

Izolacija fenolnih spojeva lista crnog ribiza primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima

Breški, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:975367>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Martina Breški

**IZOLACIJA FENOLNIH
SPOJEVA LISTA CRNOG RIBIZA
PRIMJENOM UBRZANE
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Repajić, te uz pomoć Ene Cegledi, mag.ing.techn.aliment.

ZAHVALA

Najiskrenije hvala svojoj dragoj mentorici doc.dr.dc. Maji Repajić na uloženom trudu i vremenu, suradnji, strpljenju te na stručnim i prijateljskim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala Eni Cegledi, mag.ing.techn.aliment. na nesebičnoj pomoći, savjetima i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Od srca hvala mojoj obitelji na neizmjerne podršci, strpljenju i poticanju moje želje ka ostvarivanju cilja te hvala prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane i učinili ih nezaboravnima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA LISTA CRNOG RIBIZA PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA

Martina Breški, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212306

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj temperature (100, 125 i 150 °C), statičkog vremena ekstrakcije (5 i 10 min) te omjera otapala i biljnog materijala (20, 30 i 40 mL/g) tijekom ubrzane ekstrakcije otapalima na izolaciju fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza. U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodom. Udio ukupnih fenola određen je u rasponu 42,92-78,90 mg GAE/g s.t., antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u rasponu 595,99-948,43 μmol TE/g s.t., DPPH metodom u rasponu 327,38-618,17 μmol TE/g s.t., dok je ABTS metodom određen u rasponu 579,40-1269,99 μmol TE/g s.t. Najviši udio ukupnih fenola izoliran je pri 150 °C/5 min/30 mL/g, pri čemu dobiveni ekstrakt karakterizira i visoka vrijednost antioksidacijskog kapaciteta.

Ključne riječi: *list crnog ribiza, ASE, ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet*

Rad sadrži: 40 stranica, 8 slika, 2 tablice, 45 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. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: Ena Cegledi, *mag.ing.tech.aliment.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Maja Repajić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF BLACKCURRANT LEAF USING ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

Martina Breški, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212306

Abstract: The aim of this work was to examine the influence of temperature (100, 125 and 150 °C), static extraction time (5 and 10 min) and the ratio of solvent to plant material (20, 30 and 40 mL/g) during accelerated solvent extraction on the isolation of phenolic compounds from the blackcurrant leaf. In the obtained extracts, the content of total phenols and antioxidant capacity using the FRAP, DPPH and ABTS method were determined. The content of total phenols was determined in the range 42.92-78.90 mg GAE/g dm, the antioxidant capacity determined by the FRAP method in the range 595.99-948.43 µmol TE/g dm, by the DPPH method in the range 327.38-618.17 µmol TE/g dm, while it was determined by the ABTS method in the range 579.40-1269.99 µmol TE/g dm. The highest content of total phenols was isolated at 150 °C/5 min/30 mL/g, whereby the obtained extract was characterized by a high value of antioxidant capacity.

Keywords: *blackcurrant leaf, ASE, total phenols, antioxidant capacity*

Thesis contains: 40 pages, 8 figures, 2 tables, 45 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Maja Repajić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: *Ena Cegledi, mag.ing.tech.aliment.*

Reviewers:

1. Verica, Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Maja, Repajić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ivona, Elez Garofulić, PhD, Associate professor (member)
4. Sandra, Balbino, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 22nd, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRNI RIBIZ	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA CRNOG RIBIZA.....	4
2.3. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LISTA CRNOG RIBIZA	4
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	6
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL.....	13
3.1.1. Kemikalije i standardi.....	13
3.1.2. Aparatura i pribor.....	15
3.2. METODE	17
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva.....	17
3.2.2. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	18
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	19
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	21
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	22
3.2.6. Obrada podataka	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. UDIO UKUPNIH FENOLA	24
4.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN FRAP METODOM	26
4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN DPPH METODOM	27
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN ABTS METODOM	29
4.5. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LISTA CRNOG RIBIZA	30
5. ZAKLJUČCI.....	35
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

Crni ribiz je mali višegodišnji grm koji se uzgaja u većini država sjeverne Europe, Rusiji, Sjedinjenim Američkim Državama i Novom Zelandu. Zbog visokog nutritivnog sadržaja i pozitivnog zdravstvenog učinka, koristi se u prehrambenoj industriji za proizvodnju raznih proizvoda kao što su: sokovi, sirupi, pirei, džemovi, želei i razni gotovi proizvodi. Novija istraživanja pokazuju kako i nusproizvodi crnog ribiza, među kojima je i list, imaju visok udio bioaktivnih spojeva te se teži njihovom iskorištavanju. Kako bi se izolirali bioaktivni spojevi mogu se koristiti različite ekstrakcijske tehnike poput konvencionalnih (Soxhlet ekstrakcija, maceracija, dekokcija i infuzija) ili naprednih tehnika ekstrakcije (ubrzana ekstrakcija otapalima, subkrična ekstrakcija vodom, ekstrakcija superkričnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom).

Konvencionalne tehnike ekstrakcije imaju različite nedostatke kao što su dugotrajno vrijeme ekstrakcije, korištenje velike količine otapala te intenzivniji rad, stoga se želi dati prednost bržim i ekološki prihvatljivijim tehnikama ekstrakcije. Jedna od takvih tehnika ekstrakcije je ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE). ASE je jednostavna i brza tehnika koju karakterizira potpuno automatizirani sustav kontrole procesa, a mogućnost izmjene parametara ekstrakcije pridonosi većoj učinkovitosti pri izolaciji fenolnih spojeva. No, za učinkovitu ekstrakciju s ciljem viših prinosa željenih spojeva potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije obzirom na matriks.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj uvjeta ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku za izolaciju fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza. Varirani parametri ekstrakcije bili su: temperatura (100, 125 i 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer otapala i biljnog materijala (20, 30 i 40 mL/g) uz primjenu 30 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet FRAP, DPPH i ABTS metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRNI RIBIZ

Crni ribiz (*Ribes nigrum* L., *Grossulariceae*) (slika 1) je mali višegodišnji grm visine 1-2 m s dlanasto izrezanim listovima nazubljenih rubova (Gopalan i sur., 2012). Cvjetovi su dvospolni, skupljeni u male grozdaste cvatove od 4-12 cvjetova (Lim, 2012). Daje jestive, slatke, aromatične i ljubičasto-crne bobičaste plodove sa sjemenkama promjera do 12 mm. Potječe iz sjeverne Azije te srednje i istočne Europe, a sam plod je prvi puta udomaćen prije 400-500 god. Uzgaja se diljem sjeverne Europe, Rusije, Sjedinjenih Američkih Država i novog Zelanda (Nagaki i sur., 2017). Optimalna temperatura za rast crnog ribiza je 18-20 °C, dok su temperature iznad 35 °C štetne i uzrokuju otpadanje lišća (Lim, 2012). Kako bi se prekinulo mirovanje i stimuliralo izbijanje pupova, usjevu je potrebno razdoblje zimske hladnoće. Na vrijeme izbijanja pupova, vrijeme i trajanje cvatnje te kvalitetu plodova pri berbi može ozbiljno utjecati nedovoljna količina hlađenja tijekom razdoblja mirovanja. Unutar vrste, potreba za hlađenjem, u smislu trajanja i raspona odgovarajućih temperatura, može varirati između kultivara, pa čak i između različitih pupova iste biljke (Hedley i sur, 2010). Crni ribiz preferira vlažna plodna tla s podzemnom vodom ne bliže od 1-1,5 m od površine, s pH vrijednosti u rasponu od 6,7-7, a ne podnosi kisela tla. Među ostalim vrstama ribiza, crni ribiz je najmanje otporan na sušu (Lim, 2012).



Slika 1. Crni ribiz (prema Lučić, 2020)

Crni ribiz ima veliku važnost u prehrambenoj industriji zbog svog bogatog nutritivnog sastava i privlačnih senzorskih karakteristika. Vrijedan je izvor bioaktivnih spojeva kao što su polifenoli (flavonoidi, antocijani, flavanoli), organske kiseline i vitamini te ima oko pet puta veći udio vitamina C u odnosu na agrume (Milić i sur., 2022). Ima malu količinu natrija i kalorija u usporedbi s drugim voćem, no sadrži značajne količine kalija, kalcija i željeza (Allai i sur., 2020). Crni ribiz je dugo vremena opsežno proučavan zbog svojih zdravstvenih dobrobiti i ima dobro utvrđenu povijest sigurne upotrebe. Osim što se proučavao zbog svog antioksidativnog, protuupalnog, neuroprotektivnog i antikancerogenog djelovanja, nova istraživanja pokazuju o mogućim zdravstvenim dobrobitima crnog ribiza, kao što su vaskuloprotektivni učinci, hipokolesterolemijski učinci, povećanje oksidacije masti, poboljšanja mentalnih performansi, modulacije crijevne mikrobiote i smanjenje postprandijalne razine šećera u krvi (Xue i sur., 2022).

Plodovi i listovi crnog ribiza koriste se u tradicionalnoj medicini zbog svog terapijskog potencijala, tj. zbog svojih dijaforetskih i diuretičkih svojstava te za liječenje upalnih poremećaja poput reumatskih bolesti (Nour i sur., 2014). Zbog visokog udjela pigmenata, tj. antocijana, tradicionalno se koristi kao prirodno bojilo i bojilo za hranu. Koristio se i kao nutraceutik za regulaciju ili ublažavanje raznih bolesti, kao što su kardiovaskularne i Alzheimerova bolest (Xue i sur., 2022). Budući da bobice imaju kratki rok trajanja, uglavnom se konzumira u prerađenom obliku kao što su sokovi, sirupi, pirei, džemovi, želei i razni gotovi napici (Milić i sur., 2022). Svježe bobice se mogu liofilizirati kako bi se proizveo prah crnog ribiza (Xue i sur., 2022). Tijekom prerade voća u poluproizvode ili proizvode zaostaju nusproizvodi koje akumulira prehrambena agroindustrija. Takav otpad može biti bogat različitim bioaktivnim funkcionalnim komponentama te je korišten u istraživanjima za ekstrakciju fenolnih spojeva, dijetalnih vlakana i drugih bioaktivnih tvari. Istraživanja su pokazala prisutnost značajnih razina esencijalnih hranjivih tvari i fitokemikalija u korama, sjemenkama i drugim dijelovima voća koji se često ne koriste (Nirmal i sur., 2023). Godišnje se u svijetu proizvede i do 185000 t crnog ribiza, a gotovo više od polovice ploda nakon prerade završi u komini. Budući da nastaju velike količine otpada, ne iznenađuje što se otpad crnog ribiza također koristi za proizvodnju funkcionalnih sastojaka hrane i lijekova zbog visokih količina bioaktivnih spojeva, uključujući antocijane i fenole (Kandemir i sur., 2022). Transformacija na održivije proizvodne sustave poput cirkularne ekonomije postala je odlučujući konkurentski čimbenik za proizvođačke i prerađivačke tvrtke crnog ribiza (May i Guenther, 2019). Cirkularna ekonomija je model proizvodnje i potrošnje

koji uključuje dijeljenje, iznajmljivanje, ponovnu uporabu, popravak, obnovu i recikliranje postojećih materijala i proizvoda što je duže moguće, s ciljem produljenja životnog ciklusa proizvoda i smanjenja otpada na minimum (European Parliament, 2023).

2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA CRNOG RIBIZA

List crnog ribiza sadrži uglavnom nezasićene masne kiseline kao što su α -linolenska, γ -linolenska, *cis*-7,10,13-heksadekatrienska i stearidonska te fosfatidilkolin i fosfatidilglicerol (Ziobroń i sur., 2021).

Sadrži značajne količine minerala i elemenata u tragovima koji imaju ključnu ulogu u aktivaciji enzimskih sustava ili sudjeluju u metabolizmu biomolekula. Na sadržaj minerala i elemenata u tragovima utječu različiti čimbenici kao što su uvjeti uzgoja, tehnike uzgoja, prisutnosti abiotičkog ili biotičkog stresa te dostupnost hranjivih tvari (Nour i sur., 2014). Lišće sadrži kalcij, magnezij, željezo i mangan te ima visoki omjer kalija i natrija, što je nutritivno povoljno zbog povezanosti sa smanjenjem rizika od hipertenzije (Nour i sur., 2014).

Ugodan aromatični miris svježeg lišća crnog ribiza pripisuje se prisutnosti eteričnih ulja, koja obuhvaćaju niz monoterpena i seskviterpena (Ziobroń i sur., 2021). Nagaki i sur. (2017) su u eteričnom ulju lista crnog ribiza odredili sabinen, 3-karen, *cis*- i *trans*-ocimen te većinu terpena čine monoterpeni. U vodenom ekstraktu lista crnog ribiza odredili su 38 komponenti, među kojima je najviše terpinen-4-ola, a zatim β -kariofilena, 3-karena i sabinena.

2.3. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LISTA CRNOG RIBIZA

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti s više od 8000 poznatih struktura, a spadaju u grupu spojeva koji imaju hidroksilnu skupinu spojenu na aromatski prsten (Alara i sur., 2021). Na njihovu koncentraciju mogu utjecati različiti čimbenici kao što su fiziološke varijacije, uvjeti okoliša, zemljopisne varijacije, genetski čimbenici i evolucijski utjecaji. Varijacije fenolnog sastava lista kroz godišnja doba imaju značajnu ulogu u prilagodbi biljaka sezonskim varijacijama u njihovom biotičkom i abiotičkom okruženju. Na procese koji sintetiziraju i akumuliraju sekundarne metabolite izravno utječu okolišni čimbenici koji uključuju svjetlost, temperaturu, dostupnost vode, mineralnu ishranu, kalemljenje, povišeni atmosferski ugljikov dioksid, povišene razine ozona i poljoprivredne tehnologije. S druge strane, genetska pozadina može imati ključnu ulogu u određivanju njihovog antioksidacijskog kapaciteta, sadržaja

mikronutrijenata i fitokemijskog sastava te se pomoću fenolnog profila mogu identificirati kultivari (Nour i sur., 2014)

Brojni bioaktivni sastojci mogu se pronaći u drugim dijelovima grma crnog ribiza, poput lišća, pupoljaka i sjemenki, koji su često zanemareni i podcijenjeni. Lišće crnog ribiza je vrlo dobar izvor bioaktivnih spojeva te sadrži više polifenolnih spojeva od plodova. U listu crnog ribiza detektirani su kvercetin, miricetin, rutin i katehini te je otkrivena prisutnost fenolnih kiselina kao što su: salicilna, *p*-kumarinska, galna, kininska i male količine klorogenske, sinapinske, ferulinske i kafeinske kiseline (Ziobroń i sur., 2021). Nour i sur. (2014) su u svom istraživanju odredili *p*-kumarinsku i galnu kiselinu kao glavne fenolne kiseline u listu crnog ribiza te značajan udio flavonoidnih spojeva poput kvercetina, miricetina i rutina. Na temelju dobivenih rezultata utjecaja datuma berbe i načina ekstrakcije različitih kultivara crnog ribiza, zaključili su da bi se listovi za ljekovite ili industrijske potrebe trebali sakupljati sredinom lipnja, kada sadrže veće količine polifenola, minerala, elemenata u tragovima te viši antioksidacijski kapacitet. Isti autori sugeriraju da lišće crnog ribiza treba dalje istraživati kao potencijalni izvor prirodnih antioksidansa za primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Antioksidansi su kemijski spojevi koji, kada su prisutni u hrani u malim koncentracijama, mogu odgoditi početak ili usporiti brzinu reakcije oksidacije supstrata (Shadidi, 2000). Imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala prekidajući lančane reakcije radikala ili mogu spriječiti nastanak reaktivnih oksidansa (Romera-Castillo i Jaffé, 2015). U prehrambenoj industriji koriste se za očuvanje kvalitete proizvoda i održavanja njihove hranjive vrijednosti, te su od značaja za biokemičare i zdravstvene stručnjake jer mogu pomoći tijelu da se zaštiti od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), kao i onima dušika (RNS) i klora (RCS) (Shadidi, 2000). Antioksidacijski kapacitet odnosi se na mjeru količine (u molovima) danog slobodnog radikala koje je uhvatio uzorak. Njegovim mjerenjem daje se količina heterogene mješavine antioksidansa koji zajedno reagiraju da bi proizveli ukupnu ili neto sposobnost hvatanja slobodnih radikala u uzorku. Reakcije između različitih antioksidansa i oksidansa imaju različite konstante brzine te analitičke metode mjerenja i uvjeti pod kojima se analiza odvija mogu dovesti do varijacije ukupnog antioksidativnog kapaciteta za istu vrstu hrane (MacDonald-Wicks i sur., 2006). U praksi postoji nekoliko metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, a svaka se razlikuje prema principu i metodologiji, kao i osjetljivosti na različite antioksidanse. Najčešće korištene metode obuhvaćaju određivanje antioksidativnog kapaciteta pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-

sulfonske kiseline) (ABTS) te bakar(II)-neokuproin kromogenog reagensa (eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*, CUPRAC), određivanje antioksidativne snage redukcijom željeza (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), analizu kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC), analizu redukcije cerijevog (IV) iona (eng. *Cerriic (IV) Ion Reducing Antioxidant Capacity*, CERAC (Gupta i sur., 2020; Gupta, 2015).

Listovi crnog ribiza imaju viši antioksidacijski kapacitet i pokazuju jača protuupalna svojstva od ploda i ostalih dijelova ove biljke (Ziobroń i sur., 2021). Cyboran i sur. (2012) su svojim istraživanjem prikazali kako ekstrakt lista crnog ribiza ima visoko antioksidativno djelovanje. Uočili su da antioksidativno djelovanje ne ovisi samo o ukupnom fenolnom sastavu, nego i o količini i vrsti pojedinačnih fenolnih spojeva, uglavnom kvercetina. Međutim, treba imati na umu da osim derivata kvercetina, ekstrakti sadrže i druge polifenole u tragovima koji mogu različito utjecati na njihovu antioksidacijsku aktivnost, kao i druge spojeve poput alkaloida, karotenoida, tokoferola ili askorbinske kiseline.

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je tehnika potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima, a provodi se upotrebom odgovarajućeg otapala iz krutine ili neke tekućine koja sadrži željenu tvar. Postupak se temelji na prijenosu mase gdje se željena komponenta otapa u otapalu, smjesa otopljene tvari i otapala prelazi iz namirnice na površinu te se otopljena tvar raspršuje u volumena otapala. Budući da ekstrakcija ovisi o: viskoznosti otapala, volumnom protoku otapala, temperaturi ekstrakcije, površini namirnice izloženoj otapalu i topljivosti komponente u otapalu, pogodno je provoditi ekstrakciju pri višim temperaturama kako bi se ubrzao proces. Prilikom odabira ekstrakcijskog otapala potrebno je obratiti pažnju na vrstu i svojstva komponente koju se želi ekstrahirati, stabilnost komponente pri višim temperaturama, kisiku i svjetlu, polarnost otapala, temperaturu vrenja (treba biti što niža kako bi se lakše odvojilo otapalo od komponente), reaktivnost te viskozitet (treba biti nizak). Također, otapalo mora biti sigurno za upotrebu (ako je moguće nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te sigurno za okoliš), dostupno u dovoljnim količinama, po mogućnosti što jeftinije i pogodno za ponovnu upotrebu (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala koriste se razne konvencionalne i napredne tehnike ekstrakcije. Najčešće korištene konvencionalne tehnike su Soxhlet ekstrakcija,

maceracija, dekokcija i infuzija, a uglavnom se temelje na pravilnom izboru otapala i korištenju topline i/ili miješanja kako bi se povećala topljivost željenih spojeva i prijenos mase te ručnim postupcima uz zahtijevanje velikog rada. Iako se većina laboratorija odlučuje za navedene tehnike ekstrakcije zbog njihove niske cijene i jednostavne upotrebe, nedostatak ovih tehnika je dobivanje ograničenih prinosa, potrošnja velike količine otapala, dugo vrijeme ekstrakcije, nakupljanje rezidua te rizika od toplinske degradacije sastojaka (Alara i sur., 2021). Posljednjih godina Soxhlet ekstrakcija bila je najkorištenija vrsta ekstrakcije zbog svojih prednosti kao što su: uzastopno dovođenje svježeg otapala u kontakt s čvrstim matriksom, održavanje relativno visoke temperature te nije potrebna filtracija ekstrakta. Jedan od glavnih nedostataka je dugotrajno vrijeme ekstrakcije, što rezultira značajnim utroškom vremena i toplinske energije, ograničen broj uzoraka koji se mogu obraditi, intenzivniji rad, korištenje velike količine otapala te mogućnost toplinske razgradnje ciljnih spojeva budući da se ekstrakcija obično odvija duže vrijeme pri temperaturi vrenja otapala (Shams i sur., 2015).

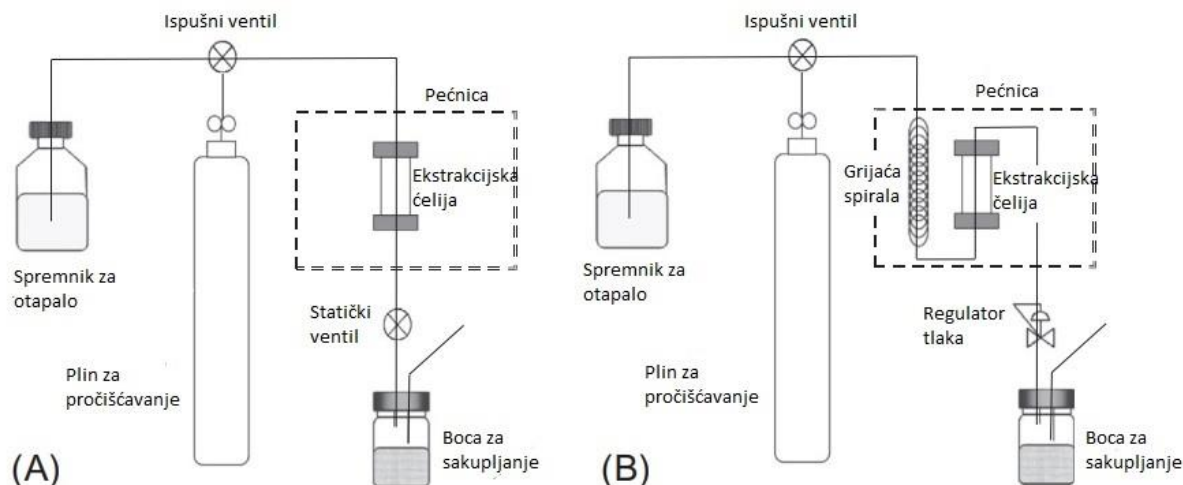
Kako bi se prevladali nedostaci konvencionalnih tehnika, došlo je do razvoja i uporabe naprednih tehnika kao što su ubrzana ekstrakcija otapalima (ASE), subkritična ekstrakcija vodom (SWE), ekstrakcija superkritičnim tekućinama (SFE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) (Shams i sur., 2015). Navedene tehnike ekstrakcije uključuju mnoge prednosti kao što su: potreba za manjim volumenom otapala, veći prinosi, smanjenje toksičnih rezidua, bolja ponovljivost procesa te kraće vrijeme ekstrakcije (Alara i sur., 2021). Također, neke od novih tehnika smatraju se i „zelenim tehnikama“ jer uključuju dizajniranje sigurnijih kemikalija, sigurnih pomoćnih sredstava za otapala, dizajn za energetske učinkovitost, korištenje obnovljivih sirovina te smanjenje derivata (Azmir i sur., 2013).

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE) je tehnika koja poboljšava izvedbu ekstrakcije korištenjem tekućih otapala pri povišenoj temperaturi i tlaku, nadmašujući učinkovitost tehnika koje se provode pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku. Prvi puta je predstavljena 1995. godine na Pitton konferenciji od strane američke tvrtke Dionex Corporation (Mustafa i Turner, 2011). Primjenom ovih specifičnih uvjeta tlaka i temperature dolazi do promjene fizikalno-kemijskih svojstava otapala kao što su povećanje brzine prijenosa mase i topljivosti analita te smanjenje površinske napetosti i

viskoznosti. To omogućuje lakše i dublje prodiranje otapala u kruti matriks koji je podvrgnut ekstrakciji, što rezultira značajno većim prinosima ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim tehnikama. ASE ubrzava proces ekstrakcije, smanjuje potrošnju otapala tijekom pripreme uzorka za krute tvari te je većina ASE instrumenata automatizirana, omogućujući uspostavljanje metoda koje zahtijevaju manje ručnog rada i osiguravaju poboljšanu ponovljivost. Zbog korištenja visokih tlakova (3,5-200 MPa) i temperature (od sobne temperature do 200 °C) obično se koriste materijali otporni na koroziju (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije, mogu se koristiti filter papir, sredstva za disperziju ili sredstva za sušenje, ovisno o karakteristikama matriksa uzorka. Također, vlaga u matriksu uzorka može imati značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije, stoga se za adsorpciju vode koristi inertna dijatomejska zemlja. Ako nema potrebe za upijanjem vlage iz uzorka, koristit će se staklene kuglice kao sredstvo za raspršivanje. Sredstva za disperziju koriste se i za punjenje ekstrakcijske ćelije, smanjujući potrošnju otapala smanjenjem volumena ćelije. Ovaj pristup pomaže u optimizaciji upotrebe otapala tijekom procesa ekstrakcije (Mustafa i Turner, 2011).

Tijekom ekstrakcije, spremnik otapala povezan je visokotlačnom pumpom koja crpkom uvodi otapalo u sustav i pomaže istisnuti ekstrakt nakon što je proces završen (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Proces ekstrakcije odvija se u ekstrakcijskoj ćeliji (Alvarez-Riviera i sur., 2020) te nakon što se tijekom ekstrakcije postignu unaprijed određeni parametri temperature i tlaka, ekstrakcija se većinom provodi u statičkom načinu, najčešće u rasponu 5 do 10 min i ponavlja u više ciklusa. Kako bi se spriječio bilo kakav gubitak, ćelija za uzorak se na kraju posljednjeg ciklusa pročišćava inertnim plinom. Ovaj proces pročišćavanja učinkovito ispire otapalo iz ćelije i cijevi te ga usmjerava u bočicu za sakupljanje (Mustafa i Turner, 2011). Ovisno koriste li se statički (slika 2A) ili dinamički proces (slika 2B), razlikovat će se instrumenti, no u osnovi instrumentacija se sastoji od spremnika otapala, pumpe, pećnice koja sadrži ekstrakcijsku ćeliju, različitih ventila i regulatora te boce za sakupljanje. Kod statičkog načina rada ekstrakcije, ekstrakcijsko otapalo se ne mijenja kontinuirano, iako se kod korištenja više ciklusa otapalo djelomično ili potpuno zamijeni nakon nekog vremena, dok kod dinamičkog načina rada postoji stalan protok ekstrakcijskog otapala kroz ekstrakcijsku ćeliju (Alvarez-Riviera i sur., 2020).



Slika 2. Shematski prikaz procesa ASE te prikaz konfiguracije za razvoj (A) statičkih i (B) dinamičkih ASE postupaka (*prema Alvarez-Riviera i sur., 2020*)

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o kinetičkim i termodinamičkim parametrima, među kojima je kao jedan od najvažnijih temperatura (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Korištenjem toplinske energije se smanjenjem energije aktivacije potrebne za proces desorpcije, prevladavaju kohezivne interakcije i adhezijske interakcije između različitih molekula, u ovom slučaju analita i matriksa uzorka (Mustafa i Turner, 2014). Osim toga, temperatura utječe na svojstva prijenosa mase mijenjanjem površinske napetosti, difuznosti i viskoznosti otapala pri čemu se površinska napetost i viskoznost smanjuju, dok se difuzivnost povećava s višim temperaturama otapala. Navedene promjene omogućavaju brži prijenos mase i poboljšavaju vlaženje uzorka, kao i desorpciju analita iz matriksa u otapalo zbog smanjenja molekularnih interakcija koje vežu analit na matriks. Kao rezultat, dolazi do potpunijeg i bržeg procesa ekstrakcije. Međutim, povećanje temperature može povećati topljivost i drugih željenih ili neželjenih spojeva prisutnih u matriksu, što može ugroziti selektivnost ASE. Kada su željeni spojevi ekstrakcije termolabilni, potrebno je posvetiti veću pažnju odabiru temperature zbog rizika od degradacije analita tijekom procesa ekstrakcije. Također, pri višim temperaturama, unutar matriksa uzorka može doći do određenih kemijskih reakcija koje potencijalno dovode do stvaranja toksičnih ili nepoželjnih spojeva. Pronalazak optimalne temperature ekstrakcije ključno je za učinkovito izdvajanje ciljanih analita, iskorištavanjem poboljšane topljivosti i poboljšanog prijenosa mase. U isto vrijeme, poželjno je minimiziranje neželjenih učinaka gubitka selektivnosti, degradacije ili ranije spomenutih kemijskih reakcija (Alvarez-Riviera i sur., 2020).

Na učinkovitost ekstrakcije utječe još i statičko vrijeme ekstrakcije koje predstavlja vrijeme tijekom kojeg je otapalo u kontaktu s matriksom pri željenom tlaku, temperaturi i protoku, a određuje se ovisno o matriksu, vrsti spoja i načinu ekstrakcije (statičkom ili dinamičkom) (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Prinos ekstrakcije općenito raste s povećanjem vremena statičke ekstrakcije sve dok se ne postigne ravnoteža. Međutim, produljenje vremena statičke ekstrakcije nakon te točke ne dovodi do daljnjeg poboljšanja u povećanju prinosa (Shams i sur., 2015).

Bitan parametar je i omjer otapala i uzorka u statičkom načinu ekstrakcije, koji bi trebao biti što manji kako bi se izbjeglo razrjeđivanje ekstrakta, no i dovoljno velik kako bi se osigurao najveći mogući prinos ekstrakcije. Široka primjena ASE proizlazi iz mogućnosti primjene velikog broja otapala, no u procesu odabira treba pažljivo razmotriti prirodu spojeva koji se ekstrahiraju. Kako bi se dao prioritet ekološki prihvatljivim otapalima, prednost je u korištenju općenito priznatih kao sigurnih (eng. *generally recognized as safe*, GRAS) otapala kao što su: etanol, etil acetat, etil laktat ili D-limonen. „Najzelenija“ opcija među njima uključuje korištenje vode kao otapala, no ta tehnika se onda naziva ekstrakcija toplom vodom pod pritiskom (eng. *pressurized hot water extraction*, PHWE) (Alvarez-Riviera i sur., 2020).

Uzorak se često na neki način prethodno obradi, npr. prosijavanjem ili mljevenjem (Carabias-Martínez i sur., 2005), kako bi se maksimizirala kontaktna površina i postigla bolja dostupnost otapala analitu (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Smanjenjem veličine čestica povećava se brzina migracije analita kroz pore matriksa, tj. tijekom mehaničkog tretmana usitnjavanja veličine čestica može doći do razbijanja stanične stijenke i strukture stanica, čime se poboljšava difuzija analita. Veličina čestica ne smije biti premala kako bi se spriječila npr. pojava aglomeracije čestica (Alvarez-Riviera i sur., 2020). Vlaga u uzorku može umanjiti učinkovitost ekstrakcije, stoga je bitno da uzorak bude osušen (Carabias-Martínez i sur., 2005).

Prednosti korištenja ASE u odnosu na ostale tehnike ekstrakcije su kratko vrijeme ekstrakcije (oko 15 min), lako korištenje uređaja, brza i jednostavna priprema uzorka te moguća ekstrakcija termolabilnih analita zbog korištenja visokog tlaka, čak i pri visokoj temperaturi procesa. Za ekstrakciju je potrebna mala količina otapala (oko 15-25 mL), a mogu se koristiti bilo koja otapala (pojedinačna ili mješavine otapala), osim jakih kiselina, jakih baza i otapala s temperaturom samozapaljenja od 40 do 200 °C. Također, otapala ne moraju biti odzračena, osim ako je željeni analit podložan oksidaciji. Potpuno automatizirani sustav kontrolira proces ekstrakcije što rezultira visokom obnovljivošću parametara ekstrakcije te je moguće provesti ekstrakciju 24 uzorka u jednom ciklusu (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Unatoč mnogim prednostima ASE, mogu se istaknuti i neki nedostaci kao što su visoka cijena opreme, neselektivnost ekstrakcije te je potrebno pročititi dobiveni ekstrakt prije konačne analize, jer se osjetljivost i rezolucija kromatografskih analiza brzo smanjuje ako ekstrakt nije pročišćen. Ponekad jedan ciklus ekstrakcije s više uzoraka daje različite volumene ekstrakta, unatoč korištenju iste metode, što je moguća posljedica poremećaja rada statičkog ventila. Također postupak pranja je vrlo složen i troši se veća količina otapala, jer se ekstrakcijska ćelija sastoji od 11 komada (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Putnik i sur. (2017) su u provedenom istraživanju optimirali različite parametre za izolaciju polifenolnih spojeva u listu masline (*Olea europea*), kao što su temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa. Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 50 %-tni etanol. Optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenola bili su temperatura 80 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min i 2 ciklusa. Također, uočeno je kako broj ciklusa nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola, dok se povećanjem vremena statičke ekstrakcije njihov sadržaj smanjivao.

U radu Howarda i Pandjaitana (2008) ASE je korišten za izolaciju flavonoida iz osušenog špinata. Kao ekstrakcijsko otapalo koristili su vodu te mješavinu etanola i vode u omjeru 70:30, dok su ostali parametri ekstrakcije temperatura u rasponu od 50 do 190 °C, statičko vrijeme 5 min i tri ciklusa. Flavonoidi su učinkovitije ekstrahirani pri korištenju mješavine vode i etanola kao ekstrakcijskog otapala te su daljnjim analizama odredili i udio ukupnih fenola, antioksidacijski kapacitet i boju. Iako je voda ekstrahirala značajnu razinu ukupnih fenola pri 50 do 90 °C, na temperaturama ekstrakcije višim od 110 °C etanolno otapalo bilo je učinkovitije u ekstrakciji fenola od vode. Također, udio ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima raste linearno u rasponu temperature ekstrakcije od 90 do 170 °C, a zatim opada sa 170 na 190 °C, dok u vodenim ekstraktima udio ukupnih fenola raste linearno u rasponu temperature od 110 do 190 °C.

Michel i sur. (2012) određivali su u svom istraživanju udio ukupnih fenola u listu pasjeg trna primjenom ASE. Ekstrakcija se provodila pomoću dva različita otapala, etanola i etil acetata, pri tlaku od 10 MPa, temperaturi 60 °C, statičkom vremenu 5 min te koristeći 5 ciklusa, dok je volumen ispiranja bio 70 %, a vrijeme propuhivanja dušikom 100 s. Zbog različite selektivnosti ekstrakcije, prinos etanolnih ekstrakata bio je značajno veći od prinosa etil acetatnih ekstrakata. Etanol je polarno otapalo koje ekstrahira širok raspon molekula uključujući šećere, glikozide, i slabo polarne molekule, dok je etil acetat nepolarno otapalo koje ekstrahira više hidrofobnih spojeva poput aglikona i dugolančanih ugljikovih spojeva.

Luthria (2008) je proveo ispitivanje utjecaja parametara ASE na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista peršina. Temperatura, kao jedan od parametara ekstrakcije, pokazala je značajan utjecaj na udio ukupnih fenolnih spojeva. Pri 40 do 100 °C uočen je porast udjela ukupnih fenolnih spojeva, dok nakon 100 °C dolazi do opadanja udjela ukupnih fenolnih spojeva. Promjene tlaka i statičkog vremena ekstrakcije nisu rezultirale značajnom promjenom u prinosu fenolnih spojeva. Veličina čestica te omjer čvrste tvari i otapala također su utjecali na količinu ukupnih fenolnih spojeva. Prinos fenolnih spojeva nije se povećavao proporcionalno s povećanjem veličine uzorka te se učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva po jedinici mase uzorka smanjivala s povećanjem količine peršinovih ljuskica, stoga zaključuje da je potrebno imati optimalan omjer čvrste tvari i otapala.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje ekstrakcijskih uvjeta ASE (temperatura i statičko vrijeme ekstrakcije te omjer otapala i biljnog materijala) za izolaciju fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza (*Ribes nigrum* L.). U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet.

3.1. MATERIJAL

Kao materijal za provođenje eksperimentalnog dijela korišten je komercijalno dostupan uzorak osušenog lista crnog ribiza (Suban d.o.o., Strmec Samoborski, Hrvatska) podrijetlom iz Poljske ubran 2021. godine.

3.1.1. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 30 %-tni, odzračeni
Priprema: S obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Destilirana voda
- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina
Priprema: 200 g bezvodnog natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjerne tikvici od 1000 mL i filtrira nakon 24 h.
- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg/mL
Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM
Priprema: odvažuje se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)
- Klorovodična kiselina, 40 mM
Priprema: otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM
Priprema: odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Gram-Mol)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina
Priprema: odvažuje se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.
- Ledena octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba)
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6
Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL ledene octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.
- FRAP reagens
Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.
- 100 %-tni metanol
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)
Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do

- oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM
Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. 500 mg troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.
 - 140 mM otopina kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$
Priprema: 0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvažuje se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.
 - 7 mM ABTS otopina
Priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
 - stabilna ABTS•+ otopina
Priprema: 88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija $K_2S_2O_8$ pri tome je 2,45 mmol/L.
 - na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+
Priprema: 1000 μ L ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$. Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Električni mlinac (Waring WSG30 Commercial, Stamford, SAD)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex Digitec DT 512 H, Bandelin electronic GmbH)

- & Co., Berlin, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
 - Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)



Slika 3. ASE™ 350 ekstraktor (*vlastita fotografija*)

Pribor:

- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific) (250 mL)
- Staklene čaše (50, 100 i 250 mL)
- Odmjerne tikvice (5, 10, 50 i 100 mL, 2 L)
- Filter-papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Plastične epruvete (Falcon)
- Spatula
- Plastične lađice za vaganje
- Menzure (50 i 500 mL)
- Stakleni lijevci

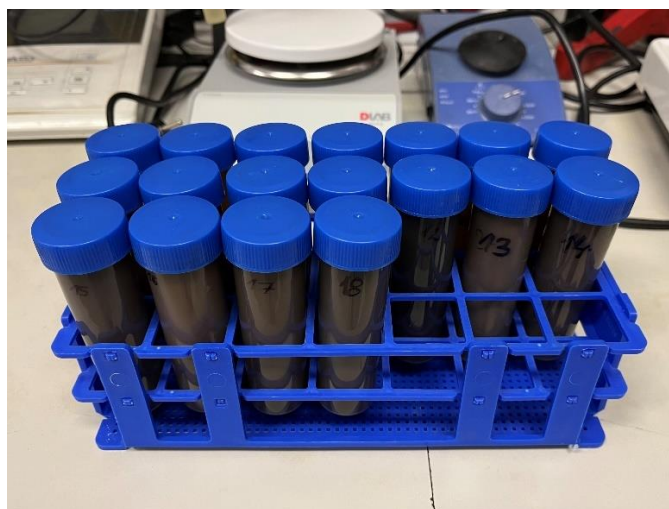
- Staklene epruvete, stalci za epruvete
- Staklene kivete

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza provodi se primjenom ASE (slika 3) prema planu eksperimenta (tablica 1). Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 30 %-tna vodena otopina etanola, koja je prethodno odzračena u ultrazvučnoj kupelji. Prije same ekstrakcije potrebno je usitniti list crnog ribiza, a usitnjeni list odvagati u staklenu čašu prema zadanom omjeru otapala i biljnog materijala: 20 mL/g = 2,5 g; 30 mL/g = 1,67 g; 40 mL/g = 1,25 g.

U izvagani uzorak se doda mjerica dijatomejske zemlje i dobro se izmiješa. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (34 mL) postavljaju se dva celulozna filtera, dodaje se smjesa uzorka i dijatomejske zemlje te se nadodaje na vrhu još dijatomejske zemlje i postavi jedan celulozni filter. Staklena boca za ekstrakciju se zajedno sa zatvorenom ćelijom stavlja na zadano mjesto na ASE ekstraktoru. Fiksni uvjeti ekstrakcije su: tlak 10,34 MPa, volumen ispiranja 30 %, volumen propuhivanja 30 s i broj ciklusa 3, dok su promjenjivi parametri temperatura (100, 125 i 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) i omjer otapala i biljnog materijala (20, 30 i 40 mL/g) (tablica 1). Dobiveni ekstrakti se profiltriraju u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopune do oznake ekstrakcijskim otapalom (30 %-tna vodena otopina etanola). Tako pripremljeni ekstrakti prebacuju se u plastične epruvete i do provođenja analiza skladište pri +4 °C (slika 4).



Slika 4. Ekstrakti lista crnog ribiza (*vlastita fotografija*)

Tablica 1. Plan eksperimenta

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	OMJER OTAPALO/BILJNI MATERIJAL (mL/g)
1	100	5	20
2	100	5	30
3	100	5	40
4	100	10	20
5	100	10	30
6	100	10	40
7	125	5	20
8	125	5	30
9	125	5	40
10	125	10	20
11	125	10	30
12	125	10	40
13	150	5	20
14	150	5	30
15	150	5	40
16	150	10	20
17	150	10	30
18	150	10	40

3.2.2. Određivanje udjela ukupnih fenola

Princip određivanja

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Navedene kiseline se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka, a plavo obojenje, čiji intenzitet je veći ukoliko je u uzorku prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema uzorka

Za određivanje udjela ukupnih fenola ekstrakte lista crnog ribiza potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

Postupak određivanja

U 100 µL ekstrakta dodaje se redom 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon 3 min 1 mL otopine natrijeva karbonata. Nakon miješanja pomoću Vortex miješalice pripremljeni uzorci se termostatiraju 25 min pri 50 °C, a zatim slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, a umjesto ekstrakta uzima se 100 µL ekstrakcijskog otapala.

Izrada baždarnog dijagrama

Pripremljena otopina galne kiseline (5 mg/L) razrijedi se destiliranom vodom u više razrjeđenja: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 100 µL galne kiseline određene koncentracije te se redom dodaje 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode, a nakon 3 min 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba umjesto galne kiseline sadrži 100 µL destilirane vode. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortexa i termostatiraju u vodenoj kupelji 25 min pri 50 °C. Nakon toga se pri valnoj duljini od 765 nm mjeri apsorbancija, a iz izmjerenih vrijednosti se pomoću programa Microsoft Excel crta baždarni pravac. Na apscisu baždarnog pravca nanose se koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola [1]:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad (R^2 = 0,9997) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE/g suhe tvari (mg GAE/g s.t.) kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje

plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Priprema uzoraka

Ekstrakte lista crnog ribiza potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

Postupak određivanja

Za mjerenje apsorbanije uzoraka u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. ApSORBANCija se mjeri pri 593 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjerneji tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Na taj način dobije se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrjeđenja na sljedeći način: u tikvice se redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjavaju 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznose 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 μmol/L. Nakon toga se u staklene epruvete otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine Troloxa određene koncentracije i 2080 μL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice izmješaju, a zatim se termostatiraju pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80 μL 96 %-tnog etanola. Slijedi mjerenje apSORBANCije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa (μmol/L), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apSORBANCija pri 593 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [2]:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad (R^2 = 0,9995) \quad [2]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom izražen je u $\mu\text{mol TE/g}$ s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja

Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijskog kapaciteta spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur, 2001; Prior i sur., 2005).

Priprema uzorka

Ekstrakte lista crnog ribiza potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

Postupak određivanja

Postupak određivanja provodi se prema metodi Shortle et al. (2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 ml 100 %-tnog metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izrada baždarnog dijagrama

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerneju tikvici od 100 mL.

Od 1mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μM .

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol/L}$), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 517 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [3]:

$$Y = -0,008 X + 1,3476 \quad (R^2 = 0,9948) \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent troloxa (TAE) (μM)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom izražen je u $\mu\text{mol TE/g}$ s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip određivanja

Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidanasa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). U prisutnosti antioksidanasa stabilni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Vrijednosti dobivene za apsorbanciju uzorka izmjerenih ABTS^+ metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

Priprema uzorka

Ekstrakte lista crnog ribiza potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi.

Postupak određivanja

160 µL razrijeđenog uzorka pomiješa se s 2 mL 1 %-tnog ABTS•+ te se nakon 1 min mjeri apsorbanacija pri 734 nm. Za slijepu probu koristi se etanol 96 %-tni.

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 0,02 mol/L standardna otopina Troloxa na način da se u plastičnoj lađici izvaže 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 µmol/L pipetiranjem redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se zatim do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom. U epruvetu se stavi 160 µL otopine Troloxa i pomiješa s 2 mL 1 %-tnog ABTS•+ te se nakon 1 min mjeri apsorbanacija pri 734 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija nacrtat će se baždarni pravac tako što se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 734 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [4]:

$$Y = -0,002 X + 0,6204 \quad (R^2=0,998) \quad [4]$$

gdje je:

Y – apsorbanacija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine µM

R² – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom izražen je u µmol TE/g s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. Obrada podataka

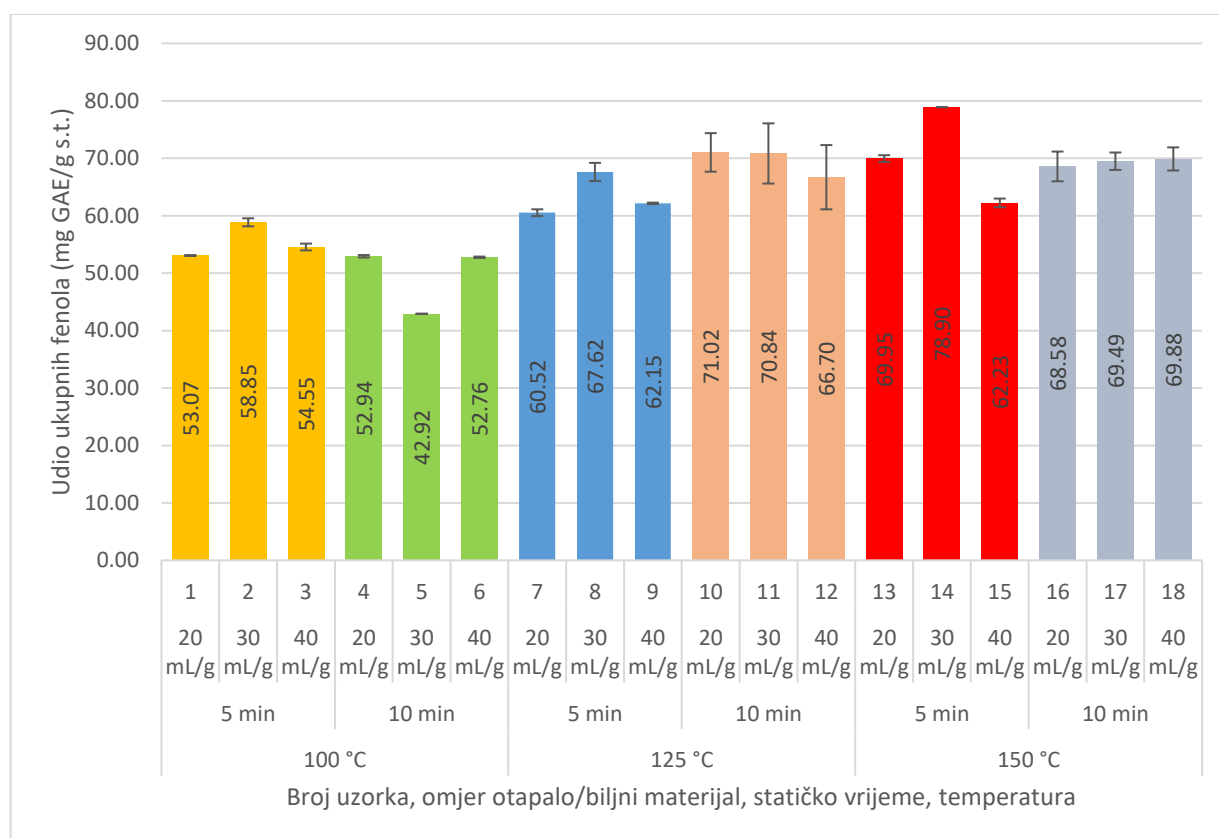
Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn na dvije (statičko vrijeme ekstrakcije) odnosno tri razine (temperatura ekstrakcije te omjer otapala i biljnog materijala). Za statističku analizu primijenjena je multifaktorska analiza varijance uz Tukey HSD test, pri čemu je statistički značajna razlika razmatrana na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje uvjeta ekstrakcije za izolaciju fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom ASE uz upotrebu 30 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala. Promjenjivi parametri ekstrakcije bili su: temperatura (100, 125 i 150 °C) i statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer otapala i biljnog materijala (20, 30 i 40 mL/g). Dobiveno je 18 ekstrakata koji su dalje korišteni u spektrofotometrijskim analizama za određivanje udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta FRAP, DPPH i ABTS metodom.

4.1. UDIO UKUPNIH FENOLA

Rezultati udjela ukupnih fenola određenih u listu crnog ribiza dobivenih primjenom ASE prikazani su grafički na slici 5.



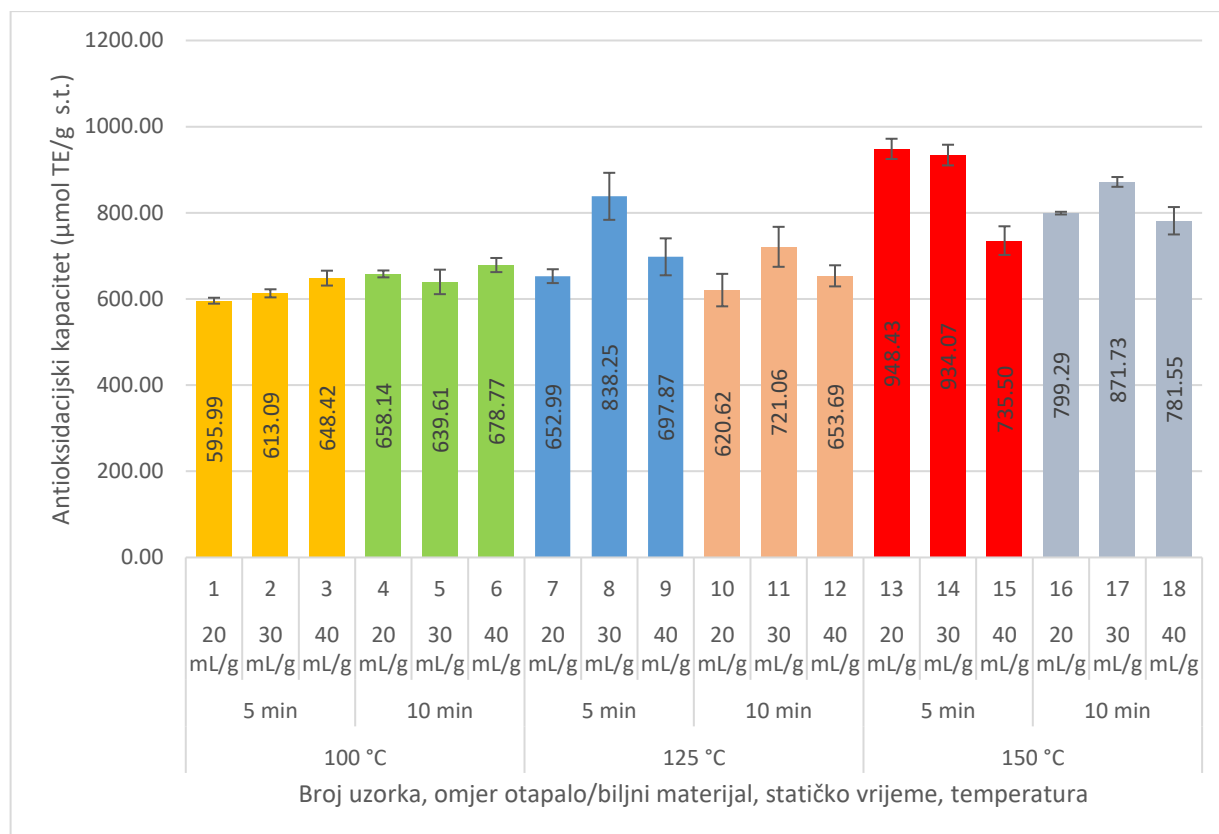
Slika 5. Udio ukupnih fenola u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom ASE

Udio ukupnih fenola u uzorcima lista crnog ribiza određen je u rasponu od $42,92 \pm 0,04$ do $78,90 \pm 0,02$ mg GAE/g s.t. Najniži udio ukupnih fenola određen je u uzorku koji je ekstrahiran pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, statičkom vremenu 10 min te omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g, dok je najviši udio određen u ekstraktu dobivenom pri $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, statičkom vremenu 5 min i omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g.

Nour i sur. (2014) odredili su udio ukupnih fenola iz različitih kultivara lista crnog ribiza koristeći konvencionalnu tehniku ekstrakcije uz primjenu vode kao otapalo pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 min, ultrazvučnu ekstrakciju pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 55 min uz 40 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo te ultrazvučnu ekstrakciju pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 55 min uz 80 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo. U uzorcima koji su ekstrahirani uz primjenu vode kao otapalo izolirano je od $24,52 \pm 1,41$ do $36,48 \pm 3,38$ mg GAE/g s.t., dok je u uzorcima ekstrahiranim ultrazvučnom ekstrakcijom uz 40 %-tni etanol izolirano od $32,16 \pm 2,98$ do $44,84 \pm 3,45$ mg GAE/g s.t. Ultrazvučnom ekstrakcijom uz 80 %-tni etanol izolirano je $12,60 \pm 1,16$ do $16,88 \pm 1,38$ mg GAE/g s.t. Uspoređujući rezultate dobivene u ovom radu s rezultatima koje su dobili Nour i sur. (2014), vidljive su više vrijednosti dobivene primjenom ASE pa se može zaključiti da je ASE mnogo učinkovitija tehnika ekstrakcije. Burri i sur. (2017) također se proveli ultrazvučnu ekstrakciju različitih kultivara lista crnog ribiza, no pri sobnoj temperaturi 15 min pomoću 50 %-tnog etanola koji je sadržavao 0,05 M *o*-fosforne kiseline. U dobivenim ekstraktima izoliran je udio ukupnih fenola u rasponu od $82,6 \pm 3,0$ do $97,3 \pm 0,6$ mg GAE/g s.t. Ako se usporede navedene vrijednosti s rezultatima dobivenima u ovom radu, vidljiva su određena odstupanja u vrijednostima koja se mogu objasniti izborom otapala te različitim porijeklom i kultivarom crnog ribiza.

4.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN FRAP METODOM

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom u listu crnog ribiza dobivenih primjenom ASE prikazani su grafički na slici 6.



Slika 6. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom ASE

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u uzorcima lista crnog ribiza određen je u rasponu od $595,99 \pm 6,85$ do $948,43 \pm 23,49$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ Najniža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u uzorku koji je ekstrahiran pri 100 °C, statičkom vremenu 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala 20 mL/g, dok je najviši antioksidacijski kapacitet određen u ekstraktu dobivenom pri 150 °C, statičkom vremenu 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala 20 mL/g.

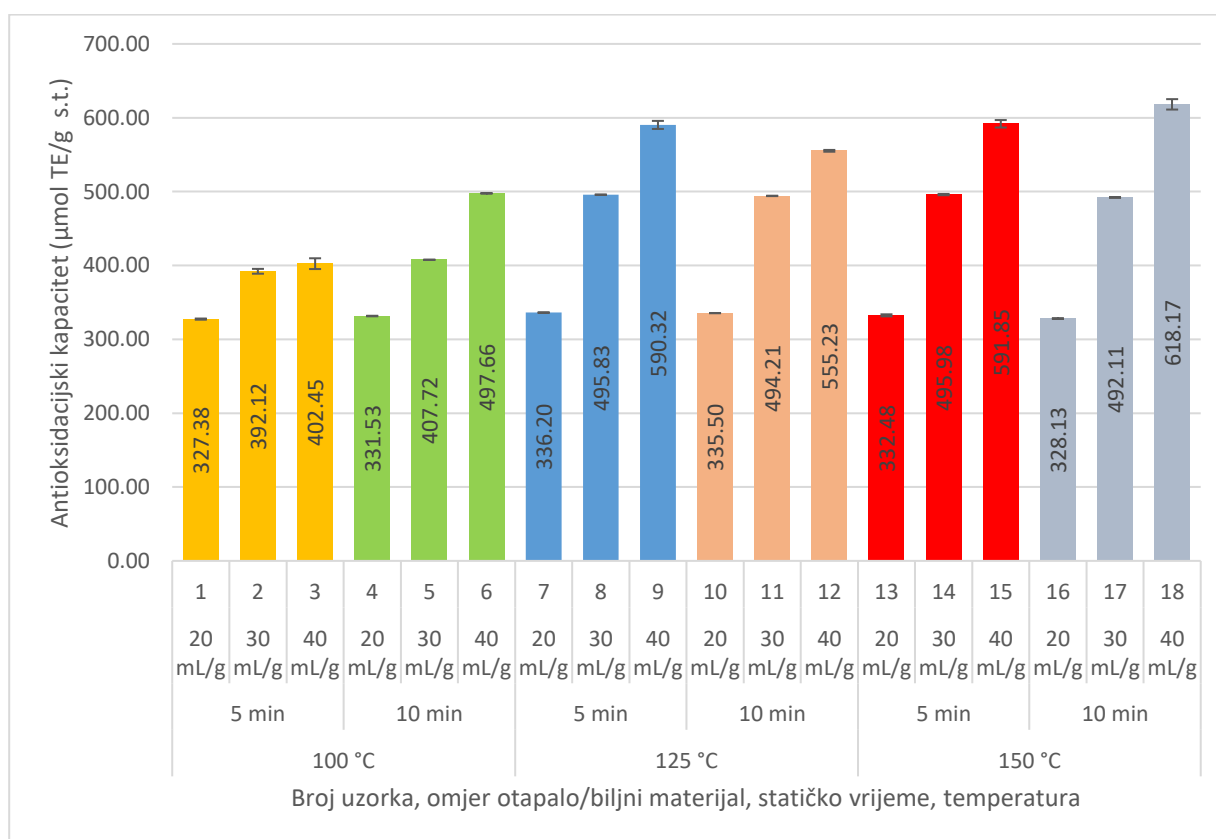
Teleszko i Wojdyło (2015) proveli su ultrazvučnu ekstrakciju lista crnog ribiza tako što su uzorci stavljeni u ultrazvučnu kupelj 15 min, nakon čega su odstojali 24 h pri 4 °C bez prisutnosti svjetla te su opet stavljeni u ultrazvučnu kupelj 15 min. Kao otapalo koristili su smjesu metanola,

askorbinske kiseline i octene kiseline. U dobivenim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet FRAP metodom te su vrijednosti dobivene u rasponu od $101,1 \pm 0,9$ do $294,5 \pm 2,8$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$, koje su mnogo niže od vrijednosti dobivenih u ovom radu. Različita tehnika ekstrakcije i izbor otapala mogući su razlozi odstupanja rezultata s onima dobivenim u ovom radu.

Dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom slijede vrijednosti udjela ukupnih fenola jer su najniže vrijednosti dobivene pri temperaturi $100\text{ }^\circ\text{C}$ dok su najviše vrijednosti dobivene pri temperaturi od $150\text{ }^\circ\text{C}$. Vidljivo je da je pri većim udjelima ukupnih fenola, dobiven i veći antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom.

4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN DPPH METODOM

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u listu crnog ribiza dobivenih primjenom ASE prikazani su grafički na slici 7.



Slika 7. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom ASE

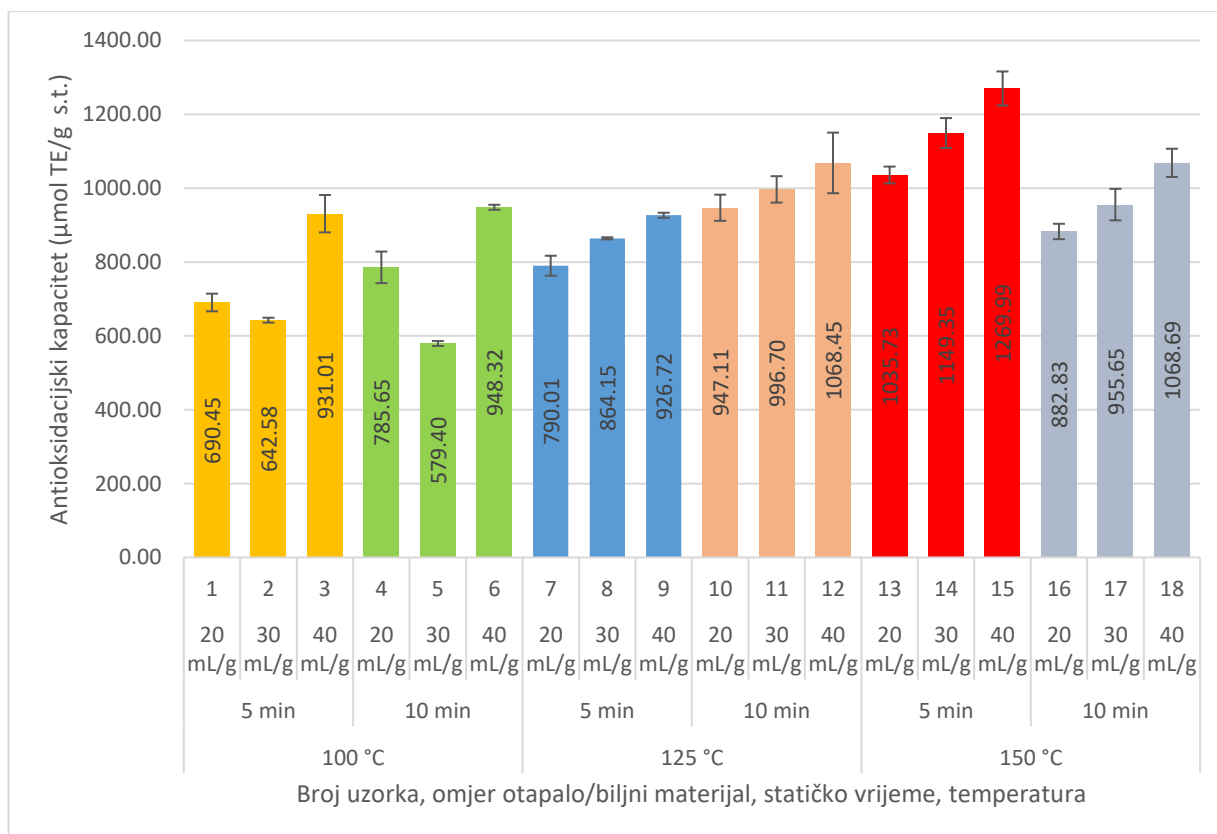
Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u uzorcima lista crnog ribiza određene su u rasponu od $327,38 \pm 0,77$ do $618,17 \pm 7,05$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ Najniža vrijednost određena je u uzorku koji je ekstrahiran pri $100\text{ }^\circ\text{C}$, statičkom vremenu 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala 20 mL/g, dok je najviša vrijednost određena u ekstraktu dobivenom pri $150\text{ }^\circ\text{C}$, statičkom vremenu 10 min te omjeru otapala i biljnog materijala 40 mL/g.

U već spomenutom istraživanju Nour i sur. (2014) u ekstraktima lista crnog ribiza određen je antioksidacijski kapacitet DPPH metodom. U ekstraktima dobivenim koristeći konvencionalnu tehniku ekstrakcije uz primjenu vode kao otapala određen je antioksidacijski kapacitet u rasponu od $222,0 \pm 11,2$ do $285,6 \pm 13,2$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom uz 40 %-tni etanol određen je u rasponu od $257,8 \pm 17,8$ do $386,8 \pm 28,4$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$, dok je ultrazvučnom ekstrakcijom uz 80 %-tni etanol dobiveno od $58,6 \pm 3,9$ do $105,3 \pm 11,9$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ U ovom istraživanju dobivene su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom, stoga se može zaključiti da je ASE učinkovitija tehnika ekstrakcija, a razlozi mogućeg odstupanja rezultata su tehnika ekstrakcije, izbor otapala te porijeklo crnog ribiza.

Vrijednosti udjela ukupnih fenola dobivenih u ovom radu slijede trend vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom, jer su najniže vrijednosti dobivene pri temperaturi od $100\text{ }^\circ\text{C}$, dok su najviše vrijednosti dobivene pri temperaturi $150\text{ }^\circ\text{C}$. Također, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom slijede trend rezultata antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom. Nije moguće direktno uspoređivati dobivene rezultate dvaju navedenih metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta jer se temelje na različitim mehanizmima reakcije. Također, ključni faktor je i otapalo u kojem se odvija reakcija jer polaritet otapala utječe na mehanizam reakcije. Na različite rezultate može utjecati i prisutnost određenih neoksidativnih spojeva, koji mogu reagirati te prividno utjecati na više vrijednosti antioksidativnog kapaciteta (Pérez-Jiménez i sur., 2008).

4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN ABTS METODOM

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom u listu crnog ribiza dobivenih primjenom ASE prikazani su grafički na slici 8.



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom ASE

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u uzorcima lista crnog ribiza određen je u rasponu od $579,40 \pm 6,66$ do $1269,99 \pm 46,16$ µmol TE/g s.t. Najniži antioksidacijski kapacitet određen je u uzorku koji je ekstrahiran pri 100 °C, statičkom vremenu 10 min te omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g, dok je najviša vrijednost određena u ekstraktu dobivenom pri 150 °C, statičkom vremenu 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala 40 mL/g.

U već spomenutom istraživanju Burri i sur. (2017) određen je antioksidacijski kapacitet ABTS metodom te su dobivene vrijednosti u rasponu od $983,0 \pm 25,0$ do $1089,0 \pm 3,0$ µmol TE/g s.t., što je u rasponu vrijednosti dobivenih u ovom radu. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u istraživanju Teleszko i Wojdyło (2015) iznosio je od $176,4 \pm 2,0$ do $498,6 \pm$

6,0 $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ te su rezultati mnogo niži od rezultata dobivenih u ovom radu. Mogući razlog odstupanja su različiti kultivari crnog ribiza, no i odabir tehnike ekstrakcije, kao i odabir otapala.

Dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom slijede vrijednosti udjela ukupnih fenola jer su najniže vrijednosti dobivene pri temperaturi 100 °C dok su najviše vrijednosti dobivene pri temperaturi od 150 °C. Također, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom slijede vrijednosti rezultata antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP i DPPH metodom. Dobivanje različitih rezultata vjerojatno proizlazi iz toga što se navedene metode temelje na različitim mehanizmima reakcije, mogućeg utjecaja otapala u kojem se odvija reakcija, jer polaritet otapala utječe na mehanizam reakcije te prisutnost određenih neoksidativnih spojeva (Pérez-Jiménez i sur., 2008).

4.5. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET LISTA CRNOG RIBIZA

Rezultati statističke analize utjecaja parametara ASE na udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet određen FRAP, DPPH i ABTS metodom u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom ASE prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola, i antioksidacijski kapacitet lista crnog ribiza određen FRAP, DPPH i ABTS metodom

Izvor varijacije	UKUPNI FENOLI (mg/g s.t. lista)	FRAP (μmol TE/g s.t. lista)	DPPH (μmol TE/g s.t. lista)	ABTS (μmol TE/g s.t. lista)
Temperatura (°C)	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
100	52,51 ± 0,63 ^a	639,00 ± 8,11 ^a	393,14 ± 0,90 ^a	762,90 ± 10,36 ^a
125	66,47 ± 0,63 ^b	697,41 ± 8,11 ^b	467,14 ± 0,90 ^b	932,19 ± 10,36 ^b
150	69,84 ± 0,63 ^c	845,09 ± 8,11 ^c	476,45 ± 0,90 ^c	1060,37 ± 10,36 ^c
Statičko vrijeme (min)	p = 0,69	p < 0,01*	p < 0,01*	p = 0,54
5	63,09 ± 0,52 ^a	740,51 ± 6,62 ^b	440,51 ± 0,73 ^a	922,22 ± 8,46 ^a
10	62,79 ± 0,52 ^a	713,83 ± 6,62 ^a	451,14 ± 0,73 ^b	914,76 ± 8,46 ^a
Omjer otapalo/biljni materijal (mL/g)	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
20	62,68 ± 0,64 ^{ab}	712,58 ± 8,11 ^a	331,87 ± 0,90 ^a	855,30 ± 10,36 ^a
30	64,77 ± 0,64 ^b	769,63 ± 8,11 ^b	462,99 ± 0,90 ^b	864,64 ± 10,36 ^a
40	61,38 ± 0,64 ^a	699,30 ± 8,11 ^a	542,61 ± 0,90 ^c	1035,53 ± 10,36 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Rezultati statističke analize pokazali su da temperatura ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza određen FRAP, DPPH i ABTS metodom. Ekstrakti dobiveni pri 100, 125 i 150 °C međusobno se statistički značajno razlikuju s obzirom na prosječnu vrijednost udjela ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i ABTS metodom. U ekstraktima dobivenima pri 150 °C izolirana je signifikantno najviša vrijednost udjela ukupnih fenola ($69,84 \pm 0,63$ mg/g s.t.), dok je u ekstraktima dobivenim pri 100 °C izolirana signifikantno najniža vrijednost udjela ukupnih fenola ($52,51 \pm 0,63$ mg/g s.t.). Nadalje, najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom određena je u ekstraktima dobivenim pri 150 °C ($845,09 \pm 8,11$ μmol TE/g s.t.), dok je signifikantno najniža vrijednost određena u ekstraktima dobivenim pri 100 °C ($639,00 \pm 8,11$ μmol TE/g s.t.). Razmatrajući rezultate za vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom, vidljivo je da je

signifikantno najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena u ekstraktima dobivenim pri 150 °C ($476,45 \pm 0,90 \mu\text{mol TE/g s.t.}$), dok je signifikantno najniža vrijednost određena u ekstraktima dobivenim pri 100 °C ($393,14 \pm 0,90 \mu\text{mol TE/g s.t.}$). Također, signifikantno najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom određena je u ekstraktima dobivenim pri 150 °C ($1060,37 \pm 10,36 \mu\text{mol TE/g s.t.}$), dok je signifikantno najniža vrijednost karakterizirala ekstrakte dobivene pri 100 °C ($762,90 \pm 10,36 \mu\text{mol TE/g s.t.}$).

Temperatura, kao parametar ekstrakcije, predstavlja jedan od kritičnih čimbenika koji utječu na učinkovitost i selektivnost ASE. Korištenjem visokih temperatura prekidaju se interakcije između analita i matriksa koje su uzrokovane van der Waalsovima silama, vodikovim vezama te dipol-dipol interakcijama, što dovodi do poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije. Visoka temperatura uzrokuje i smanjenje površinske napetosti otapala, otopljenih tvari i matriksa čime se omogućuje brže otapanje analita u otapalu. Dolazi i do smanjenja viskoznosti tekućeg otapala, što rezultira poboljšanim procesom ekstrakcije radi lakšeg prodiranja otapala u matriks (Mustafa i Turner, 2011). Ipak, pri povišenim temperaturama može doći do razgradnje spojeva koji su termolabilni, stoga je potrebno odrediti optimalne temperature ekstrakcije za svaki biljni materijal (Dobroslavić i sur., 2022).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da povišenjem temperature raste topljivost fenola te se posljedično povećava antioksidacijski kapacitet ekstrakata. Dobroslavić i sur. (2022) proveli su ASE na lovorovom listu pri temperaturama 90, 120 i 150 °C te su zaključili da je udio ukupnih fenola rastao proporcionalno s porastom temperature. Howard i Pandjaitan (2008) uočili su linearan porast udjela ukupnih fenola u ekstraktima špinata između 90 i 170 °C, no nakon 170 °C dolazi do pada vrijednosti. Također, uočili su kako povišenjem temperature dolazi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta određenog ORAC metodom. Suprotno ovim rezultatima, u istraživanju koje su proveli Repajić i sur. (2020), najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog ORAC metodom u listu samonikle koprive dobivena je pri 80 °C i opada daljnjim povišenjem temperature (100 °C). No, naveli su da povišenjem temperature dolazi do oštećenja stanica uzorka pri čemu se bioaktivni spojevi prenose iz uzorka u otapalo, što rezultira povećanjem antioksidacijskog kapaciteta i u skladu je s prethodno razmotrenim rezultatima.

Rezultati statističke analize pokazali su da statičko vrijeme ekstrakcije nema statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola ($p = 0,69$) i antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom ($p = 0,54$), no ima statistički značajan ($p < 0,01$) utjecaj na antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza određen FRAP i DPPH metodom. Ekstrakti dobiveni pri statičkom

vremenu od 5 i 10 min međusobno se nisu statistički razlikovali s obzirom na prosječnu vrijednost udjela ukupnih fenola ($63,09 \pm 0,52$ i $62,72 \pm 0,52$ mg/g s.t.). U uzorcima gdje je primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min određena je signifikantno viša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom ($740,51 \pm 6,62$ $\mu\text{mol TE/g}$ s.t.), dok je pri statičkom vremenu 10 min dobivena signifikantno niža vrijednost ($713,83 \pm 6,62$ $\mu\text{mol TE/g}$ s.t.). Signifikantno najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom određena je u uzorcima ekstrahiranim pri statičkom vremenu od 10 min ($451,14 \pm 0,73$ $\mu\text{mol TE/g}$ s.t.), dok je signifikantno najniža vrijednost određena u ekstraktima dobivenim pri statičkom vremenu od 5 min ($440,51 \pm 0,73$ $\mu\text{mol TE/g}$ s.t.). Ekstrakti dobiveni pri statičkom vremenu od 5 i 10 min međusobno se nisu statistički razlikovali obzirom na prosječnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom ($922,22 \pm 8,46$ i $914,76 \pm 8,46$ $\mu\text{mol TE/g}$ s.t.).

Statičko vrijeme je također važan parametar ekstrakcije jer duža izloženost analita ekstrakcijskom otapalu pri povišenim temperaturama rezultira povećanom brzinom difuzije ciljanih spojeva (Dobroslavić i sur., 2022). U već spomenutom istraživanju Dobroslavić i sur. (2022), primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije od 5 i 10 min nije rezultiralo statistički značajnim utjecajem na udio ukupnih fenola što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. No, suprotno ovim rezultatima, u već navedenom istraživanju Repajić i sur. (2020), statičko vrijeme ekstrakcije od 5 i 10 min pokazalo je statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u listu samonikle koprive. Pri statičkom vremenu 10 min izoliran je signifikantno viši udio ukupnih fenola, nego pri statičkom vremenu 5 min. Također, zaključili su da statičko vrijeme ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku vrijednost određenu ORAC metodom te je signifikantno viša vrijednost dobivena pri 10 min.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da omjer otapala i biljnog materijala ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza određen FRAP, DPPH i ABTS metodom. Prema rezultatima statističke analize, prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola dobivena pri omjeru otapala i biljnog materijala od 20 mL/g ($62,68 \pm 0,64$ mg/g s.t.) se međusobno statistički značajno ne razlikuje od vrijednosti dobivenih pri omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g ($64,77 \pm 0,64$ mg/g s.t.) i 40 mL/g ($61,38 \pm 0,64$ mg/g s.t.). Vrijednosti dobivene pri omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g i 40 mL/g se međusobno statistički značajno razlikuju. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom u ekstraktima dobivenim pri omjeru otapala i biljnog materijala 20

i 40 mL/g se međusobno statistički značajno ne razlikuju ($712,58 \pm 8,11$ i $699,30 \pm 8,11$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$), dok se vrijednost određena u ekstraktima dobivenim pri omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g statistički značajno razlikuje od prethodno navedenih vrijednosti ($769,63 \pm 8,11$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$). Nadalje, prosječne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u ekstraktima dobivenim pri omjeru otapala i biljnog materijala 20, 30 i 40 mL/g se međusobno statistički značajno razlikuju. Pri omjeru otapala i biljnog materijala 40 mL/g određena je signifikantno viša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ($542,61 \pm 0,90$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$), dok je pri omjeru otapala i biljnog materijala 20 mL/g određena signifikantno niža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ($331,87 \pm 0,90$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$). Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom u ekstraktima dobivenim pri omjeru otapala i biljnog materijala 20 i 30 mL/g se međusobno statistički značajno ne razlikuju ($855,30 \pm 10,36$ i $864,64 \pm 10,36$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$), dok se vrijednost određena u ekstraktima dobivenim pri omjeru otapala i biljnog materijala 40 mL/g statistički značajno razlikuje od prethodno navedenih vrijednosti ($1035,53 \pm 10,36$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$).

Omjer otapala i biljnog materijala također je važan parametar ekstrakcije. Što je veći omjer otapala i krute tvari, veća je vrijednost izoliranih spojeva. Kada se koristi veći omjer otapala i krute tvari, veći je i gradijent koncentracije između krute tvari i mase tekućine, što predstavlja pokretačku silu tijekom prijenosa mase (Pinelo i sur., 2005). Rezaei i sur. (2013) koristili su omjere otapala i biljnog materijala 10:1, 20:1 i 30:1 prilikom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju fenola iz komine jabuke. Uočen je porast udjela ukupnih fenola s porastom omjera otapala i biljnog materijala, no nije uočen značajan porast između omjera 20:1 i 30:1. Zaključili su da je takav rezultat posljedica ograničenog sadržaja fenolnih spojeva koji se mogu ekstrahirati pri omjeru 20:1.

Sumiranjem dobivenih rezultata može se zaključiti da su najpovoljniji parametri ekstrakcije lista crnog ribiza, koji rezultiraju najvišim udjelom ukupnih fenola temperatura 150 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer otapala i biljnog materijala 30 mL/g, pri čemu se postižu i visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Primjena ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) uz 30 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo, učinkovita je tehnika ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza.
2. Udio ukupnih fenola u listu crnog ribiza određen je u rasponu od 42,92 do 78,90 mg GAE/g s.t., antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom od 595,99 do 948,43 $\mu\text{mol TE/g s.t.}$, antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom od 327,38 do 618,17 $\mu\text{mol TE/g s.t.}$, dok je antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom od 579,40 do 1269,99 $\mu\text{mol TE/g s.t.}$
3. Ispitivani parametri ekstrakcije temperatura te omjer otapala i biljnog materijala imali su statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog svim primijenjenim metodama, dok je statičko vrijeme ekstrakcije imalo statistički značajan utjecaj samo na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP i DHHP metodom.
4. Parametri ASE pri kojima je izoliran najviši udio ukupnih fenola su temperatura 150 °C, statičko vrijeme 5 min te omjer otapala i biljnog materijala 30 mL/g, pri čemu dobiveni ekstrakt karakteriziraju visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* **4**, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Allai FM, Azad ZR, Gul K, Dar BN, Jabeen A, Majid D (2020) Black Currant. U: Nayik GA, Gull A (ured.) *Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, str. 271-293.

Alvarez-Riviera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibañez E (2020) Pressurized Liquid Extraction. U: Poole CF (ured.) *Liquid-Phase Extraction*, Elsevier Inc., Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 375-398.

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29(2)**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **239(1)**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64(7)**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>

Burri SCM, Ekholm A, Håkansson Å, Tornberg E, Rumpunen K (2017) Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *J Funct Food* **38(A)**, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.003>

Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J (2005) Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J Chromatogr A* **1089**, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.072>

Cyboran S, Bonarska-Kujawa D, Kapusta I, Oszmianski J, Kleszczynska H (2012) Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes. *Curr Top Biophys* **34**, 15–21. <https://doi.org/10.2478/v10214-011-0003-4>

Dobrosłavić E, Elez Garofulić I, Šeparović J, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V (2022) Pressurized Liquid Extraction as a Novel Technique for the Isolation of *Laurus nobilis* L. Leaf Polyphenols. *Molecules* **27(16)**, 5099. <https://doi.org/10.3390/molecules27165099>

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2(2)**, 22-23.

European Parliament (2023) Circular economy: definition, importance and benefits. European Parliament, <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits>. Pristupljeno 26. lipnja 2023.

Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Crit Rev Anal Chem* **31(3)**, 149–165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>

Gopalan A, Reuben SC, Ahmed S, Darvesh AS, Hohmann J, Bishayee A (2012) The health benefits of blackcurrants. *Food Funct* **3**, 795-809. <http://dx.doi.org/10.1039/C2FO30058C>

Gupta D (2015) Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *Int J Pharm Sci Res* **6(2)**, 546-566. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66)

Gupta S, Renata F, Agarwal A, Henkel R (2020) Total antioxidant capacity - Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia* **53(2)**, e13624. <https://doi.org/10.1111/and.13624>

Hedley PE, Russell JR, Jorgensen L, Gordon S, Morris JA, Hackett CA, i sur. (2010). Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *BMC Plant Biol* **10**, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-202>

Howard L, Pandjaitan N (2008) Pressurized Liquid Extraction of flavonoids from spinach. *J Food Sci* **73(3)**, C151–C157. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00658.x>

Kandemir K, Piskin E, Xiao J, Tomas M, Capanoglu E (2022) Fruit Juice Industry Wastes as a

Source of Bioactives. *J Agr Food Chem* **70(23)**, 6805-6832.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00756>

Lim TK (2012) *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*, 4. izd., Springer, Dordrecht, str. 27-42.

Lučić E (2020) Crni ribiz kao potencijalno ergogeno sredstvo - Vitamini.
<https://vitamini.hr/znanost-industrija/znanost/crni-ribiz-potencijalno-ergogeno-sredstvo-14457/>. Pristupljeno 25. lipnja 2023.

Luthria DL (2008) Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chem* **107(2)**, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.074>

MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agr* **86**, 2046-2056.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2603>

May N, Guenther E (2020) Shared benefit by Material Flow Cost Accounting in the food supply chain - The case of berry pomace as upcycled by-product of a black currant juice production. *J Clean Prod* **245**, 118946. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118946>

Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elgakir C (2012) Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem* **131**, 754-760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.029>

Milić A, Daničić T, Tepić Horecki A, Šumić Z, Teslić N, Bursać Kovačević D, i sur. (2022) Sustainable Extractions for Maximizing Content of Antioxidant Phytochemicals from Black and Red Currants. *Foods* **11(3)**, 325. <https://doi.org/10.3390/foods11030325>

Mustafa A, Turner C (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta* **703(1)**, 8-18.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>

Nagaki M, Kasai M, Goto Y, Kudo S (2017) Phytochemical analysis of the leaf of the blackcurrant (Aomori Cassis) “*Ribes nigrum* L.” and the antioxidant effect of catechins. *J*

Hirosaki Univ Health Welfare **8(1)**, 15-23. DOI: 10.13140/RG.2.2.27802.24001

Nirmal NP, Khanashyam AC, Mundanat AS, Shah K, Babu KS, Thorakkattu P, i sur. Valorization of Fruit Waste for Bioactive Compounds and Their Applications in the Food Industry. *Foods* **12(3)**, 556. <https://doi.org/10.3390/foods12030556>

Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S (2014) Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. *Ind Crop Prod* **53**, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.022>

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, i sur. (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* **133(9)**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>

Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, i sur. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* **41**, 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>

Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ (2005) Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J Agr Food Chem* **53(6)**, 2111-2117. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>

Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* **53(10)**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Putnik P, Barba FJ, Španić I, Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D (2017) : Green Extraction Approach for the Recovery of Polyphenols from Croatian Olive leaves (*Olea europea*). *Food Bioprod Process* **106**, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>

Repajić M, Cegledi E, Kruk V, Pedisić S, Çınar F, Bursać Kovačević D i sur. (2020) Accelerated Solvent Extraction as a Green Tool for the Recovery of Polyphenols and Pigments from Wild Nettle Leaves. *Processes* **8(7)**, 803. <https://doi.org/10.3390/pr8070803>

Rezaei S, Rezaei K, Haghghi M, Labbafi M (2013) Solvent and Solvent to Sample Ratio as Main Parameters in the Microwave-assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Apple Pomace. *Food Sci Biotechnol* **22(5)**, 1269-1274. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0212-8>

Romera-Castillo C, Jaffé R (2015) Free radical scavenging (antioxidant activity) of natural dissolved organic matter. *Mar Chem* **177**, 668-676. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.10.008>

Shadidi F (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. *Mol Nutr Food Res* **44(3)**, 158-163. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000501\)44:3%3C158::AID-FOOD158%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000501)44:3%3C158::AID-FOOD158%3E3.0.CO;2-L)

Shams KA, Abdel-Azim NS, Saleh IA, Hegazy MEF, El-Missiry MM, Hammouda FM (2015) Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J Chem Pharm Res* **7(5)**, 1050-1074.

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (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. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

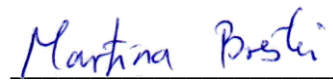
Teleszko M, Wojdyło A (2015) Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *J Funct Food* **14**, 736-746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>

Xue B, Hui X, Chen X, Luo S, Dilrukshi HNN, Wu G, i sur. (2022) Application, emerging health benefits, and dosage effects of blackcurrant food formats. *J Funct Food* **95**, 105147. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105147>

Ziobroń M, Kopeć A, Skoczylas J, Dziadek K, Zawistowski J (2021) Basic Chemical Composition and Concentration of Selected Bioactive Compounds in Leaves of Black, Red and White Currant. *Appl Sci* **11(16)**, 7638. <https://doi.org/10.3390/app11167638>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MARTINA BREŠKI izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis