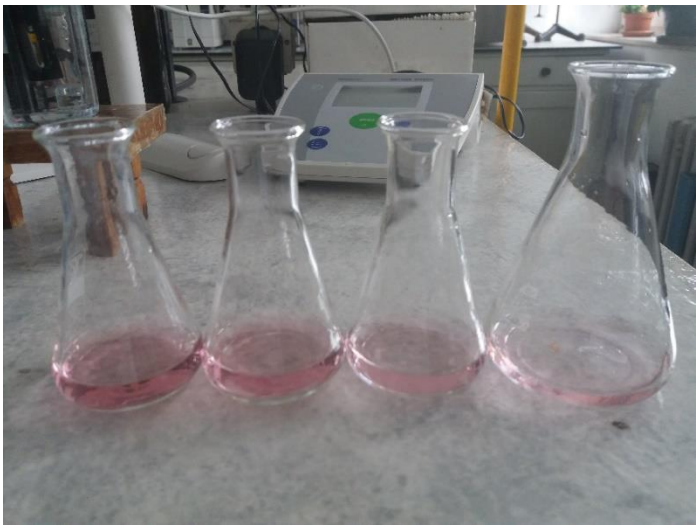
Postupak određivanja: Iz odmjerne tikvice otpipetira se 10 mL uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu te se ista titrira otopinom 2,6-diklorindofenola do pojave ružičaste

boje koja mora biti postojana barem 10 sekundi. Iz utrošenog volumena 2,6-diklorindofenola, izračunava se količina L-askorbinske kiseline (vitamin C) prema formuli:

$$Vitamin\ C\ (mg/100g) = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

Gdje je:
V (mL) – volumen utrošenog 2,6-dikloridofenola pri titraciji
F - faktor normaliteta 2,6-diklorindofenola
D (g) –masa uzorka u gramima

***Određivanje faktora otopine 2,6-diklorindofenola (slika 18):**
Kako bi se odredio faktor otopine 2,6-diklorindofenola prethodno je napravljena otopina askorbinske kiseline koja će se titrirati s otopinom 2,6-diklorindofenola. Prema utrošenom volumenu otopine 2,6-diklorindofenola za titraciju poznate mase standarda vitamina C izračunava se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu volumena 50 mL na vagi se odvaže ±0,0100 g askorbinske kiseline i tikvica se do oznake nadopuni 2%-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 50 mL odpipetira se 5 mL prethodno pripremljene askorbinske kiseline i 5 mL 2%-tne otopine oksalne kiseline te titrira otopinom 2,6-diklorindofenolom do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana 10 sekundi. Iz očitanog volumena otopine 2,6-diklorindofenola utrošenog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračunava se faktor (F) otopine 2,6-diklorindofenola.



Slika 18. Određivanje faktora vitamin C

3.5.8. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski u vodenom i etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 750 nm prema metodi Shukla i sur., (2012). Metoda se bazira na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u volfram-oksid i molibden-oksid koji su plavo obojeni.

Aparatura i pribor: odmjerna tikvica volumena 50 mL, kivete, spektofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC), tehnička vaga (s točnošću ±0,001).

*Reagens*i: Folin-Ciocalteu reagens, zasićena otopina natrijeva karbonata.

Izrada umjernog (kalibracijskog) pravca: Odvaže se 500 mg galne kiseline, otopi u 80%-tnom etanolu i u odmjernoj tikvici volumena 100 mL nadopuni do oznake. Od otopine galne kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL pripreme se razrijeđenja, tako da se otpipetira 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda (stock otopina) u svaku tikvicu i do oznake nadopuni 80%-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. U odmjernu tikvicu volumena 50 mL, odpipetira se 0,5 mL uzorka u svaku tikvicu, dodaje redom 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 7,5 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Nadopunjava se do oznake destiliranom vodom i promiješa. Uzorci se ostavljaju da stoje dva sata na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz dobivenih apsorbancija izradi se umjerni (kalibracijski pravac), tako da je na apscisi koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije.

Priprema uzorka i određivanje sadržaja: pripremljeni vodeni i etanolni uzorci sikavice i artičoke ukupnog volumena 1mL i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) dodaju se u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Pripremljena otopina ostavi se 3 min na sobnoj temperaturi. Nakon 3 min otopini se doda 3 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, te se tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom. Pripremljeni uzorci ostave se 2 sata na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje (slika 19). Nakon 2 sata provedena su očitanja fenolnih spojeva na spektrofotometru (Shimadzu UV 1650 PC) uz destiliranu vodu kao slijepu probu pri valnoj duljini od 750 nm.

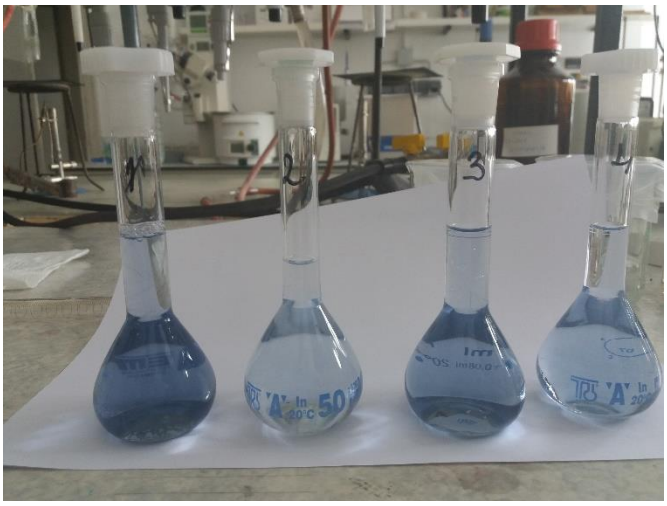
Izračun: Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca (Microsoft Excel).

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0{,}001\ x + 0{,}0436$$

y - apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)



Slika 19. Određivanje ukupnih fenola

3.5.9. Određivanje flavonoida i neflavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida vodenih i etanolnih ekstrakata praha sikavice i suhe artičoke određen je prema Abou-Arab i Abou-Salem, (2010). Sadržaj neflavonoidnih spojeva izražen je iz razlike ukupnih fenola i flavonoida.

Aparatura i pribor: filtar papir, stakleni lijevci, Erlenmeyer-ova tikvica sa šlifom i čepom volumena 25 mL, pipeta volumena 1 mL, staklene kivete, spektrofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC).

Reagensi: klorovodična kiselina (20 % v/v), formaldehid, dušik za propuhivanje uzorka, zasićena otopina natrijevog karbonata, Folin- Ciocalteu reagens.

Priprema uzorka i postupak određivanja: u odmjernu tikvicu volumena 25 mL redom se dodaju se: 1 mL ekstrakta, 1 mL klorovodične kiseline (20 % v/v) i 0,5 mL formaldehida. Pripremljeni uzorci propušu se dušikom i ostave 24 sata na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon 24 sata prema istom protokolu kao i za ukupne fenolne spojeve napravljena je reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom. Intenzitet nastaloga plavog obojenja izmjeren je na spektrofotometru Shimadzu UV 1650 PC pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

3.5.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS + radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS+ kation se reducira u ABTS, s reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiseline) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan:

- 140 mM otopine kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$ (0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- 7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- Stabilna ABTS+ otopina (88 µL $K_2S_2O_8$ otopine (140 mM) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati na sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava).

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tna otopina $ABTS^+$ (1 mL $ABTS^+$ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbanca 1%-tne otopine $ABTS^+$ pri 734 nm koja mora iznositi 0,70 ± 0,02. Ako apsorbanca otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbanca premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine $ABTS^+$ treba dodati još par kapi stabilne $ABTS^+$ otopine, a ako je apsorbanca prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu od 100 mL dodati još 96%-tnog etanola.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski): 160 µL uzoraka pomiješa se sa 2 mL 1 %-tne otopine $ABTS^+$ te se nakon 5 minuta mjeri apsorbanca pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol.

Izrada umjernog (kalibracijskog) pravca: Za izradu umjernog (kalibracijskog) pravca u ATBS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje $ABTS^+$otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 mol/dm3.

Najprije se pripremi stock otopina i to tako da se u odmjernoj tikvici od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja koja se pripremaju u odmjernim tikvicama od 25 mL;

- 0 → 0 mL Troloxa (samo EtOH)
- 100 → 0,4 mL
- 200 → 0,8 mL
- 400 → 1,6 mL
- 1000 → 4 mL
- 2000 → 8 mL
- 2500 → 10 mL

Nakon pripreme navedenih koncentracija Trolox-a iz svake tikvice u kojoj je navedena koncentracija Trolox-a uzima se 160 µL otopine Trolox-a i dodaje 2 mL 1%-tne $ABTS^+$ otopine podešene apsorbance (0,70 ± 0,02). Nakon što pomiješamo dodanu koncentraciju Trolox-a i 1%-tne $ABTS^+$ otopine izmjeri se apsorbanca pri 734 nm. I tako za svaku točku koncentracije Trolox-a. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbanca za svaku točku izradi se umjerni (kalibracijski) pravac.

3.5.11. Određivanje ukupnih klorofila i karotenoida

Poznato je nekoliko validiranih metoda za određivanje klorofila u biljnim uzorcima. U ovom radu klorofilni pigmenti određivani su spektrofotometrijski metodom po Holmu (1954) i Wetstteinu (1957). Cilj ove metode je odrediti koncentraciju kloroplastnih pigmenata (klorofil-a, klorofil-b i ukupnih klorofila a i b) u acetonskom ekstraktu biljnog materijala.

Aparatura i pribor: vaga, laboratorijski homogenozator, Büchnerov lijevak, Erlenmeyerova tikvica (300 mL), vakuum pumpa na vodeni mlaz, odmjerna tikvica od 25 mL, spektrofotometar (Shimadzu UV 1650 PC)

Kemikalije: aceton (p.a.), magnezijev karbonat ($MgCO_3$)

Postupak određivanja: Postupak ekstrakcije i određivanja pigmenata treba izvoditi brzo, u zamračenim uvjetima. U staklenoj kiveti je odvagano 5 g ekstrakta. Na uzorak je dodano malo praha $MgCO_3$ (zbog neutralizacije kiselosti) i ukupno 15 mL acetona. Smjesa je homogenizirana laboratorijskim homogenizatorom te kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 25 mL koja se nadopuni do oznake acetonom. Spektrofotometrom su očitane apsorbance pri valnim duljinama 662, 644 i 440 nm koristeći aceton kao slijepu probu. Dobivene vrijednosti apsorpcije (662A, 644A i 440A) uvrštene su u Holm-Weststtainove jednadžbe za izračunavanje koncentracije pigmenata u mg/dm^3:

$$klorofil\ a = 9{,}784 \times A662 - 0{,}990 \times A644\ [mg/dm^3]$$
$$klorofil\ b = 21{,}426 \times A644 - 4{,}65 \times A662\ [mg/dm^3]$$
$$ukupni\ klorofil = 5{,}134 \times A662 + 20{,}436 \times A644\ [mg/dm^3]$$
$$ukupni\ karotenoidi = 4{,}695 \times A440 - 0{,}268 \times (ukupni\ klorofili)[mg/dm^3]$$

Brojevi u jednadžbama su molarni apsorpcijski koeficijenti po Holmu i Wetstteinu.
Formula za izračunavanje koncentracije pigmenata na mg/g svježe tvari ploda glasi:

$$c\ (mg/g) = \frac{c1 \times V}{m}$$

Gdje je:
c – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/g svježe tvari ploda
c1 – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/L
V – volumen filtrata (odmjerne tikvice) mL
m – masa uzorka izražena u mg

3.5.11. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja statistički su obrađeni u programskom paketu SAS/STAT (2010), verzija 9.3; SAS Institute, Cary, NC, SAD. Svaki tretman klasične i ultrazvučne ekstrakcije vodenog i etanolnog tretmana napravljen je u 3 ponavljanja. Sve analize fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata provedene su u tri ponavljanja. Rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Srednje vrijednosti uspoređene su t-testom (LSD), a smatraju se značajno različitim prema $p \leq 0{,}0001$. Uz rezultate u tablicama nalaze se i eksponenti različitih slova koji označavaju značajne statističke razlike kod $p \leq 0{,}0001$. Vrijednostima standardne devijacije (s) prikazano je prosječno odstupanje rezultata od srednje vrijednosti za svaki pojedini istraživani parametar.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata sikavice

Rezultati osnovnog kemijskog sastava vodenih i etanolnih tretmana praha sikavice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom prikazani su u tablici 5, a obuhvaćaju: gustoću otopine, električnu vodljivost, sadržaj topljive suhe tvari (vodeni tretmani), odnosno kod etanolnih ekstrakata volumni sadržaj alkohola, sadržaj ukupnih kiselina i pH vrijednost. Analizom varijance dobivenih rezultata za sve istraživane parametre osnovnog kemijskog sastava utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) između svih istraživanih tretmana ovisno o načinu ekstrakcije (klasično, ultrazvuk), upotrijebljenom otapalu (destilirana voda i etanol) te temperaturi otapala (21,4 i 40 °C).

Gustoća otopine vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom bila je u rasponu od 0,9971 (S_6) do 0,9988 g/cm^3 (S_1), dok etanolnih od 0,9231 (S_3) do 0,9382 g/cm^3 (S_{15}) prema čemu je jasno vidljivo da neovisno o načinu ekstrakcije uzorci u kojima je kao otapalo korišten etanol imaju manje vrijednosti gustoće u odnosu na vodene uzorke, a što je i očekivano. Najviša gustoća otopine (0,9988 g/cm^3) utvrđena je u tretmanu S_1, odnosno uzorku klasično ekstrahiranom u kojem je kao otapalo korištena destilirana voda pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) dimenzije čestice praha sikavice od 160 µm. Usporedbom rezultata gustoće vodenih i etanolnih ekstrakata može se zaključiti kako primjena ultrazvuka nije značajno utjecala na njezine vrijednosti.

Električna vodljivosti vodenih ekstrakata ekstrahiranih klasično i ultrazvukom bila je u rasponu od 88,93 (S_2) do 275,66 µS/cm (S_{13}), dok kod etanolnih ekstrahiranih klasično i ultrazvukom u rasponu od 24,00 (S_4) do 67,70 µS/cm (S_{15}) što su višestruko niže vrijednosti od onih utvrđenih za vodene ekstrakte. Navedeni trend očekivan je s obzirom da voda pokazuje značajno veću električnu vodljivost od etanola. Najviša vrijednost električne vodljivosti (275,66 µS/cm) zabilježena je kod tretmana S_{13} u kojem je prah sikavice (dimenzije čestica 160 µm) ekstrahiran ultrazvukom pri temperaturi od 40 °C uz destiliranu vodu (40 °C) kao otapalo. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako je tretman ultrazvukom pozitivno djelovao na vrijednosti električne vodljivosti, odnosno nevezano o korištenoj vrsti otapala kod svih uzoraka tretiranih ultrazvukom utvrđene su značajno veće vrijednosti električne vodljivosti.

Volumni postotak alkohola (vol. %) određen je u tretmanima u kojima je prah sikavice tretiran alkoholom (etanolom, 50 % v/v), a i kod klasično i ultrazvučno tretiranih uzoraka bio je u rasponu od 44,20 (S_{15}) do 52,46 vol. % (S_3). U svim uzorcima tretiranim ultrazvukom dobivene su niže vrijednosti volumnog postotka.

Sadržaj topljive suhe tvari određen je samo kod uzoraka u kojima je prah sikavice tretiran destiliranom vodom kao otapalom, te je bio u rasponu od 0,01 (S_6) do 0,32 % (S_1) za uzorke ekstrahirane klasično i ultrazvukom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da prah sikavice nije bogat izvor topljive suhe tvari, odnosno šećera, što je i u skladu s literaturnim navodima. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako ultrazvučni tretman nije značajno doprinio povećanju sadržaja topljive suhe tvari, dok je značajan utjecaj utvrđen s obzirom na

veličinu čestica praha. Naime, ekstrakti koji su pripremani s manjom dimenzijom čestica praha (160 µm) imali su i više vrijednosti topljive suhe tvari, što je i očekivano s obzirom na činjenicu da će čestice manjih dimenzija pokazati bolju topljivost.

Sadržaj ukupnih kiselina vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kretao se u rasponu od 0,76 (S_{13}) do 0,3 % (S_2), dok je kod etanolnih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom bio u rasponu od 0,38 (S_7) do 2,20 % (S_8). Općenito, sadržaj ukupnih kiselina nije se značajno mijenjao ovisno o svim varijablama unutar pokusa, odnosno značajne razlike u sadržaju ukupnih kiselina nisu utvrđene niti s obzirom na različitu veličinu čestica, različitu vrstu i temperaturi otapala te način ektrakcije. Naime, najveći sadržaj ukupnih kiselina (2,20 %) koji se ujedno i značajno razlikovao od svih ostalih uzoraka utvrđen je kod tretmana $S_{8,}$ a u kojem je prah sikavice (dimenzije 630 µm) ekstrahiran klasično etanolom pri 40 °C U skladu s utvrđenim niskim vrijednostima ukupnih kiselina, pH vrijednosti svih uzoraka bile su relativno visoke i to kod klasične ekstrakcije za sve uzorke u rasponu od 5,75 do 6,52, dok kod ultrazvučne ektrakcije od 5,80 do 6,10. Također, ultrazvuk nije značajno utjecao na promjene pH vrijednosti uzoraka.

Temeljem dobivenih rezultata istraživanih kemijsko-fizikalnih parametara može se zaključiti kako ultrazvuk nije značajnije utjecao na promjene istih, a što se u konačnici i poklapa s rezultatima objavljenim od drugih autora (Aadil i sur., 2013; Zou i sur., 2016).

Tablica 5. Osnovni kemijski sastav vodenih i etanolnih tretmana praha sikavice ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	Gustoća (g/cm^3) ***	EL_VOD (µS/cm) ***	VOL. % ***	TST (%) ***	UK_KIS (%) **	pH **
			Klasična ekstrakcija			
S_1	0,9988a±0,001	184,16d±0,55	ND	0,32a±0,01	0,45b±0,03	6,36ab±0,32
S_2	0,9980bc±0,001	88,93h±0,05	ND	0,09d±0,00	0,31b±0,09	5,90cb±0,08
S_3	0,9231l±0,001	41,63j±0,05	52,46a±0,05	ND	0,53b±0,14	6,0cab±0,11
S_4	0,9290k±0,0001	24,00n	49,46b	ND	0,42b±0,18	5,75c±0,05
S_5	0,9982b±0,001	249,33b±0,57	ND	0,02c±0,02	0,59b±0,02	6,52a±0,49
S_6	0,9971e±0,001	127,80f±0,87	ND	0,01g	0,34b±0,03	5,98cab±0,11
S_7	0,9305i±0,04	53,46k±0,25	48,10c±0,05	ND	0,38b±0,03	6,39ab±0,30
S_8	0,9306i±0,0001	42,06i±0,11	47,90d±0,05	ND	2,20a±1,63	6,32cab±0,79
			Ultrazvučna ekstrakcija			
S_9	0,9983b±0,001	238,00c	ND	0,02c±0,02	0,63b±0,06	5,99cab±0,05
S_{10}	0,9976d±0,001	116,63g±0,23	ND	0,05f±0,01	0,37b±0,00	5,85cb±0,03
S_{11}	0,9317h±0,001	56,06j±0,15	47,57e±0,05	ND	0,45b±0,08	6,38ab±0,13
S_{12}	0,9299j±0,03	30,73m±0,49	48,10c	ND	0,38b±0,07	5,89cb±0,00
S_{13}	0,9987a	275,66a±0,57	ND	0,29b	0,76b±0,02	6,10cab±0,06
S_{14}	0,9977dc	139,36e±0,05	ND	0,07e	0,45b±0,07	5,91cb±0,14
S_{15}	0,9382f±0,0001	67,70i±0,10	44,20g±0,0	ND	0,51b±0,00	5,99cab±0,02
S_{16}	0,9351g±0,02	41,66l±0,11	45,57f±0,05	ND	0,52b±0,03	5,80cb±0,05

EL_VOD-električna vodljivost, TST-topljiva suha tvar, UK_KIS-ukupne kiseline, ND-nije determiniran sadržaj, ,**p<0,01,***p<0,00

U tablici 6 prikazane su kromatske vrijednosti (L*, a*, b*, C*, h*) ekstrakata sikavice. Za sve istraživane kromatske vrijednosti utvrđene su visoko signifikante statističke razlike s obzirom na sve varijable iz ovog istraživanja. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je tretman ultrazvukom neovisno o vrsti otapala (dH_2O, EtOH) i o temperaturi otapala (21,4 °C, 40 °C) utjecao na povećanje svih analiziranih kromatskih vrijednosti. Kod kromatskog parametra L* za vodene i etanolne ekstrakte neovisno o načinu ekstrakcije vrijednosti se kreću od 16,42 (S_1) do 21,40 (S_{14}), za parametar a* od 5,16 (S_2) do 10,93 (S_{15}), zatim za parametar b* od 2,01 (S_2) do 8,49 (S_8), za C* od 5,54 (S_2) do 12,63 (S_{15}) i kod parametra boje h* 21,25 (S_2) do 49,44 (S_4). Temeljem svih utvrđenih vrijednosti kromatskih parametara može se zaključiti kako su uzorci relativno tamno, žućkastog obojenja. Ultrazvuk je fenomenom kavitacije pridonio mehaničkom razaranju stjenki biljne stanice, olakšao otapanje sastojaka biljnog materijala i neposredno utjecao na promjenu boje ekstrakata. I drugi literaturni izvori napominju kako mehanizam kavitacije može uzrokovati niz promjena prvenstveno vezano uz tijek kemijske reakcije, a koje se u konačnici i očituju promjenom boje (Cruz-Cansino i sur., 2015).

Tablica 6. Prikaz intenziteta boje vodenih i etanolnih tretmana praha sikavice ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	*L**	*a**	*b**	*C**	*h**
	***	***	***	***	***
		Klasična ekstrakcija			
S_1	16,42p	6,41n	2,85m	7,01n	23,99
S_2	16,98m	5,16o	2,01o	5,54p	21,25p
S_3	16,65o	8,67c	4,72h	9,87f	28,54j
S_4	19,52d	4,54p	5,27f	6,94o	49,44a
S_5	17,77k	7,49j	3,77k	8,38	26,99k
S_6	17,85j	6,73m	2,84n	7,30m	22,87n
S_7	16,78n	8,34d	3,45	9,02i	22,48o
S_8	18,49g	8,00f	8,49a	11,66b	46,72c
		Ultrazvučna ekstrakcija			
S_9	18,88e	7,97g	4,78g	9,30h	30,96g
S_{10}	20,73b	7,10l	4,72h	8,53k	33,60e
S_{11}	18,00i	10,08b	4,39j	10,99d	23,53m
S_{12}	18,34h	7,60i	4,52i	8,82j	30,75h
S_{13}	18,72f	8,24e	5,32e	9,80g	32,85f
S_{14}	21,40a	7,90h	6,71c	10,36e	40,38d
S_{15}	17,58l	10,93a	6,32d	12,63a	30,06i
S_{16}	20,58c	7,38k	8,28b	11,09c	48,26b

*L**-intenzitet svjetla ili tame, *a**-intenzitet crvene ili zelene boje, *b**-intenzitet žute ili plave boje, *c*-, *h*-, ***-p<0,001

4.2. Bioaktivne komponente ekstrakata sikavice

Rezultati sadržaja bioaktivnih komponenti obuhvaćaju sadržaj: vitamina C, ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida, te antioksidacijskog kapaciteta. Analizom varijance dobivenih rezultata istraživanih bioaktivnih spojeva utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0{,}0001$) između svih istraživanih uzoraka ekstrahiranih klasičnom metodom i ultrazvukom visokog intenziteta (tablica 7).

Vrijednosti sadržaja vitamina C (mg/100 g) u vodenim uzorcima ekstrahiranim klasično kreću se u rasponu od 13,89 (S_5) do 25,57 mg/100 g (S_2), a etanolnih od 13,18 (S_7) do 26,23 mg/100 g (S_3). Najviše vrijednosti sadržaja vitamina C neovisno o vrsti otapala i veličini čestica praha utvrđene su za uzorke ektsrahirane klasično. Mogući razlog nižeg sadržaja vitamina C u uzorcima tretiranim ultrazvukom je povišenje temperature sustava koja je tijekom ultrazvučne ektrakcije očekivana. Prema Grafikonu 2 jasno je vidljivo povišenje temperature tijekom ultrazvučnog tretmana i vodenih i etanolnih uzoraka čak do maksimalnih 55,7 °C, a čiji porast može značajno utjecati na degradaciju termolabilnog vitamina C.

Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično kreću se u rasponu od 42,09 (S_2) do 233,95 mg/L (S_5) , dok kod etanolnih uzoraka ekstrahiranih klasično u rasponu od 87,54 (S_4) do 182,39 mg/L (S_7). I tijekom klasične i ultrazvučne ektrakcije više vrijednosti ukupnih fenola utvrđene su uzorcima pripremljenim od praha manjih dimenzija čestica (160 µm) što je i očekivano. Također, osim dimenzije čestica još jedan bitan čimbenik utjecaja na sadržaj ukupnih fenola bila je i temperatura otapala. Prema dobivenim rezultatima, utvrđen je značajno veći sadržaj ukupnih fenola u uzorcima u kojima je korišteno otapalo više temperature od sobne (40 °C) neovisno o vrsti otapala i načinu ekstrakcije. Prema čemu se može zaključiti kako blago povišenje temperature ne utječe negativno na sadržaj ukupnih fenola kako je to utvrđeno za vitamin C. Naime, fenolni spojevi općenito ne pokazuju značajnu osjetljivost na povišene temperature, a u ovom slučaju povišena temperatura je pridonijela učinkovitijem otapanju i izolaciji iz biljnog materijala. No, promatrajući sve varijable korištene u ovom istraživanju, najveći učinak na povećanje prinosa sadržaja ukupnih fenola pokazuje tretman ultrazvukom. Naime, uspoređujući uzorke u kojima je prah ekstrahiran klasično i ultrazvukom utvrđena su višestruka povećanja sadržaja ukupnih fenola prilikom ultrazvučnog tretmana. Kao primjer, u uzorku S_9 utvrđena je čak dva puta viša vrijednost sadržaja ukupnih fenola u usporedbi s istim uzorkom (prah sikavice dimenzije čestica 160 µm uz destiliranu vodu kao otapalo pri temepraturi 21,6 °C) u kojem je prah ekstrahiran klasično (S_1). Pozitivan utjecaj ultrazvučnog tretmana na sadržaj fenolnih spojeva dokazuje i niz drugih istraživanja (Šic Žlabur i sur., 2015; Šic Žlabur i sur., 2017). Vrijednosti sadržaja ukupnih flavonoida kod vodenih uzoraka praha sikavice ekstrahiranih klasično kreću se u rasponu od 15,68 (S_6) do 76,74 mg/L (S_5), a etanolnih u rasponu od 21,61 (S_3) do 62,80 mg/L (S_7).Također, sličan trend utvrđen je i za vrijednosti sadržaja ukupnih neflavonoida koji se kod vodenih uzoraka sikavice ekstrahiranih klasično kreću u rasponu od 60 (S_6) do 161,50 mg/L (S_1), a kod etanolnih u rasponu od 82,92 (S_7) do 121,52

mg/L (S_3). Temeljem svih dobivenih reultata može se zaključiti pozitivan utjecaj ultrazvučnog predtretmana na sadržaj ukupnih flavonoida i neflavonoida.

Bioaktivne komponente specifične su po značajnoj antioksidacijskoj aktivnosti, a koja je prvenstveno važna iz aspekta zdravlja ljudi. Naime, antioksidacijski spojevi inhibiraju štetne produkte (slobodnih radikala) te na taj način usporavaju oksidacijske procese u stanicama (Šic Žlabur i sur., 2015). Antioksidacijska aktivnost vezana je uz količinu bioaktivnih spojeva, odnosno uzorci s većom količinom navedenih spojeva ispoljavaju i veću antioksidacijsku aktivnost. U ovom istraživanju veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta zabilježene su uzorcima za čiju pripremu je korišten prah manjih dimenzija čestica (160 µm) kao i uzorci ultrazvučno tretirani, a što se uglavnom poklapa i s dobivenim vrijednostima pojedinih bioaktvnih spojeva.

Tablica 7. Bioaktivne komponente vodenih i etanolnih tretmana praha sikavice ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	VIT_C (mg/100g) ***	UK_FENOL (mg/L) ***	FLAV (mg/L) ***	NFLV (mg/L) ***	ANT_KAP ***
			Klasična ekstrakcija		
S_1	20,96b±0,79	197,59e±0,32	36,08fde±0,28	161,50d±0,32	1871,38bc±21,37
S_2	25,57a±1,59	42,09i±0,44	ND	ND	650,35k±771,34
S_3	26,23a±1,23	143,13f±0,73	21,61gh±0,22	121,52fe±0,68	1737,18de±686,10
S_4	22,48b±1,60	87,54g±0,43	ND	ND	1301,73i±599,01
S_5	13,89efd±0,41	233,95d±2,26	76,74b±0,86	157,21d2,32	1584,40g±567,79
S_6	14,20ecfd±0,9	56,68hi±35,11	15,68h±0,25	60hi±65,70	724,90k±557,11
S_7	13,18ef±0,69	182,39e±2,37	62,80c±1,26	82,92hg±61,11	1610,89fg±547,92
S_8	13,21ef±0,71	137,89f±0,49	45,61d±0,49	91,62hfg±0,93	1420,47h±528,51
			Ultrazvučna ekstrakcija		
S_9	12,97ef±0,72	457,61b±0,46	175,90a±2,70	281,72b±3,13	1815,15dc±964,87
S_{10}	14,21ecfd±0,7	64,05h±0,46	26,08fgh±0,24	38i±0,71	908,11j±480,79
S_{11}	13,06ef±0,78	136,35f±1,39	62,51c±24,74	73,84h±4,25	1910,67b±5,42
S_{12}	16,55c±1,50	124,27f±3,09	37,64de±18,13	76,63h±6,60	2068,26a±570,92
S_{13}	12,47f±2,86	538,50a±8,02	184,69a±1,13	353,81a±7,82	1455,21h±12,98
S_{14}	15,28ecd±0,43	143,56f±1,29	31,03fge±0,89	112,53fg±0,95	885,92j±4,25
S_{15}	16,55c±0,44	219,86d±1,74	66,15c±0,29	152,71de±1,56	1544,67g±3,88
S_{16}	16,16cd±0,41	275,17c±1,70	68,02bc±1,18	207,15c±0,89	1687,22fe±11,69

VIT_C-vitamin C, UK_FENOL-ukupni fenoli,FLAV-flavonoidi, NFLV-neflavonoidi, ANT_KAP-antioksidacijski kapacitet, ***-p<0,001

4.3. Fizikalno-kemijska svojstva ekstrakata artičoke

Rezultati osnovnog kemijskog sastava vodenih i etanolnih uzoraka artičoke ekstrahiranih klasično i ultrazvukom prikazani su u Tablici 8. Analizom varijance dobivenih rezultata za sve istraživane parametre osnovnog kemijskog sastava utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) između svih istraživanih tretmana ovisno o načinu ekstrakcije (klasično, ultrazvuk), upotrijebljenom otapalu (destilirana voda i etanol) te temperaturi otapala (21,4 i 40 °C).

Gustoća vodenih uzoraka artičoke ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kreće se u rasponu od 0,9991 (A_7) do 1,0017 g/cm^3 (A_1). Kao i kod uzoraka ekstrakata sikavice tretman ultrazvukom nije značajno utjecao na gustoću otopine, dok su ostale istraživane varijable, odnosno vrsta i temperatura otapala, utjecale na vrijednosti gustoće. Očekivano su vodeni ekstrakti pokazali veće vrijednosti gustoće od etanolnih te također uzorci koji su tretirani otapalima sobne temperature (21,4 °C) imali su i veće vrijednosti gustoće.

Električna vodljivost vodenih uzoraka artičoke ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kreće se u rasponu od 1648,3 (A_1) do 1842,6 µS/cm (A_3), dok etanolnih rasponu od 456,3 (A_2) do 583 µS/cm (A_8). Kao što je očekivano, veće vrijednosti električne vodljivosti utvrđene su kod uzoraka kod kojih je kao otapalo korištena destilirana voda. Kao i kod uzoraka sikavice, ultrazvučni tretman povoljno je djelovao na električnu vodljivost otopina, kod uzoraka tretiranih ultrazvukom utvrđene su značajno veće vrijednosti električne vodljivosti u sporedbi s onim u kojem je artičoka tretirana klasično.

Volumni postotak alkohola etanolnih ekstrakata artičoke kreće u rasponu od 45,6 (A_8) do 49,53 vol. % (A_4) prilikom čega ultrazvučni tretman nije utjecao na promjene vrijednosti istih. Općenito, više vrijednosti volumnog postotka alkohola utvrđene su u uzorcima klasično ektrahiranim.

Artičoka kao povrtna vrsta također nije karakteristična po sadržaju šećera te su stoga niže utvrđene vrijednosti topljive suhe tvari ekstrakata artičoke u ovom istraživanju i očekivane. Sadržaj topljive suhe tvari kod vodenih uzoraka ektrahiranih klasično i ultrazvukom kreće se u rasponu od 0,36 (A_3) do 0,58 % (A_5). Nešto više vrijednosti sadržaja topljive suhe tvari utvrđene su u uzorcima tretiranim ultrazvukom.

Ekstrakti artičoke tretirani ultrazvukom sadržavali su više ukupnih kiselina od onih u kojima je sirovina ektrahirana klasično neovisno o vrsti i temperaturi korištenog otapala. U prosjeku su te vrijednosti ukupnih kiselina bile za otprilike 18 % više u uzorcima tretiranim ultrazvukom. U skladu s relativno niskim sadržajem ukupnih kiselina, pH vrijednosti vodenih i etanolnih ekstrakata tretiranih klasično i utrazvukom bile su relativno visoke, u rasponu od 5,50 do 6,21. Ultrazvuk nije utjecao na pH- vrijednosti uzoraka.

Tablica 8. Fizikalno-kemijska svojstva vodenih i etanolnih tretmana artičoke ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	Gustoća (g/cm^3)	EL_VOD (µS/cm)	VOL. %	TST (%)	UK_KIS (%)	pH
	***	***	***	***	***	***
Klasična ekstrakcija						
A_1	1,0017a±0,23	1648,3d±2,08	ND	0,54b±0,011	0,75d±0,011	5,56c±0,05
A_2	0,9323d±0,03	456,3h±0,57	48,90b	ND	0,82cd±0,011	6,21a±0,02
A_3	0,998b±0,0001	1842,6a±3,51	ND	0,36c±0,011	0,95cb±0,036	5,52c±0,02
A_4	0,9272e±0,25	540,0f±4,58	49,53a±0,11	ND	1,02ab±0,06	6,13ab±0,05
Ultrazvučna ekstrakcija						
A_5	0,9997b±0,001	1741,6c±0,57	ND	0,58a±0,01	1,02ab±0,09	5,54c±0,03
A_6	0,9324d±0,15	500g±1,0	47,46c±0,05	ND	1,01ab±0,06	6,12ab±0,06
A_7	0,9991b	1814,0b±7,54	ND	0,56b±0,01	1,11a±0,09	5,50c±0,03
A_8	0,9346c±0,15	583e	45,60d±0,1	ND	1,06ab±0,02	6,07b±0,05

EL-VOD-električna vodljivost, TST-topljiva suha tvar, UK_KIS-ukupne kiseline, ***-p<0,001

Vrijednosti kromatskih parametara ekstrakata artičoke (L*, a*, b*, C*, h*) prikazane su u Tablici 9. Za sve istraživane kromatske vrijednosti utvrđene su visoko signifikante statističke razlike s obzirom na sve varijable iz ovog istraživanja. Kod kromatskog parametra L* za vodene i etanolne ekstrakte neovisno o načinu ekstrakcije vrijednosti se kreću od 29,76 (A_3) do 48,25 (A_6), za parametar a* od 0,08 (A_6) do 7,85 (A_3), zatim za parametar b* od 16,28 (A_2) do 23,59 (A_3), za C* od 16,28 (A_2) do 24,87 (A_3) i kod parametra boje h* 71,59 (A_3) do 90,29 (A_6). Prema utvrđenim vrijednostima kromatskih parametara može se zaključiti kako su uzorci svijetlije, zelenkastog obojenja. S obzirom na istraživane varijable, značajne promjene utvrđene su za kromatski parametar a* s obzirom na korištenu vrstu otapala. Naime, ekstrakti pripremljeni etanolom imali su značajno niže a* vrijednosti što upućuje na prisutnost zelenog dijela spektra odnosno zeleno obojenih ekstrakata. Što se tiče utjecaja načina ekstrakcije, ultrazvučni tretman značajnije je utjecao na promjene L* vrijednosti prilikom čega su one kod ekstrakata tretiranih ultrazvukom bile značajno veće.

Tablica 9. Prikaz intenziteta boje vodenih i etanolnih tretmana artičoke ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	*L** ***	*a** ***	*b** ***	*C** ***	*h** ***
			Klasična ekstrakcija		
A_1	35,08f	6,85c±0,001	23,42b	24,4b±0,001	73,71e
A_2	35,29e	0,09g±0,001	16,28h	16,28h	89,7b
A_3	29,76h±12,6	7,85a±0,001	23,59a	24,87a	71,59h
A_4	30,36g	0,15f	22,49c	22,49d	89,61c
			Ultrazvučna ekstrakcija		
A_5	39,16d	7,56b	21,03f	24,22c	71,81g
A_6	48,25a	0,08h	16,88g	16,89g	90,29a
A_7	39,98c	6,34d	21,48e	22,39e	73,55f
A_8	44,28b	0,52e	22,4d	22,05f	88,65d±0,001

*L**-intenzitet svjetla ili tame, *a**-intenzitet crvene ili zelene boje, *b**-intenzitet žute ili plave boje, *c*-, *h*-, ***-p<0,001

4.4. Bioaktivne komponente ekstrakata artičoke

Analizom varijance dobivenih rezultata istraživanih bioaktivnih spojeva utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) između svih istraživanih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom (Tablica 10).

Najviša vrijednost vitamina C (16,92 mg/100 g) vodenih i etanolnih ekstrakata artičoke utvrđena je kod uzorka tretiranog ultrazvukom (A_8). Općenito, nešto više vrijednosti (oko 7 %) sadržaja vitamina C utvrđene su u uzorcima tretiranih ultrazvukom neovisno o vrsti i temperaturi otapala. Kod primjera ekstrakata artičoke u usporedbi s onima sikavice utvrđeno je da ultrazvuk ne utječe negativno već naprotiv. Vrijednosti sadržaja vitamina C (mg/100 g) vodenih uzoraka, veće su vrijednosti onih tretmana koji su ekstrahirani klasičnom ekstrakcijom, dok kod etanolnih tretmana veće su vrijednosti onih tretmana ekstrahiranih ultrazvukom. Najviša vrijednost zabilježena je kod tretmana A_6 u vrijednosti 14,18 mg/100 g, ekstrahiran ultrazvukom, pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) i pri etanolu kao otapalu.

Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola (mg/L) vodenih i etanolnih tretmana ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kreću se u rasponu od 316,76 (A_1) do 594,09 mg/L (A_8). Najviša vrijednost zabilježena je kod tretmana koji je ekstrahiran ultrazvukom, pri temperaturi od 40 °C i etanolu kao otapalu, a to je tretman u vrijednosti od 594,04 mg/L (A_8). Najniža vrijednost zabilježena je kod tretmana koji je ekstrahiran klasično, pri sobnoj temperaturi (21,4 °C), te destiliranoj vodi kao otapalu, a to je tretman u vrijednosti od 316,76 mg/L (A_1). Primjena ultrazvuka doprinijela je povećanju vrijednosti vodenih i etanolnih tretmana. Jedino kod tretmana A_3 koji je ekstrahiran klasično, vrijednost je viša od vrijednosti tretmana koji ekstrahiran ultrazvukom. Vrijednosti sadržaja flavonoida vodenih i etanolnih tretmana ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kreću se u rasponu od 126,45 (A_1) do 264,81 (A_8) mg/L. Najviša vrijednost zabilježena je kod tretmana koji je ekstrahiran klasično, pri sobnoj temperaturi (21,4 °C), te pri destiliranoj vodi kao otapalu, u vrijednosti od 126,45 (A_1), dok je najniža vrijednost zabilježena kod tretmana koji je ekstrahiran ultrazvukom, pri temperaturi od 40°C, te pri etanolu kao otapalu.
Vrijednosti sadržaja neflavonoida vodenih i etanolnih tretmana ekstrahiranih klasično i ultrazvukom kreće se u rasponu od 183,05 (A_5) do 329,27 (A_8) mg/L. Kod vodenih tretmana, više su vrijednosti neflavonoida kod onih tretmana koji su ekstrahirani klasično, dok kod etanolnih tretmana, primjena ultrazvuka je doprinijela povećanju vrijednosti neflavonoida i time je zabilježeno povišenje vrijednosti neflavonoida kod tretmana koji su ekstrahirani ultrazvukom. Najviša vrijednost zabilježena je kod tretmana koji je ekstrahiran ultrazvukom, pri temperaturi od 40 °C i pri etanolu kao otapalu, u vrijednosti od 329,27 mg/L (A_8), dok je najniža vrijednost zabilježena kod tretmana, koji je također ekstrahiran ultrazvukom, ali pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) i pri destiliranoj vodi kao otapalu.

Tablica 10. Bioaktivne komponente vodenih i etanolnih tretmana artičoke ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	VIT_C (mg/100 g) **	UK_FENOL (mg/L) ***	FLV (mg/L) ***	NFLV (mg/L) ***	ANT_KAP ***
Klasična ekstrakcija					
A_1	13,59ab±2,14	316,76g±0,28	126,45g±0,455	190,29e±0,17	1689,7d±6,27
A_2	13,62ab±1,36	502,16d±0,78	238,08b±0,921	263,17c±0,38	1741,24a±4,48
A_3	11,44b±1,98	455,83e±0,57	192,37d±0,040	263,42c±0,61	1688,73d±12,25
A_4	13,11b±2,17	576,70b±1,74	264,41a±0,698	312,61b±2,38	1726,49b±2,92
Ultrazvučna ekstrakcija					
A_5	12,86b±0,42	319,17g±0,54	136,12f±2,146	183,05e±1,66	1701,97dc±2,41
A_6	14,18ab±0,00	536,89c±1,24	230,92c±5,774	305,96b±5,88	1716,38bc±3,04
A_7	11,36b±1,33	393,34f±0,98	170,81e±0,427	223,97d±1,98	1639,58e±5,44
A_8	16,92a±0,94	594,09a±2,62	264,81a±1,568	329,27a±4,18	1692,79d±5,93

VIT_C-vitamin C, UK_FENOL-ukupni fenoli,FLAV-flavonoidi, NFLV-neflavonoidi, ANT_KAP-antioksidacijski kapacitet, **-p<0,01, ***-p<0,001

4.5. Pigmentni spojevi esktrakata artičoke

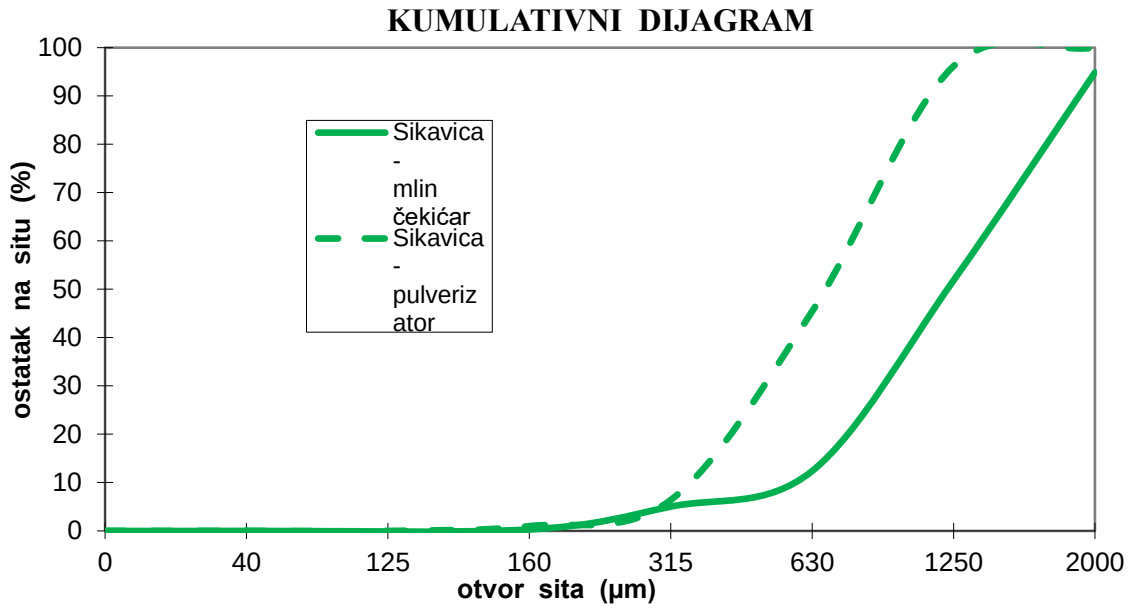
Analizirani pigmentni spojevi (ukupni klorofili, klorofil a, klorofil b i ukupni karotenoidi) ekstrakata artičoke prikazani su u tablici 11. Kod svih pigmentnih spojeva, ultrazvuk nije značajno pridonio povećanju vrijednosti tretmana ekstrahiranih ultrazvukom. Najviše vrijedosti analiziranih pigmentnih spojeva utvrđene su klasičnim načinom ekstrakcije. Također, važno je spomenuti da je vrsta otapala značajno utjecala na prinos pigmentnih spojeva, prilikom čega su uglavnom svi analizirani pigmentni spojevi u etanolnim ektraktima imali više vrijednosti.

Tablica 11. Prikaz vrijednosti pigmenata vodenih i etanolnih tretmana artičoke ekstrahirano klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tretman	Klor a (µg/g) ***	Klor b (µg/g) ***	UK_KLOR (µg/g) ***	UK_KAROT (µg/g) ***
		Klasična ekstrakcija		
A_1	2,71c	5,18d±0,05	7,90c±0,05	4,59c
A_2	42,0b±0,0001	69,0cb±0,05	111,0b±0,001	2,0d
A_3	2,13c	4,30d	6,44c±0,001	7,25a
A_4	60,0a±0,001	90,0a	150,0a	2,0d
		Ultrazvučna ekstrakcija		
A_5	ND	ND	ND	ND
A_6	40,0ab±0,01	60,0dcb±0,001	100,0cb±0,02	20,0d
A_7	3,91c±0,01	7,17dcb±0,02	11,08d±0,02	5,93b
A_8	50,0ab	70,0ab	120,0ab±0,01	2,0d

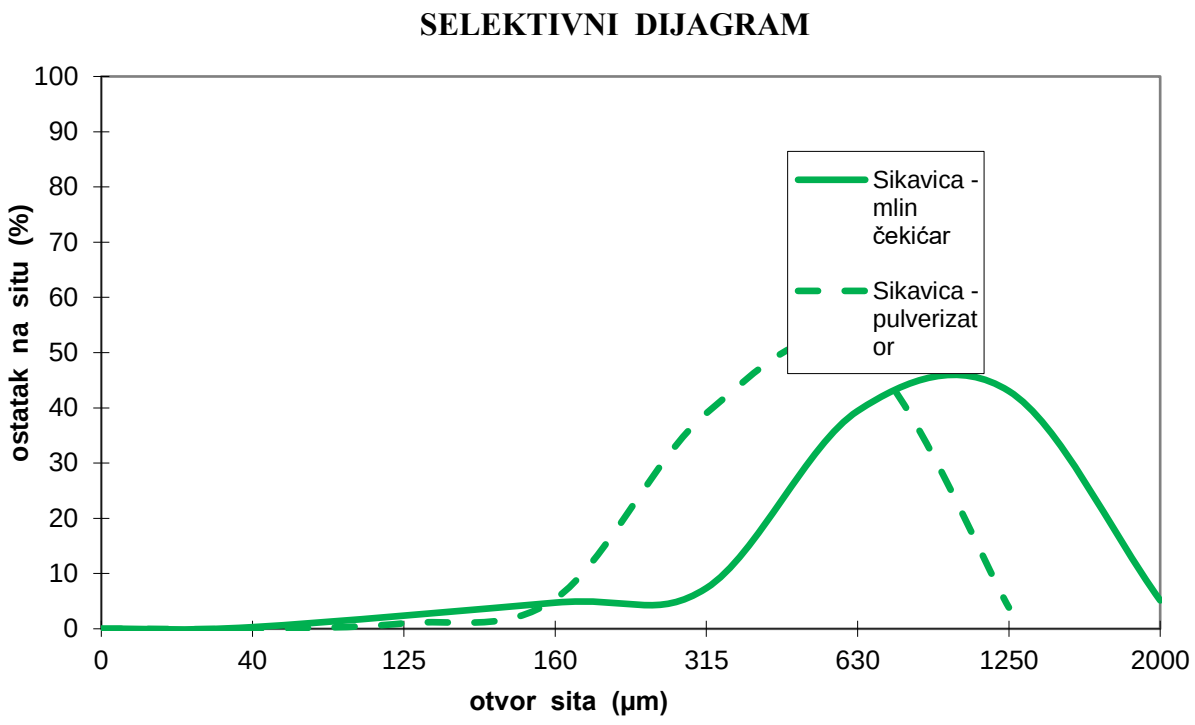
4.6. Prikaz određivanja raspodjele veličine čestica kod sikavice

Nakon usitnjavanja biljnog materijala sikavice formirane su granulometrijske krivulje (slika 20 i 21), odnosno formirani su kumulativni (slika 20) i selektivni dijagrami (slika 21).



Slika 20. Kumulativni dijagram

Usitnjavanjem suhog materijala sikavice na mlinu čekićaru modul ujednačenosti (uniformnosti) imao je odnos Mu=12:82:5. U kumulativnom dijagramu vidljivo je da suhi materijal sikavice usitnjen mlinom čekićarom ima najveći udjel čestica veličine od 160 do 630 µm. Komponente s obzirom na veličinu moraju biti što je moguće ujednačenije u rasponu od 160 do 630 µm. Prema modulu ujednačenosti, vidljiva je vrijednost finih (12), srednjih (82) i grubih čestica (5). Područja finih i grubih čestica moraju biti što manja da se smanji eventualno dekomponiranje (raslojavanje) smjese.



Slika 21. Selektivni dijagram

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvuk nije značajno utjecao na promjene vrijednosti sliijedećih fizikalno-kemijskih svojstava otopina: gustoće, topljive suhe tvari, ukupnih kiselina i pH vrijednosti i kod ekstrakata sikavice i artičoke.
2. Ultrazvuk je pozitivno djelovao na električnu vodljivosti praha sikavice i artičoke. Neovisno o korištenoj vrsti otapala kod svih uzoraka tretiranih ultrazvukom utvrđene su značajno veće vrijednosti električne vodljivosti.
3. Ultrazvuk je značajno utjecao na povećanje vrijednosti analiziranih kromatskih parametara (L*, a*, b*, C*, h*) i kod ekstrakata sikavice i artičoke.
4. Najviše vrijednosti sadržaja vitamina C kod sikavice, neovisno o vrsti otapala i veličini čestica praha, utvrđene su za uzorke ektrahirane klasično. Kod ekstrakata artičoke, dobiveni su suprotni rezultati, odnosno ultrazvuk nije negativno utjecao na sadržaj vitamina C analiziranih ekstrakata.
5. Tretman ultrazvukom pozitivno je utjecao na povećanje vrijednosti ostalih bioaktivnih komponenata uzoraka sikavice i artičoke, i to: ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida, dok su također vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata sikavice bile značajnije veće prilikom tretmana ultrazvukom.
6. Ultrazvuk nije značajno utjecao na povećanje vrijednosti istraživanih pigmentnih spojeva.

Temeljem svega navedenog, važno je spomenuti kako su pripremljeni ekstrakti sikavice neovisno o načinu pripreme dobar izvor bioaktivnih komponenti potencijalno značajne nutritivne vrijednosti. Etanolni ekstrakti bogatijeg su sastava fenolnih spojeva te višeg antioksidacijskog kapaciteta neovisno o korištenoj metodi ekstrakcije te zbog navedenog pokazuju i bolju daljnju primijenjivost. Ultrazvuk visokog intenziteta značajno je pridonio povećanju sadržaja pojedinih bioaktivnih spojeva, posebice fenolnih te se i zbog jednostavnosti rukovanja može preporučiti za daljnju primjenu u svrhu izolacije različitih vrsta kemijskih spojeva.

6. Popis literature

1. Aadil R. M., Zeng X.-A., Han Z., Sun D.-W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. Food Chemistry, 141(3): 3201–3206.

2. Abou-Arab A.E., Abu-Salem F.M. (2010). Evaluation of bioactive compounds of Stevia rebaudiana leaves and callus. African Journal of Food Science, 4 (10): 627–634.

2. AOAC (1995). Official methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.

3. AOAC (2002). Official methods of Analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.

4. Bijak M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt)- Chemistry, Bioavailability and Metabolism. Molecules, 22, 1942.

5. Brnčić M., Tripalo B., Penava A., Karlović D., Ježek D., Vikić Topić D., Karlović S., Bosiljov T. (2009). Applications of Power Ultrasound for Foodstuffs Processing. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 1-2: 32-37.

7. Chemat F., F., Zill-e-Huma., Khan M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing preservation and extraction. Ultrasonics Shonochemistry, 18: 813-835.

8. Cruz-Cansino N. S., Ramírez-Moreno E., Leon-Rivera J. E., Delgado-Oli-vares L., Alanís-García E., Ariza-Ortega J. A., Jaramillo-Bustos D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidantproperties of purple cactus pear (Opuntia ficus indica) juice after ther-moultrasound treatment. Ultrasonics Sonochemistry, 27: 277–286.

9. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology, 2(2): 22-33.

10. Gizdić Š. (1998). Višegodišnje povrće, "7 gracija" : artičoka, čičoka, hren, karda, kiselice, rabarbara i šparoga. Split : Zadružni savez Dalmacije "Zadrugar".

11. Herceg Z., Brnčić M., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S., Badanjak M., Sokolić I. (2009). Mogućnost primjene ultrazvuka u mlijekarskoj industriji. Mljekarstvo, 59 (1): 65-69.

12. Holm G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. Acta Agriculturae Scandinavica, 4: 457-471.

13. Karkanis A., Bilalis D., Efthimiadou A. (2011). Cultivation of milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn), a medicinal weed. Industrial Crops and Products, 34: 825-830.

14. Knorr D., Zenker M., Heinz V., Lee D-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. Trends in Food Science and Technology, 15: 261-266.

15. Kušec V., Pliestić S., (2006). Modul ujednačenosti kao parametra kakvoće rada mlina čekićara. Krmiva 48, Zagreb, 6: 307-315.

16. Kuštrak D. (2005). Farmakognozija- fitofarmacija, Golden-marketing, Zagreb.

17. Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84(4): 407–412.

18. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26 (9-10): 1231-1237.

19. Sala F. J., Burgos J., Condon S., Lopez P., Raso P. J., (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U knjizi: New Methods of Foods Preservation (ur. Gould, G. W.), Blackie Academic and Professional, London.

20. SAS/STAT (2010). Verzija 9.3; SAS Institute. Cary, NC, SAD.

21. Shukla S., Mehta A., Mehta P., Bajpai V.K. (2012). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Experimental and Toxicologic Pathology, 64: 807-811.

22. Suslick K. S., Eddingsaas N. C., Flannigan D. J., Hopkins S. D., Hangxun X. (2011). Extreme conditions during multibubble cavitation: Sonoluminescence as a spectroscopic probe. Ultrasonics Sonochemistry, 18: 842-846.

23. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Brnčić M., Dujmić F., Rimac Brnčić S. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from Stevia rebaudiana bertoni leaves. International Agrophysics, 29(2): 231–237.

24. Šic Žlabur J., Dobričević N., Pliestić S., Galić A., Bilić D. P., Voća S. (2017). Antioxidant potential of fruit juice with added chokeberry powder (*Aronia melanocarpa*). Molecules, 22(12).

25. Zou Y., Jiang A., Zou Y., Jiang A. (2016). Effect of ultrasound treatment on quality and microbial load of carrot juice. Food Science and Technology, 36(1): 111–115.

26. Wettstein D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. Experimental Cell Research, 12: 427-443.

Izvori slika:

1. https://www.google.hr/search?q=inpharma+sikavica+slike&rlz=1C1CHZL_hrBA695BA698&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwjWpaXZ3ordAhVPCuwKHT4jBWsQsAR6BAgGEAE&biw=1093&bih=505 , Pristupljeno 15.05.18., slika 1., slika 2.
2. https://www.google.hr/search?rlz=1C1CHZL_hrBA695BA698&biw=1093&bih=505&tbm=isch&sa=1&ei=faCCW6ylMY_TkgW227voBw&q=bodieko+slike+arti%C4%8Doka&oq=bodieko+slike+arti%C4%8Doka&gs_l=img.3...42072.46247.0.46424.0.0.0.0.0.0.0.0..0.0....0...1c.1.64.img..0.0.0....0.B-ign7gmMSM Pristupljeno 15.05.18., slika 3.
3. https://www.google.hr/search?rlz=1C1CHZL_hrBA695BA698&biw=1093&bih=505&tbm=isch&sa=1&ei=raCCW9DSHImxkwXC0I7YBA&q=vrt.com+sjeme+arti%C4%8Doke&oq=vrt.com+sjeme+arti%C4%8Doke&gs_l=img.3...33145.40267.0.40455.0.0.0.0.0.0.0.0..0.0....0...1c.1.64.img..0.0.0....0.lgvoGDF9eYo Pristupljeno 17.05.18., slika 4.
4. https://www.google.hr/search?rlz=1C1CHZL_hrBA695BA698&biw=1093&bih=505&tbm=isch&sa=1&ei=2KCCW8WoAY33kwXF5KZA&q=plantae+sjeme+arti%C4%8Doke&oq=plantae+sjeme+arti%C4%8Doke&gs_l=img.3...39143.43547.0.43709.0.0.0.0.0.0.0.0..0.0....0...1c.1.64.img..0.0.0....0.5zUkHh9cNMA Pristupljeno 01.06.18., slika 5.
5. https://www.google.hr/search?rlz=1C1CHZL_hrBA695BA698&biw=1093&bih=505&tbm=isch&sa=1&ei=BaGCW9PoIMqTkwXqx4eQBA&q=ritualcuisine+arti%C4%8Doka&oq=ritualcuisine+arti%C4%8Doka&gs_l=img.3...18224.27246.0.27433.0.0.0.0.0.0.0.0..0.0....0...1c.1.64.img..0.0.0....0.QJ4YBcJHw1c Pristupljeno 10.06.18., slika 6.

Životopis

Martina Kolar rođena je 04.01.1995. u Mostaru. Osnovnu naobrazbu stekla je u Osnovnoj školi Ilije Jakovljevića. Nakon završene osnovne škole, 2009./2010. upisuje srednju Gimnaziju fra Grge Martića u Mostaru. Zatim, upisuje preddiplomski studij, opći smjer na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Mostaru. Završni rad odrađuje iz modula Vrtlarstvo na temu „Cvjetne vrste na balkonima i terasama“. Nakon toga upisuje diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda i agroturizam u Zagrebu. Koristi se engleskim (razumijevanje – stupanj B2, govor – stupanj B1, pisanje – stupanj B1).