

Optimiranje uvjeta ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku za izolaciju sterola i pentacikličkih triterpenoida iz korijena koprive

Peričić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:144393>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2022.

Matea Peričić

**OPTIMIRANJE UVJETA
UBRZANE EKSTRAKCIJE
OTAPALIMA PRI POVIŠENOM
TLAKU ZA IZOLACIJU STEROLA
I PENTACIKLIČKIH
TRITERPENOIDA IZ KORIJENA
KOPRIVE**

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



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924). Voditelj projekta: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

OPTIMIRANJE UVJETA UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU
ZA IZOLACIJU STEROLA I PENTACIKLIČKIH TRITERPENOIDA IZ KORIJENA KOPRIVE

Matea Peričić, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058208983

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je optimirati uvjete ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) za izolaciju sterola i pentacikličkih triterpenoida iz korijena koprive. Varirani su temperatura (70 do 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 do 15 min) i broj ciklusa ekstrakcije (2 do 4) pri čemu je prema Box–Behnken dizajnu s 5 centralnih točaka dobiveno 17 uzoraka lipidne frakcije. U svim uzorcima određen je prinos lipidne frakcije te je ispitan sastav sterola i pentacikličkih triterpenoida primjenom plinske kromatografije. Prinos lipidne frakcije određen je u rasponu od 0,39 do 1,63 %. Identificirano je ukupno 12 spojeva iz skupine sterola i pentacikličkih triterpenoida: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, cikloartenol, obtusifoliol, 24-metilen cikloartenol, citrostadienol, α -amirin, β -amirin i β -amirin acetat. Udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida određen je u rasponu od 43,50 do 78,26 mg 100 g⁻¹, a najzastupljeniji spoj u svim uzorcima bio je β -sitosterol (prosječna vrijednost udjela 50,21 mg 100 g⁻¹). Rezultati statističke analize pokazali su da svi ispitani uvjeti ekstrakcije imaju značajan utjecaj na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida. Optimalni uvjeti ASE pri kojima se dobivaju najveći prinosi sterola i pentacikličkih triterpenoida izoliranih iz korijena koprive su 150 °C/5 min/4 ciklusa.

Ključne riječi: *Urtica dioica L.*, fitosteroli, korijen, β -sitosterol, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Rad sadrži: 56 stranica, 13 slika, 11 tablica, 81 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: mag. ing. Ena Cegledi

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Maja Repajić (mentor)
3. prof.dr.sc. Sandra Balbino (član)
4. doc.dr.sc. Marko Obranović (zamjenski član)

Datum obrane: 31. siječnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

OPTIMIZATION OF THE ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION CONDITIONS FOR THE ISOLATION OF STEROLS AND PENTACYCLIC TRITERPENOIDS FROM NETTLE ROOT

Matea Peričić, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058208983

Abstract: The aim of this study was to optimize the conditions of accelerated solvent extraction (ASE) for the isolation of sterols and pentacyclic triterpenoids from nettle root. The temperature (70 to 150 °C), static extraction time (5 to 15 min) and number of extraction cycles (2 to 4) were varied and 17 samples of the lipid fraction were obtained according to the Box-Benken design with 5 central points. In all samples the yield of lipid fraction and the composition of sterols and pentacyclic triterpenoids by gas chromatography were determined. The yield of lipid fraction was determined in the range of 0.39 to 1.63%. A total of 12 compounds were identified from the group of sterols and pentacyclic triterpenoids: campesterol, campestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, cycloartenol, obtusifoliol, 24-methylene cycloartanol, citrostadienol, α -amyirin, β -amyirin and β -amyirin acetate. The content of total sterols and pentacyclic triterpenoids ranged from 43.50 to 78.26 mg 100 g⁻¹, and the most abundant compound in all samples was β -sitosterol (mean content value 50.21 mg 100 g⁻¹). The results of statistical analysis showed that all studied extraction conditions had significant influence on the content of total sterols and pentacyclic triterpenoids. The optimal ASE conditions at which the highest yields of sterols and pentacyclic triterpenoids isolated from nettle root are obtained are 150 °C/5 min/4 cycles.

Keywords: *Urtica dioica* L., phytosterols, root, β -sitosterol, accelerated solvent extraction

Thesis contains: 56 pages, 13 figures, 11 tables, 81 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: Maja Repajić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Ena Cegledi, M.E.

Reviewers:

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

Thesis defended: January 31st 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kopriva	2
2.1.1. Kemijski sastav koprive	4
2.2. Fitosteroli.....	6
2.2.1. Steroli korijena koprive	9
2.3. Izolacija lipidne frakcije	10
2.3.1. ASE	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijal.....	15
3.1.1. Aparatura i pribor.....	15
3.1.2. Kemikalije, standardi i plinovi.....	17
3.2. Metode	19
3.2.1. Ekstrakcija lipidne frakcije.....	19
3.2.2. Određivanje prinosa lipidne frakcije	20
3.2.3. Određivanje udjela i sastava sterola	21
3.2.4. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Prinos lipidne frakcije te prosječan sastav i udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida.....	28
4.2. Sastav i udio sterola	33
4.3. Sastav i udio pentacikličkih triterpenoida	36
4.4. Utjecaj ekstrakcijskih uvjeta na prinos lipidne frakcije i udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te β -sitosterola	38
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA.....	48

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja biljka iz porodice Urticaceae koja raste u umjerenom i tropskom klimatskom pojasu, najčešće kao korov. Rasprostranjena je na području cijele Europe i Sjeverne Amerike, sjeverne Afrike i dijelovima Azije (Krystofova i sur., 2010).

Više od 2000 godina kopriva se koristi kao prirodni lijek zbog svojih terapijskih svojstava te predstavlja jednu od ključnih biljaka europske farmakopeje. Proizvodi na bazi koprive našli su primjenu na područjima medicine, farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i tekstilne industrije. Poznata je kao biljni lijek i dodatak prehrani zbog svog protuupalnog, analgetskog, antikancerogenog, antidijabetičkog, antihiperglikemijskog, hepatoprotektivnog, antioksidativnog, antivirusnog, antimikrobnog, laksativnog i diuretičkog djelovanja. Također se koristi za liječenje alergija, respiratornih oboljenja, astme, anemije, visokog krvnog tlaka i dr. (Keršek, 2008; Asgarpanah i sur. 2012).

Zbog vrijednog nutritivnog i kemijskog sastava kopriva je predmet brojnih znanstvenih istraživanja, a dokazano je da pojedini dijelovi biljke imaju različita svojstva i primjenu. Iz različitih dijelova biljke izolirani su nutritivno vrijedni sastojci, poput minerala, vitamina, aminokiselina, masnih kiselina, klorofila, karotenoida, flavonoida, sterola, tanina, lecitina, kumarina i polisaharida (Kregiel i sur., 2018).

Korijen koprive izvor je vrijednih fitonutrijenata poput sterola, masnih kiselina, polisaharida, polifenola, skopoletina i izolecitina (Taylor, 2009), a preparati korijena koprive koriste se za simptomatsko liječenje bolesti donjeg urinarnog trakta i benigne hiperplazije prostate (BHP) (Semalty i sur., 2017). Najpoznatiji fitosteroli korijena koprive su stigmasterol i kampesterol. Za izolaciju sterola primjenjuju se različite konvencionalne metode, kao što je primjerice Soxhlet ekstrakcija, ali i napredne tehnike među koje spada i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE).

Cilj ovog rada bio je optimirati uvjete izolacije lipidne frakcije iz korijena koprive primjenom ASE, temperaturu (70 do 150 °C), statičko vrijeme (5 do 15 min) i broj ciklusa (2 do 4) ekstrakcije. U svim dobivenim uzorcima ulja određen je sastav i udio sterola i pentacikličkih triterpenoida pomoću plinske kromatografije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je biljna vrsta koja pripada rodu *Urtica* koji sadrži 46 različitih vrsta kritosjemenjača, odnosno cvjetnjača (tablica 1). Biljke iz roda *Urtica* zeljaste su višegodišnje biljke koje mogu narasti do 2 m visine. Sve one potječu iz porodice koprivovki (Urticaceae), koja vuče korijene iz Euroazije. U narodu je poznata i kao obična, pasja i pitoma kopriva te žara, žeža, žarulja, žariga ili žigovica.

Tablica 1. Klasifikacija vrste *Urtica dioica* L. prema taksonomskim kategorijama (USDA, 2020)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	Plantae
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Urticales
Obitelj	Urticaceae
Rod	<i>Urtica</i> L.
Vrsta	<i>Urtica dioica</i> L.

Naziv roda *Urtica* izveden je iz latinske riječi "uro" što znači "goriti" ili "urere" što znači peći. Naime, na listovima i stabljici koprive nalaze se sitne, žarne dlačice poznate kao trihomi, koje trljanjem o kožu izazivaju peckanje i privremeni osip. Nazivaju se još i žaoke, a biljci služe za obranu od ljudi i životinja (Kregiel i sur., 2018). Trihomi su građeni od višestanične parenhimske baze iz koje izlazi duguljasta cjevasta stanica i glavica koja sadrži kemijske spojeve (Knežević, 2006). Prilikom dodira s kožom, glavica trihoma se lomi ispuštajući oštre dlačice nalik iglicama, koje mogu prodrijeti kroz kožu i otpustiti tekućinu koja sadrži mravlju

kiselinu, histamin, acetilkolin, serotonin i druge kemijske tvari koje uzrokuju svrbež i peckanje (Kregiel i sur., 2018).

Ime vrste *dioica* na latinskom znači "dvije kuće" (od grčke riječi *oikia*, što znači kuća), odnosno označava dvodomnost biljke zbog toga što se muški i ženski cvjetovi nalaze na odvojenim biljnim jedinkama (Semalty i sur., 2017). Ženski cvjetovi su zelenkaste boje, dok su muški žućkasti (Semalty i sur., 2017). Cvjetovi koprive sitni su i neugledni, sakupljeni u guste grozdaste cvatove. Plod koprive je plosnati oraščić glatke površine i zelenkastosmeđe boje (Hulina, 1998). Sadrži smeđu sjemenku koja u potpunosti ispunjava plod (Nikolić i Kovačić, 2008).

Kopriva ima široko razgranate rizome i stolone (Kregiel i sur., 2018). Podzemno korijenje (slika 1) kojim se biljka širi žuto-smeđe je boje, cilindričnog oblika, nepravilno savijeno, promjera 4-6 mm (Nikolić i Kovačić, 2008). Podanci daju koprivi sposobnost preživljavanja ekstremnih temperatura zimi pa iz njih u proljeće izrastaju nove biljke. Na njima se nalaze duboke uzdužne brazde i brojni manji korjenčići koji su glatki i čvrsti (Upton, 2013).



Slika 1. Korijen koprive (prema Asgarpanah i sur., 2012)

Dvije najistaknutije vrste roda *Urtica* su obična kopriva (*Urtica dioica* L.) i mala kopriva (*Urtica urens* L.) (Kregiel i sur., 2018). Iako su ove dvije vrste vrlo slične izgledom i izuzetno alergene, vrsta *U. urens* jednodomna je biljka, tamnije je boje i mnogo manja od *U. dioice* L. (Semalty i sur., 2017). *U. urens* je kod nas zakonom zaštićena zavičajna vrsta (Nikolić i Kovačić, 2008).

Obje vrste preferiraju tla bogata dušikom i rastu na tlima bogatim teškim metalima, što kao posljedicu može imati nakupljanje nitrata i teških metala te negativno utjecati na kvalitetu biljke. Biljka ima slabu sposobnost bioapsorpcije teških metala te je prema istraživanju koje je proveo Goletić (2011) u koprivi pronađen značajan sadržaj teških metala (olovo, cink, bakar, kobalt i nikal). U istraživanju je provedena analiza sadržaja teških metala u ukupno 44 uzorka različitog biljnog materijala, a uzorak koprive akumulirao je nešto veći sadržaj od ostalih uzoraka.

Kopriva se razmnožava sjetvom, rizomima ili presadnicama (Stubljarić i sur., 2013), a cvjeta u periodu od lipnja do listopada (Jan i sur., 2016).

Iako raste kao korov, njeno sjeme, stabljika, listovi pa čak i korijen predstavljaju značajan rezervoar mikronutrijenata i hranjivih tvari te se koriste u ljekovite svrhe, što čini ovu biljku predmetom proučavanja i brojnih znanstvenih istraživanja.

2.1.1. Kemijski sastav koprive

Urtica dioica L. bogat je izvor nutritivno vrijednih spojeva. Udio i sastav kemijskih tvari u koprivi razlikuje se ovisno o dijelu biljke, ali i o drugim čimbenicima kao što su tlo, klima, sorta, genotip, vegetativni stadij, vrijeme berbe, prerada i skladištenje (Kregiel i sur., 2018). Rezultati brojnih istraživanja navode da svaka vrsta koprive, kao i svaki dio biljke (korijen, stabljika, listovi ili cvijet) ima različit sadržaj i profil bioaktivnih spojeva. Stoga, različite vrste koprive mogu imati različite namjene, ovisno o njihovom fitokemijskom sastavu.

U istraživanju koje su proveli Kregiel i sur. (2018) ubrani uzorci koprive sadržavali su približno 90 % vode, do 3,7 % proteina, 0,6 % masti, 2,1 % pepela, 6,4 % dijetalnih vlakana i 7,1 % ugljikohidrata.

U. dioica u svom sastavu sadrži flavonoide, tanine, hlapljive spojeve i sterole (Krystofova i sur., 2010.; Gül i sur., 2012). Otles i Yalcin (2012) proveli su istraživanje u kojem su metodom po Folin-Ciocalteu ispitali sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima različitih dijelova koprive, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) g⁻¹ suhe tvari. Navode da se u listovima nalazi najviši sadržaj ukupnih fenola, dok slijede korijen pa stabljika. U drugom istraživanju, Hudec i sur. (2007) navode da korijen sadrži 7,82, stabljika 9,91, a listovi 7,62 mg GAE g⁻¹ suhe tvari.

Bucar i sur. (2006) navode kako su u korijenu koprive prisutni sljedeći fenolni spojevi: klorogenska i kafeinska kiselina, skopoletin i fenilpropani. Orčić i sur. (2014) kvantificirali su biljne fenole u metanolnim ekstraktima koprive, odvojeno za različite dijelove biljke (za cvjetove, korijenje, stabljike i listove). Uzorci su sakupljeni s različitih lokacija u Srbiji. Profili polifenola su ovisili ne samo o dijelovima biljaka, već i o lokaciji. Rezultati su pokazali da cvjetni dijelovi koprive sadrže najviše fenolnih spojeva, prvenstveno klorogenske kiseline, a zatim rutina i izokvercetin. Otles i Yalcin (2012) navode da kopriva i korijen koprive sakupljeni na području Crnog i Mramornog mora sadrže više koncentracije fenolnih spojeva i imaju veći antioksidacijski kapacitet, dok je veći sadržaj vlage u koprivi, korijenu i stabljici koprive određen na Egejskom i Mediteranskom području.

Repajić i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su optimizirali radne uvjeta ASE: temperaturu (20, 50, 80 i 110 °C), statičko vrijeme (5 i 10 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1–4) za ekstrakciju polifenola i pigmenata iz listova koprive. U dobivenim ekstraktima HPLC analizom identificirani su i kvantificirani različiti polifenoli: klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina i cikorična kiselina koji pripadaju skupini hidroksicimetnih kiselina te flavonoidi; kvercetin-3-glukozid, kempferol-3-rutinozid i luteolin. Najzastupljeniji polifenol bio je klorogenska kiselina s najvećim sadržajem od 278,14 mg 100 g⁻¹ suhe tvari pri 110 °C dobiven tijekom 10 min u 2 ekstrakcijska ciklusa.

Lapinskaya i sur. (2008) navode da listovi koprive sadrže treonin, serin, alanin i asparaginsku kiselinu, sjemenkama dominiraju treonin, serin i asparaginska kiselina, dok je korijen bogat alaninom i asparaginskom kiselinom. Kopriva je dobar izvor nezasićenih masnih kiselina, a sadrži značajne količine oleinske (18:1), linolne (18:2) i α -linoleinske (18:3). Sadržaj palmitoleinske kiseline (16:1n-7) kretao se od 0,5 (stabljika) do 2,6 % (korijen). Koncentracija oleinske kiseline (18:1n-9) bila je viša u korijenu (8,7 %) nego u ostalim dijelovima, dok je najviša vrijednost dobivena za eruka kiselinu (22:1n-9) iznosila 1,2 % u sjemenkama. Udio gadoleinske kiseline (20:1n-9) bio je nizak, ali viši u korijenu (1,2 %) nego u ostatku biljke. S obzirom na to da mladi listovi sadrže relativno veliku količinu ulja i α -linolenske kiseline, predstavljaju najbolji izvor n-3 masnih kiselina iz biljke. U svim djelovima biljke izolirane su značajne količine palmitinske (16:0) i stearinske kiseline (18:0) (Guil-Guerrero i sur., 2003).

Kudritsata i sur. (1986) iz svježih listova izolirali su ukupno 29,6 mg 100 g⁻¹ s.t. karoteonida, u sljedećim postocima: β-karoten (61,0 %), violaksantin (14,7 %), lutein epoksid (13,1%) , luteoksantin (10,3 %) i hidroksi-α-karoten (0,9 %).

Kvantitativni i kvalitativni sastav korijena razlikuje se od nadzemnog dijela biljaka (Pinelli i sur., 2008). U dobivenim ekstraktima korijena koprive Frank i sur. (1998) pronašli su fitosterole, triterpene, lignane, kumarine, ceramide, polisaharide, masne kiseline, jednostavne fenolne spojeve i lektine. Glavne aktivne tvari korijena koprive su fitosteroli, lignani, polisaharidi i lektin UDA (eng. *Urtica dioica agglutinin*). Najpoznatiji fitosteroli korijena koprive su stigmasterol i kampesterol. Krauss i Spitteler (1990) identificirali su osamnaest fenolnih spojeva i devetnaest lignana u ekstraktima korijena koprive. Korijen koprive sadrži sljedeće lignane: sekoizolaricirezinol, 9,90-bisacetil-neo-olivil i njihove glukozide (Semalty i sur., 2017). Harborne i Williams (2000) navode da su u korijenu koprive pronađene sljedeće fenolne kiseline: elaginska, ferulinska, fumarna, galna, kava, klorogenska, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina. Flavonoidi izolirani iz korijena koprive su kvercetin, isoramnetin, katehin, kemferol, miricetin, naringin i rutin (Spina i sur., 2008). Skopoletin, derivat kumarina, koji ima antibakterijsko djelovanje, također je identificiran u korijenu koprive (Sajfrtová i sur., 2005). Semalty i sur. (2017) navode da se u korijenu koprive nalaze magnezij, mangan, bakar i cink. Ekstrakt korijena koprive koristi se u obliku šampona i drugih preparata protiv opadanja kose. Suhi korijen koprive koristi se kao organsko gnojivo (Jukić i Mužek, 2018).

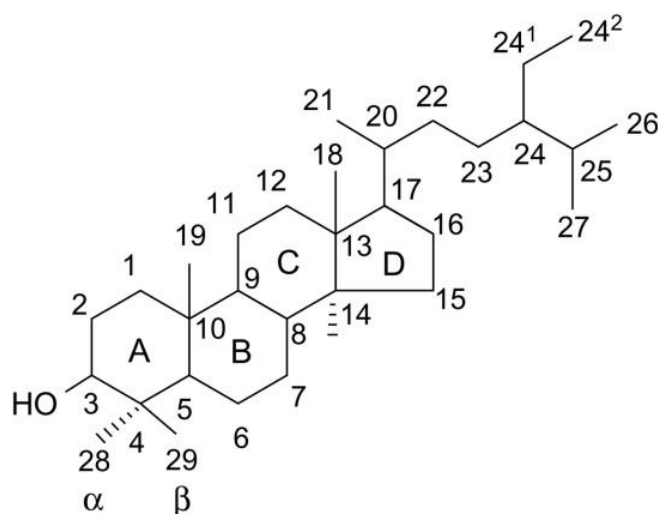
Rutto i sur. (2013) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj kuhanja, blanširanja i dodatka soli na sadržaj mineralnih tvari i nutritivnu vrijednost koprive. Tijekom dužeg izlaganja toplini i soli dolazi do blagog smanjenja udjela proteina, pepela, masti, dijetalnih vlakana, ugljikohidrata, kao i same kalorijske vrijednosti. Međutim, istraživanja pokazuju da *Urtica dioica* L. zadržava visok udio minerala, vitamina i esencijalnih hranjivih tvari i nakon navedenih tretmana.

2.2. FITOSTEROLI

Fitosteroli ili biljni steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena (Pine, 1994). To su steroidi s tetracikličkim prstenastim sustavom građeni od tri šesteročlana (cikloheksanska) i jednoga peteročlanog (ciklopentanskog) prstena s alifatskim lancem bočno vezanim za C-17 atom prstena. Na C-3 atom prstena vezana je

hidroksilna skupina (slika 2). Fitosteroli se mogu podijeliti u 3 skupine ovisno o broju metilnih skupina vezanih na C-4 atom prstena. Tako se oni koji sadrže 2 metilne skupine nazivaju 4-dimetilsteroli, oni s jednom skupinom 4-monometilsteroli, dok se fitosteroli bez metilne skupine na C-4 atomu prstena nazivaju 4-desmetilsteroli. Skupina 4-desmetilsterola dijeli se na Δ^5 -sterole koji na poziciji C-5 sterolnog prstena imaju dvostruku vezu te na Δ^7 -sterole koji sadrže dvostruku vezu između C-7 i C-8 atoma prstena.

Fitostanoli su derivati fitosterola koja u svojoj strukturi ne sadrži dvostruke veze.



Slika 2. Osnovna kemijska struktura sterola prema IUPAC-u (prema Katsouli i sur., 2020)

Fitosteroli i fitostanoli su bioaktivne komponente u biljkama i različitim namirnicama biljnog podrijetla i ne sintetiziraju se u ljudskom tijelu. Po svojoj strukturi i funkciji slični su kolesterolu, od kojeg se razlikuju drugačijom strukturom bočnog lanca. Dok bočni lanac kolesterola sadrži 8 ugljikovih atoma, većina bočnih lanaca fitosterola sadrži 9 ili 10 ugljikovih atoma (Kritchevsky i Chen, 2005).

Biosinteza i metabolizam sterola poprilično se razlikuju kod biljaka i životinja (Goodwin, 1985). Biljni steroli se dobivaju biosintezom iz skvalena. Steroli mogu biti u slobodnoj formi ili u obliku u estera koji nastaju vezanjem C-3 sterola s masnom kiselinom ili ferulinskom kiselinom (Kamal-Eldin i sur. 1998). Slobodni fitosteroli imaju ulogu stabilizacije fosfolipidnog sloja u biljnim staničnim membranama, kao kolesterol u životinjskim (Moreau i sur., 2002).

Izvor fitosterola i fitostanola su namirnice biljnog podrijetla, posebno biljna ulja (sojino, suncokretovo, kukuruzno, maslinovo i repičino ulje), orašasti plodovi, sjemenke i žitarice, naročito pšenica i raž (tablica 2) (Piironen i sur., 2000).

Tablica 2. Udio najzastupljenijih sterola u biljnim uljima (g kg⁻¹) (Piironen i sur., 2000)

BILJNA ULJA	Sitosterol	Kampesterol	Stigmasterol
Suncokretovo ulje	4,65	0,69	0,75
Maslinovo ulje	1,18-1.21	0,05	0,01
Kukuruzno ulje	9,89	2,59	0,98
Sojino ulje	1,22-2,31	0,62-0,76	0,45-0,76
Repičino ulje	2,84-3,58	1,56-2,48	0,02-0,04

Biljni steroli obuhvaćaju preko 250 različitih sterola i srodnih spojeva (Akihisa i sur., 1991). Bean (1973) je identificirao i opisao 44 različita sterola prisutna u biljkama. Glavni biljni steroli su β -sitosterol (24 α -etilkoolesterol), kampesterol (24 α -metilkoolesterol) i stigmasterol (D22, 24 α -etilkoolesterol). Ergosterol (D7,22, 24 α -metilkoolesterol) je glavni sterol kvasca i nalazi se u ulju kukuruza, sjemena pamuka, kikirikija i lanenog ulja (Moreau i sur., 2002).

Unos 2 g fitosterola i fitostanola na dan doprinosi snižavanju razine koncentracije kolesterola u krvi za 8-10 % neovisno o dobi, spolu, tjelesnoj težini i dr. U tipičnoj zapadnjačkoj prehrani, prosječni dnevni unos fitosterola je oko 300 mg, a fitostanola oko 30 mg (Gylling i sur., 1999).

Navedene tvari smanjuju apsorpciju kolesterola iz hrane u tankom crijevu zauzimajući prostor u micelama umjesto kolesterola pa se više kolesterola izlučuje stolicom, a ne apsorbira u krv kroz stijenku crijeva. One također potiču nastanak LDL-receptora na stanicama jetre što uzrokuje uklanjanje većeg broja LDL-kolesterola iz krvi i smanjenje njegove koncentracije u krvi. U pokusima na životinjama, biljni steroli i stanoli također su pokazali da usporavaju razvoj ateroskleroze (Reiner i Tedeschi-Reiner, 2007). U brojnim radovima navodi se da fitosteroli, osobito β -sitosterol, imaju antikancerogeni učinak na razvoj raka pluća, debelog crijeva, želuca i dojke. β -sitosterol inhibira proizvodnju reaktivnih metabolita kisika (ROS) kroz povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su Mn superoksid dismutaza i glutation peroksidaza (Lombardo i sur., 2018).

2.2.1. Steroli korijena koprive

U korijenu koprive identificirani su sljedeći steroli: β -sitosterol (0,2-1 %), 7β -hidroksitosterol (0,001 %), 7α -hidroksisitosterol (0,001 %), β -sitosterol-3-*O*- β -glukozid (0,032-0,2 %), (6'-*O*-palmitoil)-sitosterol-3-*O*- β -D-glukozid (0,003 %), 7β -hidroksisitosterol- β -D-glukozid (0,0005 %), 7α -hidroksisitosterol- β -glukozid (0,0005 %) i 24R-etil-5 α -kolestan-3 β ,6 α -diol (0,0015 %) (HMPC, 2012).

HPLC-NMR metodom iz korijena koprive izolirana je sterolna frakcija u kojoj su detektirani β -sitosterol (81 %), sitostanol (12 %) i kampesterol (6 %), a jedan spoj nije bio identificiran (1 %) (Horník i sur., 2013).

Assaf i sur. (2020) izolirali su 69 različitih spojeva iz uzoraka roda *Urtica*, među njima 12 sterola, dok je iz samog korijena koprive izolirano 8 sterola: kampesterol, β -sitosterol, 24R-etil-5 α -kolestan-3 β ,6 α -diol, 7β -hidroksi-sitosterol, 7α -hidroksi sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozid, 7β -hidroksi sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozid, 6'-*O*-palmitoil-sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozid i β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozid.

Chaurasia i Wichtl (1987) izolirali su 6 sterolnih spojeva i spektroskopskim metodama odredili njihove strukture: (6'-*O*-palmitoil)-sitosterol-3-*O*- β -D-glukozid, 24R-etil-5 α -kolestan-3 β ,6 α -diol, 7α -hidroksisitosterol, 7β -hidroksisitosterol, 7β -hidroksisitosterol-3-*O*- β -D-glukozid i 7α -hidroksisitosterol-3-*O*- β -D-glukozid. Posljednja 4 navedena spoja poznati su kao oksidacijski produkti sitosterola i sitosterol-3-*O*- β -D -glukozida.

Sajfrtová i sur. (2005) koristili su superkritični CO₂ kao ekstrakcijsko otapalo za izolaciju β -sitosterola (22,23-dihidrostigmasterol) i skopoletina (7-hidroksi-6-metoksikumarin) iz korijena koprive. Ekstrakti su potom analizirani HPLC metodom. Navode da su u usporedbi s ekstraktom dobivenim konvencionalnom ekstrakcijom organskim otapalom (dietil eter), ekstrakti dobiveni izolacijom pomoću superkritičnog CO₂, sadržavali dvostruko veći udio β -sitosterola (0,63 mg g⁻¹ s.t.) i skopoletina (0,058 mg g⁻¹ s.t.) Prinosi ekstrakcije dietil eterom iznosili su 0,26 mg g⁻¹ s.t. β -sitosterola te 0,016 mg mg g⁻¹ s.t. skopoletina.

Ekstrakti korijena koprive najčešće se koriste za liječenje benigne hiperplazije prostate, inhibirajući interakciju faktora rasta i receptora u stanicama prostate (Upton, 2013). β -sitosterol i skopoletin su biokemijski markeri kojima se pripisuju pozitivni učinci na BHP (Nahata i Dixit, 2012).

Hirano i sur. (1994) dokazali su kako steroli korijena koprive (stigmast-4-en-3-on, stigmasterol i kampesterol) inhibiraju Na^+ , K^+ -ATPaznu aktivnost u stanicama benigne hiperplazije prostate, što posljedično dovodi do potisnutog metabolizam i rasta stanica prostate. Enzimaska aktivnost inhibirana je u rasponu 23,0-67,0 % pri koncentracijama 10^{-3} - 10^{-6} M. Najjače inhibicijsko djelovanje (iznad 50 %) pokazao je stigmast-4-en-3-on pri koncentracijama ispod 10^{-5} M (Upton, 2013).

Korijen koprive u Njemačkoj se koristi kao sastavni dio odobrenih lijekova za liječenje benigne hiperplazije prostate (Bombardelli i Morazzoni, 1997). Biljna mješavina pod nazivom "Antidiabetis", koja sadrži korijen i druge dijelove koprive ubrane u Hrvatskoj, pokazala je pozitivne učinke na zdravlje u vidu smanjenja razine glukoze u krvi (Petlevski i sur., 2001).

β -sitosterol je inhibitor 5- α -reduktaze što dovodi do inhibicije konverzije testosterona u dihidrostersteron. Uočene su pozitivne posljedice na razvoj akni, androgene alopecije, BHP i hirutizma (Lombardo i sur., 2018).

2.3. IZOLACIJA LIPIDNE FRAKCIJE

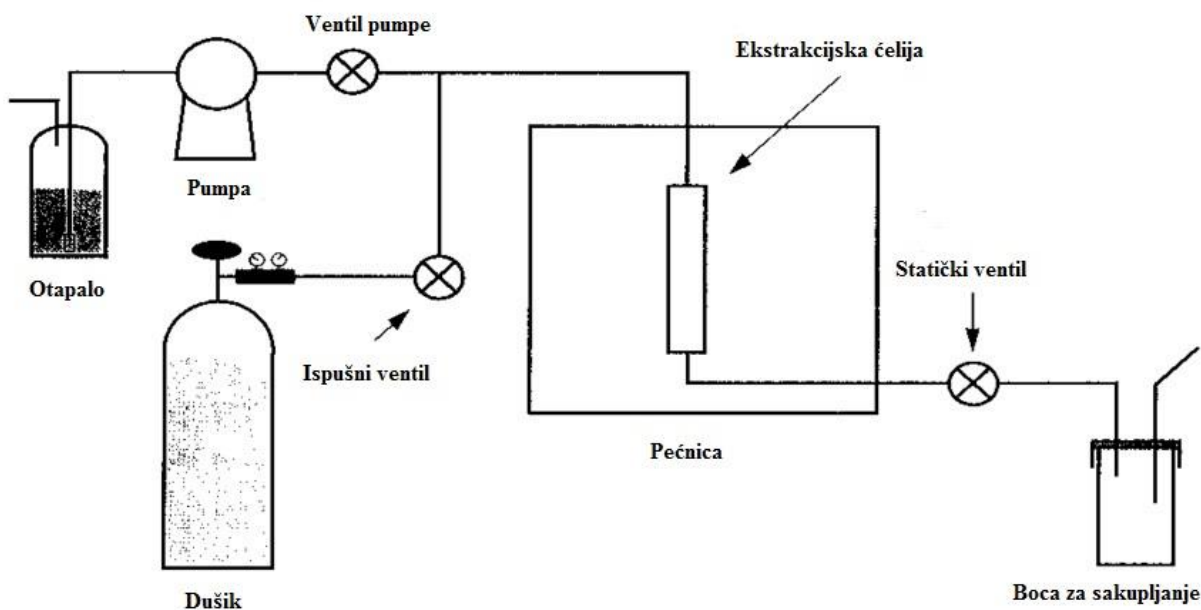
Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom je omogućena separacija topljivih biljnih metabolita uz primjenu selektivnog otapala. Metode izolacije fitosterola temelje se na prirodi matriksa i formi samog sterola (slobodna, esterificirana ili glikozilirana). Kako bi se iz biljnog materijala dobio visokokvalitetni ekstrakt s maksimalnim prinosom potrebno je odabrati učinkovitu metodu ekstrakcije i optimirati sve parametre (Uddin i sur., 2018). Dva osnovna tipa ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje su kruto-tekuće i tekuće-tekuće. Ekstrakcijom kruto-tekuće topljivi sastojci smjese odvajaju se od netopljivih ili slabo topljivih staničnih sastojaka primjenom otapala u kojem su ciljane komponente topljivije od ostatka uzorka. Općenito se za ekstrakciju različitih kemijskih spojeva u sustavima kruto-tekuće, koriste brojne konvencionalne metode, kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija, hidrodestilacija i perkolacija. Ekstrakcija po Soxhletu najčešće je korištena tehnika za ekstrakciju ulja iz različitih uzoraka, a već duže od stoljeća koristi se kao standardna metoda prema kojoj se validiraju nove metode. Iako dobro uhodana, metoda zahtijeva utrošak većih količina organskih otapala i vremena te nije automatizirana (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010). Stoga su danas sve češće u upotrebi druge metoda ekstrakcije koje daju veće prinose i omogućavaju veću stabilnost bioaktivnih molekula tijekom ekstrakcije (Richter i sur., 1996).

U novije vrijeme, prednost se sve više daje zelenim tehnikama ekstrakcije koje osiguravaju ekološki prihvatljivu i učinkovitu ekstrakciju uz manju potrošnju energije i otapala (Chemat i sur., 2012). Neke od najčešćih modernijih metoda su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim fluidima te otapalima pri povišenom tlaku (Zhang i sur., 2018).

2.3.1. ASE

ASE je automatizirana ekstrakcijska tehnika kod koje se ekstrakcija otapalom provodi pri povišenoj temperaturi i tlaku (Mottaleb i Sarker, 2012). To je relativno nova tehnologija ekstrakcije koja se koristi za izolaciju bioaktivnih molekula iz različitih vrsta biljnog materijala, čvrstih i polučvrstih uzoraka i predstavlja alternativu ekstrakciji po Soxhlet-u. Metodu je predstavila tvrtka Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995. godine (Mustafa i Turner, 2011). Ekstrakcija obično traje 15–25 min, uz utrošak 15–45 ml otapala, pri tlaku od 3,5 do 20 MPa (Mottaleb i Sarker, 2012).

Uređaj za ASE sastoji se od spremnika s otapalom, pumpe koja služi za ostvarivanje radnog tlaka i transport ekstrakcijskih otapala, pećnice koja sadrži ekstrakcijsku ćeliju s automatskim sustavom zatvaranja, spremnika s tekućim dušikom koji suši ekstrahirani analit po završetku ekstrakcije te boce za sakupljanje ekstrakata (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz ASE sustava (prema Richter i sur., 1996)

Postupak ekstrakcije kombinacija je dinamičkog i statičkog protoka otapala kroz zagrijanu ekstrakcijsku ćeliju koja sadrži uzorak. Volumen ćelije obično se kreće od 1 do 100 mL (Luthria i sur., 2004). U ekstrakcijske ćelije zajedno s uzorkom postavlja se i specijalizirani filter te adsorbent kako bi se povećala površina uzorka i brzina protoka te pospješila učinkovitost procesa. Učinkovita ekstrakcija zahtijeva veličinu čestica manju od 1 mm. Što je površina uzorka više izložena otapalu, to će se ekstrakcija brže odvijati. Priprema uzorka uglavnom uključuje mljevenje, raspršivanje i sušenje (Mottaleb i Sarker, 2012). Ekstrakcijska ćelija postavlja se u rotirajući utor uređaja te prenosi do pećnice. U pećnici dolazi do punjenja ćelije otapalom, izravnog zagrijavanja ćelije i podešavanja tlaka iznad praga potrebnog za održavanje otapala u tekućem stanju. Nakon što se postigne toplinska ravnoteža ćelija se još određeno vrijeme zadržava u pećnici pod konstantnom temperaturom i tlakom. Tijekom tog statičkog vremena dolazi do difuzije analita iz matriksa u otapalo. Ekstrakti se obično sakupljaju u staklenu bocu volumena od 40 do 250 mL koja je postavljena na rotirajućem pladnju. Važno je da svo otapalo korišteno u procesu ekstrakcije prikupi za analizu. Nakon završetka ekstrakcije, ćelija se vraća u početnu poziciju i uređaj je spreman za novu ekstrakciju (Mottaleb i Sarker, 2012; Luthria i sur., 2004).

Ekstrakcija se provodi pri temperaturama višim od temperature vrelišta otapala, što zahtijeva visoki tlak (~ 10 MPa) u ćeliji kako bi se otapalo održalo u tekućem stanju te se na taj način povećava brzina difuzije i smanjuje količina otapala potrebnog za ekstrakciju. Povišena temperatura utječe na svojstva otapala i uzrokuje povećanu topljivost analita, povećanje brzine difuzije, slabljenje ili kidanje interakcija (vodikovih veza, van der Waalsovih sila te dipol-dipolnih interakcija) između analita i matrice uzorka te smanjenje viskoznosti i površinske napetost otapala, što pospješuje prijenos mase (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). Zahvaljujući mogućnosti podešavanja temperature i tlaka ASE tehnika pruža mogućnost korištenja širokog raspona otapala (uz izuzetak jakih kiselina i lužina te otapala zapaljivih pri temperaturama od 40 do 200 °C), čak i onih koja nisu učinkovita u konvencionalnim metodama. Međutim, to može rezultirati smanjenom selektivnošću jer dolazi do topljenja komponenti matriksa koje bi pod uvjetima konvencionalne ekstrakcije ostale netopljive. Najčešće korišteno otapalo ASE tehnike je voda, ali koriste se i *n*-heksan, aceton, diklormetan, etil acetat i dr. (Poojary i sur., 2016). ASE metodom omogućeno je provođenje ekstrakcije u više ciklusa, s ciljem uvođenja svježeg otapala, a time i održavanja povoljne ekstrakcijske ravnoteže. Važan parametar za ekstrakciju je i statičko vrijeme ekstrakcije jer neki uzorci mogu zadržati analite unutar pora pa povećavanjem statičkog

vremena pri povišenoj temperaturi može doći do difuzije tih spojeva u ekstrakcijsko otapalo (Mottaleb i Sarker, 2012).

U usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije prednosti ASE metode su brojne. Dok se za konvencionalne metode uobičajeno vrijeme ekstrakcije kreće u rasponu od 4 do 48 h, vrijeme ekstrakcije ASE metode znatno je kraće, od 12 do 20 min. Volumen korištenih otapala može biti čak 10-20 puta manji nego kod tradicionalnih metoda ekstrakcije, a samim time se smanjuje količina otpadnih tvari, što ovu metodu čini ekološki prihvatljivijom od konvencionalnih metoda. Smanjena potrošnja energije i organskih otapala utječe na smanjenje troškova cijelog postupka. ASE uređaj pruža zaštitu spojevima osjetljivim na kisik i svjetlost. (Raut i sur., 2015; Luthria i sur., 2004). ASE je učinkovita i potpuno automatizirana tehnika koja zahtjeva manje radne snage, dok je reproducibilnost metode veća (Alvarez-Rivera i sur., 2019).

Međutim, troškovi opreme su visoki, kao i troškovi primjene visoke temperature i visokog tlaka. Ukoliko parametri nisu odgovarajuće podešeni, prinos termolabilnih spojeva može biti niži, a zbog povišene temperature i tlaka može doći do otapanja komponenata matriksa koje bi inače ostale netopljive u uvjetima konvencionalne ekstrakcije. Zbog niske selektivnosti procesa, u slučaju kompliciranih matrica, dobivene ekstrakte potrebno je očistiti i ponovno koncentrirati prije konačne analize (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001.; Ameer i sur., 2017). Budući da svaki parametar može imati značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije, potrebno je optimizirati ekstrakcijske uvjete kako bi se postigao maksimalan učinak ove metode (Jentzer i sur., 2015).

Za ekstrakciju ulja iz osušenih sjemenki komorača Rodríguez-Solana i sur. (2014) koristili su ASE i Soxhlet ekstrakciju. Dobiveni optimalni uvjeti za ASE iznosili su 125 °C/7 min/3 ciklusa uz metanol kao otapalo. U usporedbi s ASE tehnologijom, Soxhlet tehnologija u njihovom istraživanju postigla je veću učinkovitost ekstrakcije i veću količinu ekstrahiranih spojeva. Međutim, s industrijskog stajališta, ASE je prihvatljivija tehnika jer koristi manju količinu otapala (15 ml) i kraće vrijeme ekstrakcije (30 min) u odnosu na Soxhlet metodu (150 ml, 8 sati).

Balbino i sur. (2021) proveli su istraživanje u kojem su ispitali učinkovitost metoda ekstrakcije ulja iz nekoliko različitih vrsta sjemenki iz obitelji Apiaceae. Primjenom ASE najveći prosječni sadržaj ukupnih sterola (782,7 mg 100 g⁻¹) određen je u lipidnim frakcijama dobivenim pri 100 °C, dok je prosječni sadržaj ukupnih sterola dobiven pri 25 °C bio niži

(538,1 mg 100 g⁻¹) od rezultata određenih konvencionalnim metodama (Soxhlet ekstrakcija i ekstrakcija uz miješanje pri sobnoj temperaturi) što dovodi do zaključka kako sam učinak visokog tlaka nije dovoljan za učinkovitu izolaciju sterola. Također, Moreau i sur. (2003) koristili su ASE pri 40 i 100 °C za ekstrakciju sterolne frakcije iz kukuruza i zobi te su utvrdili da primjena visokih temperatura povećava koncentraciju sterola u dobivenom ekstraktu.

Repajić i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj parametara ASE (temperatura, statičko vrijeme i broj ciklusa) na ekstrakciju polifenola i pigmenata iz listova koprive, dok su ostali parametri bili konstantni, a kao otapalo za ekstrakciju korišten je etanol (96 %). Utjecaj temperature, statičkog vremena i broja ciklusa imao je značajan utjecaj ($p < 0,01$) na sve skupine polifenola kao i na ukupne fenolne spojeve, dok je značajan utjecaj broj statičkih ciklusa ekstrakcije na sadržaj ukupnih hidrocimetnih kiselina izostao. Porast temperature s 20 na 110 °C rezultirao je značajno većim udjelom ukupnih hidrocimetnih kiselina (od 16,87 do 255,51 mg 100 g⁻¹), ukupnih flavonoida (od 3,67 do 80,16 mg 100 g⁻¹) i ukupnih fenolnih spojeva (od 20,54 do 335,67 mg 100 g⁻¹). Također, utvrđeno je kako dulje statičko vrijeme (10 min) daje gotovo dvostruki prinosi svih ispitanih skupina spojeva u odnosu na statičko vrijeme od 5 min. Što se tiče broja ciklusa, najveći prinosi polifenola postignuti su tijekom trećeg ekstrakcijskog ciklusa.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje ekstrakcijskih uvjeta ASE (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) za izolaciju lipidne frakcije iz korijena koprive. U svim dobivenim uzorcima lipidne frakcije određen je udio i sastav sterola i pentacikličkih triterpenoida pomoću plinske kromatografije.

3.1. MATERIJAL

Za provođenje eksperimentalnog dijela korišten je komercijalno dostupan uzorak osušenog korijena koprive (*Urtica dioica* L.) sakupljen tijekom 2020. god. (Suban d.o.o., Hrvatska). Prije provođenja postupka ekstrakcije, osušeni korijen koprive usitnjen je pomoću električnog mlinca (slika 4). Usitnjeni uzorak korišten je za ekstrakciju lipidne frakcije primjenom ASE.



Slika 4. Osušeni korijen koprive prije i nakon usitnjavanja (vlastita fotografija)

3.1.1. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Balingen, Njemačka)

- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Rotacijski vakuum uparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex Digitec DT 514, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlin, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka)
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Uređaj za plinsku kromatografiju Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljen s:
 - plameno-ionizacijski detektor (FID)
 - maseni detektor (MS) tipa Agilent Technologies 5973 *inert* Mass Selective Detector
 - računalni software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

Pribor:

- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Ekstrakcijska ćelija od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Plastične kivete (Falcon, 50 mL)
- Plastična čašica
- Staklena bočica (250 mL)
- Viale (20 i 2 mL), insert 100 µL
- Staklene čaše (50, 100 i 200 mL)
- Pipete (1, 2 i 5 mL)
- Mikropipete Eppendorf (100 i 1000 µL)
- Odmjerne tikvice (10, 25 i 100 mL)

- Menzura (100 mL)
- Stakleni lijevci
- Filter-papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Čahura za ekstrakciju
- Vata
- Kuglice za vrenje
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Okrugle tikvice s ravnim dnom (100 mL)
- Tikvice s okruglim dnom (25 i 50 mL)
- Povratno hladilo
- Plinski plamenik
- Azbestna mrežica
- Kolona za kromatografiju sa sinterom na dnu
- Stakleni štapić
- Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Silikagel F254, Macherey-Nagel, GmbH, Co. KG)
- Razvijajuće kadice za TLC
- Metalna špatula
- Eksikator sa silikagelom

3.1.2. Kemikalije, standardi i plinovi

- Spremnik s dušikom (Messer Croatia Plin d.o.o., Zaprešić, Hrvatska)
- Dijatomejska zemlja 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)

- *n*-heksan, p.a. (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- Aceton, p.a. (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (96 %-tni, odzračeni, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanolna otopina kalijevog hidroksida (0,5 mol L⁻¹)

Priprema: odvaži se 3 g kalijevog hidroksida, otopi u 5 mL vode i razrijedi etanolom do 100 mL.

- Interni standard, α -kolestanol (1,0 mg mL⁻¹, Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka)

Priprema: odvaži se 0,1 g α -kolestanola i razrijedi acetonom do 100 mL.

- Kolesterol (1,0 mg mL⁻¹, Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka)

Priprema: odvaži se 0,1 g kolesterola i razrijedi acetonom do 100 mL.

- Aluminijev oksid (0,063 mm – 0,200 mm; udio vode 0 %, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium)
- Dietil-eter, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

- Razvijajući reagens (TLC) – heksan/dietil-eter (v/v)

Priprema: heksan i dietil-eter pomiješaju se u omjeru 1:1.

- Metanol, p.a. (Fisher Scientific, Loughborough, UK)

- Sililirajući reagens

Priprema: piridin (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka), heksametildisilazan(Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka) i trimetilklorosilan (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka) miješaju se u omjeru 5:2:1 (v/v/v)

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija lipidne frakcije

Ekstrakcija lipida iz osušenog korijena koprive ASE tehnikom provedena je primjenom uređaja ASE Dionex 350® (slika 5) prema eksperimentalnom planu pokusa dobivenom pomoću Box–Behnken dizajna s tri faktora na tri razine i pet centralnih točaka (tablica 3). Parametri koji su varirani tijekom eksperimenta bili su: temperatura (70 do 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 do 15 min) i broj ciklusa ekstrakcije (2 do 4) čime je dobiveno ukupno 17 ekstrakata.

Približno $5 \pm 0,0001$ g osušenog i prethodno usitnjenog uzorka korijena koprive odvaže se u plastičnoj čašici na analitičkoj vagi te se doda pola mjerice dijatomejske zemlje i sve skupa se dobro izmiješa kako bi se postigla bolja ekstrakcijska učinkovitost. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika (34 mL) postave se tri celulozna filtera na dno ćelije te se potom u nju prebaci smjesa uzorka i dijatomejske zemlje, nakon čega se ćelija gotovo do vrha ispuni dijatomejskom zemljom i postavi se još jedan celulozni filter. Ekstrakcijska ćelija ručno se zatvara i postavlja na predviđeno mjesto uređaja. Postupak ekstrakcije lipida provodi se uz *n*-heksan kao otapalo, pri tlaku 10,34 MPa, volumenu ispiranja 50 % te uz vrijeme propuhivanja dušikom 30 s. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakti sakupljeni u staklenim bočicama (250 mL) prenesu se u tikvice s okruglim dnom. Otapalo se otpari gotovo do suha na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi od 40 °C. Dobiveni ekstrakti ulja prenesu se u prethodno izvagane viala (20 mL), zatim se propuhuju dušikom s ciljem uklanjanja ostatka otapala, nakon čega se viala hermetički zatvara i čuva pri temperaturi od -18 °C do provođenja analiza.



Slika 5. ASE Dionex 350® uređaj (vlastita fotografija)

Tablica 3. Eksperimentalni dizajn pokusa ekstrakcije lipidne frakcije primjenom ASE

NAZIV UZORKA	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	BROJ CIKLUSA
1	70	5	3
2	110	5	4
3	110	15	2
4	110	10	3
5	150	10	4
6	150	10	2
7	110	10	3
8	70	15	3
9	110	10	3
10	70	10	4
11	110	15	4
12	150	5	3
13	110	5	2
14	110	10	3
15	110	10	3
16	150	15	3
17	70	10	2

3.2.2. Određivanje prinosa lipidne frakcije

Prinos lipidne frakcije računa se prema jednadžbi [1]:

$$\text{prinos (\%)} = \frac{m_{LF}}{m_K} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_{LF} = masa lipidne frakcije (g)

m_K = masa osušenog korijena koprive (g)

3.2.3. Određivanje udjela i sastava sterola

Metoda HRN EN ISO 12228:2004 korištena je za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima lipidne frakcije korijena koprive.

Metoda se temelji na dodatku unutarnjeg standarda α -kolestanola lipidnoj frakciji korijena koprive te podvrgavanju saponifikaciji u prisutnosti etanolne otopine KOH. Neosapunjiva frakcija ekstrahira se na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom prilikom čega se kao otapalo koristi dietileter. Aluminijev oksid je stacionarna faza koja zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu iz neosapunjive frakcije izdvaja se sterolna frakcija, koja se potom prevodi u trimetilsililestere te analizira plinskom kromatografijom.

3.2.3.1. Priprema neosapunjive frakcije

Pomoću ultrazvučne kupelji otopi se ukupna dobivena masna frakcija zaostala po stijenkama viala te se prebaci u okruglu tikvicu s ravnim dnom (100 mL). Doda se 1 mL prethodno pripremljenog α -kolestanola ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$), 5 mL KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$) i dvije do tri kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na vodeno hladilo i zagrijava se na suhoj kupelji do vrenja, nakon čega se ostavi da vrije točno 15 min. Nakon isteka vremena tikvica se odvoji od hladila. Pipetom se u tikvicu doda 5 mL etanola i pusti da se sadržaj ohladi do sobne temperature, nakon čega slijedi kromatografija na stupcu.

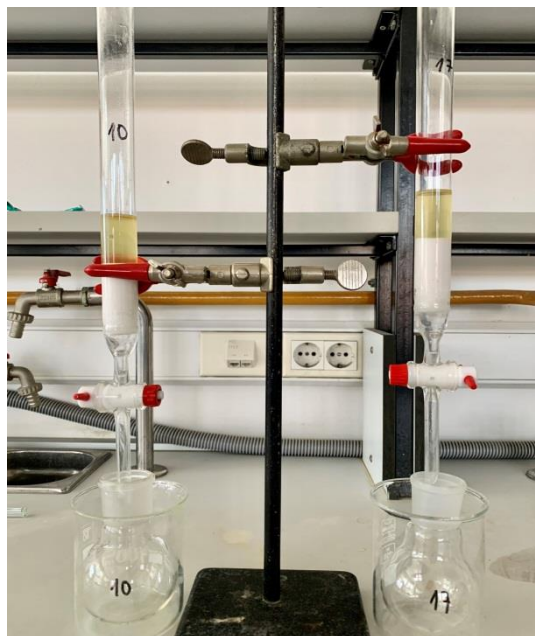
3.2.3.2. Priprema kolone za kromatografiju u stupcu

Na metalni stalak pričvrsti se kolona za kromatografiju dugačka 25 cm, unutarnjeg promjera 1,5 cm sa sinterom na dnu kolone. Na dno kolone stavi se vata i doda malo etanola kako bi vata što bolje prionula uz sinter. Vata se pažljivo utisne što više uz sinter i pomoću staklenog štapića istisne se zaostali zrak iz vate. Odvaži se 10 g aluminijevog oksida koji se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju, pažljivo, kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola se ispusti iz kolone tako da nivo etanola bude 0,5 centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida.

3.2.3.3. Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu

Nakon što se ohladi, uzorak se iz tikvice pipetom prenese u pripremljenu kolonu (Slika 6). Eluat se skuplja u tikvicu od 100 mL okruglog dna, a eluiranje traje dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida. Proces eluiranja nastavlja se dodatkom 5 mL etanola u kolonu za kromatografiju. Tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak, ispere se s 10 mL dietiletera te se prenese u kolonu. Nakon što dietileter dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, u kolonu

se dodaje još 2×10 mL dietiletera iz menzure, čime se završava proces eluiranja. Dobiveni eluat se otpari do suhog na rotavaporu pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

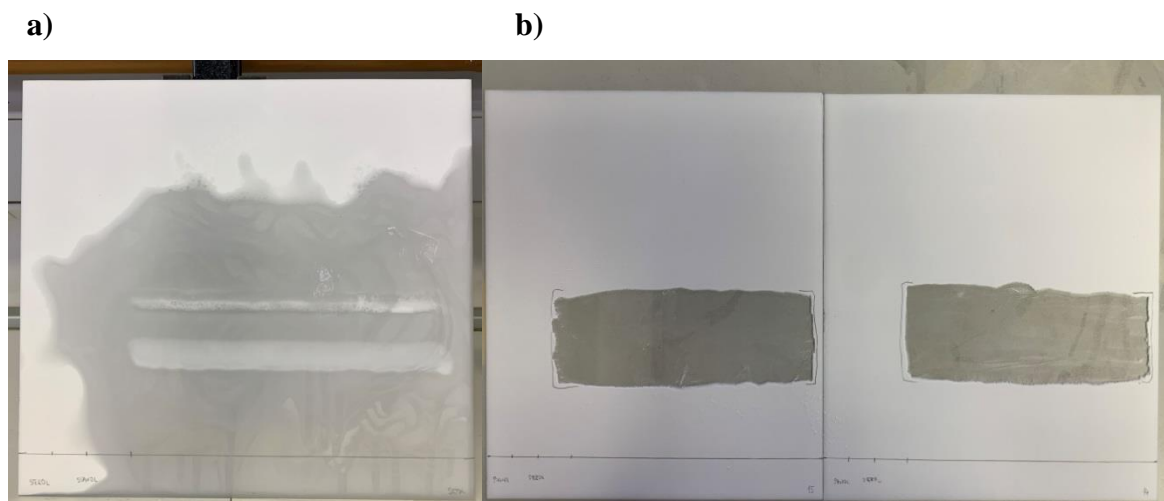


Slika 6. Ekstrakcija neosapunjive frakcije (vlastita fotografija)

3.2.3.4. Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

Metodom tankoslojne kromatografije (TLC) od neosapunjive lipidne frakcije odvajaju se steroli. Uzorak neosapunjive frakcije otopi se u 2 mL dietiletera i pomoću mikropipete nanese na gotovu ploču sa silikagelom (Silikagel F254, veličine 20x20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče. Kako bi se nakon razvitka kromatograma mogla identificirati sterolna frakcija, ispred linije, u istoj visini nanese se 2-3 μL referentne otopine α -kolestanola i kolesterola ($c=1\text{ mg mL}^{-1}$, u acetonu). Zatim se ploča sa silikagelom postavlja u kadicu za razvijanje koja sadrži 100 mL otopine heksana i dietiletera (1:1) te se zatvori poklopcem. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kada linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon toga, ploča se izvadi iz kadice i suši u digestoru, a kada se osuši, ravnomjerno se popraska metanolom (Slika 7a). Traka sterola prepoznaje se po referentnoj mrlji. Zone sterola označe se olovkom par mm ispod i iznad rubova mrlja. Unutar označenih rubova, metalnom špatulicom sastruže se silikagel s ploče (Slika 7b) te se doda 5 mL 96 %-tne otopine etanola i kvantitativno prebaci na lijevak s filter papirom. Sadržaj se ispire u tri navrata s 5 mL dietiletera u tikvicu s okruglim dnom volumena

50 mL. Sadržaj tikvice otparava se do suhog na rotavaporu pri temperaturi od 40 °C. U tikvicu sa sterolnom frakcijom se doda 1 mL dietiletera te se prenese u prethodno izvaganu epruvetu. Zatim se tikvica u kojoj je bila sterolna frakcija ispere s 0,5 mL dietiletera i sadržaj se također prebaci u epruvetu koja se propuše strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju te se zajedno s epruvetom izvaže na analitičkoj vagi.



Slika 7. Ploča s trakom sterola (a) i ostrugana traka sa sterolima (b) (vlastita fotografija)

3.2.3.5. Priprema trimetilsililetera

U epruvetu sa sterolnom frakcijom doda se po svakom mg frakcije 50 μ L reagensa za sililiranje, koji je mješavina piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 5:2:1 (v/v/v). Potom se epruveta začepi, protrese i stavi u sušionik na temperaturu od 105 °C na 15 min. Nakon sušenja, epruveta se premješta u eksikator na hlađenje i centrifugira 10 min na 3000 okretaja min^{-1} . Bistri supernatant se potom odvoji od taloga te se prenese u vialu od 2 mL s insertom od 100 μ L.

3.2.3.6. Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Pripremljen uzorak sterola analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System. Kromatograf je opremljen s automatskim injekcionim sustavom i plameno-ionizacijskim (FID) te masenim (MS) detektorom koji su preko kanala spojeni na računalo s instaliranim softverom MSD ChemStation Data Analysis. Uvjeti kromatografske analize prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti kromatografske analize

Kolona	DB-17 (Agilent) 30 m × 0,32 mm, debljina filma 0,25 μm
Stacionarna faza	(50%-fenil)-metilpolisiloksan
Temperaturni program kolone	180 do 270 °C uz 6 °C min ⁻¹ ; 270 °C 30 min
Trajanje analize	45 min
Plin nosioc	Helij
Protok plina nosioca	1,5 mL min ⁻¹
Temperatura injektora	290 °C
Split	13,3:1
Temperatura detektora (FID)	280 °C
Temperatura premosnice, MS izvora i kvadripola	280, 230 i 150 °C
Energija elektrona za ionizaciju	70 eV
Brzinu očitavanja, opseg razdvajanja mase i naboja (m/z)	1 očitavanje s ⁻¹ , 30 – 550
Količina injektiranog uzorka	1,0 μL

3.2.3.7. Identifikacija i kvantifikacija

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskih vremena izdvojenih spojeva analiziranih uzoraka s retencijskim vremenima komercijalno dostupnih standardnih smjesa spojeva analiziranih pod jednakim kromatografskim uvjetima te usporedbom masenih spektara (m/z) u bazi podataka NIST 2017 (NIST, Gaithersburg, SAD).

Koncentracija spoja u lipidnoj frakciji ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) izračuna se prema formuli [2]:

$$c_{LF} = \frac{\sum A_s \cdot 100}{A_a \cdot m_{LF}} \quad [2]$$

gdje je:

c_{LF} = koncentracija spoja u lipidnoj frakciji ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)

A_s = površina spoja

A_α = površina α -kolestanola

m_{LF} = masa uzorka lipidne frakcije korijena koprive (g)

Koncentracije pojedinačnih i ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida prikazane su kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja te su izraženi kao mg 100 g⁻¹ osušenog korijena koprive prema formuli [3]:

$$c_K = \frac{m_{LF}}{m_K} \cdot c_{LF} \quad [3]$$

gdje je:

c_K = koncentracija spoja u korijenu koprive (mg 100 g⁻¹)

m_{LF} = masa lipidne frakcije (g)

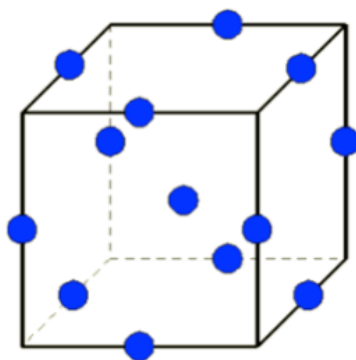
m_K = masa osušenog korijena koprive (g)

c_{LF} = koncentracija spoja u lipidnoj frakciji (mg 100 g⁻¹)

3.2.4. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišteni su programski sustavi Design-Expert 13.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD) i XLSTAT 2021.23.2.1141.0 (Addisoft, Pariz, Francuska).

Za dizajn eksperimentalnog plana pokusa korišten je Box–Behnken dizajn s tri faktora. Dizajn Box-Behnken neovisni je kvadratni dizajn jer ne sadrži ugrađeni faktorski ili frakcijski faktorski dizajn. U ovom dizajnu kombinacije faktora nalaze se na srednjim rubovima procesnog prostora i u središtu (slika 8). Ovi se dizajni mogu okretati (ili gotovo okretati) i zahtijevaju 3 razine svakog faktora (NIST/SEMATECH, 2012).



Slika 8. Primjer Box–Behnken dizajna s tri faktora (Ait-Amir i sur., 2020)

Utvrđene su gornje i donje granice ispitivanih parametara: temperatura ekstrakcije 70 do 150 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5 do 15 min te broj ciklusa ekstrakcije 2 do 4. Svaki ispitivani parametar promatran je na tri razine (-1, 0, 1) što je ukupno 17 pokusa uključujući faktorske i centralnu točku s pet ponavljanja (tablica 3).

Za utvrđivanje signifikantnih razlika između uzoraka obzirom na prinos (%), i udjele ukupnih i pojedinačnih sterola i pentacikličkih triterpenoida korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i post-hoc Tukey test na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti.

U svrhu optimiranja ASE uvjeta korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Regresijski modeli za promatrane ovisne varijable izračunati su u skladu sa sljedećom jednadžbom [4]:

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

[4]

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 faktora (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) provedena je ANOVA. Kao ovisne varijable promatrani su prinos lipidne frakcije korijena koprive (%), udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te udio β -sitosterola ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Valjanost empirijskih modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom ANOVA na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti.

Iste varijable [lipidna frakcije korijena koprive (%), udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te udio β -sitosterola ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)] uključene su u optimizaciju ASE uvjeta koja je provedena metodom poželjnosti. Sve odabrane varijable obilježene su faktorom važnosti 5.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje uvjeta ASE za izolaciju sterola i pentacikličkih triterpenoida iz korijena koprive. Parametri ASE koji su varirani tijekom eksperimenta bili su: temperatura (70 do 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 do 15 min) i broj ciklusa ekstrakcije (2 do 4) čime je dobiveno ukupno 17 uzoraka lipidne frakcije korijena koprive prema Box-Benkhen dizajnu s 5 centralnih točaka. Za svaki uzorak određen je prinos lipidne frakcije te je ispitan udio i sastav sterola i pentacikličkih triterpenoida pomoću plinske kromatografije. Za usporedbu uzoraka obzirom na prinos (%) i udjele ukupnih i pojedinačnih sterola i pentacikličkih triterpenoida korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i post-hoc Tukey test na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti. Također je ispitan utjecaj ekstrakcijskih uvjeta (temperature, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije) na prinos lipidne frakcije i udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te β -sitosterola te je provedeno optimiranje navedenih parametara u svrhu postizanja maksimalnog prinosa lipidne frakcije i udjela ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te β -sitosterola.

4.1. PRINOS LIPIDNE FRAKCIJE TE PROSJEČAN SASTAV I UDIO UKUPNIH STEROLA I PENTACIKLIČKIH TRITERPENOIDA

U tablici 5 prikazan je dobiveni prinos (%) lipidne frakcije korijena koprive. Iz rezultata je vidljivo da se prinos uzoraka kreće u rasponu od $0,39 \pm 0,01$ do $1,63 \pm 0,03$ % s prosječnom vrijednosti $0,90 \pm 0,34$ %. Najviši prinos ($1,63 \pm 0,03$ %) zabilježen je u uzorku 6 koji je dobiven pri temperaturi od 150 °C tijekom 2 ciklusa uz statičko vrijeme 10 min. Najniži prinos ($0,39 \pm 0,01$ %) određen je u uzorku 1, dobivenom u 3 ciklusa pri temperaturi od 70 °C uz statičko vrijeme od 5 min. Rezultati statističke analize pokazali su signifikantne razlike u prinosu između uzoraka (tablica 5). Uzorci 5, 6 i 12 dobiveni pri temperaturi od 150 °C imali su signifikantno viši prinos od ostalih, dok su uzorci 1, 8, 10 i 17 dobiveni pri temperaturi od 70 °C imali značajno niži prinos, što upućuje na zaključak da se viši prinos postiže pri višoj temperaturi. Lebovka i sur. (2016) navode kako prinos lipidne frakcije ovisi o primijenjenoj metodi ekstrakcije, ali i uvjetima kao što su temperatura procesa, vrijeme ekstrakcije, vrsta ekstrakcijskog otapala omjer sjemena i otapala i dr.

Tablica 5. Prinos lipidne frakcije (%) te udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida (mg 100 g⁻¹) u korijenu koprive

Uzorak	Prinos	Ukupni steroli i pentaciklički triterpenoidi
	p<0,001*	p<0,001*
1	0,39±0,01 ⁱ	43,50±0,05 ⁿ
2	0,83±0,00 ^{ef}	66,36±0,14 ^f
3	0,93±0,04 ^d	72,12±0,01 ^c
4	1,00±0,00 ^c	65,55±0,19 ^g
5	1,35±0,02 ^b	78,26±0,35 ^a
6	1,63±0,03 ^a	72,98±0,33 ^b
7	0,87±0,02 ^{de}	71,25±0,14 ^d
8	0,53±0,01 ^h	61,12±0,02 ^j
9	0,92±0,00 ^d	65,36±0,10 ^g
10	0,55±0,01 ^h	62,61±0,19 ⁱ
11	0,88±0,02 ^{de}	64,42±0,18 ^h
12	1,57±0,01 ^a	70,11±0,17 ^e
13	0,68±0,01 ^g	53,43±0,11 ^l
14	0,79±0,01 ^f	62,92±0,06 ⁱ
15	1,02±0,01 ^c	66,31±0,13 ^f
16	0,87±0,01 ^{de}	49,50±0,21 ^m
17	0,53±0,01 ^h	57,59±0,04 ^k
Prosječna vrijednost	0,90±0,34	63,73±8,70

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

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

Prema našim saznanjima, ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje koje je primijenilo ASE za ekstrakciju sterola i pentacikličkih triterpenoida iz korijena koprive. Također, u dostupnoj literaturi postoji vrlo malo podataka o sterolima korijena koprive, stoga ovaj rad predstavlja vrijedne rezultate u tom području. Iako zbog malo dostupnih podataka nije bilo moguće usporediti dobivene rezultate s literaturnim podacima, rezultati su usporedivi s rezultatima istraživanja provedenih na drugim biljnih vrstama.

Balbino i sur. (2021) određivali su prinos lipidne ekstrakcije te udio i sastav masnih kiselina i sterola nekoliko sjemenskih začina iz obitelji Apiaceae pri čemu su usporedili nekoliko metoda ekstrakcije između kojih su primijenili i ASE pri temperaturi 25 i 100 °C. Usporedbom rezultata za prinos dobiven s ASE na spomenutim temperaturama vidljivo je da se viši prinos postigao pri temperaturi od 100 °C (prosječna vrijednost 6,60 %) u odnosu na prinos dobiven pri 25 °C (prosječna vrijednost 4,93 %). Iako se radi o različitim biljnim vrstama, spomenuto istraživanje potvrđuje trend povećanja prinosa u ovisnosti o primijenjenoj temperaturi.

Obzirom na mali broj dostupnih literarnih podataka o utjecaju ASE uvjeta na prinos lipidne frakcije iz koprive, u nastavku su korišteni literaturni podaci istraživanja provedenih na drugim biljnih vrstama.

Castejón i sur. (2018) izolirali su lipidnu frakciju iz sjemenki trputaste lisičine (*Echium plantagineum*) uz etil acetat, heksan i etanol kao otapala. Optimalni uvjeti ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uz etanol kao otapalo bili su temperatura od 150 °C tijekom 10 min ekstrakcije. Pri navedenim uvjetima iz sjemenki trputaste lisičine ekstrahiran je vrlo sličan prinos ulja (31,2 %) kao Soxhlet ekstrakcijom uz upotrebu heksana tijekom 8 h (31,3 %). Općenito, više temperature rezultirale su učinkovitijom ekstrakcijom ulja za sva ispitana otapala, a maksimalni prinos dobiven pri temperaturi 150 °C bio je prilično sličan, bez obzira na korišteno otapalo: heksan (31,1 %), etil acetat (31,0 %) i etanol (31,2 %).

Lohani i sur. (2015) su primjenom ASE metode ekstrahirali ulje iz različitih uljarica (uljana repica, kamelina, lan i gorušica) pri tri različite temperature (80, 100 i 120 °C) tijekom 40, 65 i 90 min uz heksan i etil acetat kao otapalo. Rezultati ANOVA testa pokazuju kako vrijeme i temperatura ekstrakcije imaju značajan utjecaj ($p < 0,05$) na prinos ulja iz svih ispitanih uljarica i uz primjenu oba navedena otapala. Prinos ulja za različite uljarice povećavao se s povećanjem ekstrakcijskog vremena i temperatura. Duže vrijeme ekstrakcije omogućava da više ulja difundira u ekstrakcijsko otapalo. Povećanjem temperature smanjuje se viskoznost

otapala što pospješuje prodor u matricu uzorka i otapanje analita. Toplinska energija uzrokuje slabljenje ili kidanje veze analita i matrice uzorka te potiče difuziju analita s površine matrice. Maksimalni prinos ulja iz svih ispitanih uljarica određen je pri temperaturi 120 °C tijekom 90 min. Generalno, iz dobivenih rezultata vidljivo je da je temperatura imala značajniji utjecaj na prinos ulja u odnosu na vrijeme ekstrakcije.

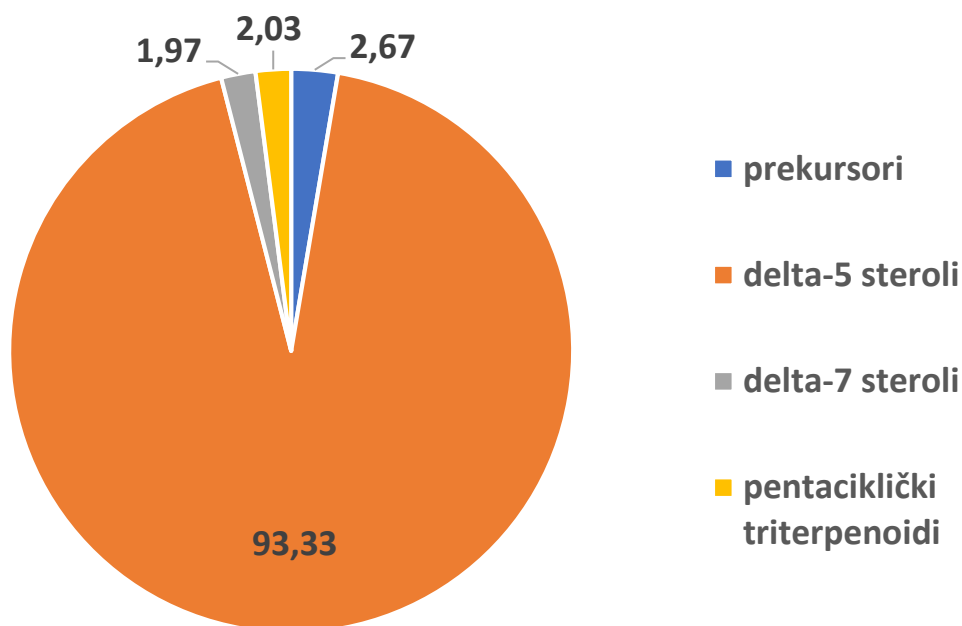
U analiziranim uzorcima lipidne frakcije korijena koprive plinskom kromatografijom određen je sastav i udio sterola i pentacikličkih triterpenoida. Udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida kretao se u rasponu od $43,50 \pm 0,05$ do $78,26 \pm 0,35$ mg 100 g⁻¹ korijena koprive, dok je prosječna vrijednost udjela iznosila $63,73 \pm 8,70$ mg 100 g⁻¹ korijena koprive (tablica 5). Vidljivo je kako je najniži udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida određen u uzorku 1, u kojem je također dobiven i najniži prinos, dok je najviši udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida određeni u uzorku 5 dobivenom pri 150 °C tijekom 4 ciklusa uz statičko vrijeme 10 min.

Ritoša (2020) je u uzorcima korijena samonikle koprive ubrane s više različitih lokacija na području Republike Hrvatske odredila prosječni udio sterola u rasponu od $0,62 \pm 0,00$ g kg⁻¹, do $0,95 \pm 0,00$ g kg⁻¹. U istraživanju koje je provela Robić (2020) određena je prosječna vrijednost ukupnih sterola u svim uzorcima u iznosu od 0,84 g kg⁻¹. Najviša koncentracija iznosila je 0,97 g kg⁻¹, dok je najniža koncentracija iznosila 0,66 g kg⁻¹. U oba istraživanja udio sterola je varirao u ovisnosti o lokaciji staništa.

Na temelju rezultata statističke analize, vidljivo je da udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida značajno varira između uzoraka odnosno ovisno o primijenjenim uvjetima ekstrakcije - temperaturi, statičkom vremenu ekstrakcije i broju ciklusa ekstrakcije.

Uzorci 3, 5, 6, 7, 12 sadržavali su viši udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida (>70 mg 100 g⁻¹ korijena koprive) od ostalih uzoraka. S obzirom da su uzorci 5, 6 i 12 dobiveni pri temperaturi 150 °C, a uzorci 3 i 7 pri temperaturi 110 °C može se zaključiti kako porastom temperature raste udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida.

Zanimljivo je kako je udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida u uzorku 16 iznosio $49,50 \pm 0,21$ mg 100 g⁻¹ korijena koprive što je značajno niže od ostalih vrijednosti dobivenih pri 150 °C. Budući da je vrijeme ekstrakcije spomenutog uzorka bilo 15 min može se zaključiti kako udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida raste uz porast temperature, ali pri kraćem vremenu ekstrakcije.



Slika 9. Prosječni sastav i udio (%) sterola i pentacikličkih triterpenoida u lipidnoj frakciji korijena koprive

Plinskom kromatografijom u uzorcima korijena koprive identificirano je ukupno 12 spojeva iz skupine sterola i pentacikličkih triterpenoida. Na slici 9 prikazan je prosječan sastav i udio sterola i pentacikličkih triterpenoida korijena koprive koji su podijeljeni u sljedeće skupine: prekursori (cikloartenol, 24-metilen cikloartanol, obtusifoliol), $\Delta 5$ -steroli (kampesterol, kampestanol, stigmasterol, sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol), $\Delta 7$ -steroli (citraadienol) i pentaciklički triterpenoidi (α -amirin, β -amirin i β -amirin acetat). Iz slike je jasno vidljivo kako je skupina $\Delta 5$ -sterola s prosječnim udjelom od 93,33 % najzastupljenija skupina, a zatim slijede prekursori (prosječni udio 2,67 %), pentaciklički triterpenoidi (prosječni udio 2,03 %) i $\Delta 7$ -steroli (prosječni udio 1,97 %). Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima budući da skupini $\Delta 5$ -sterola pripada β -sitosterol, koji je prema literaturnim podacima najzastupljeniji sterol korijena koprive (Kopyt'Ko i sur., 2012). U narednim poglavljima detaljnije će se prikazati sastav i udio identificiranih pojedinačnih sterola i pentacikličkih triterpenoida.

4.2. SASTAV I UDIO STEROLA

Kao što je već navedeno, u svim uzorcima korijena koprive metodom plinske kromatografije ispitan je i sastav sterola. U tablici 6 prikazan je sastav i udio ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ korijena koprive) identificiranih sterola.

Identificirano je 9 sterola: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, cikloartenol, obtusifoliol, 24-metilen cikloartanol i citrostadienol. Prosječna vrijednost udjela ukupnih sterola u svim uzorcima iznosila je $62,43 \pm 8,51 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ korijena koprive. U uzorku 5 određen je najviši udio ukupnih sterola koji je iznosila $76,57 \pm 0,07 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, dok je najniži udio određen u uzorku 1 iznosio $42,81 \pm 0,04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima bio je β -sitosterol (prosječna vrijednost udjela $50,21 \pm 6,94 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), slijede ga kampesterol (prosječna vrijednost udjela $6,57 \pm 0,83 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), stigmasterol (prosječna vrijednost udjela $1,47 \pm 0,22 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), citrostadienol (prosječna vrijednost udjela $1,27 \pm 0,38 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te cikloartenol (prosječna vrijednost udjela $1,15 \pm 0,85 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Kampestanol, Δ^5 -avenasterol, obtusifoliol i 24-metilen cikloartanol identificirani su u svim dobivenim uzorcima, ali s prosječnom vrijednošću udjela $<1 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Ostlund (2002) navodi kako su β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol najzastupljeniji steroli u biljnim vrstama, čime se potvrđuju rezultati dobiveni u ovom radu. Horník i sur. (2013) HPLC-NMR metodom identificirali su sterole iz korijena koprive. Najzastupljeniji je bio β -sitosterol (81 %), zatim sitostanol (12 %) i kampesterol (6 %) te još jedan neidentificirani spoj (1 %).

Udio najzastupljenijeg sterola β -sitosterola kretao se u rasponu od $35,00 \pm 0,01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (uzorak 1) do $62,88 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (uzorak 5).

Dobiveni rezultati prema kojima je β -sitosterol značajno zastupljeniji od ostalih sterola u korijenu koprive u skladu je s istraživanjem koje je provela Ritoša (2020). Metodom plinske kromatografije ispitala je sastav i udio pojedinačnih i ukupnih fitosterola iz uzoraka korijena samonikle koprive ubrane s više različitih lokacija na području Republike Hrvatske. Rezultati istraživanja pokazali su kako je β -sitosterol najzastupljeniji sterol u svim dobivenim uzorcima.

Tablica 6. Sastav i udio sterola (mg 100 g⁻¹) u korijenu koprive

Uzorak	Kampesterol	Kampestanol	Stigmasterol	β -sitosterol	Δ^5 -avenasterol	Cikloartenol	Obtusifoliol	24-metilen cikloartanol	Citrostadienol	Ukupni steroli
	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
1	4,77±0,03 ^l	0,75±0,00 ^g	0,99±0,00 ⁱ	35,00±0,01 ^m	0,44±0,02 ^{ab}	0,25±0,01 ^k	0,07±0,01 ^k	0,18±0,01 ^g	0,36±0,00 ^k	42,81±0,04 ^o
2	6,90±0,00 ^e	0,88±0,02 ^e	1,54±0,01 ^d	53,14±0,00 ^d	0,45±0,00 ^{ab}	0,32±0,12 ^{jk}	0,12±0,00 ^{ij}	0,36±0,00 ^{def}	1,43±0,01 ^d	65,14±0,14 ^f
3	7,38±0,01 ^b	0,96±0,01 ^{cd}	1,79±0,00 ^a	56,94±0,05 ^b	0,38±0,00 ^{bc}	0,87±0,03 ^{fg}	0,18±0,01 ^{cde}	0,52±0,01 ^a	1,56±0,00 ^c	70,59±0,11 ^c
4	6,89±0,04 ^e	1,02±0,01 ^b	1,50±0,00 ^{de}	52,24±0,06 ^e	0,43±0,09 ^{ab}	0,46±0,01 ^{ij}	0,15±0,00 ^{efghi}	0,34±0,00 ^{ef}	1,38±0,01 ^{de}	64,43±0,18 ^{gh}
5	8,08±0,01 ^a	1,19±0,01 ^a	1,77±0,04 ^a	62,88±0,02 ^a	0,29±0,02 ^{cd}	0,51±0,12 ⁱ	0,16±0,02 ^{defgh}	0,37±0,05 ^{def}	1,33±0,01 ^{ef}	76,57±0,07 ^a
6	7,21±0,01 ^c	0,69±0,01 ^h	1,68±0,01 ^b	56,91±0,26 ^b	0,37±0,01 ^{bcd}	2,78±0,01 ^a	0,18±0,01 ^{cdef}	0,46±0,00 ^b	1,25±0,03 ^{gh}	71,53±0,33 ^b
7	7,30±0,02 ^{bc}	0,98±0,03 ^{bc}	1,60±0,03 ^c	55,67±0,01 ^c	0,31±0,01 ^{cd}	2,05±0,01 ^c	0,18±0,01 ^{cde}	0,46±0,02 ^b	1,32±0,03 ^{efg}	69,87±0,13 ^d
8	6,50±0,02 ^g	0,99±0,00 ^{bc}	1,41±0,00 ^f	49,52±0,10 ^{gh}	0,28±0,01 ^d	0,50±0,03 ⁱ	0,15±0,01 ^{fghj}	0,33±0,01 ^f	0,32±0,00 ^k	59,99±0,07 ^k
9	6,67±0,02 ^f	0,92±0,01 ^{de}	1,47±0,00 ^e	49,81±0,05 ^g	0,33±0,00 ^{cd}	2,75±0,02 ^a	0,21±0,00 ^{abc}	0,45±0,00 ^b	1,45±0,00 ^d	64,06±0,09 ^h
10	6,32±0,08 ^h	1,03±0,01 ^b	1,38±0,00 ^f	48,31±0,08 ⁱ	0,32±0,01 ^{cd}	2,33±0,01 ^b	0,14±0,01 ^{ghij}	0,39±0,00 ^{cde}	1,15±0,01 ^{ij}	61,37±0,02 ^j
11	6,72±0,01 ^f	0,77±0,01 ^{fg}	1,54±0,00 ^d	50,83±0,02 ^f	0,37±0,01 ^{bcd}	0,90±0,05 ^f	0,19±0,00 ^{bcd}	0,45±0,00 ^{bc}	1,28±0,01 ^{fgh}	63,04±0,04 ⁱ
12	7,06±0,01 ^d	0,41±0,01 ⁱ	1,69±0,00 ^b	55,73±0,10 ^c	0,33±0,01 ^{cd}	0,95±0,01 ^f	0,22±0,01 ^{ab}	0,52±0,01 ^a	1,74±0,05 ^a	68,65±0,16 ^e
13	5,52±0,02 ^j	0,90±0,00 ^e	1,26±0,00 ^g	41,55±0,03 ^k	0,29±0,00 ^{cd}	1,30±0,00 ^e	0,13±0,00 ^{hij}	0,31±0,00 ^f	1,13±0,00 ^j	52,39±0,00 ^m
14	6,49±0,05 ^g	0,81±0,02 ^f	1,42±0,01 ^f	49,35±0,01 ^h	0,49±0,00 ^a	0,69±0,00 ^h	0,20±0,00 ^{abc}	0,46±0,00 ^b	1,66±0,01 ^{ab}	61,57±0,05 ^j
15	6,87±0,01 ^e	0,87±0,00 ^e	1,49±0,00 ^{de}	52,12±0,05 ^e	0,31±0,01 ^{cd}	0,71±0,01 ^{gh}	0,23±0,01 ^a	0,55±0,01 ^a	1,64±0,03 ^b	64,80±0,11 ^{fg}
16	5,18±0,07 ^k	0,68±0,02 ^h	1,10±0,02 ^h	39,15±0,02 ^l	0,18±0,00 ^e	0,35±0,01 ^{ijk}	0,11±0,00 ^j	0,41±0,02 ^{bcd}	1,22±0,01 ^{hi}	48,38±0,12 ⁿ
17	5,86±0,03 ⁱ	0,78±0,00 ^{fg}	1,28±0,00 ^g	44,39±0,00 ^j	0,27±0,00 ^{de}	1,76±0,00 ^d	0,16±0,00 ^{defg}	0,36±0,00 ^{def}	1,30±0,00 ^{fg}	56,15±0,03 ^l
Prosječna vrijednost	6,57±0,83	0,86±0,18	1,47±0,22	50,21±6,94	0,34±0,08	1,15±0,85	0,16±0,04	0,41±0,09	1,27±0,38	62,43±8,51

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

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

Robić (2020) je primjenom plinske kromatografije uz masenu spektrometriju (GC-MS) odredila udio i sastav sterola u uzorcima korijena samonikle koprive. Kao i u ovom istraživanju, najzastupljeniji sterol u svim uzorcima bio je β -sitosterol.

Nadalje, koristeći superkritični CO₂ kao ekstrakcijsko otapalo za izolaciju β -sitosterola iz korijena koprive, Sajfrtová i sur. (2005) dobili su rezultate slične kao u ovom radu. HPLC metodom je utvrđeno kako su dobiveni ekstrakti sadržavali 63 mg 100 g⁻¹ suhe tvari (s.t.) β -sitosterola. Prinos ekstrakcije konvencionalnim otapalom, dietil eterom, bio je značajno niži i iznosio je 26 mg 100 g⁻¹ s.t. β -sitosterola.

Kovacheva i sur. (1990) identificirali su sterole metodom plinske kromatografije u neosapunjivim koncentratima biljnih materijala. β -sitosterol bio je najzastupljeniji sterol u koncentratu korijena koprive, kao i u ovom istraživanju. Međutim, budući da su udjeli u ovom radu izraženi u mg 100 g⁻¹ korijena koprive nije ih moguće direktno usporediti s rezultatima određenim u radu Kovacheve i sur. (1990) gdje su izraženi kao postotak u odnosu na sastav cijele biljke. Također, treba naglasiti kako su u ovom radu steroli izolirani isključivo iz korijena koprive, dok Kovacheva i sur. (1990) nisu naveli precizne podatke o koncentratu koprive.

Kampesterol je sljedeći sterol po zastupljenosti u svim dobivenim uzorcima s prosječnom vrijednošću udjela 6,57±0,83 mg 100 g⁻¹. Raspon udjela kampesterola u svim uzorcima kretao se od 4,77±0,03 mg 100 g⁻¹ (uzorak 1) 8,08±0,01 mg 100 g⁻¹ (uzorak 5).

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim u istraživanju koje je provela Robić (2020). Primjenom GC-MS odredila je udio i sastav sterola u uzorcima korijena samonikle koprive. Kao i u ovom istraživanju kampesterol se nalazi na drugom mjestu po zastupljenosti u udjelu ukupnih sterola.

Može se primijetiti da su najviše vrijednosti udjela β -sitosterola i kampesterola određene u uzorku dobivenom pri istim uvjetima (150 °C/10 min/4 ciklusa), što upućuje na važnost optimiranja ekstrakcijskih uvjeta s ciljem postizanja maksimalanog učinka.

S prosječnom vrijednosti udjela od 1,47±0,22 mg 100 g⁻¹ stigmasterol se nalazi na trećem mjestu po zastupljenosti sterola u korijenu koprive. Vrijednosti u analiziranim uzorcima kretale su se u rasponu od 0,99±0,00 mg 100 g⁻¹ (uzorak 1) do 1,79±0,00 mg 100 g⁻¹ (uzorak 3).

Balbino i sur. (2021) navode da u lipidnim frakcijama dobivenim iz nekoliko različitih vrsta sjemenki iz obitelji Apiaceae uz β -sitosterol dominira stigmasterol čiji udio dobiven primjenom ASE pri 25 °C iznosi $141,9 \pm 8,9$ mg 100 g⁻¹, a pri 100 °C $202,7 \pm 8,9$ mg 100 g⁻¹. Međutim, Shen i Shao (2005) ustanovili su kako se stigmasterol, premda je jedan od najvažnijih sterola duhana, ne može ekstrahirati pomoću ASE pri ispitivanim temperaturama (100 i 125 °C). Razlike u dobivenim rezultatima mogu proizlaziti iz individualnih karakteristika različitih ispitanih vrsta.

4.3. SASTAV I UDIO PENTACIKLIČKIH TRITERPENOIDA

Uz sterole, u uzorcima korijena koprive identificirana su i tri pentaciklička triterpenoida: α -amirin, β -amirin i β -amirin acetat. Udjeli navedenih spojeva nalaze se u tablici 7.

Udio ukupnih pentacikličkih triterpenoida u uzorcima korijena koprive kretao se u rasponu od $1,68 \pm 0,42$ mg 100 g⁻¹ (uzorak 5) do $0,69 \pm 0,02$ mg 100 g⁻¹ (uzorak 1). Uzorak s najvišim udjelom pentacikličkih triterpenoida dobiven je pri temperaturi 150 °C (uzorak 5), statičkom vremenu 10 min uz 4 ekstrakcijska ciklusa, dok je uzorak 1 u kojem je određen najnižim udjelom dobiven pri temperaturi 70 °C, statičkom vremenu 5 min uz 3 ekstrakcijska ciklusa. Slično kao za sterole, može se zaključiti da prinos ukupnih pentacikličkih triterpenoida raste povećanjem temperature.

Prema dobivenim rezultatima β -amirin acetat najzastupljeniji je pentaciklički triterpenoid korijena koprive s prosječnom vrijednošću udjela od $0,56 \pm 0,14$ mg 100 g⁻¹. Najviši udio β -amirin acetata određen je u uzorku 12 ($0,74 \pm 0,00$ mg 100 g⁻¹) dobivenom pri temperaturi 150 °C, statičkom vremenu 5 min uz 3 ciklusa ekstrakcije. S nešto nižom prosječnom vrijednosti udjela slijede β -amirin ($0,50 \pm 0,11$ mg 100 g⁻¹) te α -amirin ($0,24 \pm 0,09$ mg 100 g⁻¹).

Kombinacijom GC-MS metode s NMR spektroskopijom Grauso i sur. (2019) su u ekstraktu koprive identificirali α - i β -amirin. U lipofilnom ekstraktu dobivenom uz *n*-heksan kao otapalo udio α -amirina iznosio je 10,9 %, dok je udio β -amirina bio 9,7 %.

Iako se radi o drugim biljnim vrstama, Balbino i sur. (2021) navode kako je u lipidnom ekstraktu dobivenom primjenom ASE β -amirin također bio zastupljeniji od α -amirina u svim uzorcima sjemenki iz obitelji Apiaceae. Također, najviši udio α - i β -amirina te ukupnih

pentacikličkih triterpenoida dobiven je pri temperaturi 100 ° C, dok su pri nižoj temperaturi (25 °C) izolirani u znatno nižem udjelu.

Tablica 7. Sastav i udio pentacikličkih triterpenoida (mg 100 g⁻¹) u korijenu koprive

Uzorak	α -amirin	β -amirin	β -amirin acetat	Ukupni pentaciklički triterpenoidi
	p=0,023*	p=0,026*	p<0,001*	p<0,001*
1	0,10±0,01 ^b	0,38±0,00 ^b	0,21±0,01 ^h	0,69±0,02 ^d
2	0,13±0,01 ^{ab}	0,69±0,01 ^{ab}	0,40±0,00 ^g	1,22±0,00 ^{abc}
3	0,28±0,09 ^{ab}	0,54±0,02 ^{ab}	0,71±0,01 ^{ab}	1,53±0,10 ^{ab}
4	0,20±0,00 ^{ab}	0,48±0,01 ^{ab}	0,44±0,00 ^{fg}	1,12±0,01 ^{bcd}
5	0,26±0,02 ^{ab}	0,75±0,3 ^a	0,67±0,10 ^{abc}	1,68±0,42 ^a
6	0,37±0,01 ^a	0,50±0,01 ^{ab}	0,59±0,00 ^{cde}	1,45±0,00 ^{abc}
7	0,18±0,00 ^{ab}	0,50±0,01 ^{ab}	0,70±0,00 ^{abc}	1,38±0,01 ^{abc}
8	0,22±0,02 ^{ab}	0,43±0,01 ^{ab}	0,48±0,01 ^{efg}	1,13±0,05 ^{bcd}
9	0,21±0,01 ^{ab}	0,48±0,00 ^{ab}	0,62±0,01 ^{bcd}	1,30±0,00 ^{abc}
10	0,23±0,16 ^{ab}	0,49±0,00 ^{ab}	0,52±0,01 ^{def}	1,24±0,17 ^{abc}
11	0,28±0,12 ^{ab}	0,49±0,00 ^{ab}	0,61±0,02 ^{bcd}	1,38±0,14 ^{abc}
12	0,21±0,03 ^{ab}	0,51±0,03 ^{ab}	0,74±0,00 ^a	1,46±0,01 ^{abc}
13	0,20±0,07 ^{ab}	0,40±0,01 ^b	0,43±0,03 ^{fg}	1,03±0,11 ^{cd}
14	0,27±0,00 ^{ab}	0,47±0,0 ^{ab}	0,60±0,00 ^{bcd}	1,35±0,01 ^{abc}
15	0,32±0,01 ^{ab}	0,51±0,00 ^{ab}	0,68±0,01 ^{abc}	1,51±0,02 ^{abc}
16	0,21±0,12 ^{ab}	0,44±0,01 ^{ab}	0,47±0,01 ^{fg}	1,11±0,10 ^{bcd}
17	0,38±0,00 ^a	0,44±0,01 ^{ab}	0,63±0,00 ^{abcd}	1,44±0,01 ^{abc}
Prosječna vrijednost	0,24±0,09	0,50±0,11	0,56±0,14	1,30±0,25

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

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

4.4. UTJECAJ EKSTRAKCIJSKIH UVJETA NA PRINOS LIPIDNE FRAKCIJE I UDIO UKUPNIH STEROLA I PENTACIKLIČKIH TRITERPENOIDA TE B-SITOSTEROLA

U tablici 8 prikazani su rezultati ANOVA analize kojom je ispitana signifikantnost utjecaja temperature, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije na prinos lipidne frakcije.

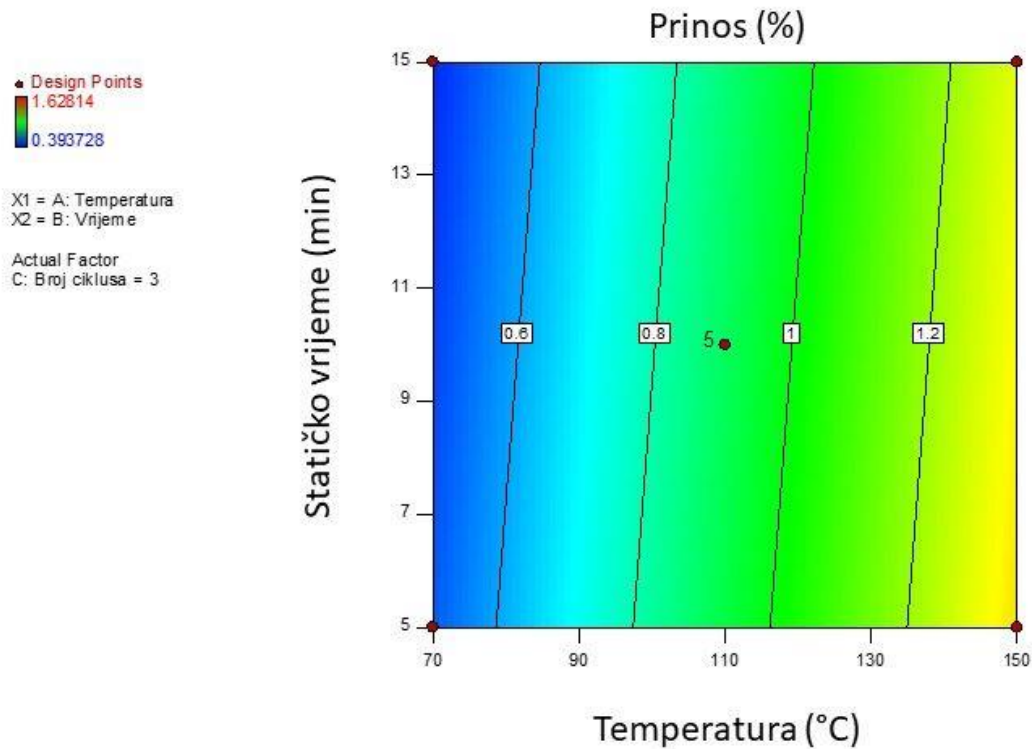
Tablica 8. Rezultati ANOVA analize utjecaja ekstrakcijskih uvjeta na prinos lipidne frakcije

Izvor varijacije	Prinos (%)	
	F-omjer	p-vrijednost
X ₁	40,90	<0,001*
X ₂	0,23	0,640
X ₃	0,08	0,777
Nedostatak modela	5,09	0,066
R ²	0,705	

X₁-temperatura, X₂-statičko vrijeme ekstrakcije, X₃-broj ciklusa ekstrakcije

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

Iz rezultata u tablici 8 vidljivo je da temperatura ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,001^*$) na prinos lipidne frakcije, dok statičko vrijeme i broj ciklusa ekstrakcije nisu pokazali značajan utjecaj. To se također može primijetiti na slici 10 koja prikazuje utjecaj kombinacije temperature i statičkog vremena ekstrakcije na prinos lipidne frakcije, gdje je vidljivo kako se povećanjem temperature povećava i prinos.



Slika 10. Utjecaj temperature (°C) i statičkog vremena ekstrakcije (min) na prinos lipidne frakcije (%)

Povišena temperatura koja se koristi tijekom procesa ekstrakcije utječe na svojstva otapala i jedan je od najvažnijih parametara ASE (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). Mottaleb i Sarker (2012) navode da povišenjem temperature otapala dolazi do porasta kapaciteta otapala za otapanje analita jer se povećava brzina difuzije i smanjuje viskoznost, što olakšava otapalu prodiranje u pore matrice. Također, povišena temperatura uzrokuje slabljenje ili kidanje interakcija (vodikovih veza, van der Waalsovih sila te dipol-dipolnih interakcija) između analita i matrice što uzrokuje izdvajanje otopljenih tvari iz matrice. Većina ekstrakcija izvodi se pri 75-125 °C, a najčešće se primjenjuje 100 °C (Mottaleb i Sarker, 2012; Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). No, rezultati ovog istraživanja pokazali su da je 150 °C bila najučinkovitija za izolaciju lipidne frakcije iz korijena koprive što je i razumljivo budući da je analizirani osušeni uzorak korijena koprive vrlo čvrste strukture pa je potrebna vrlo visoka temperatura kako bi se razorile čvrste stanične strukture i omogućilo izdvajanje ciljanih komponenti.

Iako statistička analiza nije pokazala značajan utjecaj statičkog vremena ekstrakcije na prinos u ovom istraživanju, Shen i Shao (2005) navode kako je u njihovom istraživanju prinos

dobiven tijekom 10 min ekstrakcije bio je gotovo isti kao onaj dobiven tijekom 15 min ekstrakcije, dok je prinos ekstrakcije od 10 min bio viši u odnosu na prinos ekstrakcije u trajanju od 5 min, ali niži od prinosa dvije uzastopne ekstrakcije od 5 min.

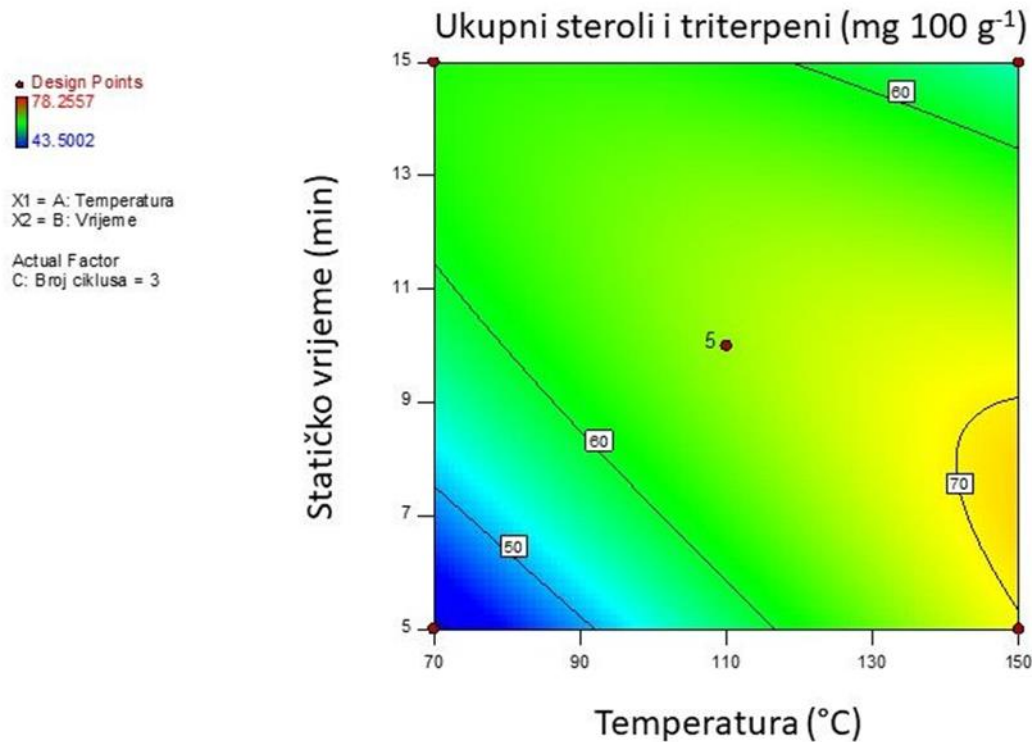
Nadalje, nesignifikantni utjecaj broja ciklusa ekstrakcije na prinos u ovom radu, u skladu je s istraživanjem koje su proveli Benthin i sur. (1999). U svom radu navode kako se u prvom ekstrakcijskom ciklusu ekstrahira većina ciljanih spojeva, prinos drugog je znatno niži ali nije zanemariv, dok je prinos trećeg ciklusa ekstrakcije vrlo nizak.

Statističkom analizom ispitan je i utjecaj ASE uvjeta na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati ANOVA analize utjecaja ekstrakcijskih uvjeta na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)

Izvor varijacije	Ukupni steroli i pentaciklički triterpenoidi	
	F-omjer	p-vrijednost
X_1	15,25	0,006*
X_1^2	2,51	0,157
X_2	1,36	0,281
X_2^2	11,88	0,011*
X_3	1,73	0,230
X_3^2	5,59	0,050*
X_1X_2	21,05	0,003*
X_1X_3	$9,43 \times 10^{-4}$	0,976
X_2X_3	6,13	0,043*
Nedostatak modela	3,00	0,158
R^2	0,778	

*X₁-temperatura, X₂-statičko vrijeme ekstrakcije, X₃-broj ciklusa ekstrakcije
utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 11. Utjecaj temperature (°C) i statičkog vremena ekstrakcije (min) na udio ukupnih sterola i triterpenoida (mg 100 g⁻¹)

Iz rezultata u tablici 9 vidljivo je da na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida značajan utjecaj imaju sva tri ispitivana faktora: temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije. Također, statistička analiza pokazuje da kombinacija temperature i statičkog vremena ekstrakcije te kombinacija statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije imaju značajan utjecaj na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida. Na slici 11 prikazan je utjecaj temperature i statičkog vremena ekstrakcije na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te je vidljivo kako se udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida povećava sukladno povećanju temperature i statičkog vremena ekstrakcije do određene vrijednosti te se može zaključiti kako udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida raste uz porast temperature, ali pri kraćem vremenu ekstrakcije.

Shen i Shao (2005) proveli su slično istraživanje u kojem su ispitali utjecaj ASE na izolaciju sterola i terpenoida u uzorcima duhana dobivenim ekstrakcijom pri različitim temperaturama (100, 125 i 150 °C). GC-MS sustav korišten je za kvalitativno i kvantitativno određivanje sastava. Ukupni udio sterola i terpenoida, povećao se porastom temperature sa 100 na 125 °C,

ali iznad te temperature za većinu ispitivanih spojeva nije uočen daljnji porast. Dobiveni zaključak u skladu je s rezultatima dobivenim u ovom radu, budući da porastom temperature sa 110 na 150 °C dolazi do povećanja udjela 2 najzastupljenija sterola korijena koprive.

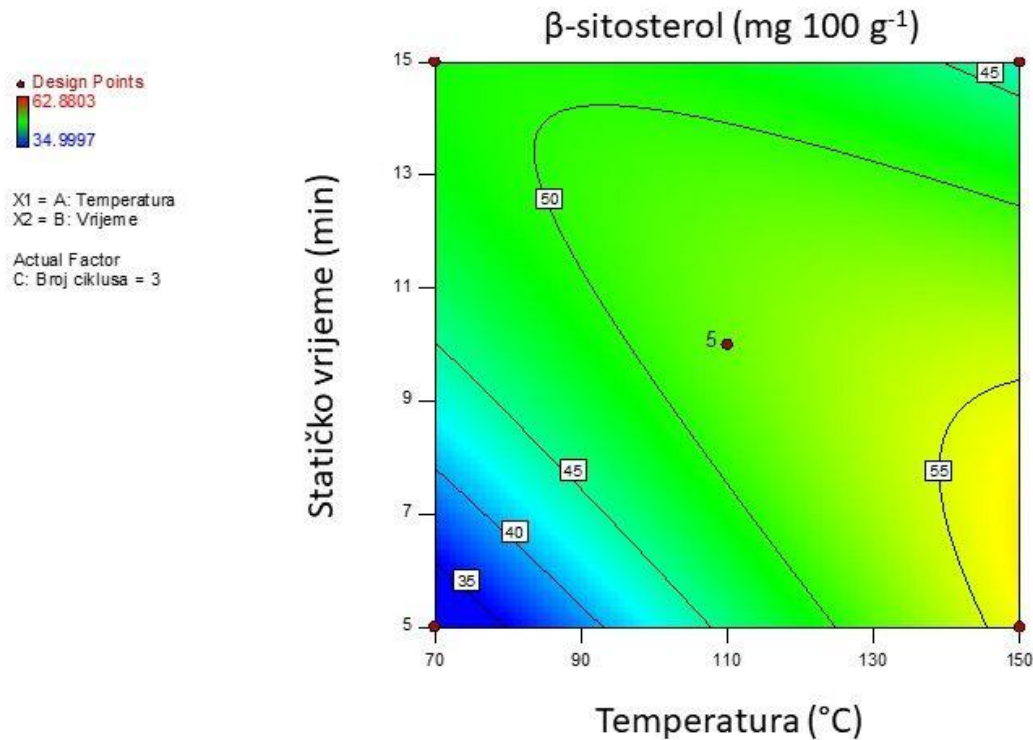
Repajić i sur. (2020) navode kako je prilikom ekstrakcije polifenola i pigmenata iz listova koprive primjenom ASE porast temperature s 20 na 110 °C rezultirao značajno većim udjelom ukupnih hidrocimetnih kiselina, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih spojeva. Broj ciklusa ekstrakcije također je imao značajan utjecaj, a najveći prinosi polifenola postignuti su tijekom trećeg ekstrakcijskog ciklusa. Iako je provedena izolacija različitih spojeva, rezultati spomenutog istraživanja potvrđuju trend povećanja udjela ciljanih spojeva u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa ekstrakcije.

Budući da je u analiziranim uzorcima korijena koprive najzastupljeniji spoj β -sitosterol, statističkom analizom je također ispitan utjecaj ekstrakcijskih uvjeta na udio β -sitosterola, a dobiveni rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati ANOVA analize utjecaja ekstrakcijskih uvjeta na udio β -sitosterola (mg 100 g⁻¹)

Izvor varijacije	β -sitosterol	
	F-omjer	p-vrijednost
X ₁	13,44	0,008*
X ₁ ²	1,62	0,244
X ₂	1,16	0,316
X ₂ ²	7,28	0,031*
X ₃	2,26	0,177
X ₃ ²	4,01	0,085
X ₁ X ₂	18,53	0,004*
X ₁ X ₃	0,08	0,784
X ₂ X ₃	6,00	0,044*
Nedostatak modela	3,50	0,129
R ²	0,738	

X₁-temperatura, X₂-statičko vrijeme ekstrakcije, X₃-broj ciklusa ekstrakcije
 *utjecaj faktora je statistički značajan uz p≤0,05



Slika 12. Utjecaj temperature (°C) i statičkog vremena ekstrakcije (min) na udio β-sitosterola (mg 100 g⁻¹)

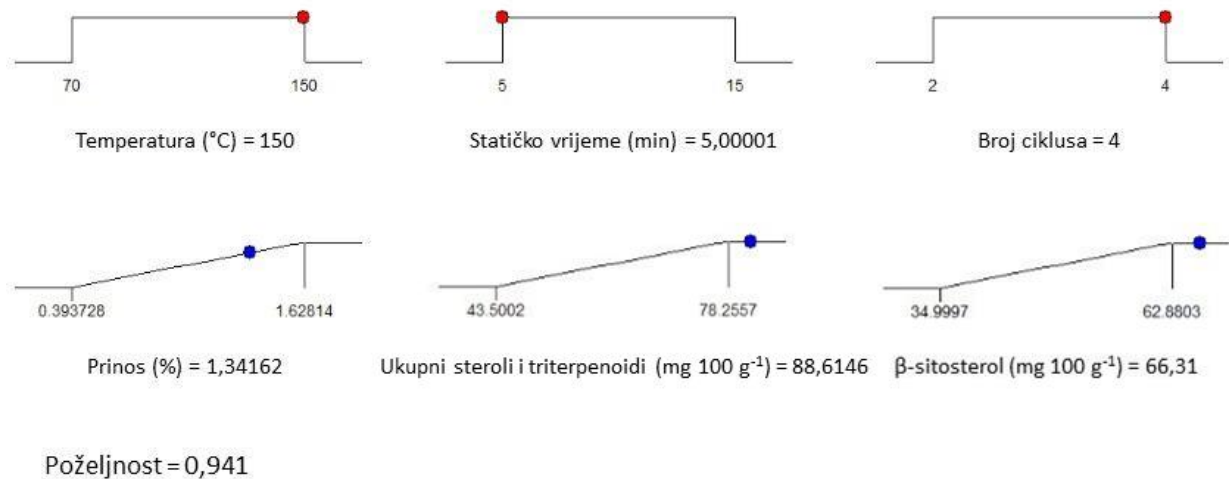
Rezultati statističke analize pokazuju kako temperatura i statičko vrijeme ekstrakcije imaju značajan utjecaj na udio β-sitosterola, dok broj ciklusa ekstrakcije nema. Također, rezultati pokazuju da kombinacija temperature i statičkog vremena ekstrakcije te kombinacija statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije imaju značajan utjecaj na udio β-sitosterola. Na slici 12 prikazan je utjecaj temperature i statičkog vremena ekstrakcije na udio β-sitosterola te je vidljivo kako udio β-sitosterola raste uz porast temperature, ali uz kraće vrijeme ekstrakcije, kao što se pokazalo i za utjecaj navedenih parametara na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida.

Nadalje, za sve tri ispitivane zavisne varijable izračunate su jednadžbe regresijskog modela uz pripadajući koeficijent determinacije (R^2) i vrijednost nedostataka modela (eng. *lack of fit*) koji su prikazani u tablici 11. Jednadžba regresijskog modela omogućuje predviđanje zavisne varijable za svaku vrijednost nezavisnih varijabli, dok pripadajući R^2 pokazuje kolika je preciznost modela. Što je njegova vrijednost bliža 1 to je model precizniji. Sukladno navedenom, dobivene R^2 vrijednost (0,705 – 0,778) ukazuju na dobru točnost modela.

Valjanost modela potvrđena je i vrijednostima nedostatka modela koje nisu bile statistički značajne.

Tablica 11. Jednadžbe regresijskih modela, koeficijenti determinacije i nedostatak modela za prinos lipidne frakcije i udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te β -sitosterola prilikom izolacije primjenom ASE

Varijabla	Model	R ²	Nedostatak modela (p-vrijednost)
Prinos (%)	$- 0,149 + 0,011X_1 - 0,006X_2 - 0,019X_3$	0,705	0,066
Ukupni steroli i pentaciklički triterpenoidi (mg 100 g⁻¹)	$- 50,918 + 1,060X_1 + 14,296X_2 - 16,738X_3 - 0,048X_1X_2 + 0,002X_1X_3 - 1,032X_2X_3 - 0,002X_1^2 - 0,280X_2^2 + 4,803X_3^2$	0,778	0,158
β-sitosterol (mg 100 g⁻¹)	$- 38,811 + 0,775X_1 + 11,004X_2 - 11,807X_3 - 0,039X_1X_2 + 0,013X_1X_3 - 0,885X_2X_3 - 0,001X_1^2 - 0,190X_2^2 + 3,526X_3^2$	0,778	0,129



Slika 13. Rezultati optimiranja uvjeta ASE za izolaciju sterola i pentacikličkih triterpenoidi iz korijena koprive

Kako bi se odredili optimalni parametri ekstrakcije u svrhu postizanja maksimalnog prinosa lipidne frakcije i udjela ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida te β -sitosterola korijena koprive provedeno je optimiranje parametara ASE prema metodi poželjnosti. Dobiveni optimalni uvjeti ASE prikazani su na slici 13 i iznose temperatura 150 °C, statičko vrijeme 5 min te broj ciklusa 4 pri čemu predviđena vrijednost za prinos lipidne frakcije iznosi 1,34 %, za udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida 88,61 mg 100 g⁻¹ te za udio β -sitosterola 66,31 mg 100 g⁻¹.

Nakon provedene ASE na definiranim optimalnim uvjetima (150 °C, 5 min, 4 ciklusa) dobivene su sljedeće eksperimentalne vrijednosti: prinos lipidne frakcije 1,28 %, udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida 88,40 mg 100 g⁻¹ te udio β -sitosterola 71,20 mg 100 g⁻¹. Dobivene eksperimentalne vrijednosti su u skladu s vrijednostima predviđenim modelom budući da je odstupanje za sve ispitivane zavisne varijable iznosilo oko 7 % ili manje.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Prinos lipidne frakcije korijena koprive izoliran primjenom različitih uvjeta ASE određen je u rasponu od $0,39 \pm 0,01$ do $1,63 \pm 0,03$ % s prosječnom vrijednosti $0,90 \pm 0,34$ %.
2. Plinskom kromatografijom u uzorcima lipidne frakcije korijena koprive identificirano je 9 sterola (kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol, cikloartenol, obtusifoliol, 24-metilen cikloartanol, citrostadienol) te tri pentaciklička triterpenoida (α -amirin, β -amirin i β -amirin acetat).
3. Udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida određen je u rasponu od $43,50 \pm 0,05$ do $78,26 \pm 0,35$ mg 100 g^{-1} korijena koprive, dok je prosječna vrijednost udjela iznosila $63,73 \pm 8,70$ mg 100 g^{-1} korijena koprive. Prosječan sastav sterola i pentacikličkih triterpenoida lipidne frakcije korijena koprive iznosi: $\Delta 5$ -steroli (93,33 %), prekursori (2,67 %), pentaciklički triterpenoidi (2,03 %) i $\Delta 7$ -steroli (1,97 %).
4. Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima bio je β -sitosterol (prosječna vrijednost udjela $50,21 \pm 6,94$ mg 100 g^{-1} korijena koprive).
5. Rezultati ANOVA analize pokazali su da temperatura ima statistički značajan utjecaj na prinos lipidne frakcije, dok statičko vrijeme i broj ciklusa ekstrakcije nisu pokazali značajan utjecaj. Na udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida značajan utjecaj imaju sva tri ispitivana faktora, kao i kombinacija temperature i statičkog vremena ekstrakcije te kombinacija statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije. Na udio β -sitosterola značajan utjecaj imaju temperatura i statičko vrijeme ekstrakcije, dok broj ciklusa ekstrakcije nema. Također, kombinacija temperature i statičkog vremena ekstrakcije te kombinacija statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije imaju značajan utjecaj na udio β -sitosterola.
6. Optimiranjem parametara prema metodi poželjnosti dobiveni optimalni uvjeti ASE iznose: temperatura $150 \text{ }^\circ\text{C}$, statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te broj ciklusa ekstrakcije 4. Prema jednadžbama regresijskih modela pri navedenim uvjetima predviđena vrijednost za prinos lipidne frakcije iznosi 1,34 %, za udio ukupnih sterola i pentacikličkih triterpenoida $88,61 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ te za udio β -sitosterola $66,31 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Dobivene eksperimentalne vrijednosti pri optimalnim ASE uvjetima su u skladu s

vrijednostima predviđenim modelom budući da je odstupanje za sve ispitivane zavisne varijable iznosilo oko 7 % ili manje.

6. LITERATURA

Ait-Amir B, Pougnet P, El Hami A (2020) Meta-model development. U: El Hami A, Pougnet P (ured.) *Embedded mechatronic systems 2*, ISTE Press Ltd, London, str. 157-187.

Akihisa T, Kokke W, Tamura T (1991) Naturally occurring sterols and related compounds from plants. U: Patterson GW, Nes WD (ured.) *Physiology and Biochemistry of Sterols*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, str. 172-228. <https://doi.org/10.1201/9781439821831.CH7>

Alvarez-Rivera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibañez E (2019) Pressurized liquid extraction. *Liq Extr* **1**, 375–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>

Ameer K, Shahbaz HM, Kwon JH (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Compr Rev Food Sci F* **16(2)**, 295-315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>

Asgarpanah J, Mohajerani R (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *J Med Plants Res* **6(46)**, 5714-5719. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.540>

Assaf HK, Nafady AM, Allam AE, Hamed AN, Kamel MS (2020) Phytochemistry and biological activity of family "Urticaceae":. *J Adv Med Biomed Res* **3(3)**, 150-176. <https://doi.org/10.21608/jabps.2020.24043.1073>

Balbino S, Repajić M, Obranović M, Medved AM, Tonković P, Dragović-Uzelac V (2021) Characterization of lipid fraction of Apiaceae family seed spices: Impact of species and extraction method. *J Appl Res Med Aromat Pl* **25**, 100326. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100326>.

Bean GA (1973) Phytosterols. *Adv Lipid Res* **11**, 193-218.

Benthin B, Henning D, Hamburger M (1999) Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J Chromatogr A* **837**, 211–219. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00071-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00071-0)

Bombardelli E, Morazzoni P (1997) *Urtica dioica* L. *Fitoterapia* **68(5)**, 387401.

- Bucar F, Britzmann B, Streit B, Weigend M. (2006) LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts aerial parts of *Urtica* species. *Planta Med* **72**, 152. <https://doi.org/10.1055/s-2006-949952>
- Castejón N, Luna P, Señoráns FJ (2018) Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chem* **244**, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.014>
- Chaurasia N, Wichtl M (1987) Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *J Nat Prod* **50(5)**, 881-885. <https://doi.org/10.1021/np50053a018>
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci* **13(7)**, 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Frank B, Bohn I, Uehleke B (1998) *Urtica*. U: Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler G, Schneider G (ured.) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Folgeband **3**, 710-736.
- Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J (2001) Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory and practice. *Crit Rev Anal Chem* **31(3)**, 149-165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>
- Goletić Š (2011) Praćenje sadržaja teških metala u tlu i biljkama u okolini željezare u zenici, Federalni zavod za agropedologiju, Sarajevo
- Goodwin TW (1985) Biosynthesis of plant sterols. U H Danielsson, J Sjovall (ured.) *Sterols and Bile Acids*, Elsevier, New York, str. 175–98.
- Grauso L, Emrick S, Bonanomi G, Lanzotti V (2019) Metabolomics of the alimurgic plants *Taraxacum officinale*, *Papaver rhoeas* and *Urtica dioica* by combined NMR and GC-MS analysis. *Phytochem Anal* **30(5)**, 535-546. <https://doi.org/10.1002/pca.2845>
- Guil-Guerrero JL, Reboloso-Fuentes MM, Torija Isasa ME (2003) Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J Food Compost Anal* **16**, 111–119.
- Gül S, Demirci B, Başer KHC, Akpulat HA, Aksu P (2012) Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bull Environ Contam Toxicol* **88(5)**, 666-671. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0535-9>

Gylling H, Miettinen TA (1999) Phytosterols, analytical and nutritional aspects. U: Lasztity R, Pfannhauser W, SimonSarkadi L, ToÈmoÈskoÈzi S (ured.) Functional Foods. A new Challenge for the Food Chemist, Publishing Company of TUB, Budapest, str. 109.

Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00235-1)

Hirano T, Homma M, Oka K (1994) Effects of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Na⁺, K⁺-ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia. *Planta Med* **60(01)**, 30-33.

HMPC (2012) Assesment report on *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., their hybrids or their mixtures HMPC - Commitee on herbal medicinal products., radix. European Medicines Agency. London.

Horník Š, Sajfrtová M, Karban J, Sýkora J, Březinová A, Wimmer Z. (2013) LC-NMR technique in the analysis of phytosterols in natural extracts. *J Anal Methods Chem* **2013**, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/526818>

Hudec J, Burdová M, Kobida L, Komora L, Macho V, Kogan G, Turianica I, Kochanová R, Lozek O, Habán M, Chlebo P (2007) Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *J Agric Food Chem* **55(14)**, <https://doi.org/5689-5696.10.1021/jf070777c>

Hulina N (1998) Korovi, Školska knjiga, Zagreb, str. 118-121.

Jan KN, Zarafshan K, Singh S (2016) Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *J Food Meas Charact* **11(2)**, 423-433. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9410-4>

Jentzer JB, Alignan M, Vaca-Garcia C, Rigal L, Vilarem G (2015) Response surface methodology to optimise accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem* **166**, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.078>

- Jukić Z, Mužek MN (2018) Priprava tekućeg organskog gnojiva fermentacijom koprive (*Urtica dioica* L.) i kamilice (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). *Kem Ind* **67(13)**, 115–118. <https://doi.org/10.15255/KUI.2018.017>
- Kamal-Eldin A, Määttä K, Toivo J, Lampi AM, Piironen V (1998) Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and Δ^5 -avenasterol. *Lipids* **33**, 1073-1077. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0307-6>
- Katsouli M, Chanioti S, Tzia C (2020) β -Sitosterol as a functional bioactive component: Physicochemical, nutritional, biological properties and its applications in food systems, A Centum of valuable plant Bioactives, Elsevier, Amsterdam, str. 194.
- Keršek E. (2008) Ljekovite biljne i voćne rakije, V.B.Z. d.o.o, Zagreb, str. 132-133.
- Knežević M (2006) Atlas korovne, ruderalne i travnjačke flore, Poljoprivredni fakultet, Osijek, str. 290.
- Kopyt'Ko YF, Lapinskaya ES, Sokol'Skaya TA (2012) Application, chemical composition, and standardization of nettle raw material and related drugs. *Pharm Chem J* **45(10)**, 622-631.
- Kovacheva E, Ganchev G, Neicheva A, Ivanova I, Konoushlieva M, Andreev V (1990) Gas chromatographic determination of sterols in fat-soluble concentrates obtained from plant materials. *J Chromatogr A* **509(1)**, 79-84.
- Krauss R, Spitteler G (1990) Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry* **29**, 1653–1659. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- Kregiel D, Pawlikowska E, Antolak H (2018) *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Mol* **23(7)**, 1664. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- Kritchevsky D, Chen SC (2005) Phytosterols - health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res* **25(5)**, 413-428. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.02.003>
- Krystofova O, Adam V, Babula P, Zehnalek J, Beklova M, Havel L, Kizek R (2010) Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int J Environ Res Public Health* **7**, 3804-3815. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103804>
- Kudritsata SE, Filman GM, Zagorodskaya LM, Chikovanii DM (1986) Carotenoids of *Urtica dioica*. *Chem Nat Compd* **22(5)**, 604–605. <https://doi.org/10.1007/BF00599278>.

Lapinskaya ES, Kopyt'ko YF, Timokhina EA, Krapivkin, BA, Levandovskii GS, Dargaeva TD, Sokol'skaya TA (2008) Amino acids and cyclic dipeptides in stinging nettle (*Urtica dioica* and *U. urens*) homeopathic matrix tinctures. *Pharm Chem J*, **42(11)**, 650-653. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0189-z>

Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (2016) Enhancing extraction processes in the food industry. CRC Press, Talyor & Francis, Boca Raton, str. 25-83.

Lohani UC, Fallahi P, Muthukumarappan K (2015) Comparison of ethyl acetate with hexane for oil extraction from various oilseeds. *J Am Oil Chem Soc* **92(5)**, 743-754. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2644-1>

Lombardo L, Grasso F, Lanciano F, Stefania L, Monetti E (2018) Broad-Spectrum Health Protection of Extra Virgin Olive Oil Compounds. *Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products)*, Elsevier Science Publishers **57**, 36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00002-8>

Luque de Castro M.D, Priego-Capote F (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J Chromatogr* **1217(16)**, 2388-2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>

Luthria D, Vinjamoori D, Noel K, Ezzell J (2004) Accelerated Solvent Extraction, U: Luthria DL (ured.) *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Comparative Studies*. American Oil Chemists' Society Meeting (AOCS), str. 25-38. <https://doi.org/10.1201/9780429104527>

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* **41(6)**, <https://doi.org/457-500>. 10.1016/s0163-7827(02)00006-1

Moreau RA, Powell MJ, Singh V (2003) Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *J Am Oil Chem Soc* **80(11)**, 1063-1067. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0821-y>

Mottaleb MA, Sarker SD (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: Sarker SD, Nahar L (ured.) *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology 3* izd, Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_4

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

Nahata A, Dixit VK (2012) Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia*, **44(1)**, 396-409. . <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01197.x>

Nikolić T, Kovačić S (2008) Flora Medvednice - 250 najčešćih vrsta Zagrebačke gore, Školska knjiga, Zagreb, str. 98.

NIST/SEMATECH (2012) e-Handbook of Statistical Methods, <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3362.htm>. Pristupljeno 20. srpnja 2021.

Orčić D, Francišković M, Bekvalac K, Svirčev E, Beara I, Lesjak M, Mimica-Dukić N (2014) Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem* **143**, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>

Ostlund RE (2002) Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* **22(1)**, 533-549. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>

Otles S, Yalcin B (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci World J* **2012**, 1-12. <https://doi.org/10.1100/2012/564367>

Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D (2001) Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol* **75(2-3)**, 181-4. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00177-5)

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* **80(7)**, 939-966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)

Pine SH (1994) Organska kemija, 3.izd., (preveli Bregovec i Rapić), Školska knjiga, Zagreb, str. 873-876.

- Pinelli P, Ieri F, Vignolini P, Bacci L, Baron S, Romani A (2008) Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *J Agric Food Chem* **56**, 9127–9132. <https://doi.org/10.1021/jf801552d>
- Poojary M, Barba F, Aliakbarian B, Donsì F, Pataro G, Dias D, Juliano P (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs* **14**, 214. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Raut P, Bhosle D, Janghel A, Deo S, Verma C, Kumar SS, Agrawal M, Amit N, Sharma M, Giri T, Tripathi DK, Ajazuddin, Alexander A (2015) Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) Techniques as an Innovative Green Technologies for the Effective Extraction of the Active Phytopharmaceuticals. *Res J Pharm Technol* **8(6)**, 801 – 812. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00129.8>
- Reiner Ž, Tedeschi-Reiner E (2007) Učinci biljnih sterola na hiperkolesterolemiju. *Liječnički Vjesnik* **129**, 276-281.
- Repajić M, Cegledi E, Kruk V, Pedisić S, Činar F, Bursać Kovačević D, Dragović-Uzelac V (2020) Accelerated Solvent extraction as a green tool for the recovery of polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes* **8(7)**, 803. <https://doi.org/10.3390/pr8070803>
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C (1996) Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation. *Anal Chem.* **68**,1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Ritoša E (2020) Usporedba sastava fitosterola iz korijena koprive, vrbovice i sabal palme (završni rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Robić K (2020) Fitosteroli koprive (*Urtica dioica* L.) (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Rodríguez-Solana R, Salgado JM, Domínguez JM, Cortés-Diéguez S (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Ind Crop Prod* **52**, 528-536. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.028>

Rutto LK, Xu Y, Ramirez E, Brandt M (2013) Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int J Food Sci* **2013**, 857120. <https://doi.org/10.1155/2013/857120>

Sajfritová M, Sovová H, Opletal L, Bártlová M (2005) Near-critical extraction of β -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *J Supercrit Fluid* **35**, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.12.008>

Semalty M, Adhikari L, Semwal D, Chauhan A, Mishra A, Kotiyal R, Semalty A (2017) A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*). *Curr Tradi Med* **3(3)**, 156-167. <https://doi.org/10.2174/221508380366617050212002>

Shen J, Shao X (2005) A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. *Anal Bioanal Chem* **383**, 1003–1008. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0078-6>

Spina M, Cuccioloni M, Sparapani L, Acciarr, S, Eleuteri A, Fioretti E, Angeletti M (2008) Comparative evaluation of flavanoid content in assessing quality of wild and cultivated vegetables for human consumption. *J Sci Food Agr* **88**, 294-304.

Stubljarić S, Žutić I, Fabek S, Benko B, Toth N (2013) Utjecaj načina uzgoja i gnojidbe dušikom na morfološka svojstva dvodomne koprive. *Glasnik zaštite bilja* **36(6)**, 12-21.

Taylor K (2009) Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *J Ecol* **97(6)**, 1436–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01575.x>

Uddin S, Ferdosh S, Akanda JH, Ghafoor Kashif, Rukshana AH, Ali E, Kamaruzzaman BY, Fauzi MB, Hadijah S, Shaarani S, Sarker Z (2018) Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health. *Sep Sci Technol* **53**, 2206-2223. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1454472>

Upton R (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J Herb Med* **3**, 9-38. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>

USDA (2020) *Urtica dioica* L. USDA - United States Department of Agriculture, <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=URDI>. Pristupljeno 24. Listopada 2021.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13(1)**, 1 – 26.
<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Matea Peričić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis