

Izolacija bioaktivnih spojeva iz koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Maras, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:145728>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marta Maras,
1095/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ KOPRIVE
PRIMJENOM UBRZANE
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI
POVIŠENOM TLAKU**

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta “Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma” (PlantBioPower, IP-01-2018-4924) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno–tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć Valentine Kruk, mag. ing. techn. aliment i dr. sc. Predraga Putnika, poslijedoktoranda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se dragoj mentorici, doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na pruženoj prilici, strpljenju i posvećenom vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na stručnim, ali i prijateljskim savjetima! Veliko hvala mag. ing. Valentini Kruk na pruženoj pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju i dr. sc. Predragu Putniku na pomoći oko obrade podataka.

Hvala dragim prijateljima koji su zasigurno obilježili ovaj period u mom životu. Hvala vam na pruženoj potpori, druženju i nezaboravnim trenucima tijekom studiranja na PBF-u.

Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene tijekom ovih godina studiranja.

Najveće hvala Ivanu, mom najvjernijem navijaču i najvećoj potpori u životu koji je uvijek bio uz mene kada je najviše trebalo. Ovo je još jedan naš uspjeh!

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

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ KOPRIVE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Marta Maras, 1095/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz listova koprive (*Urtica dioica* L.) primjenom ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo, ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: (i) statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min); (ii) broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 i 4 ciklusa); te (iii) temperatura (20 i 50 °C). U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, karotenoida te klorofila *a* i *b*. Rezultati istraživanja su pokazali kako sva tri varirana parametra značano utječu na masene udjele ispitivanih spojeva ($p \leq 0,01$). Maseni udjeli ukupnih fenola određeni su u rasponu 106,44 do 739,72 mg 100 g⁻¹, klorofila *a* od 116,44 do 490,42 mg 100 g⁻¹, klorofila *b* od 44,88 do 166,85 mg g⁻¹ te karotenoida od 36,62 do 133,99 mg 100 g⁻¹. Najveći prinosi dobiveni su pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: ukupni fenoli, karotenoidi i klorofil *a* pri temperaturi 50 °C i 4 ekstrakcijska ciklusa od 10 min; klorofil *b* pri temperaturi ekstrakcije od 50 °C, 3 ekstrakcijska ciklusa od 10 min.

Ključne riječi: *kopriva, ASE ekstrakcija, ukupni fenoli, karotenoidi, klorofili*

Rad sadrži: 46 stranica, 10 slika, 7 tablica, 70 literaturnih navoda

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. *Danijela Bursać Kovačević*

Pomoć pri izradi: *Valentina Kruk*, mag. ing. techn. aliment. i dr. sc. *Predrag Putnik*, poslijedoktorand

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Izv. prof. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. Doc. dr. sc. *Maja Repajić*
4. Izv. prof. dr. sc. *Senka Djaković* (zamjena)

Datum obrane: 13. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM NETTLE (*Urtica dioica*) LEAVES

Marta Maras, 1095/PI

Abstract: The aim of this study was to investigate the extraction efficiency of the bioactive compounds from stinging nettle (*Urtica dioica* L.) leaves by using Accelerated Solvent Extraction (ASE). Ethanol was used as the extraction solvent and the following extraction parameters were investigated: (i) static extraction time (5 and 10 min); (ii) number of extraction cycles (1, 2, 3 and 4 cycles); and (iii) temperature (20 and 50 °C). All extracts were spectrophotometrically evaluated in terms of total phenols, carotenoids and chlorophylls *a* and *b*. The results of the research have shown that all extraction parameters significantly affected the concentrations of the investigated compounds ($p \leq 0,01$). Mass fractions of total phenols ranged from 106,44 to 739,72 mg GAE 100 g⁻¹, chlorophyll *a* from 116,44 to 490,42 mg 100 g⁻¹, chlorophyll *b* from 44,88 to 166,85 mg 100 g⁻¹ and carotenoids from 36,62 to 133,99 mg 100 g⁻¹. The highest yields were obtained under the following extraction conditions: extraction temperature of 50 °C and four 10 minute cycles for total phenols, carotenoids and chlorophyll *a* and extraction temperature of 50 °C and three 10 minutes cycles for chlorophyll *b*.

Keywords: *stinging nettle, ASE extraction, total phenols, carotenoids, chlorophylls*

Thesis contains: 46 pages, 10 figures, 7 tables, 70 references

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 *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor

Technical support and assistance: *Valentina Kruk*, mag. ing. techn. aliment. and PhD *Predrag Putnik*, postdoc

Reviewers:

1. PhD *Verica Dragović-Uzelac*, Full Professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate Professor
3. PhD *Maja Repajić*, Assistant Professor
4. PhD *Senka Djaković* (substitute), Associate Professor

Thesis defended: September 13th 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KOPRIVA (<i>Urtica dioica</i> L.)	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV	4
2.3. PIGMENTI KOPRIVE.....	7
2.3.1. Karotenoidi.....	7
2.3.2. Klorofili	8
2.4. FENOLNI SPOJEVI	10
2.4.1. Fenolni spojevi koprive	11
2.5. EKSTRAKCIJA.....	12
2.5.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.2. METODE RADA.....	16
3.2.1. Priprema uzorka	16
3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija)	17
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	19
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> i ukupnih karotenoida	22
3.2.4. Statistička analiza	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA UKUPNE FENOLE.....	26
4.2. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA UKUPNE KAROTENOIDE	30
4.3. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA KLOROFILE <i>a</i> i <i>b</i>	32
5. ZAKLJUČAK.....	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je zeljasta i višegodišnja samonikla biljka za koju brojna istraživanja pokazuju da gotovo svaki njezin dio (stabljika, cvjetovi, listovi, korijenje i sjemenke) posjeduje značajan sadržaj različitih bioaktivnih spojeva (polifenola, karotenoida, klorofila, fitosterola itd.). Upravo stoga, različiti dijelovi ove biljke imaju različitu primjenu obzirom da joj se zbog visokovrijednog nutritivnog i biološkog sastava pripisuju pozitivni učinci na metaboličke i fiziološke procese u organizmu te radi čega je postala predmetom sve većeg broja znanstvenih istraživanja.

Ekstrakti koprive najčešći su oblik njezine primjene u industriji, pri čemu se za svaku pojedinu vrstu, kao i njezin dio, trebaju odrediti optimalni uvjeti ekstrakcije s naglaskom na što veću učinkovitost procesa i selektivnu izolaciju ciljanih spojeva. Konvencionalne (klasične) tehnike ekstrakcije, poput maceracije i ekstrakcije otapalima, koriste velike količine otapala, dugotrajne su te u konačnici ne rezultiraju ekstraktima odgovarajuće kvalitete i prinosa. Zbog toga se danas prednost daje novim tzv. „zelenim tehnikama ekstrakcije“ koje omogućuju brzu i okolišno prihvatljivu učinkovitu ekstrakciju uz manji utrošak energije i otapala. Jedna od takvih tehnika koja se koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala jest ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE). Riječ je o automatiziranoj tehnici kod koje se ekstrakcija provodi tekućim otapalom uz kombinaciju povišene temperature i povišenog tlaka. Metoda je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na oksidaciju te je moguće provesti ekstrakciju s većim brojem ciklusa čime se značajno doprinosi većem iskorištenju ekstrakcije.

S obzirom na sve navedeno, cilj ovog rada je izolirati pigmente (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide) i ukupne fenole iz liofiliziranih listova koprive (*Urtica dioica*) pomoću ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 96 %-tni etanol, a ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: (i) statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min); (ii) broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 ili 4) te (iii) temperatura (20 i 50 °C). U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih pigmenata i ukupnih fenola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.)

Kopriva je zajednički naziv za bilo koju od 30-45 različitih vrsta biljaka iz roda *Urtica* (Rodriguez-Fragoso i sur., 2008). Naziv roda *Urtica* dolazi od latinske riječi *urere*, što u prijevodu znači peći ili žariti, zbog žarnih dlaka koje se nalaze na cijelom nadzemnom dijelu biljke. Ime vrste *dioica* znači dvodomna, zbog odvojenih muških i ženskih cvjetova na zasebnim biljkama (Mueen i Subramani, 2014). U narodu je poznata i pod nazivima obična kopriva, velika kopriva, pitoma, pasja kopriva, žarulja, žeža i žigovica.

Premda se u literaturi navodi velik broj različitih vrsta koprive, potrebno je naglasiti da su “žarne” koprive samo dvije i da su obje ljekovite: velika/obična kopriva (*Urtica dioica*) i mala kopriva/žara (*Urtica urens*). Dvodomna ili velika kopriva (Slika 1) najpoznatija je biljna vrsta iz porodice koprivovki (*Urticaceae*), koja samoniklo raste diljem umjerene i tropske klime na području Azije, Europe, Sjeverne Amerike i sjeverne Afrike (Pant i Sundriyal, 2016). Nalazi se u ruralnim područjima, vrtovima, uz rubove šuma, rijeka i potoka, gdje raste kao korov (Krystofova i sur., 2010).



Slika 1. Kopriva (*Urtica dioica* L.) (Anonymus 1, 2019)

Urtica dioica je dvodomna zeljasta višegodišnja biljka koja za svoj rast zahtjeva vlažno i plodno tlo bogato dušikom, a vrijeme cvatnje i plodnosti je u periodu od lipnja do listopada (Jan i sur., 2016). Kopriva se može razmnožavati sjemenom i razgranatim rizomima (Slika 2) koji su jarko žute boje i debljine oko 6 mm. Biljku čini uspravna i čvrsta stabljika (visine od 1 do 2 m) na kojoj su nasuprotno smješteni dlakavi, nazubljeni listovi srcolikog oblika i zelene boje. Listovi i stabljika su prekriveni sitnim dlačicama koje se dijele na dvije

vrste, one koje „ne žare“ i one koje „žare“ (Asgarpanah i Mohajerani, 2012). Za koprivu su karakteristične dlačice koje „žare“, a koje se u literaturi zovu trihomi, žaoke (Slika 3). Trihomi mogu narasti do 70 μ m, a sastoje se od višestanične parenhimske baze iz koje izlazi duguljasta cjevasta stanica i glavica koja sadrži kemijske spojeve (Upton, 2013). Prilikom dodira s kožom trihomi se lome i pretvaraju u male iglice koje se potom zabijaju u kožu i ispuštaju smjesu kemijskih spojeva od kojih su najvažniji: 5-hidroksitriptamin, histamin, octena i mravlja kiselina, leukotrieni i moroidin (Pant i Sundriyal, 2016). Kregiel i sur. (2018) navode da svježie dlačice koprive sadrže visoku razinu acetilkolina. Navedeni spojevi izazivaju iritaciju koja se na koži manifestira plikovima (urtikarija), lokalnim crvenilom, osipom te osjećajem žarenja (Oliver i sur., 1991). Cvjetovi su crveno-smeđe do zelenkasto-bijele boje, a biljka obično ima ili muški ili ženski cvijet u odvojenim cvatovima koji izgledaju kao resa. Mali i zeleni, dvodomni cvjetovi pojavljuju se kao grozdovi u aksilima gornjih listova (Mueen i Subramani, 2014). Plod je plosnat, eliptičnog oblika i zelenkasto-smeđe boje, a sadrži jednu sjemenku koja u potpunosti ispunjava plod. Brojna istraživanja pokazuju da svaka vrsta koprive, kao i svaki dio biljke, ima različit sadržaj bioaktivnih spojeva zbog čega različite vrste ove biljke imaju različitu primjenu (Otles i Yalcin, 2012).



Slika 2. Rizomi koprive
(Jan i sur., 2016)



Slika 3. Trihomi koprive
(Asgarpanah i Mohajerani, 2012)

Iako kopriva raste kao korov i smatra se zapostavljenom biljnom vrstom, posjeduje brojna ljekovita svojstva te se danas smatra medicinski vrlo važnom biljkom. Svi dijelovi biljke (stabljika, lišće, korijenje i sjemenke) su upotrebljivi, pa se kopriva široko primjenjuje u medicini, poljoprivredi, prehrambenoj, kozmetičkoj, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji (Di Virgilio i sur., 2015). Brojna farmaceutska istraživanja ukazuju na velik broj pozitivnih

utjecaja koprive na ljudsko zdravlje kao što su: antioksidacijsko, protuupalno, antireumatsko, antivirusno i antibakterijsko, antifungalno, antikancerogeno i insekticidno djelovanje (Krystofova i sur., 2010; Mavi i sur., 2004; Mahmoudi i sur., 2014). Dokazano je da ekstrakti koprive imaju povoljne učinke na zdravlje ljudi. Vodeni ekstrakti pokazali su antihiperглиkemijsko djelovanje, dok je ekstrakt etanola pokazao antifungalno djelovanje (Orčić i sur., 2014). Ekstrakti velike koprive danas privlače pozornost zbog protuupalnih i benignih aktivnosti hiperplazije prostate (Kregiel i sur., 2018). Ekstrakti listova koprive koriste se kao antihemoragično sredstvo za smanjenje pretjeranog menstrualnog toka i krvarenja iz nosa (Mueen i Subramani, 2014). Također, ekstrakti listova i korijena koprive se u novije vrijeme koriste kao pomoćna terapija za ublažavanje reumatskih bolova i simptoma sezonskih alergija (Roschek i sur., 2009).

Hadizadeh i sur. (2009) u svom istraživanju navode da je ekstrakt koprive pokazao izvanredan antifungalni učinak protiv svih testiranih biljnih patogena, zbog čega smatraju da bi se ekstrakti koprive mogli koristiti kao alternativni proizvod za sintetske fungicide u agroindustriji. Ekstrakt lista koprive se koristi u proizvodnji proizvoda za osobnu njegu i brojnih farmaceutskih proizvoda, kao što su šamponi, pasta za zube i kreme. Hojnik i sur. (2007) navode da se, osim u medicinske svrhe, kopriva koristi i za ekstrakciju klorofila koji se upotrebljava kao bojilo (E140) za hranu i lijekove. Postoje razni pripravci s koprivom, ali danas se još uvijek najviše koriste čajevi, sokovi, macerati, dekoti, tekući ekstrakti i inkapsulirani pripravci listova i/ili korijena osušenih smrzanjem (Upton, 2013). Potražnja za prirodnim medicinskim preparatima je sve veća, ali unatoč tome u većini europskih zemalja kopriva se još uvijek ne proizvodi komercijalno, već se prikuplja iz prirodnih staništa (Radman i sur., 2015). Krystofova i sur. (2010) u svom istraživanju navode da je kopriva hiperakumulator teških metala pa se ubiranjem s prirodnih staništa skuplja biljni materijal upitne kvalitete.

2.2. KEMIJSKI SASTAV

Na kemijski sastav koprive utječu različiti čimbenici, kao što su: sorta, genotip, klima, tlo, vrijeme berbe, skladištenje i obrada. Di Virgilio i sur. (2015) navode da rezultati nekolicine studija potvrđuju prisutnost brojnih aktivnih spojeva (npr. derivata kafeinske kiseline, karotenoida, klorofila, esencijalnih masnih kiselina, fitosterola, glikozida, vitamina i minerala) i to posebno u listovima koprive. Kregiel i sur. (2018) u svom radu navode da prah

listova koprive sadrži prosječno 30 % proteina, 4 % masti, 40 % ne-dušičnih spojeva, 10 % vlakana i 15 % pepela.

Guil-Guerrero i sur. (2003) u svom istraživanju navode da udio palmitinske masne kiseline iznosi od 17,9 % (zreli listovi koprive) do 25,4 % (sjemenke koprive), dok je stearinska masna kiselina pronađena u malim količinama. Udio palmitoleinske masne kiseline iznosi od 0,5 % (stabljika) do 2,6 % (korijen), dok je udio oleinske masne kiseline bio viši u korijenu biljke (8,7 %), nego u drugim dijelovima. Pronađene su i gadoleinska masna kiselina, čija je vrijednost u korijenu iznosila 1,2 % te eruka masna kiselina, čija je najviša vrijednost određena u sjemenkama (1,2 %). Udio linolenske kiseline iznosi od 11,6 % u zrelim listovima koprive do 34,3 % u korijenu, dok je udio α -linolenske kiseline u listovima iznosi 40,7 %. Omjer $n-3/n-6$ masnih kiselina je bio visok u zrelim listovima i iznosio je 3,51. Đurović i sur. (2017) u svom istraživanju navode da su 3 najzastupljenije masne kiseline u listovima koprive sljedeće: α -linolenska ($67,98 \mu\text{g g}^{-1}$), palmitinska ($60,97 \mu\text{g g}^{-1}$) i cis-9,12-linolenska kiselina ($55,99 \mu\text{g g}^{-1}$). Termička obrada (blanširanje i kuhanje) ima minimalan utjecaj na sastav masnih kiselina, zbog čega se kopriva smatra dobrim izvorom esencijalnih masnih kiselina (Rutto i sur., 2013). Pant i Sundriyal (2016) navode da se list koprive smatra boljim izvorom esencijalnih masnih kiselina u usporedbi s bademom.

Jan i sur. (2016) navode da deproteinirana biomasa koprive obuhvaća 52,4 % biomase koprive, $69,5 \text{ g kg}^{-1}$ ne škrobnih polisaharida kao što su pektin ($196,7 \text{ g kg}^{-1}$), hemiceluloza ($334,5 \text{ g kg}^{-1}$) i celuloza ($128,5 \text{ g kg}^{-1}$). Prah koprive predstavlja jedan od najbogatijih izvora sirovih vlakana (9,1 % s.t.). Količina sirovih vlakana u prahu koprive je znatno veća u odnosu na većinu žitarica i biljnih izvora (Adhikari i sur., 2015). Kopriva se smatra i važnim izvorom dijetalnih vlakana zbog visokog sadržaja pektina (Jan i sur., 2016). Monomerni protein lektin s visokim sadržajem glicina, cisteina i triptofana prvi je put izoliran iz korijena *U. dioice* 1984. godine (Jan i sur., 2016). Lektini su proteini koji posjeduju mnogostruka mjesta za vezanje s ugljikohidratima te stupaju u interakcije s velikim brojem stanica u tijelu. Krystofova i sur. (2010) u svom istraživanju navode da su u listovima koprive pronađene veće količine proteina u odnosu na ostale dijelove biljke. Najviša vrijednost proteina pronađena u listovima koprive iznosila je 26,89 %, dok je udio proteina u stabljici iznosio 14,45 % odnosno, 10,89 % u korijenu biljke. U usporedbi s konvencionalnim izvorima proteina, prah koprive sadrži i do 3,2 odnosno 2,9 puta veći sadržaj u usporedbi sa pšeničnim i ječmenim brašnom (Adhikari i sur., 2015).

Kukrić i sur. (2012) primijetili su da postoje razlike u sadržaju proteina u listovima različite dobi. U mladim listovima sadržaj proteina iznosio je 1750,5 mg 100 g⁻¹, dok je u starijim listovima iznosio 1436,5 mg 100 g⁻¹. U listovima, rizomima i sjemenkama *U. dioice* identificirano je ukupno 12 aminokiselina, čiji je ukupni sadržaj varirao od 0,13 do 13,5 %. U listovima koprive dominiraju asparaginska kiselina, treonin, serin i alanin, a u korijenu dominiraju asparaginska kiselina i alanin, dok su sjemenke koprive bogate asparaginskom kiselinom, treoninom i serinom (Lapinskaya i sur., 2008). Listovi koprive sadrže gotovo dvostruko više proteina, nego špinat i peršin (Pant i Sundriyal, 2016).

Svježi listovi koprive sadrže značajnu koncentraciju vitamina A, C, D, E i K te vitamina B kompleksa (Rutto i sur., 2013). Upton (2013) navodi da listovi koprive sadrže od 2 do 60 mg 100 g⁻¹ suhe tvari vitamina C te od 2 do 200 mg 100 g⁻¹ s.t. željeza. Rafajlovska i sur. (2013) u svom istraživanju navode da listovi, stabljika i korijen koprive sadrži znatno veću količinu kalcija, nego magnezija. Najveći sadržaj kalcija pronađen je u listovima i određen je u rasponu od 2,63 do 5,09 %, dok je sadržaj magnezija određen u rasponu od 2,51 do 3,56 %. Najveće koncentracije cinka zabilježene su u listovima (27,44 mg kg⁻¹ suhe mase), a slijede bakar (17,47 mg kg⁻¹) i mangan (17,17 mg kg⁻¹). Đurović i sur. (2017) navode da listovi koprive sadrže olovo (0,18 µg g⁻¹), kadmij (0,02 µg g⁻¹) i arsen (0,35 µg g⁻¹), koji se smatraju štetnim elementima. Radman i sur. (2015) proučavali su utjecaj razine gnojidbe dušikom na sadržaj minerala (kalij, kalcij i željezo), proteina i bioaktivnih spojeva (antioksidacijski kapacitet, ukupni fenoli i askorbinska kiselina) u kultiviranoj koprivi. Iz dobivenih rezultata zaključili su da veće doze dušične gnojidbe rezultiraju većim sadržajem proteina, kalija i kalcija, ali se smanjuje udio željeza, ukupnih fenola i askorbinske kiseline.

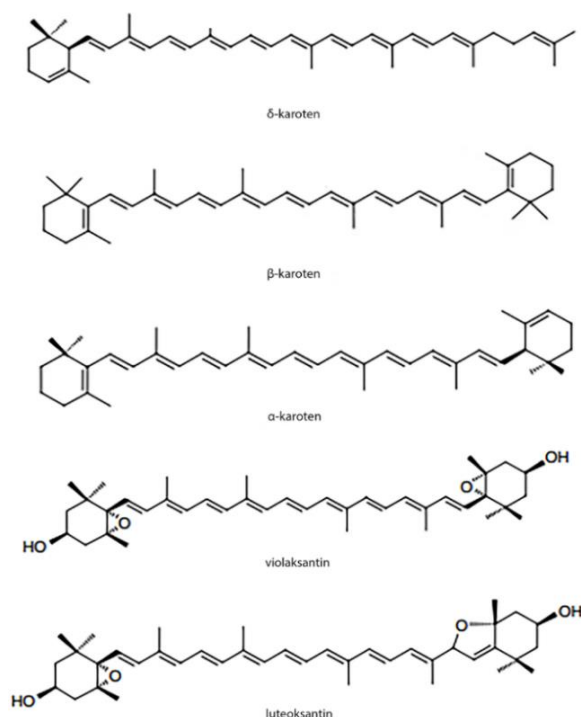
Fitosteroli su spojevi koji se prirodno pojavljuju u većini biljaka, a po strukturi su triterpeni. Dokazano je da fitosteroli imaju antioksidacijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje. Korijen koprive ima visok sadržaj fitosterola, tj. β-sitosterola (Horník i sur., 2013). Sajfrtová i sur. (2005) su usporedili učinkovitost ekstrakcije β-sitosterola iz korijena koprive pomoću superkritičnog CO₂ i konvencionalne ekstrakcije organskim otapalom (dietil eterom). Prinosi ekstrakcije dobiveni korištenjem superkritičnog CO₂ bili su dvostruko veći (0,63 mg g⁻¹ s.t.) u usporedbi s ekstraktom dobivenim dietil-eterom (0,26 mg g⁻¹ s.t.).

2.3. PIGMENTI KOPRIVE

Pigmenti (lat. *pigmentum*–boja) su prirodne tvari različite kemijske strukture koje se nalaze u stanicama i tkivima biljaka. Prirodni pigmenti mogu se smatrati potencijalnim zamjenama za sintetska bojila u hrani, lijekovima i kozmetičkim preparatima, stoga je njihova izolacija iz prirodnih izvora sve češća. Najzastupljeniji pigmenti u prirodi su fotosintetski pigmenti klorofili i karotenoidi.

2.3.1. Karotenoidi

Karotenoidi su biljni pigmenti netopljivi u vodi i staničnom soku, a topljivi u kloriranim ugljikovodicima i biljnim uljima. Nosioči su žute (ksantofili), narančaste (karoteni) i crvene (likopeni) boje, a nalaze se u svim dijelovima biljke. Po kemijskom sastavu su tetraterpeni, derivati izoprena koji sadrže 8 izoprenskih jedinica smještenih simetrično u odnosu na centar molekule. Dijeje se na karotene (α -karoten, β -karoten, γ -karoten, likopen) i ksantofile, koji su oksidirani oblici karotena te sadrže kisik u svojoj strukturi (lutein, zeaksantin, kriptoksantin, kapsantin itd. (Slika 4). β -karoten je jedan od najpoznatijih karotenoida koji se u literaturi navodi kao jak antioksidans i prekursor vitamina A koji ima važnu ulogu u vidu te u regulaciji ekspresije gena i diferencijacije tkiva (Adhikari i sur., 2015).



Slika 4. Kemijske strukture karotena i ksantofila (Rodriguez-Amaya, 2015)

Glavni karotenoid koprive je β -karoten, čiji sadržaj varira ovisno o vremenu ubiranja biljnog materijala i načinu obrade što je prikazano u Tablici 1 (Upton, 2013). Količina ukupnih karotenoida u svježim listovima koprive iznosila je $29,6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ s.t., a izolirani su sljedeći karotenoidi: β -karoten (61,0 %), hidroksi- α -karoten (0,9 %), luteoksantin (10,3 %), lutein epoksid (13,1%) i violaksantin (14,7 %) (Kudritsata i sur., 1986).

Tablica 1. Sadržaj β -karotena u listovima koprive (prema Upton, 2013)

Uzorak	β -karoten ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)
Svježi listovi	2,95-8
Sušeni mladi listovi	20,2
Sušeni listovi ubrani u svibnju	25-300
Sušeni listovi ubrani u rujnu	2,5

Adhikari i sur. (2015) u svom istraživanju navode da je sadržaj karotenoida u prahu koprive iznosio $3496,7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, odnosno gotovo deset puta više u usporedbi s pšeničnim i ječmenim brašnom. Rezultati istraživanja Kukurić i sur. (2012) pokazuju da je sadržaj ukupnih klorofila i karotenoida veći kod mlađih listova koprive u odnosu na starije listove. Sadržaj ukupnih karotenoida u mladim listovima iznosio je $32,3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, dok je u listovima koji se nalaze ispod vrha biljke sadržaj karotenoida iznosio $21,60 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Guil-Guerrero i sur. (2003) u svom istraživanju navode da je u listu koprive identificirano devet različitih karotenoida čiji je ukupan sadržaj u zrelih listovima iznosio $74,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t. te $51,4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t. u mladim listovima. Zabilježen je najveći sadržaj luteina i njegovih izomera te β -karotena i njegovih izomera u zrelih listovima koprive. Sadržaj trans-luteina u zrelih listovima koprive iznosio je $32,4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t, dok je sadržaj svih trans-karotenoida iznosio $5,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t. Sadržaj likopena se nije znatno razlikovao između zrelih ($1,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t.) i mlađih listova ($1,2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ s.t.). Đurović i sur. (2017) određivali su sadržaj ukupnih karotenoida u ekstraktima metilen-klorida, 96 %-tnog etanola i *n*-heksana. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je najveći sadržaj ukupnih karotenoida dobiven u ekstraktu metilen-klorida, a iznosio je $12,71 \text{ mg g}^{-1}$.

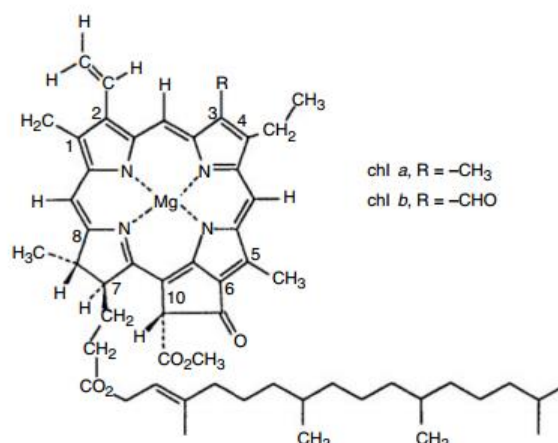
2.3.2. Klorofili

Klorofil je najrašireniji prirodni pigment, a pojavljuje se u lišću i drugim dijelovima gotovo svih biljaka (Humphrey, 2004). Najvažniji su spojevi na zemlji zbog svoje uloge u

apsorpciji i prijenosu svjetlosne energije u procesu fotosinteze. Po kemijskom sastavu ubrajaju se u skupinu tetrapirola, a od drugih tetrapirola razlikuju se po atomu magnezija koji se nalazi u središtu molekule te po dodatnom petom, tzv. izocikličkom prstenu (Willows, 2004).

Osnovna građevna jedinica je porfirinski prsten s magnezijem u središtu na koji su vezana četiri pirolova prstena (Slika 5). U prirodi se pojavljuju u nekoliko oblika, od kojih su najzastupljeniji klorofil *a* (plavozelene boje) i klorofil *b* (svijetlo-zelene boje). U strukturi klorofila *a* porfirin je kelatno vezan s Mg, dok se struktura klorofila *b* razlikuje u poziciji 3 na kojoj umjesto metilne (-CH₃) ima aldehidnu skupinu (-CHO).

Klorofil je važno prirodno sredstvo za bojenje koje se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Dobiva se ekstrakcijom iz osušenih biljaka pomoću odgovarajućeg otapala. Klorofil je u svom prirodnom okruženju konjugiran s fosfolipidima, polipeptidima i tokoferolima unutar kloroplasta. Prilikom ekstrakcije dolazi do gubitka središnjeg magnezijevog iona što rezultira nestabilnijom bojom. Taj problem se u prehrambenoj industriji rješava zamjenom magnezijevog iona bakrovim, koji formira stabilno plavo-zeleni kompleks (Udayan i sur., 2017). Ekstrakti zelenih biljaka sadrže klorofile *a* i *b* kao glavne pigmente, koji se javljaju u približnom omjeru 3:1. Većina istraživanja usmjerena je na identifikaciju i kvantifikaciju klorofila i ostalih pigmentata u zelenim biljkama (npr. kopar, listovi špinata), dok je malen broj istraživanja usmjeren na izolaciju navedenih pigmentata iz zelenih algi, brokule i listova koprive (Hojnik i sur., 2007).



Slika 5. Kemijska struktura klorofila *a* i *b* (Damodaran i sur., 2008)

Jan i sur. (2016) u svom radu navode da ukupan sadržaj klorofila u listovima *U. dioice* iznosi prosječno 1-5 %, od čega je 75 % klorofila *a*, a 25 % klorofila *b*. Đurović i sur. (2017)

u svom istraživanju navode da je najveći sadržaj klorofila *a* i *b*, kao i ukupnog sadržaja klorofila prisutan u 96 %-tnom etanolom ekstraktu, zbog najveće topljivosti tog pigmenta u alkoholu. Rezultati dobiveni unutar navedenog istraživanja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Sadržaj ukupnih klorofila, klorofila *a* i *b* u ekstraktima koprive (Đurović i sur., 2017)

Tip ekstrakcije/otapalo	Ukupni klorofili (mg g ⁻¹)	Klorofil <i>a</i> (mg g ⁻¹)	Klorofil <i>b</i> (mg g ⁻¹)
Soxhlet (96 % etanol)	24,13	16,55	7,58
Soxhlet (metilen klorid)	21,25	15,65	5,60
Soxhlet (<i>n</i> -heksan)	4,12	4,12	0

Kukurić i sur. (2012) navode da postoje razlike u sadržaju klorofila i karotenoida u listovima koprive različite dobi. Veći sadržaj klorofila pronađen je u mladim listovima. Ukupan sadržaj klorofila u mladim listovima iznosio je 117,4 mg 100 g⁻¹, 88,20 mg 100 g⁻¹ za klorofil *a* i 28,50 mg 100 g⁻¹ g za klorofil *b*. Listovi *Urtica* spp. sadrže oko 4,8 mg g⁻¹ s.t. klorofila, ovisno o klimatskim i okolišnim uvjetima. Više klorofila i karotenoida se obično nalazi u biljkama koje su ubrane iz sjenovitih mjesta (Kregiel i sur., 2018).

2.4. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla za koje su dokazani različiti biološki učinci poput antiproliferativnog, antitumorskog, protuupalnog, antimikrobnog i antivirusnog (Lin i sur., 2016). Važna karakteristika polifenola je njihovo snažno antioksidacijsko djelovanje koje se očituje hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona (Jakobek i sur., 2008). Također, štite biljku od štetnih čimbenika kao što su UV zračenje, napadi štetočina, mikrobiološke infekcije te djeluju kao signalne molekule (Harborne i Williams, 2000).

Do danas je poznato više od 8000 različitih struktura fenolnih spojeva, ali općenito njihovu osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Hidalgo i Almajano, 2017). Broj hidroksilnih skupina, kao i njihov položaj utječe na njihova svojstva. Prema razlikama u kemijskim strukturama, dvije su najvažnije grupe fenolnih spojeva zastupljene u prirodi i to: flavonoidi, u koje se ubrajaju flavoni, flavonoli, flavanoni i antocijani, te fenolne kiseline, koje podrazumijevaju derivate

hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina (Manach i sur., 2004). Skupina ne-flavonoidnih spojeva također pronađena u biljkama uključuje lignane, stilbene, tanine i lignine (Działo i sur., 2016).

2.4.1. Fenolni spojevi koprive

Augspole i sur. (2017) u svom su istraživanju odredili sadržaj ukupnih fenola u svježim listovima koprive od $743,4 \pm 96,3$ mg GAE 100 g^{-1} . Sličan rezultat objavili su Vajić i sur. (2005), koji navode da maksimalni teorijski prinos ukupnih fenola u ekstraktima koprive dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE) iznosi $8,9$ mg GAE g^{-1} suhe tvari. Također, detektirali su i kvantificirali fenolne spojeve prisutne u listovima koprive pomoću HPLC i LC/MS analize. Utvrdili su prisutnost dvije najvažnije skupine fenolnih spojeva i to flavonoida (rutin, izokvercentin, kempferol-3-*O*-rutinozid, izoramnetin-3-*O*-rutinozid, izoramnetin-heksozid) i derivate hidroksicimetnih kiselina (2-*O*-kafeoil-jabučna, klorogenska, *p*-kumaril-jabučna, kafeinska). Od ukupnih fenolnih spojeva u 50 %-tnom metanolnom ekstraktu dominiraju fenolne kiseline, dok u 96 %-tnom etanolu iste nisu pronađene. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se korištenjem vode kao ekstrakcijskog otapala ekstrahira veći sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide. U najvećim udjelima određene su 2-*O*-kafeoil-jabučna i klorogenska kiselina te rutin, čiji maseni udjeli u 50 %-tnom metanolnom ekstraktu iznose redom: $82,52 \pm 5,2$ μg kafeinske kiseline mL^{-1} , $89,0 \pm 4,9$ μg mL^{-1} i $8,7 \pm 3,8$ μg mL^{-1} . Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja Pinelli i sur. (2008) koji navode da ekstrakti listova koprive sadrže velike količine klorogenske i 2-*O*-kafeoil-jabučne kiseline, s udjelima od 71,5 % i 76,5 % u ukupnom sadržaju fenolnih kiselina. U istom istraživanju navode da se sadržaj ukupnih fenola u 50 %-tnom etanolnom ekstraktu razlikuje ovisno o uzgoju, pri čemu su više vrijednosti određene u kultiviranim ($7,364 \pm 0,421$ mg g^{-1} svježe mase) u odnosu na listove divlje koprive ($2,580 \pm 2,048$ mg g^{-1} svježe mase).

Zeković i sur. (2017) izolirali su biološki aktivne spojeve iz osušenih listova koprive korištenjem nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika poput ultrazvučne ekstrakcije (UAE), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ekstrakcije subkritičnom vodom (SCW). Najveći prinos ukupnih fenola i flavonoida ostvaren je SCW ekstrakcijom i iznosi $463,59 \pm 15,60$ mg CAE g^{-1} za ukupne fenole i $11,00 \pm 0,03$ mg CE g^{-1} za ukupne flavonoide, dok su manji prinosi ostvareni MAE ($380,08 \pm 14,91$ mg CAE g^{-1} ; $10,99 \pm 0,12$ mg CE g^{-1}) i UAE ($147,46 \pm 18,3$ mg CAE g^{-1} ; $5,43 \pm 0,09$ mg CE g^{-1}) ekstrakcijom. Rutin je najzastupljeniji spoj u svim ekstraktima UAE, MAE i SCW ($578,36$ μg g^{-1} , $722,83$ μg g^{-1} , i $215,49$ μg g^{-1}),

kao i najzastupljeniji flavonoid, dok je najzastupljenija fenolna kiselina bila sinapinska kiselina ($50,49 \mu\text{g g}^{-1}$, $63,12 \mu\text{g g}^{-1}$ i $18,08 \mu\text{g g}^{-1}$).

Orčić i sur. (2013) su odredili različite fenolne spojeve u cvjetovima, korijenu, stabljici i listovima koprive ubranim na različitim lokalitetima u Srbiji uz 80 %-tni metanol kao ekstrakcijsko otapalo. Zaključili su da polifenolni profil ne ovisi samo o dijelovima biljke, već i o lokaciji uzgoja. Ekstrakt cvjetova koprive najbogatiji je fenolima, dok je najmanji sadržaj fenola određen u korijenu. Sajfrtova i sur. (2005) navode da je u korijenu koprive pronađen skopoletin, derivat kumarinske kiseline. Sadržaj skopoletina u dobivenim ekstraktima iz korijena koprive varira ovisno o korištenom otapalu. Kada je kao ekstrakcijsko otapalo korišten superkritični CO_2 sadržaj skopoletina iznosio je $0,058 \text{ g g}^{-1}$ s.t., dok je za dietil eter iznosio $0,016 \text{ g g}^{-1}$ s.t.

Kukurić i sur. (2012) navode da ukupni sadržaj fenola u ekstraktu etanola iznosi $208,37 \text{ mg GAE g}^{-1}$ s.t., pri čemu je udio ukupnih flavonoida iznosio $20,29 \text{ mg QE g}^{-1}$ s.t., a udio ukupnih flavonola $22,83 \text{ mg QE g}^{-1}$ s.t. Prema istraživanju Güder i Korkmaz (2012) sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnom ekstraktu listova koprive iznosi $132,0 \pm 6,5 \mu\text{g}$ ekvivalenta katehina mg^{-1} , odnosno $65,8 \pm 3,5 \mu\text{g}$ ekvivalenta katehina mg^{-1} . Moldovan i sur. (2011) proučavali su sadržaj fenola u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima 5 različitih biljaka (kopriva, pravi pelin, stolisnik i grimizni kukurijek). Rezultati pokazuju da ekstrakt listova koprive sadrži $90,09 \pm 2,82 \mu\text{g mg}^{-1}$ ekvivalenta katehina ukupnih fenola, odnosno $31,03 \pm 1,93 \text{ mg}$ ekvivalenta kvercentina g^{-1} s.t. ukupnih flavonoida.

2.5. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, pri čemu dolazi do prijenosa jedne ili više tvari iz materijala u kojem se nalaze u tekuću fazu. Nakon toga slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze (Conde i sur., 2010). Ekstrakcija predstavlja glavni korak u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Lapornik i sur., 2005). Osnovni cilj ekstrakcije je izolacija što veće količine željene tvari, a da pritom izolirana tvar ima što veću kvalitetu sa što manjim udjelom nečistoća. Za učinkovito provođenje ekstrakcije potrebno je odrediti optimalne uvjete, pri čemu se moraju pratiti brojni faktori kao što su: veličina čestica, omjer tvari za ekstrakciju i tekućeg otapala, značajke samog otapala, vrste spojeva koji se ekstrahiraju kao i vrijeme te temperatura ekstrakcije (Putnik i sur., 2016).

Konvencionalne ekstrakcijske tehnike, poput maceracije i ekstrakcije otapalima, pokazuju brojne nedostatke kao što su nedovoljna selektivnost i učinkovitost, dugotrajnost izvedbe ekstrakcije, korištenje organskih otapala koji su potencijalno štetni za okoliš, a u konačnici ne rezultiraju ekstraktima odgovarajuće kvalitete i prinosa. Stoga se u novije vrijeme konvencionalne metode sve više zamjenjuju novijim metodama ekstrakcije kojima se postiže brza i efikasna ekstrakcija pri čemu se koriste znatno manje količine otapala, a ishoduju visokokvalitetnim ekstraktima koji se mogu dalje koristiti u različite svrhe. Glavne prednosti novih metoda su: brzina, selektivnost, smanjena količina otapala te su ekološki prihvatljivije, daju veće prinose i omogućuju bolju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije.

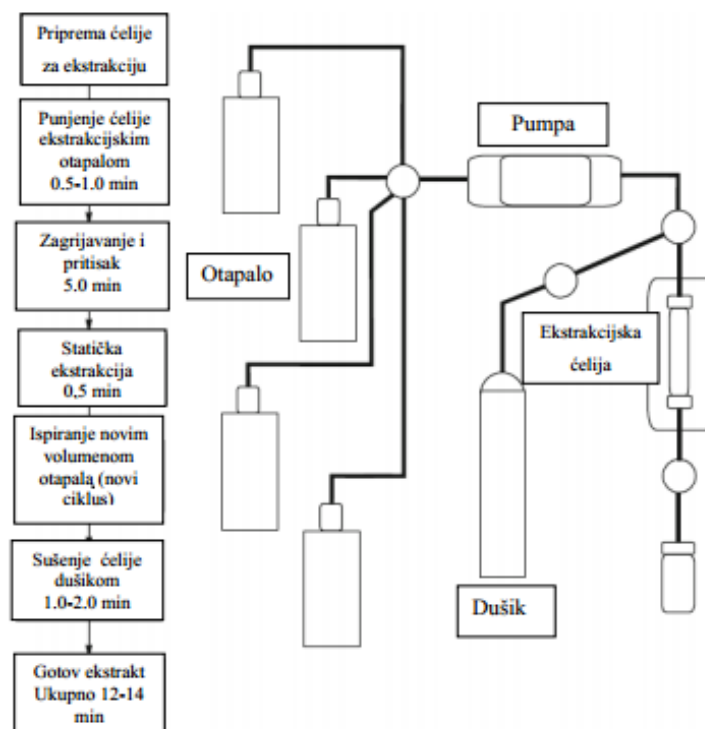
2.5.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) moderna je metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995. godine na Pittcon konferenciji (Mustafa i Turner, 2011). To je automatizirana ekstrakcijska tehnika kod koje se ekstrakcija provodi tekućim otapalom uz kombinaciju povišene temperature i povišenog tlaka u cilju brzog i učinkovitog ekstrahiranja bioaktivnih spojeva iz krutih i polukrutih matrica uzorka u kratkom vremenskom razdoblju (Mottaleb i Sarker, 2012). Ova ekstrakcijska tehnika primjenjuje se za izolaciju širokog spektra prirodnih spojeva iz biljnih materijala, a naročito je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na povišenu koncentraciju kisika i temperature.

Učinkovita ASE ekstrakcija zahtijeva čestice s promjerom <1 mm, obzirom da veća površina čestice pospješuje skraćivanje vremena ekstrakcije. Uvjeti temperature i tlaka koji se koriste u ovoj metodi ekstrakcije su u rasponu od 25 do 200 °C i 3,5 do 20 MPa. Visoka temperatura omogućuje bolju topljivost analita, bržu difuziju, nižu viskoznost otapala i slabljenje interakcija između otopine i matrice uzorka. Visoki tlakovi zadržavaju otapalo u tekućem stanju pri visokim temperaturama, čime se značajno povećava brzina difuzije, ubrzava proces ekstrakcije i istovremeno smanjuje količina otapala potrebnog za ekstrakciju (Mustafa i Turner, 2011). Ekstrakcija obično traje oko 20 minuta, pri čemu se prosječno utroši 10-50 mL otapala, dok kod klasičnih metoda, kao što je Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija prosječno traje 10-48 sati, a volumen utrošenog otapala iznosi oko 400 mL (Arceusz i sur., 2013).

U ASE ekstrakciji koriste se i adsorbenti koji se postavljaju u ekstrakcijske ćelije zajedno s uzorkom i tako povećavaju selektivnost postupka. Adsorbent se u ćeliju postavlja

prvi, a na njega se zatim stavlja uzorak i na taj se način tijekom ekstrakcije neželjene komponente zadržavaju u ćeliji (Mottaleb i Sarker, 2012). ASE ekstrakcija se može provoditi uz upotrebu različitih vrsta mono-otapala ili smjese različitih vrsta otapala (najčešće se koriste binarni sustavi), a sam uređaj ima mogućnost korištenja tri različite vrste otapala. Nakon ekstrakcije dobiveni materijal je osušen, pa je moguće provoditi ponovljene ekstrakcije s istim otapalom ili sukcesivne ekstrakcije koristeći otapala različite polarnosti čime značajno povećava učinkovitost same ekstrakcije (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 6. Prikaz sistema ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) (prema Mottaleb i Sarker, 2012)

Uređaj za ASE ekstrakciju sastoji se od: (i) ekstrakcijske ćelije koja ima automatski sustav zatvaranja da bi mogla izdržati povišeni radni tlak; (ii) pumpe koja služi za ostvarivanje radnog tlaka i transport ekstrakcijskih otapala; (iii) pećnice koja zagrijava uzorak; (iv) tekućeg dušika koji suši ekstrahirani analit po završetku ekstrakcije; i (v) staklene posude za prihvata ekstrakata.

Ekstrakcijska ćelija napunjena uzorkom postavlja se u rotirajuće utore koji dovode ekstrakcijsku ćeliju do položaja koji omogućuje njen prijenos do pećnice. U pećnici se ćelija puni otapalom, zagrijava i nalazi pod tlakom. Nakon što se u ćeliji postigne zadana temperatura, ćelija se za vrijeme statičke ekstrakcije zadržava u pećnici pod konstantnom

temperaturom i tlakom. Ekstrakti se po završetku ekstrakcije sakupljaju u staklene boce koje su postavljene na rotirajućem pladnju, a ćelija se ispiri i suši s dušikom. Nakon završetka ekstrakcije, ćelija se vraća u početnu poziciju i slijedi nova ekstrakcija u ćeliji koja je unaprijed već postavljena na sljedeću poziciju (Slika 6) (Mottaleb i Sarker, 2012).

Prednosti ASE u odnosu na konvencionalne tehnike su: učinkovita ekstrakcija iz čvrstih/polučvrstih materijala, bolja difuzija otapala u uzorak, smanjena viskoznost otapala pri povišenom tlaku i temperaturi što rezultira boljom topljivosti, uspješniji prijenos mase, smanjene količine otapala i vrijeme trajanja ekstrakcije te automatizacija procesa. Unatoč brojnim prednostima treba obratiti pozornost na velike troškove same opreme kao i uvjeta koje treba osigurati. Nadalje, ekstrakcija može biti nepotpuna zbog ograničenog volumena otapala te može doći do nižih prinosa ekstrakcije termolabilnih komponenti zbog povišenih temperatura (Ameer i sur., 2017). Shams i sur. (2015) navode kako je korak čišćenja nakon ekstrakcije još uvijek potreban.

Pregledom znanstvene literature iznašao se samo jedan znanstveni članak koji primjenjuje ASE ekstrakciju za pripremu ekstrakata od korijena, stabljike, lišća i cvjetova koprive (*U. dioica*) ubrane u području Monterey Bay, Kalifornija uz različita otapala poput vode, metanola, diklormetana i heksana (Johnson, 2013). Metodologija ekstrakcije preuzeta je iz publikacije Johnson i sur. (2010) te je podrazumijevala temperaturu (22-27 °C i 100 °C), statičko vrijeme 5 minuta, volumen ispiranja 50 %, vrijeme propuhivanja dušikom 100 sekundi, broj ciklusa 3. Cilj ovog rada podrazumijevao je ispitivanja protuupalnih i citotoksičnih efekata dobivenih ekstrakata, stoga nije dao zaključak o učinkovitosti ASE ekstrakcije u vidu utjecaja njezinih procesnih parametara na iskorištenje procesa.

Rodríguez-Solana i sur. (2014) su usporedili tri tehnike ekstrakcije (SFE, Soxhlet i ASE) za dobivanje esencijalnih ulja iz biljaka porodice *Lamiaceae*. Najviši prinosi ekstrakcije dobiveni su Soxhlet i ASE tehnikama, ali se ASE ekstrakcijom ostvarilo skraćeno vrijeme procesa, manji utrošak otapala te veći udio hlapljivih komponenti u eteričnom ulju. Jentzer i sur. (2014) u svom istraživanju su odredili optimalne parametre ASE ekstrakcije provodeći izolaciju steviol glikozida i rebaudiozida A iz listova *S. rebaudiana*. Rezultati su pokazali da svi čimbenici imaju utjecaj na konačan prinos. U usporedbi s konvencionalnim metodama ASE omogućava veće prinose u kraćem vremenu, ekološki je prihvatljivija i ne zahtijeva veliki utrošak energije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje ovog istraživanja korišten je uzorak liofiliziranog lista koprive (*Urtica dioica* L.) sakupljenog na području Žumberka, u mjestu Sela Žakanjska tijekom proljeća 2019. godine. Uzorci su dopremljeni u svježem obliku te pohranjeni u hladnjak temperature -20 °C do provođenja postupka liofilizacije.

3.2. METODE RADA

Izolacija bioaktivnih spojeva iz prethodno liofiliziranih listova koprive provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija) uz upotrebu 96%-tog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Prema planu pokusa punog faktorskog dizajna, ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima temperature, vremena trajanja ekstrakcije i broja ciklusa. U dobivenim ekstraktima lista koprive spektrofotometrijski su određeni ukupni fenolni i pigmenti (klorofili *a* i *b* i karotenoidi).

3.2.1. Priprema uzorka

Svježi uzorak lista koprive je prethodno zamrznut na temperaturu -80 °C te je podvrgnut postupku liofilizacije na liofilizatoru modela Martin Christ Alpha 1-4 LSC Plus. Na pet plitica u jednom sloju raspoređena je masa od oko 500 g zamrznutog lista koprive nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je ukupno trajao 24 sata. Dio osušenih listova koprive usitnjen je u tarioniku do konzistencije praha te je kao takav korišten za daljnju analizu (Slika 7), dok je ostatak pakiran u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoren i skladišten na temperaturi -20 °C do trenutka provođenja analize.



Slika 7. Usitnjeni uzorak lista koprive korišten za analizu (vlastita fotografija)

3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (ASE ekstrakcija)

Ekstrakcija fenolnih spojeva, karotenoida te klorofila iz liofiliziranih listova koprive (*Urtica dioica* L.) provedena je pomoću ASE ekstraktora (ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350, Slika 8) prema punom faktorskom planu pokusa (Tablica 3). Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 96 %-tni etanol, a parametri koji su varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (20 i 50 °C), broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3, 4) i statičko vrijeme (5 i 10 min).

Tablica 3. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom ASE ekstrakcije

ID	STATIČKO VRIJEME (min)	BROJ CIKLUSA	TEMPERATURA (°C)
1	5	1	20
2	5	2	20
3	5	3	20
4	5	4	20
5	5	1	50
6	5	2	50
7	5	3	50
8	5	4	50
9	10	1	20
10	10	2	20
11	10	3	20
12	10	4	20
13	10	1	50
14	10	2	50
15	10	3	50
16	10	4	50

Aparatura i pribor:

- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific, 250 mL)
- Glass fiber filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične lađice za vaganje
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL
- Stakleni lijevci
- Plastične kivete, volumena 50 mL

Otapala i reagensi:

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, SAD)
- Destilirana voda
- 96 %-tni etanol, (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

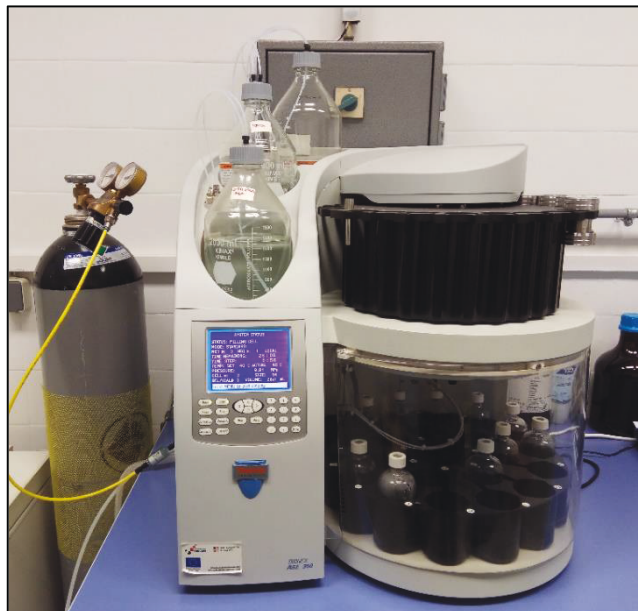
Neposredno prije provedbe ASE ekstrakcije otapalo je potrebno ultrazvučno odzračiti kroz 30 do 45 min.

Postupak ekstrakcije:

Na analitičkoj vagi, u plastičnoj čašici, odvaž se približno 1 g ($\pm 0,0001$) uzorka praha liofiliziranih listova koprive. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika prvotno se postavi Glass Fiber filter, a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje ($\sim 2,0$ g), na koju se zatim dodaje odvagani uzorak i sve se dobro promiješa. Nakon toga se ponovno dodaje dijatomejska zemlja do vrha ćelije (5 mm ispod gornjeg ruba). Ekstrakcijska ćelija se ručno zatvori i postavi na uređaj ASE Dionex 350®.

Prije početka same ekstrakcije, potrebno je na zaslonu uređaja unijeti zadane parametre ekstrakcije (temperatura, vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa). U uređaj se postavljaju po 4 pripremljene ekstrakcijske ćelije i to na pozicije označene brojevima, dok se za navedene ekstrakcijske ćelije u donjem dijelu uređaja na pozicije označene brojevima postavljaju staklene bočice za sakupljanje ekstrakata. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti su sakupljeni u staklene bočice za sakupljanje i nakon toga kvantitativno preneseni u odmjerne tikvice od 50

mL te su iste nadopunjene do oznake ekstrakcijskim otapalom. Ekstrakti se potom prenesu u plastične kivete volumena 50 mL te se skladište pri temperaturi -20 °C do provođenja spektrofotometrijskih analiza.



Slika 8. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Dionex (model ASE 350®) (vlastita fotografija)

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm primjenom metode prethodno pronađene u literaturi (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD) i staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična ladica za vaganje, špatula

- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Staklene čaše, volumena 50 mL

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Destilirana voda
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 % -tna)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline (5 g L⁻¹)

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

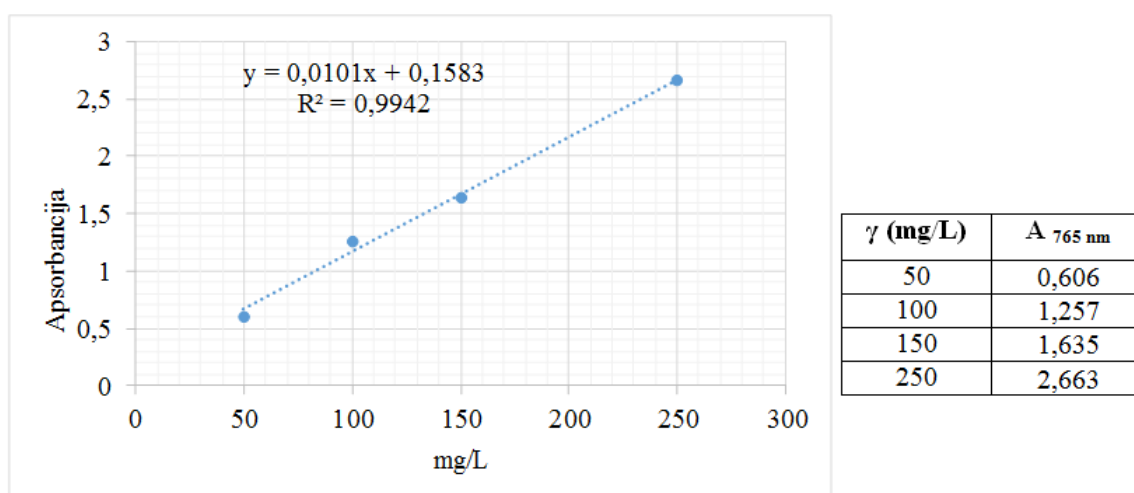
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se kratko promiješa pomoću Vortex uređaja, a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50 °C (u kupelji rotavapora). Slijepa proba se pripremi na isti način kao i uzorak, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici volumena 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C (u kupelji rotavapora). Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100 µL destilirane vode. Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac (Slika 9) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Dobivene koncentracije ukupnih fenola (mg GAE L⁻¹) preračunate su u masene udjele (mg GAE 100 g⁻¹ liofiliziranog uzorka), a rezultat se izražava kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ± standardna devijacija.



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

gdje je:

Y –apsorbancija pri 765 nm

X –koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

R^2 –koeficijent determinacije

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu je apsorpcijski maksimum za klorofil *a* (Ch-*a*) u plavom (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm), dok se apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* (Ch-*b*) nalaze između dvaju maksimuma klorofila *a* (Ch-*a*), i to na oko 450 i 640 nm.

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, SAD) i staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklena čaša, volumena 50 mL

Reagensi:

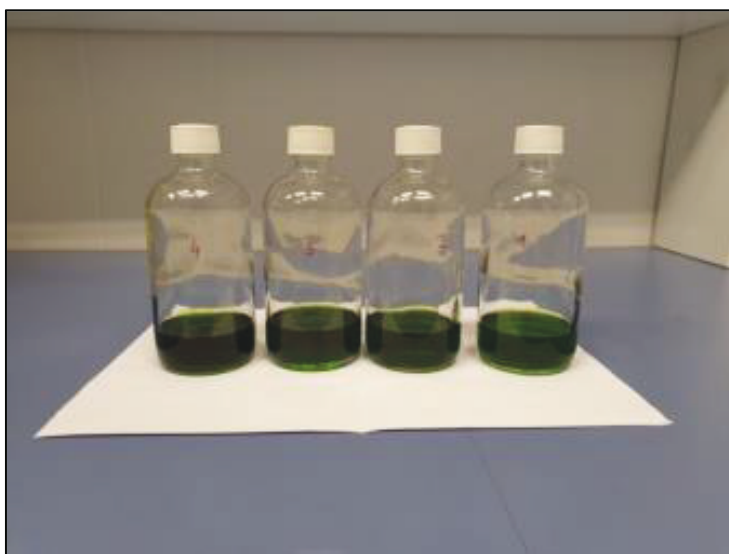
- 96 %-tni etanol

Postupak određivanja:

Dobivene ekstrakte lista koprive (Slika 10) za kvantitativno određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida je potrebno prethodno razrijediti s 96 %-tnim etanolom te se potom mjeri apsorbancija na 470 nm, 649 nm i 664 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto uzorka uzima 96 %-tni etanol. Svako mjerenje provedeno je u paraleli. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Razrijeđenja:

Uzorci pod brojevima 1-4 razrijeđeni su 5 x, gdje je na 1 mL ekstrakta dodano 4 mL 96 %-tnog etanola. Uzorci pod brojevima 5-12 razrijeđeni su 10 x (na 300 μ L ekstrakta dodano je 2700 μ L 96 %-tnog etanola), a uzorci pod brojevima 13-16 razrijeđeni su 15 x (na 200 μ L ekstrakta dodano je 2800 μ L 96 %-tnog etanola).



Slika 10. Ekstrakti u kojima je određivan sadržaj ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida (vlastita fotografija)

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001; Sumanta i sur., 2014)

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad [2]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b)/209 \quad [3]$$

gdje su:

A = apsorbancija

C_a = klorofil *a*

C_b = klorofil *b*

C_(x+c) = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija (mg L⁻¹) potom su preračunate i izražene kao mg g⁻¹ suhe tvari (mg 100 g⁻¹ liofiliziranog uzorka) ± standardna devijacija.

3.2.4. Statistička analiza

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije. Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija pigmenata (karotenoida, klorofila *a* i *b*) i ukupnih fenola u liofiliziranom listu koprive (*Urtica dioica* L.) primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE ekstrakcija).

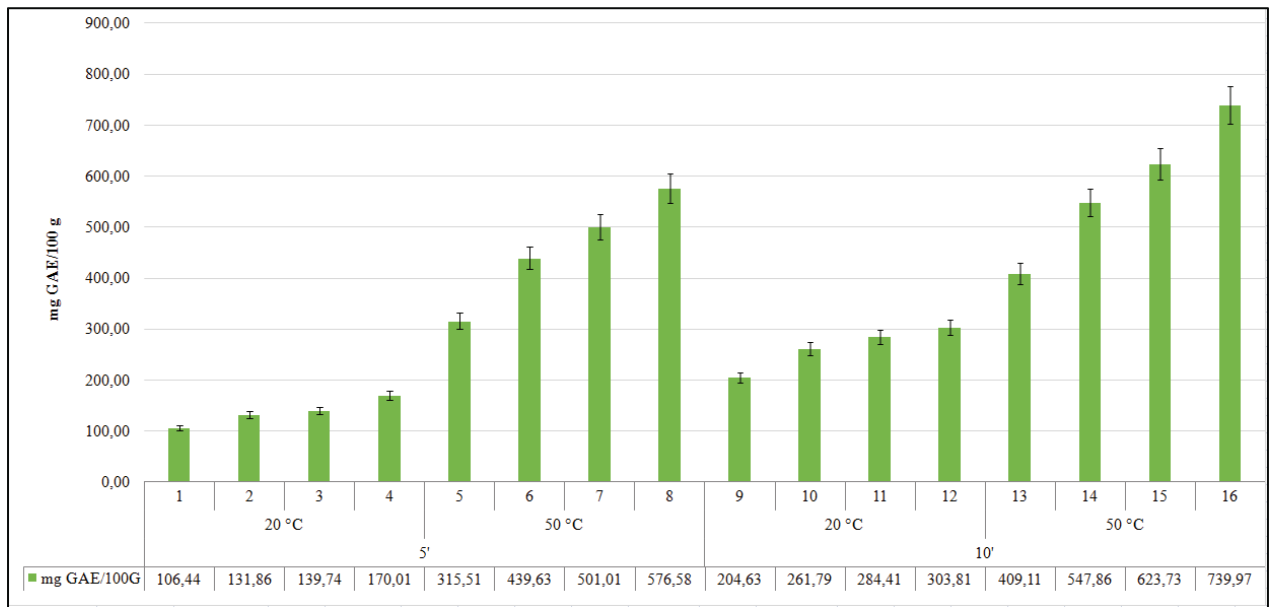
ASE ekstrakcija bioaktivnih spojeva lista koprive provedena je upotrebom 96 %-tnog etanola kao otapala. Razlog odabira navedenog otapala je činjenica da etanol ima GRAS status (eng. "*Generally Recognized as Safe*"), pa je time zadovoljen jedan od uvjeta zelene kemije, odnosno zelene ekstrakcije (Rodríguez-Rojo i sur., 2012). Organska otapala predstavljaju opasnost za okoliš i ljude zbog čega su brojna istraživanja posvećena istraživanju zelenih otapala te zamjenom konvencionalnih organskih otapala zelenima.

Ekstrakcija je provedena variranjem statičkog vremena (5 i 10 min), broja ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 ili 4 ciklusa) i temperature ekstrakcije (20 i 50 °C). Prema dosadašnjim istraživanjima pokazano je da se ASE ekstrakcija za svaku različitu sirovinu treba optimirati, odnosno da treba odrediti optimalne ekstrakcijske uvjete koji će rezultirati najvećim prinosom ciljanih spojeva. Ovako niske temperature su odabrane kako bi se ispitala učinkovitost ove ekstrakcijske tehnike pri blažim temperaturnim uvjetima s ciljem svođenja degradacije termolabilnih spojeva na minimum (Putnik i sur., 2017; Bursać Kovačević i sur., 2018). U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje pigmenata karotenoida i klorofila te ukupnih fenola, a svi dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu te prikazani grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm STDEV (Slike 11, 12, 13 i 14). Statističkom obradom dobiveni su rezultati na temelju kojih su određeni signifikantni utjecaji variranih parametara na masene udjele ispitivanih spojeva (Tablice 4, 5, 6 i 7).

Rezultati i rasprava su podijeljeni u potpoglavlja, a u svakome od njih prikazano je kako ispitivani parametri ASE ekstrakcije utječu na masene udjele fenola, karotenoida te klorofila *a* i *b*.

4.1. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA UKUPNE FENOLE

Rezultati određivanja masenih udjela ukupnih fenola (UF) u ekstraktima lista koprive prikazani su na Slici 11. Iz grafičkog prikaza vidljiv je trend promjene sadržaja UF u ovisnosti o promjeni postavljenih ekstrakcijskih parametara (statičko vrijeme, broj ciklusa i temperatura).



Slika 11. Prosječni maseni udjeli UF (mg GAE 100 g⁻¹) izoliranih iz liofiliziranih listova koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima

Maseni udjeli UF u listu koprive određeni su u rasponu od $106,44 \pm 8,21$ do $739,97 \pm 9,41$ mg GAE 100 g⁻¹, a prosječna vrijednost iznosi $359,84 \pm 18,88$ mg GAE 100 g⁻¹. Augspole i sur. (2017) su odredili da je maseni udio UF u svježim listovima koprive iznosio $743,4 \pm 96,3$ mg GAE 100 g⁻¹ što je u skladu s najvećom vrijednošću masenog udjela ukupnih fenola dobivenih u ovom istraživanju.

U ekstrakcijama 1-8 primijenjeno je isto statičko vrijeme u trajanju od 5 minuta, dok je u ekstrakcijama 9-16 statičko vrijeme iznosilo 10 minuta. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se maseni udjeli UF povećavaju povećanjem statičkog vremena, a razlog tome je duža izloženost uzorka otapalu čime je pospješena difuzija ekstrahiranih komponenata u otapalo. Prosječni maseni udio UF u uzorcima 1-8 iznosi $297,67 \pm 23,02$ mg GAE 100 g⁻¹, dok u uzorcima 9-16 iznosi $421,91 \pm 14,74$ mg GAE 100 g⁻¹, što je prosječno za 42 % više u odnosu na kraće statičko vrijeme.

Tablica 4. Rezultati multifaktorske analize utjecaja ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih fenola izoliranih iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametar ekstrakcije	n	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g ⁻¹)
Broj ciklusa		$p \leq 0,01^\dagger$
1 ciklus	8	258,92 ± 8,2 ^d
2 ciklus	8	345,29 ± 8,2 ^c
3 ciklus	8	387,22 ± 8,2 ^b
4 ciklus	8	447,59 ± 8,2 ^a
Statičko vrijeme (min)		$p \leq 0,01^\dagger$
5 min	16	297,6 ± 5,8 ^b
10min	16	421,91 ± 5,8 ^a
Temperatura		$p \leq 0,01^\dagger$
20 °C	16	200,34 ± 5,8 ^b
50 °C	16	519,17 ± 5,8 ^a

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Putnik i sur. (2017) su proveli istraživanje u kojem su proučavali utjecaj parametara ASE ekstrakcije na fenolni sastav ekstrakata listova zelene masline. ASE ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima statičkog vremena (5, 10, 15 min), broja ciklusa (1 i 2) i temperature (60, 80, 100 °C). Zaključili su da temperatura i statičko vrijeme ekstrakcije imaju veći učinak na prinos UF od broja ciklusa. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je trajanje ekstrakcije od 5-10 min rezultiralo najvećim prinosom UF, dok je pri statičkom vremenu od 15 min došlo do gubitaka. Produljena izloženost uzorka višim temperaturama pojačava reakcije koje uzrokuju degradaciju termički nestabilnih polifenola što rezultira gubicima. Da bi se provela visoko učinkovita ekstrakcija, potrebno je također istražiti utjecaj statičkog vremena unutar statičkih ciklusa (Mottaleb i Sarker, 2012). Putnik i sur. (2017) su za izolaciju bioaktivnih spojeva iz lista masline zaključili da bi trajanje statičkog vremena trebalo biti između 5 i 10 minuta kroz 2 ekstrakcijska ciklusa pri temperaturi 80 °C.

Pri istom statičkom vremenu, ali različitom temperaturnom režimu vidljivo je da se udio UF povećava s povećanjem temperature. Tako u uzorku 1 maseni udio UF iznosi 106,44 ± 0,08 mg GAE 100 g⁻¹, što je manje u usporedbi s uzorkom 8 gdje je maseni udio UF iznosio 576,58 ± 0,39 mg GAE 100 g⁻¹. Isto povećanje UF zabilježeno je i u skupini uzoraka s

primijenjenim statičkim vremenom od 10 min, gdje je udio UF u uzorku 9 iznosio $204,63 \pm 0.19$ mg GAE 100 g^{-1} , a u uzorku 16 gotovo trostruko više, odnosno $739,97 \pm 0.09$ mg GAE 100 g^{-1} . Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanim jer se porastom temperature povećava topljivost mnogih spojeva, ali i koeficijent difuzije vode što pospješuje prodiranje otapala u matriks te tako utječe na učinkovitost ekstrakcije (Hossain, 2011).

Porast sadržaja UF uz porast temperature ekstrakcije ranije je zabilježen u rezultatima istraživanja Hossaina (2011) analizirajući dobivene ekstrakte ružmarina, origana i mažurana primjenom ASE ekstrakcije. Temperature ekstrakcije (66, 75, 99, 120 i 129 °C) kombinirane su s različitim koncentracijama vodene otopine metanola (32, 40, 60, 80 i 88 %) uz konstantno statičko vrijeme od 5 minuta. Dobiveni rezultati pokazuju da su najveći udjeli UF ostvareni pri najvišoj temperaturi (129 °C).

U prilog rezultatima ovog istraživanja idu i rezultati istraživanja Zgórka (2009) u kojem je pokazano kako se primjenom ASE ekstrakcije koncentracija izoflavona iz listova djeteline (*Trifolium* L.) povećava porastom temperature (75, 100 i 125 °C) bez termičke degradacije spojeva. U istom istraživanju ispitan je i utjecaj većeg broja ekstrakcijskih ciklusa na učinkovitost ekstrakcije (1, 2, 3 i 4). Zaključeno je da se povećanjem broja ciklusa poveća udio izoliranih spojeva, ali da je nakon 3 ciklusa provedena potpuna ekstrakcija te se ekstrakcija od 4 ciklusa smatra nepotrebnom.

Bozan i Altinay (2014) su odredili utjecaj temperature (50, 80 i 120 °C), statičkog vremena ekstrakcije (5, 10, 20 i 30 minuta) i broja ekstrakcijskih ciklusa (1, 2, 3, 4 i 5) na prinos flavan-3-ola iz osušenih i usitnjenih sjemenki grožđa primjenom ASE ekstrakcije. Uočili su pozitivan učinak temperature na prinos flavan-3-ola. Povećanjem temperature s 50 °C na 80 °C prinos katehina bio je veći za 15 %, a epikatehina za čak 57 %, dok je daljnjim povećanjem temperature do 120 °C, prinos katehina bio čak 2,5 puta, a epikatehina 1,5 puta veći u odnosu na prinos postignut pri 80 °C. Povećavanjem statičkog vremena ekstrakcije do 20 minuta, povećavao se i prinos flavan-3-ola.

Pri istim uvjetima statičkog vremena i temperature, ali povećanjem broja ciklusa uočen je porast udjela UF tako da je veći udio UF određen u uzorcima kod kojih je primijenjen veći broj ciklusa. Sukladno tome, iz dobivenih rezultata je vidljivo da je u ekstraktu 4 određeni udio UF bio za 60 % veći u usporedbi s ekstraktom 1, čime se potkrjepljuje hipoteza da se veća učinkovitost ASE ekstrakcije ostvaruje uz veći broj ekstrakcijskih ciklusa (4 ekstrakcijska ciklusa vs. 1 ekstrakcijski ciklus). Rezultati ovog

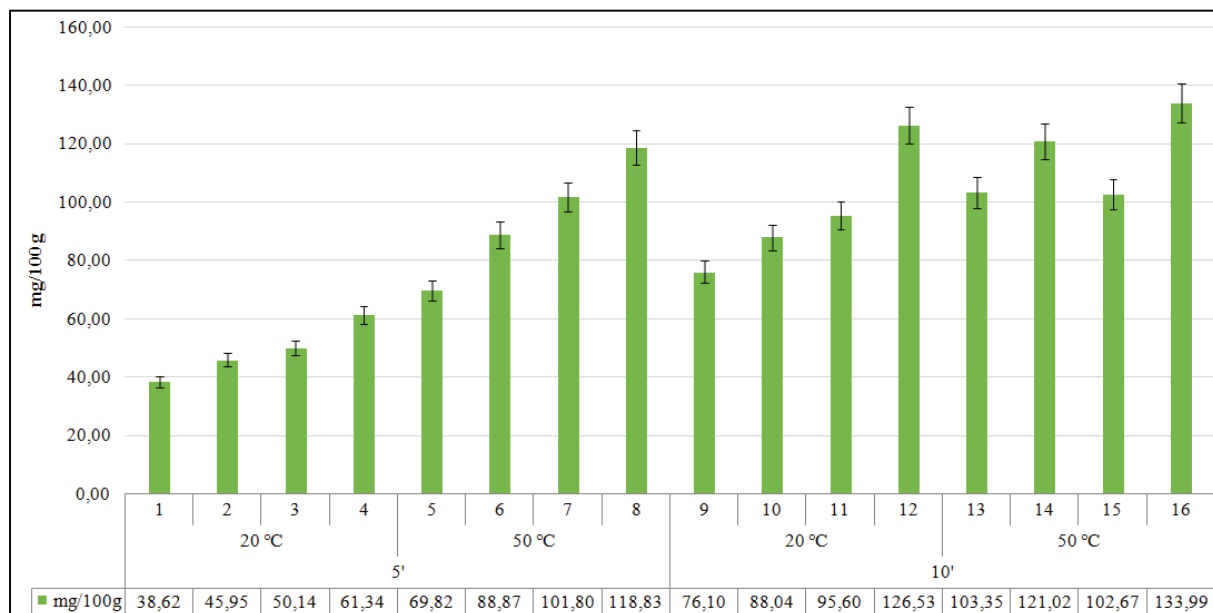
istraživanja se ne podudaraju s rezultatima Bozan i Altinay (2014) kod kojih je utjecaj broja ciklusa bio značajan samo do 2 ciklusa kada je postignuta najveća koncentracija flavan-3-ola, dok se koncentracija dobivena nakon dva ciklusa nije značajno razlikovala od onih dobivenih pri 3, 4 ili 5 ekstrakcijskih ciklusa.

Mottaleb i Saeker (2012) u svom istraživanju navode da je temperatura kritičan parametar za procjenu ekstrakcijske učinkovitosti za ASE ekstrakciju. Navode da se porastom temperature viskoznost ekstrakcijskog otapala značajno smanjuje, što rezultira boljim otapanjem samog analita, odnosno olakšava da se otapalo ravnomjerno rasporedi preko biološkog materijala te se na taj način poboljšava difuzija i brzina ekstrakcije. Također, toplinska energija koja se dovodi pomaže pucanju veza između analita i matriksa u kojem se on nalazi te se time potiče difuzija analita u otapalo. Osim temperature, objašnjavaju kako je potrebno uskladiti statičko vrijeme i broj ciklusa. Povećanjem statičkog vremena pri povišenoj temperaturi se omogućava da spojevi koji su ostali „zarobljeni“ u porama ili mikrostrukturama matriksa difundiraju u otapalo, dok se regulacijom broja ciklusa omogućava obnavljanje otapala, odnosno pri svakom novom ciklusu uvodi se nova količina otapala u sustav. Povećanje broja ciklusa ekstrakcije pogodno je za uzorke s visokom koncentracijom analita, kao i za uzorke kod kojih otapalo teže prodire u matriks. Uz sve navedeno, učinkovitost ekstrakcije ovisi i o prirodi uzorka, analitu koji se ekstrahira te o položaju/dostupnosti tog analita unutar uzorka (Mustafa i Turner, 2011).

Iz svega navedenog može se zaključiti da sva tri parametra značajno utječu na masene udjele UF u ekstraktima liofiliziranih listova koprive ($p \leq 0,01$), pri čemu se bolje iskorištenje procesa ostvaruje pri višoj temperaturi, dužem statičkom vremenu te većem broju ciklusa ekstrakcije (Tablica 4). Stoga su i najviše vrijednosti za UF određene u uzorku broj 16 ($739,97 \pm 0,09$ mg GAE 100 g⁻¹) u kojem su primijenjeni najviši režimi svih ispitivanih parametara, točnije statičko vrijeme 10 min, temperatura 50 °C i 4 ciklusa ekstrakcije.

4.2. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA UKUPNE KAROTENOIDE

Rezultati određivanja masenih udjela ukupnih karotenoida u ekstraktima lista koprive prikazani su na Slici 12.



Slika 12. Prosječni maseni udjeli ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) karotenoida u listu koprive izoliranih iz liofiliziranih listova koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima

Maseni udjeli karotenoida u listu koprive određeni su u rasponu od $38,61 \pm 0,76 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ do $133,99 \pm 5,11 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a prosječna vrijednost iznosi $88,92 \pm 3,58 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Ako se proučava utjecaj statičkog vremena ekstrakcije, dobiveni rezultati ukazuju da se dužim statičkim vremenom (5 vs. 10 min) dobivaju značajno veći maseni udjeli karotenoida u etanolnim ekstraktima lista koprive (Tablica 5). Prosječni maseni udio karotenoida u uzorcima 1-8 iznosi $71,92 \pm 2,47 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ dok u uzorcima 9-16 iznosi $105,91 \pm 4,68 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, što je prosječno za 47 % više u odnosu na kraće statičko vrijeme.

U nekim slučajevima, jedan ciklus ekstrakcije ne može posve kvantitativno izdvojiti analite iz uzorka, stoga se mora uvesti svježe otapalo kako bi se povećala učinkovitost procesa. Mustafa i Turner (2011) navode da provođenje više ciklusa ekstrakcije može biti korisno u situacijama kada ekstrakcija nije potpuna zbog ograničenog volumena ekstrakcijskog otapala. U ovom istraživanju se iz Tablice 5 vidi da općenito porast broja ciklusa ekstrakcije značajno doprinosi povećanju masenog udjela karotenoida u dobivenim ekstraktima, iako između drugog i trećeg ciklusa nema značajne razlike ($p \leq 0,01$). Sukladno

tome, iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u ekstraktu 4 određeni udio karotenoida bio za 59 % veći u usporedbi s ekstraktom 1.

Tablica 5. Rezultati multifaktorske analize utjecaja ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih karotenoida izoliranih iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametar ekstrakcije	n	Ukupni karotenoidi (mg 100 g ⁻¹)
Broj ciklusa		$p \leq 0,01^\dagger$
1 ciklus	8	$72,56 \pm 0,02^c$
2 ciklus	8	$86,37 \pm 0,02^b$
3 ciklus	8	$88,01 \pm 0,02^b$
4 ciklus	8	$110,22 \pm 0,02^a$
Statičko vrijeme (min)		$p \leq 0,01^\dagger$
5 min	16	$72,45 \pm 0,01^b$
10min	16	$106,85 \pm 0,01^a$
Temperatura		$p \leq 0,01^\dagger$
20 °C	16	$73,99 \pm 0,01^b$
50 °C	16	$105,40 \pm 0,01^a$

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Zaghdoudi i sur. (2015) su izolirali karotenoide pomoću ASE ekstrakcije iz tri ploda: kaki (*Diospyros kaki* L.), breskve (*Prunus persica* L.) i marelice (*Prunus Armeniaca* L.) te je najveći prinos ostvaren pri ekstrakciji u trajanju od 5 minuta, unutar 1 ciklusa i temperaturi 40 °C. Zaključili su da povećanje broja ciklusa od 1 do 5 nema značajan utjecaj na povećanje ukupnih izoliranih karotenoida. Do sličnog su zaključka došli i Saha i sur. (2015) koji su proveli ASE ekstrakciju karotenoida iz naranče i mrkve te su zaključili da povećanje količine otapala i broja ciklusa (više od 3 ekstrakcijska ciklusa) ne dovodi do učinkovitije ekstrakcije. Zaključili su da vrijeme i temperatura imaju značaj učinak na prinos te da su optimalni uvjeti ekstrakcije postignuti pri 60 °C i 15 min uz 3 ekstrakcijska ciklusa. Rezultati navedenih istraživanja se ne podudaraju s rezultatima dobivenih unutar ovog istraživanja. Razlog tome može biti činjenica da su u ovom radu korištene niže temperature (20 i 50 °C) koje nisu bile dovoljne za razaranje strukture kloroplasta i uspješniju izolaciju pigmenata, pa su se samim time prinosi kroz veći broj ciklusa i duže statičko vrijeme povećavali.

Dugotrajan proces ekstrakcije najčešće se skraćuje porastom temperature i/ili smanjenjem veličine čestica. Porast temperature poboljšava kontakt analita s ekstrakcijskim otapalom što povećava brzinu difuzije, a samim time ubrzava proces ekstrakcije. Međutim, visoke temperature mogu dovesti do razgradnje termolabilnih spojeva kao što su pigmenti, stoga je iznimno važno odrediti najvišu temperaturu ekstrakcije koja omogućava brzu i efikasnu ekstrakciju bez gubitaka. Temperatura je bila ključan parametar PLE ekstrakcije pigmenta iz alge *Chlorella vulgaris* u istraživanju Cha i sur. (2010). U navedenom istraživanju došlo je do povećanja učinkovitosti procesa ekstrakcije klorofila pri višim temperaturama, dok je β -karoten bio osjetljiv na povišenu temperaturu (od 120 do 160 °C) te je došlo do smanjenja njegove koncentracije. Temperatura osim na viskoznost i topljivost otapala, također može utjecati na izomerizaciju i razgradnju spojeva osjetljivih na visoke temperature.

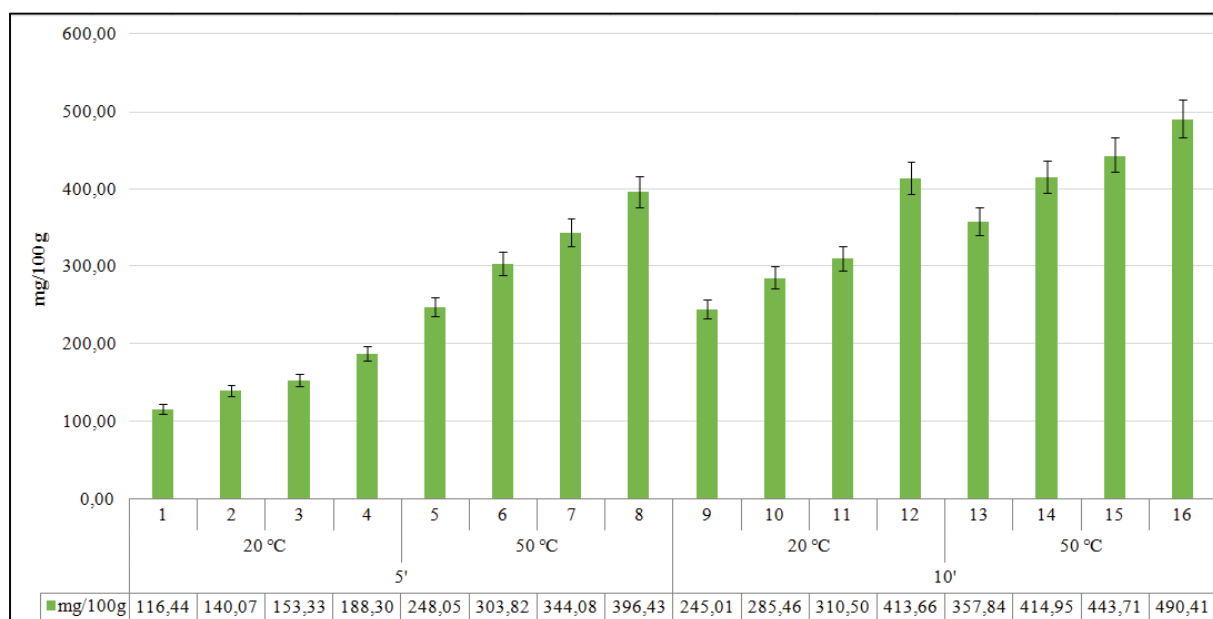
Iz rezultata dobivenih unutar ovog istraživanja vidljivo je da se pri istom statičkom vremenu, ali različitom temperaturnom režimu, udio karotenoida povećava s povećanjem temperature. Tako u uzorku 1 maseni udio karotenoida iznosi $38,62 \pm 7,56$ mg 100 g⁻¹, što je vidno manje u usporedbi s uzorkom 8 gdje je izmjeren maseni udio karotenoida iznosio $118,83 \pm 2,64$ mg 100 g⁻¹. Isto povećanje udjela karotenoida zabilježeno je i u skupini uzoraka s primijenjenim statičkim vremenom od 10 min, gdje je udio karotenoida u uzorku 9 iznosio $76,10 \pm 1,49$ mg 100 g⁻¹, a u uzorku 16 $133,99 \pm 5,12$ mg 100 g⁻¹. Može se zaključiti da se povećanjem temperature s 20 °C na 50 °C, pri istom statičkom vremenu, maseni udio karotenoida dvostruko povećava što je značajan doprinos (Tablica 5).

Zaključno, najveći udio karotenoida u listu koprive ($133,99$ mg 100 g⁻¹) određen je u ekstraktu 16 koji je dobiven pri temperaturi od 50 °C, uz 4 ciklusa ekstrakcije i statičkom vremenu od 10 minuta.

4.3. UTJECAJ ASE EKSTRAKCIJE NA KLOROFIL *a* I *b*

Unutar ovog istraživanja određeni su i maseni udjeli klorofila *a* i *b* (Ch-*a* i Ch-*b*), a dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 13 i Slika 14). Ch-*a* i Ch-*b* se uobičajeno u biljkama nalaze u omjeru 3:1 (Gaur i sur., 2006), a rezultati ovog istraživanja su u skladu s navedenim. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da etanolni ekstrakti listova koprive sadržavaju značajno više udjele klorofila *a* u odnosu na klorofil *b* s prosječnim vrijednostima $303,25 \pm 10,34$ mg 100 g⁻¹ (klorofil *a*) te $113,53 \pm 6,33$ mg 100 g⁻¹ (klorofil *b*). Đurović i sur. (2007) u

svom istraživanju navode da etanolni ekstrakt lista koprive sadrži značajno više udjele klorofila *a* (16,55 mg g⁻¹) u odnosu na klorofil *b* (7,55 mg g⁻¹) što je u skladu s rezultatima dobivenima unutar ovog istraživanja.



Slika 13. Prosječni maseni udjeli (mg 100 g⁻¹) klorofila *a* izoliranih iz liofiliziranih listova koprive primjenom ASE

Maseni udjeli klorofila *a* u ekstraktima lista koprive određeni su u rasponu od 116,44 ± 2,75 mg 100 g⁻¹ do 490,42 ± 2,31 mg 100 g⁻¹, a prosječna vrijednost iznosi 303,25 ± 10,34 mg 100 g⁻¹.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se dužim statičkim vremenom (5 vs. 10 min) dobivaju značajno veći maseni udjeli klorofila *a* u etanolnim ekstraktima lista koprive ($p \leq 0,01$) (Tablica 6). Prosječni maseni udio klorofila *a* u uzorcima 1-8 iznosi 236,32 ± 6,61 mg 100 g⁻¹ dok u uzorcima 9-16 iznosi 370,19 ± 14,08 mg 100 g⁻¹, što je prosječno za 56 % više u odnosu na kraće statičko vrijeme.

Iz Slike 13 se vidi da porastom broja ekstrakcijskih ciklusa dolazi do povećanja masenog udjela klorofila *a* u dobivenim ekstraktima, što je razvidno i u rezultatima provedene statističke analize (Tablica 6). Sukladno tome, iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u ekstraktu 4 određeni udio klorofila *a* bio za 62 % veći u usporedbi s ekstraktom 1. Također, u ekstraktu 12 određeni udio klorofila *a* bio je za 69 % veći u usporedbi s ekstraktom 9.

Tablica 6. Rezultati multifaktorske analize utjecaja ekstrakcijskih parametara na masene udjele klorofila *a* izoliranih iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

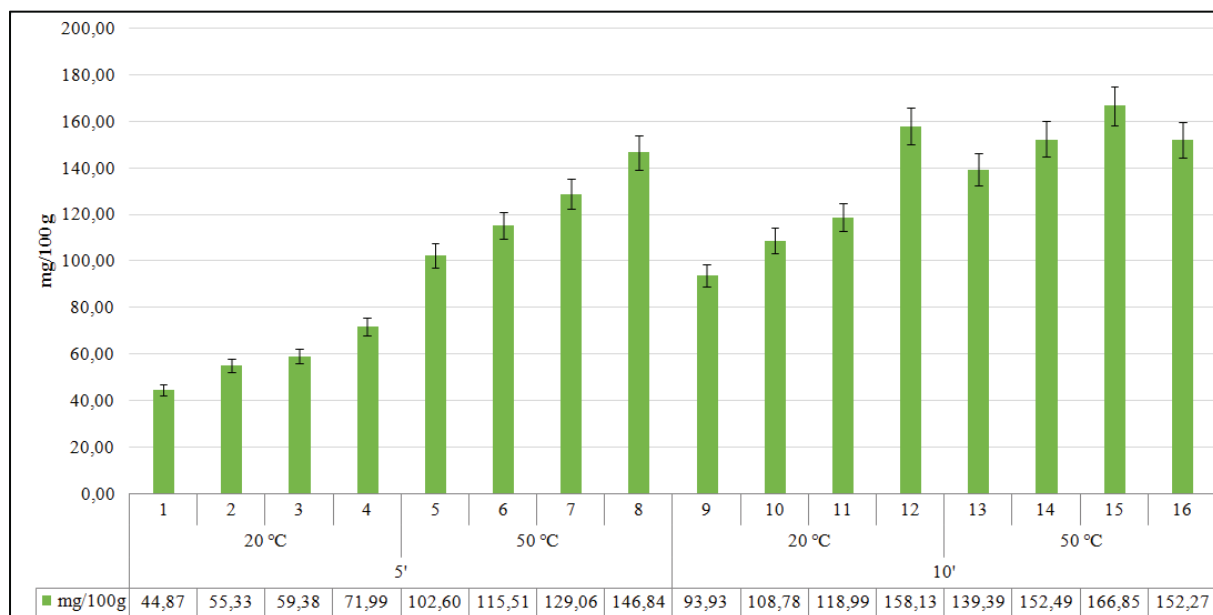
Parametar ekstrakcije	n	Klorofil <i>a</i> (mg 100 g ⁻¹)
Broj ciklusa		$p \leq 0,01^\dagger$
1 ciklus	8	242,33 ± 0,05 ^d
2 ciklus	8	286,15 ± 0,05 ^c
3 ciklus	8	313,70 ± 0,05 ^b
4 ciklus	8	372,19 ± 0,05 ^a
Statičko vrijeme (min)		$p \leq 0,01^\dagger$
5 min	16	236,55 ± 0,04 ^b
10min	16	370,85 ± 0,04 ^a
Temperatura		$p \leq 0,01^\dagger$
20 °C	16	232,71 ± 0,04 ^b
50 °C	16	37569 ± 0,04 ^a

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Velik broj istraživanja navodi kako je temperatura jedan od ključnih parametara učinkovitosti ASE ekstrakcije. Porastom temperature povećava se brzina ekstrakcije, međutim kod ekstrakcije pigmenta potrebno je precizno definirati temperaturni interval kako bi se spriječila degradacija željenih spojeva. Rezultati ovog istraživanja izdvojili su temperaturu kao značajan čimbenik koji doprinosi učinkovitosti ASE ekstrakcije (Tablica 6). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da porastom temperature s 20 na 50 °C, pri istom statičkom vremenu, dolazi do povećanja masenih udjela klorofila *a*. Tako u uzorku 1 maseni udio klorofila *a* iznosi $116,44 \pm 2,75$ mg 100 g⁻¹, što je vidno manje u usporedbi s uzorkom 8 gdje je izmjeren maseni udio iznosio $396,43 \pm 9,53$ mg 100 g⁻¹. Isto povećanje udjela klorofila *a* zabilježeno je i u skupini uzoraka s primijenjenim statičkim vremenom od 10 min, gdje je udio klorofil *a* u uzorku 9 iznosio $245,01 \pm 5,80$ mg 100 g⁻¹, a u uzorku 16 $490,41 \pm 2,31$ mg 100 g⁻¹. Cha i sur. (2010) navode da je temperatura ključan parametar PLE ekstrakcije u izolaciji pigmenta iz *Chlorella vulgaris*. U navedenom istraživanju došlo je do povećanja učinkovitosti procesa ekstrakcije klorofila pri višim temperaturama te su maksimalni prinosi klorofila *a* i *b* ostvareni pri temperaturama od 150 do 160 °C. Autori objašnjavaju da navedena alga akumulira velike

količine pigmenata u kloroplastima koji sadrže čvrstu staničnu stijenku što otežava proces njihove ekstrakcije, stoga povišena temperatura smanjuje tu barijeru i povećava učinkovitost ekstrakcije.

Iz svega navedenog može se zaključiti da je najveći udio klorofila *a* u listu koprive određen u ekstraktu 16 (490,41 mg 100 g⁻¹) koji je dobiven pri temperaturi od 50 °C, uz 4 ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme od 10 minuta.



Slika 14. Prosječni maseni udjeli (mg 100 g⁻¹) klorofila *b* izoliranih iz liofiliziranih listova koprive primjenom ASE

Maseni udjeli klorofila *b* u ekstraktima lista koprive određeni su u rasponu od 44,87 ± 1,43 mg 100 g⁻¹ do 166,846 ± 10,26 mg 100 g⁻¹, a prosječna vrijednost iznosi 113,53 ± 6,33 mg 100 g⁻¹.

Povećanjem vremena ekstrakcije produljuje se period tijekom kojeg uzorak reagira s ekstrakcijskim otapalom po zadanom ciklusu ekstrakcije. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da povećanjem statičkog vremena s 5 na 10 minuta dolazi do povećanja masenih udjela klorofila *b* tako da je prosječni maseni udio u uzorcima 1-8 iznosio 90,70 ± 3,47 mg 100 g⁻¹, dok je u uzorcima 9-16 iznosio 136,35 ± 7,92 mg 100 g⁻¹.

Također, iz rezultata je vidljivo da povećanjem broja ciklusa dolazi do značajnog povećanja masenog udjela klorofila *b* u dobivenim ekstraktima ($p \leq 0,01$) (Tablica 7). Međutim, navedeno povećanje vrijedi do ekstrakcije 15 u kojem se postiže najveći maseni

udio ($166,85 \pm 10,26 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), a zatim slijedi pad vrijednosti u ekstrakciji 16 ($152,27 \pm 9,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da porastom temperature s 20 na 50 °C, pri istom statičkom vremenu, dolazi do povećanja masenih udjela klorofila *b*. Tako u uzorku 1 maseni udio klorofila *b* iznosi $44,87 \pm 1,43 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, što je vidno manje u usporedbi s uzorkom 8 gdje je izmjeren maseni udio iznosio $146,84 \pm 4,47 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Međutim, povećanjem broja ciklusa s 3 na 4 pri statičkom vremenu 10 min i temperaturi 50 °C dolazi do pada vrijednosti masenog udjela, tako je udio klorofil *b* u uzorku 15 iznosio $166,85 \pm 10,26 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a u uzorku 16 $152,27 \pm 9,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Do pada masenog udjela klorofila *b* u ekstrakcijskom režimu 16 najvjerojatnije je došlo zbog degradacije pigmentata uslijed „najekstremnijih“ uvjeta ekstrakcije.

Tablica 7. Rezultati multifaktorske analize utjecaja ekstrakcijskih parametara na masene udjele klorofila *b* izoliranih iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametar ekstrakcije	n	Klorofil <i>b</i> (mg 100 g ⁻¹)
Broj ciklusa		$p \leq 0,01^\dagger$
1 ciklus	8	$95,66 \pm 0,02^d$
2 ciklus	8	$108,10 \pm 0,02^c$
3 ciklus	8	$119,30 \pm 0,02^b$
4 ciklus	8	$132,77 \pm 0,02^a$
Statičko vrijeme (min)		$p \leq 0,01^\dagger$
5 min	16	$91,00 \pm 0,02^b$
10min	16	$136,21 \pm 0,02^a$
Temperatura		$p \leq 0,01^\dagger$
20 °C	16	$89,64 \pm 0,02^b$
50 °C	16	$138,54 \pm 0,02^a$

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Rezultati provedene statističke analize potvrdili su temperaturu kao značajan parametar koji doprinosi učinkovitosti izolacije klorofila *b* iz lista koprive (Tablica 7). Obzirom su rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali da je klorofil *b* u odnosu na klorofil *a* više polaran i manje termički stabilan (Wang i sur., 2017, Indrasti i sur., 2018), pretpostavlja

se da mu je iz tog razloga za veći prinos ASE ekstrakcijom potrebno sveukupno kraće ekstrakcijsko vrijeme, što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja.

Najveći udio klorofila *b* u listu koprive (166,85 mg 100 g⁻¹) određen je u ekstraktu 15 koji je dobiven pri temperaturi od 50 °C, uz 3 ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme od 10 minuta. U prilog ovome idu i rezultati provedene statističke analize koji pokazuju da sva tri ekstrakcijska parametra značajno utječu na izolaciju klorofila *b* iz lista koprive (Tablica 7).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. U ovom istraživanju, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima iz lista koprive izolirani su sljedeći bioaktivni spojevi s prosječnim vrijednostima: (i) 359,84 mg GAE 100 g⁻¹ za ukupne fenole; (ii) 88,92 mg 100 g⁻¹ za ukupne karotenoide; (iii) 303,25 mg 100 g⁻¹ za klorofil *a* te (iv) 113,53 mg 100 g⁻¹ za klorofil *b*.
2. Porast temperature, veći broj ekstrakcijskih ciklusa i duže statičko vrijeme značajno pridonose prijenosu mase i učinkovitijoj ekstrakciji ukupnih fenola i pigmenata iz listova koprive te su općenito najviši maseni udjeli izoliranih spojeva dobiveni pri 50 °C, 3 i/ili 4 ekstrakcijska ciklusa uz statičko vrijeme od 10 min.
3. Optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih fenola, karotenoida i klorofila *a* iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu su: temperatura od 50 °C, četiri ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 10 minuta.
4. Optimalni uvjeti za ekstrakciju klorofila *b* iz lista koprive primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu su: temperatura od 50 °C, tri ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 10 minuta.
5. Zaključno, rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je ASE učinkovita okolišno prihvatljiva metoda ekstrakcije ukupnih fenola, klorofila i karotenoida iz liofiliziranih listova koprive pri čemu je utvrđeno da se kroz kratko vrijeme ekstrakcije postižu visoki prinosi određivanih spojeva. Razmatrajući signifikantnost utjecaja temperature, vremena ekstrakcije i broja ciklusa na izolaciju ukupnih fenola i pigmenata iz lista koprive, dobiveni rezultati pokazuju da sva tri ekstrakcijska parametra značajno doprinose učinkovitosti procesa ($p \leq 0,01$).

6. LITERATURA

Slika Anonymus 1: <https://dominantni.com/wp-content/uploads/2019/03/kopriva.jpg>;
Pristupljeno: 22.8.2019.

Adhikari, B.M., Bajracharya, A., Shrestha, A.K. (2016) Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Sci. Nutr.* **4(1)**, 119-124.

Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.H. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **16(2)**, 295-315.

Asgarpanah, J., Mohajerani, R. (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *J.Med. Plants Res.* **6(46)**, 5714-5719.

Augspole, I., Duma, M., Ozola, B., Cinkmanis, I. (2017) Phenolic profile of fresh and frozen nettle, goutweed, dandelion and chickweed leaves. In *Proceedings of the 11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food Science and Technology in a Changing World"*, Jelgava, Latvia (pp. 27-28).

Bozan, B., Altinay, R.C. (2014) Accelerated solvent extraction of flavan-3-ol derivatives from grape seeds. *Food Sci. Technol. Res.* **20(2)**, 409-414.

Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U., Pan, C.H. (2010) Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 793-797.

Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2010) Extraction of natural antioxidants from plant foods. U: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries (Syed S.H. Rizvi, ured.), str. 506-594.

Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (2008) Minor food components. U: Fenema's Food Chemistry, Taylor and Francis Group, London/New York, str. 580

Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., Wielgusz, K. (2015) The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Indian Crops Prod.* **68**, 42-49.

Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A. (2016) The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2), 160.

Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Pertonić, M., Zeković, Z. (2017) Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J. Funct. Food.* **32**, 18-26.

Gaur, S., Shivhare, U.S., Ahmed, J. (2006) Degradation of chlorophyll during processing of green vegetables: a review. *Stewart Postharvest Review*, **5**, 1-8.

Güder, A., Horkmaz, H. (2012) Evaluation of in-vitro antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iranian J. Pharm. Res.* **11**(3), 913-923.

Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., Isasa, M.E.T. (2003) Fatty acids and carotenoids from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food Compos. Anal.* **16**(2), 111–119.

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Kolahi, M. (2009) Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L.), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pak. J. Bio. Sci.* **12**(1), 58.

Hammouda, F.M. (2015) Green technology: economically and environmentally innovative Harbone, J.B., Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **55**, 481-504.

Hidalgo, G.I., Almajano, M. (2017) Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxid.* **6**(1), 7.

Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž. (2007) Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Sep. Purif. Technol.* **57(1)**, 37-46.

Horník, Š., Sajfrtová, M., Karban, J., Sýkora, J., Březinová, A., Wimmer, Z. (2013) LC-NMR technique in the analysis of phytosterols in natural extracts. *J. Anal. Methods Chem.* 1-7.

Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N.P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**, 339–346.

Humphrey, A.M. (2004) Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.* **69(5)**, 422-425.

Indrasti, D., Andarwulan, N., Purnomo, E.H., Wulandari, N. (2018) Stability of Chlorophyll as Natural Colorant: A Review for Suji (*Dracaena angustifolia* (Medik.) Roxb.) Leaves' Case. *Curr Res Nutr Food Sci.* **6(3)**, 609-625.

Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., Lukačević, I. (2008) Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologia Croatica.* **14**, 13-26.

Jan, K.N., Zarafshan, K., Singh, S. (2016) Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *J. Food Meas. Charact.* **11(2)**, 423-433.

Jentzer, J.B., Alignan, M., Vaca-Garica, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2014) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561–567.

Johnson, T.A., Morgan, M.V.C., Aratow, N.A., Estee, S.A., Sashidhara, K.V., Loveridge, S.T., Segraves, N.L., Crews, P. (2010) Assessing pressurized liquid extraction for the high-throughput extraction of marine sponge-derived natural products. *J. Nat. Prod.* **73(3)**, 359–364.

Kovačević, D.B., Barba, F.J., Granato, D., Galanakis, C.M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., Putnik, P. (2018) Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food chem.* **254**, 150-157.

Kregiel, D., Pawlikowska, E., Antolak, H. (2018) *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Mol.* **23(7)**, 1664.

Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., Kizek, R. (2010) Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **7(10)**, 3804–3815.

Kudritsata, S.E., Filman, G.M., Zagorodskaya, L.M., Chikovanii, D.M. (1986) Carotenoids of *Urtica dioica*. *Chem. Nat. Compd.* **22(5)**, 604–605.

Kukrić, Z., Topalić-Trivunović, L., Kukavica, B., Matoš, S.B., Pavičić, S.S., Boroja, M., Savić, A. (2012) Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Apteiff.* **43**, 257–272.

Lapinskaya, E.S., Kopyt'ko, Y.F., Timokhina, E.A., Krapivkin, B.A., Levandovskii, G.S., Dargaeva, T.D., Sokol'skaya, T.A. (2008) Amino acids and cyclic dipeptides in stinging nettle (*Urtica dioica* and *U. urens*) homeopathic matrix tinctures. *Pharm. Chem. J.* **42(11)**, 650-653.

Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214–222.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids– measurement and characterisation by UV-VIS. – Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA), (Supplement1), F4.3.1 – F4.3.8. John Wiley, New York.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Chen, H. (2016) An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Mol.* **21(10)**, 1374

M. Sajfrtová , H. Sovová , L. Opletal, M. Bártlová (2005) Near-critical extraction of sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *J. Supercrit Fluid.* **35(2)**, 111–118.

Mahmoudi, R., Amini, K., Fakhri, O., Alem, M. (2014) Aroma profile and antimicrobial properties of alcoholic and aqueous extracts from root, leaf and stalk of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Microb. Biotechn. Food Sci.* **4(3)**, 220.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: foodsources and bioavailability. *Am. J. clin. Nutr.* **79**, 727-747.

Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coskun, M. (2004) Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (*Apiaceae*), *Sedum sempervivoides* (*Crassulaceae*), *Malva neglecta* (*Malvaceae*), *Cruciata taurica* (*Rubiaceae*), *Rosa pimpinelli folia* (*Rosaceae*), *Galium verum* subsp. *Verum* (*Rubiaceae*), *Urtica dioica* (*Urticaceae*). *Biol. Pharm. Bull.* **27(5)**, 702-705.

Shams, K.A., Abdel-Azim, N.S., Saleh, I.A., Hegazy, M.E.F., El-Missiry, M.M., (2015) Methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J. Chem. Pharm. Res.* **7(5)**, 1050-1074.

Moldovan, L., Gapar, A., Toma, L., Craciunescu, O., Saviuc, C. (2011) Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five Romanian traditional medicinal plants. *Rev. Chim.(Bucharest).* **62**, 299-303.

Mottaleb, M.A., Sarker, S.D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation, U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology 3.izd., (Sarker, S. D., Nahar, L., ured.). Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87.

Mueen, A.K.K., Subramani, P. (2014) *Urtica dioica* L.(*Urticaceae*): A stinging nettle. *Sys. Rev. Pharm.* **5(1)**, 6.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta*, **703**, 8-18.

Oliver, F., Amon, E.U., Breathnach, A., Francis, D.M., Sarathchandra, P., Kobza Black, A., Greaves, M.W. (1991) Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)-histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clin. Exp. Dermatol.* **16**, 1-7.

Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014) Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* **143**, 48-53.

Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci. World J.* 1-12.

Pant, V., Sundriyal, R.C. (2016) Nutritional and therapeutic efficacy of Stinging Nettle- A review. *The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine. Photon.* **126**, 1240-1254.

Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., Romani, A. (2008) Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks and textile fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food. Chem.* **56**, 9127–9132.

Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Kovačević, D. B. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food Bioprod. Process.* **106**, 19-28.

Radman, S., Žutić, I., Fabek, S., Žlabur, J. Š., Benko, B., Toth, N., Čoga, L. (2015) Influence of nitrogen fertilization on chemical composition of cultivated nettle. *Emir. J. Food Agr.* **27(12)**, 889-896.

Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., Simonovska, J., Srbinoska, M. (2013) Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Qual. Life.* **4**, 26-30.

Rodriguez-Amaya, D.B. (2015) Nomenclature, structures, and physical and chemical properties U: Food carotenoids: Chemistry, biology and technology. John Wiley & Sons. str. 4-10.

Rodriguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, L., Burchiel, S.W., Herrera-Ruiz, D., Torres E. (2008) Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharm.* **227**, 125-135.

Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* **109(1)**, 98-103.

Roschek Jr, B., Fink, R. C., McMichael, M., Alberte, R. S. (2009) Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* **23(7)**, 920-926.

Rutto L.K., Xu Y., Ramirez E., Brandt M. (2013) Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int. J. Food Sci.* 1-9.

Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R. K. (2015) Optimal extraction and finger printing of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Chem.* **177**, 369-375.

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 Sci.* **98(4)**, 828-834.

Sumanta, N., Haque, C.I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.

Udayan, A., Arumugam, M., Pandey, A. (2017) Nutraceuticals from *algae* and *cyanobacteria*.U: Algal Green Chemistry. Elsevier, str. 65-89.

Upton, R. (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.) Extraordinary vegetable medicine. *J. Herb. Med.* **3(1)**, 9-38.

Vajić, U.J., Grujić–Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Gođevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., Mihailović-Stanojević, N. (2015) Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* **74**, 912-917.

Wang, R., Ding, S., Hu, X., Zhang, Y. (2017) Stability of chlorophyll–protein complex (photosystem II) in processed spinach: Effect of high hydrostatic pressure. *Int J Food Prop.* **20(3)**, 3177–3188.

Willows, R.D. (2004) Chlorophylls. U: Plant Pigments and their Manipulation (Davies, K. ured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 23-56.

Zeković, Z., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gorjanović, S., Sužnjević, D., Mašković, P., Đurović, S. (2017) Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Ind Crop Prod.* **108**, 423-430.

Zgórka, G. (2009) Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium* L. species. *Talanta*, **79(1)**, 46-53.

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.

Marta Horas

ime i prezime studenta