

Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom u izolaciji polifenolnih spojeva iz korijena i lista maslačka

Mirković, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:081415>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Matea Mirković

725/N

**PRIMJENA EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE
MIKROVALOVIMA I
ULTRAZVUKOM U IZOLACIJI
POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ
KORIJENA I LISTA MASLAČKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć doc.dr.sc Danijele Bursać Kovačević i asistentice dr.sc Ivone Elez Garofulić.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr.sc. Verici na ukazanoj podršci, izdvojenom vremenu i predanom znanju, docentici dr.sc. Danijeli na njenom doprinosu ovom radu te asistentici dr.sc. Ivoni na njenoj ljubaznosti, pomoći i iskazanom znanju prilikom izrade ovoga rada. Najveće hvala mojim roditeljima bez čije bezuvjetne podrške sve ovo ne bi bilo ostvareno, mojim najdražim prijateljicama i mojem Branimiru koji su sa mnom slavili prolaze i trpjeli padove kako tijekom obrazovanja tako i u životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA I ULTRAZVUKOM U IZOLACIJI POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ KORIJENA I LISTA MASLAČKA

Matea Mirković, 725/N

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima korijena i lista maslačka. Kod obje metode ekstrakcija je provedena s 50 i 70 % vodenim otopinama etanola te vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta. Kod MAE su varirane temperature ekstrakcije te je ekstrakcija provedena pri 40 °C, 60 °C i 80 °C, a UAE je provedena pri amplitudi 50% i 100%. Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka primjenom MAE su temperatura ekstrakcije 60 °C, 70% vodena otopina etanola i vrijeme ekstrakcije od 15 minuta, dok je za list maslačka 40 °C, 50% vodena otopina etanola i 10 minuta. Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka primjenom UAE su amplituda 100%, 70% vodena otopina etanola i vrijeme ekstrakcije 10 minuta, dok su za list maslačka amplituda 50%, polarnost 50% i vrijeme ekstrakcije 15 minuta. Također je utvrđeno da se primjenom MAE pri navedenim uvjetima dobivaju veći prinosi ukupnih fenola u usporedbi s UAE.

Gljučne riječi: maslačak, polifenolni spojevi, ekstrakcija, mikrovalovi, ultrazvuk

Rad sadrži: 46 stranica, 12 slika, 4 tablice, 64 literaturni navod, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*

Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević, dr.sc. Ivona Elez Garofulić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
2. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac*
3. Izv.prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
4. Prof.dr.sc. *Branka Levaj(zamjena)*

Datum obrane: 27.rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

**APPLICATION OF MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION AND ULTRASOUND
ASSISTED EXTRACTION IN ISOLATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM
THE DANDELION ROOT AND LEAF**

Matea Mirković, 725/N

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) to the concentration of total phenols in extracts of dandelion roots and leaves. In both methods of extraction was carried out with 50 or 70% aqueous ethanol, and the extraction time of 5, 10 and 15 minutes. By MAE extraction temperature were varied, and the extraction was carried out at 40 ° C, 60 ° C and 80 °, and the UAE method was conducted at an amplitude of 50% and 100%. The optimum conditions for the isolation of phenol compounds from root of dandelion using MAE are the extraction temperature of 60 ° C, 70% aqueous ethanol, and the extraction time of 15 minutes, while the conditions for dandelion leaf are 40 ° C, 50% aqueous solution of ethanol in 10 minutes. The optimum conditions for the isolation of phenol compounds from root of dandelion using UAE are 100% amplitude, 70% aqueous ethanol, and the extraction time of 10 minutes, while the conditions for dandelion leaf are 50% amplitude, 50% aqueous ethanol and the extraction time of 15 minutes. It was also found that the application of the MAE methods in these conditions receive higher yields of total phenols in comparison to the UAE.

Keywords: *dandelion, polyphenolic compounds, extraction, micro waves, ultrasound*

Thesis contains: 46 pages, 12 figures, 4 tables, 64 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: *PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor; PhD. Ivona Elez Garofulić, Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
2. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
3. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Associate professor/Assistant professor
4. PhD. *Branka Levaj*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MASLAČAK (<i>Taraxacum officinale</i>)	3
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke	3
2.1.2. Kemijski sastav.....	4
2.1.3. Djelovanje i uporaba.....	5
2.2. FENOLNI SPOJEVI MASLAČKA.....	6
2.2.1. Flavonoidi.....	7
2.2.2. Fenolne kiseline i derivati.....	9
2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	11
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE).....	12
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE).....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI	19
3.1.1. Uzorci maslačka	19
3.1.2. Otapala i reagensi.....	19
3.1.3. Aparatura i pribor.....	20
3.2. METODE RADA.....	21
3.2.1. Izolacija fenolnih komponenti iz korijena i lista maslačka ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE).....	21
3.2.2. Izolacija fenolnih komponenti iz korijena i lista maslačka ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE).....	22
3.2.3. Princip određivanja ukupnih fenola.....	23
3.2.3.1. Priprema ekstrakata.....	23
3.2.3.2. Postupak određivanja.....	24
3.2.3.3. Izrada baždarnog pravca.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA (MAE)	27
4.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (UAE).....	33
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1.UVOD

Maslačak je široko rasprostranjena biljka koja raste od nizinskih do visokoplaninskih područja. Ubraja se među najpoznatije i prve proljetne korove, a često raste u velikom broju po travnjacima, livadama, vrtovima, uz puteve i živice. Izgled biljke ovisi o staništu i ekološkim uvjetima. Autohtona je vrsta samo u Europi i dijelu Azije, a poslije se proširila u mnoge zemlje sjeverne hemisfere.

Maslačak se od davnina rabi kao ljekovita biljka, a dokazano je da djeluje kao diuretik i kolagog, pospješuje funkciju bubrega i jetre, izlučivanje žuči te otvara apetit. Mnogi drevni narodi su smatrali kako maslačak liječi sve teške bolesti. Većina ovih svojstava pripisuje se upravo sadržaju raznih sekundarnih biljnih metabolita uključujući i fenole koji su bili predmet našeg istraživanja.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti te ujedno i jedna od najrasprostranjenijih skupina bioaktivnih spojeva. U biljci imaju različite biološke funkcije kao što su zaštita od patogena i UV zračenja, zaslužni su za pigmentaciju i senzorske karakteristike biljke. Od fenolnih komponenti maslačak sadrži flavonoide kao što su luteolin 7-glukozid, apigenin 7-glukozid i kvercetin 7-glukozid te nešto slobodnog kvercetina i luteolina. Prisutni su također kumarini umbeliferon, eksuletin i skopoletin te veće koncentracije cikorina. Od fenolnih kiselina maslačak sadrži klorogensku, kava, *p*-kumarinsku, ferulinsku, *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku, vanilinsku i siringinsku kiselina.

Istraživanja pokazuju kako u raznim medicinskim pripravcima (infuzije, ekstrakti korijena, ekstrakti cvijeta i lista, čajevi od lista ili cvijeta) značajno varira sadržaj navedenih fenolnih komponenta, stoga možemo zaključiti da je za izolaciju ovih komponenti vrlo važno utvrditi koja je metoda ekstrakcije najpogodnija i najefikasnija. Ekstrakcija polifenola provodi se različitim metodama ovisno o kemijskim svojstvima i strukturnoj različitosti fenolnih komponenti u uzorku. Kemijska struktura fenolnih spojeva ima važnu ulogu pri odabiru vrste i uvjeta ekstrakcije te osjetljivosti same ekstrakcije. Klasične metode ekstrakcije nemaju dovoljnu efikasnost, a također koriste mnogo otapala i energije, te se iz tog razloga sve više ispituju razne novije metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

(MAE, *eng.* microwave assisted extraction) i ekstrakcije potpomognuta ultrazvukom (UAE, *eng.* ultrasound assisted extraction). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazuje značajno skraćivanje vremena ekstrakcije i uporabe otapala u odnosu na klasične metode. Također ova metoda daje visoku efikasnost postupka, mogućnost odabira otapala (polarnog ili nepolarnog) i očuvanje termolabilnih komponenti uzorka. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom također pokazuje puno veću efikasnost i brzinu od klasičnih metoda, daje mogućnost ekstrakcije iz različito pripremljenih uzoraka (svježih i suhих) te daje puno veće prinose ekstrakcije.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dviju navedenih metoda ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu korijena i lista maslačka. Kod obje metode ispitan je utjecaj parametara ekstrakcije kao što su polarnost otapala (50 i 70% vodena otopina etanola), vrijeme trajanja ekstrakcije (5,10 i 15 minuta), dok je kod MAE kao izvor varijacija uzeta i temperatura ekstrakcije (40,60 i 80°C), a kod UAE amplituda 50% i 100%.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLAČAK (*Taraxacum officinale*)

2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

Maslačak je trajna, višegodišnja, zeljasta biljka s vrlo razvijenim korijenom iz kojeg izrasta rozeta krupno pilasto nazubljenog lišća, duguljastog i na vrhu proširenog, bez stabljike. Iz sredine rozete izdiže se do 30 cm visoka cvjetna stapka, bez lišća, okrugla, šuplja, nerazgranata, na čijem je vrhu zlatnožuti glavičast cvat, sastavljen od mnogih jezičastih cvjetova (Slika 1). Kad latice opadnu, ostaju sjemenke s perjanicom u obliku prozirne kugle (lampion), koje vjetar lako raznosi. Biljka je gorka i puna mliječnog soka koji curi čim se biljka otrgne. Korijen je vretenast, valjkast i prilično debeo i oko 20 cm dug, iznutra bijel, izvana crn, pun mliječnog soka (Gursky, 1999).

Raste na vlažnim livadama, travnjacima, pašnjacima, brežuljcima, šetalištima i vrtovima kao korov. Cvate od proljeća do jeseni. Za lijek se beru korijen i lišće: korijen potkraj ljeta i na početku jeseni, jer je tada najgorči i najljekovitiji, pun mliječnog soka, a lišće prije cvjetanja. Ako je korijen odrvenjen i iznutra crn nije dobar za uporabu (Gursky, 1999).



Slika 1. Maslačak (*Taraxacum officinale*) korijen, cvijet, list, sjemenka. (Anonymus, 2016)

Tablica 1. Sistematika maslačka (*Taraxacum officinale*)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Asterales</i>
Porodica	<i>Asteraceae</i>
Rod	<i>Taraxacum</i>
Vrsta	<i>Taraxacum officinale</i>

2.1.2. *Kemijski sastav*

Maslačak se ubraja u inulinske biljne droge. Umjesto škroba biljka stvara inulin čiji je sadržaj tijekom vegetacije vrlo promjenjiv. Korijen u proljeće sadrži svega 1-2% a u jesen i do 40% inulina (Kuštrak, 2005). Korijen također sadrži gorku tvar laktukopikrin, zatim seksviterpenske laktone kao što su taraksakolidglukozid i glukozid taraksinske kiseline. U mliječnom soku taraksasterol, triterpene te flavonoide (Gursky, 1999).

U proljeće u biljci prevladavaju gorke tvari: seksviterpenske kiseline i odgovarajući esteri (taraksinska kiselina i glikozid dihidrotaraksinske kiseline s β -D glukozom). Izolirani su i triterpenski alkoholi i tetraciklički triterpenoidi. Od fenolnih spojeva postoji kava kiselina, flavonoidi-apigenin i luteolin -7-glukozid te fitosteroli (sitosterol i stigmasterol) te karotenoidi. Uz visok sadržaj inulina u korijenu maslačka dokazana je i fruktoza (Kuštrak, 2005).

Listovi maslačka sadrže 18-60 mg vitamina C, 5-9 mg karoteina, 2,7% bjelančevina, 8% ugljikohidrata, 0,7% masti te mineralne soli s oko 5% kalija i 3,1 mg željeza (Gursky, 1999).

2.1.3. Djelovanje i uporaba

Ekstrakti maslačka uključujući ekstrakt lista, korijena i cvijeta, dugi niz godina koriste se u tradicionalnoj kineskoj i nativnoj-američkoj medicini za liječenje raka, hepatitisa i bolesti probavnog sustava (Yang i Li, 2015). Također pretpostavlja se da su maslačak kao lijek i povrće koristili stari Grci i Rimljani, a zapisi o njegovoj primjeni nalaze se i u arapskih liječnika. Za liječenje su se rabili svi dijelovi biljke. Ljekoviti su i korijen –*Taraxaci radix* i nadzemni dio biljke- *Taraxaci herba cum radice*. Uporaba maslačka je višestruka ali ponajprije djeluje kao kolagog i diuretik. Zahvaljujući tim svojstvima maslačak se u fitomedicini zadržao sve do danas (Kuštrak,2005).

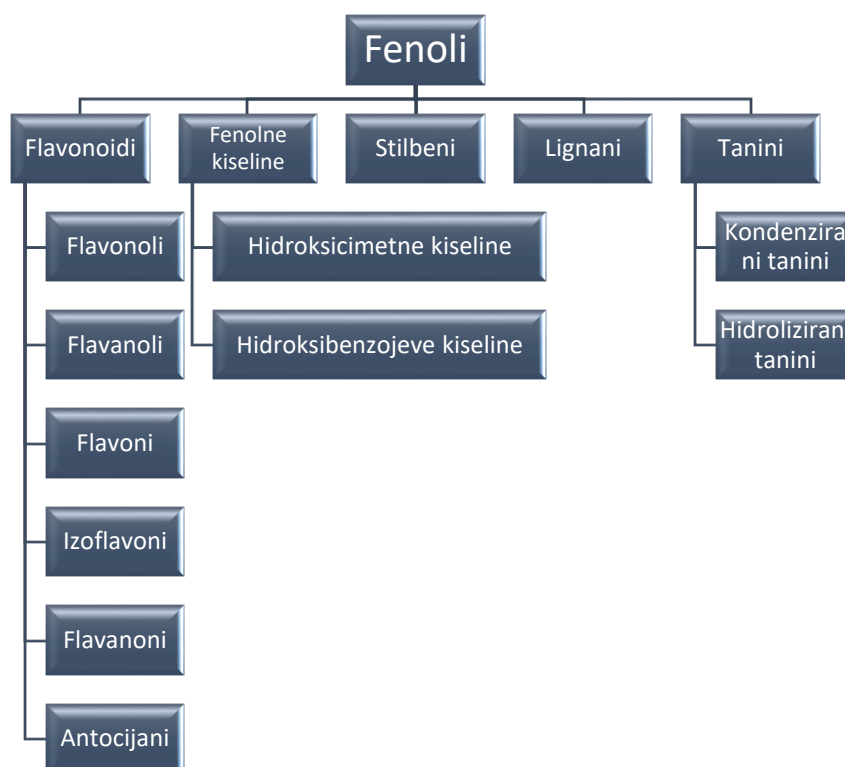
Zbog sadržaja gorkih tvari maslačak pojačava tek i probavu. U slučaju atonije crijeva i dispepsije služi kao blagi laksans i diuretik. Uzima se kao čaj ili ekstrakt. U rano proljeće služi kao salata koja se priprema od mladog lišća, ubranog prije cvatnje, i korijena rezanog na ploške (Gursky, 1999). On pospješuje funkcije jetre i bubrega, pospješuje sekreciju jetrenog parenhima i djeluje pri smetnjama istjecanja žući, potiče lučenje mokraće i pospješuje diurezu. Otvara apetit i djeluje pri dispeptičkim tegobama. Tekući ekstrakti maslačka pokazuju diuretsko i saleuretsko djelovanje u studijama na štakorima koje se može usporediti s djelovanjem diuretičkog lijeka furosema (Williams i sur.,1996). Ljekoviti oblici maslačka omogućuju bolju prokrvljenost vezivnog tkiva, a time i povoljno djeluju kad je riječ o bolestima mišića i zglobova, osobito gihta. Priređuje se i maslačkov sirup (od cvjetnih glavica) koji se preporučuje za pročišćavanje sluznice dišnih i probavnih organa. Od cvjetnih glavica priprema se i maslačkov med koji umnogome nalikuje pravome medu (Kuštrak, 2005).

Novija istraživanja pokazuju kako ekstrakti lista maslačka značajno štite stanice od UVB zračenja tako što smanjuju količinu nastalih reaktivnih kisikovih vrsta, kada se apliciraju prije ili neposredno nakon zračenja. Ekstrakti cvijeta i korijena maslačka stimuliraju sintezu glutationa koji također ima antioksidativnu ulogu u organizmu (Yang i Li, 2015). Rezultati *in vitro* studije pokazuju da ekstrakti maslačka imaju važnu ulogu u adipogenezi i metabolizmu lipida, te mogu imati potencijalnu ulogu u liječenju pretilosti (Gonzales-Castejan i sur., 2014). Studija provedena na štakorima pokazuje kako ekstrakt lista i korijena maslačka imaju protektivni učinak prilikom radiozračenja tako što smanjuju staničnu smrt u intestinalnom sustavu, štite intestinalnu mukozu te smanjuju sistemsku upalu (Tae- Jeong i Min, 2013).

2.2. FENOLNI SPOJEVI MASLAČKA

Fenolni spojevi ili polifenoli, su sekundarni biljni metaboliti koji imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, zaštiti protiv patogena i predatora (Bravo, 1998), te pridonose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća (Alasalvar i sur., 2001). Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Prisutni su u velikom broju biljnih vrsta u različitim koncentracijama a poznato ih je oko 8000 (Slika 2.) te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Harborne i Baxter, 1999).

U biljnom tkivu se obično pojavljuju vezani na druge molekule, najčešće glikozidnim skupinama, ali i sa sulfatnim ili acetilnim skupinama (Harborne, 1982). Većina fenolnih spojeva u biljnom tkivu nastaje biosintetskim putem iz aminokiselina fenilalanina ili tirozina. Ključni korak u tom biosintetskom putu je uvođenje jedne ili više hidroksilnih skupina u fenilnom prstenu te nastaje cijeli niz fenolnih spojeva: cimetne kiseline (C6-C3), benzojeve (C6-C1), flavonoidi (C6-C3-C6), proantocijanidi [(C6-C3-C6) n], kumarini (C6-C3), stilbeni (C6-C2-C6), lignani (C6-C3-C3-C6) i lignini [(C6-C3) n] (Seabra i sur., 2006).



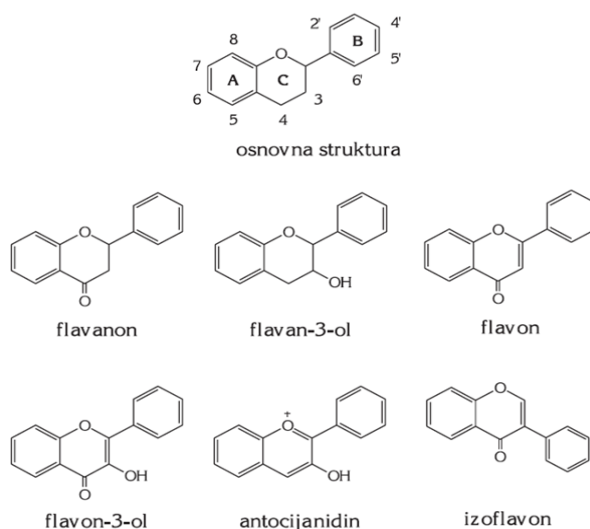
Slika 2. Podjela fenolnih spojeva (Erdman i sur., 2007)

Prema osnovnoj kemijskoj strukturi možemo ih podijeliti na:

- Flavonoide (polifenolne spojeve koji sadrže veći broj benzenskih prstenova u jednoj molekuli)
- Jednostavne fenole, fenolne kiseline i derivate (monofenolni spojevi koji sadrže jedan benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više OH skupina) (Katalinić i sur., 2010).

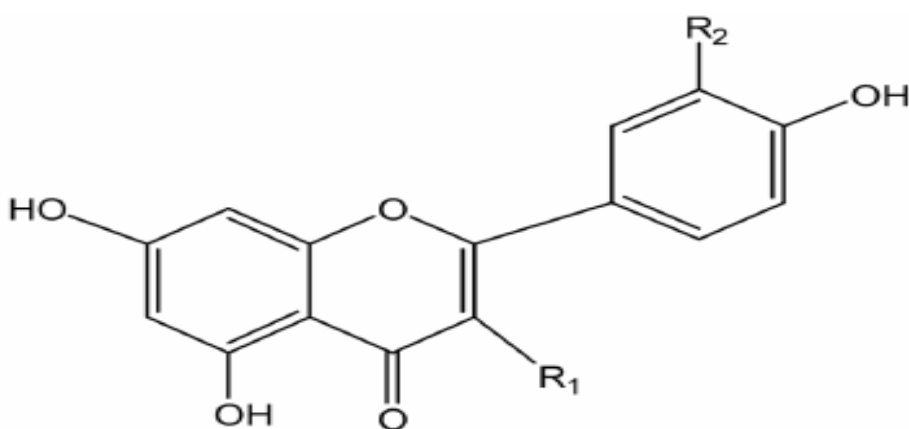
2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su velika skupina sekundarnih biljnih metabolita s istom osnovnom strukturom koju čine dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koji ima vezan kisik. U svijetu je trenutno identificirano preko 6400 flavonoida a u biljkama ih možemo naći u sjemenkama, lišću i cvijeću, pokožici ili kori voća te kori drveća. Dokazano je kako takvi spojevi imaju vrlo važnu ulogu u održavanju i zaštiti biljaka od patogena, što daje mogućnost takve uloge i u drugim živim bićima. Nakon apsorpcije putem probavnog ili dišnog sustava te putem kože pokazuju antioksidacijsko djelovanje jer djeluju kao donori vodika ili hvatači slobodnih radikala. Sukladno tome, nakon njihove apsorpcije u ljudskom organizmu dokazani su zaštitni učinci te smanjena incidencija bolesti srca i krvožilnog sustava te karcinoma (Teixeira i sur.,2014, Ramirez-Lopez, 2011). Ovisno o stupnju nezasićenosti, broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina te stupnju oksidacije C prstena flavonoidi se dijele na više podskupina (Slika 3).



Slika 3. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Usprkos dugoj povijesti uporabe maslačka kao biljnog lijeka, relativno je malo poznat kemijski sastav aktivnih komponenti u biljci. Ipak dosadašnjim studijama dokazana je prisutnost luteolin 7-glukozida i apigenin 7 -glukozida iz tkiva lista, nešto slobodnog kvercetina i luteolina (Slika 4.), kvercetin 7-glukozid, luteolin 7-rutinozid i izoramnetin 3-glukozid iz kombiniranog ekstrakta korijena i lista. Novija istraživanja također pokazuju prisutnost tri kumarina umbeliferon, eskuletin i skopoletin iz ekstrakta korijena (Schutz i sur.,2006). List maslačka također sadrži veće koncentracije cikorina (karakterističan za biljku Cikoriju) te askulina i njihovih glikozida (Wiliams i sur., 1996)(Tablica 2.).



Apigenin:	R₁ = OH, R₂ = H
Luteolin:	R₁ = H, R₂ = OH
Kvercetin:	R₁ = OH, R₂ = OH

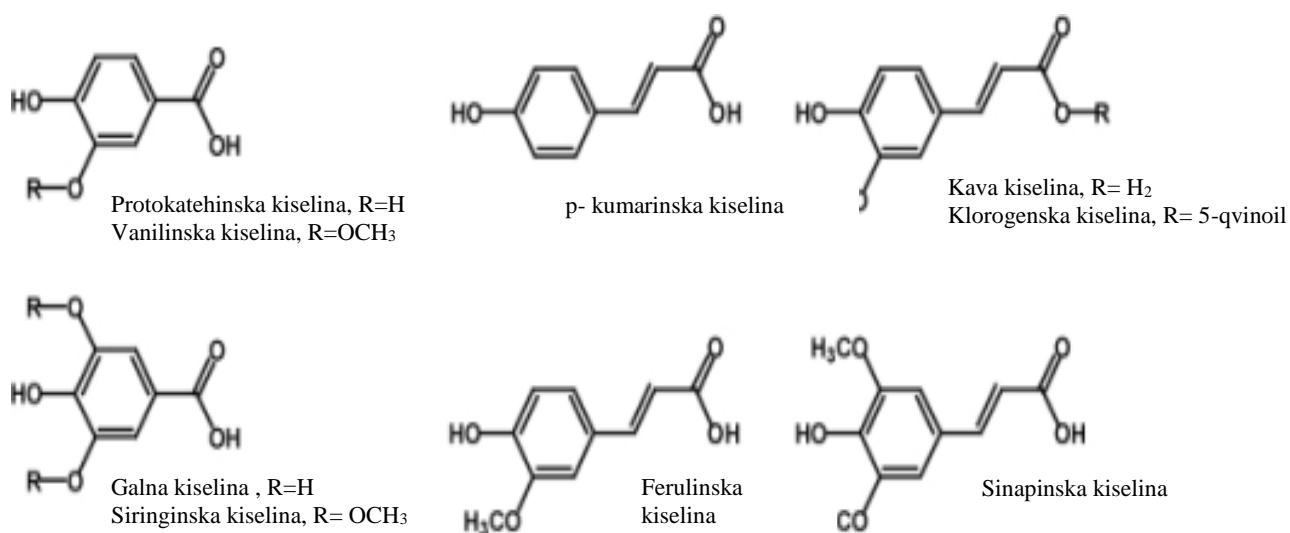
Slika 4. Kemijska struktura flavonoida (Bhandari i sur., 2013)

2.2.2 Fenolne kiseline i derivati

Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne grupe:

- **hidroksibenzojeve kiseline** (C_6-C_1) od kojih su najpoznatije kava kiselina, ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina i sinapinska kiselina. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku već su najčešće vezane u formi estera. Najpoznatiji ester je 5' kafeoilkina kiselina, poznatijeg imena klorogenska kiselina.
- **hidroksicimetne kiseline** (C_6-C_3) i njihovi derivati koji nastaju uglavnom izravno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne u slobodnom obliku. U ovu skupinu spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska, elaginska i salicilna kiselina (Santi i sur., 2010).

U maslačku se nalaze derivati hidroksicimetne kiseline, kava, klorogensku kiselinu i cikornu kiselinu iz korijena, te *p*-hidroksifenilacetatnu kiselinu iz ekstrakta korijena i lista u vrlo visokim koncentracijama. Korijen maslačka također sadrži visoke koncentracije cimetine kiseline (Williams i sur., 1996). Novija istraživanja dokazuju dosadašnje spoznaje ali također navode prisutnost većine poznatih fenolnih kiselina kao što su klorogenska, kava, *p*-kumarinska, ferulinska, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina (Slika 5.) u korijenu i listu maslačka. (Schutz i sur., 2006).



Slika 5. Kemijske strukture fenolnih kiselina (Tsao, 2010)

Tablica 2. Usporedba fenolnih komponenti u tkivima maslačka (Wiliams i sur.,1996).

Komponenta	List	Korijen	Cvijet
Luteolin7- glukozid	+	-	+
Luteolin7- diglukozid	+	-	+
Slobodni luteolin	-	-	++
Cikorna kiselina	++	++	++
Klorogenska kiselina	+	+	+
Cikorin	+	-	-
Askulin	+	-	-

2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija predstavlja prvi i najkritičniji korak u postupku određivanja fenolnih spojeva ali i ostalih biološki važnih spojeva iz biljnog materijala. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete same ekstrakcije, a da bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet potrebno je uzeti u obzir prirodu biljnog materijala i ciljanih skupina spojeva. Fenolni spojevi se najčešće ekstrahiraju u stanju u kojem se koriste za uporabu, a materijal također može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli. Pri odabiru prikladne metode ekstrakcije treba uzeti u obzir lipofilnost/hidrofilnost spojeva te prema tome odabrati odgovarajuće otapalo.

Za izolaciju fenolnih komponenti najčešće se upotrebljavaju ekstrakcija otapalima i ekstrakcija superkritičnim plinovima (Ignat i sur., 2011). Kemijska struktura fenolnih spojeva ima važnu ulogu pri odabiru vrste i uvjeta ekstrakcije te osjetljivosti ekstrakcije (Bimakr i sur., 2011).

Ekstrakcija različitim vrstama otapala najčešće se koristi prilikom pripreme biljnih ekstrakata zbog njene efikasnosti i širokog spektra primjenjivosti. Efikasnost ekstrakcije odnosno udio fenolnih komponenti u ekstraktu uvelike ovisi o polarnosti odabranog otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije te o fizikalnim i kemijskim svojstvima ekstrahiranog uzorka. Topljivost fenolnih spojeva ovisi o kemijskoj strukturi spojeva koji se ekstrahiraju te polarnosti ekstrakcijskog otapala (Bimakr i sur., 2011). Prilikom ekstrakcije iz biljnog materijala uz fenolne komponente može doći i do ekstrahiranja drugih spojeva kao što su šećeri, organske kiseline, masti, proteini, pigmenti i druge tvari koje mogu ometati proces izolacije pa se moraju ukloniti iz uzorka (Dai i Mumper, 2010).

Otapala koja se najčešće koriste prilikom ekstrakcije su:

- metanol (Ross i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011)
- etanol (Altiok i sur., 2008; Ross i sur., 2009; Wang i sur., 2009; Bimakr i sur., 2011)
- aceton (Naczki i Shahidi, 2006; Altiok i sur., 2008)
- etil-acetat i njegove vodene otopine (Robards, 2003)

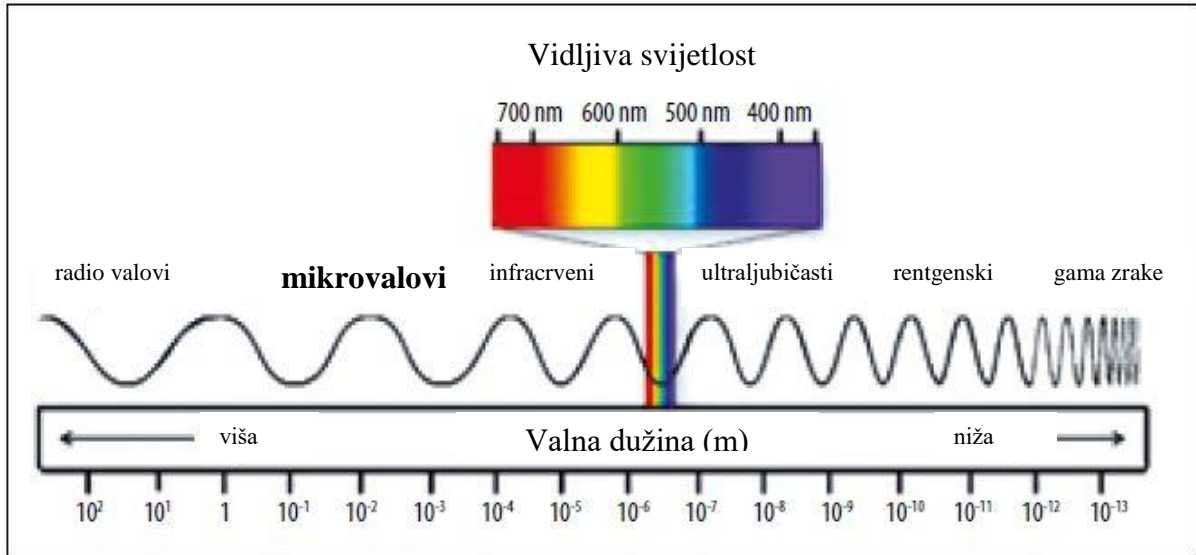
Prilikom klasične ekstrakcije otapala koja se najčešće upotrebljavaju su metanol i etanol s različitim udjelom organskih otapala u vodenoj fazi. Metanol se smatra učinkovitijim ekstrakcijskim otapalom jer omogućuje ekstrakciju 20% više fenolnih komponenti nego kada se ekstrakcija vrši etanolom. (Kapasakalidis i sur.,2006). Također metanol je učinkovitiji za ekstrakciju fenolnih spojeva niže molekulske mase, dok je aceton pogodniji za ekstrakciju flavanola viših molekularnih masa iz voća (Prior i sur., 2001; Guyot i sur., 2001). Usprkos tome što je metanol učinkovitiji, u industrijskim procesima za ekstrakciju fenola iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, radi manje toksičnosti (Ignat i sur., 2011; Bimakr i sur., 2011).

Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Stoga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*eng.* microwave-assisted extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* ultrasound-assisted extractions, UAE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (*eng.* high pressurized liquid extraction, HPLE) te ubrzana ekstrakcija otapalom (*eng.* accelerated solvent extraction, ASE).

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva oscilirajuća perpendikularna polja: električnog i magnetnog polja. Energija mikrovalova je neionizirajuće zračenje frekvencije između 300 MHz i 300 GHz, te valne duljine od 1mm do 1m (Slika 6.). Mikrovalovi se mogu koristiti kao nosioci informacija ili kao energetske vektori. Uloga energetskih vektora je direktna uloga valova na materiju koja apsorbira dio elektromagnetske energije i transformira ju u toplinu (Wang i Weller, 2006). Sam princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na direktnom djelovanju mikrovalova na molekule ciljnog materijala. Transformacija elektromagnetske energije u toplinsku odvija se kroz dva mehanizma: ionskom kondukcijom i rotacijom dipola u otapalu i matriksu uzorka. Ionska kondukcija događa se radi elektroforetske migracije iona pod utjecajem elektromagnetnog polja. Otpor topline ovakvom gibanju iona te sudari među molekulama koji su posljedica mijenjanja smjera gibanja iona. Mijenjanjem magnetnog polja dolazi do frikcije a time i grijanja otopine (Ganzler i sur.,1990). Rotacija dipola povezana je s dodatnim gibanjem polarnih molekula

koje sadrže dipolne momente (stalne ili inducirane električnim poljem) koji se pokušavaju uskladiti s nametnutim elektromagnetskim poljem. Kako se električno polje smanjuje tako se povećava entropija sustava što rezultira oslobađanjem topline (Destandau i sur., 2013).



Slika 6. Valna duljina mikrovalova

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima danas se najčešće koristi za ekstrakciju prirodnih komponenti iz biljnog materijala zbog značajne redukcije vremena ekstrakcije i uporabe otapala, te dokazane efikasnosti. Zračenje mikrovalovima prilikom ekstrakcije služi zagrijavanju otapala s uzorkom radi pospješivanja samog postupka ekstrakcije. Tretiranjem biljnog materijala zračenjem mikrovalova tijekom ekstrakcije uglavnom se postiže povećanje ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita (kao što su i fenoli) te tvari arome (Starmans i sur.,1996). Zagrijavanjem vode u matriksu uzorka dolazi do oslobađanja vodene pare u stanicama što rezultira puknućem staničnih membrana. Kako se većina sekundarnih metabolita nalaze u membrani ili citoplazmi stanice, na ovaj način se pospješuje difuzija sekundarnih metabolita u otapalo te ulazak otapala u biljni materijal (Starmans i sur.,1996). U slučaju ekstrakcije biljnog materijala učinak energije mikrovalova u najvećoj mjeri ovisi o prirodi otapala i matriksa uzorka. U većini slučajeva odabrano otapalo ima visoku dielektričnu konstantu što omogućuje da snažno apsorbira energiju mikrovalova. Ipak u nekim slučajevima može se zagrijavati samo matriks uzorka kako bi se ekstrahirane tvari oslobodile u hladno otapalo. Na taj način se sprečava degradacija termolabilnih komponenti (Destandau i sur.,2013).

Selekcija parametara i njihovih vrijednosti ovisi o topljivosti i stabilnosti ciljnih komponenti ali također i o interakcijama između drugih komponenti prisutnih u biljnom materijalu. Parametri koji utječu na proces ekstrakcije su:

- Odabir otapala

Neovisno o tome koja se vrsta ekstrakcije provodi, odabir prikladnog otapala važan je za postizanje optimalnih uvjeta ekstrakcije. MAE se obično provodi sa istim otapalima kao u slučaju tradicionalne ekstrakcije. Odabir otapala za MAE ovisi o topivosti ciljnih komponenta i interakcijama između otapala i biljnog materijala, ali također i o sposobnosti apsorpcije mikrovalova što diktira dielektrična konstanta otapala (Destandau i sur., 2013). Otapala koja se najčešće koriste su metanol (Mandal i sur.,2007;Zhang i sur.,2008;Martino i sur.,2006), etanol (Lianfu i Zelong, 2008; Li i sur., 2012). Mandal i suradnici (2007) također sugeriraju smjesu etanola i heksana kao dobro otapalo za MAE.

- Temperatura i tlak

Temperatura je važan parametar za sve tipove ekstrakcije jer doprinosi povećanju dobivenog ekstrakta. Povećanjem temperature otapalo ima veći kapacitet za otapanje ciljnih komponenti, površinska napetost i viskoznost otapala se smanjuju što pomaže vlaženju matriksa uzorka i penetraciji otapala. Za MAE temperatura ovisi o sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalove i jačini energije.Ukoliko temperatura prijeđe temperaturu vrenja otapala tlak postaje važna varijabla. Tlak direktno ovisi o temperaturi i omogućuje zagrijavanje iznad temperatura vrenja u zatvorenom sustavu. U slučaju ekstrakcije termolabilnih komponenta visoke temperature mogu dovesti do degradacije, što se može spriječiti uvođenjem tlaka u proces ekstrakcije (Hemwimon i sur., 2007). U radu Liozida i suradnika (2007) istražena je stabilnost fenolnih komponenti(katehina, kumarina, stilbena, flavona i fenolnih kiselina) pri rasponu temperature od 50°C do 175°C te je zaključeno kako su komponente stabilne do 100°C dok je kod 125°C primijećena značajna degradacija epikatehina, resveratrola i miricetina. Iznad 125°C došlo je do značajne degradacije svih fenolnih komponenti.

- Vrijeme ekstrakcije

Jedna od glavnih prednosti MAE je vrlo kratko vrijeme ekstrakcije (minute ili sekunde) u usporedbi s drugim konvencionalnim metodama. Trajanje ekstrakcije varira ovisno o učincima vremena zračenja na mehanizme interakcija između mikrovalova i materijala kao što su biljne stanice, ciljne komponente i nečistoće. U slučaju ekstrakcije termolabilnih komponenti duga ekstrakcija može dovesti do degradacije. Ekstrakcija se također može provoditi u kraćim ciklusima umjesto jednog duljeg procesa, što povećava razinu ekstrahiranih tvari u konačnom ekstraktu (Destandau i sur., 2013). MAE metoda ekstrakcije polifenola bilježi porast analita u ekstraktu do četvrte minute ekstrakcije, a nakon toga se smanjuje (Mandal i sur., 2007). Najčešće se ekstrakcija provodi u vremenu od 30 sekundi do 5 minuta (Ballard i sur., 2010; Zhang i sur., 2008).

- Snaga mikrovalova

Snaga mora biti ispravno podešena kako bi se minimiziralo vrijeme potrebno za postizanje odgovarajuće temperature a da ne dođe do pregrijavanja sustava odnosno prevelikog tlaka ako se radi o zatvorenom sustavu. Treba također paziti da pod povećanom snagom sustava kroz dulji vremenski period ne dođe do isparavanja otapala. Snaga mikrovalova koja se najčešće koristi je 600W-1000W za zatvoreni sustav i 250W za otvoreni sustav (Kaufman i Christen, 2002). Generalno jačina od 30 do 150W pozitivno utječu na prinose ekstrakcije (Mandal i sur., 2007).

- Svojstva matriksa uzorka

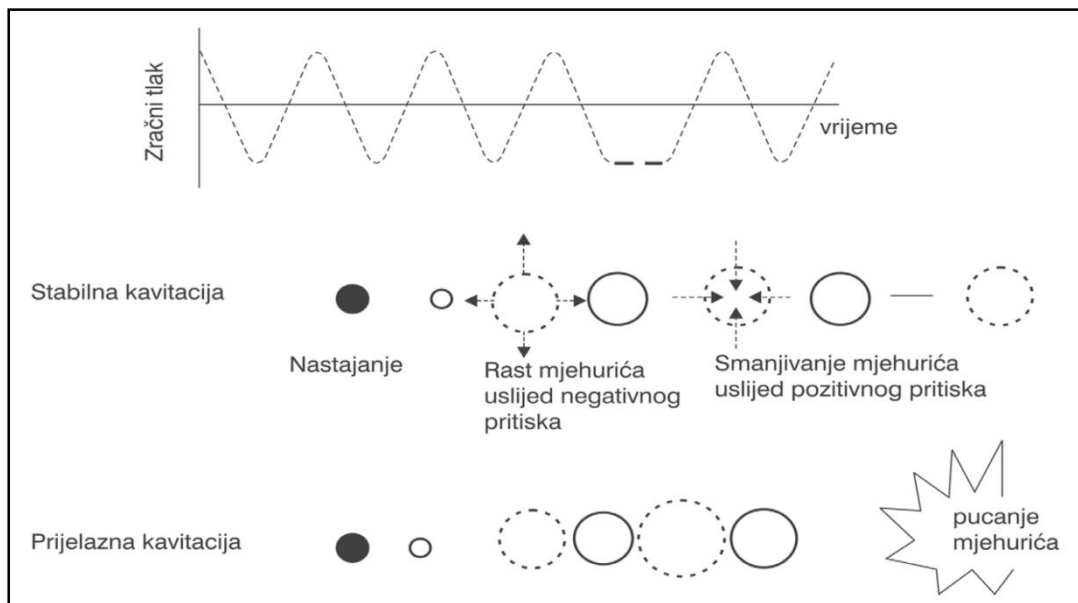
Svojstva matriksa uzorka mogu značajno utjecati na proces ekstrakcije. Dodana ili prirodno prisutna voda u uzorku vrlo je važna jer molekule vode imaju visok dipolni moment i stoga jako apsorbiraju mikrovalove. Suhi sirovi materijal se zato prije ekstrakcije rehidrira vodom kako bi se poboljšala ekstrakcija. Također kod nekih uzoraka (npr. sjemenki) pri ekstrakciji ulja korisno je namakanje u vodi prije same ekstrakcije.

Veličina čestica biljnog materijala i njihova distribucija mogu znatno utjecati na MAE. Preporučena veličina čestica je 100 μ m-2mm (Wang i Weller, 2006).

2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Uporaba ultrazvuka smatra se obećavajućom i inovativnom metodom 21.stoljeća sa širokom uporabom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i kemijskoj industriji. Ultrazvuk je mehanički val koji se prenosi putem elastičnog medija, a od zvučnog vala razlikuje se svojom frekvencijom. Frekvencija zvuka koju ljudski organizam može detektirati je od 16Hz do 20kHz, dok frekvencija ultrazvuka uključuje raspon od 20kHz do 10MHz. Glavni fizički parametri koji karakteriziraju ultrazvučni val su snaga (W), frekvencija (Hz) i valna duljina (cm) iz kojih se računa jakost ultrazvuka (I)(Mason i sur.,2005). Usprkos primarnoj uporabi za čišćenje površina i pribora, ultrazvučni uređaji imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Radi širokog raspona mogućih frekvencija i snage ultrazvuk ima različite efekte što omogućuje široki raspon primjena. Ultrazvuk se može koristiti za rezanje, inaktivaciju mikroorganizama i enzima, homogenizaciju, emulgiranje, filtraciju, kristalizaciju i smrzavanje, sušenje, kuhanje, odzračivanje i ekstrakciju (Pingret i sur.,2013).

Učinci ultrazvuka u tekućem mediju uglavnom su vezani uz fenomen kavitacije (Slika 7.) koji nastaje fizičkim procesom koji stvara, povećava i smanjuje mikro mjehuriće plina otopljenog u tekućini (McClements, 1995). Molekule od kojih je građen tekući medij zbijene su zajedno privlačnim silama. Kada ultrazvučni val prolazi kroz medij uzrokuje dislociranje i sudaranje molekula. Mjehurići plina koji nastaju kavitacijom rastu dok ne dođu do kritične točke pri kojoj pucaju te se generiraju toplinske točke u mediju. Takve toplinske točke drastično ubrzavaju kemijsku reaktivnost medija. Prilikom ekstrakcije tvari iz biljnog materijala mikro mjehurići kavitacije koji nastaju u blizini biljnog matriksa, pucaju te razvijaju toplinu što pokreće sustav. Visoki tlak i temperatura, uključeni u proces, razaraju membrane stanica u biljnom matriksu i time dolazi do otpuštanja ciljnih komponenta u otapalo (Mason i sur., 2005; Suslik i sur., 1991).



Slika 7. Stabilna i prijelazna kavitacija (Kujipers i sur., 2002)

Najvažniji parametri koji utječu na UAE su:

- Fizički parametri uređaja

S obzirom da je ultrazvuk mehanički val, frekvencija, valna duljina i amplituda utječu na proces kavitacije tj. stvaranja mikro mjehurića a time i na samu ekstrakciju. Za ekstrakciju se najčešće koristi frekvencija od 20kHz do 50kHz dok se za odabir odgovarajuće valne duljine uzima u obzir izvor ultrazvuka i medij u kojem se provodi ekstrakcija (Pingret i sur.,2013).

- Odabir otapala

Pri odabiru ekstrakcijskog otapala treba uzeti u obzir topljivost ciljnih komponenti u otapalu te parametre kao što su viskoznost, površinska napetost i tlak pare medija. Ovi parametri značajno utječu na proces kavitacije a time i na samu ekstrakciju. Idealno otapalo za UAE bi trebalo imati nizak tlak pare i visoku sposobnost otapanja ciljnih komponenti iz uzorka(Santos i sur., 2002). Otapalo koja se najčešće koriste etanol i to polarosti 50 - 60% (Wang i sur.,2008; Ghafoor i sur.,2009), a uglavnom 75% (Khan i sur., 2007; Chen i sur., 2007).

- Temperatura

Prilikom ekstrakcije, povišenje temperature može rezultirati povećanjem efikasnosti zbog povećanja broja mjehurića i kontakte površine između otapala i uzorka. Također dolazi do povećanja difuznosti otapala i veće topljivosti ciljnih komponenti. Usprkos tome, ovakav učinak se smanjuje kako se temperatura približava točki vrenja otapala. Također treba imati na umu da se povišenjem temperature ekstrakcija nestabilnih i termolabilnih komponenti smanjuje, te je stoga optimizacija temperature za svaki proces ekstrakcije vrlo važna (Zhang i sur., 2008). Najoptimalnije temperature koje se koriste kod UAE metode su 40 °C za ekstrakciju polifenola iz cvijeta naranče (Khan i sur., 2010), 56 °C za ekstrakciju fenola iz sjemenke grožđa (Ghafoor i sur.,2009), te 60 °C za ekstrakciju fenolnih komponenti iz pšeničnih mekinja (Wang i sur.,2008).

- Prisutnost otopljenih plinova

S obzirom da kavitacijski mjehurići nastaju iz plinova otopljenih u tekućini, odsutnost plinova drastično smanjuje njihovu produkciju. Ipak, ni prevelika koncentracija plinova nije poželjna jer se time značajno ubrzava produkcija mjehurića. Mjehurići prebrzo rastu te ne dolazi do njihovog pucanja. Tada bi otapalo ključalo bez pojave kavitacije (Santos i sur.,2002; Zhang i sur., 2008).

- Svojstva matriksa uzorka

Uzorak za UAE može biti u svježem ili sušenom obliku. Ukoliko se koristi sušeno uzorak prije provođenja ekstrakcije uzorak se mora rehidrirati (Pingret i sur.,2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci maslačka

Istraživanje je provedeno na biljnim preparatima maslačka i to listu *Taraxaci folium* (porodica *Cichoriaceae*) i korijenu *Taraxaci radix* (*Taraxacum officinale*), nabavljenim u suradnji sa Suban d.o.o. (biljni preparati su sakupljeni na području RH te osušeni). Biljni preparati lista i korijena maslačka su samljeveni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolce Vita CG1, Italy) u fini prah, a pomoću laserskog analizatora (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) određena je veličina čestica ($d \leq 500$ mikrona). Dobiveni prah je korišten za ekstrakcije fenolnih spojeva.

3.1.2. Otopala i reagensi

- Etanol, 96%-tni, (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 50 i 70% (v/v)
- Folin-Ciocalteu reagens, (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Na_2CO_3), (Lach-Ner, Neratovice Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
 - Priprema: 200 g anhidrida natrijevog karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerno tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.
- Galna kiselina, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Standard galne kiseline
 - Priprema: U plastičnoj ladici za vaganje odvaži se 500 mg galne kiseline te se pomoću 10 mL 96% - tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Nakon toga se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

3.1.3. Aparatura i pribor

1. Analitička vaga (METTLER), $\pm 0,0001$ g
2. Mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis)
3. Centrifuga (HETTICH, Rotofix 32)
4. Hladilo
5. Klor-kalcijeva cijev
6. Staklene čaše (100mL)
7. Menzure, volumena 100mL i 1L
8. Stakleni štapić
9. Stakleni lijevci za filtraciju
10. Pipete (20 i 25 mL)
11. Odmjerne tikvice volumena 50 mL
12. Erlenmeyer-ove tikvice volumena 25 mL
13. Magnetski mješači
14. Plastične epruvete (Falcon)
15. Filter papir
16. Mikser (Mixy, Zepter International)
17. Ultrazvučni prosesor-Misonix S-400 (Misonix Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD)
18. Ultrazvučne sonde od titanija: 19,1 mm (Misonix Sonicators)
19. Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija fenolnih komponenti iz korijena i lista maslačka ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)

Odvaže se 0,5g samljevenog uzorka s točnošću $\pm 0,0001$ g homogenizira se s 20mL otapala za ekstrakciju (etanol, 50% i 70%) u tikvici sa šlifom okruglog dna volumena 50 mL. Tikvica s uzorkom u koju je ubačen i magnetski mješač, postavlja se na predviđeni prostor na postolju u mikrovalnom reaktoru (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis). Na tikvicu se spoji hladilo s klor-kalcijevom cijevi. Na mikrovalnom reaktoru postave se opći parametri ekstrakcije:

- snaga od 100W do 300W kako bi se postigla odgovarajuća temperatura,
- miješanje – 80%,
- ventilacija nakon ekstrakcije – 2 min
- ekstrakcija prema zadanim parametrima (Tablica 3.)

Tablica 3. Parametri provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Uzorak	Polarnost (%)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
Korijen/list maslačka	50	40	5
			10
			15
		60	5
			10
			15
		80	5
			10
			15
	70	40	5
			10
			15
		60	5
			10
			15
80	5		
	10		
	15		

Nakon ekstrakcije uzorci se kvantitativno prebace u odmjerne tikvice od 25 mL koje se do oznake nadopune otapalom koje je korišteno za ekstrakciju. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem se oddekanira od nastalog taloga (profiltrira se ukoliko je potrebno) u čiste plastične epruvete (Falcon) od 50 mL. Ekstrakti se čuvaju na temperaturi -18°C do trenutka određivanja fenolnih spojeva.

3.2.2. . Izolacija fenolnih komponenti iz korijena i lista maslačka ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE)

Na analitičkoj vagi u plastičnoj lađici odvažuje se 2 g ($\pm 0,0001$) uzorka praha lista (*Taraxaci folium*) i korijena maslačka (*Taraxaci radix*). Uzorak se zatim kvantitativno pomoću 80 mL ekstrakcijskog otapala (50% ili 70 %-tna vodena otopina etanola) prenese u staklenu laboratorijsku čašu volumena 200 mL te se podvrgava tretiranju ultrazvukom visokog intenziteta. Ultrazvučna sonda (Misonix Sonicators) ima vibrirajući titanski vrh (19,1mm) koji je direktno uronjen u ekstrakt tijekom provedbe ekstrakcije na dubinu od 2 cm. Temperatura tretiranja tijekom ekstrakcije pratila se termočlankom (HI 9063, Hanna Instruments ltd., Leighton Buzzard LU74AD, UK), koji je priključen na ultrazvučni procesor (Misonix S-400, Misonix Sonicators, Newton, Connecticut, SAD). Frekvencija upotrijebljenog ultrazvuka bila je 20 kHz, a maksimalna izlazna snaga ultrazvuka bila je 600 W. Ekstrakcija se provodila prema zadanim uvjetima (Tablica 4.).

Tablica 4. Parametri provedbe ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Uzorak	Sonda (mm)	Amplituda (%)	Polarnost (%)	Vrijeme (min)
Korijen/list maslačka	19,1	50	50	5
				10
				15
			70	5
				10
				15
		100	50	5
				10
				15
			70	5
				10
				15

Nakon provedbe ekstrakcije uzorci se centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem se oddekanira od nastalog taloga (profiltrira se ukoliko je potrebno) u čiste plastične epruvete (Falcon). Ekstrakti se čuvaju na temperaturi -18°C do trenutka određivanja fenolnih spojeva.

3.2.3. Princip određivanja ukupnih fenola

Fenolni spojevi se mogu analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske su jednostavne i praktične, a za određivanje ukupnih fenola najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari nastaje plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

3.2.3.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2. Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Razrjeđenja:

Ekstrakti lista maslačka dobiveni MAE metodom prije analize razrijeđeni su 5 puta. Ekstrakti korijena maslačka dobiveni MAE metodom prije analize nisu bili razrijeđivani. Ekstrakti lista maslačka dobiveni UAE metodom prije analize razrijeđeni su 5 puta. Ekstrakti korijena maslačka dobiveni UAE metodom prije analize razrijeđeni su 2 puta.

Svi ekstrakti razrijeđeni su destiliranom vodom.

3.2.3.2. Postupak određivanja

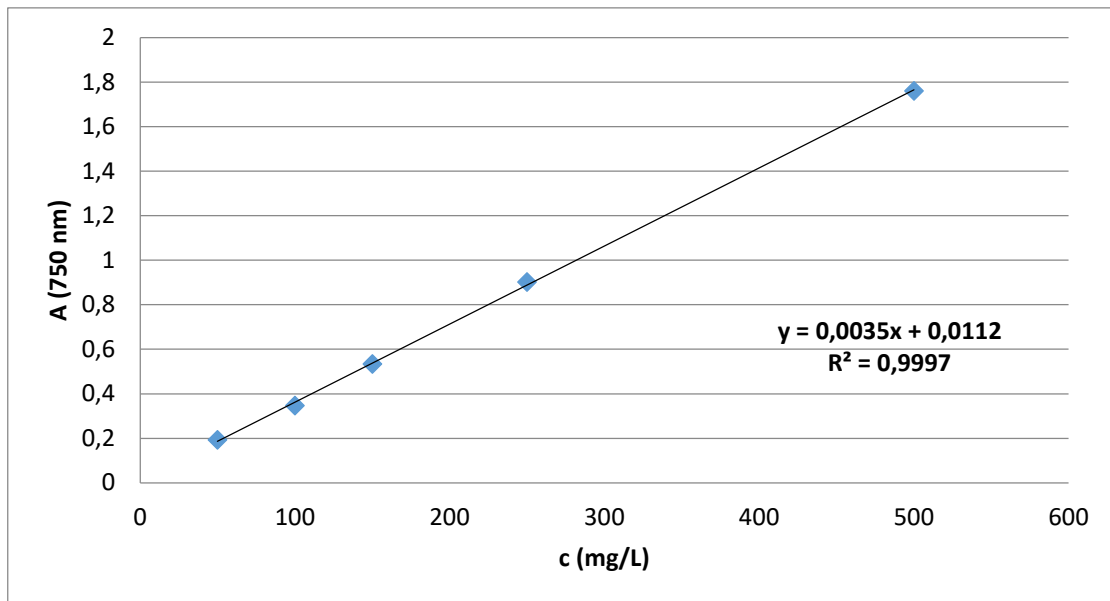
U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa. Zatim se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi od 50°C (u kupelji od rotavapora). Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima destilirana voda. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbanacija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

3.2.3.3. Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola. Otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline se u odmjernim tikvicama od 100 mL rade razrjeđenja tako da se redom otpipetira 1, 2, 3 i 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i do oznake nadopune destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 50, 100, 150 i 250 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u kupelji od rotavapora. Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbanacija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm (Slika 8). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola.



Slika 8. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad R^2 = 0,9997$$

gdje je :

Y- apsorbancija pri 765 nm,

X- koncentracija galne kiseline (mg/L).

R²- koeficijent determinacije

4.REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola iz ekstrakata korijena i lista maslačka dobivenih različitim metodama ekstrakcije (MAE ili UAE). Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocolateu reagensom kao što je navedeno u poglavlju 3.2., te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija.

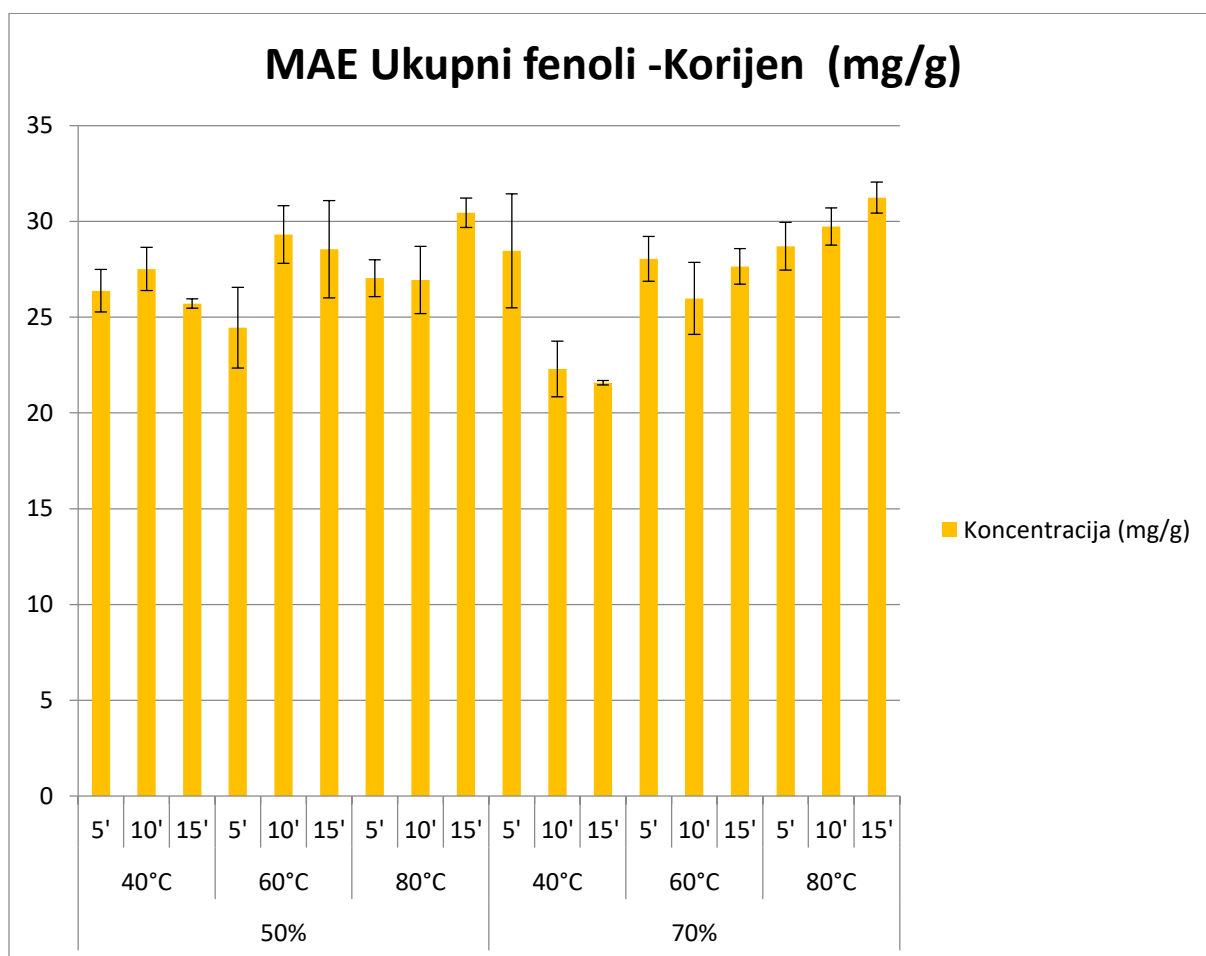
Eksperimentalni podaci dobiveni mjerenjem obrađeni su u MS Excel programu, te su prikazani u ovisnosti o parametrima pri kojima se provodila ekstrakcija. Parametri koji su varirani tijekom provođenja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su polarnost otapala, temperatura te vrijeme trajanja ekstrakcije. Prilikom provođenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom varirana je amplituda valova, polarnost otapala te vrijeme ekstrakcije. Također su uspoređeni rezultati s obzirom na sadržaj ukupnih fenola iz ekstrakta korijena u usporedbi s ekstraktom lista, i rezultati dobiveni različitim metodama ekstrakcije (MAE i UAE).

Rezultati su podijeljeni u dva poglavlja prema provedenoj metodi ekstrakcije.

Slike 9. i 10. prikazuju koncentracije ukupnih fenola iz ekstrakta korijena i lista maslačka u ovisnosti o polarnosti otapala (50% i 70%), temperaturi (40 °C, 60 °C i 80 °C) i trajanju ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

Slike 11. i 12. prikazuju koncentracije ukupnih fenola iz ekstrakta korijena i lista maslačka u ovisnosti o valnoj amplitudi (50% i 100%), polarnosti otapala (50% i 70%) i trajanju ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom.

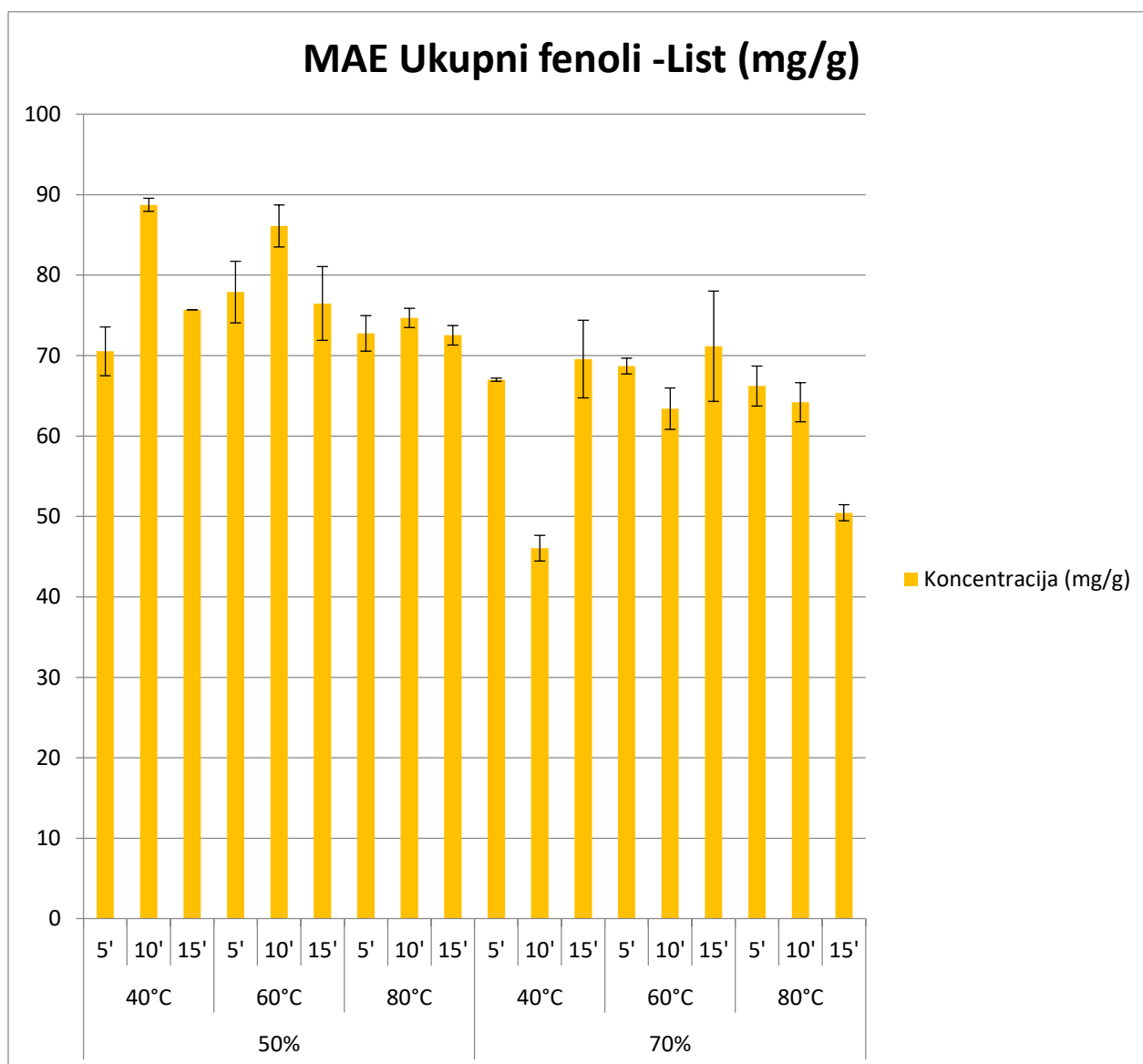
4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA



Slika 9. Utjecaj polarnosti otapala, temperature i trajanja ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola ekstrakta korijena maslačka

Na slici 9. prikazane su koncentracije ukupnih fenola u ekstraktu korijena maslačka u ovisnosti o polarnosti otapala, temperaturi i vremenu ekstrakcije. U ekstraktima koji su dobiveni s 50% vodenom otopinom etanola bolji prinosi ukupnih fenola dobiveni su pri višim temperaturama. Vrijeme ekstrakcije pri temperaturi od 40 °C nije imalo utjecaj na prinos ukupnih fenola. Pri temperaturama ekstrakcije 60 i 80 °C bolji prinos ukupnih fenola dobiven je pri dužem vremenu ekstrakcije. Najviša koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu korijena maslačka dobivenom s 50% vodenom otopinom etanola određena je pri temperaturi od 80 °C i trajanju od 15 minuta, a iznosila je 30,45 mg/g.

Sličan trend uočen je i u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu 70% vodene otopine etanola. Također je utvrđen veći prinos ukupnih fenola u ekstraktima koji su dobiveni pri višim temperaturama. Visoka koncentracija ukupnih fenola pri 40 °C određena je već nakon 5 minuta ekstrakcije, a povećanjem vremena ekstrakcije vrijednosti su se smanjivale. Pri 60 °C dobivene su podjednake vrijednosti pri svim vremenima ekstrakcije, dok se pri 80 °C koncentracija ukupnih fenola povećavala s povećanjem vremena ekstrakcije. Najveća koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima korijena maslačka dobivenim sa 70 % vodenom otopinom etanola određena je pri temperaturi 80 °C te trajanje ekstrakcije od 15 minuta (31,25 mg/g). Usporedimo li ekstrakte dobivene sa 50 % vodenom otopinom etanola i 70% vodenom otopinom etanola, pri istim uvjetima ekstrakcije, ne uočava se značajna razlika u koncentracijama ukupnih fenola. Nešto veća odstupanja uočena su u ekstraktima koji su dobiveni pri 40 °C. To nas navodi na zaključak da se oba otapala mogu učinkovito koristiti u izolaciji ukupnih fenola.



Slika 10. Utjecaj polarnosti otapala, temperature i trajanja ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola ekstrakta lista maslačka.

Slika 10. prikazuje rezultate određivanja koncentracije fenola u ekstraktu lista maslačka. Ekstrakti dobiveni s 50% vodenom otopinom etanola daju najviše prinose ekstrakcije, te su bolji prinosi primijećeni pri nižim temperaturama. Pri temperaturi od 80°C vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola, dok se za temperature od 40°C i 60°C pokazalo optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije 10 minuta. Najviše koncentracija fenola u ekstraktima lista maslačka dobivenim s 50% vodenom otopinom etanola određene su pri 40°C i trajanju od 10 minuta (88,74 mg/g) te pri 60°C i trajanju od 10 minuta (86,11mg/g). Sličan trend što se tiče temperature zamijećen je i u

ekstraktima dobivenim uz primjenu 70% vodene otopine etanola. Veći prinos ukupnih fenola utvrđen je u ekstraktima dobivenim pri nižim temperaturama. Najviša koncentracija ukupnih fenola pri 40 °C određena je nakon 15 minuta ekstrakcije, dok za temperaturu od 60 °C vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj. Najveći prinos ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim pri 80 °C određen je već nakon 5 minuta ekstrakcije, a povećanjem vremena ekstrakcije vrijednosti su se smanjivale. Najveća koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima lista maslačka dobivenim s 70% vodenom otopinom etanola određena je pri temperaturi od 60 °C i 15 minuta, a iznosila je 71,16 mg/g. Usporedbom najviših određenih koncentracija iz ekstrakata dobivenih primjenom 50% vodene otopine etanola i 70% vodene otopine etanola, možemo zaključiti kako je za izolaciju ukupnih fenola iz lista maslačka učinkovitije otapalo 50% vodena otopina etanola.

Prema dobivenim rezultatima oba uzorka i korijena i lista maslačka možemo zaključiti kako su fenolne komponente više zastupljene u listu nego korijenu maslačka što može imati važnu ulogu pri odabiru materijala u terapijskom djelovanju.

Prema istraživanju Mandala i sur. (2007) koji su proveli ekstrakciju fenolnih kiselina i kumarina iz cvijeta *Melilotus officinalis* optimalno otapalo za ekstrakciju fenolnih kiselina je 80% metanol. Također navode da je otapalo koje se najčešće koristi za provođenje MAE etanol u smjesi sa heksanom. Što se tiče trajanja ekstrakcije navode da općenito dulje vrijeme ekstrakcije daje veći udio analita u ekstraktu, što je u skladu s rezultatima ove studije, ali postoji rizik od degradacije. Ekstrakcija polifenola metodom MAE bilježi porast analita do 4. minute a nakon toga se koncentracija smanjuje. U radu je zaključeno kako su pri ekstrakciji polifenola iz čaja optimalni uvjeti polarnost otapala od 50%, vrijeme ekstrakcije 4 minute. Također prilikom ekstrakcije kumarina iz cvijeta *Melilotus officinalis* optimalni uvjeti su polarnost otapala 50% i vrijeme ekstrakcije 10 minuta što je u skladu s rezultatima ove studije.

Li i suradnici (2012) proveli su istraživanje utjecaja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na ekstrakciju fenola s maksimalnom antioksidacijskom aktivnošću iz rajčice. Nakon provedene FRAP i ORAC metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, rezultati su evaluirani pomoću RSM metodologije (*eng.* response surface methodology).

Zaključeno je kako su optimalni uvjeti za FRAP metodu polarnost otapala 66%, temperatura od 96 °C i 2 minute ekstrakcije, te za ORAC polarnost otapala 61%, temperatura 96 °C i 1, 6 minuta ekstrakcije. Ovakvi rezultati pokazuju značajne razlike u trajanju ekstrakcije s obzirom na rezultate dobivene ovom studijom ali se razlika može pripisati različitoj konzistenciji i tkivu materijala koji je korišten za ekstrakciju. Također ekstrakcija je provedena pri sniženom tlaku što može uzrokovati razliku u rezultatima s obzirom da su rezultati ove studije dobiveni ekstrakcijom pri atmosferskom tlaku.

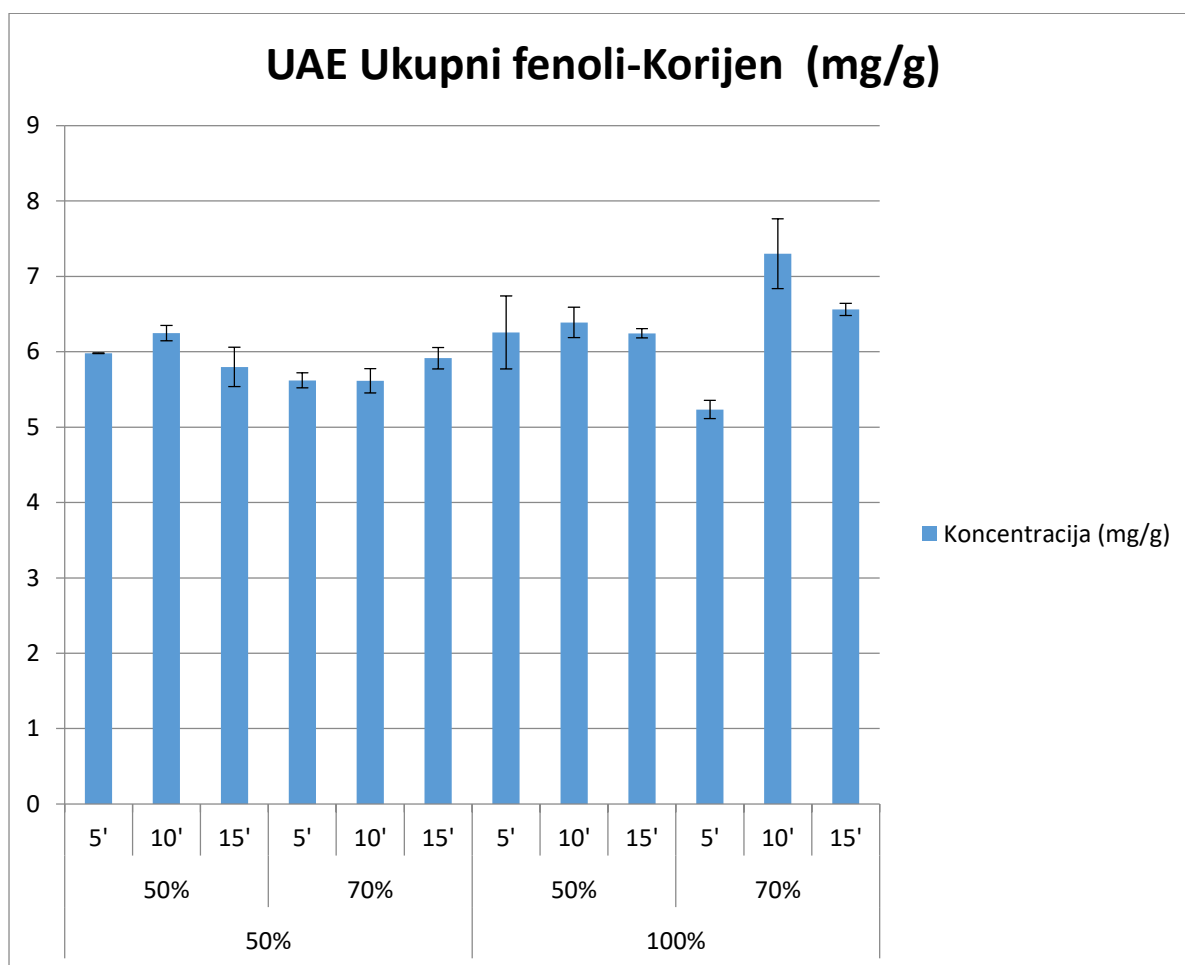
Studija koju su proveli Zhang i suradnici (2008) prilikom koje je provedena MAE metoda ekstrakcije klorogenske kiseline iz pupoljaka *Lonicere Japonice* bilježi najveće koncentracije analita u ekstraktu prilikom ekstrakcije provedene s etanolom polarnosti 50%, temperaturom od 60 °C i trajanju ekstrakcije od 5 minuta što uglavnom odgovara rezultatima ove studije s izuzevši nešto kraće vrijeme ekstrakcije u usporedbi s ovim radom.

Martino i suradnici (2006) prilikom ekstrakcije kumarina iz biljnog materijala zaključuju kako su optimalni uvjeti ekstrakcije etanol polarnosti 50%, temperatura od 50 °C te trajanje ekstrakcije u dva ciklusa po 5 minuta. Takve rezultate pokazuje i ekstrakcija iz lista maslačka navedena u ovom radu izuzevši vrijeme ekstrakcije odnosno provedbu ekstrakcije u dva ciklusa što u ovom radu nije bio slučaj.

Prema istraživanju Dragović-Uzelac i suradnika (2012) koji su proveli ekstrakciju polifenola iz kadulje optimalni uvjeti za ekstrakciju su snaga 500W, vrijeme ekstrakcije od 9 minuta te 30% polarnost otapala (etanol i aceton). Vrijeme ekstrakcije je u skladu s rezultatima ove studije dok polarnost značajnije varira.

Simić i suradnici (2015) u svom radu ispitali su optimalne uvjete ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju polifenola iz aronije. Varirana je snaga (300W, 450W i 600W), polarnost otapala etanola (25%, 50% i 75%) te vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta). Određena je koncentracija ukupnih fenola u uzorcima te su statistički dobivene optimalne vrijednosti : snaga od 300W, polarnost otapala 53,6% i 5 minuta ekstrakcije. Rezultati odgovaraju rezultatima ove studije vezano uz polarnost otapala i snagu, dok je vrijeme ekstrakcije nešto kraće.

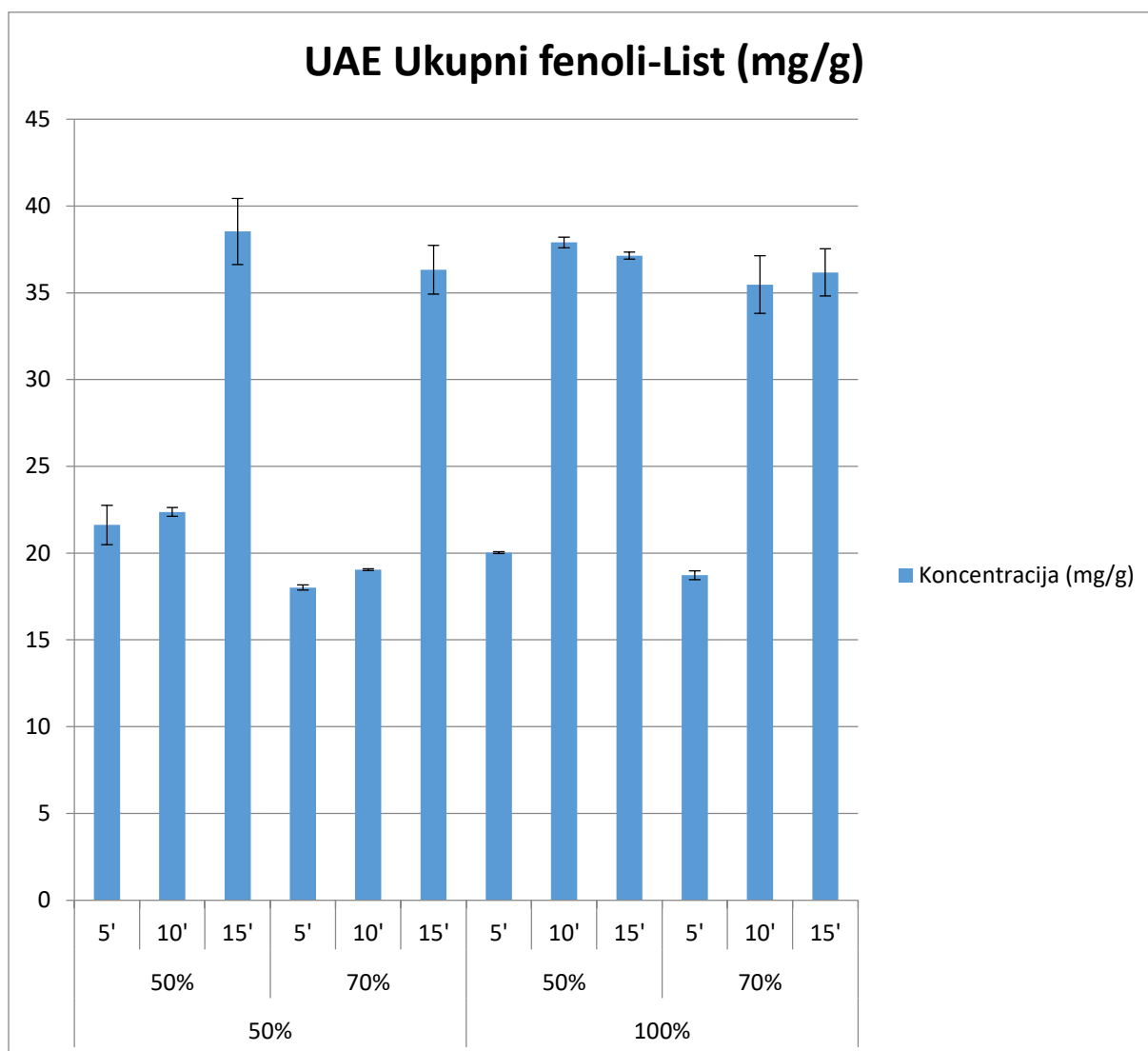
4.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM



Slika 11. Utjecaj amplitude, polarnosti otapala i trajanja ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktu korijena maslačka.

Slika 11. prikazuje koncentracije ukupnih fenola u ekstraktu korijena maslačka u ovisnosti o amplitudi, polarnosti otapala i vremenu ekstrakcije. U ekstraktima koji su dobiveni pri 50% amplitudi zamijećeni su nešto niži prinosi nego u onima dobivenim primjenom 100% amplitude. Također više koncentracije ukupnih fenola pri amplitudi od 50% primijećene su prilikom primjene 50% vodene otopine etanola i pri duljem trajanju ekstrakcije. Isti trend što se tiče trajanja ekstrakcije vrijedi i za ekstrakte dobivene sa 70% vodenom otopinom etanola. Najviša koncentracija ukupnih fenola određena pri 50% amplitudi je dobivena primjenom 50% vodene otopine etanola i 10 minuta trajanja ekstrakcije, a iznosila je 6,25 mg/g. U ekstraktima korijena maslačka dobivenim primjenom 100% amplitude veće prinose daju uzorci dobiveni sa 70% vodenom otopinom etanola. Također vrijeme trajanja ekstrakcije nije

imalo značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola u uzorcima dobivenim s 50% vodenom otopinom etanola, dok su za 70% vodenu otopinu etanola najveći prinosi dobiveni pri 10 minuta. Najviša koncentracija ukupnih fenola iz korijena maslačka određena je pri 100% amplitudi, 70% vodenoj otopini etanola i 10 minuta trajanja ekstrakcije te je iznosila 7,3 mg/g. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je za određivanje ukupnih fenola iz korijena maslačka najefikasnije otapalo 70% vodena otopina etanola te primjena 100% amplitude valova.



Slika 12. Utjecaj amplitude, polarnosti otapala i trajanja ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktu lista maslačka.

Slikom 12. prikazane su koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima lista maslačka u ovisnosti o amplitudi, polarnosti otapala i trajanju ekstrakcije. Ekstrakti dobiveni primjenom 50% amplitude pokazuju vrlo slične rezultate prilikom primjene obje vrste otapala (50% i 70% vodene otopine etanola). U oba slučaja najveći prinosi ukupnih fenola dobiveni su pri 15 minuta ekstrakcije, ipak nešto više vrijednosti primijećene su u uzorcima dobivenim s 50% vodenom otopinom etanola. Najviša koncentracija ukupnih fenola iz lista maslačka primjenom 50% amplitude određena je pri 50% vodenoj otopini etanola i 15 minuta (38,53 mg/g). Isti trend primijećen je i za uzorke dobivene primjenom 100% amplitude. Najveći prinosi dobiveni su pri duljem trajanju ekstrakcije za obje vrste otapala a najveća

koncentracija ukupnih fenola iz lista maslačka dobivena je pri 50% vodenoj otopini etanola i 10 minuta ekstrakcije (37,9 mg/g). Može se zaključiti kako su za određivanje ukupnih fenola iz lista maslačka pogodne obje amplitude i obje vrste otapala (50% i 70% vodena otopina etanola), a najveći utjecaj na prinos ukupnih fenola ima vrijeme ekstrakcije.

Wang i suradnici (2008) proveli su UAE metodu ekstrakcije fenolnih komponenti iz pšeničnih mekinja. Cilj rada bio je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije pri čemu su testirani polarnost i vrijeme ekstrakcije. Zaključili su kako su optimalni uvjeti polarnost otapala od 64% te trajanje ekstrakcije od 20 minuta. Jedan od glavnih zaključaka je također da je vrijeme najvažniji parametar što se tiče ukupnog prinosa ekstrakcije, što podupiru i rezultati ove studije prikazani Slikom 12.

Khan i suradnici (2010) istražili su utjecaj parametara (snaga ultrazvuka, polarnost i temperatura ekstrakcije) na ekstrakciju polifenola iz kore naranče. Prema RSM (*eng.* response surface) metodologiji zaključeno je kako su optimalni uvjeti temperatura od 40 °C, snaga od 150W te polarnost otapala 75%. Snaga korištena u ovoj studiji varirala je od 31 do 66W a temperatura od 17 do 75 °C. Najviša koncentracija ukupnih fenola u ovoj studiji zabilježena je za list maslačka pri snazi od 56W, a za cvijet 37W što je značajno manje nego u navedenom radu. Optimalna polarnost otapala u navedenom radu je 75% dok su za ovaj rad oba otapala (50% i 70% vodena otopina etanola) bila pogodna za ekstrakciju.

Chen i suradnici (2007) proveli su ekstrakciju antocijana iz malina te im je glavni cilj studije bio odrediti optimalne uvjete ekstrakcije. Pomoću CCRD (*eng.* central composite rotate design) metode određeni su optimalni parametri: 75% polarnost, i vrijeme ekstrakcije 3,3 minute. Polarnost otapala je slična kao i u ovom radu dok se vrijeme ekstrakcije znatno razlikuje. Autori navode kako vrijeme ekstrakcije izrazito ovisi o upotrebnoj snazi ultrazvuka stoga je nepodudarnost rezultata posljedica upotrebe različite snage. U navedenom radu upotrebljena snaga je 400 W dok je u ovom radu korištena snaga 31-66W.

Ghafoor i suradnici (2009) u svom istraživanju proveli su UAE metodu ekstrakcije fenola, antioksidansa i antocijana iz sjemenki grožđa. Najpovoljniji uvjeti ekstrakcije koji su rezultirali najvećim izdvajanjem fenola su dobiveni RSM metodologijom a to su: polarnost

otapala 54%, temperatura od 56 °C i 29 minuta ekstrakcije. Također je utvrđeno kako je vrijeme najutjecajniji parametar na udio ukupnih fenola u ekstraktu što je zaključeno i kao glavni rezultat u ovoj studiji.

Jedan od glavnih ciljeva ovog rada, uz određivanje optimalnih parametara ekstrakcije, bio je utvrditi koja metoda ekstrakcije daje bolje prinose tj. koja je metoda efikasnija. Iz grafova možemo zaključiti da se značajno veće koncentracije ukupnih fenola u uzorku postižu kada se koristi ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Ovakvi rezultati dobiveni su i za ekstrakte korijena i lista maslačka. Rezultati dobiveni MAE metodom u prosjeku su 337% veći nego oni dobiveni UAE metodom kada govorimo o uzorcima korijena maslačka, dok su rezultati uzoraka lista maslačka prosječno 174% veći za MAE u usporedbi s UAE pri istim uvjetima ekstrakcije.

Većina istraživanja potvrđuje ovakve rezultate kao npr. istraživanje Bagherian i suradnika (2011) u kojem je glavni cilj rada bio usporediti konvencionalne metode ekstrakcije s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom te ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima prilikom ekstrakcije pektina iz grejpfruta. Rezultati studije sugeriraju kako najbolje prinose daje ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

Istraživanje Casazza i suradnika (2010) također daje pregled usporedbe nekonvencionalnih metoda ekstrakcije (MAE, UAE, HPAE) prilikom ekstrakcije polifenola iz otpadnih produkta vinove loze. Najviše koncentracije fenola dobivene su ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (HPAE) ali ipak uzorci s najvećim antioksidativnim svojstvima dobiveni su ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

Aspé i Fernandez (2011) u svom istraživanju proveli su četiri metode ekstrakcije (maceraciju, ekstrakciju po Soxlet-u, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom) prilikom ekstrakcije ukupnih fenola i određivanja antioksidativnog djelovanja ekstrakata iz kore *Pinus radiata*. Kao i u rezultatima navedenim u ovom istraživanju zaključeno je kako ekstrakte s najvišim antioksidativnim svojstvima daje ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

5.ZAKLJUČCI

1. Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju fenolnih spojeva iz uzorka korijena maslačka su: otapalo etanol polarnosti 70%, temperatura ekstrakcije 80°C, te trajanje ekstrakcije od 15 minuta. Pri tim uvjetima dobivena vrijednost ukupnih fenolnih spojeva u korijenu maslačka je $31,25 \pm 0,81$ mg GA/g.
2. Za izolaciju fenolnih komponenti iz uzorka lista maslačka pomoću ekstrakcije potpomognute mikrovalovima optimalni uvjeti su, etanol polarnosti 50%, temperatura ekstrakcije 40°C, te trajanje ekstrakcije je nešto kraće u odnosu na uzorak korijena, a iznosi 10 minuta. Koncentracija ukupnih fenola lista maslačka izolirana pri tim uvjetima iznosi $88,74 \pm 0,80$ mg GA/g.
3. Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za uzorak korijena maslačka su amplituda 100%, otapalo etanol polarnosti 70% i trajanje ekstrakcije od 10 minuta, pri čemu je dobivena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u korijenu maslačka $7,3 \pm 0,46$ mg GA/g. Ovakva vrijednost je značajno niža nego ona dobivena ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.
4. Prilikom izolacije fenolnih komponenti iz uzorka lista maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom optimalni uvjeti su amplituda 50%, etanol polarnosti otapala 50% i trajanje ekstrakcije od 15 minuta. Pri tim uvjetima, dobivena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iznosi $38,53 \pm 1,91$ mg GA/g, što je također puno niža vrijednost nego ona dobivena ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.
5. Primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) dobiveni su veći prinosi tj. izolirana je veća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva iz korijena i lista maslačka u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (UAE). Rezultati dobiveni MAE metodom u prosjeku su 337% veći nego oni dobiveni UAE metodom kada govorimo o uzorcima korijena maslačka, dok su rezultati uzoraka lista maslačka prosječno 174% veći za MAE u usporedbi s UAE pri istim uvjetima ekstrakcije.

6.LITERATURA

Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., Shahidi, F. (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1410–1416.

Altıok, E., Bayçin, D., Bayraktar, O., Ülkü, S. (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, **62**, 342-348.

Anonymus,2016https://www.google.hr/search?q=taraxacum+officinale&biw=1600&bih=770&source=lnms&tbn=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjIpuOa3ZvPAhUfKywKH WtRA0YQ_AUIBigB#imgrc=dmgIYS2pgzLRkM%3A

Aspé, E., Fernandez, K. (2011) The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolics, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* bark. *Industrial Crops and Products*. **34**, 838-844.

Bagherian, H.,Ashtiani, F.Z., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011) Comparison between conventional, microwave – and ultrasound- assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Proces Intensification*. **50**, 1237-1243.

Ballard, S.T., Malikarjunan, P., Zhou, K., O'Keffe, S. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*. **120**, 1185-1192.

Berend, S., Grabarić, Z. Flow-injection method in determining food polyphenol. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **59**, 205-212.

Bhandari, P., Kumar, N., Singh, B., Gupta, P., Kaul, V.K., Ahuja P.S. (2013) HPTLC Flavonoids

Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, **89**, 67-72.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Camel, V., (2000) *Trends Anal. Chem.* **19**, 229.

Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Duong, S., Laughher, D., Jones, R. (2007) Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **105**, 691-699.

Casazza, A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P. (2010) Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*. **100**, 50-55.

Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007) Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using HPLC-MS. *Ultrasonics Sonochemistry*. **14**, 767-778.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.

Destandau, E., Michel, T., Elfakir, C. (2013) Microwave - assisted Extraction, U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado, J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113-135.

Dragović-Uzelac, V., Elez Grofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The influence of Microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 377-383.

Erdman, J.W. Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J. (2007) Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31- June 1, 2005, Washington, DC. *J. Nutr.* **137**, 718S-737S.

Ganzler, K., Szinai, I., Salgo, A. (1990) *A. J. Chromatogr. A.* **520**, 257.

Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and antocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 4988-4994.

Gonzales-Castejan, M., Garcia-Carrasco, B., Fernandez-Dacosta, R., Davalos, A., Rodriguez-Casado, A. (2014) Reduction of adipogenesis and lipid accumulation by *Taraxacum officinale* (Dandelion) extracts in 3T3L1 adipocytes: An in vitro study. *Phytotherapy Research.* **28**, 745-752.

Gursky, Z. (1999) Zlatna knjiga ljekovitog bilja, 5. izd., Nakladni Zavod Matice Hrvatske, str. 347, 348

Guyot, S., Marnet, N., Drilleau, J. (2001) Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 14-20.

Harborne, J. B., Baxter, H., Moss, G. P. (1999) *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants*, 2. izd., Taylor & Francis, London.

Harborne, J.B. (1980) *Plant Phenolics. U: Encyclopidia of Plant Physiology, New Series*, vol 8, (Bell, E.A., Charlwood, B.V., ured.), Springer-Verlag, Berlin.

Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A.(2007) *Sep. Purif. Technol.* **54**,44.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **126**, 1821-1835.

Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., Gordon, M.H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4016-4021.

Katalinić, V., Miloš, M., Jukić, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550-557.

Kaufman, B., Christen, P. (2002) *Phytochem. Anal.* **13**, 105.

Khan, K.M., Abert-Vian, M., Fabiano Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. **119**, 851-858.

Kuštrak, D. (2005) Farmakognozija Fitofarmacija, Golden Marketing-Tehnička knjiga, Zagreb

Li,H., Deng, Z., Wu, T.,Liu, R., Loewen, S., Tsao, R.(2012) Microwave assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, **130**, 928-936.

Lianfu, Z., Zelong, L.(2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted esxtraction (UAE) of lycopene from tomatoes.

Mandal, V., Mohan, Y.,Hemaltha, S.(2007) Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, **1**, 7-18.

Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006) Microwave-assisted extraction of coumarina and related compounds from *Melliotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Cromatography A*, **1125**, 147-151.

Mason, T.J., Riera, E., Vercet, A., Buesa Lopez, P. (2005) U:Emerging Technologies for Food Processing,(Sun, D.W.) Academic Press, str. 323.

McClements, D.J.(1995) *Trends Food Science Technology*. **6**, 293.

Naczki, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523–1542.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013) Ultrasound - assisted Extraction. U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado, J.M., ed.), The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str.89-109.

Prior, R.L., Lazarus, S.A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J.F. (2001) Identification of procyanidins and antocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1270-1276.

Ramirez-Lopez, L.M. (2011) Characterization of phenolic compounds in cynthiana (*Vitis aestivalis*). Department of Animal Science Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University.

Robards, K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**, 657-691.

Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D. (2009) A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, **113**, 336-344.

Rostagno, M.A., Villares,Guillamon, E.,Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A. (2009) *Journal of Chromatography A*. **1216**, 2.

Santi, M.M., Dipjyoti, C., Satyahari, D. (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant microbe symbioses. *Plant Signal Behav*, **5**, 359-368.

Santos, H.M., Lodeino, C., Capelo-Martinez J.L.(2002) *U: Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Wiley, str. 171.

Schutz , K., Carle, R., Schieber, A. (2006) Taraxacum – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 313-323.

Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006) In *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms*; Fingerman, M., Nagabhushanam, R. Eds.; Science Publishers: Enfield, NH, USA, 115-174.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P.(2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science*. **98 (4)**, 828-834.

Simić, V.M., Rajković, K.M., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, L.M., Karabegović, I.T. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*. **160**, 89-97.

Starmans, D.A.J., Njhuis, H.H. (1996) *Trends Food Sci. Technol.* **7**,191.

Suslick, K.S., Didenko, Y., Fang, M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., McNamara, W.B., Mdeleleni, M.M., Wong, M.(1991) *Phil.Trans.R.Soc.Lond.A*. **357**, 335.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.

Toe-Jeong, J., Min, B. (2013) Radioprotective effects of dandelion(*Taraxacum officinale*). *The Journal of the Korea Contents Association.* **13**, 287-293.

Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*

Veberič, R. (2010) Bioactive compounds in fruit plants, El. Knjiga, Ljubljana.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry.* **106**(2), 804-810.

Wang, Z-h., Hsu, C-c., Yin, M-c. (2009) Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. *Food Chemistry*, **112**, 914-918.

Williams, C.A., Goldstone, F., Greenham, J. (1996) Flavonoids, cinamic acids and coumarins from the different tissues and medical preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, **42**, 121-127.

Wong, L., Weller, C.L.(2006) *Trends Food Sci. Technol.* **17**,300.

Yang, Y., Li, S. (2015) Dandelion extracts protect human skin fibroblasts from UVB damage and cellular senescence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2015**, 619560.

Zhang, B, Yang, R., Liu, C.Z. (2008) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera Japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology*, **62**, 480-483.

Zhang, S.Z, Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X.D. Mao, Z.M. (2008) *Sep. Pur. Technol.* **62**, 513.