

Utjecaj metoda ekstrakcije na udio eteričnog ulja i fenolni sastav ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Hradec, Gloria

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:614387>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj, 2020 .

Gloria Hradec,
1099/PI

**UTJECAJ METODA
EKSTRAKCIJE NA UDIO
ETERIČNOG ULJA I FENOLNI
SASTAV EKSTRAKTA
RUŽMARINA (*Rosmarinus
officinalis* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju u Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Dent, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Anđele Miljanović, mag.ing. (Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama).



Ovo istraživanje je financirano sredstvima znanstvenog projekta „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša“ (HRZZ InteractOomyc, UIP-05-2017-6267) Hrvatske zaklade za znanost HRZZ (2018.-2023.).

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Dent na stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se Anđeli Miljanović, mag. ing. na pomoći i savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac te Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva na ustupljenom ultrazvučnom uređaju.

Te na kraju, zahvaljujem se svima onima bez kojih ne bih završila PBF, obitelji i prijateljima koji su uvijek bili tu za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA UDIO ETERIČNOG ULJA I FENOLNI SASTAV EKSTRAKTA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.)

Gloria Hradec, 1099/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti udio eteričnog ulja i fenolni sastav ekstrakta lista ružmarina nakon vodene destilacije po Clavengeru. Vodenoj destilaciji po Clavengeru prethodili su predtretmani: ekstrakcija refluksiranjem, ekstrakcija refluksiranjem potpomognuta enzimima te ultrazvučna ekstrakcija s ili bez dodatka enzima. Uz eterično ulje dobiveni su nusprodukti (vodeni ekstrakt i hidrolat) koji u svom sastavu sadrže fenolne spojeve. Biljni ostaci podvrgnuti su ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom primjenom otapala različite polarnosti (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1)). Najveći udio eteričnog ulja (1 mL/100 g) dobiven je uz predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i dodatak enzima ksilanaze. Najveći maseni udio ukupnih fenolnih spojeva određen je u vodenim ekstraktima ružmarina ($44,02 \pm 5,38$ mg GAE g⁻¹), dok je najveći udio ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatu (0,2 mg GAE g⁻¹) određen ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog ostatka važan je izbor otapala te primijenjeni predtretmani, a najveći prinosi fenolnih spojeva dobivaju se primjenom otapala etanol-voda (1:1) i prethodnim tretmanom enzimom ksilanazom.

Ključne riječi: ružmarin, fenolni spojevi, enzimi, ekstrakcija, ultrazvuk

Rad sadrži: 56 stranica, 9 slika, 11 tablica, 74 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. *Maja Dent*

Pomoć pri izradi: *Anđela Miljanović*, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Doc. dr. sc. *Maja Dent*
3. Doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić*
4. Izv. prof. dr. sc. *Lidija Šver*

Datum obrane: 13.7.2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON THE YIELD OF ESSENTIAL OIL AND PHENOLIC COMPOSITION OF ROSEMARY EXTRACT (*Rosmarinus officinalis* L.)

Gloria Hradec 1099/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the yield of essential oil and phenolic composition of rosemary leaves extract after Clavenger hydro-distillation. Clavenger hydro-distillation was preceded by refluxing or ultrasound-assisted extraction with or without the addition of an enzyme. By-products (aqueous extract and hydrolate) contain phenolic compounds in their composition. Plant residues were subjected to ultrasound-assisted extraction using solvents of different polarity (ethanol-water (1:1), methanol-water (1:1) and ethanol-methanol-water (1:1:1)). The highest yield of essential oil (1 mL/100g) was obtained by ultrasound pre-treatment and addition of xylanase enzyme. The highest mass fraction of total phenolic compounds in aqueous extracts ($44,02 \pm 5,38$ mg GAE g⁻¹) was obtained by refluxing, while the highest fraction of total phenolic compounds in the hydrolate (0,2 mg GAE g⁻¹) was obtained with ultrasound-assisted extraction. In the extraction of phenolic compounds the choice of solvent and the applied pretreatments are shown to be important factors. The highest proportion of phenolic compounds was extracted using the ethanol-water solvent (1:1) and the xylanase enzyme.

Keywords: rosemary, phenolic compounds, enzymes, extraction, ultrasound

Thesis contains: 56 pages, 9 figures, 11 tables, 74 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. *Maja Dent*, Assistant Professor

Technical support and assistance: *Anđela Miljanović*, BSc

Reviewers:

1. Ph.D. *Verica Dragović-Uzelac*, Full Professor
2. Ph.D. *Maja Dent*, Assistant Professor
3. Ph.D. *Tomislav Vladušić*, Assistant Professor
4. Ph.D. *Lidija Šver*, Associate Professor

Thesis defended: July 13th, 2020

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RUŽMARIN.....	2
2.2. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA.....	2
2.3. FENOLNI SPOJEVI.....	4
2.3.1. Flavonoidi.....	5
2.3.2. Flavonoli.....	6
2.3.3. Fenolne kiseline.....	6
2.3.4. Fenolni spojevi ružmarina.....	6
2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	7
2.4.1. Učinkovitost ekstrakcije.....	7
2.4.2. Utjecaj otapala na ekstrakciju.....	8
2.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija.....	9
2.4.4. Ekstrakcija potpomognuta enzimima.....	10
2.4.5. Vodena destilacija po Clavengeru.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI.....	12
3.3. APARATURA I PRIBOR.....	14
3.4. METODE RADA.....	15
3.4.1. Izolacija eteričnog ulja ružmarina.....	16
3.4.1.1. Klasična ekstrakcija refluksiranjem.....	17
3.4.1.2. Ekstrakcija refluksiranjem potpomognuta enzimima.....	17
3.4.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	17
3.4.1.4. Clavenger vodena destilacija.....	18
3.4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom biljnog ostatka listića ružmarina nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru.....	19
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu ružmarina.....	20
3.4.3.1. Određivanje ukupnih fenola.....	20
3.4.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida.....	22
3.4.3.3. Određivanje hidrosicimetnih kiselina i flavonola.....	24

4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM EKSTRAKTIMA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU	29
4.1.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru.....	29
4.1.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	30
4.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ETERIČNOG ULJA RUŽMARINA DOBIVENOG NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU	31
4.3. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA UKUPNIH FENOLA U HIDROLATIMA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU	32
4.4. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA LISTA RUŽMARINA	33
4.5. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU	37
4.5.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene klasične ekstrakcije refluksiranjem i ekstrakcije potpomognute enzimima.....	37
4.5.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s i bez dodatka enzima.....	39
4.6. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA	41
4.7. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU RUŽMARINA	42
4.8. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA BILJNOG OSTATKA RUŽMARINA	42
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Ružmarin (*Salvia rosmarinus* Spenn. syn. *Rosmarinus officinalis* L.) pripada porodici Lamiaceae, potječe iz mediteranske regije i široko je rasprostranjen po cijelom svijetu. Višegodišnja je, aromatična biljka, grmolikog oblika, visine do dva metra i lišćem koje se odlikuje karakterističnim mirisom (de Oliveira i sur., 2019). Ružmarin je bogat biološki aktivnim spojevima među kojima značajno mjesto zauzimaju fenolni spojevi koji se većim dijelom nalaze u listu, te im se pripisuje snažno antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje. U ekstraktima ružmarina u najvećoj su mjeri zastupljene fenolne kiseline: karnosična kiselina, kafeinska kiselina i njezini derivati poput ružmarinske kiseline (Moreno i sur., 2009), te flavonoidi od kojih su najzastupljeniji flavon glikozidi.

Na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva ružmarina utječu brojni faktori, kao što su metoda ekstrakcije, vrsta i polarnost otapala te temperatura i vrijeme ekstrakcije.

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem određivanja utjecaja predtretmana (klasične ekstrakcija refluksiranjem s ili bez dodatka odabranog enzima (pektinaze, celulaze ili ksilanaze), te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s ili bez dodatka odabranog enzima) na povećanje prinosa izoliranog eteričnog ulja iz sasušanih i usitnjenih listića ružmarina nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru. Osim na povećanje prinosa eteričnog ulja, utjecaj predtretmana odredit će se i u vodenim ekstraktima i hidrolatima koji su dobiveni kao nusprodukti vodene destilacije po Clavengeru, pri čemu je spektrofotometrijski određivan maseni udio fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola). U biljnom ostatku koji je također dobiven kao nusprodukt nakon vodene destilacije po Clavengeru odredit će se utjecaj ultrazvučne ekstrakcije otapalima etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) te etanol-metanol-voda (1:1:1) na izolaciju fenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RUŽMARIN

Ružmarin (*Salvia rosmarinus* Spenn. syn. *Rosmarinus officinalis* L.) je samonikla biljka koja pripada porodici Lamiaceae, široko rasprostranjena u mediteranskoj regiji, a nalazimo je i na područjima sjeverne Afrike i južne Azije (Oluwatuyi i sur., 2004). Riječ ružmarin potječe od latinskih riječi ros (rosa) i marinus (morski) te znači "morska rosa" (Kompelly i sur., 2019). Ružmarin je široko kultiviran od antičkog doba kao začinska i vrtna biljka (Pistelli i sur., 2018).

Ružmarin je drvenasta višegodišnja biljka s mirisnim, zimzelenim lišćem nalik na iglice i bijelim, ružičastim, ljubičastim ili plavim cvjetovima. Oblici se kreću od uspravnog do puzećih oblika: uspravni oblici mogu doseći 1,5 m visine. Listovi su dužine 2 do 4 cm i 25 mm širine, dok je naličje zelenkasto, prekriveno bijelim, kratkim dlačicama (Kompelly i sur., 2019). Biljka počinje cvjetati u kasno proljeće te se cvjetanje nastavlja tijekom ljeta (Parađiković i sur., 2013). Blijedoplavi, rijetko ružičasti ili bijeli cvjetovi rastu vertikalno u cvatovima na vrhu ogranaka (Kokkini i sur., 2003). Iz listova, cvjetova i grančica dobiva se eterično ulje i oleoresin, visoko cijenjeni u tradicionalnoj medicini, modernoj medicini, aromaterapiji kao i u parfemskoj industriji (Sasikumar i sur., 2004).

Osušeni listići ružmarina koriste se za aromatiziranje salata, povrtnih jela, juha, mesnih jela, kobasica i umaka (Kokkini i sur., 2003). Ružmarin je biljka često korištena u narodnoj medicini, kozmetičkim proizvodima, fitoterapiji i kao začin (Pistelli i sur., 2018).

2.2. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA

Eterična ulja su hlapive tekućine, a sintetiziraju ih biljke u žljezdastim dlakama ili sekretornim stanicama. Eterično ulje biljke akumuliraju u korijenu, listu, cvijetu ili stabljici, a udio eteričnog ulja u biljkama najčešće je ispod 1 %. Eterično ulje biljka sintetizira u lišću, dok za vrijeme cvatnje dolazi do migracije ulja u cvjetove (Butnariu i Sarac, 2018).

Eterična ulja u biljaka vrše različite funkcije, kao što su smanjivanje stupnja transpiracije, zaštita od patogena i biljojeda te imaju ulogu u privlačenju oprašivača, a često djeluju i fitotoksično pomažući biljkama u kompeticiji za resurse. Eterična ulja u biljkama smještena su u sekretornim stanicama između kutikule i epiderme, u strukturama unutar biljnih tkiva ili u posebnim žljezdastim dlakama koje se nalaze na površini biljke. U porodici Lamiaceae smještene su na površini lišća i stabljika. Stanice epiderme izlučuju eterično ulje na površinu biljke kroz citoplazmu i staničnu stijenku (Buckle, 2015). Žljezdaste dlake ružmarina raspoređene su na gornjoj i donjoj površini listića. Ovisno o smještaju žljezdastih dlaka,

ružmarin sadrži tri vrste eteričnog ulja: ulja bogata bornil acetatom nalaze se na gornjoj površini listića, ulja bogata kamforom nalaze se na donjoj površini listića, dok se ulja bogata bornil acetatom i kamforom nalaze na površinskom dijelom stabljike (Sagawa i sur., 2013).

Eterično ulje ružmarina ima primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te kao zamjena za osušene listiće ružmarina u svrhu dodatka arome prehrambenim proizvodima. Eterično ulje ružmarina tradicionalno se dobiva vodenom destilacijom po Clavengeru suhog ili svježeg biljnog materijala (Celiktaş i sur., 2007; Moreno i sur., 2009). Posljednjih godina dolazi do razvoja novih tehnika izolacija eteričnog ulja, a najčešće korištene tehnike su ekstrakcija mikrovalovima bez upotrebe otapala (Bayramoglu i sur., 2008), ekstrakcija pomoću superkritičnih otapala (Ozel i sur., 2003) te ultrazvučna ekstrakcija (Tekin i sur., 2015). Ulje se ekstrahira iz cvjetnih vrhova, stabljika i listića (Özcan i Chalcat, 2008). Prinos eteričnog ulja ružmarina iznosi između 0,5 % do 2,8 % (Lakušić i sur., 2012). Eterično ulje ružmarina sadrži 1,8-cineol, alfa-pinen, beta-pinen, kamfor, linalool, limonen, borneol, mircen, terpineol i kariofilen (Özcan i Chalcat, 2008). Alfa-pinen, 1,8-cineol, kamfor i borneol obično su glavni sastojci ulja ružmarina. Smatra se da su ulja smanjene količine alfa-pinena i kamfora i povećane količine 1,8-cineola i borneola bolje kvalitete (Kokkini i sur., 2003).

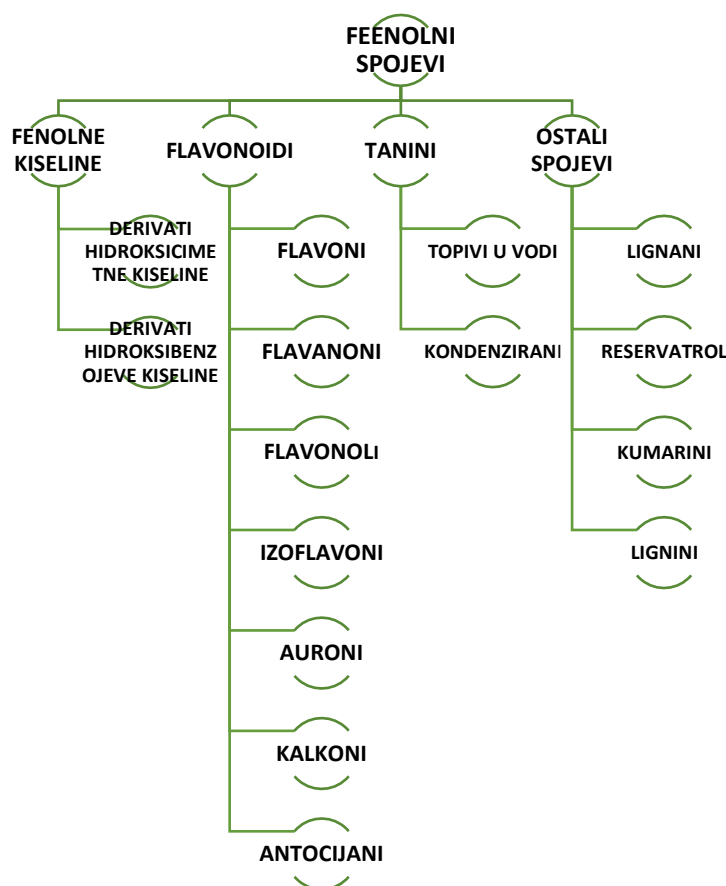
Eterična ulja mogu se podijeliti u dvije kategorije. Eterična ulja kod kojih je u većinskom udjelu zastupljen 1,8- cineol; eterična ulja iz Maroka, Hrvatske i Crne Gore te eterična ulja u kojima su u podjednaki udjelima zastupljeni 1,8- cineol, alfa-pinen te kamfor ili borneol; eterična ulja iz Španjolske, Francuske, Grčke (Chalcat i sur., 1993; Özcan i Chalcat 2008; Lakušić i sur., 2012).

Prema Lakušić i sur. (2012) na kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina najviše utječe geografski položaj, niže temperature tijekom zimskih mjeseci, srednja mjesečna temperatura i godišnji, odnosno mjesečni raspon temperature. Prema rezultatima istraživanja, koncentracija kamfora se povećavala u hladnijim uvjetima u odnosu na koncentraciju 1,8-cineola i obrnuto.

Zahvaljujući svom kemijskom sastavu eterično ulje ružmarina pokazuje jaka antimikrobna (Moreno i sur., 2009; Özcan i Chalcat 2008; Oluwatuyi i sur., 2004) i antioksidacijska svojstva (Pérez- Fons i sur., 2010; Bozin i sur., 2007).

2.3. FENOLNI SPOJEVI

Biljni fenolni spojevi su fitokemikalije, zastupljene u svim vrstama biljaka (Dai i Mumper, 2010). U raznim biljnim vrstama identificirano je više od 8000 različitih fenolnih spojeva (Pandey i Rizvi, 2009). U fenolne spojeve ubrajaju se jednostavni fenoli, benzojeve i cimetne kiseline, kumarini, tanini, lignini, lignani, flavonoidi i stilbeni (Khoddami i sur., 2013; Dai i Mumper, 2010).



Slika 1. Podjela fenolnih spojeva (Gharaati Jahromi, 2019)

Fenolni spojevi su spojevi različitih struktura (Katalinić i sur., 2012). Sastoje od jednog ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010), mogu se raspodijeliti u različite skupine ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže te na temelju strukturnih elemenata kojima se fenolni prsteni povezuju jedan s drugim (Pandey i Rizvi, 2009).

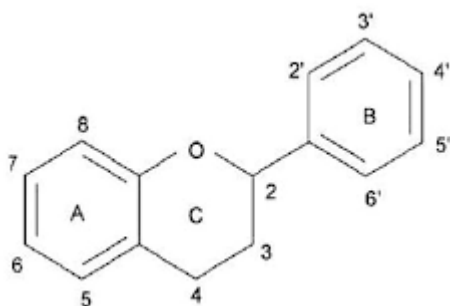
Fenolni spojevi u biljkama nastaju iz međuprodukta fenilalanina ili bliskog prekursora, šikiminske kiseline. Primarno se pojavljuju u konjugiranim oblicima, s jednim ili više ostataka šećera vezanih s hidroksilnim skupinama, iako postoje strukture gdje su šećeri (polisaharid ili

monosaharid) izravno vezani s aromatskim ugljikovodikom (Pandey i Rizvi, 2009). Fenolni spojevi najzastupljeniji u biljnim vrstama su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini te u nešto manjem udjelu stilbeni i lignani (Dai i Mumper, 2010). Većina fenolnih spojeva nalazi se s polisaharidima stanične stijenke poput celuloze, hemiceluloze i pektina s kojima su povezani hidrofobnim interakcijama i vodikovim vezama (Nadar i sur., 2018). Primjeri toga su strukturni polifenolni spojevi lignin i suberin. Fenolne spojeve biljke koriste za obranu od ultraljubičastog zračenja, parazita ili grabežljivaca (Dai i Mumper, 2010).

2.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih spojeva, široko rasprostranjena u biljnim tkivima, a često su uz karotenoide odgovorni za njihovu plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju (Khoddami i sur., 2013). Identificirano je više od 4000 vrsta flavonoida (Suwal i Marciniak, 2019).

U osnovi, struktura flavonoida sastoji se od 15 ugljikovih atoma raspoređena u dva aromatska prstena A i B, povezanih heterocikličkim piranskim prstenom C (Ajila i sur., 2010). Flavonoidi imaju C6-C3-C6 opću strukturnu okosnicu u kojoj su dvije C6 jedinice (prsten A i prsten B) fenolne strukture. Flavonoidi su podijeljeni u šest podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijanini, ovisno o oksidacijskom stanju središnjeg prstena - C. Njihova strukturna varijacija u svakoj podskupini dijelom je posljedica stupnja i obrasca hidroksilacija, metoksilacija, prenilacija ili glikozilacija (Dai i Mumper, 2010).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Ioannou i Ghoul, 2012)

Flavonoidi su kovalentno povezani glikozidnom vezom sa šećernim ostacima kroz OH skupinu (O-glikozidi) ili preko ugljik-ugljik veze (C-glikozidi) (Nadar i sur., 2018).

2.3.2. Flavonoli

Flavonoli su najzastupljeniji flavonoidi, a glavni predstavnici kvercetin i kampferol, prisutni su u glikoziliranim oblicima. Pridružena skupina šećera vrlo je često glukoza ili ramnoza, ali mogu biti uključeni i drugi šećeri poput galaktoze, arabinoze, ksiloze ili glukuronske kiseline. Flavonoli su koncentrirani u pokožici i lišću, jer se njihova biosinteza odvija uz prisutnost svjetlosti (Manach i sur., 2004).

2.3.3. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su polifenolni spojevi koji se dalje mogu podijeliti u dvije glavne vrste, derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline na temelju okosnica C1-C6 i C3-C6 (Tsao, 2010).

Derivati hidroksicimetine kiseline uključuju ferulinsku, kafeinsku, kumarinsku i sinapinsku kiselinu, dok derivati hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu, vanilinsku, siringičnu i protokatehničnu kiselinu (Khoddami i sur., 2013).

Fenolne kiseline u biljkama povezane su s različitim funkcijama, kao što su unos hranjivih tvari, sinteza proteina, regulacija aktivnosti enzima, fotosinteza i sinteza strukturnih komponenti (Ajila i sur., 2010).

Kafeinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u raznim vrstama voća i povrća, a najčešće je esterificirana s kvininskom kiselinom u klorogenskoj kiselini koja je glavni fenolni spoj u kavi (Dai i Mumper, 2010).

2.3.4. Fenolni spojevi ružmarina

Ružmarin je bogat izvor fenolnih spojeva koji imaju izrazito visok antioksidacijski (Özcan., 2003; Özcan i Chalchat, 2008) i antimikrobni (Nieto i sur., 2018; Oluwatuyi i sur., 2004) učinak. Sadrži diterpenoide, triterpenoide, flavonoide i fenolne kiseline (Kompelly i sur., 2019). Najviše proučavani kemijski spojevi ružmarina su kafeinska kiselina i derivati, te ružmarinska kiselina. Najzastupljeniji fenolni spojevi u ekstraktu ružmarina su fenolne kiseline i flavonoidi (Mena i sur., 2016). Osim snažnog antioksidativnog djelovanja, ekstraktima s povišenim udjelom fenolnih kiselina pripisuje se i antimikrobno i antikancerogeno djelovanje (Moreno i sur., 2009).

Fenolni spojevi su izrazito jaki antioksidansi te posjeduju jaka antivirusna, antimikrobna, antikancerogena i protuupalna svojstva (Rajbhar i sur., 2014), a njihova je uloga široko

proučavana u prevenciji raznih bolesti poput raka, upalnih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Suwal i Marciniak, 2019).

Antioksidativno djelovanje ekstrakta ružmarina uglavnom je posljedica diterpena i fenolnih kiselina poput ružmarinske kiseline, karnosoične kiseline i njenih derivata, karnosola, rosmadiala, rosmanola, izomera rosmanola i metil karnosata (Pérez-Fons i sur., 2010). U prehrambenoj industriji ružmarin se koristi kao začim, a u novije vrijeme i kao konzervans (Hassani i sur., 2016).

2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Razvoj učinkovitog postupka za ekstrakciju, pravilnu analizu i karakterizaciju fenolnih spojeva iz različitih izvora je izazovan zadatak zbog strukturne raznolikosti fenolnih spojeva i njihove interakcije s drugim staničnim komponentama (Ajila i sur., 2010). Metode ekstrakcije dizajnirane su na temelju strukturne raznolikosti i fizikalno-kemijskih karakteristika fenolnih spojeva (Ajila i sur., 2010)

Osim klasičnih metoda ekstrakcija u novije vrijeme sve je veći naglasak na nekonvencionalnim metodama ekstrakcije: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija pomoću superkritičnih otapala, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija pomoću visokog hidrostatskog tlaka (Aires, 2017; Ajila i sur. 2010; Suwal i Marcinac, 2019).

Novije tehnike ekstrakcije mogu biti zanimljiv izbor kao zamjena za klasične metode ekstrakcije, nudeći nekoliko prednosti poput kraćeg vremena ekstrakcije, smanjene količine utrošenog otapala, smanjene količine krajnjih toksičnih ostataka te većeg prinosa ekstrakcije (Aires, 2017).

2.4.1. Učinkovitost ekstrakcije

Nekoliko čimbenika utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnih materijala, poput prirode uzorka, kemijske strukture fenolnih spojeva, primijenjene metode ekstrakcije, korištenog sredstva za ekstrakciju, uvjeta skladištenja, veličine čestica uzorka, kao i prisutnosti interferirajućih čestica te posljedičnih kemijskih i biokemijskih reakcija (Naczki i Shahidi, 2004). Topljivost fenolnih spojeva ovisi primarno o kemijskoj strukturi, ali također i o polarosti otapala, stupnju polimerizacije, kao i interakciji fenolnih spojeva s ostalim komponentama te stvaranju netopivih kompleksa (Naczki i Shahidi, 2004). Da bi se poboljšao

postupak ekstrakcije, uzorak bi trebao biti usitnjen kako bi se povećala dodirna površina između uzorka i otapala te kako bi se smanjilo vrijeme ekstrakcije, jer teoretski vrijeme ekstrakcije varira obrnuto s kvadratom karakteristične dimenzije krute čestice (Ignat i sur., 2013).

2.4.2. Utjecaj otapala na ekstrakciju

Ekstrakcija otapalima najčešće se koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka zbog jednostavnosti metode, visoke učinkovitosti i široke mogućnosti primjene (Rajbhar i sur., 2014). Fenolni ekstrakti biljaka uključuju različite grupe fenolnih spojeva selektivno topivih u otapalima (Rajbhar i sur., 2014) te stoga na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva utječe nekoliko parametara, uključujući vrijeme ekstrakcije, temperatura, omjer otapalo-uzorak, broj ponovljenih ekstrakcija uzorka kao i vrsta otapala. Nadalje, optimalna ekstrakcija fenolnih spojeva razlikuje se ovisno o uzorku, te ovisi o vrsti biljke i njezinim aktivnim spojevima (Khoddami i sur., 2013).

Najčešće korištena otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva su metanol, aceton i etanol te njihove vodene otopine (Durling i sur., 2007; Dent i sur., 2013). Polarnost otapala utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Aires, 2017). Dodatak vode u otapalo povećava polarnost otapala, te su primjenom vodenih otopina ekstrahirani veći udjeli fenolnih spojeva u odnosu na primjenu čistog organskog otapala (Dent i sur., 2013). Vodu ubrajamo u skupinu „zelenih“ otapala jer je neškodljiva za zdravlje i okoliš. Karakterizira ju visoki toplinski kapacitet, visoka dielektrična konstanta te sposobnost stvaranja vodikovih veza (Kari i Riekola, 2017; Chanda i Fokin 2009). Voda je odlično otapalo za organske spojeve koje sadrže polarne skupine poput alkohola i karboksilnih kiselina (Breslow, 2010). Ionski i polarni spojevi lako se otapaju u vodi pri sobnoj temperaturi, dok pri povišenim temperaturama dolazi do otapanja manje polarnih komponenti. Pri višim temperaturama dolazi do smanjenja vrijednosti dielektrične konstante, polaribilnosti i sposobnosti stvaranja vodikovih veza što uzrokuje smanjenje viskoznosti i površinske napetosti vode te posljedično i smanjenja polarnosti vode (Kari i Riekola, 2017).

Osim odabira optimalnog otapala za ekstrakciju, postoje još dva važna parametra koja utječu na prinose fenolnih spojeva iz biljaka: trajanje i temperatura ekstrakcije. Povećanjem vremena i temperature proporcionalno se povećava topljivost analita; međutim, pri takvim uvjetima, biljni fenoli uglavnom bivaju razgrađeni ili su podvrgnuti nepoželjnim reakcijama kao što je enzimska oksidacija pri produženim vremenima ekstrakcije i visokim temperaturama. (Khoddami i sur., 2013).

Moreno i sur. (2009) proveli su istraživanje antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava ekstrakta ružmarina. Aktivnost je određivana u ekstraktima dobivenim vodom, acetonom i metanolom te su svi ekstrakti ružmarina pokazali visoku antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost. U metanolnim i acetonskim ekstraktima određeni su značajni udjeli karnozoične kiseline (21,5-30 %), karnosola (11-16 %) i ružmarinske kiseline (4-5 %). U vodenom ekstraktu je određena jedino ružmarinska kiselina (15 %), dok udio karnozoične kiseline i karnosola nije zabilježen.

Zaključno, treba spomenuti da je neovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije izbor otapala važan korak temeljen na nekoliko svojstava (Ignat i sur., 2013):

- a) topljivost specifičnih spojeva u otapalu.
- b) mogućnost ponovnog korištenja otapala
- c) napetost i viskoznost- otapalo mora prodrijeti kroz pore i kapilare
- d) u idealnom slučaju otapalo treba imati dobru kemijsku i toplinsku stabilnost, treba biti neotrovno, nezapaljivo, za okoliš neškodljivo i jeftino
- e) otapalo mora imati visoku selektivnost za spojeve koje je potrebno ekstrahirati

2.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija temelji se na fenomenu akustičke kavitacije, odnosno formiranju, rastu i kolapsu mikro mjehurića unutar tekuće faze (Chemat i sur., 2008). Ultrazvučna ekstrakcija uključuje upotrebu ultrazvuka s frekvencijama u rasponu od 20 do 2000 kHz, što povećava propusnost staničnih stijenki i dovodi do pojave kavitacije (Aires, 2017).

Ultrazvučnom ekstrakcijom povećava se učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz različitih biljnih izvora, vrijeme ekstrakcije se značajno skraćuje, a pogodna je i za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Ajila i sur., 2010). Također se smanjuje i potrošnja otapala, organska otapala se mogu zamijeniti GRAS otapalima, a moguća je i primjena vode kao ekstrakcijskog otapala (Ajila i sur., 2010).

Za primjenu ultrazvučnih valova u svrhu ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljaka primjenjuju se ultrazvučne sonde i ultrazvučne kupelji. Osim svojstvenih parametara ultrazvučnih uređaja (kao što su snaga (amplituda), frekvencija i valna duljina), za postizanje optimalnih uvjeta ekstrakcije potrebno je optimizirati snagu ultrazvuka (Gharaati Jahromi, 2019). Uslijed ultrazvučno potpomognute ekstrakcije dolazi do povećanja temperature čime se povećava

topljivost, difuznost i tlak koji omogućavaju valovima da prodru u stanicu i prenose stanične sadržaje u organska otapala (Rajbhar i sur., 2014).

Mehanizam ekstrakcije uključuje dvije vrste fizičkih fenomena: difuziju kroz stanične stijenke i ispiranje sadržaja stanice nakon probijanja stanične stijenke čime se olakšava otpuštanje unutarstaničnog sadržaja (Rajbhar i sur., 2014). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom omogućuje bolju i bržu ekstrakciju s manjim stupnjem degradacije fenolnih spojeva u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije (Dent i sur., 2015; Aires, 2017).

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti da ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pokazuje prednosti pred klasičnim metodama ekstrakcija: niža cijena procesa zbog manje iskorištene količine otapala i manje vremena potrebnog za izvođenje postupka ekstrakcije, ali treba uračunati cijenu nabave ultrazvučnog uređaja kao i potrošnju električne energije. Također, niže temperature i kraće vrijeme ekstrakcije povoljno utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva doprinoseći i očuvanju termolabilnih i nestabilnih spojeva (Aires, 2017).

2.4.4. Ekstrakcija potpomognuta enzimima

Ekstrakcija potpomognuta enzimima jednostavna je i brza metoda ekstrakcije jer povećava učinak razgradnje stanične stijenke biljke što omogućava bolju ekstrakciju fenolnih spojeva (Ajila i sur., 2010). Ekstrakcija potpomognuta enzimima ovisi o karakterističnom svojstvu enzima da provode reakcije zahvaljujući specifičnosti i selektivnosti aktivnog mjesta te njihovoj sposobnosti provođenja reakcija u blagim uvjetima uz zadržavanje svojstava bioaktivnih spojeva (Puri i sur., 2012).

Enzimi su idealni katalizatori jer potpomažu u ekstrakciji, modifikaciji ili sintezi složenih bioaktivnih spojeva prirodnog podrijetla (Puri i sur., 2012). Osnovno načelo ekstrakcije je uklanjanje biljne stijenke hidroliziranjem pomoću enzima kao katalizatora u optimalnim uvjetima (Nadar i sur., 2018). Uz to, budući da se ova ekstrakcija provodi u uvjetima kontrolirane temperature, vrlo je korisna za ekstrakciju termolabilnih molekula poput, pigmentata, ulja i sl. (Nadar i sur., 2018).

Zajednički učinci više enzima mogu rezultirati povećanom razgradnjom stanične stijenke, što rezultira većim prinosima ekstrakcije (Nadar i sur., 2018). Enzimi koji se najčešće koriste za ekstrakciju ulja jesu celulaza, α -amilaza, pektinaza, hemicelulaza i proteaza (Puri i sur., 2012; Nadar i sur., 2018). Ovi enzimi hidroliziraju sastojke stanične stijenke, povećavajući tako

propusnost stanične stijenke, što rezultira većim prinosima ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Puri i sur., 2012). Najnovija istraživanja ekstrakcije potpomognute enzimima dokazuju kraće vrijeme provođenja ekstrakcije, smanjenu potrošnju otapala i manji utrošak energije u usporedbi s neenzimskim metodama (Puri i sur., 2012).

2.4.5. Vodena destilacija po Clavengeru

Eterična ulja se najčešće izoliraju destilacijom (Sadgrove i Johnes, 2015), postupkom zagrijavanja biljnog materijala s vodom ili drugim otapalom pri čemu dolazi do ukapljivanja hlapivih komponenti u kondenzatoru (Rassem i sur., 2016).

Tijekom vodene destilacije nastaje mješavina plinova: vodene pare i pare uljne faze koja odlazi u kondenzator gdje dolazi do hlađenja na temperaturi ispod 30 °C gdje se kondenzira u dvije odvojene (nemiješajuće) tekuće faze; jedna je faza hidrolat koji predstavlja vodenu fazu nastalu kondenziranjem vodene pare i s njom prisutnih tvari; a druga je eterično ulje, pri čemu se faza eteričnog ulja obično zadržava iznad hidrolata (Sadgrove i Johnes, 2015).

Kako bi se smanjio gubitak eteričnog ulja zbog otapanja u hidrolatu, koristi se uređaj tipa Clavenger koji hidrolat vraća u aparaturu tijekom destilacije. Time se ujedno smanjuje i ukupni volumen vode potreban za destilaciju (Sadgrove i Johnes, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

- Za izradu diplomskog rada korišteni su listići ružmarina (*S. rosmarinus* syn. *R. officinalis* L), prikupljeni u kolovozu 2018. godine, na području Dalmacije. Grančice ružmarina osušene su na zraku i skladištene na suhom i tamnom mjestu, a listovi su neposredno prije analize usitnjeni pomoću električnog mlinca (GT 1108, Tefal, Bratislava, Slovačka).

3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI

Enzimi korišteni za ekstrakciju

- enzim pektinaza (iz *Aspergillus niger*) (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- enzim ksilanaza (iz *Theryomyces sp.*) (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- enzim celulaza (iz *Aspergillus niger*) (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)

Kemikalije za postupak ekstrakcije

- etanol (96 %, v/v)
- metanol (100 %, v/v)
- deionizirana voda

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje

- Folin- Ciocalteu regens
- standardna otopina galne kiseline ($\gamma=5 \text{ g L}^{-1}$)
- standardna otopina kvercetina ($\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$)
- standardna otopina kafeinske kiseline ($\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v)
- deionizirana voda
- pročišćena voda
- etanol (96 %, v/v)
- metanol (100 %, v/v)
- koncentrirana klorovodična kiselina (37 %, v/v)

Reagensi za određivanje ukupnih fenola

- **Folin-Ciocalteu regens (F.C. reagens)**

Priprema: F.C. reagens razrijedi se deioniziranom vodom u omjeru 1:2

- **zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v)**

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode u odmjernoj tikvici volumena 1 L. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata te se odmjerna tikvica nadopuni do oznake. Zasićena otopina natrijeva karbonata filtrira se nakon 24 sata.

- **standardna otopina galne kiseline** ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$)

Priprema: na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001 \text{ g}$) odvaži se 250 mg galne kiseline u suhu laboratorijsku čašu, te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola, prelije u odmjernu tikvicu i otopi u volumenu 50 mL. Tikvica se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Reagensi za određivanje flavonoida

- **etanol** (96 %, v/ v)
- **metanol** (100 %, v/ v)
- **aluminijev klorid** (10 %, w/ v)

Priprema: na analitičkoj vagi odvaži se 1g ($\pm 0,0001 \text{ g}$) aluminij-klorid-heksahidrata te se u digestoru otopi s 5 mL destilirane vode i prelije u odmjernu tikvicu 10 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- **kalijev acetat** ($c = 1 \text{ M}$)

Priprema: u suhu laboratorijsku čašu odvaži se 9,845 g kalijevog acetata te se otopi u 10 mL destilirane vode. Sadržaj se prelije u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- **standardna otopina kvercetina** ($\gamma = 100 \text{ mg L}^{-1}$)

Priprema: na analitičkoj vagi odvaži se 5 mg ($\pm 0,0001 \text{ g}$) standarda kvercetina te se uz 5 mL 100 %-tnog metanola, prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Kvercetin se otopi u volumenu 50 mL te se nadopuni metanolom do oznake.

Reagensi za određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

- **koncentrirana klorovodična kiselina** (37 %, v/ v)
- **etanol** (96 %, v/ v)
- **otopina klorovodične kiseline** ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$)

Priprema: 227 μL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetira se u odmjernu tikvicu 100 mL te se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- **otopina klorovodične kiseline** ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)

Priprema: 454 μL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetira se u odmjernu tikvicu 100 mL, tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- **standardna otopina kafeinske kiseline** ($\gamma = 100 \text{ mg L}^{-1}$)

Priprema: na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001 \text{ g}$) odvaži se 5 mg standarda kafeinske kiseline te se pomoću 80 %-tnog metanola prelije u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Standard

kafeinske kiseline otopi se u volumenu 50 mL, nakon toga tikvica se do oznake nadopuni 80 %-tnim metanolom.

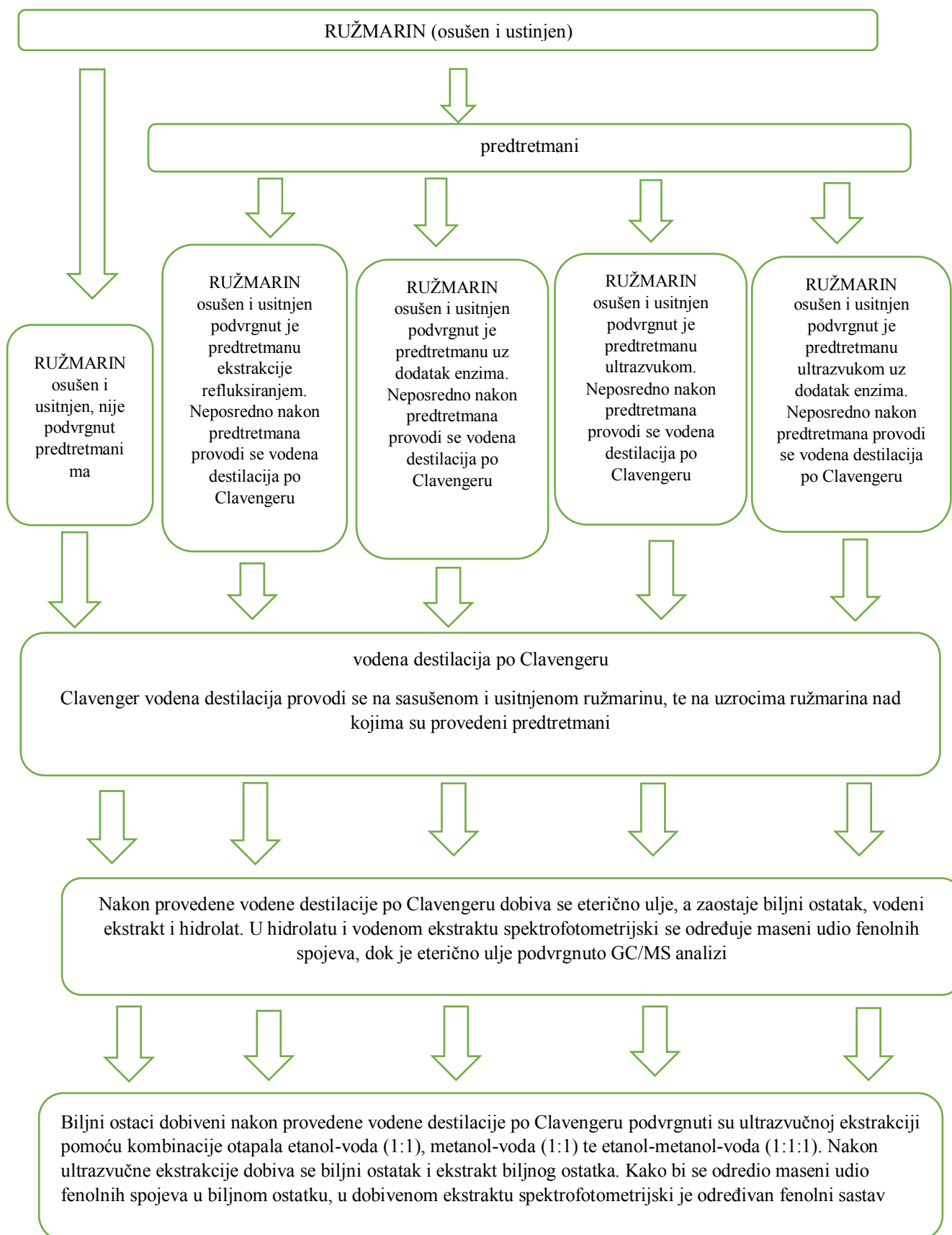
- **standardna otopina kvercetina** ($\rho=100 \text{ mg L}^{-1}$)

Priprema: na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001 \text{ g}$) odvaži se 5 mg standarda kvercetina te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola prelije u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Standard kvercetina otopi se u metanolu, nakon toga tikvica se do oznake nadopuni 100%-tnim metanolom.

3.3. APARATURA I PRIBOR

- spektrofotometar (Lambda 1, Perkin-Elmer, Waltham, SAD)
- analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan)
- vorteks miješalica (VTX, Labo Moderne, Pariz, Francuska)
- ultrazvučna sonda - maksimalna izlazna snaga 150 W (UP200Ht, Hielscher, Njemačka)
- magnetska miješalica s grijanjem (MS-H-S, DLAB Scientific, Peking, Kina)
- Clavenger aparatura
- električni mlinac (GT 1108, Tefal, Bratislava, Slovačka)
- tehnička vaga (MK-500C, Chyo, Kyoto, Japan)
- termometar
- mikropipete volumena 100 μL i 1000 μL
- staklene kivete
- filter papir (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany)
- graduirane pipete volumena: 1 mL, 2 mL, 5 mL
- automatske pipete volumena 2 – 1000 μL (KemoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- odmjerne tikvice volumena: 25mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- laboratorijske čaše volumena: 100 mL, 250 mL i 500 mL
- staklene epruvete
- stalak za epruvete
- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka volumena: 15 mL i 50 mL
- stakleni lijevci
- plastična ladica za vaganje

3.4. METODE RADA



Slika 3. Shematski prikaz postupka provođenja eksperimentalnog dijela

3.4.1. Izolacija eteričnog ulja ružmarina

Listići ružmarina mehanički su usitnjeni neposredno prije provođenja analiza. Usitnjeni listići ružmarina podvrgnuti su predtretmanima (ekstrakcija refluksiranjem s ili bez dodatka enzima, te ultrazvučna ekstrakcija s ili bez dodatka enzima). Neposredno nakon provođenja predtretmana provedena je vodena destilacija po Clavengeru, vodena destilacija po Clavengeru provedena je i na uzorku ružmarina koji nije bio prethodno tretiran.

Vodena destilacija po Clavengeru provedena je u svrhu dobivanja eteričnog ulja ružmarina, te su dobiveni i nusprodukti: hidrolat, vodeni ekstrakt i biljni ostatak. Eterično ulje ružmarina je odvojeno za daljnje GC/MS analize i ispitivanje inhibicijske aktivnosti prema patogenim oomicetama. Vodeni ekstrakt zaostao s biljnim ostatkom, u tikvici s okruglim dnom, nakon provedene vodene destilacije hladi se na sobnu temperaturu i filtrira preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany). U vodenom ekstraktu i hidrolatu su određeni maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva, a biljni ostatak je korišten za daljnja istraživanja gdje je ispitan utjecaj polarosti otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog ostatka primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

Biljni ostatak dobiven nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru podvrgnut je postupku ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz kombinaciju otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) te etanol-metanol-voda (1:1:1) kako bi se odredio maseni udio fenolnih spojeva u biljnom ostatku zaostalih nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru te utjecaj primjene predtretmana (ekstrakcije refluksiranjem s ili bez dodatka enzima i ultrazvučne ekstrakcije s ili bez dodatka enzima uz vodu kao otapalo). U dobivenim ekstraktima biljnih ostataka ružmarina provedeno je spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina), a dio ekstrakta je odvojen za daljnju HPLC analizu.

Predtretmani koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clavengeru:

- a)** Klasična ekstrakcija refluksiranjem listića ružmarina uz vodu kao otapalo pri temperaturi 40 °C kroz 60 minuta (3.4.1.1.)
- b)** Ekstrakcija potpomognuta enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza), $\gamma=0,02 \text{ g L}^{-1}$ listića ružmarina primjenom vode kao otapala na temperaturi 40 °C kroz 60 minuta (3.4.1.2.)

- c) Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom primjenom direktno uronjene ultrazvučne sonde u biljni uzorak listića ružmarina primjenom vode kao otapala pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10$ minuta) (3.4.1.3. Faza 2)
- d) Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom primjenom direktno uronjene ultrazvučne sonde u biljni uzorak listića ružmarina uz dodatak enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza), $\gamma=0,02$ g L⁻¹ primjenom vode kao otapala pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10$ minuta) (3.4.1.3. Faza 3)

3.4.1.1. Klasična ekstrakcija refluksiranjem

20 g usitnjenih listića ružmarina odvaži se na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001$ g) u Erlenmayerovu tikvicu te se doda 250 mL pročišćene vode. Ekstrakcija refluksiranjem provodi se pri temperaturi 40 °C kroz 60 minuta. Po završetku ekstrakcije sadržaj tikvice se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja.

3.4.1.2. Klasična ekstrakcija refluksiranjem potpomognuta enzimima

Ekstrakcija potpomognuta enzimima (uz dodatak enzima: pektinaza, celulaza, ksilanaza) provedena je neposredno prije provođenja vodene destilacije po Clavengeru. U Erlenmayerovu tikvicu odvaži se 5 mg enzima u 250 mL pročišćene vode ($\gamma=0,02$ g L⁻¹) i 20 g usitnjenih listića ružmarina. Ekstrakcija potpomognuta enzimima se provodi pri temperaturi 40 °C kroz 60 minuta. Po završetku ekstrakcije sadržaj tikvice se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja.

3.4.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Faza 1: određivanje optimalnih parametara

Određivanje optimalnih parametara za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom provodi se pomoću ultrazvučne sonde, uronjene u uzorak, promjera 14 mm, pri amplitudi 30 %, 50 % i 100 % kroz 5, 10 i 15 minuta, dok je ciklus konstantan - 1, uz vodu kao otapalo. Maksimalna izlazna snaga ultrazvuka iznosila je 150 W, dok je primjenom konstantnog ciklusa omogućeno neprekidno tretiranje uzorka. 1 g usitnjenih listića ružmarina odvaži se na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001$ g) u suhu laboratorijsku čašu te se doda 25 mL pročišćene vode. Nakon provedene ekstrakcije, smjesa se profiltrira se preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125

mm/388, Filtrak, Germany) u odmjernu tikvicu od 25 mL. Nakon filtracije i hlađenja odmjerna tikvica se nadopuni do oznake pročišćenom vodom. Optimalni parametri ekstrakcije za provedbu predtretmana ($A=30\%$, $t=10$ minuta) određeni su spektrofotometrijskim određivanjem masenog udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima izraženi kao maseni udio w (mg GAE/g).

Faza 2: Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom listića ružmarina provedena je pri optimalnim parametrima ($A=30\%$, $t=10$ min) neposredno prije provođenja vodene destilacije po Clavengeru uz vodu kao otapalo tako da se na analitičkoj vagi odvaži 20 g usitnjenih listića ružmarina ($\pm 0,0001$ g) u suhu laboratorijsku čašu te se doda 250 mL pročišćene vode. Po završetku ekstrakcije sadržaj čaše se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja, kao nusprodukti dobiveni su hidrolat, vodeni ekstrakt te biljni ostatak nad kojima su provedene daljnje analize.

Faza 3: Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima

Ekstrakcija se provodi pri prethodno utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10$ min) uz dodatak enzima pektinaze, celulaze ili ksilanaze. Ekstrakcija se provodi tako da je odvagano 5 mg ($\pm 0,0001$ g) enzima u 250 mL pročišćene vode, ($\gamma=0,02$ g L⁻¹) i dodano je 20 g usitnjenih listića ružmarina te je provedena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10$ min). Po završetku ekstrakcije sadržaj čaše se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja, kao nusprodukti dobiveni su hidrolat, vodeni ekstrakt te biljni ostatak nad kojima su provedene daljnje analize.

3.4.1.4. Clavenger vodena destilacija

Uzorak ružmarina koji je prethodno podvrgnut predtretmanu ili 20 g listića ružmarina (koji nisu podvrgnuti predtretmanu) prenese se u okruglu laboratorijsku tikvicu volumena 500 mL te se doda 250 mL pročišćene vode. Vodena destilacija provodi se 2 sata. Nakon provedene vodene destilacije, odvoji se eterično ulje i hidrolat, biljni materijal profiltrira se preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany), a dobiveni vodeni ekstrakt spremi se za daljnje analize. U vodenom ekstraktu i hidrolatu provodi se spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina). Biljni ostatak dobiven nakon vodene destilacije osuši se na zraku te

se koristi u daljnjoj analizi ultrazvučne ekstrakcije pomoću alkoholnih otapala u svrhu određivanja fenolnog sastava zaostalog biljnog ostatka.

3.4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom biljnog ostatka listića ružmarina nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru

Biljni ostatak dobiven nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru podvrgnut je postupku ultrazvučne ekstrakcije uz kombinaciju otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) te etanol-metanol-voda (1:1:1). Za svako otapalo provodi se optimizacija uvjeta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u vremenu 5, 10 ili 15 minuta, pri amplitudi 30 %, 50 % ili 100 %.

Određivanje optimalnih parametara za ultrazvučnu ekstrakciju biljnog ostatka ružmarina provedeno je postupkom opisanim u poglavlju 3.4.1.3, *Faza 1*, ali je pročišćena voda zamijenjena odabranim otapalom: etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) ili etanol-metanol-voda (1:1:1).

Optimalni parametri ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10$ minuta) određeni su spektrofotometrijskim određivanjem masenog udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima izraženi kao maseni udio w (mg GAE/g).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija biljnog ostatka ružmarina provodi se pri optimalnim uvjetima ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom ultrazvučne sonde promjera 14 mm pri amplitudi od 30 % kroz 10 minuta uz otapala: etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) te etanol-metanol-voda (1:1:1). 1 g biljnog ostatka ružmarina odvaži se na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001$ g) u suhu laboratorijsku čašu te se doda 25 mL odabranog otapala. Nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije, biljni materijal profiltrira se preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany) u odmjernu tikvicu 25 mL. Nakon filtracije, i hlađenja odmjerna tikvica nadopuni se otapalom korištenim za ekstrakciju do oznake. Ekstrakt se prenese u plastičnu, prethodno označenu, Falcon epruvetu volumena 25 mL. U ekstraktima se provodi spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina), a dio ekstrakta se čuva na tamnom mjestu pri temperaturi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja daljnjih HPLC analiza

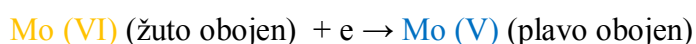
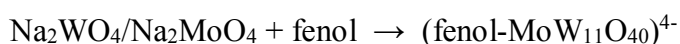
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu ružmarina

Maseni udjeli fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina) određeni su u vodenim ekstraktima ružmarina te u ekstraktima ružmarina dobivenih nakon ekstrakcije otapalima etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) te etanol-metanol-voda (1:1:1) u svrhu određivanja optimalnih parametara za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina) provedeno je i u vodenim ekstraktima ružmarina i hidrolatima nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru te ekstraktima dobivenim nakon ultrazvučne ekstrakcije uz kombinaciju otapala etanol-vode (1:1), metanol-vode (1:1) ili etanol-metanol-vode (1:1:1).

3.4.3.1. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određuju se kolorimetrijski, mjereći intenzitet nastalog plavog obojenja pri 765 nm, koje je rezultat reakcije prisutnih fenola i Folin-Ciocalteu reagensa (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koje se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u volfram oksid i molibden oksid, plave boje. Mjerenje intenziteta nastalog obojenja provodi se pomoću spektrofotometra pri valnoj dužini od 765 nm.

Tijek reakcije:



Priprema uzorka

Za potrebe određivanja ukupnih fenola uzorke je potrebno prethodno razrijediti otapalom korištenim za ekstrakciju. Za potrebe određivanja ukupnih fenola u vodenom ekstraktu nakon provedene Clavenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni 13 puta (1:12). Kod određivanja ukupnih fenola u hidrolatima uzorci nisu razrijeđeni, dok je za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije uz alkoholna otapala uzorke bilo potrebno razrijediti 4 puta (1:3).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se 125 μL uzorka (prethodno razrijeđenog), 625 μL F.C. reagensa (1:2) i 7,5 mL deionizirane vode. Nakon tri minute u epruvetu se otpipetira 1875 μL prethodno pripremljene, zasićene otopine natrijeva karbonata te se doda 2,4 mL deionizirane vode. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteks miješalici. Nakon toga uzorci se ostave stajati u mraku 2 sata. Nakon 2 sata, uzorcima se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se 125 μL uzorka zamijenjeni s deioniziranom vodom.

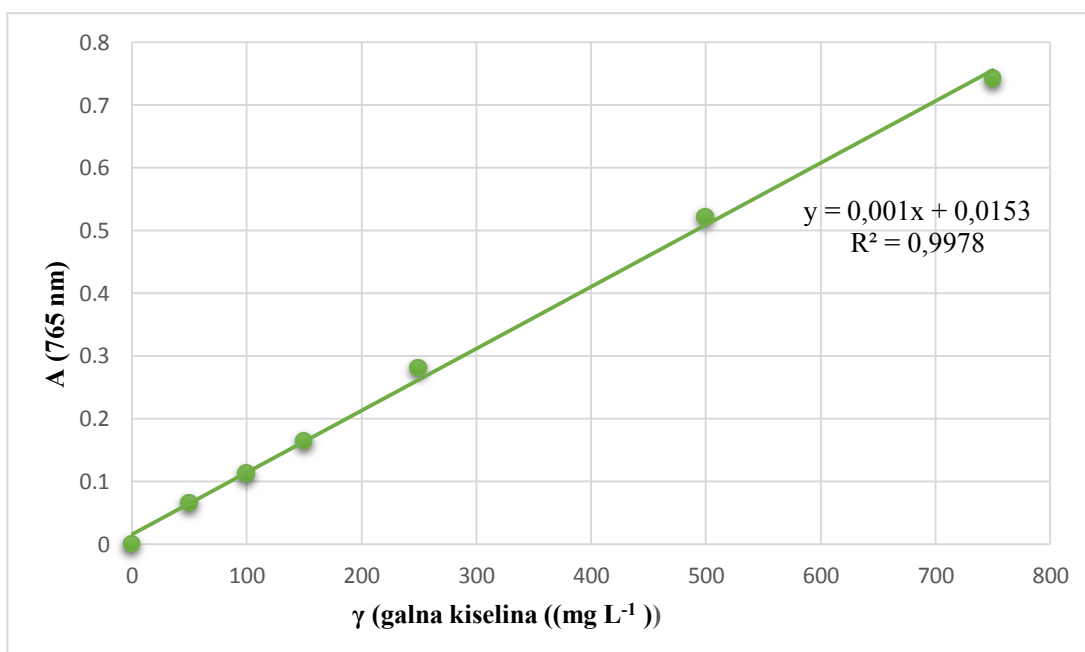
Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti standard otopine galne kiseline masene koncentracije 5 g L^{-1} . Od pripremljene standardne otopine galne kiseline priređuju se razrjeđenja standardne otopine galne kiseline koncentracija 50, 100, 150, 250, 500 i 750 mg L^{-1} . Od svakog razrjeđenja otpipetira se 125 μL standarda u staklene epruvete, 625 μL F.C. reagensa (1:2) i 7,5 mL deionizirane vode. Nakon tri minute u epruvetu se otpipetira 1875 μL prethodno pripremljene, zasićene otopine natrijeva karbonata te se doda 2,4 mL deionizirane vode. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteks miješalici. Nakon toga uzorci se ostave stajati u mraku 2 sata. Nakon 2 sata, uzorcima se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se 125 μL uzorka zamijenjeni s deioniziranom vodom.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1}) pomoću programa Microsoft Excel. Maseni udio ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline w (mg GAE g^{-1}).

Tablica 1. Masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm

γ (mg L ⁻¹)	A (765 nm)
0	0
50	0,065
100	0,112
150	0,164
250	0,281
500	0,522
750	0,742



Slika 4. Baždarni pravac standardne otopine galne kiseline

3.4.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi se određuju spektrofotometrijski, metodom temeljenoj na reakciji obojenja prisutnih flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom pri čemu dolazi do stvaranja

kompleksa žute boje. Mjerenje nastalog intenziteta obojenja provodi se pomoću spektrofotometra pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Priprema uzorka

Za potrebe određivanja ukupnih flavonoida, uzorke je potrebno prethodno razrijediti otapalom za ekstrakciju. Za potrebe određivanja ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu nakon provedene Clavenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni 13 puta (1:12). Kod određivanja ukupnih flavonoida u hidrolatima uzorci nisu razrijeđeni, dok je za određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije uz alkoholna otapala uzorke bilo potrebno razrijediti 4 puta (1:3).

Postupak određivanja ukupnih flavonoida

U staklenu epruvetu otpipetira se 0,5 mL ekstrakta (prethodno razrijeđenog), 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog prethodno pripremljenog aluminij-klorid-heksahidrata, 0,1 mL 1M kalijeva acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Reakcijska smjesa ostavi se stajati 30 minuta, nakon čega se mjerenje intenziteta nastalog obojenja pri 415 nm provodi pomoću spektrofotometra. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 0,5 mL ekstrakta u epruvetu otpipetira 0,5 mL otapala korištenog za ekstrakciju, a umjesto 0,1 mL 10 %-tnog aluminij-klorid heksahidrata otpipetira se 0,1 mL deionizirane vode.

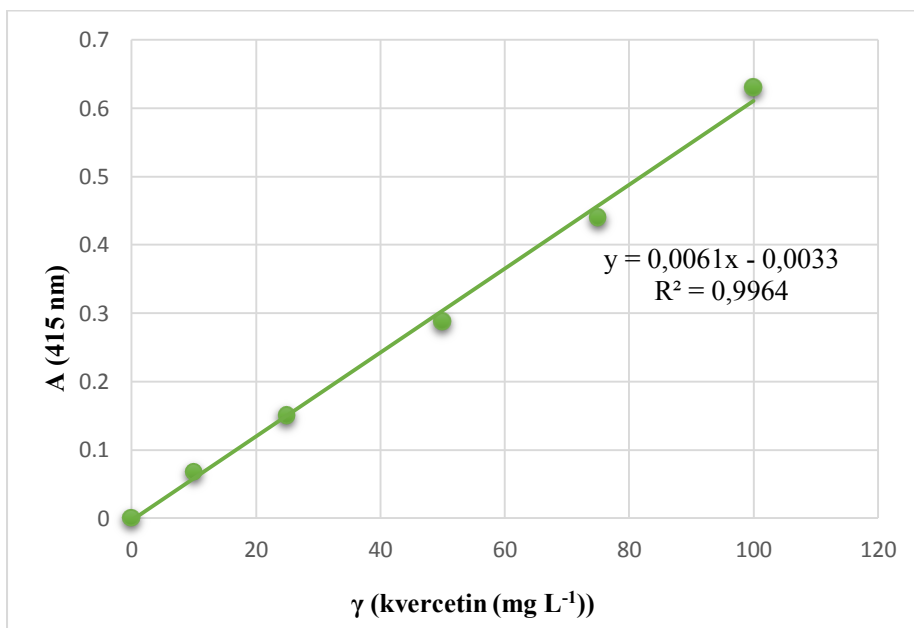
Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti standard otopine kvercetina u metanolu masene koncentracije 100 mg L⁻¹. Od pripremljene standardne otopine kvercetina priređuju se razrjeđenja standardne otopine koncentracija 10, 25, 50 i 75 i 100 mg L⁻¹. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 0,5 mL standarda u staklene epruvete, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 % aluminijevog klorida, 0,1 mL 1M kalijeva acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteks miješalici, uzorci se ostave stajati u mraku 30 minuta. Uzorcima se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 0,1 mL 10 %-tnog aluminij- klorid heksahidrata otpipetira 0,1 mL deionizirane vode.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 415 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg L⁻¹) pomoću programa Microsoft Excel. Maseni udio ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Maseni udjeli flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina w (mg QE g⁻¹).

Tablica 2. Masene koncentracije standardne otopine kvercetina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 415 nm

γ (mg L ⁻¹)	A (415 nm)
0	0
10	0,068
25	0,150
50	0,288
75	0,440
100	0,630



Slika 5. Baždarni pravac standardne otopine kvercetina

3.4.3.3 Određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 320 nm. Za određivanje ukupnih flavonola mjeri se intenzitet nastalog obojenja pri 360 nm.

Priprema uzorka

Za potrebe određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola, uzorke je potrebno prethodno razrijediti otapalom za ekstrakciju. Za potrebe određivanja hidroksicimetnih kiselina

u vodenom ekstraktu nakon provedene Clavenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni 7 puta (1:6). Kod određivanja hidrokscimetnih kiselina u hidrolatima uzorci nisu razrijeđeni, dok je za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima biljnog ostatka nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije uzorke bilo potrebno razrijediti 7 puta (1:6). Za potrebe određivanja flavonola u vodenom ekstraktu nakon provedene Clavenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni 7 puta (1:6). Kod određivanja flavonola u hidrolatima uzorci nisu razrijeđeni, dok je za određivanje flavonola u ekstraktima nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije uz alkoholna otapala uzorke bilo potrebno razrijediti 10 puta (1:9).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se 250 μL ekstrakta prethodno razrijeđen otapalom za ekstrakciju, 250 μL 1g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2g L^{-1} HCl. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto 250 μL otopine standarda otpipetira 250 μL metanola, nakon čega se mjerenje intenziteta pri valnoj duljini od 320 nm (hidrokscimetne kiseline) odnosno 360 nm (flavonoli) provodi na spektrofotometru.

Izrada baždarnog pravca

a) Hidrokscimetne kiseline

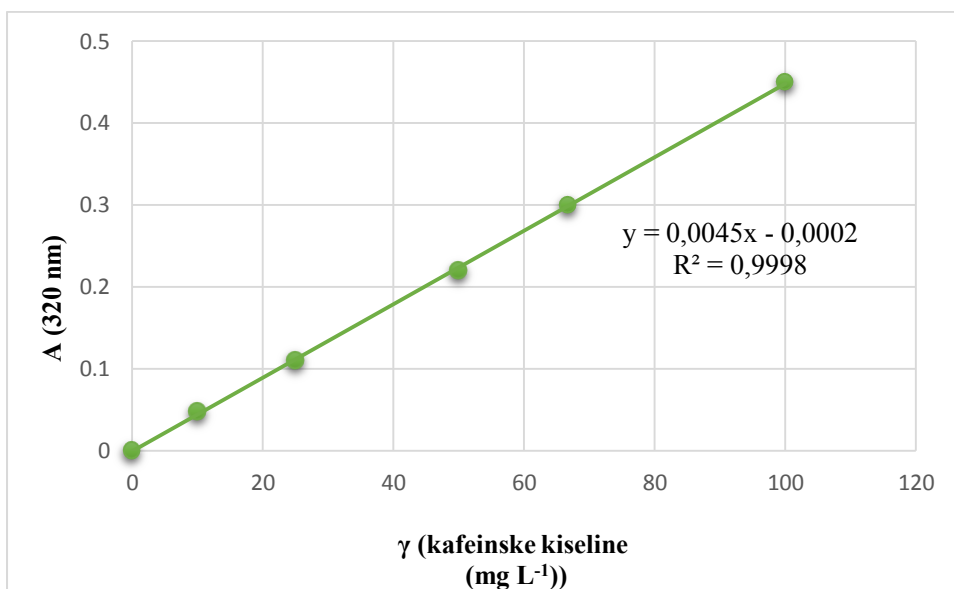
Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti standard otopine kafeinske kiseline masene koncentracije 100 mg L^{-1} . Od pripremljene standardne otopine kafeinske kiseline priređuju se razrjeđenja standardne otopine koncentracija 10, 25, 50, 66,7 i 100 mg L^{-1} . Od svakog razrjeđenja otpipetira se 250 μL standarda u staklene epruvete, 250 μL 1g L^{-1} HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteks miješalici.

Uzorcima se mjeri apsorbanacija pri valnoj duljini od 320 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 250 μL standarda otpipetira 250 μL 80%-tnog metanola.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbanacije pri 320 nm o masenoj koncentraciji kafeinske kiseline (mg L^{-1}) pomoću programa Microsoft Excel. Maseni udio hidrokscimetnih kiselina izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Maseni udjeli hidrokscimetnih kiselina izraženi su kao ekvivalent kafeinske kiseline w (mg CAE g^{-1}).

Tablica 3. Masene koncentracije standardne otopine kafeinske kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 320 nm

γ (mg L ⁻¹)	A (320 nm)
0	0
10	0,048
25	0,110
50	0,220
66,7	0,300
100	0,450



Slika 6. Baždarni pravac standardne otopine kafeinske kiseline

b) Flavonoli

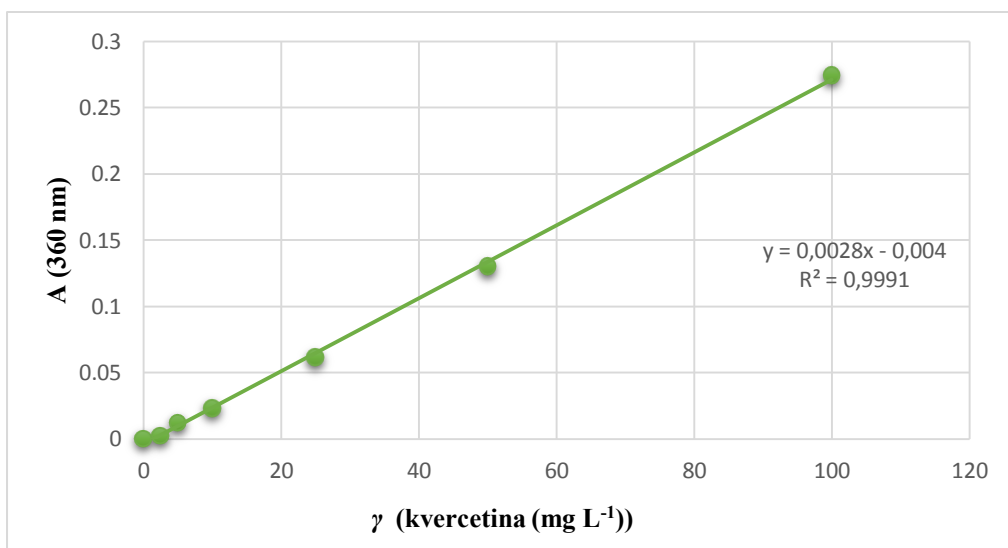
Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti standard otopine kvercetina masene koncentracije 100 mg L⁻¹. Od pripremljene standardne otopine kvercetina priređuju se razrjeđenja standardne otopine koncentracija 2,5, 5, 10, 25, 50 i 100 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetira se 250 μ L standarda u staklene epruvete, 250 μ L 1 g L⁻¹ HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteks miješalici. Uzorcima se mjeri

apsorbancija pri valnoj duljini od 360 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 250 μL standarda otpipetira 250 μL 100%-tnog metanola.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbcija nacrtana se baždarni pravac ovisnosti apsorbcije pri 360 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg L^{-1}) pomoću programa Microsoft Excel. Maseni udio flavonola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Maseni udjeli flavonola izraženi su kao ekvivalent kvercetina w (mg QE g^{-1}).

Tablica 4. Masene koncentracije standardne otopine kvercetina i pripadajuće vrijednosti apsorbcija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 360 nm

γ (mg L^{-1})	A (360 nm)
0	0
2,5	0,002
5	0,012
10	0,023
25	0,061
50	0,130
100	0,274



Slika 7. Baždarni pravac standardne otopine kvercetina

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedena je vodena destilacija po Clavengeru s ciljem dobivanja eteričnog ulja ružmarina. Kako bi se povećao prinos eteričnog ulja iz listića ružmarina, istraživani su utjecaji različitih predtretmana koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clavengeru. U svrhu određivanja optimalne metode izolacije eteričnog ulja iz listića ružmarina provedeni su predtretmani: klasične ekstrakcije refluksiranjem s ili bez dodatka enzima (pektinaze, celulaze i ksilanaze) te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom s ili bez dodatka enzima (pektinaze, celulaze ili ksilanaze).

Nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru dobiveno je eterično ulje ružmarina te nus-produkti: vodeni ekstrakt i hidrolat te biljni ostatak. U vodenom ekstraktu i hidrolatu određivani su maseni udjeli fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina). Biljni ostatak ružmarina nakon sušenja na zraku ekstrahiran je ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10 \text{ min}$) uz otapala: etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) ili etanol-metanol-voda (1:1:1). U ekstraktima biljnog ostatka određivani su maseni udjeli fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina). Rezultati su prikazani u tablicama (5-14). Dobiveno eterično ulje spremljeno je za daljnje analize uz određivanje inhibicijskog djelovanja prema patogenim oomicetama.

4.1. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM
ESKTRAKTIMA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO
CLAVENGERU

4.1.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene vodene destilacije
po Clavengeru

Tablica 5. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima nakon provedene Clavenger vodene destilacije u uzorku ružmarina kojem nisu prethodili predtretmani te uzorcima ružmarina kojima je prethodila klasična ekstrakcija refluksiranjem te ekstrakcija potpomognuta enzimima (pektinaza, celulaza i ksilanaza) pri 40 °C kroz 60 minuta

	UKUPNI FENOLI w (mg GAE g ⁻¹)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE g ⁻¹)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE g ⁻¹) ±SD	FLAVONOLI w (mg QE g ⁻¹)±SD
RUŽMARIN	44,02 ± 5,38	7,22 ± 0,88	9,41 ± 0,06	9,67 ± 0,16
RUŽMARIN- BEZ ENZIMA	31,31 ± 6,27	3,76 ± 0,23	7,60 ± 0,15	8,37 ± 0,02
RUŽMARIN- PEKTINAZA	33,08 ± 1,97	5,59 ± 0,03	8,14 ± 0,35	9,08 ± 0,39
RUŽMARIN- CELULAZA	36,75 ± 1,43	4,57 ± 0,06	7,46 ± 0,17	8,21 ± 0,23
RUŽMARIN- KSILANAZA	40,89 ± 3,71	4,69 ± 1,09	7,13 ± 0,01	7,47 ± 0,17

4.1.2 Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

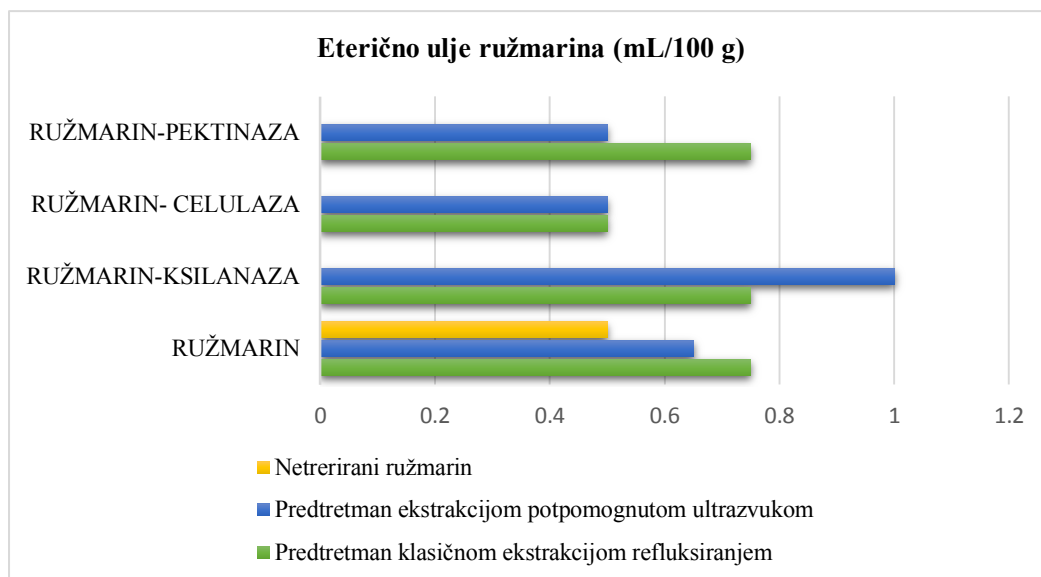
Tablica 6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u vodenim ekstraktima ružmarina nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudi 30, 50 i 100 % i vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta

UKUPNI FENOLI w (mg GAE g^{-1}) \pm SD			
AMPLITUDA (%)	30	50	100
VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)			
5	23,50 \pm 0,35	11,59 \pm 0,27	12,55 \pm 0,69
10	24,36 \pm 0,53	11,32 \pm 0,02	12,80 \pm 0,20
15	25,88 \pm 0,53	10,77 \pm 0,04	12,03 \pm 0,14

Tablica 7. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene Clavenger vodene destilacije kojoj je prethodila ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) bez dodatka enzima te ekstrakcija ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) uz dodatak enzima pektinaze, celulaze i ksilanaze

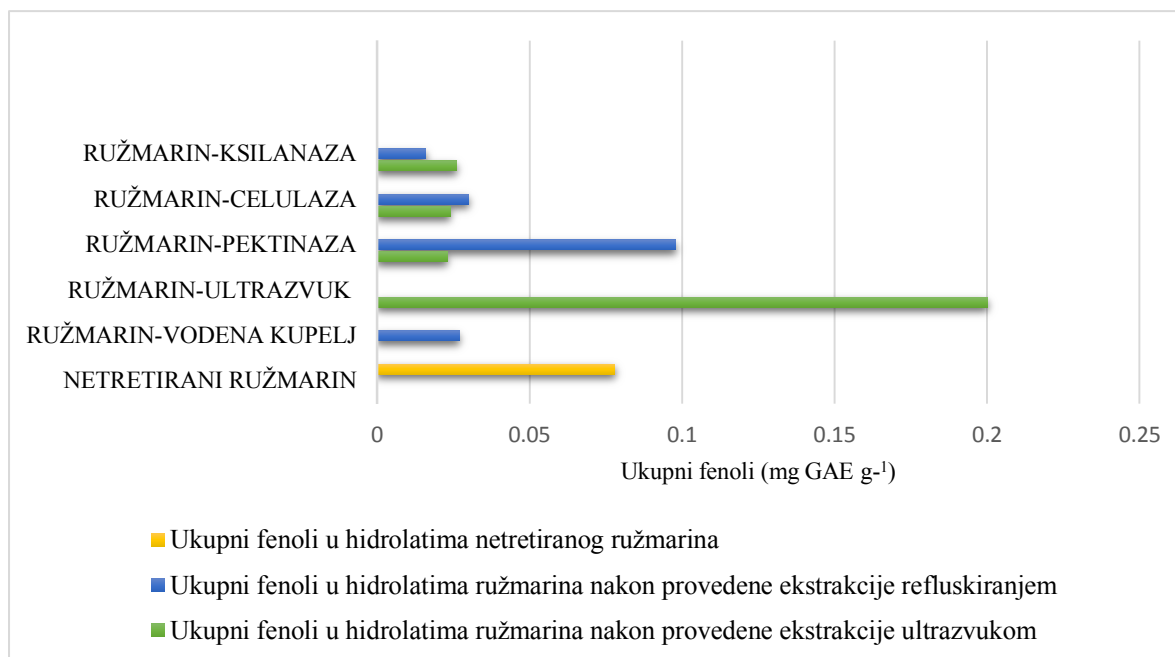
	UKUPNI FENOLI w (mg GAE g^{-1}) \pm SD	FLAVONOIDI w (mg QE g^{-1}) \pm SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE g^{-1}) \pm SD	FLAVONOLI w (mg QE g^{-1}) \pm SD
RUŽMARIN - BEZ ENZIMA	17,83 \pm 1,43	5,09 \pm 0,35	8,58 \pm 0,27	8,09 \pm 0,34
RUŽMARIN- PEKTINAZA	26,69 \pm 1,26	4,88 \pm 1,11	7,83 \pm 0,17	7,79 \pm 0,56
RUŽMARIN- CELULAZA	25,47 \pm 2,92	5,01 \pm 0,64	7,65 \pm 0,75	7,13 \pm 0,91
RUŽMARIN- KSILANAZA	28,21 \pm 3,34	4,63 \pm 0,50	7,19 \pm 0,02	7,41 \pm 0,21

4.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ETERIČNOG ULJA RUŽMARINA DOBIVENOG NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU



Slika 8. Udio eteričnog ulja ružmarina dobivenog nakon provedene Clavenger vodene destilacije netreriranih listića ružmarina, uzoraka ružmarina kojima je prethodila ekstrakcija refluksiranjem, ekstrakcija potpomognuta enzimima (pektinaza, celulaza i ksilanaza) pri 40 °C kroz 60 minuta te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) s ili bez dodatka enzima pektinaze, celulaze i ksilanaze

4.3. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA UKUPNIH FENOLA U HIDROLATIMA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU



Slika 9. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u hidrolatima ružmarina nakon provedene Clavenger vodene destilacije netretiranih listića ružmarina, uzoraka ružmarina kojima je prethodila ekstrakcija refluksiranjem, ekstrakcija potpomognuta enzimima (pektinaza, celulaza i ksilanaza) pri 40 °C kroz 60 minuta te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) s ili bez dodatka enzima pektinaze, celulaze i ksilanaze

4.4. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA LISTA RUŽMARINA

Tablica 8. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lista ružmarina nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudi 30, 50 i 100 % i vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta primjenom otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1)

AMPLITUDA (%)	VRIJEME EKSTRAKCIJE (min)	ETANOL-VODA (1:1)	METANOL-VODA (1:1)	ETANOL-METANOL-VODA (1:1:1)
w (mg GAE g⁻¹)±SD				
30	5	20,39 ± 2,36	47,13 ± 3,31	36,81 ± 2,32
	10	16,97 ± 1,98	42,51 ± 0,81	48,69 ± 6,91
	15	21,24 ± 1,45	35,33 ± 3,33	51,55 ± 3,10
50	5	20,98 ± 2,36	43,88 ± 0,92	44,98 ± 3,53
	10	15,97 ± 2,11	38,77 ± 0,91	45,75 ± 3,54
	15	18,72 ± 3,00	30,42 ± 2,73	48,85 ± 4,24
100	5	20,62 ± 3,84	42,44 ± 6,38	47,82 ± 1,24
	10	7,82 ± 1,40	44,92 ± 2,23	44,14 ± 2,14
	15	1,63 ± 1,35	41,02 ± 5,19	40,17 ± 4,76

Tablica 9. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktima biljnog ostatka lista ružmarina na kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnim uvjetima ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) primjenom otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1), provedena vodena destilacija po Clavengeru

RUŽMARIN	UKUPNI FENOLI w (mg GAE g⁻¹)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE g⁻¹)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE g⁻¹)±SD	FLAVONOLI w (mg QE g⁻¹)±SD
ETANOL- VODA (1:1)	18,40 ± 0,25	4,63 ± 3,48	12,02 ± 1,24	6,43 ± 2,21
METANOL- VODA (1:1)	16,88 ± 1,39	1,80 ± 2,57	5,44 ± 0,98	4,82 ± 3,02
ETANOL- METANOL- VODA (1:1:1)	29,70 ± 2,87	3,47 ± 1,03	7,28 ± 3,21	7,32 ± 2,48

Tablica 10. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktima biljnog ostatka lista ružmarina na kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) primjenom otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1) provedena ekstrakcija refluksiranjem s ili bez dodatka enzima, nakon koje je provedena vodena destilacija po Clavengeru

OTAPALO		UKUPNI FENOLI w (mg GAE g ⁻¹)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE g ⁻¹)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE g ⁻¹)±SD	FLAVONOLI w (mg QE g ⁻¹)±SD
RUŽMARIN	Etanol-voda (1:1)	16,30 ± 2,32	3,62 ± 4,21	10,19 ± 4,58	6,61 ± 3,65
	Metanol-voda (1:1)	9,70 ± 1,29	1,37 ± 2,02	5,21 ± 1,80	4,20 ± 2,56
	Etanol-metanol-voda (1:1)	10,20 ± 3,25	3,15 ± 1,93	4,11 ± 0,79	5,26 ± 3,24
RUŽMARIN-PEKTINAZA	Etanol-voda(1:1)	17,19 ± 4,56	3,70 ± 3,06	8,99 ± 2,21	7,14 ± 1,63
	Metanol-voda (1:1)	18,69 ± 3,85	2,03 ± 1,79	5,91 ± 4,63	2,95 ± 1,85
	Etanol-metanol-voda (1:1)	15,89 ± 2,69	3,57 ± 2,99	8,24 ± 2,78	6,97 ± 2,51
RUŽMARIN-CELULAZA	Etanol-voda (1:1)	16,68 ± 1,47	3,29 ± 2,12	6,41 ± 3,50	5,59 ± 3,24
	Metanol-voda (1:1)	7,20 ± 2,98	0,90 ± 0,88	3,27 ± 0,55	2,41 ± 3,30
	Etanol-metanol-voda (1:1)	12,09 ± 4,30	1,64 ± 2,82	6,76 ± 1,02	5,35 ± 2,15
RUŽMARIN-KSILANAZA	Etanol-voda (1:1)	18,59 ± 3,37	4,47 ± 3,03	11,00 ± 4,11	8,21 ± 3,07
	Metanol-voda (1:1)	22,29 ± 5,25	1,13 ± 1,62	5,29 ± 0,84	4,47 ± 4,03
	Etanol-metanol-voda (1:1)	16,60 ± 6,32	3,17 ± 1,78	8,00 ± 2,93	6,69 ± 2,04

Tablica 11. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktima biljnog ostatka lista ružmarina u kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute *ultrazvukom* ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) primjenom otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1) provedena ekstrakcija ultrazvukom ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) uz dodatak enzima pektinaze, celulaze ili ksilanaze, nakon koje je provedena vodena destilacija po Clavengeru

	OTAPALO	UKUPNI FENOLI w (mg GAE g ⁻¹)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE g ⁻¹)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE g ⁻¹)±SD	FLAVONOLI w (mg QE g ⁻¹)±SD
RUŽMARIN- PEKTINAZA	Etanol-voda (1:1)	12,59 ± 4,07	3,06 ± 2,59	7,08 ± 1,60	6,69 ± 2,16
	Metanol-voda (1:1)	14,90 ± 3,04	2,18 ± 1,06	4,28 ± 2,29	3,04 ± 1,84
	Etanol-metanol- voda (1:1)	14,19 ± 1,22	3,70 ± 1,86	7,27 ± 2,05	5,99 ± 1,13
RUŽMARIN CELULAZA	Etanol-voda (1:1)	19,19 ± 4,26	4,16 ± 2,99	8,24 ± 2,53	6,43 ± 2,41
	Metanol-voda (1:1)	7,51 ± 1,19	1,51 ± 1,79	7,86 ± 3,14	3,31 ± 1,28
	Etanol-metanol- voda (1:1)	17,71 ± 2,77	3,70 ± 4,00	7,08 ± 2,32	5,98 ± 2,30
RUŽMARIN- KSILANAZA	Etanol-voda (1:1)	18,18 ± 1,92	2,98 ± 1,94	8,20 ± 1,50	6,25 ± 3,05
	Metanol-voda (1:1)	16,20 ± 2,59	2,66 ± 1,39	5,56 ± 2,72	4,64 ± 1,88
	Etanol-metanol- voda (1:1)	17,79 ± 1,86	2,92 ± 0,68	8,24 ± 2,66	7,94 ± 1,66

4.5. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM EKSTRAKTIMA LISTA RUŽMARINA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU

4.5.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene klasične ekstrakcije refluksiranjem i ekstrakcije refluksiranjem potpomognute enzimima

Ukupni fenoli.

Iz rezultata prikazanih u tablici 5 vidljivo je kako se maseni udio ukupnih fenola kreće u rasponu $31,31 \pm 6,27$ do $44,02 \pm 5,38$ mg GAE g⁻¹. Najmanji udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu određen je u vodenom ekstraktu ružmarina dobivenom vodenom destilacijom po Clavengeru uz predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem. Najveći udio ukupnih fenola određen je u vodenom ekstraktu ružmarina u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru nisu provedeni predtretmani klasične ekstrakcije refluksiranjem, niti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

U vodenim ekstraktima ružmarina u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru provedena ekstrakcija refluksiranjem potpomognuta enzimima (ksilanaza, pektinaza ili celulaza) udio ukupni fenola kreće se u rasponu $33,08 \pm 1,97$ do $40,89 \pm 3,71$ mg GAE g⁻¹. Najveći maseni udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu određen je u vodenom ekstraktu ružmarina u kojem je provedena ekstrakcija refluksiranjem potpomognuta enzimima uz dodatak enzima ksilanaze.

Provedenim predtretmanom klasične ekstrakcije refluksiranjem i ekstrakcije refluksiranjem potpomognutom enzimima nije postignuto očekivano povećanje masenog udjela ukupnih fenola u vodenom ekstraktu u odnosu na vodeni ekstrakt u kojem nije proveden predtretman neposredno prije provođenja vodene destilacije.

Temperatura i vrijeme ekstrakcije pokazali su se kao glavni čimbenici u ekstrakciji fenolnih spojeva. Povišena temperatura tretmana zaslužna je za smanjenje čvrstoće stanične stijenke odnosno hidrolizu veza fenolnih spojeva s proteinima ili polisaharidima što omogućuje olakšanu ekstrakciju fenolnih spojeva (Spigno i sur., 2007). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem i ekstrakcijom potpomognutom enzimima postiže jednaki ili manji ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva usporedno s vodenim ekstraktom ružmarina koji prethodno nije bio podvrgnut predtretmanu.

Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli.

Iz rezultata prikazanih u tablici 5 vidljivo je kako su flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli ekstrahirani u značajno manjim masenim udjelima u odnosu na ukupne fenole. Udio ekstrahiranih flavonoida kreće se u rasponu $3,76 \pm 0,23$ do $7,22 \pm 0,88$ mg QE g⁻¹. Udio hidroksicimetnih kiselina u vodenom ekstraktu kreće se u rasponu $7,13 \pm 0,01$ do $9,41 \pm 0,06$ mg CAE g⁻¹, dok se udio flavonola u vodenom ekstraktu kreće u rasponu $7,47 \pm 0,17$ do $9,67 \pm 0,16$ mg QE g⁻¹. Najveći maseni udio flavonoida ($7,22 \pm 0,88$ mg QE g⁻¹), hidroksicimetnih kiselina ($9,41 \pm 0,06$ mg CAE g⁻¹) te flavonola ($9,67 \pm 0,16$ mg QE g⁻¹) određen je u vodenim ekstraktima ružmarina koji nisu bili podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije refluksiranjem ili ekstrakcije potpomognute enzimima.

Najmanji maseni udio flavonoida ($3,76 \pm 0,23$ mg QE g⁻¹) određen je u vodenom ekstraktu ružmarina u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru provedena ekstrakcija refluksiranjem. Najmanji maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina ($7,13 \pm 0,01$ mg CAE g⁻¹) i flavonola ($7,47 \pm 0,17$ mg QE g⁻¹) određeni su u vodenim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem potpomognutom enzimima uz dodatak ksilanaze.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se provedenim predtretmanom neposredno prije vodene destilacije u vodenom ekstraktu ružmarina primjenom ekstrakcije refluksiranjem potpomognute enzimima postiže jednak ili manji ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva usporedno s vodenim ekstraktom ružmarina koji nije bio podvrgnut predtretmanu. Na povećanje masenog udjela ukupnih fenola u vodenom ekstraktu ružmarina najveći ekstrakcijski kapacitet postignut je uz dodatak enzima ksilanaze, dok je najveći ekstrakcijski kapacitet na povećanje masenog udjela hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i flavonola u vodenom ekstraktu postignut uz dodatak enzima pektinaze.

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala može se poboljšati korištenjem enzimskih pripravaka (Baby i Rangathan, 2016) poput celulaze, hemiceluloze i pektinaze (Boulila i sur., 2015) jer je stanična stijenka sastavljena od kompleksnih biopolimera poput celuloze, hemiceluloze, lignina i pektina (Doi i Kosugi, 2004). Očekivano povećanje masenog udjela fenolnih spojeva iz ružmarina nije postignuto uz dodatak enzima celulaze, pektinaze ili ksilanaze pa bi stoga pri budućim provođenjima ekstrakcije trebalo povećati koncentraciju enzima ili koristiti kombinaciju enzima celulaze, pektinaze i ksilanaze (1:1:1) te optimizirati pH. Zhou i sur. (2017) proveli su istraživanje utjecaja temperature i pH na klasičnu ekstrakciju refluksiranjem uz enzime pektinaze i β-glukozidaze iz peteljki sibirskog brijesta uz 50 %-tni

etanol kao otapalo. Kao optimalni parametri određeni su vrijeme ekstrakcije 62 min, temperatura 52 °C te pH 4,63. Daljnjim povećanjem temperature i pH vrijednosti zabilježena je smanjena ekstrakcija fenolnih spojeva. Pri optimalnoj temperaturi ekstrakcije te optimalnoj pH vrijednosti dolazi do povećane hidrolitičke aktivnosti, te posljedično o povećanja poroznosti stanične stijenke što olakšava oslobađanje fenolnih spojeva. Iste rezultate zabilježili su i Dimaki i sur. (2017) koji su proveli su istraživanje određivanja utjecaja enzimske ekstrakcije iz biljka roda *Sideritis* (porodica Lamiaceae). Dobivenim rezultatima istraživanja ukazali su kako je za optimalni rezultat ekstrakcije fenolnih spojeva neovisno o načinu ekstrakcije potrebno optimizirati pH vrijednost ($\text{pH} < 5$), te upotrijebiti kombinaciju enzima prilikom ekstrakcije.

4.5.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima ružmarina nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s i bez dodatka enzima

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je u cilju povećanja stupnja ekstrakcije fenolnih spojeva. Neposredno prije provođenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom određeni su optimalni parametri: vrijeme ekstrakcije (5, 10, 15 min) i amplituda (30 %, 50%, 100 %) uz konstantan ciklus -1. Maksimalna izlazna snaga ultrazvuka iznosila je 150 W, dok je primjenom konstantnog ciklusa omogućeno neprekinuto tretiranje uzorka. U tablici 6 prikazani su rezultati masenog udjela ukupnih fenola u vodenim ekstraktima ružmarina, na temelju određenih masenog udjela ukupnih fenola u vodenim ekstraktima ružmarina određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

Iz dobivenih rezultata u tablici 6 vidljivo je kako je najveći maseni udio ukupnih fenola iznosio $25,88 \pm 0,53 \text{ mg GAE g}^{-1}$ postignut pri vremenu ekstrakcije od 15 minuta pri amplitudi 30%, a neznatno manji ($24,36 \pm 0,53 \text{ mg GAE g}^{-1}$) dobiven je pri istoj amplitudi i vremenu ekstrakcije 10 min. Povećanje vremena i amplitude zabilježen je smanjeni ekstrakcijski kapacitet ukupnih fenola, a najmanji maseni udio ukupnih fenola ($10,77 \pm 0,04 \text{ mg GAE g}^{-1}$) zabilježen je pri vremenu 15 minuta i amplitudi 50%. S obzirom na navedeno, kao optimalan parametar ekstrakcije određena je amplituda 30% kroz period ekstrakcije od 10 minuta, jer se povećanjem vremena ekstrakcije maseni udio ukupnih fenola neznatno mijenja. Optimalni parametar vremena ekstrakcije u skladu je s istraživanjem Dent i sur. (2015) koji su provedenim istraživanjem ekstrakcije fenolnih spojeva ultrazvučnom sondom iz kadulje odredili vrijeme 11 minuta.

Ukupni fenoli

Iz rezultata prikazanih u tablici 7 vidljiv je utjecaj enzima na ekstrakcijski kapacitet ukupnih fenola. Ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima ksilanaze određen je najveći maseni udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu ružmarina ($28,21 \pm 3,34$ mg GAE g⁻¹). Nešto manji maseni udio ukupnih fenola uz dodatak enzima određen je ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima celulaze ($25,47 \pm 2,92$ mg GAE g⁻¹) dok je ultrazvučnom ekstrakcijom bez dodatka enzima zabilježen najmanji maseni udio ukupnih fenola ($17,83 \pm 1,43$ mg GAE g⁻¹). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja drugih autora (Tchabo i sur., 2015; Wu i sur., 2014.) koji su provedenim istraživanjima zabilježili značajno povišenje stupnja ekstrakcije fenolnih spojeva prilikom ultrazvučno-enzimske ekstrakcije.

Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli

Iz rezultata prikazanih u tablici 7 vidljivo je kako je najveći maseni udio flavonoida ($5,09 \pm 0,35$ mg QE g⁻¹), hidroksicimetnih kiselina ($8,58 \pm 0,27$ mg CAE g⁻¹) i flavonola ($8,09 \pm 0,34$ mg QE g⁻¹) određen u vodenim ekstraktima ružmarina koji su neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije potpomognute samo ultrazvukom. Najmanji maseni udio flavonoida ($4,63 \pm 0,50$ mg QE g⁻¹) i hidroksicimetnih kiselina ($7,19 \pm 0,02$ mg CAE g⁻¹) određen je u vodenim ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima ksilanaze, a najmanji maseni udio flavonola ($7,13 \pm 0,91$ mg QE g⁻¹) uz dodatak enzima celulaze.

Očekivano značajno povećanje masenog udjela fenolnih spojeva uz primjenu predtretmana nije zabilježeno. Dodatak enzima nije imao znatan utjecaj na ekstrakciju flavonoida, hidroksicimetnih kiselina te flavonola iako je ekstrakcija ultrazvukom provedena pri optimalnim parametrima ($A=30\%$, $t=10$ min).

Najveći utjecaj na povećanje masenog udjela ukupnih fenola određen je enzimom ksilanaza, kao što je određeno i kod klasične ekstrakcije refluksiranjem kao predtretmana vodenoj destilaciji. Najveći ekstrakcijski kapacitet te povećanje masenog udjela hidroksicimetnih kiselina u vodenom ekstraktu postignut je uz dodatak enzima celulaze, dok je na povećanje masenog udjela flavonoida i flavonola u vodenom ekstraktu najveći utjecaj imao enzim pektinaza.

4.6. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA

Na slici 8 prikazani su udjeli izoliranog eteričnog ulja dobivenog iz ružmarina nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru, odnosno ulja dobivenog iz ružmarina nakon provedenih predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (s ili bez dodatka enzima), te klasične ekstrakcije refluksiranjem ili ekstrakcije refluksiranjem potpomognute enzimima. Najveći udio eteričnog ulja (1 mL/100 g biljke) izoliran je iz ružmarina kojem je prije vodene destilacije po Clavengeru prethodio predtretman ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima ksilanaze, što je povećanje prinosa do 50 % u odnosu na uzorak koji nije podvrgnut predtretmanu. Dodatak enzima pektinaze i celulaze pri istim uvjetima ekstrakcije nije doprinjeo povećanju izolacije eteričnog ulja iz ružmarina, određen je najmanji udio eteričnog ulja (0,5 mL/100 g biljke) kao i u uzorku ružmarina koji prije provođenja vodene destilacije po Clavengeru nije podvrgnut predtretmanu. Dodatkom enzima pektinaze ili ksilanaze uz provođenje ekstrakcije refluksiranjem postiže se jednak udio izoliranog eteričnog ulja iz ružmarina kao i ekstrakcijom refluksiranjem bez dodatka enzima (0,75 mL/100 g biljke). Provedenim istraživanjem ispitivanja utjecaja predtretmana ekstrakcije potpomognute enzimima, može se zaključiti da enzim celulaza nije pokazao utjecaj na povećanje udjela izoliranog eteričnog ulja u kombinaciji s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom ili klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Hosni i sur., (2013) koji također primjenom enzima celulaze odnosno kombinacijom enzima celulaza/hemicelulaza nisu postigli značajan utjecaj na povećanje udjela eteričnog ulja izoliranog iz ružmarina, ali je zabilježen povećani prinos ukupnih fenolnih spojeva kao i promjena fenolnog sastava u eteričnom ulju ružmarina.

Provedeni predtretmani klasične ekstrakcije refluksiranjem, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili enzimima osim na povećanje udjela izoliranog eteričnog ulja iz ružmarina, mogu utjecati i na promjenu kemijskog sastava eteričnog ulja što je potrebno ispitati daljnjim GC/MS analizama. Na povećanje udjela izoliranog eteričnog ulja ružmarina najveći utjecaj zabilježen je predtretmanom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima ksilanaze neposredno prije provedene vodene destilacije po Clavengeru.

4.7. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU RUŽMARINA

Nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru osim eteričnog ulja, kao nusprodukt uz vodeni ekstrakt dobiva se i hidrolat, u kojem je provedeno spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i flavonola. Iz rezultata prikazanih na slici 9 vidljivo je kako je maseni udio fenolnih spojeva u hidrolatu nizak. Ukupni fenoli u hidrolatu ružmarina određeni su u koncentracijama 0,023 do 0,2 mg GAE g⁻¹, dok su flavonoidi, flavonoli i fenolne kiseline određeni u tragovima. Najveći udio ukupnih fenola određen je u hidrolatu ružmarina dobivenog nakon predtretmana ultrazvučnom ekstrakcijom, najmanji udio ukupnih fenola određen je u hidrolatu ružmarina dobivenog nakon predtretmana ekstrakcijom refluksiranjem uz enzim ksilanazu.

4.8. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA BILJNOG OSTATKA RUŽMARINA

Nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja, kao nusprodukti dobiveni su hidrolat, vodeni ekstrakt i biljni ostatak. Biljni ostatak zaostao nakon provođenja vodene destilacije po Clavengeru u svojem kemijskom sastavu sadrži fenolne spojeve (Santana-Méridas i sur., 2014). Iz tog razloga, dobiveni biljni ostatak ekstrahiran je otapalima etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1) uz primjenu ultrazvuka. Najčešće primijenjena otapala su polarna organska otapala s različitim udjelom vodene faze u organskoj fazi, kao što su: etanol-voda, metanol- voda, aceton te dietil eter i etil acetat (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Złotek i sur., (2016) su dokazali učinkovitost utjecaja otapala i većeg broja ekstrakcija na ukupne fenole lista bosiljka. Dobivenim rezultatima je dokazano kako produženi kontakt otapala s uzorkom pospješuje ekstrakciju fenolnih spojeva, dok konstantna izmjena otapala sprječava zasićenje otapala. Izbor ekstrakcijskog otapala ovisi o vrsti fenolnih spojeva koje je potrebno ekstrahirati (Ajila i sur., 2010).

Prije provođenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom otapala različite polarnosti biljnog ostatka ružmarina određeni su optimalni parametri ultrazvučne ekstrakcije (amplituda i vrijeme) za svako otapalo (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1)) određivanjem masenog udjela ukupnih fenola. U tablici 8 vidljivi su rezultati određivanja optimalnih parametara ekstrakcije. Optimalni parametri ekstrakcije određivani su na listovima ružmarina ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom primjenom otapala različite polarnosti.

Maseni udio ukupnih fenola određen ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz otapalo etanol-voda (1:1) kreće se u rasponu $1,63 \pm 1,35$ do $21,24 \pm 1,45$ mg GAE g⁻¹. Maseni udio ukupnih fenola određen ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz otapalo metanol-voda (1:1) kreće se u rasponu $30,42 \pm 2,73$ do $47,13 \pm 3,31$ mg GAE g⁻¹, a za otapalo etanol-metanol-voda (1:1:1) $36,81 \pm 2,32$ do $51,55 \pm 3,10$ mg GAE g⁻¹. Provedenom ultrazvučnom ekstrakcijom primjenom otapala etanol-voda (1:1) i etanol-metanol-voda (1:1:1) maksimalni kapacitet ekstrakcije je postignut pri $A=30\%$, $t=15$ min, a za metanol-voda (1:1) pri $A=30\%$, $t=5$ min.

Najmanji maseni udio ukupnih fenola za otapalo etanol-voda (1:1) određen je pri $A=100\%$, $t=15$ min, za otapalo metanol-voda (1:1) pri $A=50\%$, $t=15$ min, a za otapalo etanol-metanol-voda (1:1:1) $A=30\%$, $t=5$ min. S obzirom na dobivene rezultate određeni su optimalni parametri ekstrakcije $A=30\%$, $t=10$ min. Pri određivanju optimalnih parametara u razmatranje je stavljena i činjenica kako porastom vremena odnosno amplitude pri ultrazvučnoj ekstrakciji dolazi do porasta temperature, a otapala etanol i metanol imaju nisku temperaturu vrelišta i lako su hlapljiva pa prilikom dužeg vremena ekstrakcije dolazi do ishlapljivanja otapala usred porasta temperature te bi učinak otapala na ekstrakciju mogao biti zanemariv.

Ukupni fenoli.

U tablici 9 prikazani su rezultati masenog udjela ukupnih fenola ekstrahiranih iz biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon vodene destilacije po Clavengeru netretiranih listića ružmarina) primjenom otapala različite polarnosti uz ultrazvučnu ekstrakciju u iznosu od $16,88 \pm 1,39$ do $29,70 \pm 2,87$ mg GAE g⁻¹. Najveći maseni udio ukupnih fenola ekstrahiran je uz primjenu otapala etanol-metanol-voda (1:1:1), a najmanji maseni udio ukupnih fenola ekstrahiran je primjenom otapala metanol-voda (1:1).

U tablici 10 prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije refluksiranjem bez dodatka enzima). Maseni udjeli ukupnih fenola određeni su u iznosu od $9,70 \pm 1,29$ do $16,30 \pm 2,32$ mg GAE g⁻¹. Najveći maseni udio ukupnih fenola određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala etanol-voda (1:1), a najmanji maseni udio određen je u biljnom ostatku u kojem je provedena ekstrakcija refluksiranjem bez dodatka enzima uz primjenu otapala metanol-voda (1:1).

U ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije refluksiranjem uz dodatak enzimima pektinaze, celulaze ili ksilanaze) određeni su maseni udjeli ukupnih fenola u iznosu od $7,20 \pm 2,98$ do $22,29 \pm 5,25$ mg GAE g⁻¹ (Tablica 10). Najveći maseni udio ukupnih fenola ($22,29 \pm 5,25$ mg GAE g⁻¹) određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala metanol:voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima ksilanaze, a najmanji maseni udio ukupnih fenola ($7,20 \pm 2,98$ mg GAE g⁻¹) određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala metanol:voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima celulaze.

U ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ultrazvučne ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) potpomognute enzimima ksilanaze, pektinaze, celulaze) određeni su maseni udjeli ukupnih fenola u iznosu od $7,51 \pm 1,19$ do $19,19 \pm 4,26$ mg GAE g⁻¹ (Tablica 11). Najveći maseni udio ukupnih fenola ($19,19 \pm 4,26$ mg GAE g⁻¹) određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala etanol-voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima celulaze. Najmanji maseni udio ukupnih fenola ($7,51 \pm 1,19$ mg GAE g⁻¹) određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima celulaze.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako se uz otapalo etanol-voda (1:1) postigao najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola, iako je i za otapalo etanol-metanol-voda (1:1:1) zabilježen značajan ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola. Uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) zabilježen je najmanji prinos ukupnih fenola tijekom ekstrakcije. Odabir ekstrakcijskog otapala pokazao se kao važan faktor pri provođenju ekstrakcije izolacije fenolnih spojeva, što je i u skladu s rezultatima drugih autora (Ballesteros i sur., 2013). Kombinacija vode i organskog otapala doprinosi ekstrakciji komponenata topivih u vodi i/ili organskim otapalima. To je ujedno i razlog zašto su prinosi vodenih ekstrakata metanola, etanola ili acetona veći od prinosa vode, metanola, etanola i acetona (Do i sur., 2014). Biljno tkivo slabo je propusno za otapalo, a propusnost se može povećati bubrenjem tkiva. Tome je uzrok

adsorpcija polarnih molekula otapala na hidroksilne i karboksilne skupine celuloznih vlakana. Nakon adsorpcije povećava se udaljenost između vlakana te se tako olakšava prodor otapala u biljno tkivo (Zurro i Lavecchia, 2013). Kombinacija otapala etanol-voda (1:1) u većini istraživanja zabilježena je kao povoljna kombinacija za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka (Do i sur., 2014; Turkmen i sur., 2006; Roselló - Soto i sur., 2019).

Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli.

U tablici 9 prikazani su rezultati maseni udjela flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola ekstrahiranih iz biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon vodene destilacije po Clavengeru netretiranih listića ružmarina) primjenom otapala različite polarosti uz ultrazvučnu ekstrakciju bez dodatka enzima. Maseni udjeli flavonoida određeni su u iznosu od $1,80 \pm 2,57$ do $4,63 \pm 3,48$ mg QE g⁻¹, hidroksicimetnih kiselina od $5,44 \pm 0,98$ do $12,02 \pm 1,24$ mg CAE g⁻¹ te flavonola od $4,82 \pm 3,02$ do $7,32 \pm 2,48$ mg QE g⁻¹. Najveći maseni udio flavonoida i hidroksicimetnih kiselina je određen u ekstraktima biljnih ostataka dobivenih primjenom otapala etanol-voda (1:1), te flavonola primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1), dok je najmanji maseni udio određen je ekstrakcijom uz primjenu otapala metanol-voda (1:1), neovisno o ekstrahiranoj skupini spojeva.

U tablici 10 prikazani su maseni udjeli flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije refluksiranjem bez dodatka enzima). Maseni udjeli flavonoida određeni su u iznosu od $1,37 \pm 2,02$ do $3,62 \pm 4,21$ mg QE g⁻¹, hidroksicimetnih kiselina $4,11 \pm 0,79$ do $10,19 \pm 4,58$ mg CAE g⁻¹ te flavonola $4,20 \pm 2,56$ do $6,61 \pm 3,56$ mg QE g⁻¹. Najveći maseni udio flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala etanol-voda (1:1), dok je najmanji maseni udio flavonoida i hidroksicimetnih kiselina određen u biljnom ostatku u kojem je provedena ekstrakcija refluksiranjem bez dodatka enzima uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) te flavonola uz primjenu otapala etanol-metanol-voda.

U ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ekstrakcije refluksiranjem uz dodatak enzima pektinaze, celulaze ili ksilanaze)

određeni su maseni udjeli flavonoida u iznosu od $0,90 \pm 0,88$ do $4,47 \pm 3,03$ mg QE g⁻¹, hidroksicimetnih kiselina $3,27 \pm 0,55$ do $11,00 \pm 4,11$ mg CAE g⁻¹ te flavonola $2,41 \pm 3,30$ do $8,21 \pm 3,07$ mg QE g⁻¹ (Tablica 10). Najveći maseni udio flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određen je u biljnim ostacima uz primjenu otapala etanol-voda (1:1) u kojima je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima ksilanaze. Najmanji maseni udio flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola određen je u biljnim ostacima uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) u kojima je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima celulaze. Dobiveni rezultati su u skladu s podacima Virot i sur., (2010) koji su odredili da su najveće koncentracije fenolnih spojeva u jabučnoj komini dobivene provedenom ultrazvučnom ekstrakcijom uz kombinaciju otapala etanol-voda 1:1. Vodena otopina etanola je najčešće primjenjivano otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala jer voda u otapalu omogućuje bubrenje biljnog materijala, dok etanol olakšava raskid veze između otopljenih tvari i stanične stijenke (d'Alessandro i sur. 2012).

U ekstraktima biljnog ostatka ružmarina (biljni ostatak ružmarina dobiven je nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru ostataka ružmarina koji su prethodno bili podvrgnuti predtretmanu ultrazvučne ekstrakcije ($A=30\%$, $t=10\text{ min}$) potpomognute enzimima ksilanaze, pektinaze, celulaze) određeni su maseni udjeli flavonoida u iznosu od $1,51 \pm 1,79$ do $4,16 \pm 2,99$ mg QE g⁻¹, hidroksicimetnih kiselina $4,28 \pm 2,29$ do $8,24 \pm 2,53$ mg CAE g⁻¹ te flavonola $3,04 \pm 1,84$ do $7,94 \pm 1,66$ mg QE g⁻¹ (Tablica 11). Najveći maseni udio flavonoida određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala etanol-voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima celulaze. Najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina određen je uz primjenu otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) u biljnom ostatku u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima ksilanaze, odnosno uz primjenu otapala etanol-voda (1:1) u biljnom ostatku u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima celulaze. Najveći maseni udio flavonola određen je u biljnom ostatku uz primjenu otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima ksilanaze. Najmanji maseni udio flavonoida određen je uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) u biljnom ostatku u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman

ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima celulaze, dok je najmanji maseni udio hidroksicimetnih kiselina i flavonola određen u biljnom ostatku uz primjenu otapala metanol-voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak enzima pektinaze.

Primjenom predtretmana klasičnom ekstrakcijom refkusiranjem ili ekstrakcijom ultrazvukom uz dodatak enzima zabilježen je podjednak prinos fenolnih spojeva kao i u uzorcima ružmarina u kojima je prije vodene destilacije po Clavengeru provedena ekstrakcija refluksiranjem bez dodatka enzima. Ukupni fenoli ekstrahirani su u višim masenim udjelima, dok su hidroksicimetne kiseline, flavonoidi i flavonoli ekstrahirani u nižim masenim udjelima. Od samog izbora predtretmana pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog ostatka ružmarina na kapacitet ekstrakcije fenolnih spojeva najveći utjecaj pokazao je izbor otapala, ali je zabilježen i utjecaj enzima na prinos fenolnih spojeva. Smjesa otapala etanol-voda (1:1) pokazala se kao najbolji izbor otapala, dok se smjesa otapala metanol-voda (1:1) pokazala kao najnepovoljniji izbor otapala za ekstrakciju. Enzim ksilanaza također je pokazao značajan utjecaj na ekstrakciju fenolnih spojeva ružmarina neovisno o primjeni predtretmana. Enzim ksilanaza uvrštava se u skupinu hidrolitičkih enzima. Ksilanaza je glukozidaza koja katalizira endohidrolizu 1,4- β -D-ksilanozidnih veza u ksilanu (Collins i sur., 2005). Supstrat ksilanaze, ksilan glavni je strukturni polisaharid u biljaka i glavna je vrsta hemiceluloze. Ksilan je najviše prisutan u staničnoj stijenci biljnih stanica (Collins i sur., 2005). Dobivenim istraživanjima drugih autora određeni su povećani prinosi ekstrakcije fenolnih spojeva uz primjenu enzima. Balasubramaniam i sur. 2019; Nagendra Chari i sur., 2012; Zhou i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja iz listića ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L) dobiveni su nusprodukti: vodeni ekstrakt i hidrolat te biljni ostatak listića ružmarina koji predstavljaju bogat izvor fenolnih spojeva. Spektrofotometrijskim određivanjem fenolnih spojeva određeni su visoki maseni udjeli ukupnih fenola: u vodenom ekstraktu $44,02 \pm 5,38$ mg GAE g⁻¹ i biljnom ostatku listića ružmarina $29,70 \pm 2,87$ mg GAE g⁻¹ te nizak u hidrolatu ružmarina 0,2 mg GAE g⁻¹
2. Primjenom predtretmana klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem ili ultrazvučnom ekstrakcijom s ili bez dodatka enzima nije zabilježeno povećanje prinosa fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu. Najveći maseni udio ukupnih fenola ($44,02 \pm 5,38$ mg GAE g⁻¹) određen je u vodenom ekstraktu ružmarina u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru nisu provedeni predtretmani klasične ekstrakcije refluksiranjem, niti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.
3. Predtretmanom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz enzim ksilanazu ($\gamma=0,2$ g L⁻¹) neposredno prije provedene vodene destilacije po Clavengeru dobiven je najveći udio eteričnog ulja ružmarina (1 mL/100 g). Provedenim predtretmanom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima ksilanaze ($\gamma=0,2$ g L⁻¹) postiže se povećanje udjela ekstrahiranog eteričnog ulja iz ružmarina čak do 50 % u odnosu na vodenu destilaciju po Clavengeru iz listića ružmarina kojem su prethodili drugi navedeni predtretmani i čak do 100% za ružmarin koji nije podvrgnut niti jednom predtretmanu.
4. Na ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnih ostataka listića ružmarina zaostalog nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru značajan utjecaj pokazao je odabira otapala. Najveći maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva iz biljnog ostatka listića ružmarina određeni su primjenom otapala etanol-voda (1:1), dok je uz otapalo metanol-voda (1:1) određen najmanji maseni udio ukupnih fenolnih spojeva.
5. U vodenom ekstraktu i ekstraktima biljnog ostatka određeni su značajni udjeli fenolnih spojeva. Stoga, vodeni ekstrakt, ekstrakt biljnog ostatka i eterično ulje ružmarina predstavljaju visokovrijedni supstrat koji će se koristiti u daljnjim analizama za ispitivanje inhibicijskog djelovanja prema patogenim oomicetama.

6. LITERATURA

Aires, A. (2017) Phenolics in Foods: Extraction, Analysis and Measurements. U: Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications, (Soto-Hernandez, M.; Palma-Tenango, M.; Garcia-Mateos, M.R., ured.), InTech, London/UK, str.61–88.

Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., Valéro, J. R. (2010) Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31(3)**, 227–249.

Baby, K. C., Ranganathan, T. V. (2016) Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare*) volatile oil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **8**, 248–256.

Balasubramaniam, V. G., Ayyappan, P., Sathvika, S., Antony, U. (2019) Effect of enzyme pretreatment in the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols. *J. Food Sci. Technol.* **56(3)**, 1583-1594.

Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I. (2013) Selection of the Solvent and Extraction Conditions for Maximum Recovery of Antioxidant Phenolic Compounds from Coffee Silverskin. *Food Bioproc. Tech.* **7(5)**, 1322–1332.

Bayramoglu, B., Sahin, S., Sumnu, G. (2008) Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *J. Food Eng.* **88(4)**, 535–540.

Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. B., Casabianca, H., Hosni, K. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind. Crops Prod.* **74**, 485–493.

Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007) Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **55(19)**, 7879–7885.

Breslow, R. (2010) The Principles of and Reasons for Using Water as a Solvent for Green Chemistry. U: Handbook of Green Chemistry, (Chao-Jun, L., ured.), Wiley, Weinheim str. 1-29.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, **21(7)**, 901-939.

- Buckle, J. (2015) *Clinical Aromatherapy*, Elsevier Science Ltd, London/New York, str. 37–72.
- Butnariu, M., Sarac, I. (2018) Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. **(1):4**, 35-43.
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., Baser, K. H. C. (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100(2)**, 553–559.
- Chalchat, J.C., Garry, R., Michet A., Benjlali B., Chabart J.L: (1993) Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The Chemical Composition of Oils of Various Origins (Morocco, Spain, France). *J. Essent. Oil Res.* **5:6**, 613-618,
- Chanda, A., Fokin, V. V. (2009) Organic Synthesis On Water. *Chem. Rev.* **109(2)**, 725–748.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* **10(3)**, 178-182.
- Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008) Ultrasound-assisted extraction in food analysis. U: *Handbook of Food Analysis Instruments*, (Ötles, S. ured.), Taylor & Francis, London/ New York, str. 85–103.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29(1)**, 3–23.
- d’Alessandro , L. G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. (2012) Ultrasonic assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep Purifi Technol*, **93**, 42–47.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15(10)**, 7313–7352.
- de Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., de Oliveira, L. D. (2019) *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J. Biomed. Sci.* **26(1)**, doi:10.1186/s12929-019-0499-8.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Elez-Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29(3)**, 475–484.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotech.* **51(1)**, 84-91.

Dimaki, V. D., Iatrou, G., Lamari, F. N. (2017) Effect of acidic and enzymatic pretreatment on the analysis of mountain tea (*Sideritis* spp.) volatiles via distillation and ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **1524**, 290–297.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y.-H. (2014). *Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica**. *J. Food Drug Anal.* **22(3)**, 296–302.

Doi, R. H., Kosugi, A. (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2(7)**, 541-551.

Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K., Foo L., Perry, N. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chem.* **101(4)**, 1417–1424.

Gharaati Jahromi, S. (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. U: *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds* (Soto-Hernández, M., Garcia-Mateos, G., Palma-Tenango, M. ured.), doi:10.5772/intechopen.84705

Hassani, F. V., Shirani, K., Hosseinzadeh, H. (2016) Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **389(9)**, 931–949.

Hosni, K., Hassen, I., Chaâbane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. (2013) Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.* **47**, 291–299.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2013) Analytical Methods of Phenolic Compounds. U: Natural Products, (Ramawat, K.G., Merillon, J.M., ured.), Springer, Berlin, str. 2061–2092.

Ioannou, I., Ghoul, M., (2012) Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. U: Advances in Applied Biotechnology (Petre, M., ured.), doi: 10.5772/30690.

Kari, H., Riekkola, M.L., (2017) Water as the first choice green solvent. U: The application of green solvents in separation processes (Pereira, F.P., Tobiszewski, M., ured.), Elsevier Science Ltd, London/New York, str. 19-55.

Katalinić, V., Mozina, S. S., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Klancnik, A. (2012) Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. Varieties. *Int. J. Food Prop.* **16(1)**, 45–60.

Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, **18(2)**, 2328–2375.

Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E. (2003) Herbs of the Labiatae. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Caballero B., ured.) Elsevier, London/New York, str. 3082–3090.

Kompelly, A., Kompelly, S., Vasudha, B., Narender, B. (2019) *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **9(1)**, 323-330.

Lakušić, D. V., Ristić, M. S., Slavkovska, V. N., Šinžar-Sekulić, J. B., Lakušić, B. S. (2012) Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chemistry & Biodiversity*, **9(7)**, 1286–1302.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **(79)**, 727–747.

- Mena, P., Cirlini, M., Tassotti, M., Herrlinger, K., Dall'Asta, C., Del Rio, D. (2016) Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules*, **21(11)**, 1576. doi:10.3390/molecules21111576
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vojnov, A. A. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.* **40(2)**, 223-231.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054 (1-2)**, 95–111.
- Nadar, S. S., Rao, P., Rathod, V. K. (2018) Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res. Int.* **108**, 309–330.
- Nagendra Chari, K. L., Manasa, D., Srinivas, P., Sowbhagaya, H. B. (2013) Enzyme assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food. Chem.* **139**, 509-514.
- Nieto, G., Ros, G., Castillo, J. (2018) Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, **5(3)**, 98. doi:10.3390/medicines5030098
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., Gibbons, S. (2004) Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus Officinalis*. *Phytochemistry*, **65(24)**, 3249–3254.
- Özcan, M. (2003) Antioxidant Activities of Rosemary, Sage, and Sumac Extracts and Their Combinations on Stability of Natural Peanut Oil. *J. Med. Food.* **6(3)**, 267–270.
- Özcan, M. M., Chalchat, J.C. (2008) Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) oil from Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **59(7-8)**, 691–698.
- Ozel, M. Z., Gogus, F., Lewis, A. C. (2003) Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chem.* **82(3)**, 381–386.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxi. Med. Cell. Longev.* **2(5)**, 270–278.

- Parađiković, N., Zeljković, S., Tkalec, M., Vinković, T., Dervić, I., Marić, M. (2013) Influence of rooting powder on propagation of sage (*Salvia Officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) with green cuttings. *Poljoprivreda*, **19(2)**, 10-15.
- Pérez-Fons, L., Garzón, M. T., Micol, V. (2010) Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. *J. Agric. Food Chem.* **58(1)**, 161–171.
- Pistelli L., Giovanelli S., D'Angiolillo F., Karkleva K., Leonardi M., Ambryszewska K., Cervelli C. (2018) Antioxidant Activity of Several Essential Oils from Different *Rosmarinus officinalis* Cultivars Grown in Sanremo (Italy). *Nat. Prod. Commun.* **13(9)**, 1167-1170.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012) Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* **30(1)**, 37–44.
- Rajbhar K., Dawa H., Mukundan U. (2014) Polyphenols: methods of extraction. *Sci. Rev. Chem. Comm.* **(51)**, 1-6.
- Rassem, H. H. A, Nour A. H., Yunus, R. M. (2016) Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **10(16)**, 117-127.
- Roselló-Soto, E., Martí-Quijal, F., Cilla, A., Munekata, P., Lorenzo, J., Remize, F., Barba, F. (2019) Influence of Temperature, Solvent and pH on the Selective Extraction of Phenolic Compounds from Tiger Nuts by-Products: Triple-TOF-LC-MS-MS Characterization. *Molecules*, **24(4)**, 797. doi:10.3390/molecules24040797
- Sadgrove, N., Jones, G. (2015) A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*, **5(1)**, 48–102.
- Sagawa, T., Ikeda, H., Hiraoka, T., Hayakawa, K. (2013) Study of Rosemary Peltate Glandular Trichomes Using Combined Morphological and Chemical Approach. *Food Sci. Technol. Res.* **19(3)**, 491–495.
- Santana-Méridas, O., Polissiou, M., Izquierdo-Melero, M. E., Astraka, K., Tarantilis, P. A., Herraiz-Peñalver, D., Sánchez-Vioque, R. (2014) *Polyphenol composition, antioxidant and bioplague activities of the solid residue from hydrodistillation of Rosmarinus officinalis L.* *Ind. Crops Prod.* **59**, 125–134.

Sasikumar B. (2004) Rosemary. U: Handbook of Herbs and Spices, (Peter, K.V., ured.) Woodhead Publishing Limited ,Cambridge/England, str. 243-255.

Singleton, V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, MD. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Sci. Food. Agric.* **87**, 2817–2822.

Suwal, S., Marciniak, A. (2019) Technologies for the Extraction, Separation and Purification of polyphenols – A Review. *Nepal Journal of Biotechnology*, **6(1)**, 74–91.

Svoboda, K.P., Svoboda, T.G., Syrrred, A. (2001) A Closer Look: Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants. *Herbal Gram.* **53**, 34-43.

Tchabo, W., Ma, Y., Engmann, F. N., Zhang, H. (2015) Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **63**, 214–225.

Tekin, K., Akalın, M. K., Şeker, M. G. (2015) Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Ind. Crops Prod.* **77**, 954–960.

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246

Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y. S. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem.* **99(4)**, 835–841.

Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. Chemat, F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **17(6)**:1066-74

Wu, H., Zhu, J., Yang, L., Wang, R., Wang, C. (2014) Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of phenolics from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) inflorescences and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Food Sci. Technol. Int.* **21(4)**, 306–319.

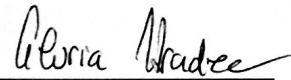
Zhou, Z., Shao, H., Han, X., Wang, K., Gong, C., Yang, X. (2017) The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila* L. barks by trienzyme-assisted extraction. *Ind. Crops Prod.* **97**, 401–408.

Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., Świeca, M. (2016) The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi J. Biol. Sci.* **23(5)**, 628–633.

Zurro, A., Lavecchia, R. (2013) Influence of Extraction Conditions on the Recovery of Phenolic Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *American Journal of Applied Sciences* **10(5)**: 478-486.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Gloria Hradec