

Izolacija flavonol glikozida iz cvijeta trnine primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Čunčić, Kristina

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:159:071474>

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

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, srpanj 2016.

Kristina Čunčić, 646/PI

**Izolacija flavonol glikozida iz cvijeta
trnine primjenom ekstrakcije
potpomognute ultrazvukom**

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.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović Uzelac, te uz pomoć dr.sc. Ivone Elez Garofulić i u Laboratoriju za tehničku termodinamiku pod stručnim vodstvom Prof.dr.sc.Mladena Brnčića, te uz pomoć dr.sc.Filipa Dujmića

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA FLAVONOL GLIKOZIDA IZ CVIJETA TRNINE PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOŠNE ULTRAZVUKOM

Kristina Čunčić, 646/PI

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na prinos flavonol glikozida iz cvijeta trnina, pri čemu su varirani polarnost otapala (50 i 70 % vodena otopina etanola), amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100%) i vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta). Ekstrakcija je provedena pri konstantnoj jakosti ultrazvuka (400W), promjeru sonde (7 mm) i ciklusu (1). Identifikacija i kvantifikacija flavonol glikozida provedena je primjenom ultra djelotvorne tekućinske kromatografije sa masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS). Identificirano je 16 flavonol glikozida i to 8 kamferol glikozida i 7 kvercetin glikozida te izoramnetin-3-rutinozid. Najbolji prinosi flavonol glikozida postižu se uz primjenu 70%-tne vodene otopine etanola, vremenu ekstrakcije 6 minuta i pri amplitudi 50%.

Ključne riječi: flavonol glikozidi, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, trnina (*Prunus spinosa* L.), UPLC-MS/MS

Rad sadrži: 49 stranica, 9 slika, 7 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Verica Dragović Uzelac

Pomoć pri izradi: dr.sc. Ivona Elez Garofulić i dr.sc.Filip Dujmić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 14. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF FLAVONOL GLYCOSIDES FROM BLACKTHORN FLOWERS USING ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Kristina Čunčić, 646/PI

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of ultrasound assisted extraction on the yield of flavonol glycosides in blackthorn flowers. The polarity of the solvent (50 and 70% aqueous ethanol), ultrasound amplitude (50, 75 and 100 %) and extraction time (3, 6, 9 minutes) were varied, whereas intensity of ultrasound (400 W), the diameter of the probe (7 mm) and cycle (1) were constant. Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used for the identification and quantification of flavonol glycosides. Sixteen flavonol glycosides were identified: 7 quercetin glycosides, 8 kampferol glycosides and isoramnetin-3-rutinoside. The highest flavonol glycosides yield was obtained using 70 % aqueous solution of ethanol, extraction time 6 minutes and amplitude 50 %.

Keywords: flavonol glycosides, ultrasound assisted extraction, blackthorn (*Prunus spinosa* L.), UPLC-MS/MS

Thesis contains: 49 pages, 9 figures, 7 tables, 65 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

Technical support and assistance: Ph.D. Ivona Elez Garofulić and Ph.D. Filip Dujmić

Reviewers:

1. Ph.D. Mladen, Brnčić, Full professor
2. Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. Ph.D. Branka Levaj, Full professor
4. Ph.D. Danijela, Bursać Kovačević, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 14 July 2016

Sadržaj:

1.UVOD	7
2. TEORIJSKI DIO	9
2.1. TRNINA	10
2.2. FENOLNI SPOJEVI TRNINE	11
2.2.1 Kemijski sastav trnine	11
2.2.2. Flavonoidi	12
2.3. Metode ekstrakcije flavonoida.....	14
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI.....	20
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	20
3.2.2. Određivanje flavonoida primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK.....	38
6. LITERATURA	40

1.UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je jedna od nedovoljno istraženih voćnih samoniklih vrsta, a dosadašnja istraživanja pokazuju da sadrži različite skupine bioaktivnih spojeva kojima se pripisuje antioksidacijsko djelovanje i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Značajnu skupinu bioaktivnih spojeva čine fenolni spojevi koji su zastupljeni u svim dijelovima biljke, cvijetu, listu i plodu.

Fenolni spojevi biljaka strukturno su vrlo različiti, zato je za svaku biljnu vrstu važno odabrati optimalnu metodu i parametre ekstrakcije. Najčešće primjenjivani postupak ekstrakcije je klasična ekstrakcija uz primjenu organskih otapala uz zagrijavanje kroz određeno vrijeme. Takav postupak zahtijeva dulje vrijeme ekstrakcije, veću potrošnju otapala i energije stoga se u posljednje vrijeme sve više upotrebljavaju novi postupci ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, visokim hidrostatskim tlakom, mikrovalovima, superkritičnim fluidima, pulsirajućim električnim i magnetskim poljem.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se može provoditi u ultrazvučnim kupeljima ili primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom primjenom različitih otapala, najčešće vodenih otopina etanola i metanola. U odnosu na klasičnu ekstrakciju prednosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su kraće vrijeme postupka ekstrakcije, manji utrošak energije, smanjena potrošnja otapala što ju čini ekološki prihvatljivijom metodom. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su: frekvencija (kHz), amplituda ultrazvuka (%), ciklus (%), izlazna snaga (W) i promjer sonde (mm).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj polarosti otapala, amplitude ultrazvuka i vremena trajanja ekstrakcije na maseni udio flavonol glikozida u cvijetu trnine. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je primjenom 50 i 70 % vodene otopine etanola, te je varirana amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta), dok su snaga (400 W), promjer sonde (7 mm) i ciklus (1) konstantni.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samonikla biljka iz porodice *Rosaceae*, roda *Prunus* poznata još iz davnina (Marakoğlu i sur., 2005). Raste na obroncima neobrađenih površina, duž puteva i kanala čineći gustu trnovitu masu. Karakteristična je za područja gdje prevladava umjerena kontinentalna klima (Veličković i sur., 2013). Ovisno o regijama, na području RH za trninu se koriste različiti sinonimi: trnjina, trnula, trnavka, trn, crni trn, divlja šljiva, grmulja i kukinja (Schafner, 1991).

Listovi su nazubljeni, razmjerno maleni i listaju nakon cvatnje. Mnogobrojni sitni bijeli cvjetovi stoje pojedinačno ili po 2-3 zajedno. Plodovi su plave boje, oblika okrugle koštunice, a poslije prvog mraza omekšaju i mogu se koristiti u prehrani (List, 1971).

Zbog prisutstva flavonoida u cvijetu trnine može se reći da cvjetovi imaju pozitivan učinak na određena stanja poput blagog laksativnog djelovanja, uklanjaju štetne tvari iz organizma i smanjuju mogućnost stvaranja krvnih ugrušaka. Plodovi djeluju anitbakterijski (Pelc i sur., 2010, Barros i sur., 2010, Morales i sur., 2013). Osim što dobro utječe na zdravlje, trnina se može koristiti u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova, sokova, čajeva, vina i kompota (Sikora i sur., 2013).



Slika 1. Trnina (*Prunus spinosa* L.) (Anonymous 1, 2016)

2.2. FENOLNI SPOJEVI TRNINE

Cvijet i plod trnine dobar su izvor fenolnih spojeva. Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela (Harborne i Baxter, 1990). Prisutni su u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Većina njih nastaje biosintetskim putem iz aminokiselina fenilalanina ili tirozina (Seabra i sur., 2006).

Najbrojnija skupina fenolnih spojeva su flavonoidi koji se dijele na flavone, flavanole, flavonole, procijanidine itd.

Plod trnine više je istraživani u usporedbi s cvijetom, a prema Radovanović i sur. (2013) plod trnine sadrži značajnu koncentraciju ukupnih fenola koja iznosi 7959,90 mg GAE¹/kg ± 1,95. U istraživanju Turker i sur. (2012) vrijednosti ukupnih fenola u plodu trnine iznose 0,29 ± 0,02 mg GAE/g, dok u istraživanju Sikora i sur. (2013) vrijednosti ukupnih fenola iznose 599,2 mg GAE/100 g. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Ionska-Ryś i sur. (2009) gdje je udio ukupnih fenola iznosio 402,67 mg GAE/100 g. U istraživanju Leja i sur. (2007) udio fenolnih spojeva u plodu trnine iznosio je 623,48 mg/100 g.

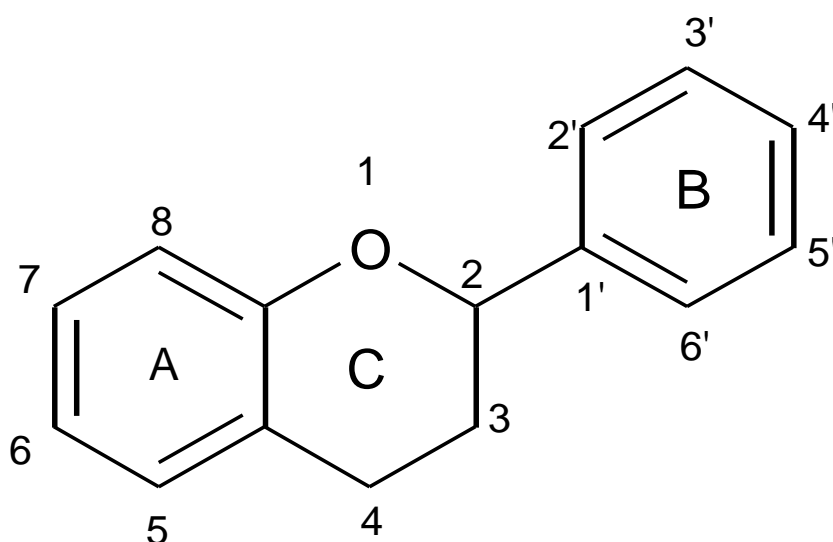
2.2.1 Kemijski sastav trnine

Osim fenolnih spojeva plod trnine sadrži i proteine, masti, šećere i vitamine. Sadržaj proteina u svježem plodu prema istraživanju Sikora i sur. (2013) iznosi 0,8 g/100 g. U portugalskoj sorti trnine udio proteina iznosi 2,86 g/100 g (Barros i sur, 2010). Prema istraživanju Marakoglu i sur. (2005) sadržaj proteina iznosi 3,4g/100 g. Sadržaj masti u svježem plodu iznosi 0,37 g/100 g, a u smrznutom plodu 0,33g/100 g (Sikora i sur.,2013). Sadržaj šećera u svježem plodu trnine iznosi 5,52 g/100 g, a u smrznutom 5g/100 g. Plodovi trnine mogu biti odličan izvor minerala. Minerali koji su prisutni su: K, Ca, P, Mg, Na, B i Al (Sikora i sur., 2013). Vitamin C je prisutan u koncentraciji od 23,84 mg/100 g u svježem materijalu, i 20,86 mg/100 g u smrznutom materijalu (Sikora i sur., 2013). Manje količine vitamina C pronađene su u istraživanju Morales i sur. (2013) - 7,73mg/100 g i Barros i sur. (2010) - 15,69 mg/100 g. Plod trnine sadrži malu količinu β-karotena - 0,04 mg/100 g (Sikora i sur., 2013), dok Barros i sur. (2010) tvrde da je sadržaj tri puta veći - 0,78 mg/100 g.

¹ GAE - je ekvivalent galne kiseline (*eng.* gallic acid equivalent)

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću skupinu sekundarnih biljnih metabolita te ih je identificirano više od 6400 (Harborne i Baxter, 1999; Procházková i sur., 2011). Flavonoidi imaju C6-C3-C6 skelet u kojem su 2 aromatska prstena povezana 6-članim (piranskim) ili 5-članim (furanskim) prstenom (Janjičević i sur., 2008). Flavonoidi prisutni u biljkama razlikuju se po položaju hidroksilnih i glikozidnih skupina te po konjugaciji između prstena A i B. Dobili su ime prema latinskoj riječi *flavus* (žuta) iako su poznati po skupini antocijani koja obuhvaća crvene, plave i ljubičaste pigmente u biljnom tkivu (Winkel-Shirley, 2001).

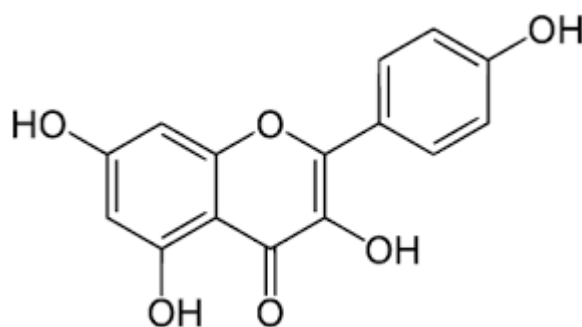


Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Heim i sur., 2002)

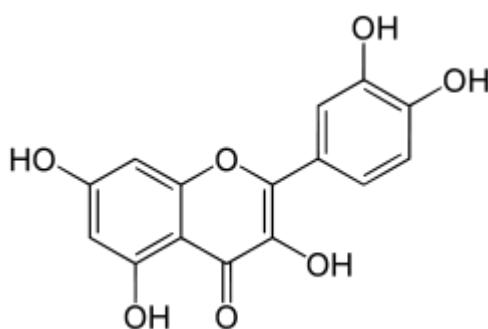
Danas se sve više naglašava njihova važnost u tretiranju brojnih bolesti zahvaljujući njihovoj sposobnosti da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju određene hormone i neurotransmitere te uništavaju slobodne radikale (Havsteen, 2002.). Ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C - prstena dijele na: flavone, flavanole, flavone, antocijane, procijanidine itd.

Flavonoli su najzastupljenija podgrupa flavonoidnih spojeva, prisutni su u voću i biljkama. Do sada ih je u biljkama identificirano oko 200, a najčešći su miricetin, izomiricetin, kamferol (Slika 2.), kvercetin (Slika 3.) koji su uglavnom prisutni u obliku O-glikozida. Flavonol glikozidi, poput kvercetin-glikozida, dobro apsorbiraju UV zračenje i

time pružaju biljci zaštitu od ovog štetnog zračenja. Formiranje glikozida flavona i flavonola ovisi o prisutnosti svjetla. Oni su odgovorni za zaštitu biljke od UV zračenja zbog čega se uglavnom nalaze u lišću i pokožici biljaka, a značajne koncentracije pronađene su i u pulpi, dok se u podzemnim dijelovima biljke nalaze samo u tragovima (Shahidi i Naczk, 2004). Najčešće se vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom (Veberić, 2010). Njihova koncentracija u plodovima ovisi o njihovim uvjetima rasta, izloženosti svjetlu i sunčevim zrakama, uvjetima čuvanja i procesiranja, jer se akumuliraju u površinskim tkivima (pokožica i listovi) (Caridi i sur., 2007).



Slika 3. Kamferol (Anonymous 2, 2016)



Slika 4. Kvercetin (Anonymous 3, 2016)

Istraživanja na studiju za farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Lodz-u, potvrdile su prisutstvo kamferola, kvercetina i njihovih heterozida u cvijetu trnine. Flavonoli su bili prisutni u obliku monoglikozida, najviše kamferol i kvercetin-3-*O*-arabinozid (Olszewska i sur., 1998).

U istraživanju Olszewska i sur. (2001), te Olszewska i Wolbis (2000) identificirane su različite skupine fenolnih spojeva u cvijetu trnine te je od ukupnog udjela flavonola u cvijetu trnine udio kvercetina iznosio 2,51-3,58 %, a kamferola 0,96-1,51 %. Udio navedenih spojeva dvostruko je viši u usporedbi s vrijednostima koje su u svom istraživanju dobili Tamas i sur. (1985). U cvjetovima flavonoidi su većinom prisutni u obliku kampferol i kvercetin 3-*O*-arabinozida. Neki od flavonoida izoliranih iz cvijeta trnine u istraživanjima Sakar i sur. (1992, 1993) su: kampferol, kvercetin, kampferol-3-*O*- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-*O*- α -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-*O*- α -ksilopiranozid, kampferol-3-*O*- α -L-arabinofuranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid.

U istraživanju Veličković i sur. (2014) na plodu trnine sadržaj ukupnih flavonoida iznosio je $0,700 \pm 0,10$ mg/GAE svježeg ploda (otapalo vodena otopina etanola). Prema rezultatima tog istraživanja od flavonola prisutan je kvercetin u masenom udjelu od $3,83 \pm 0,2$ mg/L. U istraživanju Ganhao i sur. (2010) u ekstraktu ploda trnine pronađen je udio flavonola u koncentraciji od 42,1 mg/100 g. U istraživanju Radovanović i sur. (2013) na plodu trnine udio ukupnih flavonola iznosio je $971,69 \pm 06$ mg GAE/kg. U tom istraživanju izolirani spojevi iz skupine flavonola bili su kvercetin-3-glikozid i kvercetin. Najzastupljeniji spoj ploda trnine u tome istraživanju bio je kvercetin-3-glikozid ($32,02 \pm 1,42$ mg/kg). U radovima drugih autora (Tomas-Barberan, 2000; Maatta-Riihinen, 2004; Maattta-Riihinen, 2004) najzastupljeniji spojevi bili su kvercetin glukozidi i kvercetin. U istraživanju Jaiswal i sur. (2013) određivano je prisutstvo različitih fenolnih spojeva u plodu trnine gdje je dokazano da plod sadrži iz skupine flavonola sljedeće spojeve: kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid i kvercetin pentozid. U lišću ima mnogo glikozida, uglavnom kampferol- 3,7-*O*-diramnozida (Olszewska, 2000).

2.3. METODE EKSTRAKCIJE FLAVONOIDA

Ekstrakcija je vrlo važan korak u izolaciji, identifikaciji i upotrebi funkcionalnih spojeva iz biljnog materijala (Lapornik i sur., 2005). Provodi se na temelju različite topljivosti neke tvari u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju (Lianfu i Zelong, 2008). Udio ekstrahiranih fenolnih spojeva ovisi o polarnosti ekstrakcijskog otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije te o fizikalno kemijskim karakteristikama ekstrahiranog uzorka (Bimacr i sur., 2011) stoga je za svaku biljnu vrstu potrebno optimirati te uvjete. Izbor metode za ekstrakciju fenolnih spojeva ovisi o vrsti spoja koji se želi ekstrahirati.

Konvencionalni postupci ekstrakcije koji su korišteni desetljećima zahtijevaju dugotrajno vrijeme ekstrakcije i relativno veće količine otapala zato se zato sve više ispituju nove metode ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Rodrigues i sur., 2008; Wang, i sur., 2008; Zhang i sur., 2009, Šic Žlabur i sur., 2015), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Spigno i sur., 2009), ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (Dragović Uzelac i sur., 2015) i ekstrakcije potpomognute plazmom (Elez Garofulić i sur., 2014). Primjenom ovih tehnika otvorene su mogućnosti komercijalizacije zbog obećavajućih rezultata koji se postižu (Chavan i sur., 2013).

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jeftina, jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije fenolnih spojeva. Provodi se u ultrazvučnim kupeljima ili uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji se želi ekstrahirati (Slika 4.).



Slika 5. Ultrazvučna sonda (Vlastita fotografija, 2016)

Postoji cijeli niz izvedbi različitih uređaja kao i postupaka ekstrakcije koji se upotrebljavaju. Na učinkovitost same ekstrakcije utječu različiti parametri: snaga i frekvencija ultrazvuka, amplituda, promjer sonde, vrijeme ekstrakcije i izbor organskog otapala kojim se provodi ekstrakcija. Princip ultrazvuka temelji se na prolasku zvučnih valova kroz medij. Valovi putujući kroz medij izazivaju ekspanziju i kompresiju i to dovodi do stvaranja mjehurića (Zinoviadou et al., 2015). Mjehurići rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije zbog visokih temperatura i tlakova koji pritom nastaju (Ninčević Grassino i sur., 2016). Mehanički učinak ultrazvuka temelji se na prodiranju otapala u matriks uzorka i time se povećava kontaktna površina između krute i tekuće faze i kao rezultat toga olakšan je prolaz otapala do staničnog materijala (Rostagno i sur., 2003, Roselló-Soto i sur., 2015). Mehaničko djelovanje ultrazvuka ima nekoliko prednosti: bolji prolazak otapala u stanicu, poboljšani prijenos mase i razbijanje stijenki stanica u biljnom materijalu što omogućuje lakše otpuštanje staničnih sastojaka.

Važan dio ekstrakcije potpomognute ultrazvukom je optimizacija procesa. Treba pažljivo odabrati frekvenciju (kHz), amplitudu (%), ciklus koji se primjenjuje (%), nazivnu izlaznu snagu (W) i geometrijske parametre sonde (dužina i promjer - mm) koji će se primjenjivati za ekstrakciju fenolnih spojeva.

Frekvencija ultrazvuka ima veliki utjecaj na ekstrakcijski kapacitet, ali ne treba zanemariti i prirodu samog materijala ili biljke iz koje se ekstrahira.

Amplituda ultrazvuka je također značajan faktor, pri velikoj amplitudi ultrazvučni val putuje kroz medij i uslijed pojave kavitacije dolazi do mikrofraktura membrane tkiva (Vinatoru, 2001).

Odabir otapala za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom ima utjecaj na učinkovitost ekstrakcije jer pojava kavitacije ovisi o fizikalnim svojstvima otapala, a intenzitet kavitacije se smanjuje uslijed povećanja tlaka i površinske napetosti (Vilkhu i sur., 2008). Primjenom ultrazvuka znatno se skraćuje vrijeme trajanja ekstrakcije te upotreba otapala stoga se za tu metodu može reći da je ekološki prihvatljiva i da ima veliki potencijal za primjenu u industriji (Dent i sur., 2015).

Veličković i sur. (2006) su proveli usporedbu klasične ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na kadulji upotrebom otapala različite polarosti pri čemu je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bila učinkovitija (veći prinos fenolnih spojeva).

U istraživanju Paniwnyk i sur. (2009) na uzorku mažurana uspoređivan je utjecaj različitih ekstrakcijskih metoda tijekom vremena od 15 minuta. Tako je padajućim redoslijedom udio fenolnih spojeva najveći primjenom ekstrakcije potpomognute

ultrazvukom uz frekvenciju od 20 kHz, slijedi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji uz konstantno miješanje i frekvenciju od 40 kHz, zatim ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom u kupelji pri 40 kHz i konvencionalna ekstrakcija. Također, u tom istraživanju metanol se pokazao boljim otapalom u primjeni konvencionalnih metoda ekstrakcije, dok je etanol učinkovitiji pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom.

Ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom izlazne snage 400 W promjera sonde 22 mm pri optimalnim uvjetima (amplituda 100 %, kroz 11 minuta) postiže se oko 20 % veći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz kadulje u odnosu na klasičnu ekstrakciju, te se vrijeme ekstrakcije skraćuje 3 puta (Dent, 2013).

U istraživanju Dent i sur. (2015) vrijeme prozvučivanja bilo je 8, 10, 11 i 12 minuta za analizu ukupnih fenola i flavonoida. Rezultati su pokazali da se koncentracija fenola i flavonoida povećava vremenom prozvučivanja, dosežući svoj maksimum kod tretmana u trajanju od 11 minuta. Učinci ekstrakcije bili su lošiji tijekom prvih 8 minuta prozvučivanja što indicira da je to vrijeme prekratko da bi ultrazvuk razorio stijenke stanica i otpustio fenole iz staničnih djelova. Nadalje, produljenjem ekstrakcije tijekom 12 minuta nije došlo do značajnog povećanja koncentracije ukupnih fenola i flavonoida.

U istraživanju Ince i sur. (2013) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provedenom na matičnjaku varirani su sljedeći parametri: vrijeme ekstrakcije (5, 10, 15 i 20 minuta), omjer krutina-otapalo (voda) (1:10, 1:20, 1:30 g/mL), amplituda ultrazvuka (50 do 80 %). Frekvencija je bila konstantna i iznosila je 20 kHz kao i snaga 300 W. Rezultati istraživanja pokazali su da do izolacije većine fenolnih spojeva dolazi pri 50 % amplitudi ultrazvuka, vremenu ekstrakcije od 20 minuta i omjeru krutine - otapala 1:30. Može se zaključiti da u ovom istraživanju povećanjem amplitude ultrazvuka dolazi do degradacije pojedinih fenolnih spojeva. Veći maseni udio fenolnih spojeva postiže se pri duljem vremenu ekstrakcije (20 minuta) što znači da vrijeme u ovom slučaju ima pozitivan utjecaj na prinos fenolnih spojeva.

U istraživanju Chavan (2013) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom gdje se kao materijal koristila palma varirani su sljedeći parametri: snaga ultrazvuka (30–70 W), ciklus (30–70 %) i vrijeme ekstrakcije (25–50 min). Rezultati istraživanja dokazuju da vrijeme ekstrakcije i radni ciklus igraju značajnu ulogu u izolaciji fenolnih spojeva. Maksimalna ekstrakcija fenolnih spojeva vidljiva je nakon 42 minute i pri 60 % radnog ciklusa. To može biti zbog prolaska ultrazvučnih valova visoke vrijednosti jakosti ultrazvuka kroz medij gdje kao posljedica toga dolazi do kavitacije u neposrednoj blizini ili na površini

biljnih membrana. To uzrokuje mikropukotine koje povećavaju difuziju otopljene tvari i povećavaju izlučivanje (Vinatoru, 2001).

Primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u odnosu na klasičnu ekstrakciju, udio ekstrahiranih fenolnih spojeva je veći za oko 20 % (Virot i sur., 2010). Razvojem koncepta zelene kemije zadnjih se godina sve više daje prednost ekološki prihvatljivim tehnikama ekstrakcije biološki aktivnih spojeva. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (20-100 kHz) i mikrovalovima te ekstrakcija superkritičnim plinovima su novije tehnike, a njihova prednost se očituje u visokoj obnovljivosti postupka u kratko vrijeme, jednostavnom rukovanju, smanjenoj upotrebi otapala i temperature i manjim utrošcima energije (Chemat i sur., 2008) uz povećanje kvalitete i udjela ekstrakta (Wang i Weller, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje ovog istraživanja korišten je uzorak prirodno osušenog cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) (Slika 5.) nabavljen u suradnji sa proizvođačem Suban d.o.o. Proizvod je s hrvatskog tržišta, te mu je rok trajanja do 31. ožujka 2017. godine, broj serije 63451. Kao takav čuvan je na suhom i u primarnoj ambalaži od kartona do trenutka provođenja analiza (7 dana). Uzorci cvijeta trnine su usitnjeni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita, Italy) u fini prah. Pomoću laserskog analizatora (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments, and Worcestershire, UK) određena je veličina čestica, pri čemu je 90 % čestica bilo manje ili jednako 349 μm .



Slika 6. Cvijet trnine (Vlastita fotografija, 2016)

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Za ekstrakciju odvagano je po $\pm 1,00$ g uzorka na analitičkoj vagi, a kao otapala su korištene 50 % i 70 % vodene otopine etanola (v/v). Na uređaju s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom provedena je ekstrakcija uzorka sa smjesom otapala uz djelovanje ultrazvuka pri amplitudi 50, 75 i 100 % kroz 3, 6, 9 minuta te (Slika 6.). Za provedbu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom korišten je ultrazvuk maksimalne izlazne snage 400

W, sonda Dr. Hielscher UP 400s promjera 7 mm, te ciklus 1, sonda je bila uronjena do polovice njene veličine te se nakon određenog vremena hladila. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta na uređaju Rotofiks 32 Hettich. Supernatant dobiven centrifugiranjem se odekantira od nastalog taloga te se profiltrira u čiste plastične kivete od 50 mL. Uzorci su označeni od TR-1 do TR-18 i čuvani do analize na temperaturi od -18 °C.



Slika 7. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Vlastita fotografija, 2016)

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
- Tekućinski kromatograf Agilent 1260 sistem (UPLC) opremljen sa:
 - 1260 kvarternom pumpom,
 - 1260 autosamplrom,
 - 1260 termostatirane kolone,
- Agilent 6490 trostrukim kvadropol MS/MS detektora
- Software MassHunter Workstation for QQQ

Svi reagensi i otapala koji su se koristili u ovom radu bili su najmanje p.a. stupnja čistoće. Standardi koji su se koristili bili su pro chromatography stupnja čistoće:

- Etanol (GRAM-MOL), p.a.
- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ, Millipore, SAD
- Acetonitril, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)
- 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu
- 0,1%-tna otopina mravlje kiseline u vodi

- Mravlja kiselina, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)

-Kvercentin-3-glukozid (Sigma Aldrich, Njemačka)

-Kamferol-3-rutinozid (Sigma Aldrich, Njemačka)

-Kvercentin-3-rutinozid (Acros Organics, SAD)

Ekstrakcija fenolnih spojeva je provedena prema dizajnu eksperimenta (Tablica 1.) pri čemu su varirani slijedeći parametri: različite vrijednosti amplitude, polarnost otapala i vrijeme ekstrakcije.

Tablica 1. Plan pokusa za provedbu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

ID	Amplituda (%)	Polarnost (%)	Vrijeme (min)
TR-1	50	50	3
TR-2	50	50	6
TR-3	50	50	9
TR-4	75	50	3
TR-5	75	50	6
TR-6	75	50	9
TR-7	100	50	3
TR-8	100	50	6
TR-9	100	50	9
TR-10	50	70	3
TR-11	50	70	6
TR-12	50	70	9
TR-13	75	70	3
TR-14	75	70	6
TR-15	75	70	9
TR-16	100	70	3
TR-17	100	70	6
TR-18	100	70	9

3.2.2. Određivanje flavonoida primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju

Princip određivanja:

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom ultra djelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju - metoda vanjskog standarda temelji se na gradijentnoj eluciji, pri čemu se ekstrahirani polifenoli eluiraju u nizu padajuće polarnosti.

Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva (flavonol glikozidi) u fenolnim ekstraktima dobivenih iz cvijeta trnine provedena je prema metodi koju su prethodno opisali Serra i sur. (2011) uz određene modifikacije.

Prema Serra i sur. (2011) mobilne faze su bile: A (0,2 % octena kiselina u H₂O) i B (acetonitril), dok su u ovom istraživanju korištene mobilne faze: A (0,1 % mravlja kiselina u H₂O) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu).

Priprema uzorka za ultra djelotvornu tekućinsku kromatografiju (UPLC):

Uzorci dobiveni ekstrakcijom ukupnih fenola (postupak opisan u poglavlju 2.2.1) su profilirani neposredno prije injektiranja kroz 0,45 µm filtar (Machery-Nagel, Njemačka).

Postupak određivanja pomoću UPLC-a:

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na tekućinskom kromatografu Agilent 1260 sistemom opremljenim s: kvarternom pumpom, autosamplerom, termostatirane kolone, Agilent 6490 trostrukim kvadropol MS/MS detektorom te software-om MassHunter Workstation for QQQ.

Određivanje je provedeno prema sljedećim kromatografskim uvjetima:

Kromatografski uvjeti:

Kolona:	ZorbaxEclipse Plus C18, 1,8 µm (100 × 2,1 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A : 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B : 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor:	MS/MS trostruki kvadropol (QQQ)
Ionski izvor:	ESI
MS parametri:	temperatura plina: 300 °C protok plina (N ₂): 11 L/min nebulizer: 40 psi

	napon na kapilari: +4000 V; -3500 V
	maseni detektor: DMRM mode (m/z od 50 do 1000)
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u Tablici 1.
Temperatura:	35 °C
Vrijeme trajanja:	12,5 min
Injektirani volumen:	2,5 mL

Tablica 2. Gradijent za UPLC-MS/MS analizu flavonoida (Serra i sur., 2011)

t (min)	Otapalo A	Otapalo B	Protok (mL/min)
0	95	5	0,4
10	65	35	0,4
10,1	20	80	0,4
11	20	80	0,4
11,1	95	5	0,4
12,5	95	5	0,4

Identifikacija i kvantifikacija flavonoida:

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki spoj.

Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja prikazanih u Tablici 3.

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedine flavonoida

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent određivanja (R^2)
Kvercetin-3-rutinozid	$Y=1477,80 X$	0,909
Kvercetin-3-glukozid	$Y=3224,50 X$	0,947
Kamferol-3-rutinozid	$Y=3452,00 X$	0,924

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati utjecaja parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (polarnost otapala, vrijeme ekstrakcije te amplituda ultrazvuka) na prinos flavonoida. Sastav i maseni udjeli flavonoida ekstrakata cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) određeni su primjenom UPLC MS/MS analize.

Eksperimentalno dobiveni podaci te njihova ovisnost o udjelu etanola u otapalu za ekstrakciju, vremenu trajanja ekstrakcije, te korištenoj amplitudi ultrazvuka, obrađeni su pomoću MS Excel programskog paketa.

U Tablicama 4. i 5. prikazani su: retencijsko vrijeme (*R_t*) flavonoida ekstrakta cvijeta trnine te redosljed elucije fenolnih spojeva, prekursor ion (*m/z*) i fragment ion (*m/z*) koji su određeni pomoću ultra djelotvorne tekućinske kromatografije sa detektorom mase.

Tablica 4. Retencijsko vrijeme, prekursor i fragmenti iona za identificirane kamferol glikozide u cvijetu trnine

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Prekursor ion (<i>m/z</i>)	Fragment ion (<i>m/z</i>)
Kamferol-3-glukozid	5,23	449	287
Kamferol ramnozid heksozid	6,356	595	287
Kamferol-3-rutinozid	6,356	595	287
Kamferol pentozid heksozid	6,467	581	287
Kamferol pentozid	7,327	419	287
Kamferol ramnozid	7,549	433	287
Kamferol acetil heksozid	7,794	491	287
Kamferol acetil rutinozid	8,049	637	287

Tablica 5. Retencijsko vrijeme, prekursor i fragmenti iona za identificirane kvercetin glikozide u cvijetu trnine

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Prekursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)
Kvercetin pentozil heksozid	5,803	597	303
Kvercetin-3-rutinozid	5,642	611	303
Kvercetin-3-glukozid	5,896	465	303,1
Kvercetin pentozid	6,519	435	303
Kvercetin acetil heksozid	6,847	507	303
Kvercetin ramnozid	7,73	449	303
Kvercetin acetil rutinozid	7,749	653	303

Primjenom UPLC MS/MS metode u ekstraktu cvijeta trnine određeni su spojevi iz skupine *flavonol glikozida*;

1. **kamferol glikozidi:** kamferol-3-glukozid, kamferol ramnozid-heksozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol ramnozid, kamferol pentozid, kamferol acetil heksozid, kamferol acetil rutinozid, kamferol pentozil heksozid
2. **kvercetin glikozidi:** kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-rutinozid, , kvercetin-3-glukozid, kvercetin pentozid, kvercetin acetil heksozid, kvercetin ramnozid, kvercetin acetil rutinozid te izoramnetin-3-rutinozid.

U tablicama 6. i 7. prikazani su maseni udjeli identificiranih glikozida kamferola i kvercetina izraženi u mg/100 g suhog uzorka.

Na slikama 8. i 9. prikazan je utjecaj ekstrakcijskog otapala (50 % i 70 % vodena otopina etanola, v/v), utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6, 9 minuta) te utjecaj amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida

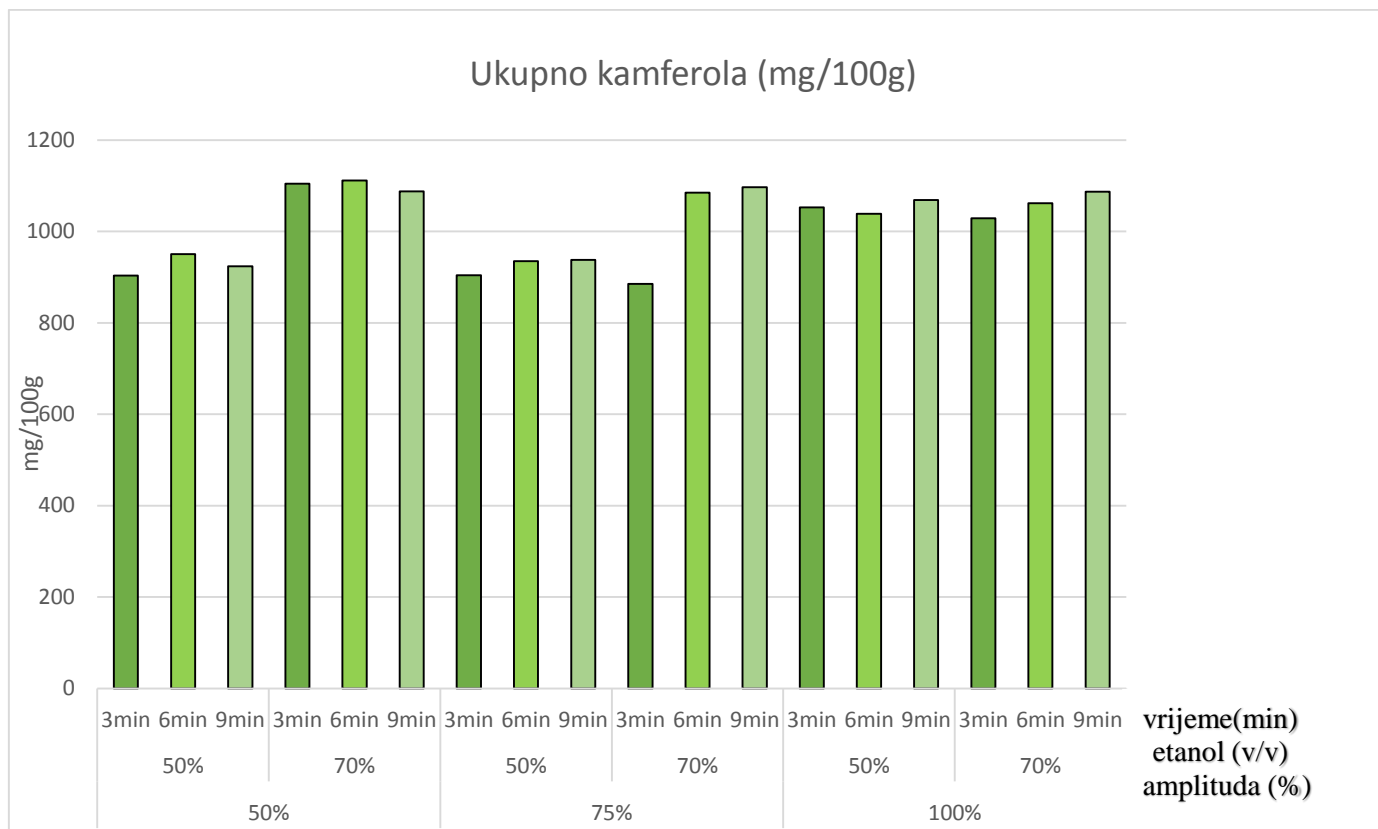
iz cvijeta trnine. Prikazani su maseni udjeli ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida (dobiveni kao suma masenih udjela svih identificiranih spojeva unutar skupine) u ovisnosti o primijenjenim parametrima ekstrakcije.

Tablica 6. Maseni udio pojedinačnih kamferol glikozida (K) (mg/100 g) u cvijetu trnine

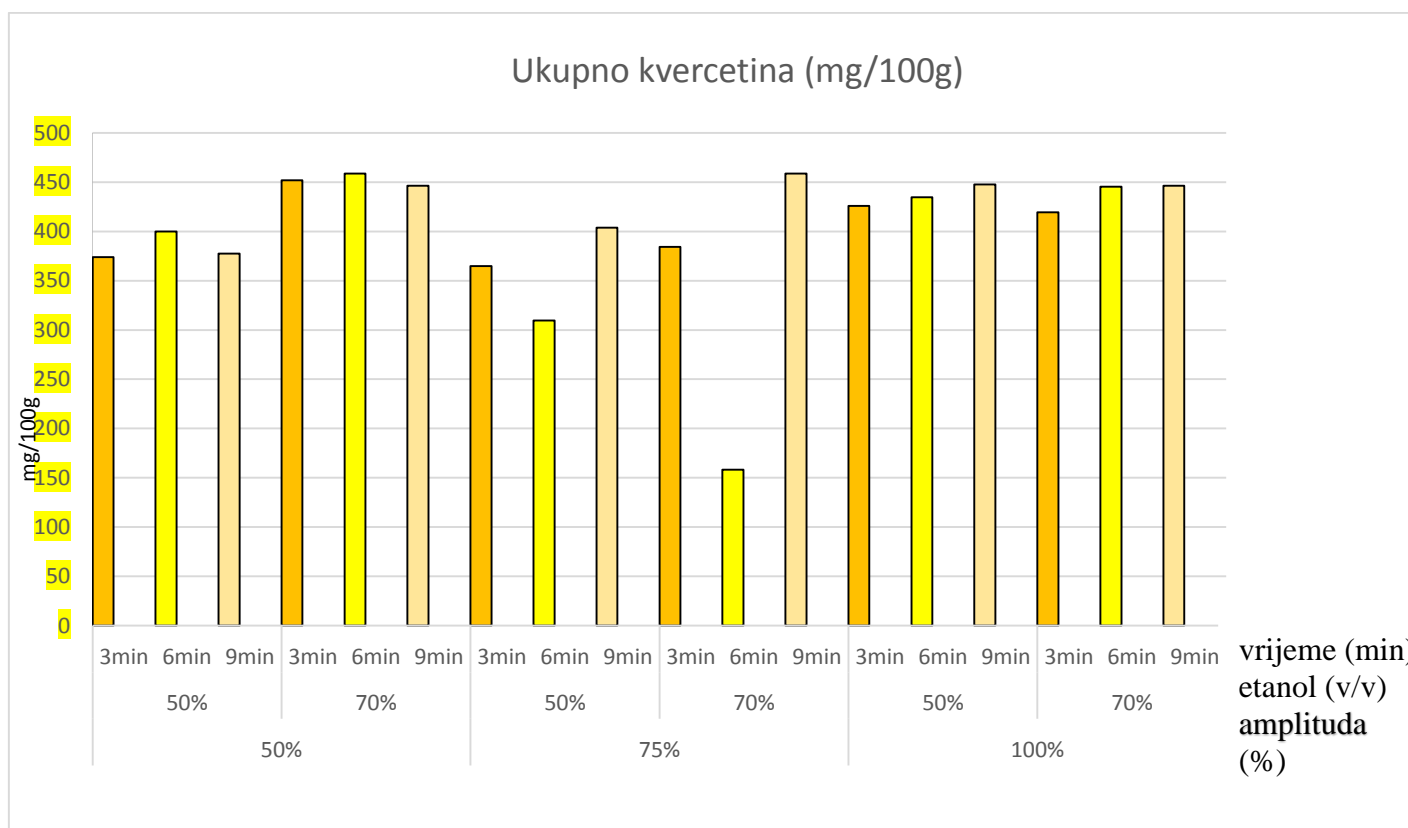
Spoj	K-3- glukozid	K- ramnozid heksozid	K-3- rutinozid	K- pentozil heksozid	K- pentozid	K- ramnozid	K-acetil heksozid	K- acetil rutinozid
1.	0,32	43,24	6,36	54,92	376,28	388,79	1,02	0,54
2.	0,34	44,08	595	55,89	400,62	403,93	1,13	0,63
3.	0,35	43,55	287	54,77	382,34	398,45	1,06	0,56
4.	0,42	50,78	38,23	61,58	466,99	472,45	1,32	0,72
5.	0,46	52,43	43,62	63,08	466,62	472,20	1,36	0,67
6.	0,53	49,91	42,91	59,87	460,19	466,19	1,29	0,64
7.	0,58	47,17	50,38	58,51	337,09	413,85	1,05	0,56
8.	0,76	48,61	51,76	58,17	365,18	414,08	1,12	0,60
9.	0,89	50,70	48,90	58,30	362,67	415,36	1,11	0,58
10.	0,37	42,63	45,15	55,65	362,40	382,40	1,05	0,59
11.	0,45	48,28	46,74	58,78	461,80	465,90	1,35	0,63
12.	0,60	49,35	48,56	60,97	463,39	469,02	1,29	0,68
13.	0,77	46,31	39,97	56,04	445,39	457,33	1,27	0,59
14.	0,41	44,86	47,92	55,24	446,12	445,75	1,27	0,55
15.	0,50	46,25	51,24	56,05	461,72	457,62	1,34	0,61
16.	0,35	44,46	44,99	51,75	436,56	451,03	1,21	0,60
17.	0,40	45,59	44,63	54,44	457,72	456,60	1,31	0,61
18.	0,46	49,61	44,70	58,44	456,78	470,39	1,35	0,64

Tablica 7. Maseni udio pojedinačnih kvercetin glikozida (Q) (mg/100 g) u cvijetu trnine

Spoj	Q-pentozil heksozid	Q -3- rutinozid	Q-3- glukozid	Q- pentozid	Q- ramnozid	Q - acetil rutinozid	Q - acetil heksozid
1.	46,52	57,38	27,01	237,17	2,00	2,57	1,29
2.	51,45	61,42	30,25	250,51	2,12	2,89	1,38
3.	49,13	58,60	27,31	236,45	2,02	2,70	1,30
4.	55,85	70,02	32,68	286,17	2,50	3,18	1,53
5.	57,26	73,46	32,03	288,34	2,61	3,28	1,65
6.	55,76	68,51	30,67	284,19	2,62	3,10	1,56
7.	50,73	70,25	24,82	212,71	2,30	2,70	1,30
8.	51,84	66,38	25,62	225,69	2,23	2,76	1,38
9.	52,14	73,72	25,05	246,53	2,21	2,79	1,42
10.	49,09	60,71	27,52	241,19	2,07	2,56	1,28
11.	53,72	67,47	29,90	288,26	2,72	2,99	1,55
12.	57,20	74,18	31,24	288,47	2,79	3,18	1,56
13.	52,19	64,95	28,52	273,19	2,66	2,79	1,44
14.	52,04	65,78	28,87	280,98	2,63	2,69	1,49
15.	52,48	65,84	29,88	292,17	2,91	2,80	1,56
16.	49,53	61,85	27,93	273,15	2,75	2,82	1,47
17.	52,78	66,12	29,62	290,45	2,81	2,83	1,61
18.	53,88	68,79	30,05	286,15	2,91	2,94	1,56



Slika 8. Ukupni maseni udjeli kamferol glikozida ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/100 g) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz primjenu 50 %, 70 % vodenih otopina etanola, pri amplitudi ultrazvuka 50 %, 75 % i 100 %, kroz vrijeme od 3 do 9 minuta



Slika 9. Ukupni maseni udjeli kvercetin glikozida ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/100 g) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz primjenu 50 %, 70 % vodenih otopina etanola, pri amplitudi ultrazvuka 50 %, 75 % i 100 %, kroz vrijeme od 3 do 9 minuta

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te polarnosti otapala (50 %, 70 % vodena otopina etanola), amplitude (50 %, 75 %, 100 %) i vremena ekstrakcije (3, 6, 9 min) na sastav i maseni udio fenolnih spojeva (flavonol glikozida) cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.). U literaturi je dostupno malo radova o fenolnom sastavu i masenim udjelima flavonol glikozida u cvijetu trnine, a o utjecaju različitih tehnika ekstrakcije na izolaciju flavonol glikozida iz cvijeta trnine do sada nema niti jedno dostupno istraživanje. Stoga su u dobivenim ekstraktima primjenom UPLC MS/MS metode identificirani i kvantificirani glikozidi kamferola i kvercetina te je praćen trend promjena ovih skupina spojeva u ovisnosti o primijenjenim ekstrakcijskim parametrima.

- **Identifikacija flavonol glikozida u ekstraktima cvijeta trnine primjenom UPLC MS/MS analize**

Primjenom UPLC MS/MS analize identificirano je 16 flavonol glikozida od čega **8 kamferol glikozida** (kamferol-3-glukozid, kamferol ramnozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol ramnozid, kamferol pentozid, kamferol acetil heksozid, kamferol acetil rutinozid, kamferol pentozil heksozid) i **7 kvercetin glikozida** (kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-rutinozid, , kvercetin-3-glukozid, kvercetin pentozid, kvercetin acetil heksozid, kvercetin ramnozid, kvercetin acetil rutinozid te izoramnetin-3-rutinozid (Tablice 6. i 7.). Prema istraživanju Olszewska i sur. (2001) sadržaj flavonoida u cvijetu trnine također pokazuje značajan udio kvercetin glikozida i kamferol glikozida i to kvercetin 3-O- α -L arabinofuranozida, kamferol-3-O- α -L arabinofuranozida, kamferol-3-O- α -L arabinofuranozida-7-O- α -L ramnopiranozida, no međutim u istraživanju nisu navedene njihove koncentracije.

Iz Tablice 6. vidljivo je da je raspon masenih udjela za kamferol glikozide iznosio od 0,32 do 472,20 mg/100 g te da su iz skupine kamferol glikozida u najvećem masenom udjelu prisutni kamferol pentozid u rasponu masenih koncentracija od 376,28 mg/100 g do 466,99 mg/100 g i kamferol ramnozid u rasponu masenih koncentracija od 388,79 mg/100 g do 475,20 mg/100 g. U odnosu na ukupnu sumu kamferol glikozida identificiranih u cvijetu trnine kamferol pentozid čini 81,6 % ukupnih kamferol glikozida. U najmanjem masenom udjelu prisutni su kamferol-3-glukozid (0,32-0,89 mg/100 g) i kamferol acetil rutinozid (0,54-0,72 mg/100 g).

Kvercetin glikozid zastupljen je u rasponu masenih koncentracija od 1,29 do 292,17 mg/100 g. Iz skupine kvercetin glikozida najzastupljeniji je kvercetin pentozid (212,71-292,17 mg/100 g), dok su ostali kvercetin glikozidi zastupljeni u znatno nižim masenim udjelima (primjerice

kvercetin acetil heksozid 1,29-1,65 mg/100 g). Kvercetin pentozid čini 63,2 % ukupnih kvercetin glikozida identificiranih u cvijetu trnine računato u odnosu na ukupnu sumu kvercetin glikozida.

Na slikama 8. i 9. prikazani su maseni udjeli ukupnih kamferol i kvercetin glikozida ekstrahiranih iz cvijeta trnine (mg/100 g) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudi ultrazvuka 50 i 75 % i 100 % uz primjenu 50 % i 70 % vodene otopine etanola, kroz vrijeme ekstrakcije od 3 do 9 minuta.

Najmanji maseni udio ukupnih kamferol glikozida iznosi 903,33 mg/100 g (pri 50 % amplitudi, uporabom 50 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije 3 minute), dok je najveći maseni udio iznosio 1111,59 mg/100 g (pri 50 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije 6 minuta).

Najveći maseni udio ukupnih kvercetin glikozida iznosi 458,62 mg/100 g (pri 50 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije od 6 minute), dok je najmanji maseni udio iznosio 158,36 mg/100g (pri 75 % amplitudi, uporabom 70 % vodene otopine etanola i vremenom ekstrakcije 6 minuta).

U literaturi nema podataka o utjecaju ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta trnine te su rezultati našeg istraživanja uspoređivani sa istraživanjima koja su provedena na drugim biljkama.

U istraživanju Proestos i sur. (2006) provedenom na uzorku mažurana ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: 60 % vodena otopina metanola, temperatura 60°C i vrijeme ekstrakcije od 60 minuta te su u najvećim udjelima identificirani fenolni spojevi iz skupine flavonol glikozida (kvercetin-3-rutinozid – $2,6 \pm 0,04$ mg/100 g suhog materijala i kvercetin glikozid u masenom udjelu $2,8 \pm 0,04$ mg/100 g suhog materijala).

Utjecaji parametara ekstrakcije (polarnost otapala, amplituda i vrijeme ekstrakcije) opisani su u nastavku rasprave.

- ***Utjecaj ekstrakcijskog otapala na masene udjele flavonol glikozida u ekstraktima cvijeta trnine***

Iz slika 8. i 9. vidljivo je da su maseni udjeli ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida veći u ekstraktima dobivenim uz primjenu 70 % vodene otopine etanola nego uz primjenu 50 % vodene otopine etanola što znači da **polarnost otapala** utječe na maseni udio ukupnih kamferol i kvercetin glikozida. Budući da su u cvijetu trnine zastupljeniji spojevi iz skupine flavonoida koji su manje polarni od ostalih fenolnih spojeva, bilo je za očekivati da je učinkovitija ekstrakcija uz upotrebu manje polarnog otapala (70 % vodena otopina etanola). Također, bilo je i za očekivati da će se veći ekstrakcijski kapacitet postići primjenom 70 % vodene otopine etanola i zbog toga što s porastom udjela organskih otapala u vodenim otopinama ekstrakcijski kapacitet raste. Rezultate ovog istraživanja potvrđuju i rezultati drugih autora. U istraživanju Rouhani i sur. (2009) provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz korijena kurkume primjenom ultrazvuka, uz upotrebu 60 % do 96 % vodene otopine etanola. Najveći udio fenolnih spojeva ekstrahirani je primjenom 70 % vodene otopine etanola.

- ***Utjecaj amplitude na masene udjele flavonol glikozida u ekstraktima cvijeta trnine***

Primjenjena **amplituda ultrazvuka** utjecala je na maseni udio ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida. Pri povećanju amplitude s 50 % na 100 % vidljiva je značajna promjena u masenom udjelu ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida, naročito u ekstraktima dobivenim primjenom 70 % vodene otopine etanola. Primjenom veće amplitude, ultrazvučni val kroz vodeni medij putuje stvarajući puno više kavitacijskih mjehurića. Uslijed kolapsa tj. implozije mjehurića do kojeg dolazi za vrlo kratko vrijeme radi mehaničkog djelovanja kavitacijskih mjehurića dolazi do stvaranja povišene temperature unutar obrađivanog sustava te staničnog oslobađanja produkata pucanjem staničnih stijenki, boljeg prodiranja otapala u biljno tkivo i do većeg rasta prinosa ekstrahiranih spojeva (Zhang i sur., 2009). Hossain i sur. (2012) proveli su istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz aromatskih biljaka porodice *Lamiaceae* pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: ultrazvučnog procesora jakosti 1500 W, promjera sonde 19 mm u trajanju 5 do 15 min s 80 % vodenom otopinom metanola te variranom amplitudom (24-61 μm). Utvrdili su da na izolaciju fenolnih spojeva značajan utjecaj ima amplituda ultrazvuka, te da porastom amplitude značajno raste prinos fenolnih spojeva, što je u skladu s ovim istraživanjem na cvijetu trnine.

- *Utjecaj vremena ekstrakcije na masene udjele flavonol glikozida u ekstraktima cvijeta trnine*

Vrijeme ekstrakcije pri nižim vrijednostima amplitude (50 i 75 %) nije imalo veliki utjecaj na maseni udio ukupnih kamferol i kvercetin glikozida. Tek pri većim vrijednostima amplitude (100 %) s povećanjem vremena ekstrakcije (9 minuta) proporcionalno raste maseni udio ukupnih kamferol i kvercetin glikozida. Dent i sur. (2015) su proveli istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz lista kadulje primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri sljedećim parametrima: 30 % vodena otopina etanola, 100 % amplituda i vrijeme trajanja ekstrakcije 8-12 minuta gdje je najveći prinos flavonoida bio pri vremenu ekstrakcije od 11 minuta ($2122,96 \pm 11,84$ mg/100 g) što je u skladu sa našim istraživanjem kada se koristi 100 % amplituda ultrazvuka.

U istraživanju Proestos i sur. (2006) uspoređivan je utjecaj konvencionalne metode ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na prinos fenolnih spojeva ekstrahiranih iz različitih aromatskih biljaka (ružmarin, mažuran, origano i dr.). Primjenom obiju ekstrakcijskih metoda određen je isti sastav fenolnih spojeva, ali primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dobiveni su znatno veći maseni udjeli te je skraćeno vrijeme trajanja ekstrakcije.

Općenito, značajan prinos ukupnih kamferol glikozida postiže se pri 100 % amplitudi ultrazvuka i primjenom 70 % vodene otopine etanola dok je značajan prinos ukupnih kvercetin glikozida postignut pri 50 % amplitudi ultrazvuka, uz primjenu 70 % vodene otopine etanola dok se za vrijeme ekstrakcije ne može reći da je imalo veći utjecaj na prinos ukupnih kamferol i kvercetin glikozida.

5. ZAKLJUČAK

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

1. UPLC MS/MS analizom u uzorcima cvijeta trnine identificirano je ukupno 16 flavonol glikozida iz skupine kamferola i kvercetina: **kamferoli** (kamferol-3-glukozid, kamferol ramnozid-heksozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol ramnozid, kamferol pentozid, kamferol acetil heksozid, kamferol acetil rutinozid, kamferol pentozil heksozid), **kvercetini** (kvercetin pentozil heksozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin pentozid, kvercetin acetil heksozid, kvercetin ramnozid, kvercetin acetil rutinozid) te izoramnetin-3-rutinozid.
2. U najvećim masenim udjelima iz skupine kamferol glikozida zastupljeni su kamferol pentozid (466,99 mg/100 g) i kamferol ramnozid (475,20 mg/100 g), a iz skupine kvercetin glikozida kvercetin pentozid (292,17 mg/100 g).
3. Povećanje volumnog udjela etanola s 50 na 70 % te povećanje amplitude ultrazvuka utječe na povećanje masenih udjela ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida, dok vrijeme ekstrakcije nije bitno utjecalo na koncentracije ukupnih kamferol glikozida i kvercetin glikozida.
4. Optimalni uvjeti izolacije kamferol glikozida i kvercetin glikozida iz cvijeta trnine uz primjenu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te najviši prinosi ostvaruju se pri slijedećim uvjetima: 70 % vodena otopina etanola, 50 % amplituda i vrijeme ekstrakcije 6 minuta.
5. Provedeno istraživanje predstavlja značajan doprinos u području proučavanja samoniklih biljnih vrsta budući da daje detaljan sastav velikog broja flavonoida u cvijetu trnine, kao i njihove masene udjele.

6. LITERATURA

Anonymous 1, *Prunus spinosa* L.
https://www.google.hr/search?q=trnina&espv=2&biw=1745&bih=890&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjPgK3PqsPMAhUKPxoKHQThCiYQ_AUIBigB#imgrc=-X8glxrtVRGXFM%3A, pristupljeno 05.05.2016.

Anonymous 2., Kamferol,
https://www.google.hr/search?q=kaempferol&espv=2&biw=1745&bih=890&site=webhp&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj1g4CEh8_MAhUkSJoKHXiEC6kQ_AUIBigB&dpr=1.1#imgrc=R--N1uCl6NDDTM%3A, pristupljeno 10.05.2016.

Anonymous 3., Kvercetin,
https://www.google.hr/search?q=quercetin&biw=1745&bih=890&espv=2&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi49Livh8_MAhXCCpoKHduaAXkQ_AUIBigB#imgrc=fjYPveCqfwHvIM%3A, pristupljeno 10.05.2016.

Barros, L., Carvalho, A., M., Morais, J., S., Ferreira, I., C. (2010) Strawberry tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120** 247–254.

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.

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.

Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Duong, S., Laughler, D., Jones, R. (2007) Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using

capillary zone electrophoresis nad high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **105**, 691-699.

Chavan, Y., Singhal, S. R. (2013) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovat.Food Sci. Emerg.Tech.* **17**, 10-113.

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.

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., Elez Garofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Technol Biotech.* **50 (3)**, 377-383.

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.

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. *LWT- Food Sci. Tech.* (62), 894-900.

Ganhão R., Estévez M., Kylli P., Heinonen M., Morcuende D. (2010) Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8854-8861.

Harborne, J.B., Baxter H. (1999) Handbook of natural flavonoids, 2. izd., Wiley & Sons, Chichester (UK).

Havsteen B. (1983) Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141-1148.

Heim, K.E., Tagliafero, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutrit. Biochem.* 13, 572-584.

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.

Ince, A., E., Sahin, S., Sumnu, S., G. (2013) Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish J. Agricult. For.* 37, 69-75.

Jaiswal, R., Karaköse, H., Rühmann, S., Goldner, K., Neumüller, M., Treutter, D., Kuhnert, N. (2013) Identification of Phenolic Compounds in Plum Fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Characterization of Varieties by Quantitative Phenolic Fingerprints. *J. Agric. Food Chem.* Vol 61, 12020-12031.

łońska-Ryś, E., J., Zalewska-Korona, M., Kalbarczyk, J. (2009) Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* Vol **17** (2), 115-120.

Janićijević, H. S., Kenić, J., Arsić- Komljenović, G. (2008) Antioksidantni potencijal biljke matočina (*Mellitis melisophyllum*). *Praxis. Medica.* **36**, 3-4. 083-087.

Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**(2), 214–222.

Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731-737.

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

Leja M., Mareczek A., Nanaszko B. (2007) Antioxidant properties of selected species of wild grown trees and bushes. *Rocz. AR Pozn.* **383**, **41**, 327-331.

Marakoğlu T., Arslan D., Özcan M., Haciseferoğullari H. (2005) Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur.)) fruits. *J. Food Eng.* **68**, 137-142.

Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. (2004) Identification and Quantification of Phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *J Agric Food Chem.* **52**, 6178-6187.

Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, Gonzalez-Paramas AM, Törrönen AR. (2004) Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem.* **52**, 4477-4486.

Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., Carvalho, A.M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Morales, R., Tardío J. (2013) Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 176-185.

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. (1998) XVII Nauk. Zjazd PTFarm., Krakov

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.

Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J.; Cole, R. (2009) The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **16**, 287-292.

Pelc, M., Szalacha, E., Przybył, J., Angielczyk, M., Kwiecińska, D., Węglarz, Z. (2010) Zróżnicowanie genetyczne i chemiczne dziko rosnących populacji śliwy tarniny (*Prunus spinosa* L.) występujących na terenie wschodniej Polski [Genetic and chemical diversity of wild grown population of blackthorn fruits]. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* **555**, 333-338 [na Poljskom].

Procházková, D., Boušova, I., Wilhelmova, N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterap.* **82**, 513-523.

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.

Radovanović, B., Milenković, A., S., Radovanović, A., B., Anđelković, M., Z. (2013) Antioxidant and Antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southwest Serbia. *Trop. J. Pharm.Res* **12** (5), 813-819.

Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnčić, M., V. Orlien, 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 in Food Science & Technology*.**42**, 134-149.

Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., Fernandes, F. A. N. (2008) Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 95–100.

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.

Rostagno, M.A., Palma, M, Barroso, C.G. (2003) Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr.* **1012**, 119-128.

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.

Schafner, W., Hafelfinger, B., Ernst, B. (1991) Ljekovito bilje kompendij (preveo Jurković, B.). Centar za informacije i publicitet, Zagreb.

Sikora, E., Bieniek, M., I., Borczak, B. (2013) Compozition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **12**(4), 365-372.

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

Serra, A., Maciàa, A., Romeroa, M., Piñolb, C., Motilvaa, M. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **879** (17), 1519–1528.

Shahidi F., Naczk M. (2004) Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL. 352-355.

Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S., (2015) Optimization of Ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Internat. Agrophysics* **29**, 231-237.

Spigno, G., De Faveri, D. M. (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210–217.

Tamas, M. (1985) Study of flavones *Prunus spinosa* L. flowers, *Farmacia.* **33** 181–186.

Tomas-Barberan FA, Clifford MN. (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr.* **80**, 1024-1032.

Turker, G., Kizilkaya, B., Cevik, N., Gonuz, A. (2012) Free radical scavenging activity and phenolic content of edible wild fruits from Kazdagi (Ida Mountains), Turkey . *J. Med. Plants Res. Vol.* **6(36)**, 4989-4994.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted. *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.* **9**, 161-169.

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), 1066-1074.

Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B. (2006) Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage, *Ultrason. Sonochem.* **13**, 150-156.

Veličković, J.M., Kostić, D.A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Randelović, S.S., Đorđević, A.S. (2013) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind.* **68** (3), 297-303.

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

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.

Zhang, H. F., Yang, X. H., Zhao, L. D., Wang, Y. (2009.) Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of Epimedium and extraction mechanism. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **10**, 54–60.

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

Wang, L., Weller C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends. Food. Sci. Tech.* **17**, 300-312.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.