

Fenolni profil i antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.) izoliranog primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Kruk, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:787480>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Valentina Kruk
966/USH

**FENOLNI PROFIL I
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET
EKSTRAKTA LISTA TRŠLJE
(*Pistacia lentiscus* L.) IZOLIRANOG
PRIMJENOM EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE
MIKROVALOVIMA**

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

Rad je izrađen u Laboratoriju za konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivone Elez Garofulić, te uz pomoć doc.dr.sc. Zorana Zorića i dr.sc. Sandre Pedisić.

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

FENOLNI PROFIL I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET EKSTRAKTA LISTA TRŠLJE

(*Pistacia lentiscus* L.) IZOLIRANOG PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE

MIKROVALOVIMA

Valentina Kruk, 966/USH

Sažetak: Cilj ovog istraživanja je postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima izolirati ukupne fenole iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). Parametri varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (50 °C –70 °C), snaga (200-500 W) i vrijeme (4-12 min). Vrijeme 12 minuta, temperatura 69 °C i snaga 512 W su optimalni parametri kojima se postiže najveća koncentracija ukupnih fenola u iznosu od 108,14 mg GAE/g. Slična koncentracija ukupnih fenola dobivena je klasičnom ekstrakcijom, ali uz produženo trajanje ekstrakcije od 30 min. Identifikacija i kvantifikacija ukupnih fenola provedena je primjenom ultra djelotvorne tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS) te je analizom identificirano ukupno 34 fenolna spoja. U najvećim koncentracijama su određeni derivati galne kiseline (606 mg/100g uzorka, digaloilkina kiselina), derivati miricetina (1782,4 mg/100g uzorka, miricetin ramnozid) i derivati kvercetina (130,9 mg/100g uzorka, kvercetina ramnozid). ORAC metodom određena je visoka antioksidacijska aktivnost ekstrakta lista tršlje (10768,2±0,07 μmol TE/L) što dokazuje visok potencijal te biljke za primjenom u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: list tršlje, ukupni fenolni spojevi, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), UPLC-MS/MS, ORAC metoda

Rad sadrži: 52 stranica, 10 slika, 10 tablica, 71 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Zoran Zorić i dr. sc. Sandra Pedisić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. doc.dr.sc. Zoran Zorić (član)
4. prof.dr.sc. Branka Levaj (zamjena)

Datum obrane: 24. rujna 2018.

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

PHENOLIC PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Pistacia lentiscus* L. LEAF EXTRACT ISOLATED WITH APPLICATION MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

Valentina Kruk, 966/USH

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of microwave assisted extraction on the yield of total phenols from *Pistacia lentiscus* L. leaf. Temperature (50 °C –70 °C), power (200-500 W and time (4-12 min) were varied. The highest concentration of total phenols 108,14 mg GAE/g was obtained after 12 minutes of extraction at temperature 69 °C and power 512 W. Similar concentration of total phenols was obtained with classic extraction but with prolonged time (30min). Identification and quantification of total phenols has been implemented with UPLC-MS/MS and 34 phenolic compounds were identified. Derivates of galic acid, mircetin and kvercetin were defined at the highest concentration. High antioxidant activity of the *Pistacia lentiscus* L. leaf extract (10768,2±0,07 µmol TE/L) was determined by the ORAC method proves its high potential for application in food industry.

Key words: *Pistacia lentiscus* L. leaf, total phenols, microwave-assisted extraction (MAE), UPLC-MS/MS, ORAC

Thesis contains: 52 pages, 10 figures, 10 tables, 71 references

Original in: Croatian Graduate

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

Mentor: PhD. Ivona Elez Garofulić, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD. Zoran Zorić, Assistant Professor and PhD. Sandra Pedisić

Reviewers:

1. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor (president)
2. PhD. Ivona Elez Garofulić, Assistant Professor (mentor)
3. PhD. Zoran Zorić, Assistant Professor
4. PhD. Branka Levaj, Full Professor (substitute)

Thesis defended: September 24th, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TRŠLJA	2
2.2. FENOLNI SPOJEVI U LISTU TRŠLJE.....	4
2.2.1. FENOLNE KISELINE.....	5
2.2.2. FLAVONOIDI	6
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE	9
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	10
2.5. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA	11
2.5.1. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima	13
2.6. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJAL	17
3.1.1. Priprema uzorka lista tršlje	17
3.1.2. Kemikalije i standardi	17
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)	20
3.2.2. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.) klasičnom ekstrakcijom.....	22
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	22
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (ORAC metoda).....	24
3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva primjenom primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju.....	25
3.2.6. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	31
4.2. Utjecaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije	34
4.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije	34
4.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije.....	35
4.2.3. Utjecaj snage mikrovalova	36

4.3. Identificirani i kvantificirani fenolni spojevi iz ekstrakta lista tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	39
4.4. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista tršlje	44
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). To je mediteranska biljka koja u Hrvatskoj raste diljem Dalmacije, na sunčanim i suhim mjestima stjenovitih područja. Listovi tršlje su ovalni, kožasti, sjajni, a plodovi se gusto nalaze na granama, mali su, crvene boje. Tršlja je još nedovoljno istraжена biljna vrsta, no dosadašnja istraživanja pokazuju kako svi dijelovi tršlje, list, plod, stabljika, sadrže bioaktivne spojeve koji mogu imati pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zahvaljujući antioksidacijskom i antimikrobnom djelovanju.

Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije o čemu ovisi priroda biljnog materijala i vrsta spoja koja se želi ekstrahirati. Prilikom odabira adekvatne metode za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva potrebno je razmotriti prednosti i nedostatke svake metode. Osim klasične konvencionalne ekstrakcije sve više su u primjeni nove tehnologije: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija hladnom plazmom. Prednosti novih tehnologija ogledaju se u samoj brzini ekstrakcije, prinosu ekstrakcije, manjem utrošku energije i ekološkoj prihvatljivosti budući da nema otpadnih produkata.

Cilj ovog istraživanja je postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima izolirati ukupne fenole iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). Parametri varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (50 °C –70 °C), snaga (200-500 W) i vrijeme (4-12 min). Konačni cilj je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pri kojima se dobiva najveći prinos ukupnih fenola, odrediti ORAC metodom antioksidacijsku aktivnost te primjenom ultra djelotvorne tekućinske kromatografije sa masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS) identificirati i kvantificirati spojeve prisutne u ekstraktu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRŠLJA

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). Raste u obliku grmova ili niskog drveća do 5 metara u visinu, jakog je, karakterističnog i aromatičnog mirisa (Dahmoune i sur., 2014).

Kora je u mladosti zelenkasto siva i glatka, kasnije postane tamnozeleno. Listovi su ovalni, kožasti, sjajni, goli, na licu su tamnozeleni, naličje im je svijetlozeleno, glavna peteljka im je spljoštena i žljebasta, karakterističnog mirisa. Plodovi se sitne, kuglaste koštunice, crvene boje, dozrijevaju u kasnu jesen kada postanu crni.

To je mediteranska biljka koja raste na širokom području od Izraela, preko Turske i Grčke do Španjolske (Tolić, 2003). U Hrvatskoj raste diljem Dalmacije, uključujući i otoke. Raste u sastavu makije na sunčanim, stjenovitim staništima mediteranskog područja, na plitkim i skeletnim tlima. Podnosi veliku žegu, sušu, zasjenu, posolicu i zaslanjena tla (Kovačić i sur., 2008).

Na području Republike Hrvatske za tršlju (Slika 1.) koriste se narodna imena poput: mrča, crnomrta, smarča, lanjstik, entišk, lentiska, mastika.



Slika 1. Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) (Anonymous 1)

Zarezivanjem kore tršlje dobiva se mirisav smolasti sok (mastiks) koji se upotrebljavao u medicini, industriji i proizvodnji pića već kod Rimljana, starih Grka i Egipćana. Riječ „mastiks“ dolazi od grčkog ili feničkog glagola *mastichein* ili *massein*, a znači „rabiti desni“, odnosno žvakati (Kovačić i sur., 2008).

Svi dijelovi biljke koristili su se u tradicionalnoj medicini za liječenje bolesti kao što su ekcemi, dijareja, infekcije grla, žutica, astma, itd (Longo i sur., 2007; Zitouni i sur., 2016). Listovi biljke imaju antiupalne, antibakterijske, antimikrobne, antidijaretičke učinke (Cherbal i sur., 2012). Nadalje, bobice su bogate antocijaninima što im daje antioksidacijski kapacitet, a smola (mastiksa) iz biljke ima protuupalna djelovanja (Rodríguez-Pérez i sur., 2013).

Zbog potvrđenih i dokazanih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje vodeni ekstrakt lišća popularno je piće u zemljama sjeverne Afrike (Trabelsi i sur., 2015). Osim što dobro utječe na zdravlje, tršlja se može koristiti u prehrambenoj industriji za poboljšanje arome alkoholnih pića i žvakaćih guma (Mehenni i sur., 2016).

Također, tršlja je bogat izvor eteričnih ulja, masnih kiselina poput oleinske, palmitinske i linoleinske kiseline i polifenola (Lo Presti, 2008).

2.2. FENOLNI SPOJEVI U LISTU TRŠLJE

Fenolni spojevi čine veliku skupinu sekundarnih biljnih metabolita prisutnih u svim biljnim tkivima (Ignat i sur., 2011). Identificirano je više od 8000 različitih fenolnih spojeva (Trabelsi i sur., 2015) koji imaju brojne funkcije u biljnom tkivu kao što je zaštita od UV zračenja, zaštita od pigmentacije biljaka i zaštita od različitih patogena (Holtung, 2014). Epidemiološka istraživanja pokazala su kako su fenolni spojevi važni u prehrani ljudi jer imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, te antioksidacijsko, antibakterijsko i antifungalno djelovanje (Schieber i sur., 2001).

U literaturi postoje različite klasifikacije fenolnih spojeva, no najjednostavnija podjela je na neflavonoide (fenolne kiseline) i flavonoide.

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) bogata je sekundarnim biljnim metabolitima, posebice polifenolima, flavonoidima i fenolnim kiselinama koji pokazuju antioksidacijska i antimikrobna djelovanja. Udio fenolnih spojeva razlikuje se u ovisnosti o dijelu biljke (list, korijen, stabljika, cvijet, plod) i agroekološkim uvjetima u kojima biljka uspijeva (Bampouli i sur., 2014). U Tablici 1. prikazane su koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i kondenziranih tanina u listovima, stabljici, plodu i korijenu tršlje.

Tablica 1. Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i kondenziranih tanina u različitim tkivima tršlje (Zitouni i sur., 2016)

DIJELOVI BILJKE	UKUPNI FENOLI (mg GAE/g)	FLAVONOIDI (mg CE/g)	KONDENZIRANI TANINI (mg CE/g)
LIST	216.289 ± 20.62	19.162 ± 0.436	121.515 ± 9.171
STABLJICA	121.399 ± 3.354	16.788 ± 0.733	80.215 ± 3.113
PLOD	103.342 ± 2.317	4.696 ± 0.329	7.893 ± 0.481
KORIJEN	30.188 ± 1.291	4.287 ± 0.106	7.166 ± 0.818

U literaturi je dostupan velik broj istraživanja koji potvrđuju da je najviše ukupnih fenola prisutno upravo u listu tršlje (Zitouni i sur., 2016).

Mehenni i sur., (2016) u svom istraživanju dobili su slične rezultate kao i Zitouni i sur., (2016). Oni su uspoređivali ekstrakt sirovog lista i ekstrakt ploda tršlje i dobili su više koncentracije ukupnih fenola u listu biljke (517.512 ± 5.53 mg GAE/g) u odnosu na rad Zitouni i sur., (2016).

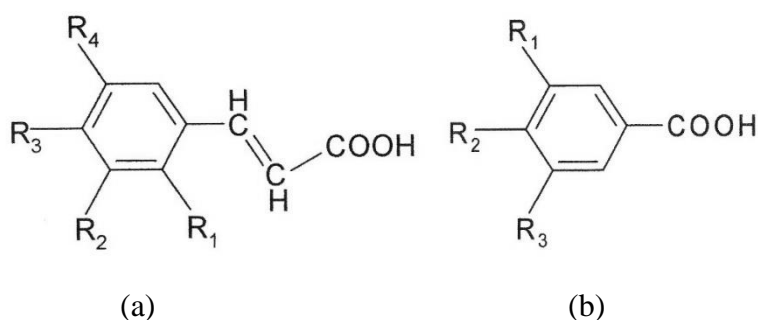
Nadalje, Gardeli i sur., (2008) u svojoj analizi ukupnih fenola u listu tršlje dobivaju slične rezultate kao prethodni znanstvenici (588 mg GAE/g).

2.2.1. FENOLNE KISELINE

Hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline pripadaju grupi fenolnih kiselina i u biljnom tkivu najčešće su prisutne u obliku derivata (Slika 2.).

Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina je C6-C3. Najvažnije hidroksicimetne kiseline su: kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna), ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna), *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna) i sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna) kiselina. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, već najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri. Najpoznatiji ester je 5'-kafeoilkina kiselina ili poznatija pod trivijalnim imenom klorogenska kiselina (Bravo, 1998).

Hidroksibenzojeve kiseline, osnovne strukture C6-C1 nastaju izravno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne kao slobodne kiseline. U ovu skupinu spadaju: galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska, elaginska i salicilna kiselina.



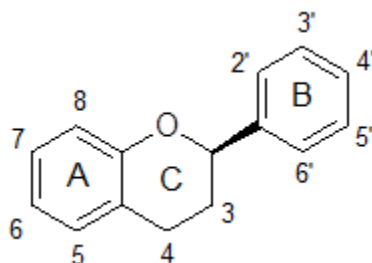
Slika 2. Strukturne formule hidroksicimetnih (a) i hidroksibenzojevih kiselina (b)
(Ignat, i sur., 2011)

Najzastupljenija fenolna kiselina u listu tršlje je galna kiselina i njeni derivati s kojima čini 70 % ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u listu tršlje (Romani i sur., 2002). Mehenni i sur., (2016) uz pomoć HPLC analize identificirali su fenolne spojeve u listu tršlje među kojima su bile fenolne kiseline: galna kiselina ($161,67 \pm 35,27$ mg/g), siringinska kiselina ($52,66 \pm 7,23$ mg/g) i elaginska kiselina ($9,54 \pm 0,63$ mg/g). Nadalje Remila i sur., (2015) uz pomoć UPLC-MS

identificiraju galnu kiselinu i njene derivate: glukogalin, galoilkina kiselina, digaloilkina kiselina, trigaloilkina kiselina. Iste rezultate dobivaju u istraživanju Romani i sur., (2002) samo uz pomoć HPLC analize. U njihovim rezultatima najveće koncentracije su imali 3,5-*O*-digaloilkina kiselina ($26,8 \pm 4,67$ mg/g) i 3,4,5-*O*-trigaloilkina kiselina ($10,3 \pm 2,45$ mg/g). Od hidroksicimernih kiselina u bobici tršlje su identificirane klorogenska kiselina i *p*-kumarinska 4-*O*-glukozid (Trabelsi i sur., 2015).

2.2.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su velika skupina fenolnih spojeva male molekulske mase s osnovnom strukturom koja se sastoji od dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koja sadrži kisik, (Slika 3.) (Ignat i sur., 2011). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, pa mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozidirani sa šećerima i esterificirani organskim kiselinama te ih je do danas identificirano više od 6400 (Teixeira, i sur., 2014). Flavonoidi se dijele na: flavonole, flavanole, flavone, flavanone, izoflavone.



Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Ignat i sur., 2011)

Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu lista tršlje dobivenom uz pomoć mikrovalova iznosi $68,34 \pm 0,1$ mg QE/g suhog ekstrakta (Bampouli i sur., 2014) dok su Mehenni i sur., (2016) u etanolnom ekstraktu dobivenom klasičnom ekstrakcijom odredili koncentraciju flavonoida $108,67 \pm 0,5$ mg QE/g.

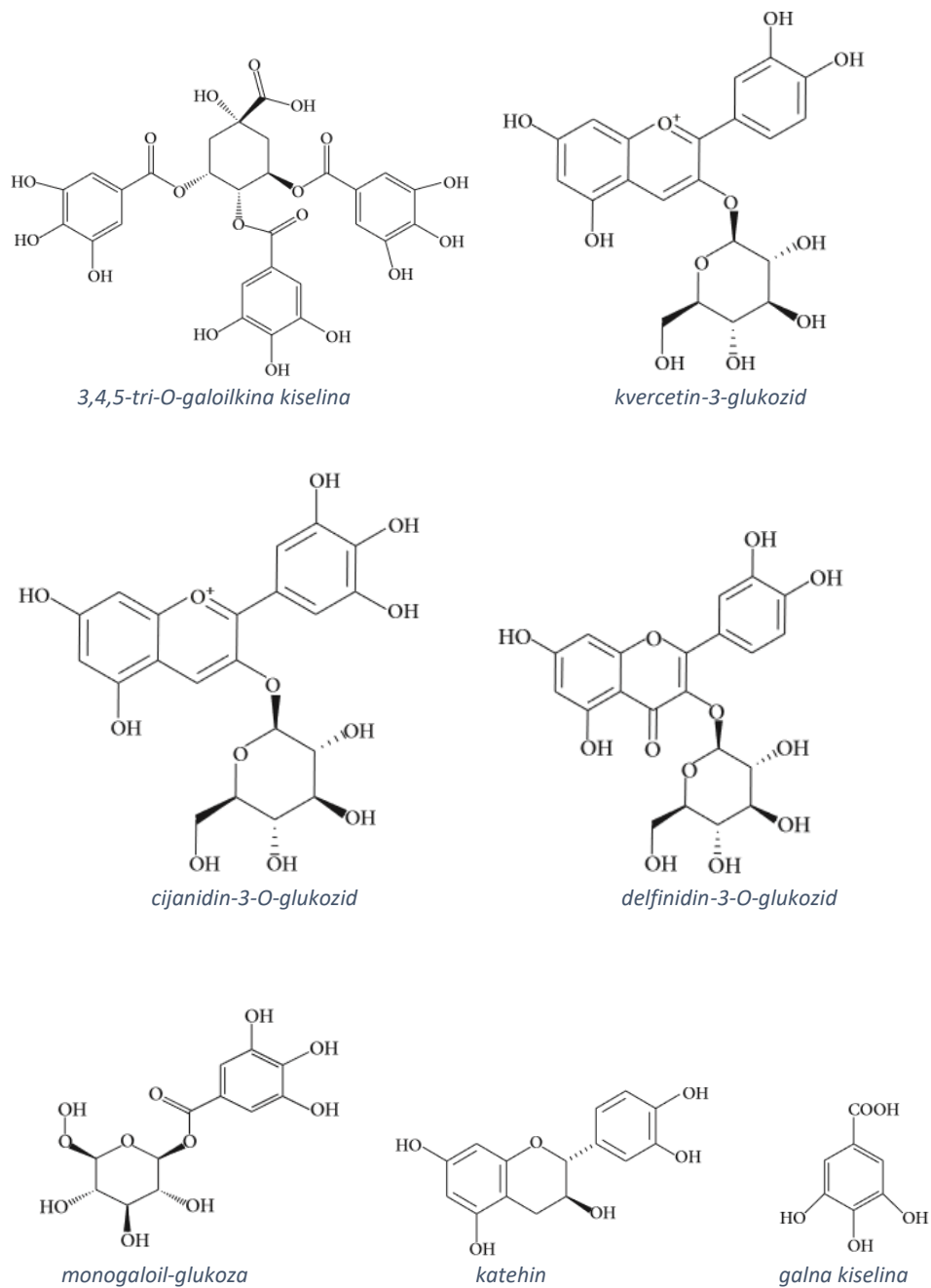
Flavanoli sadrže hidroksilnu skupinu na C3 poziciji te nemaju karbonilnu skupinu na C4 poziciji za razliku od flavonola. Glavni predstavnici su: katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin (Bravo, 1998). Polimeri monomernih flavanola nazivaju se proantocijanidini ili kondenzirani tanini kojih ima identificiranih u listu tršlje. U tršlji su prisutni katehini u koncentraciji $31,79 \pm 5,76$ mg/g (Mehenni i sur., 2016).

Rezultati istraživanja Mehenni i sur., (2016) pokazuju da je tršlja bogatija taninima ($409,87 \pm 6,9$ mg CE/g) u odnosu na flavonoide ($108,67 \pm 0,5$ mg CE/g). Također, Zitouni i sur., (2016) dobivaju veće koncentracije tanina ($121,515 \pm 9,171$ mg CE/g) u listu tršlje u odnosu na flavonoide ($19,162 \pm 0,436$ mg CE/g).

Flavonoli su žuto obojeni pigmenti kojih je do danas u biljkama identificirano oko 200 spojeva, a najčešći su kvercetin, kamferol, miricetin. Flavonoli sadrže dvostruku vezu između C2 i C3 atoma i hidroksilnu skupinu na C3 atomu. Različiti šećeri mogu biti vezani na flavonole i tako mogu tvoriti glukozide, glukuronide, galaktozide i diglikozide (Kazazić, 2004). Identificirani flavonoli u listu tršlje su: miricetin-3,*O*-rutinozid, miricetin-glukozid, miricetin - 3,*O*-ramnozid, kvercetin-rutinozid, kvercetin-glukozid, kvercetin-ramnozid (Remila i sur., 2015; Mehenni i sur., 2016).

Flavoni sadrže dvostruku vezu između C2 i C3 ugljikovog atoma, a od flavonola se razlikuju po tome što nemaju hidroksilnu skupinu na C3 ugljikovom atomu. U tršlji od flavona su identificirane male količine luteolina i apigenina (Mehenni i sur., 2016; Holmann i sur., 2000).

Antocijani se sastoje od aglikona antocijanidina, aromatskog prstena (A) vezanog na heterociklički prsten (C) koji sadrži kisik koji je također vezan C-C vezom tvoreći aromatski prsten (B). To su pigmenti topljivi u vodi, a nositelji su plave, crvene i ljubičaste boje različitih biljaka (Ignat i sur., 2011). U listu i bobici tršlje identificirani su delfinidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-glukozid (Romani i sur., 2002; Belhachat i sur., 2017).



Slika 4. Kemijska struktura najvažnijih fenolnih spojeva u listu tršlje (Bozorgi i sur., 2013)

2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kada se nalaze u suvišku tj. kada je njihova koncentracija veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom reaktivnom slobodnom radikalumu. Vršu ulogu neutralizacije slobodnih radikala i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti (Kazazić, 2004).

Fenolni spojevi su grupa sekundarnih aromatskih metabolita biljke, za koje se zna da posjeduju višestruke biološko djelovanje kao što su antioksidativna aktivnost i antimikrobna aktivnost (Ramarathnam i sur., 1995). Epidemiološka istraživanja pokazala su kako konzumacija voća i povrća ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje poput smanjenja rizika oboljenja od srčanih bolesti i srčanog udara, te smanjenje rizika oboljenja od raka. Ti pozitivni učinci na zdravlje se prije svega pripisuju fenolnim spojevima koji se ističu po antioksidacijskom, antibakterijskom i antifungalnom djelovanju (Schieber i sur., 2001).

Zbog kompleksnih oksidacijskih procesa, potrebno je više metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste se direktne metode (ORAC metoda, određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β – karotenom) i indirektne metode (DPPH, ABTS+, FRAP).

ORAC (eng. *oxygen radical absorbance capacity* - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) je standardizirana metoda, koju su razvili znanstvenici Ghiselli i Glazer, koja se koristi za dobivanje antioksidacijskih vrijednosti različitih proizvoda (Prior i sur., 2005). Tipična reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksilnih radikala, fluorescentnu probu, te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Uslijed reakcije slobodnih radikala i fluorescentne probe (boja), boja se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje kao pad intenziteta fluorescencije. Ukoliko se u reakcijsku smjesu dodaju antioksidansi, dolazi do usporavanja ove reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. ORAC je jedina metoda koja kombinira stupanj i trajanje inhibicije u jednu vrijednost, te daje informacije o zaštitnom učinku antioksidansa u dužem vremenskom periodu (Prior, 2005).

Kao antioksidansi u listu tršlje značajni su fenolni spojevi i to iz skupina: fenolnih kiselina (hidroksibenzojeve i hidroksicimete kislina) i flavonoida (flavanoli, flavon glikozidi i

flavoni). Rezultati istraživanja mnogih autora (Gardeli sur., 2008; Cherbal i sur., 2012; Bampouli i sur., 2014) potvrđuju značajne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta lista tršlje te samim time i značajnu koncentraciju antioksidansa. U istraživanju Remila i sur., (2015) provedenom na svježim ekstraktima lista tršlje rezultati pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet čije vrijednosti iznose $5865 \pm 406 \mu\text{mol TE}/100 \text{ gE}$ mjerene ORAC metodom. U istraživanju Zitouni i sur., (2016) potvrdili su visok antioksidacijski kapacitet u metanolnim i butanolnim ekstraktima u listu tršlje, izmjeren DPPH metodom.

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, a u preradi hrane definira se kao prijenos jedne ili više bioloških tvari iz materijala u tekuću fazu (Lloyd i van Wyk, 2012). Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju.

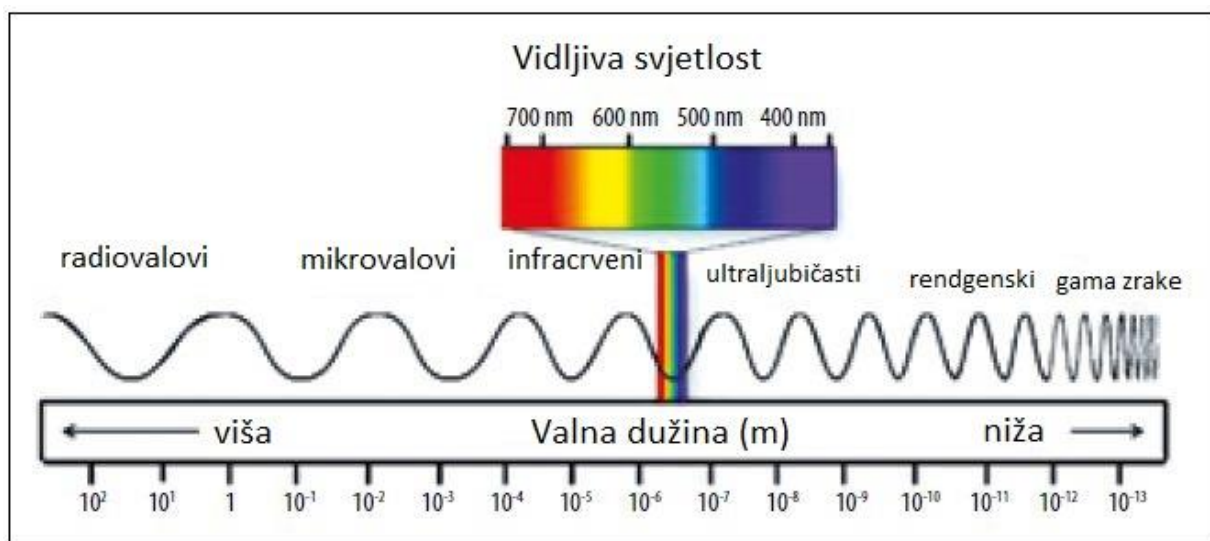
Ekstrakcija predstavlja glavni korak u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Lapornik i sur., 2005). Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije o čemu ovisi priroda biljnog materijala i vrsta spoja koja se želi ekstrahirati. Također prilikom odabira adekvatne metode potrebno je uzeti u obzir dostupnost tehnike ekstrakcije, čistoću ekstrakta, prinos ekstrakcije i potrošnju energije (Rostagno i Prado, 2013).

Danas, konvencionalne metode više nisu dovoljno selektivne jer dovode do ekstrakcije i nefenolnih spojeva, kao što su šećeri, organske kiseline i proteini (Castaneda-Ovando i sur., 2009) ili dolazi do gubitka bioaktivnih spojeva uslijed hidrolize, oksidacije ili povišene temperature ili pak dolazi do onečišćenja okoliša zbog korištenja velike količine organskih spojeva (Drosou i sur., 2015).

Cilj same ekstrakcije jest izolacija maksimalne količine željene tvari, a da pritom izolirana tvar bude sa što manjim udjelom nečistoća i uz očuvanje visokog antioksidacijskog kapaciteta (Spigno i sur., 2007), stoga se konvencionalne metode sve više zamjenjuju novijim metodama ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HPAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija hladnom plazmom (HVED) te ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SCO₂) (Bursać Kovačević i sur., 2016). Glavne prednosti novih metoda su brzina, selektivnost, ekološka prihvatljivost, veći prinos, manja količina otapala i kontrola temperature prilikom ekstrakcije (Bhattacharya, 2015).

2.5. EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA MIKROVALOVIMA

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi smješteni između radiofrekventnih valova i infracrvenog zračenja u elektromagnetskom spektru (Slika 5.) (Zrinski i Ecker-Maksić, 2005) i ubrajaju se u neionizirajuće zračenje jer njihova energija nije dovoljna za ionizaciju atoma (Pedroza i sur., 2015). Mikrovalovi imaju frekvenciju u rasponu od 300 MHz i 30 GHz i valne duljine od 1 mm do 1 m. (Li i sur., 2012).



Slika 5. Valna duljina mikrovalova (Anonymous 2)

Elektromagnetsko zračenje je gibanje energije koje nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Elektromagnetski valovi su titraji međusobno povezanog električnog i magnetskog polja, koji se šire prostorom. Protok struje kroz žicu rezultira stvaranjem dvaju polja (električnog i magnetskog) koja okružuju vodič. Promjenom smjera gibanja struje uzrokuje pulsiranje oba polja i stvarane elektromagnetskih valova koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala.

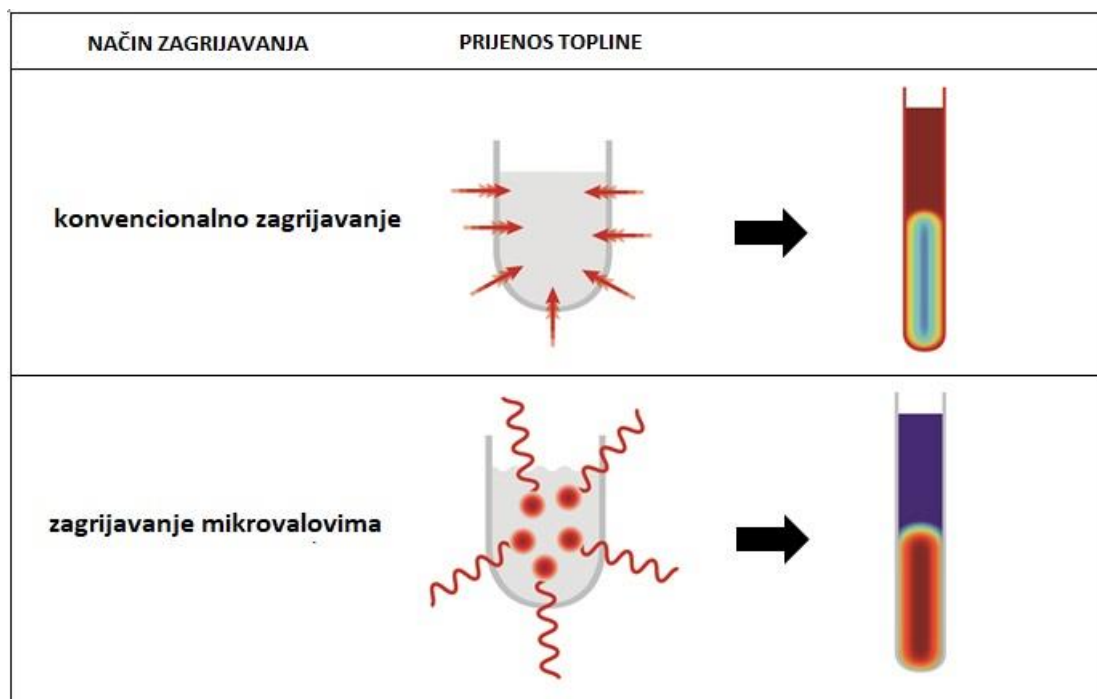
Transformacija elektromagnetske energije u toplinsku se odvija kroz dva simultana mehanizma: ionsku kondukciju i rotaciju dipola u otapalu (Favretto, 2004). Prilikom rotacije dipola dolazi do reorijentacije dipolnih molekula s brzo promjenjivim električnim poljem što dovodi do njihove vibracije i oslobađanja topline uslijed trenja. Nadalje, zbog ionske vodljivosti dolazi do kretanja iona pod utjecajem izmjeničnog električnog polja pri čemu okolna otopina pruža otpor kretanju što također rezultira trenjem i zagrijavanjem otopine (Veggi i sur., 2013). Zagrijavanjem otapala za ekstrakciju i prirodno prisutne vode u stanicama materijala dolazi do

povećanja pritiska na staničnu stijenkicu stanica i njenog puknuća što dovodi do prodiranja otapala unutar stanice i difuzije sekundarnih metabolita u otapalo i time se postiže ekstrakcija sekundarnih biljnih metabolita (Dick i sur., 1996).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) ekološki je prihvatljiva tehnika koja koristi energiju mikrovalova kako bi se olakšao prijenos spojeva iz matrice uzorka u otapalo (Spigno i De Faveri, 2009). Danas se sve više koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala zbog redukcije vremena ekstrakcije, smanjenja volumena otapala, većeg prinosa ekstrakcije i veće selektivnosti (Acierno i sur., 2004).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) smatra se alternativom konvencionalnoj ekstrakciji metabolita iz biljaka. U brojnim istraživanjima je dokazano da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pogodnija za ekstrakciju biljnih metabolita od tradicionalnih tehnika kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija ili ekstrakcija uz refluks (Mandal i sur., 2007).

Prijenos mase i topline kod ekstrakcije mikrovalovima se razlikuje u odnosu na konvencionalnu tehniku. Prijenos mase isti je kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i konvencionalne tehnike, a odvija se iz čvrste faze u tekuću fazu prodiranjem otapala u biljni materijal i difuzijom u tekuću fazu ekstrakta. Nadalje, prijenos topline kod konvencionalne tehnike se odvija iz tekuće u čvrstu fazu, a kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prijenos topline se vrši iz čvrste u tekuću fazu zagrijavanjem polarnih molekula u biljnom materijalu (Périno-Issartier i sur., 2011) (Slika 6).



Slika 6. Zagrijavanje materijala kod konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Anonymous 3)

2.5.1. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima značajno utječu: vrsta otapala, temperatura, snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije te veličina čestica. Prije samog postupka ekstrakcije potpomognute mikrovalovima vrlo je bitno imati u vidu karakteristike uzorka i način pripreme istoga. Naime, o karakteristikama i osobinama spojeva koji se izoliraju ovisi kako će se postaviti parametri, a sve u cilju što veće učinkovitosti procesa.

Odabir otapala u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima je izuzetno važan parametar. Poželjno je da otapalo ima visoku dielektričnu konstantu tj. mogućnost dobre apsorpcije energije mikrovalovima i visok faktor disipacije energije što predstavlja sposobnost otapala da apsorbiranu energiju mikrovalova preda okolnom mediju kao toplinu (Mandal i sur., 2007). Apsorpcija je često direktno povezana sa polarnošću otapala pa su otapala poput etanola, metanola i vode dobar izbor kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Spigno i De Faveri, 2009; Li i sur., 2012). Wang i Helliwell., (2001) u svom radu dobivaju veće prinose flavonoida iz čaja koristeći vodenu otopinu acetona i metanola. Nadalje, Song i sur., (2011) pokazali su da 60-80 % vodena otopina etanola optimalna u ekstrakciji ukupnih fenola iz listova slatkog

krumpira. Družynska i sur., (2007) dokazuju suprotno, vodena otopina metanola u njihovom istraživanju daje veće koncentracije ukupnih fenola u odnosu na vodu i vodenu otopinu acetona i etanola. Također i druga otapala se pokazuju kao prikladna za ekstrakciju, ulje rižinih mekinja ekstrahirano je uz pomoć mikrovalne ekstrakcije s izopropanolom i heksanom koristeći omjer otapala i uzorka 3:1 (w/w). Rezultati su pokazali da je izopropanol najbolje otapalo za ekstrakciju γ -tokoferola i γ -tokotrienola u usporedbi s heksanom. Omjer količine otapala i materijala je također jedan od bitnih faktora. Upotreba velike količine otapala dovodi do slabijeg zagrijavanja materijala što dovodi do većih troškova jer je potrebno povećati snagu mikrovalova. Idealan volumen otapala je onaj volumen koji prekrije uzorak koji se ekstrahira (Mandal i sur., 2007).

Temperatura je jedan od važnih faktora za učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Povećanjem temperature dolazi do ubrzanja difuzije otapala u unutrašnjost uzorka što rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. No, ukoliko se ekstrahiraju termolabilne komponente tada visoke temperature mogu dovesti do degradacije bioaktivnih spojeva (Li i sur., 2010). Lafka i sur., (2007) u svom istraživanju zaključuju kako povišenje temperature ekstrakcije iznad 60 °C smanjuje koncentraciju ukupnih fenola iz kome grožda. Slične rezultate su dobili Zhang i sur., (2011) gdje je utvrđena optimalna temperatura od 60 °C za izolaciju klorogenske kiseline iz cvjetnih pupova *Lonicera japonica*.

Sljedeći parametar koji utječe na proces je *vrijeme* trajanja ekstrakcije. Kao i kod temperature, što je dulje vrijeme ekstrakcije to je veći ekstrakcijski prinos, ali predugo izlaganje može dovesti do gubitka termolabilnih komponenata. Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima vrijeme je najčešće između nekoliko minuta do maksimalno pola sata (Ballard i sur., 2010).

Previsoka temperatura i predugo trajanje ekstrakcije dovode do gubitka otapala i povećavaju mogućnost oksidacije bioaktivnih spojeva.

Snaga je još jedan od ključnih parametara koji mora biti dobro podešen da bi se minimiziralo vrijeme potrebno za postizanje odgovarajuće temperature, ali i da bi se izbjeglo pregrijavanje sustava (posebice kod zatvorenih sustava zbog prevelikog tlaka) (Font i sur., 1998). Uobičajeno se koristi niska snaga uz dulje vrijeme ekstrakcije, te visoka snaga mikrovalova uz kratko trajanje ekstrakcije. Dahmoune i sur., (2014) u svom radu izolirali su ukupne fenole iz tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i prinos ukupnih fenola se povećavao povećanjem snage mikrovalova 300-500 W, a daljnjim povećanjem je ostao konstantan ili neznatno smanjen.

Mandal i sur., (2007) u svom radu navode kako prevelika snaga dovodi do ubrzane izolacije željenih spojeva, ali povećanjem snage može doći do povećanja količine nečistoća u ekstraktu.

Na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima utječe i veličina čestica koja bi trebala biti od 100 μm do 2 mm. Presitne čestice nisu poželjne jer mogu izazvati tehničke probleme i potrebu za kasnijim pročišćavanjem ekstrakta.

Iz svega navedenog, zaključuje se da na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima značajno utječu različiti parametri te je na početku ekstrakcije izuzetno bitno poznavati karakteristike uzorka i adekvatno napraviti pripremu istoga. Također, o osobinama spojeva koji se izoliraju ovisi kako će se postaviti parametri, a sve u cilju što veće učinkovitosti procesa i većoj izolaciji spojeva koji se ekstrahiraju.

2.6. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Pojam optimizacije koji se često koristi u analitičkoj kemiji definira se kao sredstvo za poboljšanje parametara nekog procesa gdje je cilj postizanje maksimalnog prinosa (odziva) uz što manje troškove (Bezzerra, 2008). Budući da tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne nije moguće dobiti stvarnu sliku utjecaja tih parametara na proces. Takav pristup optimizaciji zahtjeva veliki utrošak vremena i veliki broj eksperimenata, a ne uzima u obzir interakciju promatranih parametara procesa.

Općenito, optimizacija procesa provodi se empirijskim i statističkim metodama. Empirijska metoda optimizacije zahtjeva veliki broj eksperimenata i utrošenog vremena i zanemaruje interakcije među parametrima procesa, dok s druge strane multivarijantne statističke tehnike uzimaju u obzir interakciju ispitivanih parametara procesa i u novije vrijeme sve više se koriste u optimizaciji procesa (Liyana-Pathirana, 2005).

Najčešće korištena statistička tehnika za planiranje eksperimenata je metoda odzivnih površina (RSM, eng. *Response Surface Metodology*) koja se definira kao skup matematičkih i statističkih tehnika koje se koriste pri modeliranju i analizi procesa. Metoda odzivnih površina prvi put su predstavili Box i Wilson u 20.st. Osnovna ideja metode je dobiti odnos nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu (odziv) preko odzivne funkcije te zaključiti na koji način ulazni (procesni) parametri utječu na promatrani odziv. Cilj metode je razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa (Bezzerra i sur., 2008).

Prije primjene metode odzivnih površina (RSM) potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta (plan pokusa) kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti.

Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti (odzivna ploha). Funkcija koja opisuje odzivnu plohu naziva se odzivna funkcija, a predstavlja ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama te interakcijama među njima. Svako odzivnoj funkciji pridružuje se odgovarajući polinom te je moguće proračunati koeficijente jednadžbe (Bezerra i sur., 2008).

Odabir dizajna eksperimenata ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Dizajn eksperimenata za modele prvog reda (npr. faktorijalni dizajn) koristi se samo u slučajevima kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulje odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije. Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine, tj. dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: trofaktorijalni pokus na tri razine, centralni kompozitni dizajn, Box-Bhenken dizajn, itd. Takvi modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te njihovu interakciju, ali i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Navedeni planovi pokusa međusobno se razlikuju po broju potrebnih pokusa, odabiru eksperimentalnih točaka i razini ispitivanih varijabli (Bezerra i sur., 2008).

Nakon određivanja koeficijenata odzivne funkcije primjenom metode najmanjih kvadrata mogu se primjenom analize varijance (ANOVA) izdvojiti oni faktori ili njihove interakcije koje značajno utječu na promatrani proces.

Danas je sve veći broj znanstvenih istraživanja koji koriste RSM za optimizaciju procesa u inženjerstvu, biokemiji, poljoprivredi, ekološkom inženjerstvu i drugdje. Također, RSM se uspješno koristi za optimiranje biotehničkih procesa povezanih s hranom, primjerice ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnih materijala (Xiao i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Priprema uzorka lista tršlje

U ovom istraživanju korišten je osušen i samljeven uzorak lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). List tršlje je sakupljen je na području otoka Korčule (Vela Luka, koordinate: 42,961182/16,721574) u listopadu 2017. godine. Uzorci su prenošeni u vinskim vrećama i isti dan kada su se brali su stavljani u prostoriju sobne temperature, te ostavljeni 5 dana na sušenju. Nakon 5 dana sušenja, uzorci su se samljeli i stavili u plastične spremnike u hladnjak na temperaturu 4-5 °C do provođenja analize.

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, to %-tni (v/v)

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se 729 mL 96 %-tnog etanola i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid, Na₂CO₃ (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

- Standard galne kiseline

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

- Destilirana voda

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Tehnička vaga Mettler (točnost ±0,01g)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β, Velika Britanija)
- Clariostar (BMG Labtech, Njemačka)
- MARS 2.0 software (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent 1260 sistem (UPLC) opremljen sa:
 - 1260 kvarternom pumpom
 - 1260 autosamplerom
 - 1260 termostatirane kolone
 - Agilent 6490 trostrukim kvadropol MS/MS detektora
 - software MassHunter Workstation for QQQ
- Statistički program Statistica 11.0, (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD)

Pribor:

- Odmjerne tikvice (50 mL)
- Menzure (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Erlenmeyerova tikvica (1000 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipeta (5 mL) i propipeta
- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 μL, 1000 μL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni štapić

- Filter papir
- Magnetski mješači
- Plastična lađica za vaganje
- Tikvice s okruglim dnom
- Povratno vodeno hladilo
- Plamenik
- Klor-kalcijeva cijev

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija ukupnih fenola iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) provedena je uz pomoć mikrovalova (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis, Slika 7.) prema centralnom kompozitnom dizajnu pokusa prikazanom u Tablici 2. Kao otapalo pri ekstrakciji korišten je 70 %-tni etanol. Parametri koji su varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (50 °C –70 °C), snaga (200-500 W) i vrijeme (4-12 min).

Tablica 2. Plan pokusa ekstrakcije ukupnih fenola primjenom mikrovalova

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)
1	50	200	4
2	50	200	12
3	50	500	4
4	50	500	12
5	70	200	4
6	70	200	12
7	70	500	4
8	70	500	12
9	43	350	8
10	77	350	8
11	60	98	8
12	60	602	8
13	60	350	1
14	60	350	15
15 (C)	60	350	8
16 (C)	60	350	8

Postupak ekstrakcije:

Odvaže se 1 g samljevenog uzorka s točnošću $\pm 0,001$ g i homogenizira se s 40 mL 70 %-tnog etanola u tikvici sa šlifom okruglog dna volumena 50 mL. Tikvica s uzorkom u koji se ubaci magnetski mješač postavlja se na predviđen prostor na postolju u mikrovalnom ekstraktoru (Slika 7.). Na tikvicu se spoji hladilo s klor-kalcijevom cijevi. Na mikrovalnom reaktoru postavljaju se opće parametri ekstrakcije: miješanje 50 %, vrijeme za postizanje temperature 2 min, ventilacija 1 min, te zadani parametri po planu pokusa prikazani u Tablici 2.

Nakon provedene ekstrakcije mikrovalovima uzorci se kvantitativno (pomoću staklenog lijevka i filter papira) prenesu u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i do oznake nadopune 70 %-tnim etanolom. Potom se uzorci preliju u čiste plastične epruvete (Falcon) od 50 mL i dobro zatvore. Ekstrakti se čuvaju na temperaturi -18 °C do trenutka određivanja ukupnih fenola.



Slika 7. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis) (vlastita fotografija)

3.2.2. Izolacija ukupnih fenola iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) klasičnom ekstrakcijom

Postupak ekstrakcije:

Odvaže se 1 g samljevenog uzorka s točnošću $\pm 0,0001$ g i homogenizira se s 40 mL 70 %-tnog etanola u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Ekstrakcija se provodi pomoću refluxa 30 min (vrijeme se mjeri od trenutka kad ekstrakt provrije). Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakt se filtrira preko filter papira i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL te nadopuni odgovarajućim otapalom (70%- tni etanol) do oznake. Etanolni ekstrakt se zatim prelije u plastičnu epruvetu (Falcon) od 50 mL i čuva na +4°C do trenutka provođenja analize ukupnih fenola.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

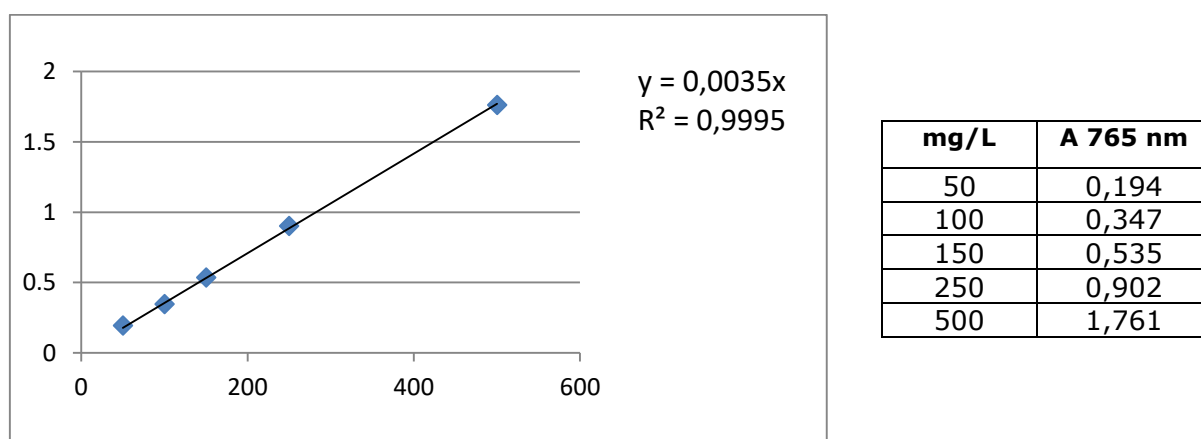
Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Za određivanje se koristi Folin-Ciocalteu reagens koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Princip metode se temelji na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom nastaje plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μ L ekstrakta (koji je 10x razrijeđen sa 70 %-tnim etanolom), 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 70 %-tni etanol. Uzorci se promiješaju (pomoću Vortexa), a zatim termostatiraju u kupelji od rotavapora 25 minuta pri temperaturi 50 °C. Nakon termostatiranja na spektrofotometru mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici volumena 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μ L F.C. reagensa i 2 mL. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali umjesto otopine standarda uzima se 100 μ L destilirane vode. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 8.).



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca glasi:

$$Y=0,0035X \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (ORAC metoda)

Princip određivanja:

ORAC (eng. *oxygen radical absorbance capacity* - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) je standardizirana metoda za dobivanje antioksidacijskih vrijednosti prehrambenih proizvoda. ORAC metoda se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta antioksidansa topljivih u vodi (H-ORAC) i u mastima (L-ORAC), a koja se temelji na gašenju radikala transferom vodika. Tipična reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksilnih radikala, fluorescentnu probu, te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Uslijed reakcije slobodnih radikala i fluorescentne probe (boja), boja se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje kao pad intenziteta fluorescencije. Ukoliko su u reakcijskoj smjesi prisutni antioksidansi, dolazi do usporavanja ove reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. Razlika u padu intenziteta fluorescencije između uzorka s antioksidansom i uzorka bez antioksidansa (slijepa proba) se uzima kao mjera antioksidacijskog djelovanja.

Postupak određivanja:

Antioksidacijski kapacitet ekstrakta određen je ORAC metodom prema radu Prior i sur. (2005) uz male modifikacije. U 75 mM fosfatnom puferu (pH 7,0) pripremljene su otopine fluoresceina (70.3 nM), otopine Trolox standarda 6 različitih koncentracija pripremljenih razrjeđenja (3,12 – 103,99 μ M), izvor radikala 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (240 mM) te odgovarajuća razrjeđenja uzorka.

U svakoj jažici na ploči s 96 jažica otpipetira se:

150 μ l otopine fluoresceina od 70.3 nM (sve jažice)

+ 25 μ L Trolox® razrjeđivanje (standardi)

+25 μ L razrjeđivanje uzorka (uzorci)

+ 25 μ L fosfatnog pufera 75 mM, pH=7 (slijepa proba)

Inkubira se pločica s jažicama u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μ L svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta.

Mjerenje se provelo spektrofotometrijski pri temperaturi od 37 °C uz λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) služi kao standard i zbog toga se ORAC vrijednosti izražavaju kao mikromol trolox ekvivalenta po litri ($\mu\text{mol TE/L}$).

ORAC analiza je provedena na uređaju Clariostar, a analiza podataka sa MARS 2.0 software (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka). MARS softver za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu, te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom.

3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva primjenom 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 fenolni spojevi eluiraju u nizu padajuće polarosti.

UPLC uz MS/MS je provedena prema metodi koju su prethodno opisali Serra i sur., (2011), ali uz određene modifikacije prikazane u Tablici 3. i Tablici 4.

U ovoj analizi korištene su mobilne faze: A (0,1 % mravlja kiselina u H₂O) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu)

Postupak određivanja:

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na tekućinskom kromatografu Agilent 1260 sistemom opremljenim s: kvarternom pumpom, autosemplerom, termostatiranom kolonom, zatim Agilent 6490 trostrukim kvadropolom MS/MS detektorom te software-om Mass Hunter Work Station for QQQ.

Tablica 3. Kromatografski uvjeti

Kolona	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 μm (100 \times 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 $^{\circ}\text{C}$ Protok plina (N ₂): 11 L/h Nebulizer: 40 psi Pozitivni/negativni napon na kapilari: +4000 V; -3500 V
Maseni detektor	dMRM mode (m/z od 100 do 1000)
Eluiranje	gradijentno (gradijent prikazan u Tablici 4.)
Temperatura	35 $^{\circ}\text{C}$
Vrijeme trajanja	12,5 min
Injektirani volumen	2,5 μL

Tablica 4. Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (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 fenolnih spojeva:

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini 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 5. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih prekursor i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija je provedena na sljedeći način: 3-*O*-feruloilkina kiselina kvantificirana je prema standardu ferulinske kiseline, 4-*p*-kumaroilkina kiselina i 3-*p*-kumaroilkina kiselina *p*-kumarinskom kiselinom, 3-*O*-kafeoilkina kiselina prema standardu klorogenske kiseline, monogaloil glukoza, 5-*O*-galoilkina kiselina, digaloilkina kiselina te trigaloilkina kiselina kvantificirane su prema standardnoj krivulji galne kiseline, miricetin rutinozid, miricetin glukuronid i miricetin ramnozid prema standardu miricetina, kamferol-3-glukozid, kamferol-ramnozil-heksozid, kamferol-pentozil-heksozid, kamferol-pentozid, kamferol-ramnozid, kamferol-acetil-rutinozid kvantificirani su prema standardu kamferol-3-rutinozida, a kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid i kvercetin-3-rutinozid prema standardu kvercetin-3-glukozida. Dobivene koncentracije izražene su kao mg/100 g uzorka.

Tablica 5. Jednadžba baždarnih pravaca za pojedine fenolne spojeve

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca
Kvercetin-3-glukozid	$Y=3224,50X$
Kamferol-3-rutinozid	$Y=3452X$
Kumarinska kiselina	$Y=973,30X$
Epikatehin	$Y=2776,20X$
Ferulinska kiselina	$Y=368,81X$
Galna kiselina	$Y=480,65X$
Klorogenska kiselina	$Y=2056,20X$
p-kumarinska kiselina	$Y=994,29X$
Katehin	$Y=2935,30X$
Epigalokatehin galat	$Y=2873,10X$
Rutin	$Y=1477,80X$
Epikatehin galat	$Y=1101,60X$
Procijanidin B1	$Y=55,58X$
Procijanidin B2	$Y=69,97X$
Miricetin	$Y=212,42X$
Apigenin	$Y=1684,50X$
Luteolin	$Y=1292,90X$

3.2.6. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD).

Da bi se utvrdio utjecaj temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u listu tršlje s ciljem optimiranja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine.

Centralno-kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od tri dijela: puni 2^k faktorijalni dizajn (dizajn prvog reda), osni dio sastavljen od $2k$ broja točaka smještenih tako da su dvije točke položene na osima kontrolnih varijabli na istoj udaljenosti α od centra te od centralne točke i replikacije u istoj (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

Utvrđene su gornje i donje granice ispitivanih parametara kako slijedi: temperatura od 50 do 70 °C, snaga mikrovalova od 200 do 500 W te vrijeme ekstrakcije od 4 do 12 min. Svaki od tri

ispitivana parametra promatran je na tri razine, nižoj (-1), središnjoj (0) i višoj (1) što je ukupno 16 pokusa uključujući faktorske, aksijalne i centralnu točku sa dva ponavljanja (Tablica 2.). Kao ovisna varijabla promatrana je koncentracija ukupnih fenola izražena u mg GAE/g uzorka. Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Regresijski model za svaku promatranu ovisnu varijablu izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=j}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

[2]

gdje je:

Y- predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

β_0 - fiksni koeficijent a β_i , β_{ii} i β_{ij} linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

$X_i \dots X_j$ - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable

Da bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli te postojanje razlike među provedenim uvjetima ekstrakcije korištena je analiza varijance (ANOVA). Valjanost cijelog kvadratnog empirijskog modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom analize varijance na 95% - tnoj razini vjerojatnosti.

Prilikom optimizacije parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima postavljena je visoka preferencija (1,0) za ovisnu varijablu, odnosno koncentraciju ukupnih fenola. Ulazni parametri su promatrani u različitom broju koraka ovisno o njihovom rasponu, a radi preciznije optimizacije. Tako je temperatura promatrana u 20 koraka, snaga mikrovalova u 100 koraka, a vrijeme u 8.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana je utjecaj temperature (50 °C –70 °C), snage (200-400 W) i vremena ekstrakcije (4-12 min) na maseni udio ukupnih fenola iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) ekstrahirana primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja i prikazani su u Tablici 6.

Da bi se utvrdio utjecaj temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u listu tršlje s ciljem optimiranja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine.

Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli na promatrane parametre i rezultati analize su prikazani u Tablici 7. Na Slikama 8. i 9. prikazani su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije odnosno pri konstantnoj temperaturi mikrovalova (60 °C), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije.

U Tablici 8. prikazana je jednadžba regresijskog modela i koeficijent determinacije za koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje. Model omogućava da se za neke nove ekstrakte lista tršlje može predvidjeti očekivani maseni udjel ukupnih fenola.

Na temelju rezultata definirani su optimalni uvjeti ekstrakcije te učinkovitost modela provjerena provedbom ekstrakcije pri optimalnim uvjetima te su u Tablici 9. prikazani optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te predviđene i eksperimentalne vrijednosti ukupnih fenola te njihovo odstupanje. Također, provedena je klasična ekstrakcija uz refluks u trajanju od 30 min.

Konačni cilj bio je identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakta lista tršlje prema prethodnoj razrađenoj i validiranoj metodi primjenom UPLC-MS/MS-a (Sierra i sur., 2011) te je identificirano 34 spoja s masenim udjelima prikazani u Tablici 10.

4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Tablica 6. Koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje u ovisnosti o primjenjenoj temperaturi, snazi mikrovalova i vremenu ekstrakcije

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)
1	50	200	4	94,95 ± 3,43
2	50	200	12	104,00 ± 4,04
3	50	500	4	95,14 ± 3,43
4	50	500	12	99,76 ± 0,30
5	70	200	4	85,71 ± 0,2
6	70	200	12	100,90 ± 1,41
7	70	500	4	85,14 ± 2,63
8	70	500	12	110,18 ± 2,22
9	43	350	8	88,63 ± 0,91
10	77	350	8	110,14 ± 3,64
11	60	98	8	94,19 ± 2,42
12	60	602	8	107,93 ± 2,52
13	60	350	1	67,72 ± 1,51
14	60	350	15	94,05 ± 5,05
15 (C)	60	350	8	94,67 ± 1,21
16 (C)	60	350	8	92,57 ± 3,64

Koncentracije ukupnih fenola u listu tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) nakon provedene ekstrakcije potpomognute mikrovalovima kreću se u rasponu vrijednosti od $67,72 \pm 1,51$ do $110,18 \pm 2,22$ mg GAE/g. Najveća vrijednost koncentracije ukupnih fenola $110,18 \pm 2,22$ mg GAE/g određena je u uzorku broj 8 pri temperaturi 70 °C, u trajanju 12 min i primijenjenoj snazi od 500 W. S druge strane, najniža koncentracija ukupnih fenola dobivena je uzorku broj 13 koja iznosi $67,72 \pm 1,51$ mg GAE/g, a dobivena pri temperaturi 60 °C, u trajanju 1 min i korištenoj snazi od 350 W. Iz tablice je vidljivo da porastom vremena ekstrakcije raste koncentracija ukupnih fenola pri istim parametrima temperature i snage mikrovalova. Koncentracija ukupnih

fenola dobivena ekstrakcijom u trajanju od 1 min iznosi $67,72 \pm 1,51$ mg GAE/g, a koncentracija dobivena ekstrakcijom u trajanju od 15 min iznosi $94,05 \pm 5,05$ mg GAE/g. U oba slučaja je korištena ista temperatura od $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i snaga mikrovalova 350 W.

Nadalje, vidljivo je da su povećanjem snage mikrovalova s 98 W na 350 W pri istim vrijednostima temperature ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) i vremena ekstrakcije (8 min) dobivene slične koncentracije ukupnih fenola $94,19 \pm 2,42$ mg GAE/g, odnosno $94,67 \pm 1,21$ mg GAE/g.

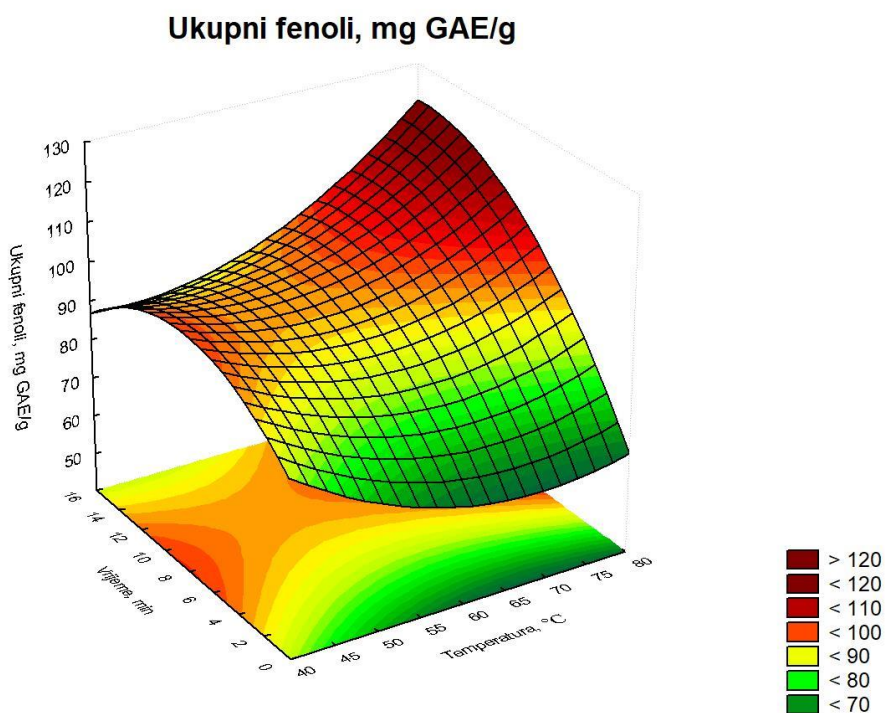
Tablica 7. Analiza varijance (ANOVA) utjecaja nezavisnih varijabli (X_1 , X_2 i X_3) na količinu ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na 95 % - tnom intervalu vjerojatnosti

Izvor varijacije	F-omjer	p-vrijednost
X_1	19,9926	0,140074
X_1^2	29,2002	0,116494
X_2	25,5822	0,124264
X_2^2	44,2345	0,095008
X_3	320,9279	0,035500*
X_3^2	61,7326	0,080592
X_1X_2	9,2300	0,202435
X_1X_3	39,9906	0,099844
X_2X_3	1,6653	0,419693
Nedostatak modela	27,2902	0,144276
R^2	0,82573	

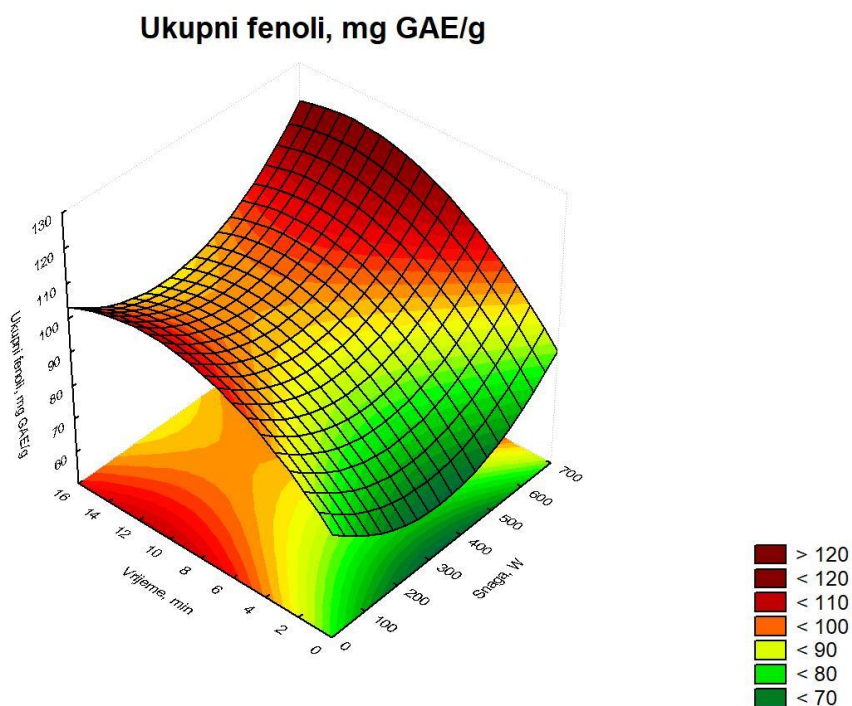
X_1 -temperatura; X_2 -snaga; X_3 -vrijeme

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Prema rezultatima analize varijance (ANOVA) signifikantan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola ima samo vrijeme ekstrakcije ($p \leq 0,05$). Povećanje vremena ekstrakcije imao je pozitivan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje. Snaga mikrovalova i temperatura ne pokazuju statistički signifikantan utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktima.



Slika 9. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj snazi mikrovalova (350W), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije



Slika 10. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj temperaturi mikrovalova (60°C), u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije

Na Slici 9. prikazan je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola mg GAE/g u ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W) u ovisnosti o vremenu ekstrakcije i temperaturi. Iz trodimenzionalnog prikaza odzivnih površina vidljivo je da vrijeme ekstrakcije ima ključan utjecaj na maseni udio ukupnih fenola, odnosno povećanje vremena ekstrakcije rezultira povećanjem masenog udjela ukupnih fenola. Na Slici 10. prikazan je trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udio ukupnih fenola mg GAE/g u ekstraktu lista tršlje pri konstantnoj temperaturi (60 °C) u ovisnosti o vremenu ekstrakcije i snazi mikrovalova. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina u skladu je rezultatima ANOVE gdje je vrijeme ekstrakcije ima signifikantan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola tj. povećanje vremena ekstrakcije rezultira višom koncentracijom ukupnih fenola.

4.2. Utjecaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije

4.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije

Vrijeme ekstrakcije signifikantno ($p \leq 0,05$) je utjecalo na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva. Povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do povećanja ekstrakcijskih prinosa. Najviša koncentracija ukupnih fenola dobivena je provedbom ekstrakcije u trajanju od 12 minuta (110,18 mg GAE/g), dok je najniža koncentracija dobivena i najkraćim trajanjem ekstrakcije od 1 minute (67,72 mg GAE/g). Daljnjim povećanjem vremena na 15 min koncentracija fenolnih spojeva se smanjuje na 94,05 mg GAE/g.

Dobiveni rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima i literaturnim navodima. Rafiee i sur., (2011) istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (2-15 min) na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz lišća triju varijeteta maslina te zaključuju da s porastom vremena ekstrakcije raste i udio fenolnih spojeva što je u skladu s ovim istraživanjem. Najveća koncentracija fenolnih spojeva iznosila je 42,852 mg TAE/g te je taj ekstrakt bio podvrgnut ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima u trajanju od 12 minuta. Iz drugih rezultata vidljivo je kako nije bilo značajne razlike u koncentracijama fenolnih spojeva između 12 minuta i 15 minuta. Rezultati istraživanja Jafari i sur., (2011) prate i rezultate ovog istraživanja kada je najveći prinos dobiven ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima u trajanju od 12 minuta, a daljnje povećanje vremena je imalo za posljedicu i smanjenje prinosa ekstrakcije. Također, Dragović-Uzelac i sur., (2012) određivali su optimalne uvjete za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) te su varirali trajanje ekstrakcije potpomognute mikrovalovima od 3 minute do 11 minuta i zaključuju kako se za ekstrakcijski

prinos najučinkovitije pokazalo trajanje od 9 minuta. Lovrić i sur., (2017) istraživali su utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na fenolne spojeve iz cvijeta trnine. U studiji korištena su vremena 5, 15 i 25 minuta, a od otapala etanol i metanol u koncentracijama 50 % odnosno 70 %, temperature 40 °C, 50 °C i 60 °C, a snaga mikrovalova 100 W, 200 W i 300 W. Vrijeme ekstrakcije je imalo signifikantan utjecaj na količinu ukupnih fenola odnosno povećanjem vremena dobiveni su veći prinosi ukupnih fenola. Najveće koncentracije ukupnih fenola dobivene su u ekstraktima koji su bili ekstrahirani između 15 i 25 minuta. S druge strane, produljenje vremena ekstrakcije od 5 do 25 minuta nije imao signifikantan utjecaj na ukupne flavonole. Produljenje vremena ekstrakcije može izazvati nepoželjne reakcije kao što je enzimska degradacija i oksidacija te rezultira smanjenim prinosom ekstrakcije fenolnih spojeva.

4.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije

Iz ANOVA Tablice 7. može se zaključiti kako temperatura kao procesni parametar na prinos ekstrakcije nije signifikantno ($p \leq 0,05$) utjecao na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje. U istraživanju su se primjenjivale temperature u rasponu 43-77 °C, a najveća koncentracija ukupnih fenola postignuta kada je korištena temperature od 70 °C. U pravilu porastom temperature raste ekstrakcijski prinos, no više temperature mogu dovesti do degradacije temperaturno osjetljivih spojeva. Temperatura do 50 °C je preniska da bi izazvala degradaciju spojeva što je vidljivo kod ekstrakata koji su tretirani tim temperaturama jer je vidljiv trend povećanja koncentracije ukupnih fenola. Daljnjim povećanjem temperature na 60 °C, 70 °C odnosno 77 °C u pojedinim ekstraktima je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih fenola što može biti rezultat degradacije. Lafka i sur., (2017) u svom istraživanju zaključuju kako porastom temperature ekstrakcije iznad 60 °C rezultira smanjenjem ukupnih fenola iz komine grožđa. S druge strane, Spigno i De Faveri (2009) koji su provodili ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima za izolaciju fenola iz crnog čaja dobivaju veće koncentracije pri temperaturama 80 °C (1200 mg GAE/L) nego pri nižim od 45 °C (500 mg GAE/L).

4.2.3. Utjecaj snage mikrovalova

Pri provedbi ekstrakcije potpomognute mikrovalovima primjenjivala se snaga mikrovalova u rasponu od 98-602 W, a najveća koncentracija ukupnih fenola postignuta kada je korištena snaga od 500 W, pri temperaturi od 70 °C i vremenu od 12 minuta, a iznosila je 110,18 mg GAE/g. Snaga kao procesni parametar nije imao signifikantan ($p \leq 0,05$) utjecaj na prinos ekstrakcije. Uobičajeno je da su snaga i temperatura međusobno povezane tako što povećanje snage dovodi do povećanja temperature ekstrakcijskog postupka, ali previsoka snaga može prouzročiti termičku degradaciju bioaktivnih spojeva. Song i sur., (2011) provodili su ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima na lišću slatkog krumpira pri čemu su varirali snagu od 150-550 W. Ekstrakcijski prinos se proporcionalno povećavao kako se povećavala snaga mikrovalova do 350 W. Pri daljnjim povećanjem snage mikrovalova došlo je do pada u prinosu ukupnih fenola.

Tablica 8. Jednadžba regresijskog modela i koeficijent determinacije za koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima lista tršlje

Varijabla	Model	R ²
Ukupni fenoli (Y)	$Y=226,6418-3,9910X_1+0,0261X_1^2-0,1614X_2+0,001X_2^2+0,0012X_3-0,2254X_3^2+0,011X_1X_2+0,0830X_1X_3+0,011X_2X_3$	0,83

X₁-temperatura; X₂-snaga; X₃-vrijeme

U Tablici 8. prikazana je jednadžba regresijskog modela i pripadajući koeficijent determinacije. Jednadžba regresijskog modela omogućava predviđanje koncentracije ukupnih fenola za svaku vrijednost temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije. Pripadajući koeficijent determinacije (R²) pokazuje kolika je preciznost modela za predviđanje ukupnih fenola. Vrijednost koeficijenta determinacije 0,83 ukazuje na dobro prilagođen model.

U Tablici 9. prikazani su optimalni parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ukupnih fenola iz lista tršlje. Vrijeme od 12 minuta, temperatura 69 °C i snaga 512 W su optimalni parametri kojima se postiže najveća koncentracija ukupnih fenola, a uvrštavanjem u dobiveni regresijski model dobiva se predviđena koncentracija 112,71 mg GAE/g. Provedbom ekstrakcije pri optimalnim uvjetima dobivena je eksperimentalna koncentracija ukupnih fenola 108,14 mg GAE/g koja je u skladu s vrijednostima predviđenim modelom.

Također, provedena je klasična ekstrakcija ukupnih fenola iz lista tršlje pomoću refluksa u trajanju od 30 minuta. Ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri optimalnim uvjetima dobivena je koncentracija ukupnih fenola 108,14 mg GAE/g, dok je klasičnom ekstrakcijom dobivena gotovo ista koncentracija 108,71 mg GAE/g u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.

Za postizanje ekstrakcijskih prinosa ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima je bilo potrebno 12 min, dok klasičnom ekstrakcijom 30 min.

Tablica 9. Optimalni parametri za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima lista tršlje s predviđenim i dobivenim koncentracijama ukupnih fenola te dobivenom koncentracijom ukupnih fenola postupkom klasične ekstrakcije uz refluks

Optimalni parametri mikrovalne ekstrakcije		Predviđena koncentracija UF (mg GAE/g)	Dobivena koncentracija UF (mg GAE/g)
Temperatura	69 °C	112,71	108,14
Snaga mikrovalova	512 W		
Vrijeme	12 min		
Uvjeti klasične ekstrakcije uz refluks		/	108,71
Vrijeme	30 min		

Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima budući da je najveća prednost novih inovativnih tehnika među kojima je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima bitno skraćivanje vremena potrebno za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala.

Pan i sur., (2003) izolirali su polifenole iz listova zelenog čaja uz pomoć ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (0,5-8 min), ekstrakcije pri sobnoj temperaturi (20 h), ultrazvučne ekstrakcije tijekom 90 min i ekstrakcije uz pomoć refluksa tijekom 45 min.

Rezultati su pokazali kako je MAE najučinkovitija metoda za ekstrakciju polifenola iz listova zelenog čaja jer tijekom 4 min su dobiveni veći ekstrakcijski prinosi nego kod ostalih metoda koje su imale dulja vremena ekstrakcije. Također, Dragović-Uzelac i sur., (2012) potvrđuju da ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom smanjuje vrijeme za izolaciju polifenola iz listova kadulje. Korištene su iste temperature od 80 °C te je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u trajanju od 9 min dala veće koncentracije ukupnih fenola nego klasična ekstrakcija u trajanju od 30 min.

Slične rezultate dobivaju brojni drugi znanstvenici među kojima i Elez Garofulić i sur., (2013) gdje se potvrđuju prethodne tvrdnje da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima najučinkovitija u odnosu na konvencionalne ekstrakcije. Izolirali su antocijane i fenolne kiseline iz višnje Maraske (*Prunus cerasus var. Marasca*) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (50-70 °C, 5-12 min, snaga mikrovalova 250-500 W) i klasičnom ekstrakcijom u trajanju od 20 min. Određeni su optimalni uvjeti za izolaciju antocijana i fenolnih kiselina i u oba slučaja ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima su dobiveni veći prinosi ukupnih fenola nego konvencionalnom ekstrakcijom.

4.3. Identificirani i kvantificirani fenolni spojevi iz ekstrakta lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Tablica 10. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva iz lista tršlje

SPOJ	Retencijsko vrijeme (min)	Prekursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	mg/100g	Identifikacija
1	0,905	367	193	2,3	3- <i>O</i> -feruloilkina kiselina
2	0,916	337	173	0,2	4- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina
3	0,918	353	191	0,5	3- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina
4	0,979	331	169	18,8	monogaloil glukoza
5	1,313	169	125	4,4	galna kiselina*
6	2,144	343	191	3,1	5- <i>O</i> -galoilkina kiselina
7	2,639	353	191	0,3	klorogenska kiselina*
8	3,251	495	343	606	digaloilkina kiselina
9	3,346	579	427	13,6	procijanidin B1*
10	3,468	579	427	10,7	procijanidin B2*
11	3,602	337	163	0,4	3- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina
12	3,935	291	139	31,65	epikatehin*
13	3,944	291	139	31,7	katehin*
14	5,171	459	139	9,2	epigalokatehin galat*
15	5,208	647	495	102,1	trigaloilkina kiselina
16	5,836	627	319	528,9	miricetin-rutinozid
17	5,94	163	119	0	<i>p</i> -kumarinska kiselina*
18	5,992	495	319	300	miricetin-glukuronid
19	5,992	319	273	304,1	miricetin*
20	6,549	611	303	31,9	kvercetin-3-rutinozid
21	6,665	465	319	1782,4	miricetin-ramnozid
22	6,77	442,9	139	1,5	epikatehin galat*
23	6,886	465	303,1	39,4	kvercetin-3-glukozid*
24	6,946	449	287	19,5	kamferol-3-glukozid

25	7,309	595	287	2,5	kamferol-ramnozil-heksozid
26	7,312	595	287	2,4	kamferol-3-rutinozid*
27	7,342	435	303	10,7	kvercetin-pentozid
28	7,452	581	287	0,2	kamferol-pentozil-heksozid
29	7,702	449	303	130,9	kvercetin-ramnozid
30	8,373	419	287	2,2	kamferol-pentozid
31	8,585	433	287	11,3	kamferol-ramnozid
32	9,989	287	153	26,6	luteolin*
33	11,162	637	287	0,2	kamferol-acetil-rutinozid
34	11,185	271	153	2	apigenin*

U Tablici 10. prikazana su 34 identificirana fenolna spoja u suhom ekstraktu lista tršlje određenih uz pomoć UPLC MS/MS metode. Također, prikazano je vrijeme zadržavanja komponenti u koloni, prekursor ion (m/z), fragment ion (m/z) i masa pojedinog spoja mg/100g uzorka.

Fenolni spojevi koji su identificirani mogu se podijeliti u 5 slijedećih skupina:

- *Hidroksibenzojeve kiseline* – galna kiselina, monogaloil glukoza, 5-*O*-galoilkina kiselina, trigaloilkina kiselina, digaloilkina kiselina
- *Hidroksicimetne kiseline* - *p*-kumarinska kiselina, 4-*p*-kumaroilkina kiselina, 3-*p*-kumaroilkina kiselina, klorogenska kiselina, 3-*O*-kafeoilkina kiselina, 3-*O*-feruloilkina kiselina
- *Flavanoli* - katehin, procijanidin B2, procijanidin B1, epikatehin, epigalokatehingalat, epikatehingalat
- *Flavonol glikozidi* – miricetin, miricetin-rutinozid, miricetin-glukuronid, miricetin-ramnozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol-3-glukozid, kamferol-ramnozil-heksozid, kamferol-pentozil-heksozid, kamferol-pentozid, kamferol ramnozid, kamferol-acetil-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-pentozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-3-rutinozid
- *Flavoni* – apigenin, luteolin

34 fenolna spoja iz ekstrakta lista tršlje identificirani su na temelju njihovih kromatografskih pikova i uspoređeni s odgovarajućim standardima koji su prikazani u Tablici 5. u eksperimentalnom dijelu rada. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa, usporedbom njihovih molekularnih i fragment iona s literaturnim podacima. Identifikacija spojeva se provodila usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Nakon identifikacije, spojevi su kvantificirani i njihova koncentracija izražena u mg/100g uzorka.

Najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u listu tršlje su flavonol glikozidi, s najviše glikozida kamferola, kvercetina i miricetina. Najveći maseni udjel u listu tršlje određen je za flavonol glikozid – miricetin ramnozid, a iznosi 1782,4 mg/100g uzorka. Veliki maseni udio miricetina u skladu je s dosadašnjim istraživanjima budući da su Bozorgi i sur., (2013) odredili da u listu *Pistacia lentiscus* L. prisutno 20 % derivata miricetina od ukupnog sadržaja fenola.

Iz skupine *fenolnih kiselina* u koje se ubrajaju hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, spojevi 5, 7 i 17 identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao galna, klorogenska i *p*-kumarinska kiselina. Spojevi 4, 6, 8 i 15 identificirani su kao derivati galne kiseline te su stoga kvantificirani prema standardnoj krivulji galne kiseline. Spoj 4 ima prekursor ion m/z 331, te uslijed gubitka glukoze (-162 amu) nastaje fragment ion m/z 169, koji upućuje na strukturu monogaloil-glukoze. Nadalje, 5-*O*-galoilkinoj kiselini, kao spoju 6, odgovara prekursor ion m/z 343 i fragment ion m/z 191 s gubitkom galoil jedinice (-152 amu). Spoj 8 i 15 kvantificirani kao digaloilkina kiselina s prekursor ionom m/z 495 i fragment ionom m/z 343 odnosno trigaloilkina kiselina s prekursor ionom m/z 647, fragment ionom m/z 495 zbog gubitka galoil jedinice (-152 amu) (Wyrepkowski i sur., 2014).

Spoj 1, 3-*O*-feruloilkina kiselina, kvantificiran je prema referentnom standardu ferulinske kiseline koji ima prekursor ion m/z 367, a fragment ion m/z 193, a spoj 3, 3-*O*-kafeoilkina kiselina, prema standardu klorogenske kiseline s prekursor ionom m/z 353 i fragment ionom m/z 191.

Spojevi 2 i 11 kvantificirani su prema standardnoj krivulji *p*-kumarinske kiseline. Spojevi 2 i 11 imaju svojstveni prekursor iona m/z 337. 4-*p*-kumaroilkina kiselina, spoj 2, ima fragment ion m/z 173, a spoju 11 odgovara 3-*p*-kumaroilkina kiselina s fragment ionom m/z 163. Najzastupljenija fenolna kiselina u listu tršlje je galna kiselina i njeni derivati s kojima čini 70

% ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u listu tršlje (Romani i sur., 2002). Galna kiselina u ekstraktu lista tršlje je prisutna u koncentraciji 4,4 mg/100g uzorka, a njen derivat digaloilkina kiselina ima najveću koncentraciju 606 mg/100g uzorka. Do sličnih rezultata dolaze Romani i sur., (2002) koji su proveli HPLC analizu te derivat galne kiseline, 3,5-*O*-digaloilkina kiselina, pokazuje najveću koncentraciju (2680 ± 467 mg/100g suhe tvari ekstrakta). Hidroksicimetne kiseline u odnosu na hidrokisbenzojeve kiseline u ekstraktima lista tršlje pokazuju puno nižu koncentraciju (0mg/100g uzorka do 2,3 mg/100g uzorka).

Svi spojevi iz skupine *flavanola* identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao procijanidin B1, procijanidin B2, epikatehin, katehin, epigalokatehin galat, epikatehin-galat (prikazani u Tablici 10. kao spojevi 9, 10, 12 13, 14 i 22). Najzastupljeniji flavanol u ekstraktu lista tršlje je katehin u koncentraciji 31,7 mg/100g uzorka, iza njega slijedi epikatehin 31,65 mg/100g uzorka te procijanidin B1 13,6 mg/100g uzorka. Istraživanje koje su proveli Zitouni i sur., (2016) dokazuju prisustvo katehina i listu tršlje u koncentraciji 4,106 mg/100 g suhe tvari. Prisustvo katehina u listu tršlje dokazuju i Mehenni i sur., (2016) u koncentraciji $31,79 \pm 5,76$ mg/g suhe tvari (Mehenni i sur., 2016).

Iz skupine *flavonol glikozida*, spojevi 19, 23 i 26 identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao kao miricetin, kvercetin-3-glukozid i kamferol-3-rutinozid od kojih je miricetin u najzastupljeniji u ekstraktu lista tršlje u koncentraciji 304,1 mg/100g. Bozorgi i sur., (2013) navode kako je u listu *Pistacia lentiscus* L. prisutno 20 % derivata miricetina od ukupnih fenola, dok je istraživanje Kawashtya i suradnika (2000) pokazalo kako je kvercetin-3-glukozid najzastupljeniji flavanol u tršlji (*Pistacia lentiscus* L.).

Spojevi 16, 18, 21 identificirani su kao *derivati miricetina* jer su okarakterizirani fragmentnim ionom m/z 319. Spoj 16 pokazao je prekursor ion m/z 627 te uslijed gubitka ramnoze (-146 amu) i glukoze (-162 amu) nastali fragmentni ion m/z 319 što odgovara strukturi miricetin rutinozida (Osterc i sur., 2014). MS/MS spektar spoja 18 ima prekursor ion m/z 495 i fragment ion m/z 319 gdje gubitak glukuronilne jedinice (-176 amu) upućuje na strukturu miricetin glukuronida (Carocho i sur., 2014).

Spoj 21 okarakteriziran je prekursor ionom m/z 465 i fragmentnim ionom m/z 319 koji odgovara gubitku ramnoze (-146 amu) što prema Ostercu i sur., (2014) upućuje na strukturu miricetin ramnozida. Od svih derivata miricetina najveću koncentraciju pokazuje miricetin ramnozid, a iznosi 1782,4 mg/100g uzorka što je ujedno i najveća dobivena koncentracija u odnosu na ostala 33 fenolna spoja. Bampouli i sur., (2014) identificirali su miricetin ramnozid u listovima tršlje,

dok su Remila i sur., (2015) u bobicama tršlje identificirali derivat miricetina, miricetin ramnozid.

Spojevi 20, 27, 29 identificirani su kao *derivati kvercetina* i kvantificirani su prema standardu kvercetin-3-glukozida. Svim spojevima je zajednički fragmentni ion m/z 303. Kvercetin rutinozidu kao spoju 20 odgovara prekursor ion m/z 611, kvercetin pentozid ima prekursor ion m/z 435 i u Tablici 10. je prikazan kao spoj 27 te kvercetin ramnozid, spoj 29, ima prekursor ion m/z 449. Za derivate kvercetina, fragmentni ioni, odgovaraju gubitku heksoze (-162 amu) i ramnoze (-146 amu) za spoj 20, gubitku pentozil jedinice (-132 amu) za spoj 27 te gubitku ramnoze (-146 amu) za spoj 29 (Carocho i sur., 2014). Najzastupljeniji kvercetin u ekstraktu lista tršlje jest kvercetin ramnozid u koncentraciji koja iznosi 130,9 mg/100g uzorka. Njegova prisutnost je dokazana i u listovima i u bobicama tršlje u istraživanju koje su proveli Mehenni i sur., (2016).

Spojevi 24, 25, 28, 30, 31 i 33 identificirani su kao *derivati kamferola* i kvantificirani su prema standardu kamferol-3-rutinozida. Svi spojevi imaju svojstveni fragmentni ion m/z 287. Ovi spojevi identificirani su prema karakterističnim fragmentnim gubicima i imenovani kao kamferol-3-glukozid, spoj 24 (prekursor ion m/z 449, gubitak -162 amu što odgovara gubitku glukoze), kamferol ramnozil heksozid, spoj 25 (prekursor ion m/z 595, gubici -142 amu i -162 amu što odgovara gubitku ramnoze i heksoze), kamferol pentozil heksozid, spoj 28 (prekursor ion m/z 581, gubici -132 amu i -162 amu odgovaraju gubitku pentoze i heksoze), kamferol pentozid, spoj 30 (prekursor ion m/z 419, gubitak -132 amu koji odgovara gubitku pentoze), kamferol ramnozid, spoj 31 (prekursor ion m/z 433, gubitak -146 amu upućuje na gubitak ramnoze) i kamferol acetyl ramnozil heksozid, spoj 33 (prekursor ion m/z 637) (Barros i sur., 2013). Od svih identificiranih spojeva derivata kamferola u najvećoj koncentraciji prisutan je kamferol-3-glukozid čija koncentracija iznosi 19,5 mg/100g uzorka. Bampouli i sur., (2014) također identificiraju derivate kamferola u listu tršlje.

Iz skupine *flavona*, spojevi 32 i 34 identificirani su prema referentnim standardima kao luteolin i apigenin. U ekstraktima lista tršlje uočena je značajno veća koncentracija luteolina (26,6 mg/100 g uzorka) u usporedbi s apigeninom (2 mg/100g uzorka). Luteolin je drugi najzastupljeniji fenolni spoj u ekstraktima bobice tršlje prema istraživanju Mehenni i sur. (2016), a potvrđena je njegova prisutnost i u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) (Bampouli i sur., 2014).

4.4. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista tršlje

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u ovom radu korištena je ORAC metoda (eng. *oxygen radical absorbance capacity* - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) i određen je kapacitet apsorpcije kisikovih radikala u ekstraktu lista tršlje te iznosi $10768,2 \pm 0,07$ $\mu\text{mol TE/L}$.

Dahmoune i sur., (2014) određivali su antioksidacijski kapacitet ekstrakata listova tršlje i usporedili ORAC vrijednosti ekstrakata dobivenih klasičnom metodom ekstrakcije, ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom (UAE) i ubrzanom ekstrakcijom otapalima (ASE). Najveću ORAC vrijednost imao je ekstrakt dobiven klasičnom metodom ekstrakcije ($671,07 \pm 58,80$ $\mu\text{mol TE/g}$ uzorka), zatim ekstrakt dobiven ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom ($517,52 \pm 35,18$ $\mu\text{mol TE/g}$ uzorka), a najmanji antioksidacijski kapacitet imao je ekstrakt dobiven ubrzanom ekstrakcijom otapalima ($257,07 \pm 20,00$ $\mu\text{mol TE/g}$ uzorka). Pretpostavka je da se ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom, a naročito ubrzanom ekstrakcijom otapalima dobije niži antioksidacijski kapacitet ekstrakata zbog nepovoljnijih ekstrakcijskih uvjeta. Konkretno, dolazi do drastičnog smanjenja količine otapala te skraćivanja ekstrakcijskog vremena u usporedbi s klasičnim ekstrakcijskim metodama što utječe na ORAC vrijednost dobivenih ekstrakata.

Remila i sur., (2015) u svom istraživanju odredili su antioksidacijski kapacitet lista tršlje koji iznosi $442,1 \pm 30,60$ $\mu\text{mol TE/L}$. Antioksidacijski kapacitet kod dobivenih znanstvenika je višestruko manji nego u našem istraživanju, a razlog tomu je razlika u odabranoj ekstrakcijskoj metodi i prirodi materijala budući da su koristili kao metodu ekstrakcije maceraciju dok je u ovom istraživanju korištena inovativna ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Autori su u istom istraživanju odredili i antioksidacijski kapacitet ekstrakta bobice tršlje te zabilježili ORAC vrijednost ekstrakta od $281,2 \pm 15,89$ $\mu\text{mol TE/L}$.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala se izrazito efikasnom za izolaciju ukupnih fenola iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) zbog dobivenog visokog ekstrakcijskog prinosa i skraćenog trajanja u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom.
2. Vrijeme ekstrakcije signifikantno je utjecalo na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva dok druga dva procesna parametra ne pokazuju statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije.
3. Vrijeme od 12 minuta, temperatura 69 °C i snaga 512 W su optimalni parametri kojima se postiže najveća koncentracija ukupnih fenola u iznosu od 108,14 mg GAE/g.
4. Klasičnom ekstrakcijom uz refluks u trajanju od 30 min dobiva se slična koncentracija ukupnih fenola, a ona je iznosila 108,71 mg GAE/g.
5. UPLC MS/MS analizom u ekstraktu lista tršlje identificirano je ukupno 34 fenolna spoja (5 hidroksibenzojevih kiselina, 6 hidroksicimetnih kiselina, 6 flavanola, 15 flavonola i 2 flavona). U najvećim koncentracijama su određeni derivati galne kiseline (606mg/100g uzorka, digaloilkina kiselina), derivati miricetina (1782,4 mg/100g uzorka, miricetin ramnozid) i derivati kvercetina (130,9 mg/100g uzorka, kvercetina ramnozid).
6. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) za ekstrakt lista tršlje iznosi 10768,2±0,07 μmol TE/g uzorka što dokazuje visok potencijal ove biljke za primjenom u prehrambenoj industriji.

6. LITERATURA

1. Acierno, D., Barba, AA., d'Amore M. (2004) Heat transfer phenomena during processing materials with microwave energy. *Heat Mass Transfer*, **40**, 413–420.
2. Anonymus 1 – Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.)
<[- 4. Anonymus 3 – Zagrijavanje materijala kod konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije mikrovalovima
< \[46\]\(https://wiki.anton-paar.com/microwave-assisted-synthesis/> pristupljeno 18.2.2018.5. Ballard, S.T., Malikarjunan, P., Zhou, K., O'Keffe, S. \(2010\) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. <i>Food Chem.</i> 120, 1185-1192.6. Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Nektarios, A., Krokida, M., Magoulas, K. \(2014\) Evaluation of total antioxidant potential of <i>Pistacia lentiscus</i> var. <i>chia</i> leaves extracts using UHPLCHRMS. <i>J food eng.</i> doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.10.0217. Barros, L., Tiago Alves, C., Duenas, M., Silvac, S., Oliveirac, R., Carvalho, A.M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. \(2013\) Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. <i>Ind Crops Prod.</i> 44, 104–110. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.0038. Belhachat, D., Aidb, F., Mekimenea, L., Belhachat, M. \(2017\) Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of <i>Pistacia lentiscus</i> berries ethanolic extract growing in Algeria. <i>Med J Nutrition Metab.</i> 10, 273–285. doi: 10.3233/MNM-17169</div><div data-bbox=\)](https://www.google.hr/search?dcr=0&biw=1536&bih=727&tbm=isch&sa=1&ei=ib7ZWvTuKIreU6ipsaAM&q=pistacia+lentiscus+tr%C5%A1lja&oq=pistacia+lentiscus+tr%C5%A1lja&gs_l=psyab.3...35344.36686.0.36822.7.7.0.0.0.88.550.7.7.0...0...1c.1.64.psy-ab..0.0.0...0.WoWbtLLbyT8#imgsrc=XVmpUgk47CwQHM:> pristupljeno 10.2.2018.3. Anonymus 2 – Valna duljina mikrovalova
<<a href=)

9. Bender, C., Graziano, S., Zimmerman, B.F., Weidlich, H.H. (2014) Antioxidant potential of aqueous plant extracts assessed by the cellular antioxidant activity assay. *American Journal of Biology and Life Sciences*. **2**, 72-79.
10. Bezzerra M., Santelli R., Oliveira E., Villar L., Escaleira L. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**, 965–977.
11. Bhattacharya, S. (2015) Conventional and advanced food processing technologies. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford
12. Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R. (2013) Five Pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *ScientificWorldJournal*. doi: 10.1155/2013/219815
13. Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev*. **56**(11), 317-333
14. Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice, *Food Chem*. **190**, 317-323
15. Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014) *Castanea sativa* Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/232956
16. Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*. **113**, 859–871.
17. Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K., & El-Adawi, H. (2012). Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algerian Pistacia lentiscus. *Asian Journal of Plant Sciences*, **11**(3), 131
18. Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014) *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind Crop Prod*. **61**, 31–40. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.035
19. 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.) polyphenols. *Food Technol. Biotechnol*. **50**, 377-383

20. Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M. (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grapepomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crops Prod.* doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.06
21. Drużyńska, B., Stępniewska, A., Wołosiak, R. (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, **6**, 27–36.
22. Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Režek Jambrak, A., Jukić, M. (2013) The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). *J Food Eng.* **117**, 437–42. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043
23. Favretto, L. (2004) Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications, Milestone, Bergamo
24. Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J Chrom A.* **798**, 179–186. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01194-1
25. Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* **107**(3), 1120-1130
26. Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1081–1093. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G)
27. Holtung, L. (2014) Berry press- residue-a valuable source of polyphenols with potential health effects. Series of dissertations submittes to the Faculty of Medicine, University of Oslo. No.1828
28. 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026
29. Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M., Saleh, N.A.M. (2000) The favonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Ecol.* **28**, 915-917.
30. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

31. Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. *Advanced Review. Wires Comput. Mol. Sci.*, **2**, 128-149.
32. Lafka, T. I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, **104**(3), 1206-1214.
33. 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.
34. Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012) Microwave assisted extraction of phenolic compounds with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* **130**, 928-936.
35. Li, J., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J., Yang, Y.-C., Li, S.-M., Li, Z.-N., Wink, M. (2010) Optimization of microwave assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**, 637–664
36. Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem*, **93**, 47–56
37. Liu, H.W. (2011) Extraction and Isolation of Compounds from Herbal Medicines. U: *Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies* (Liu, W.J.H., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 81-138.
38. Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), *CRC Press*, str. 1-24.
39. Lo Presti, M., Sciarrone, D., Crupi, M.L., Costa, R., Ragusa, S., Dugo, G., Monedello, L. (2008) Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. *Flavour Fragr. J.* **23**, 249–257. doi: 10.1002/ffj.1878
40. Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007) Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innov Food Sci Emerg.* **8**, 360–364. doi: 10.1016/j.ifset.2007.03.010
41. Lovrić, V., Putnik, P., Kovačević, D. B., Jukić, M., & Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol. Biotechnol.* **55**(2), 243.

42. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7–18.
43. Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarcay, S., Perrin, D., Gerardin, P., Atmani, D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J Food Drug Anal.* **24**, 653-669. doi: 10.1016/j.jfda.2016.03.002
44. Osterc, G., Cunja, V., Mikulic-Petkovseka, M., Schmitzer, V., Stampar, F., Bavcon, J. (2014) Foliage identification of different autochthonous common cyclamen genotypes (*Cyclamen purpurascens* Mill.) using various biochemical parameters. *Sci Hortic.* **173**, 37–44. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.034
45. Pan, X., Niu, G., Liu, H. (2003) Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process.* **42**, 129-33. doi: 10.1016/S0255-2701(02)00037-5
46. Pedroza, M. A., Amendola, D., Maggi, L., Zalacain, A., De Faveri, D. M., Spigno, G. (2015) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from dried waste grape skins. *Int. J. Food Eng.* **11**, 359-370.
47. Périno-Issartier, S., Abert-Vian, M., Chemat, F. (2011). Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Tech*, **4**(6), 1020-1028.
48. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.
49. Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., & Khomeiri, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.*, **21**(4), 738-745.
50. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S. (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 75–82.
51. Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015) Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med.* doi: 10.1016/j.eujim.2015.03.009

52. Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002) Identification and Quantification of Galloyl Derivatives, Flavonoid Glycosides and Anthocyanins in Leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal.* **13**, 79–86. doi: 10.1002/pca.627
53. Rostagno, M.A., Prado, J.M. (2013) Natural product extraction: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge
54. Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutierrez, A. (2013). A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **77**, 167-174
55. Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, **910**, 265-273
56. Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Pinol, C., Motilva, M.J. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879**(19), 1519-1528. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.03.042
57. 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.
58. Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011) Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant properties. *Innov Food Sci Emerg.*, **12**, 282–7. doi:10.1016/j.ifset.2011.03.001
59. Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200- 208.
60. Spigno, G., De Faveri, D. M. (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210–217
61. Dick, A.J., Starmans, H.H.N. (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: a review *Trends Food Sci. Technol.* **7**,191--197
62. Tolić, I. (2003) Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda *Pistacia*. *Šumarski list.* **9-10**, 501-507.
63. Trabelsi, H., Lajnef, H.B., Arfa, K.B., Boukhchina, S. (2016) Phenolic Compounds Characterization from *Pistacia lentiscus* (lentisc) Fruit. *J Chem Pharm Res.* **8**(8), 1-8

64. Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678. doi:10.3390/ijms150915638.
65. Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Chemat, F., Cravoto, G., ured. Food engineering series. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media. **4**, 15–52. doi: 10.1007/978-1-4614-4830-3
66. Wang, H., Helliwell, K. (2001) Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int.*, **34**, 223–7. doi:10.1016/S0963-9969(00)00156-3
67. Wyrepkowski, C.C., Maldonado Gomes da Costa, D.L., Sinhoin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., Campaner dos Santos, L. (2014) Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules*. **19**, 16039-16057. doi:10.3390/molecules191016039
68. Xiao, W., Han, L., Shi, B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix astragali. *Sep Purif Technol.* **62**(3), 614–618. doi: 10.1016/j.seppur.2008.03.025
69. Zhang, H.F., Yang, X.H., Wang, Y. (2011) Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends Food Sci Tech.* **22**, 672–688. doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.003
70. Zitouni, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Ghembaza, N., Toul, F., AtikBekkara, F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.* **8**(4), 627-633
71. Zrinski, I., Eckert-Maksić, M. (2005) Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi. *Kem. Ind.* **54**, 469-475

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta