

Utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na bioaktivne spojeve cvijeta trnine

Ostrman, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:139072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE
ULTRAZVUKOM NA
BIOAKTIVNE SPOJEVE CVIJETA
TRNINE**

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

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratoriju za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo uz mentorstvo prof. dr. sc. Verice Dragović Uzelac te u Laboratoriju za tehničku termodinamiku Zavoda za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uz stručno vodstvo prof. dr. sc. Mladena Brnčića.

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

UTJECAJ EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM NA BIOAKTIVNE SPOJEVE CVIJETA TRNINE

Monika Ostrman, 650/PI

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj snazi ultrazvuka (400 W), ciklusu (1) i promjeru sonde (7 mm), a varirani su vrsta i polarnost otapala (50 i 70 % vodene otopine etanola i metanola, v/v), amplituda ultrazvuka 50, 75 i 100 %, vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. U ekstraktima cvijeta trnine određivani su ukupni fenolni spojevi tekućinskom kromatografijom te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola bio je 75,84 mg/g, a ostvaren je pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: 70 % vodena otopina etanola, 9 minuta i pri amplitudi 100 %. Najveći antioksidacijski kapacitet bio je 145,37 mg AAE/g, a ostvaren je pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: 70 % vodena otopina etanola, 6 minuta i pri 75 % amplitudi.

Ključne riječi: cvijet trnine, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ukupni fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 49 stranica, 16 slika, 3 tablice, 92 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Ivona Elez Garofulić, viši asistent i dr.sc. Filip Dujmić, viši asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević
2. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
3. Prof.dr.sc. Mladen Brnčić
4. Prof.dr.sc. Branka Levaj

Datum obrane: 14.07.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for conservation processes and processing of fruits and vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION ON THE ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FLOWERS OF BLACKTHORN

Monika Ostrman, 650/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal conditions for the extraction of phenolic compounds in blackthorn flowers (*Prunus spinosa* L.) using ultrasound assisted extraction. The extraction was performed at constant: power of ultrasound (400 W), the cycle (1) and the diameter of the probe (7 mm), and varied: the type and polarity of the solvent (50 to 70 % aqueous solution of ethanol and methanol, v/v), the amplitude of ultrasound 50, 75 and 100 % and the extraction time of 3, 6 and 9 min. Total phenolics and total antioxidant capacity by FRAP method were determined in blackthorn flower extracts. The highest yield of the total phenolics extraction was 75,84 mg/g, it was achieved with the following extraction conditions: 70 % aqueous solution of ethanol, 9 minutes at an amplitude of 100 %. The highest antioxidant capacity was 145,37 mgAAE/g, and it was achieved with the following extraction conditions: 70 % aqueous solution of ethanol, 6 minutes at 75 % amplitude.

Keyword: flower of blackthorn, ultrasound assisted extraction, total phenolics, antioxidant capacity

Thesis contains: 49 pages, 16 figures, 3 tables, 92 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić, Senior Assistant and PhD. Filip Dujmić, Senior Assistant*

Reviewers:

1. PhD, Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor
2. PhD, Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. PhD, Mladen Brnčić, Full profesor
4. PhD, Branka Levaj, Full professor

Thesis defended: 14.07.2016.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. TRNINA (<i>Prunus spinosa</i> L.)	5
2.2. FENOLNI SPOJEVI	6
2.2.1. Fenolni spojevi cvijeta trnine	8
2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE TRNINE	9
2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA	10
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	18
3.2. METODE	18
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	18
3.2.2. Određivanje fenolnih spojeva primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) uz UV/Vis PDA detektor	20
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodom	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. REZULTATI	29
4.2. RASPRAVA	34
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samonikla biljka iz porodice *Rosaceae*, roda *Prunus*; bogata biološki aktivnim spojevima među kojima značajno mjesto zauzimaju fenolni spojevi koji osim što su od iznimne važnosti za rast i reprodukciju biljke, smatra se da imaju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje te su snažni antioksidansi. Fenolni spojevi uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih fenola, fenolnih kiselina (hidroksibenzojeve, hidroksicimetne kiseline), antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina (Keerthi i sur., 2014). U cvijetu trnine u najvećim udjelima nalaze se fenolni spojevi iz skupine fenolnih kiselina (hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih), flavonoida (flavonol glikozidi, flavanoli, procijanidini) (Olszewska i sur., 2001).

Za izolaciju fenolnih spojeva koriste se različite ekstrakcijske tehnike poput konvencionalnih metoda, koje zahtijevaju produženo vrijeme trajanja ekstrakcije i veće količine otapala (Dent i sur., 2013), te u posljednje vrijeme sve više zastupljene nove tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom, suprekritičnim fluidima, pulsirajućim električnim i magnetskim poljem (Wan i sur., 2005).

Jedna od često primjenjivanih tehnika je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom čije prednosti su skraćivanje vremena trajanja ekstrakcije, smanjena potrošnja otapala, smanjena temperatura ekstrakcije te manji utrošak energije (Dujmić i sur., 2013). Tijekom tretiranja ultrazvukom kavitacije uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki, što omogućuje visoke brzine difuzije kroz staničnu stjenku te omogućuje učinkovitije oslobađanje staničnog materijala (Vinatoru, 2001). Kako bi postupak ekstrakcije dao što veći prinos fenolnih spojeva potrebno je optimizirati ekstrakcijske parametre: podesiti odgovarajuću frekvenciju (kHz), amplitudu (%), ciklus (%), izlaznu snagu (W) i promjer sonde (mm). Odabir postupka ekstrakcije uz sve navedeno ovisi i o fizikalno-kemijskim svojstvima ciljanih skupina spojeva koji se ekstrahiraju, o vrsti i polarnosti otapala, temperaturi i vremenu ekstrakcije (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010; Dujmić i sur., 2013; Ninčević Grassino i sur., 2016).

Stoga, cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj vremena ekstrakcije, amplitude ultrazvuka i polarnosti otapala na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom) te na antioksidacijski kapacitet. Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj snazi ultrazvuka (400 W), ciklusu (1) i promjeru sonde (7 mm), a varirani su vrsta

i polarnost otapala (50 i 70 % vodene otopine etanola i metanola, v/v), amplituda ultrazvuka 50, 75 i 100 %, vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Fenolni spojevi određivani su primjenom HPLC metode uz UV/Vis PDA detekciju, dok je antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

Trnina, lat. *Prunus spinosa* L. je samonikla biljka iz porodice *Rosaceae*, roda *Prunus* (Slika 1.). Raste u umjerenj klimi na sjevernoj hemisferi (Europa, sjeverna Afrika, Iran, Turska), te je vrlo rasprostranjena i u Hrvatskoj (Browicz, 1996). Ovisno o regijama RH trnina se naziva različitim sinonimima kao što su: trnjina, trnula, trnavka, trn, crni trn, divlja šljiva, grmulja i kukinja (Schafner, 1991).

Trnina je gusto razgranjen grm s trnovitim ograncima koji narastu od 1 do 3 metra visine. Na razgranatom granju nalaze se tvrdi trnovi u proljeće pokriveni malim, bijelim cvjetićima. Listovi su razmjerno maleni, do 4 cm dugi, oštrog nazubljenog ruba na kratkim peteljčkama. Plod je plavkastocrne boje, okruglog oblika promjera 1–1,5 cm, iznutra mesnat. Plodovi se vrlo čvrsto drže na granama, pa ostaju na stablu i zimi (Pleše, 2002).



Slika 1. Trnina (Anonymus, 2016)

Kao ljekovita biljka često se koristi u fitoterapiji za liječenje mnogih bolesti. Ljekoviti dijelovi biljke su: plod, list, cvijet, kora, unutarnja kora i korijen. Ima blago laksativno djelovanje, čisti krv, blagi diuretik, a služi i kao okrjepjujuće sredstvo i kura za jačanje

organizma (List i sur., 1971; Borkowski i sur., 1994). Osim u fitoterapiji, trnina se koristi i u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova, čaja i različitih alkoholnih i bezalkoholnih pića (Veličković, 2014).

2.2. FENOLNI SPOJEVI

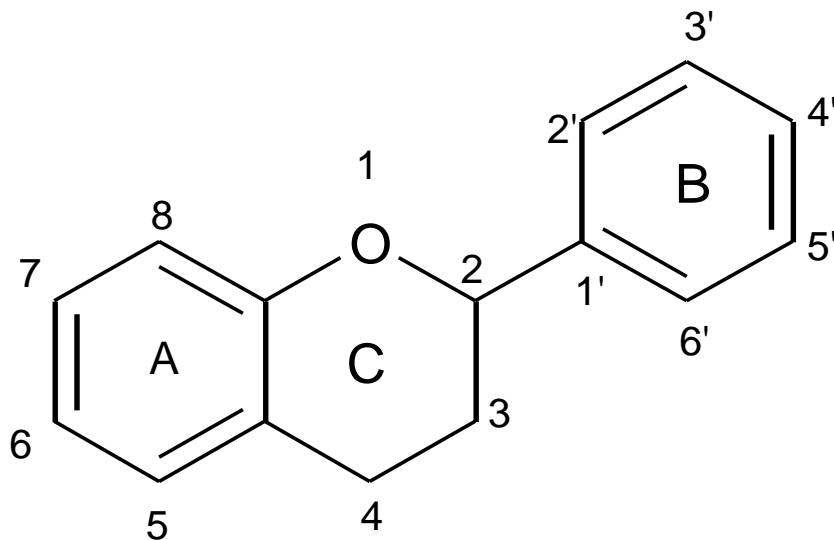
Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama, poznato ih je oko 8000 te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Spanos i Wrolstad, 1992; Harborne i Baxter, 1999). Međusobno se razlikuju po strukturi, njihovu osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998). U biljnom tkivu se obično pojavljuju vezani na druge molekule, najčešće glikozidnim skupinama, ali i sa sulfatnim ili acetilnim skupinama (Harborne, 1982). Iako su fenolni spojevi prisutni u biljnom tkivu, većina njih ipak nastaje biosintetskim putem iz aminokiselina fenilalanina ili tirozina. Ključni korak u tom biosintetskom putu je uvođenje jedne ili više hidroksilnih skupina u fenilnom prstenu pri čemu nastaje cijeli niz fenolnih spojeva: cimetne kiseline (C6-C3), benzojeve (C6-C1), flavonoidi (C6-C3-C6), proantocijanidi [(C6-C3-C6) n], kumarini (C6-C3), stilbeni (C6-C2-C6), lignani (C6-C3-C3-C6) i lignini [(C6-C3) n] (Seabra i sur., 2006).

Struktura fenola se razlikuje ovisno o broju aromatskih jezgara prisutnih u molekuli pa razlikujemo monofenole koji sadrže jedan benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više -OH skupina (jednostavni fenoli, fenolne kiseline i njihovi derivati) i polifenole koji sadrže veći broj benzenskih prstenova unutar jedne molekule (flavonoidi) (Macheix i sur., 1990; Shahidi i Naczki, 2004; Maestri i sur., 2006; Pereira i sur., 2009; Katalinić i sur., 2010).

Fenolni spojevi važni su za mnoge biokemijske procese u biljkama, te djeluju antioksidacijski, antimikrobno i kao fotoreceptori. U prehrambenoj i kemijskoj industriji analize fenolnih spojeva vrše se putem spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda.

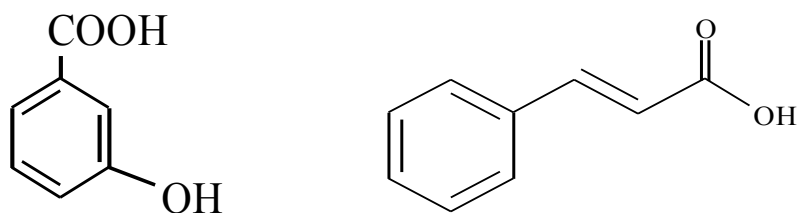
- **Flavonoidi** (Slika 2.) su skupina polifenola, a nalaze se u kori, lišću i cvijetovima biljaka. To su molekulske vrste male molekulske mase, do danas ih je poznato preko 4000, njihova najvažnija svojstva su antioksidacijska i kelirajuća (Heim i sur., 2002). Obzirom na stupanj oksidacije centralnog piranskog prstena podijeljeni u slijedeće

skupine: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavan-3-oli, antocijani, itd. (Veličković, 2013). Njihova glavna uloga u biljkama još uvijek nije razjašnjena iako je utvrđeno da se ponašaju kao: antioksidansi, inhibitori enzima, fotosenzibilizatori i prenosioci energije, respiratori u biosintezi, a također imaju i estrogena i antikancerogena svojstva (Lajšić i Gruić-Injac, 1998).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Heim i sur., 2002)

- **Fenolne kiseline** obuhvaćaju hidroksicimetne kiseline (i njeni derivati) i hidroksibenzojeve kiseline (i njeni derivati). Razlike između pojedine kiseline i njenih derivata je u stupnju hidroksilacije i metilacije benzenskog aromatskog prstena od kojeg su sastavljene (Macheix i sur., 1990). Ovisno o obliku prisutnih fenolnih kiselina, potrebno je odabrati uvjete ekstrakcije koji rezultiraju što manjim stupnjem degradacije (Ross i sur., 2009). Hidroksibenzojeve kiseline (Slika 3.) imaju osnovnu strukturu C6-C1, derivati su benzojeve kiseline, nastaju direktno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne u slobodnom obliku, ali dolaze i u obliku konjugiranih šećera, estera i organskih kiselina. U ovu skupinu kiselina pripadaju: galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska, salicilna i gentizinska kiselina (Macheix i sur., 1990; Pereira i sur., 2009). Hidroksicimetne kiseline (Slika 3.) imaju osnovnu strukturu C6-C3, derivati su fenilpropanoida (Apak i sur., 2007; Pereira i sur., 2009). U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, već najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri četiriju osnovnih molekula: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina.

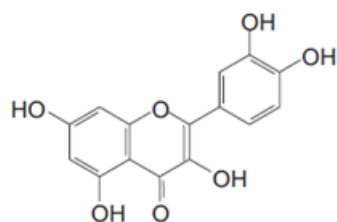


Slika 3. Hidroksibenzojeva kiselina i hidroksicimetna kiselina (Tsao, 2009)

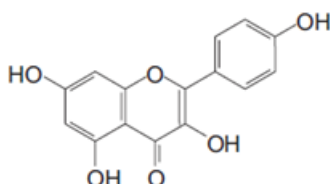
2.2.1. Fenolni spojevi cvijeta trnine

Plod trnine više je istraživana u usporedbi s cvijetom, a prema Veličković i sur. (2014) svježi plod sadrži značajnu koncentraciju ukupnih fenola koja je određena u rasponu od 15,33 mg GAE/g (otapalo voda) do 20,94 mg GAE/g (otapalo etanol-voda 50/50). U istraživanju Dragović Uzelac i sur. (2007) vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva su niže u usporedbi s prethodno spomenutim istraživanjem i iznose 0,546 do 0,86 mg GAE/g (otapalo 80 % vodena otopina etanola). Fraternali i sur. (2009) istraživali su udio ukupnih fenolnih spojeva u sušenim plodovima trnine te je određeno da iznose $83,5 \pm 2,5$ mg/g. Preračunavanjem rezultata istraživanja Fraternali i sur. (2009) na svježi uzorak dobivene vrijednosti su u skladu s rezultatima Veličković i sur. (2014) te više u usporedbi sa rezultatima Dragović Uzelac i sur. (2007).

Prema mnogim autorima, cvijet i lišće trnine sadrže kompleks flavonoida i derivata flavonola (Slika 4.): kamferol, kvercetin i njihove glikozide s arabinozom, ramnozom i ksilozom (Horhammer i sur., 1957; Makarov, 1972; Tamas, 1985; Sakar i sur., 1992; Sakar i Kolodziej, 1993). Također cvijet trnine sadrži procijanidine tipa A (Kolodziej i sur., 1991), te fenolne kiseline (Olszewska i Wolbis, 2001). Prema istraživanju Olszewska i sur. (2001) sadržaj flavonoida u cvijetu trnine analiziran je pomoću spektrofotometrijske i HPLC metode, rezultati ukupnih flavonoida određeni spektrofotometrijski iznosili su za kvercetin 2,51 – 3,58 % (uzorci ekstrahirani konvencionalnom metodom) i 2,46 – 3,42 % (uzorci dobiveni Soxhlet ekstrakcijom), dok uzorci analizirani HPLC metodom iznose 1,82 – 2,64 % za ukupne aglikone (računato na glikozide 2,57 – 3,72 %). Također u istome istraživanju prema rezultatima vidi se da su kamferol i kvercetin u cvijetu trnine prisutni u omjeru 1:1. Opsežna kvantitativna analiza fenolnih spojeva cvijeta trnine do sada nije provedena.



Kvercetin



Kamferol

Slika 4. Struktura kvercetina i kamferola (Ajila i sur., 2011)

2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE TRNINE

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kad su oni u štetnom suvišku tj. kad je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Antioksidansi inaktiviraju djelovanje slobodnih radikala pa tako zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Osim što sprječavaju neželjene procese oksidacije, antioksidansi mogu doprinjeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala (Halliwell, 1990). Slobodni radikali su molekule koje imaju nespareni elektron i stoga su izuzetno reaktivni.

Fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na brojne načine, jedan od njih je zbog prisutnosti hidroksilnih skupina u molekuli fenola koje su dobri proton donori koji mogu reagirati s reaktivnim kisikom i dušikom i na taj način spriječiti nastanak novih radikala. Interakcija hidroksilnih skupina s π -elektronom benzenskog prstena daje molekuli posebna svojstva stvaranja slobodnih radikala koji su u stanju mijenjati oksidacijski proces (Paya i sur. 1992; Heim i sur. 2002; Choi i sur. 2002; Paar i sur. 2002; Valentao i sur. 2002, 2003). Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva se pripisuje i njihovoj sposobnosti kelatiranja,

kelatni ion sudjeluje u stvaranju slobodnih radikala na način da fenolni spoj djeluje kao pro-oksident (Croft, 1998). Zahvaljujući specifičnoj strukturi molekule, fenolni spojevi pokazuju snažan potencijal interakcije s proteinima uslijed čega mogu inhibirati neke enzime (lipooksigenaza, ciklooksigenaza i ksantin oksidaza i dr.) te djelovati kao antioksidansi (Cos i sur., 1988; Paar i sur., 2002).

Kao antioksidansi u plodu i cvijetu trnine značajni su fenolni spojevi i to iz skupina: fenolnih kiselina (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina) i flavonoida (flavanoli, flavon glikozidi i flavoni). Rezultati istraživanja mnogih autora (Olszewska i Wolbis, 2001; Dragović Uzelac i sur., 2007; Sikora i sur., 2013; Veličković i sur., 2014) potvrđuju značajne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta plodova trnine te samim time i značajnu koncentraciju antioksidansa. U istraživanju Jablonska Rys i sur. (2009) provedenom na svježim ekstraktima ploda trnine rezultati pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet čije vrijednosti iznose $14,17 \pm 3,06 \text{ mM FE} \cdot 100\text{g}^{-1}$ mjerene FRAP metodom. U istraživanju Veličković i sur. (2014) antioksidacijski kapacitet izmjeren DPPH metodom iznosio je 47,38 – 72,12 % (otapalo etanol), te 75,69 – 89,10 % (otapalo metanol). U cvijetu trnine također su izolirani fenolni spojevi: hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina, flavanoli, kamferol i kvercetin glikozidi, flavoni te procijanidini (Panizo i sur., 1955; Sakar i sur., 1992; Olszewska i Wolbis, 2001), no nisu provedena istraživanja vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Prvi i ujedno vrlo važan korak izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala prije daljnje upotrebe ili analize je ekstrakcija. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Fenolni spojevi se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli. Odabirom prikladne metode ekstrakcije fenolnih spojeva treba voditi računa o topljivosti spojeva koje želimo ekstrahirati te odabrati pogodno otapalo.

Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, temperaturi, vremenu ekstrakcije, polarnosti otapala te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Dai i Mumper, 2010). Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija super kritičnim plinovima su najčešće upotrebljavane tehnike izolacije fenolnih spojeva (Bimakr i sur., 2011; Ignat i sur., 2011). U literaturi je

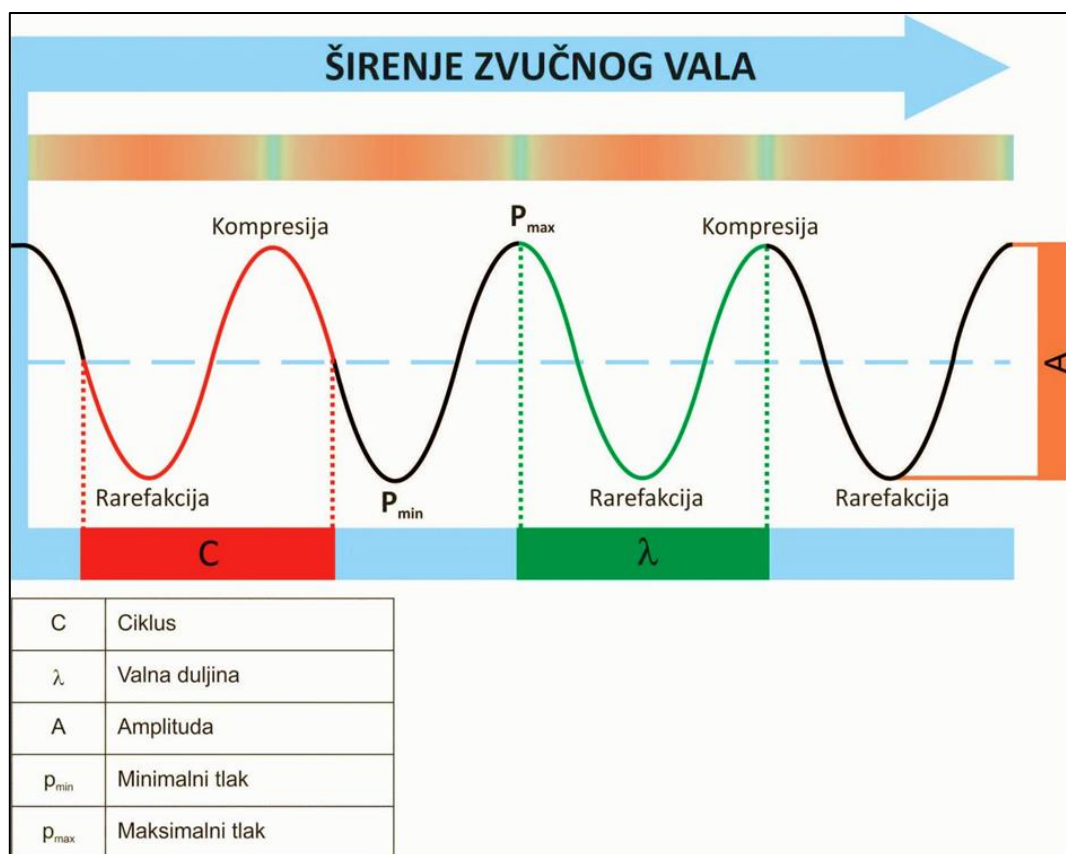
opisan cijeli niz istraživanja izolacije i analize fenolnih spojeva iz različitih biljnih vrsta (Balasundram i sur., 2006; Naczki i Shahidi, 2006; Hossain i sur., 2011; Bimakr i sur., 2011). Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Stoga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije, kao što su: *ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima* eng. microwave-assisted extraction - MAE (Putnik i sur., 2016), *ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom* eng. ultrasonic-assisted extractions - UAE (Dent i sur., 2015), *ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom* eng. pressurized liquid extraction - PLE (Dragović Uzelac i sur., 2015) te *ekstrakcija potpomognuta plazmom* eng. Plasma assisted extractions - PAE (Elez Garofulić i sur., 2014).

Prednosti ovih metoda su brzina, selektivnost, ekološka prihvatljivost, upotreba manjih količina otapala, veći prinos od klasične ekstrakcije, i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije.

2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

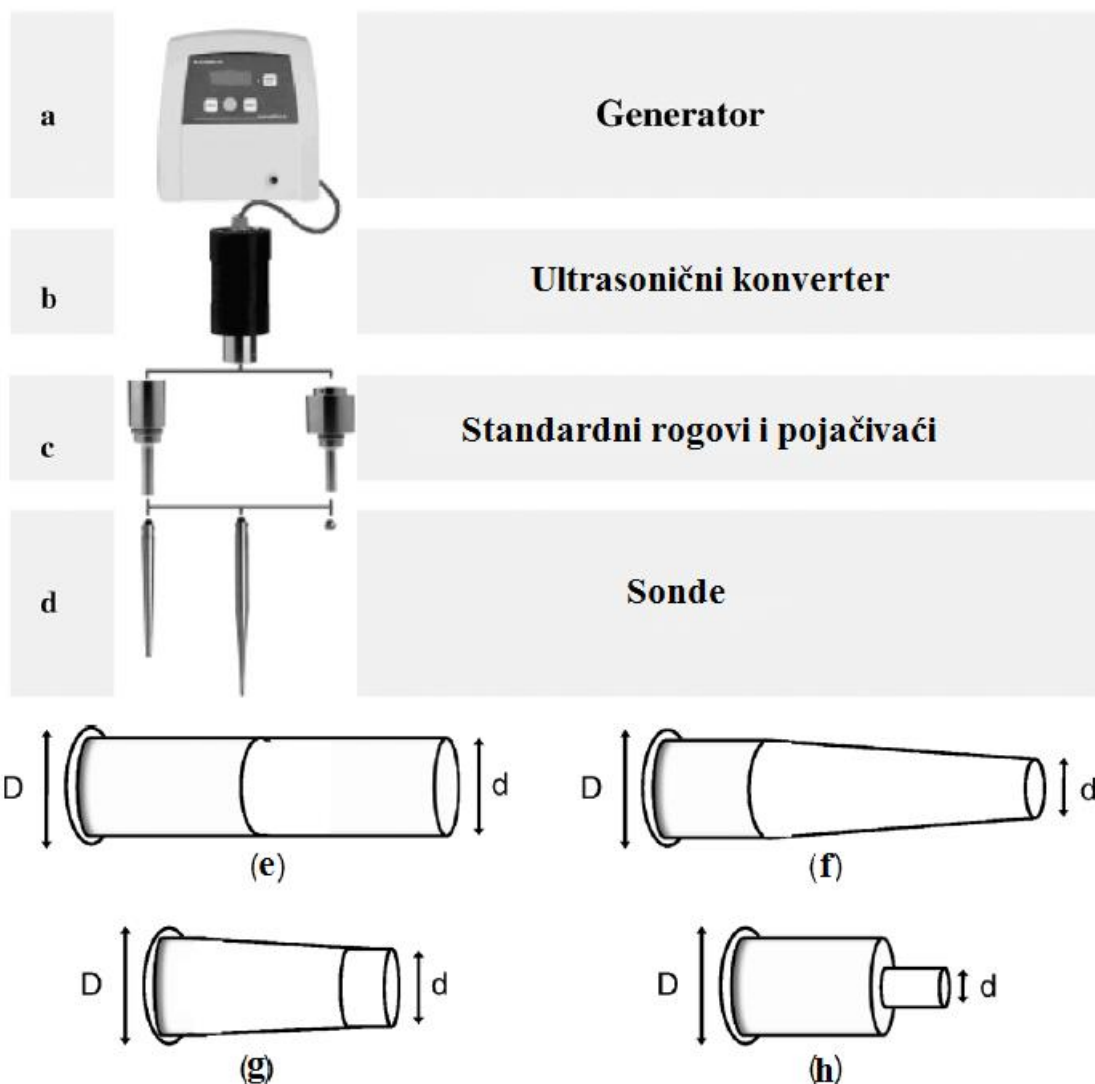
Razvijene su i usavršene razne nove tehnike ekstrakcije bioaktivnih sastojaka biljaka, pa tako i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je nadolazeća ekstrakcijska tehnika koja može ponuditi visoku reproducibilnost u kratkom vremenu, veće prinose bioaktivnih sastojaka, jednostavniju manipulaciju, smanjenje temperature tijekom procesa, smanjenje količine otapala i manji unos energije (Wang i Weller, 2006; Virot i sur., 2010; Klen i Vodopivec, 2012). Provodi se na uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji želimo ekstrahirati. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom široko se koristi za dobivanje polifenola iz biljaka korištenjem etanola, mješavine etanola/vode (Albu i sur., 2004; Wang i sur., 2004; Vilku i sur., 2008; Khan i sur., 2010; Šic Žlabur i sur., 2015; Rosello-Soto i sur., 2015), vode i acetona (Wang i sur., 2004) kao otapala. Ovaj tip ekstrakcije može pružiti priliku za poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih sastojaka koji su termosenzibilni, tako da se proces ekstrakcije provodi na nižim procesnim temperaturama (Vilku i sur., 2008), također ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je mnogo učinkovitija tehnika nego konvencionalne toplinske ekstrakcijske tehnike, gdje se kod većine biljaka proces ekstrakcije završi unutar 15 minuta (Albu i sur., 2004). Mehanizam ultrazvuka u tekućinama se oslanja na mehanički efekt prouzročen impolzijama kavitacijskih mjehurića. Tijekom impolzije mikro kavitacijskih mjehurića, stvorene su snažne sile smicanja, dok se generiraju visoki tlak i temperatura kao

posljedica pucanja mjehurića, posljedica tih pojava je brzo razaranje biljnog tkiva čime dolazi do oslobađanja staničnog materijala i poboljšava se prijenos mase. Drugi mehanički učinak uslijed djelovanja ultrazvuka doprinosi većem gibanju molekula čime dolazi do boljeg kontakta između otapala i materijala koji se ekstrahira te prodiranja u unutrašnjost. Uz mehanički učinak ultrazvuka, postoji i toplinski indeks ultrazvuka koji se definira kao omjer akustičke snage proizvedene u ultrazvučnom pretvorniku i snage potrebne za zagrijavanje materijala koji se obrađuje za 1°C (Režek Jambrak, 2008; Zinoviadou i sur., 2015). Princip ultrazvuka očituje se u zvučnim valovima frekvencije više od 20 kHz koji stvaraju mehaničke vibracije u krutom, tekućem ili plinovitom stanju (Slika 5.). Zvučni valovi putuju kroz sustav i izazivaju ekspanziju i kompresiju uslijed čega dolazi do boljeg kontakta molekula. Uslijed ekspanzije dolazi do stvaranja mjehurića u tekućem stanju te nastanka negativnog tlaka. Mjehurići nastaju, rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije kada dolazi do bržeg prijenosa na krutu fazu unutar tekućeg medija (Luque-Garcia i Luque de Castro, 2003; Brnčić i sur., 2010). Važan dio ekstrakcije potpomognute ultrazvukom je optimizacija procesa. Frekvencija (kHz), amplituda (%), ciklus (%), nazivna izlazna snaga (W), i geometrijski parametri sonde (dužina i promjer – mm) moraju biti pravilno odabrani i uzeti u obzir (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010; Dujmić i sur., 2013). Izbor metode za ekstrakciju fenolnih spojeva cvijeta trnine ovisi o vrsti spojeva koji se žele ekstrahirati, i također ovisi o otapalu koje se upotrebljava. Iz podataka u literaturi (Albu i sur., 2004), ekstrakcija polifenola upotrebom polarnih otapala je značajno poboljšana prozvučivanjem. Važno je primjetiti da je vrijeme ekstrakcije značajno skraćeno korištenjem ultrazvuka.



Slika 5. Širenje zvučnog vala (Laboratorij za tehnološke operacije, PBF, 2013)

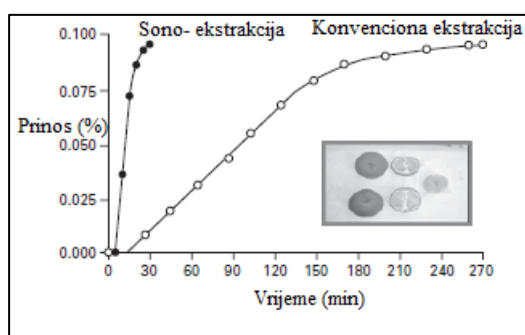
Izbor ultrazvučne sonde (Slika 6.) za ekstrakciju bioaktivnih sastojaka koristi se kod uzoraka manjih volumena (Vorobiev i Chemat, 2010). Koristeći sonde različitih promjera može se provesti ekstrakcija do čak 100 puta veće jačine od onih u ultrazvučnoj kupelji. Jedna od glavnih značajki za uspješnu primjenu ultrazvučnih sondi za mnoge kemijske procese je to da se ultrazvučna energija ne prenosi kroz tekući medij za ekstrakciju već je uvedena izravno u sustav (Bendicho i Lavilla, 2000). U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom koristile su se sonde promjera 7 mm i 22 mm. Rezultati prinosa ukupnih fenola veći su kod sonde promjera 22 mm (77,89 mg/g uzorka), nego kod sonde promjera 7 mm (59,43 mg/g uzorka).



Slika 6. Ultrazvučna sonda a) generator - pretvara napon mreže u električnu energiju visoke frekvencije (20 kHz); b) pretvarač - pretvara električnu energiju u mehaničke vibracije fiksne frekvencije, obično 20 kHz; c) standardni rogovi i pojačivači - povećavaju amplitudu ultrazvuka; d) sonde - prenose ultrazvučnu energiju u uzorak; (e-h) tipovi ultrazvučnih sonda; e) ujednačena cilindra; f) eksponencijalni konus; g) linearni konus; h) stupasta. (Santos i sur., 2008)

Također, na provedbu ekstrakcije utjecaj ima i vrijeme sonikacije. Pri istom vremenu ekstrakcije veći prinos fenolnih spojeva dobije se ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom s direktno uronjenom sondom nego ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji (Slika 7.). Tako u istraživanju Dent i sur. (2015) vrijeme ekstrakcije (8, 10, 11 i 12 min) od 11 minuta pokazalo se kao optimalno za najveći prinos fenolnih spojeva u usporedbi sa ostalim istraživanima. Kraće vrijeme sonikacije indicira da je vrijeme prekratko da bi ultrazvuk razorio stijenke

stanica te da bi se otpustili fenolni spojevi iz staničnih djelova. Produljenjem vremena iznad 11 minuta, prinos fenolnih spojeva nije se znatno povećavao. U istraživanjima autora Šic Žlabur i sur. (2015), Ince i sur. (2014), Chemat i sur. (2004) te Rostango i sur. (2003) vrijeme je imalo značajan utjecaj na prinos ukupnih fenolnih spojeva. Dužim vremenom ekstrakcije povećavao se prinos fenolnih spojeva, tako u istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) na ekstraktu stevije optimalno vrijeme ekstrakcije bilo je 10 minuta, dok su vremena od 2, 4, 6 i 8 min bila prekratka i rezultirala su manjim prinosima ukupnih fenolnih spojeva. U istraživanju Rouhani i sur. (2009) provedenom na korijenu kurkume kao što je očekivano prinos fenolnih spojeva raste produljenjem vremena ekstrakcije, no ako ekstrakcija traje duže od 15 minuta dolazi do negativnog utjecaja i do degradacije fenolnih spojeva.



Slika 7. Usporedba brze sono-ekstrakcije i konvencionalne ekstrakcije na kori naranče u alkoholnim otopinama (Vorobiev i Chemat, 2010)

Povećanje razine jakosti ultrazvuka opskrbljuje brži i jači učinak koji smanjuje vanjski otpor i povećava prijenos mase, tako da povećanje jakosti ultrazvuka povećava učinkovitost miješanja. Utjecaj jakosti ultrazvuka na prinos fenolnih spojeva analizirao se u istraživanju Dent i sur. (2015), rezultati pokazuju da u ekstraktima dobivenima korištenjem ultrazvuka jakosti 400 W količine identificiranih polifenola su veće nego korištenjem ultrazvuka jakosti 100 W. U istraživanju Ince i sur. (2014) provedenom na koprivi uspoređeni su rezultati dobiveni uporabom ultrazvuka jakosti 150 W i 240 W, dokazano je da pri vrijednosti jakosti od 240 W bio veći prinos fenolnih spojeva.

Otapalo koje se koristi za izvođenje tretmana s ultrazvukom treba biti pažljivo izabrano. Kao opće pravilo, većina aplikacija se izvodi u vodi. Međutim, ostale manje polarne tekućine, kao što su neke organske, mogu se također upotrijebiti, ovisno o namjeni. I viskoznost otapala i površinska napetost utječu na inhibiciju kavitacije. Ako postoje veće prirodne kohezivne sile koji djeluje u tekućini (na primjer, visoka viskoznost i visoka

površinska napetost) teže je postići kavitaciju (Mason, 1992). Odabir prikladnog otapala znatno utječe na prinos fenolnih spojeva. Najčešća otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva su alkoholi (etanol, metanol), voda, aceton. U radu Dent i sur. (2015) ultrazvučna ekstrakcija je provedena pod ultrazvučnim radnim parametrima (100% amplituda/radni ciklus, ultrazvučni uređaj od 400W), uz upotrebu 30%-tnih vodenih otopina etanola i acetona, vode, te vremenom sonikacije od 11 minuta. Prema rezultatima najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenola i flavonoida je etanol (30%) > aceton (30%) > voda. U istraživanju Proestos i sur. (2006) kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva pokazala se 60%-tna vodena otopina metanola, dok su primjenom 60% vodene otopine acetona, vode i etil acetat/voda (60:30, v/v) dobiveni niži prinosi.

Intenzitet prozvučivanja proporcionalan je amplitudi vibracija ultrazvučnog izvora i kao takav, prirast amplitude vibracija će dovesti do povećanja intenziteta vibracija i povećanja sonikacijskog učinka. Da bi se postigao prag kavitacije potreban je minimalni intenzitet. To znači da veće amplitude nisu uvijek potrebne da se dobiju željeni rezultati. Osim toga, visoke amplitude ultrazvuka mogu dovesti do oštećenja ultrazvučne sonde, što može rezultirati u tekućem mediju agitaciju umjesto kavitacije i loš prijenos ultrazvuka kroz tekući medij. Međutim, amplituda ultrazvuka trebala bi biti veća kada se radi s uzorcima visoke viskoznosti. Također povećana amplituda ultrazvuka potrebna je za dobivanje mehaničkih vibracija koje potiču kavitaciju (Santos i sur., 2008). Hossain i sur. (2012) su proveli istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz aromatskih biljka porodice Lamiaceae pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: ultrazvučnog procesora jakosti 1500 W, promjera sonde 19 mm u trajanju 5 do 15 min sa 80% vodenom otopinom metanola, te variranom amplitudom (24-61 μm). Utvrdili su da na izolaciju fenolnih spojeva značajni utjecaj ima amplituda ultrazvuka, te da porastom amplitude značajno raste prinos fenolnih spojeva.

Iako je djelovanje ultrazvuka proučavano na više od stotinu biljnih vrsta, učinak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na cvijet trnine u znanstvenoj literaturi do sada uopće nije proučavano, te do sada nisu dostupne nikakve studije o optimizaciji parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provedene na ekstraktu cvijeta trnine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje ovog istraživanja korišten je uzorak prirodno osušenog cvijeta trnine nabavljen u suradnji sa proizvođačem Suban d.o.o. (Slika 8.). Proizvod je sa hrvatskog tržišta, te mu je rok trajanja 31. ožujak 2017. godine, broj serije 63451. Kao takav čuvan je na suhom u ambalaži od kartona do trenutka provođenja analiza. Uzorci cvijeta trnine su usitnjeni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevit, Italy) u fini prah. Pomoću laserskog analizatora (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments, and Worcestershire, UK) određena je veličina čestica, 90% čestica bilo je manje ili jednako 349 μm .



Slika 8. Cvijet trnine (Vlastita fotografija, 2016)

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Za ekstrakciju odvagano je po $\pm 1,00$ g uzorka koji je prethodno usitnjen u fini prah, a kao otapala su korištene 50 % i 70 % vodene otopine etanola i metanola (v/v). Smjese otapala i uzorka su izložene djelovanju ultrazvuka kroz 3, 6, i 9 minuta pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100 % te je provedena ekstrakcija na uređaju s direktno uronjenom ultrazvučnom

sondom. Za provedbu ekstrakcijskog postupka potpomognutog ultrazvukom korišten je uređaj tvrtke Dr.Hielscher GMBH (Teltow, Njemačka) UP400S konstantne frekvencije od 24 kHz. Koristila se sonda promjera 7 mm i konstantan ciklus prozvučivanja (1).

Nakon toga uzorci su centrifugirani na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta na uređaju Rotofiks 32 Hettich. Supernatant dobiven centrifugiranjem je odekantiran od nastalog taloga, profiltriran u čiste falkonice od 50 mL. Uzorci su označeni od TR-1 do TR-36 i čuvani do analize na temperaturi od -18 °C.

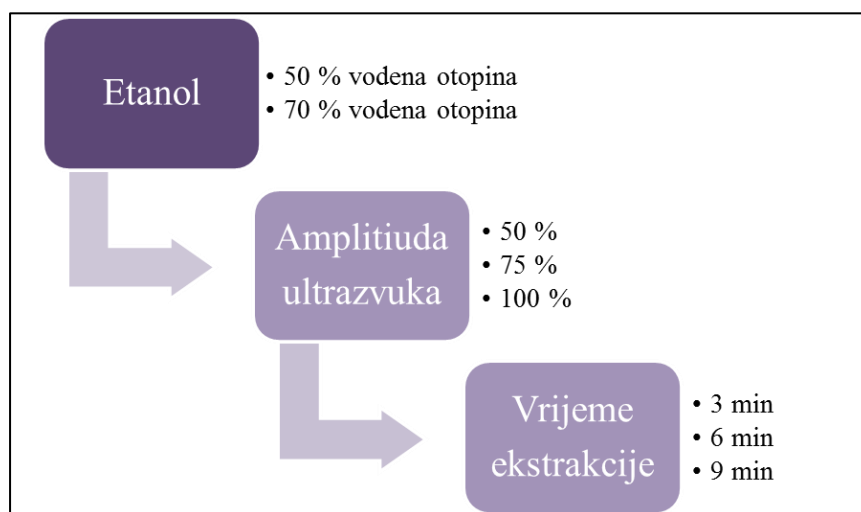
Aparatura i pribor:

- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Vortex MS2 Minishaker IKA
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis)
- Električni mlinac (Imetec Dolcevita, Italy)
- Laboratorijska centrifuga Rotofiks 32 Hettich
- Laboratorijski ultrazvuk Dr. Hielscher Ultrasonic Processor UP 400 S
- Pipete, volumena 2 mL, 5 mL i 10 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL
- Plastična ladica za vaganje
- Mikropipete, volumena 100 µL i 1000 µL
- Staklene čaše, volumena 50 ml
- Falkonice, volumena 50 ml

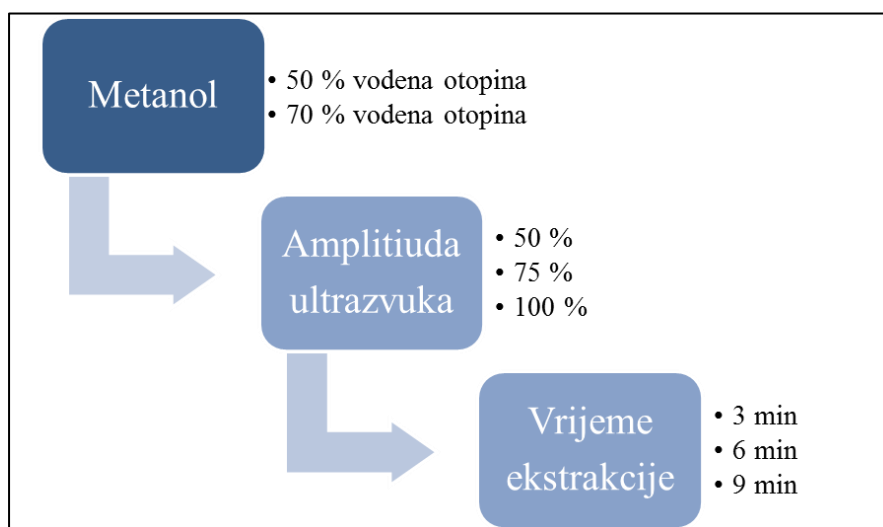
Reagensi:

- Etanol (GRAM-MOL), p.a. stupnja čistoće
- Metanol (GRAM-MOL), p.a. stupnja čistoće
- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ, Millipore, SAD

Ekstrakcija fenolnih spojeva je provedena prema dizajnu eksperimenta (Slika 9. i Slika 10.) pri čemu su varirani slijedeći parametri: amplituda ultrazvuka, polarnost otapala i vrijeme ekstrakcije.



Slika 9. Parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri uporabi etanola kao otapala



Slika 10. Parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri uporabi metanola kao otapala

3.2.2. Određivanje fenolnih spojeva primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) uz UV/Vis PDA detektor

Određivanje sastava i udjela pojedinačnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i flavonoida, u ekstraktima cvijeta trnine provedeno je primjenom visoko djelotvorne

tekućinske kromatografije (*engl.* High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) metodom koju su opisati Fecka i Turek (2008), uz određene modifikacije. Modifikacija navedene metode provedena je u dijelu kromatografske analize gdje je kao mobilna faza upotrijebljena 3 %-tna mravlja kiselina umjesto 0,2 %, 1,5 % i 5 %-tne mravlje kiseline.

Metoda za određivanje fenolnih spojeva primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije se temelji na ekstrakciji fenolnih spojeva primjenom otapala različite polarnosti s ciljem povećanja ekstrakcijskog kapaciteta te razdvajanjem i elucijom fenolnih spojeva na kromatografskoj koloni u nizu padajuće polarnosti. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na Agilent 1260 Infinity HPLC sustavu koji se sastoji od: Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu te 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora.

Aparatura i pribor:

•tekućinski kromatograf Agilent 1260 sistem (HPLC) opremljen sa:

- 1260 kvarternom pumpom,
- injektor,
- 1260 termostatirane kolone,
- 1260 TCC kućišta za kolonu
- 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora

Reagensi i standardi:

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Procijanidina B1(Extrasynthese, Francuska)
- Procijanidin B2 (Extrasynthese, Francuska)
- Kamferol-3-rutinozid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Klorogenska kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Kvercentin-3-glukozid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Mravlja kiselina, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)

Parametri kromatografske analize:

<i>Kolona:</i>	Nucleosil 100-5C18, 5 μ m (250 \times 4,6 mm I.D.)
<i>Mobilne faze:</i>	Otapalo A-3 %-tna mravlja kiselina u acetonitrilu (v/v) Otapalo B-3 %-tna mravlja kiselina u vodi (v/v)
<i>Eluiranje:</i>	gradijentno
<i>Gradijent:</i>	prikazan u tablici 1
<i>Detektor:</i>	UV-Photo Diode Array (valna duljina= 320 nm za identifikaciju fenolnih kiselina 278 i 340 nm za identifikaciju flavonoida)
<i>Temperatura:</i>	sobna
<i>Vrijeme trajanja:</i>	35 minuta
<i>Injektirani volumen:</i>	20 μ L
<i>Ekvilibracija:</i>	2 minute

Tablica 1. Gradijent za HPLC analizu fenolnih spojeva

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL/min)
0	10	90	0,9
25	40	60	0,9
30	70	30	0,9
35	10	90	0,9

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva:

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 380 nm (Fecka i Turec, 2008). Flavonol glikozidi identificirani su na 340 nm, a fenolne kiseline na 278 nm.

Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne flavonoide izračunate su iz jednažbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca za fenolne spojeve

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent determinacije (R^2)
Kvercetin 3- β -D-glukozid	$Y = 37,386 x$	1,000
Kamferol 3- <i>O</i> -rutinozid	$Y = 41,313 x$	1,000
Klorogenska kiselina	$Y = 63,539 x$	0,987
Galna kiselina	$Y=30,025 x$	0,991
Procijanidin B1	$Y=3,57 x$	0,990
Procijanidin B2	$Y=7,8852 x$	0,986

3.2.3 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodom

FRAP metoda pripada skupini metoda koje se temelje na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron ne samo slobodnim radikalima, već i metalima i karbonilnim spojevima. Reakcija je popraćena smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa.

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinjeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Reakcija prijenosa elektrona odvija se relativno brzo, najčešće u trajanju od 4 do 6 minuta, pa se njome može opisati antioksidacijski kapacitet onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo, dok za one spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna.

Ova metoda je jednostavna, brza, jeftina i ne zahtijeva posebnu opremu, stoga se uvelike primjenjuje u određivanju antioksidacijskog kapaciteta različitih namirnica. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Mikropipete, volumena $100\ \mu\text{L}$ i $1000\ \mu\text{L}$
6. Staklene epruvete
7. Pipete, volumena $1\ \text{mL}$, $2\ \text{mL}$, $5\ \text{mL}$, $10\ \text{mL}$ i $25\ \text{mL}$
8. Odmjerne tikvice, volumena $10\ \text{mL}$, $100\ \text{mL}$, $500\ \text{mL}$ i $1\ \text{L}$
9. Vortex MS2 Minishaker IKA
10. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Klorovodična kiselina, 37 %-tna
2. Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se $330\ \mu\text{L}$ 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od $100\ \text{mL}$.

3. TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaži 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.

4. Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži 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.

5. Ledena octena kiselina, 99-100 %-tna

6. Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaži 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 koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

7. FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

8. Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L. Odvaži se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Napomena: Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C 10 minuta.

Postupak određivanja

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μL ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Ukoliko izmjerene

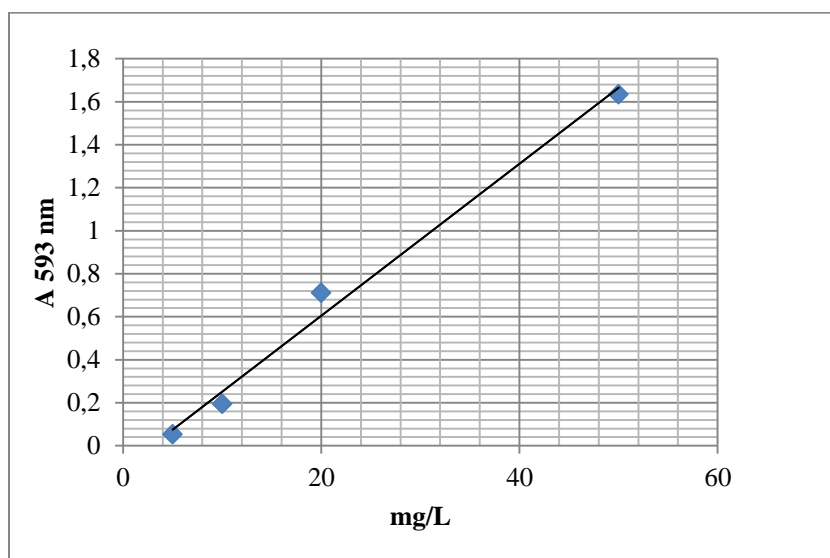
apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da se izmjerene apsorbcije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0,5, 1, 2, 1 i 5 mL alikvot otopine askorbinske kiseline te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μ L otopine standarda i 2250 μ L FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbcija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbcije nacrtava se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbcije nanesenim na ordinati (Slika 11.). Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.



γ (mg/L)	A 593 nm
5	0,053
10	0,195
20	0,712
50	1,635

Slika 11. Baždarni pravac s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbcije na ordinati

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0353X - 0,1021$$

$$R^2 = 0,9896$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L)

Račun:

Obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti sa 2 (Fegredo i sur., 2009).

FRAP = Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE) \times 2

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

U ovom poglavlju prikazani su rezultati utjecaja parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (polarnost i vrsta otapala, vrijeme ekstrakcije te amplituda ultrazvuka) na prinos fenolnih spojeva. Sastav i maseni udjeli fenolnih spojeva ekstrakata cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) određeni su primjenom HPLC UV/Vis PDA analize.

Nakon provedenih HPLC UV/Vis PDA analiza i određivanja masenih udjela fenolnih spojeva, utvrđeni su antioksidacijski kapaciteti ekstrakta cvijeta trnine pomoću FRAP metode te su rezultati prikazani u mg AAE/g.

Primjenom HPLC UV/Vis PDA metode u ekstraktu cvijeta trnine određeno je ukupno 24 fenolna spoja koji pripadaju u 3 različite skupine. U Tablici 3. prikazani su redosljed elucije i pripadajuća retencijska vremena fenolnih spojeva, te njihovi maksimumi apsorbancije (uzorak TR-9).

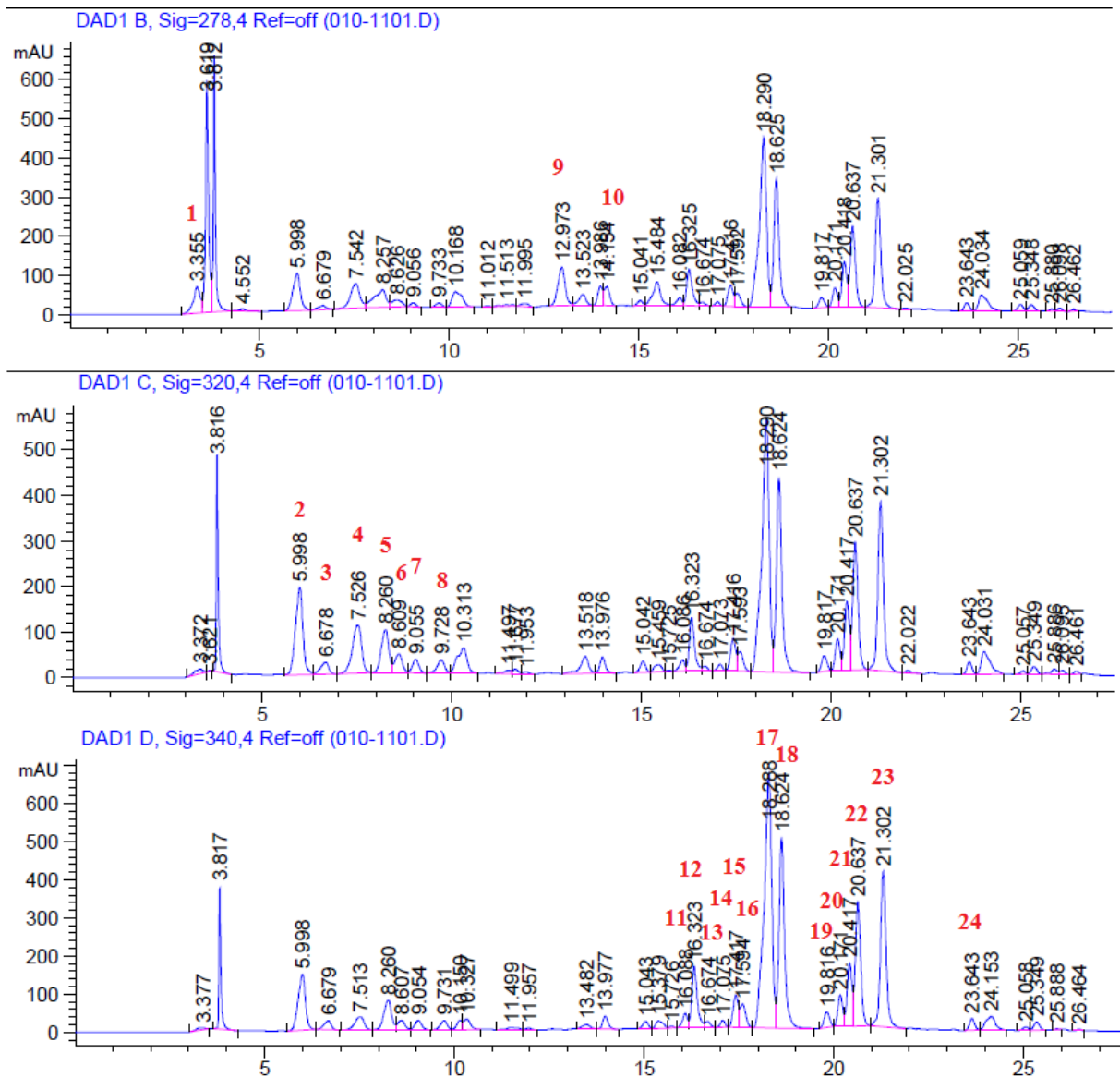
Na Slici 12. prikazani su kromatogrami dobiveni HPLC UV/Vis PDA analizom ekstrakta cvijeta trnine (uzorak TR-9).

Na slikama 13-14 prikazane su dobivene vrijednosti prilikom određivanja ukupnih fenolnih spojeva, to zapravo vrijednosti HPLC analize koje su izražene kao suma masenih udjela pojedinačnih fenolnih spojeva. Prikazan je utjecaj vodenih otopina metanola i etanola, različitih volumnih udjela (50 i 70 %) u otapalu za ekstrakciju, utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaj amplitude ultrazvuka (50, 75 i 100 %) na izolaciju ukupnih fenolnih spojeva cvijeta trnine.

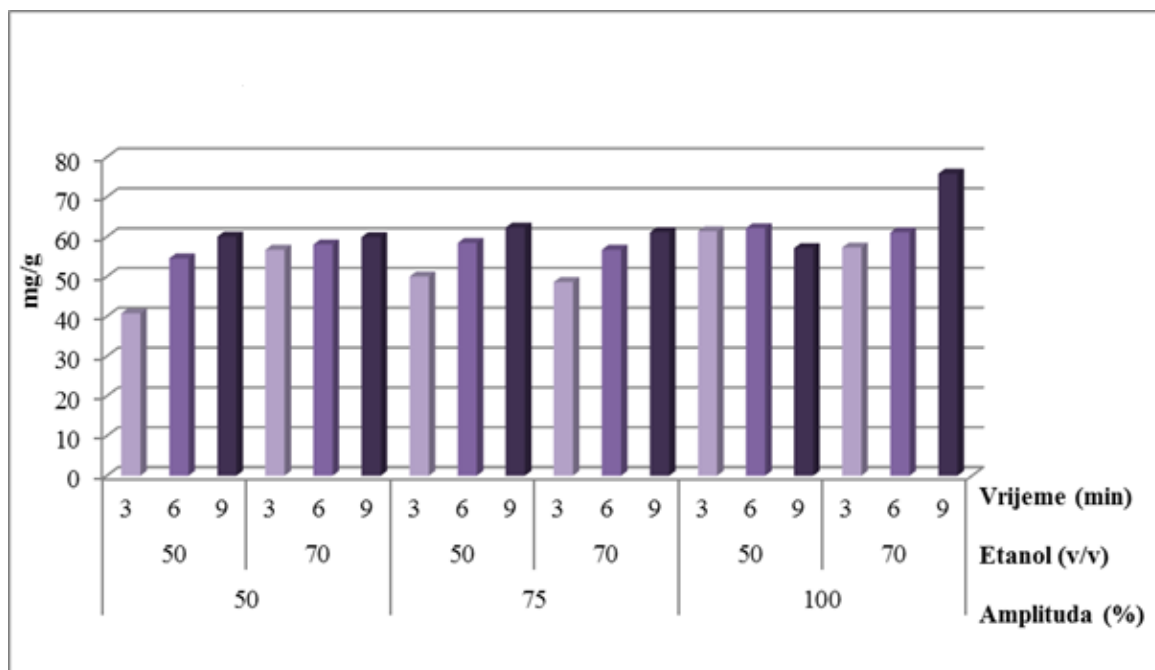
Na slikama 15-16 prikazane su dobivene vrijednosti prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom. Prikazan je utjecaj vodenih otopina metanola i etanola, različitih volumnih udjela (50 i 70 %) u otapalu za ekstrakciju, utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaj amplitude ultrazvuka (50, 75 i 100%) na antioksidacijski kapacitet cvijeta trnine.

Tablica 3. Rezultati HPLC UV/Vis PDA analize fenolnih spojeva cvijeta trnine (TR-9)

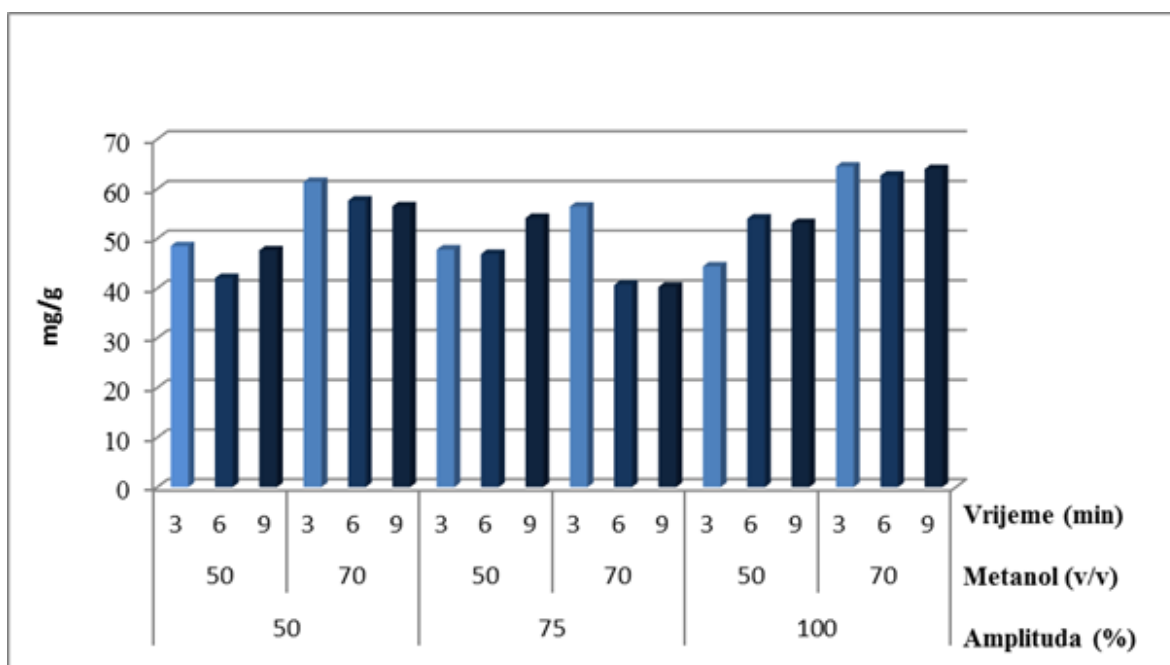
Pik br.	RT, min	Spoj	nm (mÅ)
1	3,355	Derivat hidroksibenzojeve kiselina	243(302) / 284 (643)
2	5,9	3- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina	245(95) / 325(194)
3	6,678	Derivat klorogenske 1	247 (9) / 329 (25)
4	7,526	3- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina	312 (118)
5	8,26	4- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina	245 (37) / 326 (83)
6	8,609	3- <i>O</i> -feruloilkina kiselina	243 (13) / 319 (31)
7	9,055	Derivat klorogenske kiselina 2	246 (11) / 326 (27)
8	9,728	Derivat klorogenske kiselina 3	245 (12) / 327 (26)
9	12,973	Procijanidin A1	243 (110) / 279 (99)
10	14,154	Procijanidin A2	243 (50) / 279 (48)
11	16,088	Derivat kvercetina 1	256 (49) / 356 (41)
12	16,325	Kvercetin pentozil heksozid	257 (216) / 353 (171)
13	16,674	Kvercetin ramnozil heksozid	256 (21) / 355 (17)
14	17,075	Kamferol ramnozil heksozid	266 (20) / 348 (18)
15	17,417	Kamferol-3-rutinozid	266 (104) / 350 (86)
16	17,594	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	256 (64) / 354 (51)
17	18,288	Kamferol pentozil-heksozid	265 (840) / 351 (663)
18	18,624	Kamferol-3- <i>O</i> -glukozid	264 (679) / 345 (485)
19	19,816	Kamferol heksozid	266 (49) / 349 (41)
20	20,171	Kamferol heksozil ramnozid	266 (100) / 349 (85)
21	20,417	Kamferol pentozid	264 (244) / 347 (164)
22	20,637	Kamferol ramnozid	264 (418) / 350 (326)
23	21,302	Kamferol acetil heksozid	264 (589) / 345 (407)
24	23,643	Kamferol acetil rutinozid	264 (45) / 345 (31)



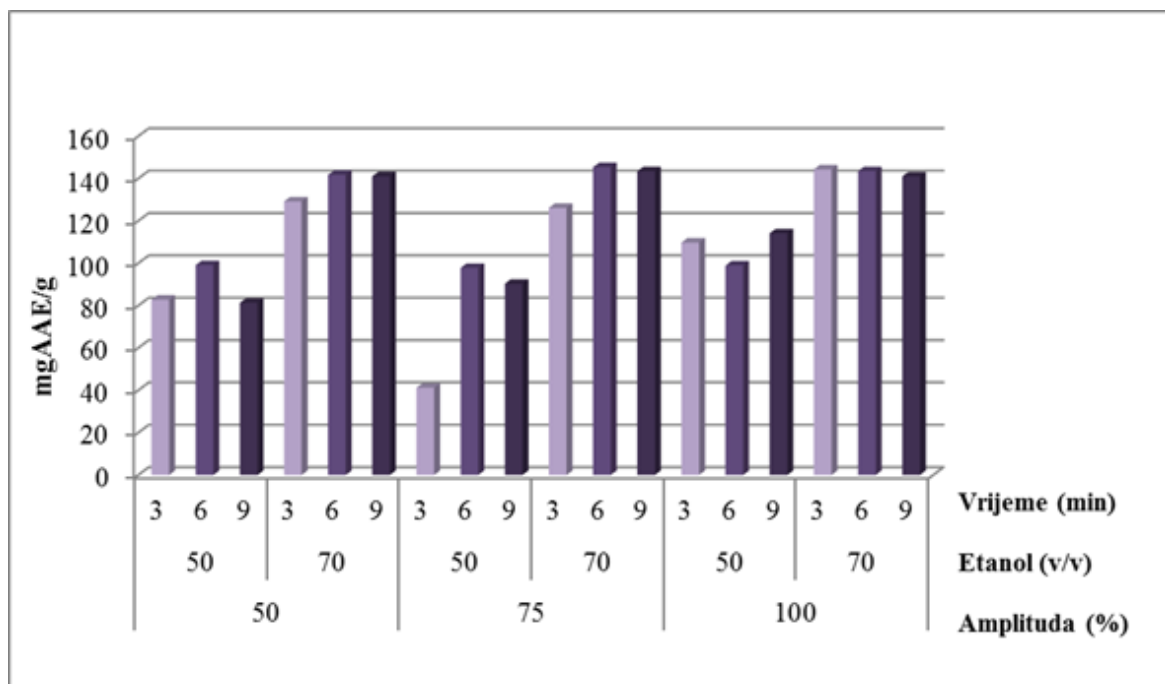
Slika 12. HPLC UV/Vis PDA kromatogrami ekstrakta cvijeta trnine (uzorak TR-9)



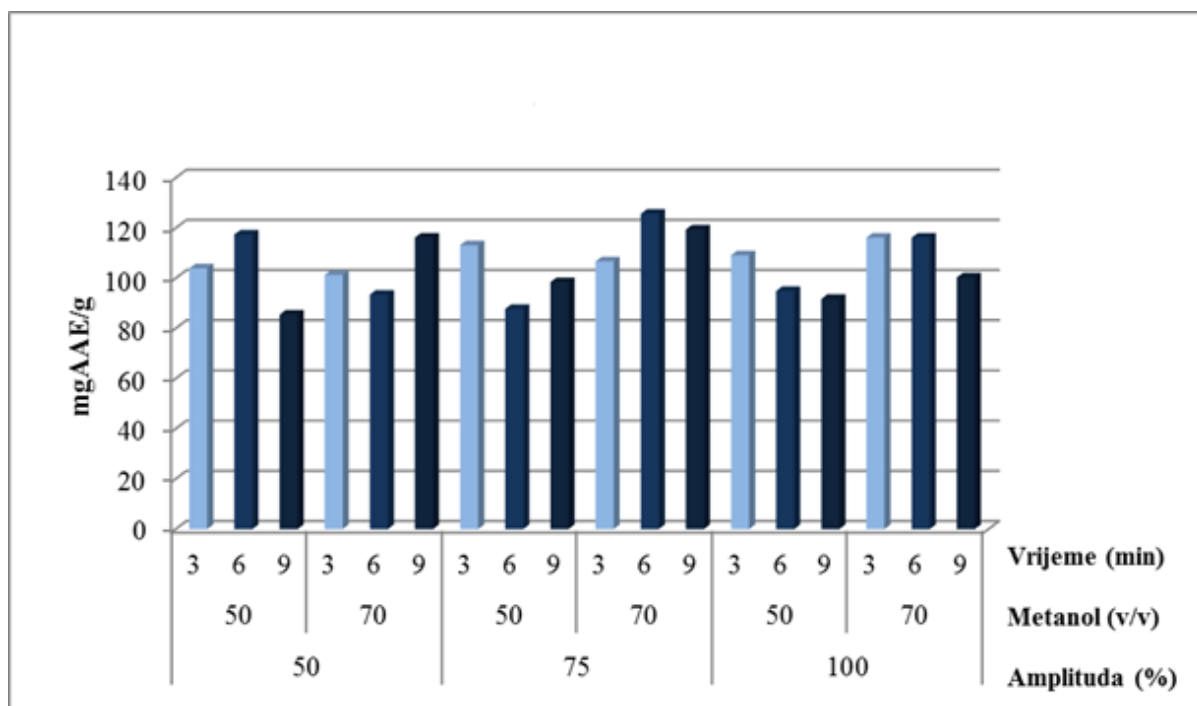
Slika 13. Maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/g) primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina etanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.



Slika 14. Maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/g) primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina metanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.



Slika 15. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iz cvijeta trnine (mgAAE/g) dobiven primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina etanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.



Slika 16. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iz cvijeta trnine (mgAAE/g) dobiven primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina metanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.

4.2. RASPRAVA

U ovom radu istraživana je utjecaj polarnosti otapala (50 i 70 % vodena otopina etanola, te 50 i 70 % vodena otopina metanola), amplitude (50, 75 i 100 %) i vremena ekstrakcije (3, 6, 9 min) na antioksidacijski kapacitet i maseni udio ukupnih fenola cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) ekstrahiranih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom). Tijekom eksperimenata promjer sonde (7 mm), ciklus (1) te snaga ultrazvuka (400 W) bili su konstantni. Na temelju dobivenih rezultata definirani su optimalni uvjeti ekstrakcije za dobivanje maksimalnih prinosa ukupnih fenola i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. U literaturi je dostupno malo radova o fenolnom sastavu i masenim udjelima fenolnih spojeva u cvijetu trnine, a o utjecaju različitih tehnika ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta trnine do sada nema niti jedno dostupno istraživanje. Prema prethodno razrađenoj i validiranoj metodi određivanja fenola u biljnom materijalu primjenom HPLC-UV/Vis PDA-a metode (Fecka i Turek, 2008) identificirane su tri skupine fenolnih spojeva (Tablica 3.):

- FENOLNE KISELINE: derivat hidroksi benzojeve kiseline, 3-*O*-kafeoilkina kiselina, derivat klorogenske 1, 3-*p*-kumaroilkina kiselina, 4-*O*-kafeoilkina kiselina, 3-*O*-feruloilkina kiselina, derivat klorogenske kiseline 2, derivat klorogenske kiseline 3
- PROCIJANIDINI: procijanidin A1, procijanidin A2
- FLAVONOL GLIKOZIDI: derivat kvercetina 1, kvercetin pentozil heksozid, kvercetin ramnozil heksozid, kamferol ramnozil heksozid, kamferol-3-rutinozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid, kamferol pentozil heksozid, kamferol-3-*O* glukozid, kamferol heksozid, kamferol heksozil ramnozid, kamferol pentozid, kamferol ramnozid, kamferol acetil heksozid, kamferol acetil rutinozid.

Najzastupljenija skupina fenolnih spojeva prisutnih u cvijetu trnine su flavonol glikozidi, pri čemu ih je identificirano 14 i to najviše kamferola i kvercetina. Na Slici 12. prikazani su kromatogrami HPLC UV/Vis PDA analize ekstrakta cvijeta trnine (uzorak TR-9) pri tri različite valne duljine (278 nm, 320 nm i 340 nm) karakteristične za svaku od prethodno spomenutih skupina spojeva. Na kromatogramu se vidi da dominiraju kamferol glikozidi - kamferol ramnozid, kamferol acetil heksozid, kamferol-3-*O*-glukozid i kamferol pentozil heksozid (pikovi br. 17, 18, 22 i 23).

Istraživanja mnogih autora pokazala su da su flavonol glikozidi dobri "hvatači" slobodnih radikala te da imaju značajno izražena antioksidativna svojstva, to ukazuje na njihovu važnu

ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Kazazić, 2004). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s istraživanjima Olszewska i sur. (2001) prema kojem sadržaj flavonoida u cvijetu trnine također pokazuje značajan udio kvercetina i kamferola.

Maseni udjeli pojedinačnih fenolnih spojeva određenih HPLC-om sumirani su i dobivene su vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola koje su prikazane na slikama 13 i 14.

Na slici 13. prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/g) primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina etanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta. Najmanji maseni udio ukupnih fenola dobiven je primjenom vodene otopine etanola i iznosio je 40,76 mg/g (pri 50 % amplitudi, uporabom 50 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije od 3 minute), dok je najveći maseni udio iznosio 75,84 mg/g (pri 100 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije od 9 minuta).

Na slici 14. prikazani maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/g) primjenom UAE pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100% uz primjenu 50% i 70% vodenih otopina metanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta. Najveći maseni udio ukupnih fenola primjenom vodene otopine metanola kao otapala iznosi 64,50 mg/g (pri 100 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine metanola i vremenom ekstrakcije od 3 minute), dok je najmanji maseni udio iznosio 40,31 mg/g (pri 75 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine metanola i vremenom ekstrakcije od 9 minuta).

Maseni udio ukupnih fenola značajno je veći u većini uzoraka gdje se kao otapalo upotrebljavala vodena otopina etanola, dok su prinosi fenola značajno manji u uzorcima ekstrahiranim vodenim otopinama metanola. Također se može uočiti da povećanje volumnog udjela etanola i metanola sa 50 na 70 %, utječe na povećanje masenih udjela ukupnih fenola. U istraživanju autora Lee i sur. (2014) kao otapala su također korištene vodene otopine etanola i metanola za ekstrakciju fenolnih spojeva iz ploda anisa, te je dokazano da je etanol učinkovitije otapalo od metanola, a optimalni udio etanola u vodenoj otopini kreće se od 63 do 97 %. Rezultati naših istraživanja u skladu su sa rezultatima prethodno spomenutih autora. Etanol se pokazao kao optimalno otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva i u istraživanju Dent i sur. (2015) koje se provodilo na ekstraktu lista kadulje. Veći prinos fenolnih spojeva ekstrahiran je uporabom slijedećih otapala: 30 % vodene otopine etanola > 30 % vodena otopina acetona > voda.

Vrijeme ekstrakcije imalo je značajan utjecaj na prinos fenolnih spojeva na analiziranim uzorcima s vodenom otopinom etanola kao otapalom, gdje je trend da se produljenjem vremena ekstrakcije povećava prinos fenolnih spojeva. Iz rezultata je vidljivo da je najveći maseni udio fenolnih spojeva izoliran pri vremenu ekstrakcije od 9 minuta, a najmanji maseni udio je izoliran tijekom 3 minute ekstrakcije. Dok na uzorcima gdje se ekstrakcija fenolnih spojeva provodila uporabom metanola, vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan učinak na prinos fenolnih spojeva. U istraživanju Šic Žlabur i sur. (2015) provedenom na ekstraktu stevije dužim vremenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom povećavao se prinos fenolnih spojeva, te je optimalno vrijeme ekstrakcije bilo 10 minuta, dok su vremena od 2, 4, 6 i 8 minuta bila prekratka i rezultirala su manjim prinosima ukupnih fenola što je bio slučaj u ovome istraživanju (izuzevši uzorke metanola). Dok u istraživanju Carrea i sur. (2012) gdje se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provela na ekstraktima grožđa vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj na prinos fenolnih spojeva. Kraće vrijeme sonikacije ponekad nije dovoljno da bi ultrazvuk razorio stijenke stanica i da bi se mogli otpustiti fenoli iz staničnih dijelova, no također produljenjem vremena tretiranja može doći do degradacije fenolnih spojeva i negativnog utjecaja prolongiranjem vremena ekstrakcije.

Primjenjena amplituda ultrazvuka značajno je utjecala na prinos ukupnih fenolnih spojeva. Vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva rastle su sa porastom amplitude neovisno o otapalu koje se koristilo za ekstrakciju. Tako najveći prinosi fenolnih spojeva dobiveni su pri 100 % amplitudi ultrazvuka (vodena otopina etanola – 75,84 mg/g, vodena otopina metanola – 64,50 mg/g). Utjecaj amplitude (20%, 50% i 100%) na ekstrakciju fenolnih spojeva istraživan je u radu Carrea i sur. (2012). Najveći prinos fenolnih spojeva bio je pri amplitudi od 100%, ali nije bilo značajne razlike između 100%-tne i 50%-tne amplitude, dok korištenjem amplitude od 20% dobiveni rezultati masenog udjela fenolnih spojeva su značajno manji. Korištenjem 100% amplitude postigli su se najbolji rezultati ekstrakcije u istraživanju Dent i sur. (2015), no u tome istraživanju vrijednost amplitude je konstantna. Prema tome manje vrijednosti amplitude mogu negativno utjecati na prinos bioaktivnih spojeva tijekom ekstrakcije.

Na slici 15. prikazan je antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iz cvijeta trnine (mg AAE/g) primjenom UAE, pri amplitudama 50, 75 i 100 % uz primjenu 50 i 70 % vodenih otopina etanola, kroz vrijeme ekstrakcije od 3 do 9 minuta. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta visoke su u svim uzorcima. Najveća vrijednost je 145,37 mg AAE/g, postignuta uz uporabu 70% vodene otopine etanola kao otapala za ekstrakciju, pri

amplitudi od 75 %, u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost 41,20 mg AAE/g određena uz uporabu 50 % vodene otopine etanola kao otapala za ekstrakciju, pri amplitudi od 75 % i vremenu trajanja ekstrakcije od 3 minute.

Na slici 16. prikazan je antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iz cvijeta trnine (mg AAE/g) primjenom UAE, pri amplitudama 50, 75 i 100 % uz primjenu 50 i 70 % vodenih otopina metanola, kroz vrijeme ekstrakcije od 3 do 9 minuta. Najveća vrijednost je 125,66 mg AAE/g, postignuta uz uporabu 70 % vodene otopine metanola kao otapala za ekstrakciju, pri amplitudi od 75 %, u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost 85,45 mg AAE/g određena uz uporabu 50 % vodene otopine metanola kao otapala za ekstrakciju, pri amplitudi od 50 % i vremenu trajanja ekstrakcije od 9 minuta.

Upotreba vodene otopine etanola kao otapala pokazala se prikladnijom za dobivanje većih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s vodenom otopinom metanola. To se može usporediti i s rezultatima prinosa fenolnih spojeva, gdje se veći prinos fenolnih spojeva također ekstrahirani uporabom vodene otopine etanola. Međutim, nije uočena korelacija između rezultata ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta. Vrijeme trajanja ekstrakcije i amplituda ultrazvuka nisu imali značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Ne postoji određeni trend po kojemu se povećavaju vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. U istraživanju Ince i sur. (2014) na uzorcima koprive dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta analizirane su DPPH metodom, te također nije uočena korelacija između rezultata ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u okviru ovog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. U usporedbi s metanolom, etanol se pokazao kao učinkovitije otapalo za izolaciju ukupnih fenolnih spojeva iz cvijeta trnine uz primjenu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.
2. Povećanje volumnog udjela etanola i metanola sa 50 na 70 %, utječe na povećanje masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva.
3. Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim UAE neovisno o vrsti otapala rastu s porastom amplitude ultrazvuka.
4. Vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na maseni udio ukupnih fenolnih spojeva kod većine uzoraka gdje se metanol koristio kao otapalo, dok u uzorcima ekstrahiranim u etanolu produljenjem vremena ekstrakcije povećavao se maseni udio ukupnih fenolnih spojeva.
5. Optimalni uvjeti izolacije ukupnih fenolnih spojeva iz cvijeta trnine uz primjenu UAE te najviši prinosi ostvaruju se pri slijedećim uvjetima:
 - ukupni fenolni spojevi (etanol) uz 70 % vodenu otopinu etanola, u vremenu trajanja ekstrakcije od 9 minuta pri amplitudi ultrazvuka 100 %
 - ukupni fenolni spojevi (metanol) uz 70 % vodenu otopinu metanola, u vremenu trajanja ekstrakcije od 3 minute pri amplitudi ultrazvuka 100 %
6. Antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom sukladno većim udjelima ukupnih fenola bio je veći u etanolnim ekstraktima i raste s porastom udjela alkohola u otapalu za ekstrakciju. Veći antioksidacijski kapacitet određen je u uzorcima u kojima je korištena vodena otopina etanola, a ne metanola, kao ekstrakcijskog otapala. Najveća vrijednost dobivena je uz uporabu 70 % vodene otopine etanola pri 75 % amplitudi u vremenu trajanja ekstrakcije od 6 minuta.
7. Amplituda ultrazvuka i vrijeme trajanja ekstrakcije nisu imali značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta većine uzoraka, neovisno o vrsti otapala.

6. LITERATURA

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valero, J.R. (2011) Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31**(3), 227-249.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261.

Anonymus (2016) Slika 1. Trnina, <<http://www.val-znanje.com/index.php/ljekovite-biljke/1075-trnina-prunus-spinosa-1>>, pristupljeno 10.05.2016.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyüren, M., Esin Çelik, S., Bektaşoğlu, Berker, K.I., Özyurt, D. (2007) Review: Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, **12**, 1496-1547.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **99**, 191-203.

Bendicho, C., i Lavilla, I. (2000) Ultrasound Extractions. U: Encyclopedia of Separation Science (Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cooke, M., Pooleured, C.F., ured.), Academic Press, str. 1448-1454.

Benzie, I.F.F., (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochem.* **29** (2), 111-116.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239** (1), 70-76.

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

Borkowski, B., Lutomski, J., Skrzydlewska, E., Zygmunt, B. (1994) Rosliny leczniczew fitoterapii, IRiPZ Poznan 470—471.

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

- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava, A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra-red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment. *Afr. J. Biotech.* **9** (41), 6907.
- Browicz, K. (1996) *Prunus L. Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Regions* (Supplement), str. 16-17.
- Carrea, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, G.C. (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta.* **732**, 100–104.
- Chemat F., Grondin I., Shum Cheong Sing A., Smadja J. (2004) Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 13–15.
- Choi, H.R., Choi, J.S., Han, Y.N., Bae, S.J., Chung, H.Y. (2002) Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy Research*, **16**, 364-367.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. (1988) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Natural Products*, **61**, 71-76.
- Croft, K.D. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals New York Academy Sci.*, **854**, 435-442.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food. Technol. Biotech.* **51**(1), 84.
- Dent, M., Dragović Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.) *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29** (3), 475- 484.
- Dragović Uzelac, V., Levaj, B., Bursać, D., Pedisić, S., Radojčić, I., Biško, A. (2007) Total Phenolics and Antioxidant Capacity Assays of Selected Fruits. *Agriculturae. Conspec. Sci.*, **72**, 279–284.

- Dragović Uzelac, V., Putnik, P., Zorić, Z., Bursać Kovačević, D. (2015) Winery by-products: anthocyanins recovery from red grape skin by high hydrostatic pressure extraction (HHPE) *Ann. Nutr. Metab.* **(67)**, 522-523.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., Mofardin, I. (2013) Ultrasound-assisted infrared drying of Pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.* **36**, 397.
- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Herceg, Z. (2014) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *Food Sci. Tech.* **(62)**, 894-900.
- Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**, 1039-1053.
- Fegredo, J.A., Wong, M.C.Y., Wiseman, H., Preedy, V.R. (2009) Poglavlje 97 - Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers, U: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego, str. 991-1002.
- Fraternalea, D., Giamperia, L., Bucchina, A., Sestili, P., Paolillo, M. (2009) *Prunus spinosa* Fresh Fruit Juice: Antioxidant Activity in Cell-free and Cellular Systems *J. Food Sci.* **12** 1665–1670.
- Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications* **9** (1), 1-32.
- Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chichester.
- Heim, K.E., Tagliafero, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutrit. Biochem.* **13**, 572-584.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambrak Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Possibility of application high intensity ultrasound in milk industry. *Mljekarstvo.* **59**, 65.
- Horhammer, L., Endres, L., Wagner, H., Richthsmmer, F. (1957) *Arch. Pharmaz.* **290**, 342

Hossain, M.B., Patras, A., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P. (2011) Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. *J. Functional Food*, **3**, 179-189.

Hossain, M.B., Brunton, N.P. Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **19**, 582-590.

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

Ince, A. E., Sahin, S., Sumnu, G. (2014) Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J. Food Sci. Technol.* **51**(10), 2776-2782.

Jabłońska-Ryś, E., Zalewska-Korona, M., Kalbarczyk, J. (2009) Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* **17**, 115–120.

Katalinić, V., Smole Možina, S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M. (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* **119**, 715-723.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

Keerthi, M., Lakshmi Prasanna, J., Santhosh Aruna, M., Rama Rao, N. (2014) Review on polyphenols as nature's gift. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, (4), 445-455.

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

Klen, T. J., Vodopivec, B. M. (2012) Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food. Chem.* **134**, 2481.

Kolodziej, H., Sakar, M.K., Burger, J. F., Engelshove, R., Ferreira, D., Ferreira, A. (1991) Type Proanthocyanidins from *Prunus Spinosa* L. *Phytochemistry* **30**, 2041 –2047.

Lajšić S., Grujić-Injac B. (1998) Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Lee, A. Y., Kim, H. S., Choi, G., Moon, B. C., Chun, J. M., Kim, H. K. (2014) Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Active Compounds from the Fruit of star Anise by Using Response Surface Methodology. *Food Anal. Methods* **7**, 1661-1670.

List, P.H., Horhammer, L., Hagers (1971) Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Izd. 6, Springer, Berlin.

Luque-Garcia, J. L., Luque de Castro, M. D. (2003) Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trac. Trend Anal. Chem.* **22**, 41-47.

Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A:I:, Zygadlo, J.A. (2006) Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in Research*, 37/661, 105-135.

Makarov, V., A. (1972) *Rast. Resur.* **8**, 42

Mason, T.J. (1992) Practical Sonochemistry: User's Guide to Applications in Chemistry and Chemical Engineering, Ellis Horwood Ltd, New York.

Naczka, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 95-111.

Ninčević Grassino, A., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Rimac Brnčić, S. (2016) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chem.* 198, 93-100.

Olszewska, M., Wolbis, M. (2000) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Herba Polon. Pharm.* **46**. 249–234.

Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbis, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Polon. Pharm.* **58**, 199–203.

- Paar, A.J., Bolwell, J.P. (2002) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 985-1012.
- Panizo, F. M., Acebal, B. (1955) *Annales Real. Soc. Espan.*; 51B; 623;CA 50; 7231.
- Payá, M., Halliwell, B., Houlst, J.R.S. (1992) Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radical. *Biochem. Pharm.* **44**, 205-214.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P. (2009) Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, **14**, 2202-2211.
- Pleše, V. (2002) Trnina, crni trn (*Prunus spinosa* L.). *Hrvatske šume* **65**, 24.
- Proestos, C., Komaitis, M. (2006) Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *J. Food Qual.* **29**, 567–582.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Penić, M., Dragović Uzelac, V. (2016) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Anal. Methods*, In press
- Režek Jambrak, A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno biotehnološki fakultet, Disertacija, Zagreb.
- Rosello-Soto, E., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Orlie, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B. K., Barba, F. J. (2015) Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing: Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **42**, 134.
- Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D. (2009) A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem.* **113**, 336-344.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003) Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr.* **1012**, 119-128.

- Rouhani, S., Alizadeh, N., Salimi, S., Haji-Ghasemi, T. (2009) Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma longa* L. *Prog.Color Colorants Coat.* (2), 103-113.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006) In Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms; Fingerman, M., Nagabhushanam, R. Eds.; Science Publishers: Enfield, NH, USA, 115-174.
- Sakar, M. K., Engelshowe, R., Tamer, A. (1992) Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi.* (12), 59-63.
- Sakar, M. K., Kolodziej, H. (1993) Flavonoid glycosides from the flowers of *Prunus spinosa*. *Fitoter.* **64**, 180-181.
- Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J. (2008) The Power of Ultrasound. U: *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications* (Capelo-Martínez, J.L., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1-15.
- Schafner, W., Hafelfinger, B., Ernst, B. (1991) Ljekovito bilje kompendij (preveo Jurković, B.). Centar za informacije i publicitet, Zagreb.
- Shahidi F., Naczk M. (2004) Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL. 352-355.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98** (4), 828-834.
- Sikora, E., Bieniek, I.M., Borczak, B. (2013) Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.) *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.* **12** (4), 365 – 372
- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1992) Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-A review. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1478-1487.
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S. (2015) Optimisation of Ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* **29**, 231.

- Tamas, M. (1985) Study of flavones *Prunus spinosa* L. flowers, *Farmacia* **33**, 181–186.
- Tsao, R., McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L. (2002) Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 1320-1323.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L. (2003) Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaureum eythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Phytomedicine*, **10**, 517-522.
- Veličković, J., M. (2013) Kemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim komponentama, Prirodno matematički fakultet, Dizertacija, Niš, 18-33.
- Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S, Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S, Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. ind.* **68** (3), 297-303.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Inno. Food. Sci. Emerg. Technol.* **9**, 161.
- Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.
- Viot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **17** (6), 1066.
- Vorobiev E., Chemat, F. (2010) Principles of physically assisted extractions and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. U: Separation, extraction and concentration processes (Rizvi, S.S.H, ured). Woodhead Publishing Limited, Oxford, str. 94.

Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M, Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M.J., Saraiva, J., Patras, A., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015) Fruit juice sonication: Implications on food safety, physicochemical and nutritional properties. *Food Res. Int.* **77** (4) 743-752.

Wan, J., Mawson, R., Ashoukkumar, M., Ronacher, K., Coventry, M.J., Roginski, H., Versteeg, C. (2005) Emerging processing technologies for functional foods. *Aust. J. Dairy. Tech.* **60**, 59-61.

Wang, H., Provan, G. J., Helliwel, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food. Chem.* **87**, 307.

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300.