

Izolacija polifenola iz lista i korijena maslačka primjenom ekstrakcije pri povišenom i visokom tlaku

Ćuk, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:264454>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Ana Ćuk

649/PI

**IZOLACIJA POLIFENOLA IZ
LISTA I KORIJENA MASLAČKA
PRIMJENOM EKSTRAKCIJE PRI
POVIŠENOM I VISOKOM TLAKU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za tehnološke operacije na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć asistentice dr.sc. Ivone Elez Garofulić.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanoj prilici, strpljenju i izdvojenom vremenu te dr.sc. Ivoni Elez Garofulić i doc.dr.sc. Danijeli Bursać Kovačević na pristupačnosti i pomoći prilikom izvedbe ovoga rada.

Veliko hvala mojoj obitelji koji su mi omogućili studij i kojima pripada veliki dio zasluge za ovaj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA POLIFENOLA IZ LISTA I KORIJENA MASLAČKA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE PRI POVIŠENOM I VSOKOM TLAKU

Ana Ćuk, 649/PI

Sažetak: *Maslačak je biljka koju odlikuje visoka koncentracija fenolnih spojeva te može poslužiti kao dobra sirovina za njihovu ekstrakciju. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HPAE) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) su novije metode izolacije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj odabranih parametara na izolaciju fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka. Optimalni uvjeti za izolaciju iz lista HPAE metodom su 70 % - tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C, tlak 500 MPa i vrijeme ekstrakcije 5 minuta, a za izolaciju iz korijena 50 % - tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C, tlak 500 MPa i vrijeme ekstrakcije 5 minuta. Optimalni uvjeti za izolaciju iz lista ASE metodom su 50 % - tna vodena otopina etanola, temperatura 60 °C i vrijeme ekstrakcije 10 minuta, a iz korijena 50 % - tna vodena otopina etanola, temperatura 80 °C i vrijeme ekstrakcije 15 minuta. Primjenom ASE metode dobiveni su veći prinosi fenolnih spojeva nego HPAE metodom.*

Ključne riječi: maslačak, fenolni spojevi, HPAE, ASE

Rad sadrži: 40 stranica, 12 slika, 4 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Ivona Elez Garofulić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
2. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac*
3. Doc.dr.sc. *Sven Karlović*
4. Prof.dr.sc. *Damir Ježek* (zamjena)

Datum obrane: 14. srpanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF POLYPHENOLS FROM LEAVES AND ROOTS OF DANDELION ASSISTED BY HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

Ana Cuk, 649/PI

Abstract: *Dandelion is characterized by high concentrations of phenolic compounds and it can serve as a good raw material for their extraction. High hydrostatic pressure assisted extraction (HPAE) and accelerated solvent extraction (ASE) are relatively new technics which are used for the extraction of bioactive compounds from plant materials. The aim of this study was to investigate the influence of different parameters on the isolation of phenolic compounds from the leaves and roots of dandelion. Optimum conditions for extraction of an entire amount of phenols from leaves using HPAE method was as follows: ethanol in polarity of 70 % with 5 minutes duration at 60°C and 500 MPa pressure, on the other hand for extraction from roots, optimum conditions were: ethanol in polarity of 50 %, with 5 minutes duration at 60°C and 500 MPa pressure. Optimum conditions for extraction of an entire amount of phenols from leaves using ASE method was as follows: ethanol in polarity of 50 % with 10 minutes duration at 60°C. On the other hand, for extraction from roots optimum conditions were: ethanol in polarity of 50 %, with 15 minutes duration at 80°C. By applying ASE method higher yields of phenolic compounds were obtained than with HPAE method.*

Keywords: *dandelion, phenolic compounds, HPAE, ASE*

Thesis contains: 40 pages, 12 figures, 4 tables, 38 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: *Verica Dragović-Uzelac, Ph.D. Full Professor*

Technical support and assistance: *Ivona Elez Garofulić, Ph.D., assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor
2. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
3. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor
4. PhD. *Damir Ježek*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 14 July 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MASLAČAK.....	3
2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI MASLAČKA	4
2.2.1. Fenolni spojevi maslačka.....	4
2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA	11
2.3.1 Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom.....	12
2.3.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci maslačka.....	17
3.1.2. Otapala i reagensi.....	17
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE).....	20
3.2.2. Izolacija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE).....	22
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom	27
4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku.....	30
4.3. Usporedba prinosa fenolnih spojeva u ovisnosti o primjenjenoj metodi ekstrakcije	32
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je biljka iz porodice Asteraceae koja se uglavnom smatra korovom, iako najnovija istraživanja pokazuju izrazit biološki potencijal zbog značajnog udjela bioaktivnih spojeva. Jednu od najznačajnijih skupina bioaktivnih sojeva maslačka čine fenolni spojevi, a njihov udio varira u ovisnosti o dijelu biljke (npr. korijen, list), terminu berbe, agroekološkim uvjetima i sl. Fenolni spojevi maslačka imaju antioksidacijsko djelovanje te pokazuju povoljne učinke na ljudsko zdravlje.

Fenolni spojevi maslačka se razlikuju prema molekulskoj strukturi i polarnosti te je za njihovu izolaciju potrebno odabrati učinkovite metode te uvjete ekstrakcije. Ekstrakcija fenolnih spojeva se može provoditi primjenom konvencionalnih metoda uz upotrebu organskih otapala ili novih tehnika (ubrzana ekstrakcija otapalima, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pomoću hladne plazme, te visoko naponskog električnog pražnjenja i dr.) koje se sve više istražuju.

U novije vrijeme ispituje se mogućnost primjene novih i efikasnih metoda ekstrakcije koje ne zagađuju okoliš, štede energiju, uz korištenje manjeg volumena organskih otapala, a istovremeno daju visoke prinose ciljanih skupina spojeva (npr. fenolnih spojeva).

Prednosti ekstrakcije potpomognute visokim tlakom su kraće vrijeme ekstrakcije, visoki prinosi ekstrakcije, minimalno zagrijavanje što sprječava termalnu degradaciju, manje količine otapala i manji utrošak energije u odnosu na klasične metode ekstrakcije.

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku je automatizirana tehnika, koju karakterizira visoka propusnost uzoraka, veća brzina difuzije, veća topljivost analita, a samim tima i brža ekstrakcija. Metoda je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na oksidaciju, te je moguće provesti ekstrakciju u više stupnjeva ili ciklusa.

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati i usporediti učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) i ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE). Kod obadviije metode za ekstrakciju su korištene 50 i 70 % vodene otopine etanola, a ostali parametri ekstrakcije varirani su u ovisnosti o metodi.

Kod ASE ispitivan je utjecaj temperature ekstrakcije (60, 80 i 100 °C) kroz 1, 2 i 3 ciklusa, pri čemu je jedan ciklus trajao 5 minuta.

Kod HPAE ispitivan je utjecaj temperature ekstrakcije (22 i 60 °C), tijekom 5 i 15 minuta pri tlaku 300 i 500 MPa.

Krajnji cilj istraživanja je bio odrediti optimalne parametre pri kojima se ostvaruje najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom i ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLAČAK

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je trajna zeljasta višegodišnja biljka iz porodice Asteraceae, koja se većinom smatra korovom, iako u sebi sadrži brojne spojeve koji doprinose ljekovitim svojstvima (Popescui sur.,2010). Ima snažan vretenasti korijen i listove združene u prizemnu rozetu. Rozetu čine listovi priligli uz tlo, koji se tek u kasnijem razvoju uspravljaju. Oblik lista je promjenjiv, ima ih s glatkim rubom i pilasto nazubljenih. Cjevasta cvjetna stabljika je okrugla i nosi žutu cvatnu glavicu koja se noću i za vrijeme kiše zatvara. Nakon cvatnje pojavljuje se plod roška sa jednom sjemenkom i papusom pomoću kojeg se plodovi rasprostranjuju vjetrom. Maslačak je samonikla biljka čitave sjeverne polutke, a dolazi često u većem mnoštvu na travnatim površinama, napuštenim njivama, vrtovima od nizine do predplaninskog pojasa (Erhatic i sur., 2014).



Slika 1. List maslačka (*Taraxaci folium*)

(Anonymus., 1)



Slika 2. Korijen maslačka (*Taraxaci radix*)

(Anonymus., 2)

Čitava biljka sadrži holin, gorku tvar, škrob, koji se kod dužeg čuvanja pretvara u voćni šećer, saponin, masti, tragove eteričnog ulja, vosak, sluz, kaučuk, šećer, bjelančevine, levulin i taraksin. U korijenu se nalazi još i kalij, kalcij, mangan, natrij, silicijska (kreemična) kiselina, sumpor i vitamin C. Sadržaj tvari u biljnim dijelovima mijenja se s godišnjim dobom, tako da svježiji korijen, iskopan u proljeće (od sredine ožujka do sredine travnja), sadrži većim dijelom

gorku tvar, prema sredini kolovoza, umjesto mliječnog soka, stvara se inulin, a u listopadu je u korijenu najviše tarakserina i levulina (Erhatic i sur., 2014).

List maslačka koristi se u pučkoj medicini kao diuretik, snižava visok krvni tlak, a ubran ranije u proljeće koristi se kao namirnica u prehrani (Grlić, 1990). Mladi listovi i cvjetovi se koriste za pripremu salata, a prženi korijen se koristi kao zamjena za kavu. Isto tako koristi se i za pripremu čaja (Schütz i sur., 2006). Od antičkog doba maslačak se koristi u narodnoj medicini za liječenje depresije, bolesti jetre, slezene, dojki, maternice, anoreksije, te kao protuupalno sredstvo (Jeon i sur., 2008).

2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI MASLAČKA

Prema dosadašnjim istraživanjima, maslačak ima ljekovita svojstva kojima doprinose biološki aktivne tvari koje sadrži, a koje doprinose ljudskom zdravlju. U kemijskom sastavu maslačka većinu biološki aktivnih tvari terpenoida i sterola čine taraksan i taraksacerin, koji su podjednako zastupljeni u korijenu, listu i cvijetu biljke. Od terpena i sterola izdvajaju se beta amin, tarakasterol, tarakserol, sitosterin, sigmasterin, te fitosterin (Lee i sur., 2005).

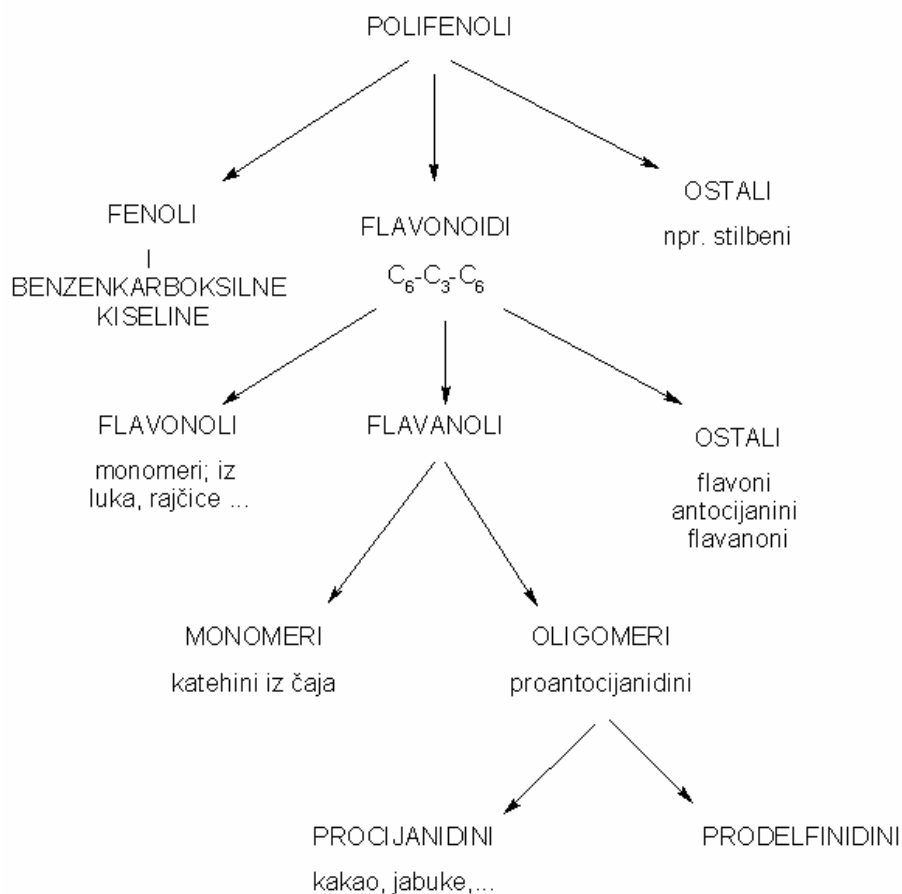
Fenolni spojevi čine jednu od najvažnijih skupina bioaktivnih spojeva maslačka, a značajno variraju ovisno o dijelu biljke. Udio fenolnih spojeva veći je u vanjskim dijelovima biljke, u cvjetovima i listovima ($9,9 \pm 0,28$ g fenolnih spojeva na 100 g ekstrakta maslačka) nego u korijenu ($0,086 \pm 0,003$ g fenolnih spojeva na 100 g ekstrakta maslačka) (González-Castejón i sur., 2012). Trenutno u svijetu postoje mnogi dokazi o biološkim aktivnostima fenolnih spojeva poput antioksidacijskog, antimikrobnog, protuupalnog i antikancerogenog djelovanja što je dovelo do posebnog naglaska na korištenje fenolnih spojeva u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Teixeira i sur., 2014).

2.2.1. Fenolni spojevi maslačka

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji doprinose senzorskim i nutritivnim svojstvima voća, povrća i biljaka. Koncentrirani su u žitaricama, kori drveća, lišću i cvijeću, gotovo svim vrstama začinskog i aromatskog bilja te u sjemenkama, pokožici i mezokarpu voća i povrća (Riedel i sur., 2012).

Predstavljaju jednu od najbrojnijih skupina biljnih metabolita u prirodi te ih je do danas poznato oko 8000 (Dreosti, 2000). Dije se u više podskupina, a prema osnovnoj podjeli razlikujemo flavonoide i neflavonidne fenolne spojeve odnosno fenolne kiseline (Teixeira i sur., 2014). Sadrže dva aromatska prstena koji su povezani pomoću tri ugljikova atoma, na koje je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Njihova struktura varira od jednostavnih fenolnih molekula do kompleksnih visokomolekularnih polimera (Ignat i sur., 2011). Antioksidativno djelovanje polifenola povezuje se s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

U cvijetu maslačka sadržaj fenolnih kiselina iznosi 4,09% i flavonoida 3,65% (Yang Lan i sur., 2011).



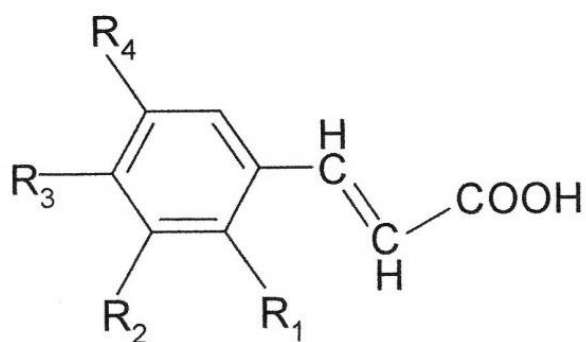
Slika 3. Podjela polifenolnih spojeva (Berend i Grabarić, 2008)

2.2.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne grupe, a to su hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁) i hidroksicimetne kiseline (C₆-C₃), te njihove derivate. Razlika u strukturi između pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990.)

Hidroksicimetne kiseline

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



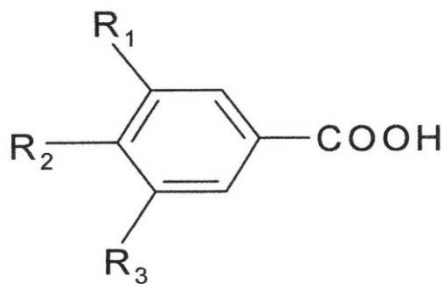
HIDROKSICIMETNE KISELINE:

<i>Kafeinska</i>	R ₁ =R ₂ =H R ₃ = R ₄ =OH
<i>p-kumarinska</i>	R ₁ =R ₂ =H R ₃ =OH
<i>Ferulinska</i>	R ₁ =R ₂ = R ₄ =H R ₃ =OH R ₄ =OCH ₃
<i>sinapinska</i>	R ₁ =H R ₃ =OH R ₄ = R ₂ =OCH ₃

Slika 4. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)

Hidroksibenzojeve kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline, osnovne strukture C₆-C₁ nastaju izravno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne kao slobodne kiseline. U ovu skupinu spadaju: galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska, elaginska i salicilna kiselina (Bravo, 1998).



HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	
<i>galna</i>	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH
<i>protokatehinska</i>	R ₁ =H R ₂ =R ₃ =OH
<i>siringinska</i>	R ₂ =OH R ₁ =R ₃ =OCH ₃
<i>vanilinska</i>	R ₁ =H R ₂ =OH R ₃ =OCH ₃

Slika 5. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

Najveći dio fenolnih spojeva maslačka pripada fenolnim kiselinama. Od fenolnih kiselina prevladavaju hidroksicimetne kiseline i njeni derivati, a u korijenu maslačka zastupljene su *p*-hidroksibenzojeva kiselina, klorogenska kiselina, kafeinska kiselina, te cikorična kiselina, a dominantne su klorogenska kiselina i cikorična kiselina (dikafeoilkinična kiselina) (Diasi sur., 2014; Najda i Sugier, 2007). U listu maslačka dominantne su cikorična kiselina, zatim u padajućem nizu slijede sinapinska kiselina, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina te kafeinska kiselina (Ivanov, 2014).

Tablica 1. Koncentracija fenolnih kiselina u etil acetatnom ekstraktu korijena maslačka (Kenny i sur., 2014)

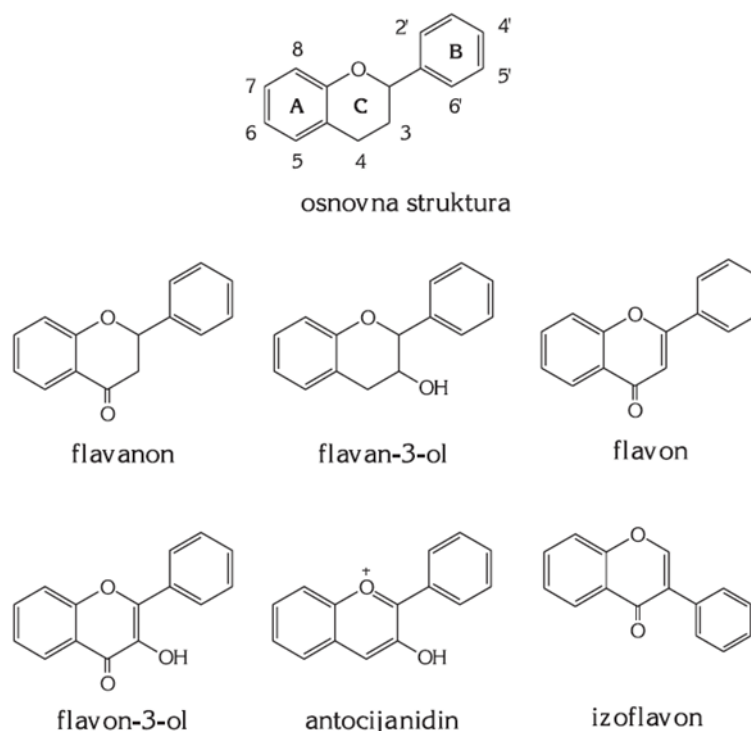
Fenolna kiselina	Koncentracija (mg g ⁻¹)
Kafeinska kiselina	3,932
Klorogenska kiselina	31,059
Ferulinska kiselina	0,317
Galna kiselina	0,334
Sinerginska kiselina	2,182
Vanilin kiselina	1,694

Cikorična kiselina se u najvećoj količini nalazi u listu maslačka, a njena koncentracija ovisi o periodu berbe. Prije cvjetanja biljke koncentracija cikorične kiseline veća je u listu maslačka, dok je nakon cvjetanja veća koncentracija u korijenu biljke. Najveće količine cikorične kiseline nalazimo u lišću ubranom tijekom ožujka, dok se nakon toga smanjuje i najmanja je u listovima ubranim tijekom prosinca. Udio cikorične kiseline u korijenu također ovisi o terminu berbe, i suprotno listu, najveće količine nalaze se u korijenu ubranom tijekom prosinca, tj. najmanje tijekom ožujka (Stzlianon i sur., 2014). Istraživanja korijena maslačka potvrđuju navedeno, tj. u korijenu maslačka ubranom u svibnju određena je veća količina fenolnih spojeva nego u korijenu ubranom u srpnju ili listopadu (Najda i Sugire, 2007).

Ekstrakti maslačka koji sadrže klorogensku kiselinu su pokazali da djeluju kao inhibitori patogenih bakterija *Staphylococcus* i *Escherichiacoli*, pozitivno utječu na sprječavanje simptoma astme, upale i alergije, te djeluju na sniženje razine glukoze u krvi (Chkhikvishvili i sur., 2001).

2.2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su niskomolekularni spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma organiziranih u C6-C3-C6 konfiguraciju. Do sada je identificirano oko 4000 različitih vrsta flavonoida (Ignat i sur., 2011). Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama (Harborne i Baxter, 1999). Glikozilacija kod flavonoida uglavnom se događa na položaju C3, a rjeđe na položaju C7. Šećer koji se najčešće veže na aglikonski dio je glukoza, no pojavljuju se i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza te neki disaharidi kao što je rutinoza (Miller i Ruiz-Larrea, 2002). Podskupine flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena (Teixeira i sur., 2014) i možemo ih podijeliti na antocijane, flavone, izoflavone, flavanone, flavonole i flavanole (Ignat i sur., 2011).



Slika 6. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Od flavonoida u maslačku se nalaze flavoni i flavonol glikozidi (Schutz i sur., 2005). Najzastupljeniji su luteolin (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon) i luteolin-7-glikozid (Hu i Kitts, 2003), te kvercetin koji pridonose antioksidacijskoj aktivnosti maslačka (Dias i sur., 2014).

Tablica 2. Koncentracija flavonoida u etil acetatnom ekstraktu korijena maslačka (Kenny i sur., 2014)

Flavonoid	Koncentracija (mg g⁻¹)
Apigenin – 7- O- glikozid	0,012
3-kumarin	0,224
4-kumarin	0,006
Luteolin	0,301
Luteolin-7-O-glikozid	0,503
Naringenin -7-O-glikozid	0,031
Narirutin	0,002

2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Definira se kao prijenos jedne ili više bioloških tvari, iz materijala u kojem se nalaze, u tekuću fazu nakon čega slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze. Tijekom procesa ekstrakcije jedna ili više komponenti prelazi iz biološkog materijala u otopinu. Fizikalni proces koji to omogućava je koncentracijski gradijent, gdje je koncentracija komponenti u otapalu manja od njihove koncentracije u biološkom materijalu tako da te komponente procesom difuzije prelaze iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012).

Faktori koji utječu na djelotvornost ekstrakcije fenolnih spojeva su veličina čestica, vrsta fenola, vrste i polarnost otapala, odnos otapala i uzorka, vrijeme i temperatura ekstrakcije te zbog svih tih razloga ne postoji univerzalna metoda ekstrakcije za sve vrste fenolnih spojeva (Teixeira i sur., 2014).

Operacije koje je potrebno provesti prije ekstrakcije ciljanih skupina spojeva iz biljnog materijala su usitnjavanje, sušenje ili liofilizacija uzoraka, nakon čega slijedi postupak ekstrakcije. Postupak ekstrakcije najčešće se provodi primjenom konvencionalnih metoda pri čemu se ekstrahira i velik udio interferirajućih spojeva, kao što su šećeri, organske kiseline i proteini, što dovodi do smanjenja čistoće ekstrakta. Takve ekstrakte potrebno je podvrgnuti različitim postupcima pročišćavanja (Ignat i sur., 2011).

Veće cijene energenata i potreba za smanjenjem onečišćenja okoliša dovela je do razvoja novih tehnika ekstrakcije u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Mnogi procesi ekstrakcije u prehrambenoj industriji koriste organska otapala koja predstavljaju atmosfersko zagađenje, te zaostaju i u prerađevinama kao i u ekstraktima što utječe na njihovu čistoću. Kako bi se zadovoljila rastuća potreba za čistoćom proizvoda, procesima koji ne zagađuju okoliš i štede energiju, uz dodatnu prednost korištenja manje otapala, koriste se različite nove metode ekstrakcije pomoću otapala. Ekstrakcija superkritičnim tekućinama trenutno je najčešće korištena alternativna metoda, a na tržištu već postoje i komercijalni proizvodi dobiveni ekstrakcijom superkritičnim tekućinama (Lloyd i van Wyk, 2012). Ostale alternativne metode ekstrakcije su ubrzana ekstrakcija otapalima (Accelerated Solvent Extraction, ASE), ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (High Pressure Assisted Extraction, HPAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (Microwave Assisted Extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Ultrasound Assisted Extraction,

UAE) i kao jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija pomoću hladne plazme, te visoko naponskog električnog pražnjenja (High Voltage Electrical Discharges, HVED) (Teixeira i sur., 2013; Bursać Kovačević i sur.2016; Herceg i sur., 2015, Elez Garofulić i sur., 2015).

2.3.1 Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom smatra se ekološki prihvatljivom metodom od strane FDA (Food and Drug Administration, 2007), te se u kemijskoj, keramičkoj i plastičnoj industriji koristi godinama dok je u prehrambenoj industriji njen potencijal prepoznat tek u kasnim 1980-ima. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom relativno je nova tehnika koja se koristi za ekstrakciju aktivnih komponenti iz biljnih materijala (Prasad i sur., 2012). Upotreba visokog tlaka podrazumijeva podvrgavanje uzoraka djelovanju tlakova od 100 do 1200 MPa, prilikom čega se temperatura obrade može kretati od ispod 0°C do iznad 100°C, a vrijeme izloženosti uzoraka djelovanju visokog tlaka može biti od nekoliko sekundi do preko 20 minuta (Krešić i sur., 2011).

Prednosti upotrebe visokog tlaka su: očuvanje komponenti koje utječu na zdravlje, veći zdravstveni doprinos hrane zbog povećane bioraspoloživosti mikronutrijenata i fitokemikalija, smanjeni alergijski potencijal, očuvanje lipida, smanjenje unosa soli zbog povećane percepcije slanosti, te smanjenje kontaminacije tijekom procesa (Barba i sur., 2016).

Djelovanjem visokog tlaka dolazi do smanjenja volumena sustava na koji se tlak primjenjuje. Prema Le Chatelier-Braunovom zakonu, sustav nastoji umanjiti promjenu neke intenzivne veličine. Ako na zatvoreni sustav u uvjetima ravnoteže djelujemo povišenim tlakom, sustav se prilagođava tako da se smanje utjecaji tlaka, pri čemu dolazi do kemijskih reakcija i fizikalnih promjena (prelazak iz faza, promjene u konformaciji) koje vode smanjenju volumena i uspostave nove ravnoteže. Dolazi do inhibicije svih ostalih reakcija. Upravo su zbog toga nekovalentne kemijske veze (vodikove, van der Waalove i ionske veze, te hidrofobne interakcije) osjetljive na djelovanje visokog tlaka. Kao posljedica toga, komponente hrane velike molekulske mase u kojima je terciarna struktura od presudne važnosti za funkcionalna svojstva podložne su promjenama konformacije i funkcionalnih svojstava zbog tretiranja visokim tlakom. Jedna od glavnih prednosti djelovanja visokog tlaka je činjenica da su komponente hrane koje su odgovorne za nutritivnu vrijednost i organoleptička svojstva hrane, zahvaljujući malom udjelu sekundarne, terciarne i kvartarne strukture praktički neosjetljive

na djelovanje visokog tlaka (Krešić i sur., 2011). Smanjenjem volumena tekućine (do 20 % pri 600 MPa za vodu) omogućuje se bliži kontakt između molekula, te se smanjuje put potreban za difuziju otapala unutar stanica i difuziju stanične tvari prema van. Time se ubrzava proces ekstrakcije i omogućuju se veći prinosi.

Energija kompresije 1 litre vode pri 400 MPa iznosi 19,2 kJ, što je manje u usporedbi s energijom potrebnom za zagrijavanje jedne litre vode od 20°C na 25°C (20,9 kJ). Manja količina energije uključena u tretiranje visokim tlakom objašnjava činjenicu da su kovalentne veze manje osjetljive na djelovanje visokog tlaka u usporedbi s drugim kemijskim vezama. Dodatna prednost ovog postupka, sa stajališta potrošnje energije, je da nakon postizanja željenog tlaka održavanje tretiranog materijala pod postignutim tlakom ne zahtijeva dodatno dovodenje energije, a vrijeme tretiranja ne ovisi o dimenzijama uzorka (Krešić i sur., 2011).

Tijekom procesa ekstrakcije potpomognute visokim tlakom topljivost raste kako raste tlak prema teoriji faza. Tlačene stanice imaju veću propusnost definiranu u teoriji prijenosa mase što znači da što je tlak viši, više otapala ulazi u stanice, što dovodi do veće propusnosti membrana. Djelovanjem tlaka time više komponenti može proći kroz membranu, što na kraju dovodi i do većeg prinosa ciljanih skupina spojeva te kraćeg vremena ekstrakcije. Uz promjenu u propusnosti membrane, pokretačka sila koja značajno utječe na proces ekstrakcije povećanjem prijenosa mase kroz staničnu membranu je velika razlika u tlaku između unutarnjeg i vanjskog dijela stanice (Altuner i sur., 2012).

Ekstrakcija visokim tlakom pruža mogućnosti inaktivacije intaktnih enzima što može objasniti visoki prinos ekstrakcije i antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije (naročito ako se ekstrakcija provodi iz svježeg biljnog materijala). Visoki tlak također ima sposobnost smanjiti pH otapala tijekom ekstrakcije što povećava ekstrakciju bioaktivnih komponenata koje su stabilnije pri nižim pH. Za svakih 100 MPa pH se smanjuje od 0,3 do 0,5 jedinica. U uzorcima koji se tretiraju visokim tlakom dolazi do mnogih strukturnih promjena kao što su oštećenja i deformacije stanica, njihovih membrana te denaturacija proteina i enzima (Prasad i sur., 2012). Odabir otapala u ekstrakciji potpomognutoj visokim hidrostatskim tlakom ovisi o polarnosti komponenata koje želimo ekstrahirati. Zbog toga se ova metoda može koristiti u ekstrakciji jako polarnih, slabije polarnih i nepolarnih komponenata koristeći različita otapala (Altuner i sur., 2012). Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom može skratiti vrijeme ekstrakcije te povećati količinu ekstrahiranih komponenti u usporedbi s drugim metodama te nema

nepovoljne učinke na aktivnost i strukturu biološki aktivnih komponenata (Briones-Labarca i sur., 2015).

Visoki tlak djeluje odmah i ravnomjerno kroz namirnice bez obzira na njihovu veličinu, oblik ili sastav i zbog toga se ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom smatra dobrom metodom izolacije fenolnih spojeva. Isto tako ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom zahtjeva minimalno zagrijavanje te može spriječiti termalnu degradaciju, istovremeno osigurava visoke prinose ekstrakcije, ali i skraćuje vrijeme ekstrakcije. Jedna od prednosti ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom je i mogućnost provođenja procesa u širokom rasponu temperatura, pri čemu se već na sobnoj temperaturi mogu dobiti odlični rezultati. Time se izbjegava utjecaj visokih temperatura na ekstrahirane spojeve kao tijekom konvencionalne ekstrakcije, te se smanjuje utrošak energije. Samo djelovanje visokog tlaka dovodi do minimalnih promjena u temperaturi kao posljedice adijabatske kompresije. Za vodu su te vrijednosti oko 1,5 °C na svakih 100 MPa. Uređaji za obradu visokim hidrostatskim tlakom omogućuju i cikličnu obradu materijala, čime se u više ciklusa kompresije i ekspanzije pri različitim parametrima mogu dobiti značajno viši prinosi nego korištenjem samo jednog ciklusa (Prasad i sur., 2012).

Različite grupe autora bavile su se utjecajem ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom na izolaciju različitih skupina bioaktivnih spojeva iz različitih biljnih vrsta.

Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom iz Korejske maline (*Rubus coreanus*) pri tlaku od 500 MPa, temperaturi 60°C, te vremenu od 5 do 15 minuta pokazala se znatno bolja od konvencionalne ekstrakcije, 24 sata pri 100°C. Dobivene su veće koncentracije kafeinske kiseline, katehina i ferulinske kiseline ekstrakcijom potpomognutom visokim hidrostatskim tlakom (12,3 mg/L, 10,1 mg/L, 6,9 mg/L), naprema koncentracijama dobivenima konvencionalnom ekstrakcijom (10,1 mg/L, 3,1 mg/L, 2,6 mg/L) (Barba i sur., 2016).

Usporedbom HPAE i konvencionalne ekstrakcije, kod izolacije fenolnih spojeva iz perikarpa voća longan, značajno je veća koncentracija korilagina i ukupnih fenolnih spojeva primjenom HPAE uz uvjete: tlak 200 - 500 MPa, temperaturu 30 - 70 °C u vremenu 2.5 – 30 minuta nego kod konvencionalne ekstrakcije s etanolom kao otapalom u trajanju od 12 sati pri 100°C (Barba i sur., 2016).

Provedeno je istraživanje koje je obuhvaćalo izolaciju flavonoida iz propolisa i *Rhodiola sachalinensis* primjenom ekstrakcije potpomognute visokim tlakom u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija ispiranjem, Soxhlet ekstrakcija i ekstrakcija uz pomoć povratnog hladila). Uvjeti pod kojima se provodila HPAE su: tlak 400-600 MPa, temperatura 20°C, te vrijeme ekstrakcije od 15 minuta. Utvrđeno je da se primjenom ekstrakcije potpomognute visokim tlakom dobivaju veći prinosi flavonoida i znatno smanjuje vrijeme ekstrakcije u usporedbi s drugim metodama (Barba i sur., 2016).

2.3.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak i temperaturu moderna je metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995 godine. Riječ je o automatiziranoj tehnici kod koje se ekstrakcija izvodi otapalom uz povišenu temperaturu i povišeni tlak. Automatizacija omogućuje visoku propusnost uzoraka i bržu provedbu tehnike.

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku primjenjuje se za izolaciju širokog spektra bioaktivnih spojeva, a naročito je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na oksidaciju. Iako ovaj tip ekstrakcije zahtjeva više temperature u odnosu na neke druge ekstrakcijske metode, visoki tlakovi (do 20 MPa) otapalo zadržavaju u tekućem stanju pri visokim temperaturama, čime se značajno povećava brzina difuzije, topljivost analita i ubrzava sama ekstrakcija. Prednost ove ekstrakcijske tehnike je i u mogućnosti provođenja ekstrakcije u više stupnjeva (ili ciklusa) što je važno jer se tim postupkom učinkovitost same ekstrakcije značajno povećava. Uređaj ima mogućnost provođenja ekstrakcije uz doziranje tri različite vrste otapala, a sama ekstrakcija se može vršiti uz upotrebu različitih vrsta mono otapala ili smjese različitih vrsta otapala. Ipak, najčešće se koriste binarni sustavi otapala. Obzirom da je nakon ekstrakcije materijal osušen, moguće je vršiti ponovljene ekstrakcije s istim otapalom ili sukcesivne ekstrakcije koristeći otapala s rastućom polarnosti (Mottaleb i Sarker, 2012).

Visoki tlak olakšava prodor otapala kroz biljnu matricu, ubrzava proces ekstrakcije, te istovremeno smanjuje količinu otapala potrebnu za ekstrakciju. Automatizirana oprema osigurava savršeno preciznu kontrolu tlaka, temperature, vremena ekstrakcije i sastava otapala tokom čitavog procesa. Moguće je programirati ekstrakciju 24 uzorka u jednoj seriji, gdje su

uzorci smješteni u posudice od nehrđajućeg čelika u kojima su zaštićeni od svjetlosti i kisika. (Zaghdoudi i sur., 2015).

U procesu ubrzane ekstrakcije otapalima pri visokom tlaku se koriste i adsorbenti. Oni se stavljaju u ćelije zajedno s uzorkom i tako povećavaju selektivnost postupka. Adsorbent se u ćeliju stavlja prvi, a na njega se zatim stavlja uzorak i na taj se način tijekom ekstrakcije neželjene komponente zadržavaju u ćeliji. Zadržavanje ovisi o vrsti i fizikalno-kemijskim karakteristikama otapala i željenih analita. Za uklanjanje neželjenih materijala postoji velik broj adsorbenata, primjerice silicijev dioksid, glina i C18 smole se koriste za adsorpciju nepolarnih lipida i obojenih spojeva (Mottaleb i Sarker, 2012).

Ovisno o vrsti fenolnih spojeva koje je potrebno ekstrahirati i o materijalu iz kojeg se ekstrahira, potrebno je pronaći optimalne parametre za najbolje iskorištenje. Koristeći ovu tehniku, za ekstrakciju flavan-3-ol derivata iz sjemenki grejpa, među različitim otapalima, najpovoljnijim se pokazao 70%-tni aceton, a najbolji prinosi ekstrakcije se dobiju povećanjem temperature s 80°C na 120°C. Učinkovitost ekstrakcije ovisi i o veličini čestica, a ona je dva ili tri puta manja ako je prosječna veličina čestica 0,725 mm umjesto 0,512 mm. Optimalno vrijeme za ekstrakciju monomera i dimera flavan-2-ola se pokazalo 20 minuta u jednom ciklusu ili isto tako dva ciklusa po 10 minuta (Bozan i Altinay, 2014).

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku korištena je za ekstrakciju fenolnih spojeva iz zrna sirka pri temperaturama 60, 120 i 150 °C. Pri temperaturi od 120 i 150 °C koristeći 50 i 70 %-tno otapalo etanol/voda (v/v) došlo je do gotovo jednake ekstrakcije fenolnih spojeva i do 12% više antioksidanasa uspoređujući s tradicionalnim metodama gdje se kao otapalo koristi aceton i metanol (Barros i sur., 2013).

Rajha i suradnici (2014) su određivali fenolne spojeve u komini grožđa primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku, te su kao optimalne parametre izdvojili 70%-tn vodenu otopinu etanola i temperaturu od 140 °C. Zaključili su da je ASE metoda dobra za koncentriranje bioaktivnih fenolnih spojeva, te je to postupak koji se može koristiti u industriji hrane kao ekonomski isplativ i za okoliš siguran.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci maslačka

Istraživanje je provedeno na na biljnim preparatima maslačka i to listu *Taraxaci folium* (porodica *Cichoriaceae*) i korijenu *Taraxaci radix* (*Taraxacum officinale*), nabavljenim u suradnji sa Suban d.o.o. (biljni preparati su sakupljeni na području RH te osušeni). Biljni preparati lista i korijena maslačka su samljeveni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolce Vita CG1, Italy) u fini prah, a pomoću laserskog analizatora (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) određena je veličina čestica ($d \leq 500$ mikrona). Dobiveni prah je korišten za ekstrakcije fenolnih spojeva.

3.1.2. Otopala i reagensi

- Etanol, 96%-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 30, 50 i 70% (v/v)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Na_2CO_3) (Lach-Ner, Neratovice Češka)
- Zasićena topina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
 - Priprema: 200 g anhidrida natrijevog karbonata otopi se u 800mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerno tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.
- Galna kiselina, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Standard galne kiseline
 - Priprema: U plastičnoj ladici za vaganje odvaži se 500 mg galne kiseline te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Nakon toga se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6
 - Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata koji se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 1 L u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Centrifuga (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka)
- Električni mlinac (Imetec Dolcevita CG1, Italy)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Laserski analizator (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)
- Spektrofotometar (VWR UV-PC Spectrophotometer)
- Tehnička vaga Mettler (točnost $\pm 0,01\text{g}$)
- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Uređaj za vakumiranje (Besser Vacuum SRL, Italija)
- Uređaj za visoki tlak (Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

Pribor:

- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Falkonice volumena 15 mL i 50 mL
- Menzure (50 mL, 100 mL i 500 mL)
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Pipete (5 mL, 10 mL, 20 mL)

- Plastične bočice (50 mL)
- Plastične lađice za vaganje
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci
- Vakuum vrećice

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE)

Izvaže se 1 g ($\pm 0,001$ g) uzoraka praha lista i korijena maslačka u plastičnu bočicu volumena 50 mL te se menzutom doda 40 mL otapala odgovarajuće polarnosti (vodena otopina etanola 50% i 70%, v/v). Plastična bočica se zatim dobro zatvori, stavi u plastičnu vrećicu i vakuumira u uređaju za vakumiranje. Vakimirani uzorci stavljaju se u uređaj za obradu visokim hidrostatskim tlakom (2 L, Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija) (Slika 7) te slijedi ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, pri čemu se variraju temperatura, tlak, vrijeme i polarnost otapala. Otopine korištene za ekstrakciju su 50 i 70 %-tne vodene otopine etanola. Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc) (Tablica 3.), a ekstrakti su pripremani u duplikatu. Parametri tlaka i temperature tijekom provođenja procesa praćeni su preko K i J termo parova i mjerača tlaka povezanih na SCADA sustav.



Slika 7. Uređaj za visoki tlak: Stansted Fluid Power, Velika Britanija

Tablica 3. Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute visokim hidrostatskim tlakom iz lista i korijena maslačka

Uzorak	Tlak (MPa)	Polarnost otapala (%)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
<i>List/korijen maslačka</i>	300	50	22	5
				15
			60	5
		15		
		70	22	5
				15
	60		5	
		15		
	500	50	22	5
				15
			60	5
				15
		70	22	5
				15
			60	5
				15

Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL pomoću lijevka te nadopune do oznake otapalom za ekstrakciju. Uzorci se zatim prenose u falkonice volumena 50 mL i centrifugiraju na $5500 \text{ o} \cdot \text{min}^{-1}$ 10 minuta nakon čega se dekantiraju u nove falkonice volumena 50 mL i skladište na $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje analize.

3.2.2. Izolacija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE)

Na analitičkoj vagi u plastičnoj lađici odvažuje se 2 g ($\pm 0,0001$) uzorka praha lista i korijena maslačka. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika najprije se postavi celulozni filter papir, a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje (DE, P/N 062819), na koju se zatim dodaje odvagani uzorak i sve dobro promiješa sa špatulom, vodeći pri tom računa da se ne bi oštetio filter na dnu ćelije. Nakon toga se ponovno se dodaje dijatomejska zemlja do vrha ćelije (5 mm ispod gornjeg ruba) te se ćelija ručno zatvara. Tako pripremljeni uzorci postavljaju na ekstrakciju na uređaju Ase Dionex 350®. Ekstrakcija je provedena prema punom faktorskom planu pokusa pri čemu je variran udio etanola u vodenim otopinama (50 i 70 %, v/v), broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3) pri čemu je vrijeme trajanja ciklusa 5 min. Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc) (Tablica 2.), a ekstrakti su pripremani u duplikatu.

Tablica 4. Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak iz lista i korijena maslačka

Uzorak	Statičko vrijeme ekstrakcije (min)	Polarnost otapala (%)	Temperatura (°C)	Broj ciklusa ekstrakcije
<i>List/korijen maslačka</i>	5	50	60	1
				2
				3
			80	1
				2
				3
			100	1
				2
				3
		70	60	1
				2
				3
			80	1
				2
				3
100	1			
	2			
	3			

Nakon završene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 100 mL te se nadopune do oznake otapalom koje se koristi za ekstrakciju (50% ili 70 %-tna vodena otopina etanola). Naposljetku se pripremljeni ekstrakti prenesu u po dvije plastične falkonice volumena 50 mL te se skladište na -18 °C do provođenja analiza.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Fenolni spojevi se mogu analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske su jednostavne i praktične, a za određivanje ukupnih fenola najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom.

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari nastaje plavo obojeni kompleks čiji intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema ekstrakata

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2. Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Razrijeđenja:

Ekstrakti lista maslačka dobiveni HPAE metodom prije analize razrijeđeni su 5puta. Ekstrakti korijena maslačka dobiveni HPAE metodom prije analize nisu bili razrijeđivani. Ekstrakti lista maslačka dobiveni ASE metodom prije analize razrijeđeni su 20x. Ekstrakti korijena maslačka dobiveni ASE metodom prije analize razrijeđeni su 5x.

Svi ekstrakti razrijeđeni su destiliranom vodom.

Postupak određivanja

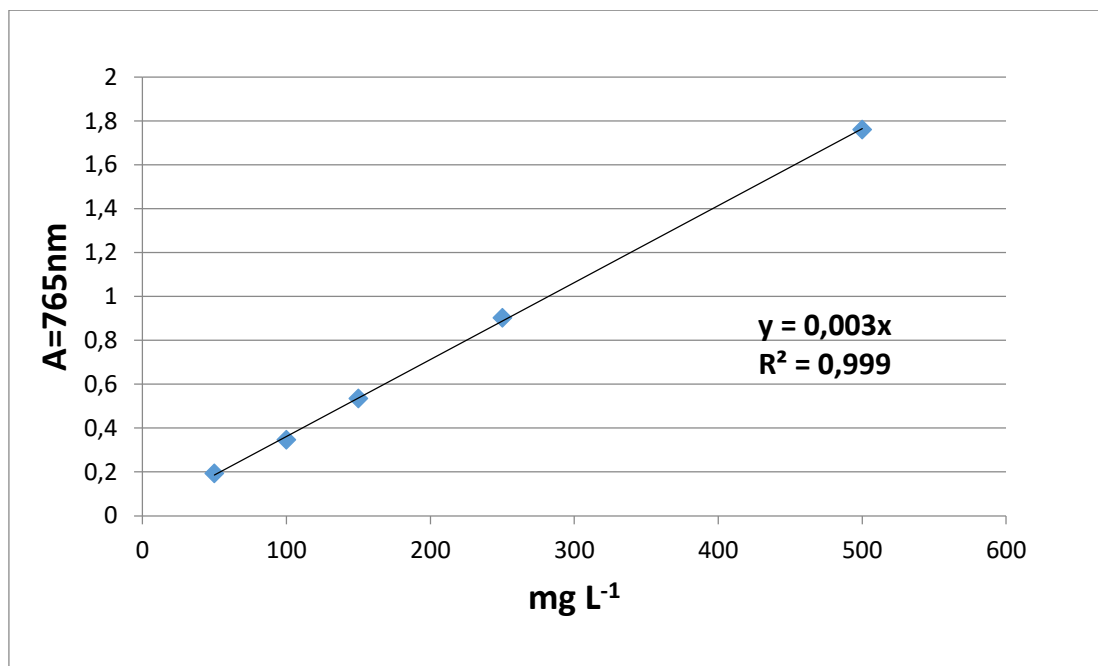
U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa. Zatim se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi od 50°C (u kupelji od rotavapora). Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima destilirana voda. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina galne kiseline u koncentraciji 5 g L⁻¹ tako da se odvaži 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola. Otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline se u odmjernim tikvicama od 100 mL rade razrijeđenja tako da se redom otpipetira 1, 2, 3 i 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i do oznake nadopune destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 50, 100, 150 i 250 mg L⁻¹. Iz svake tikvice se otpipetira 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u kupelji od rotavapora. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (Slika 8). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola.



Slika 8. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravcaglasi:

$$Y = 0,003 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mgL⁻¹).

R² - koeficijent determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju uspoređivana je učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE) i ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). U obadvije metode kao otapalo za ekstrakciju korištena je vodena otopina etanola.

Parametri koji su varirani kod HPAE su: polarnost otapala odnosno udio etanola u otapalu za ekstrakciju (50 %, 70 %), temperatura (22 °C, 60 °C), vrijeme (5 min, 15 min), te tlak (300 MPa, 500 MPa), dok su kod ASE varirani polarnosti otapala (50 %, 70 %), temperatura (60 °C, 80 °C, 100 °C), te ciklusi (1, 2, 3) pri čemu je trajanje jednog ciklusa bilo 5 minuta.

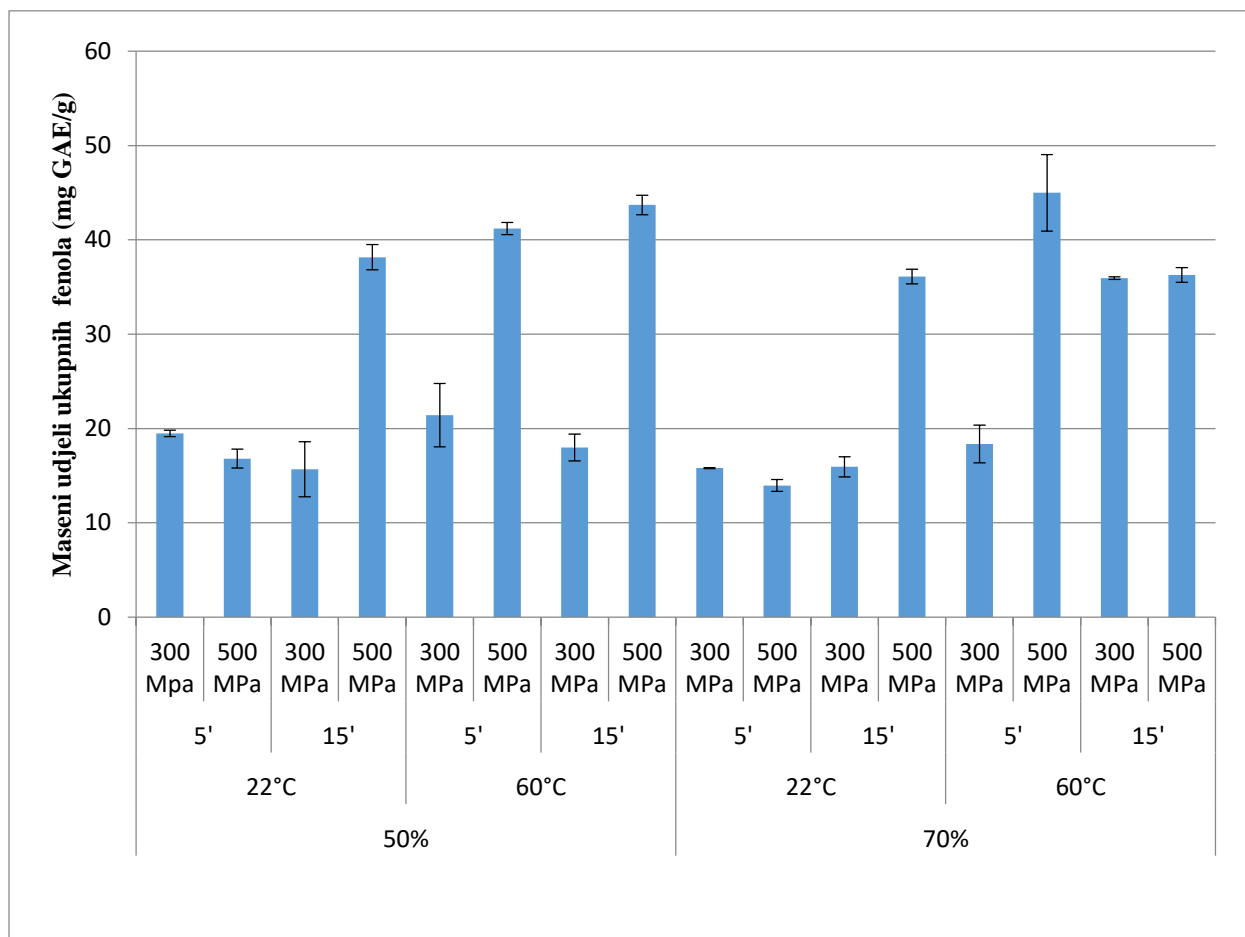
Rezultati i rasprava su podijeljeni prema tehnikama i prikazani su u dva podpoglavlja, dok je u trećem podpoglavlju prikazana usporedba dviju primjenjivanih metoda te prinosi fenolnih spojeva u ovisnosti o primjenjenim uvjetima ekstrakcije .

U prvom podpoglavlju prikazani su utjecaji visokog hidrostatskog tlaka, vremena ekstrakcije, temperature i polarnosti otapala na koncentraciju fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim iz lista i korijena maslačka (Slika 9 i 10).

U drugom podpoglavlju prikazani su utjecaji vremena ekstrakcije, temperature i polarnosti otapala na koncentraciju fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim iz lista i korijena maslačka (Slika 11 i 12).

4.1. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

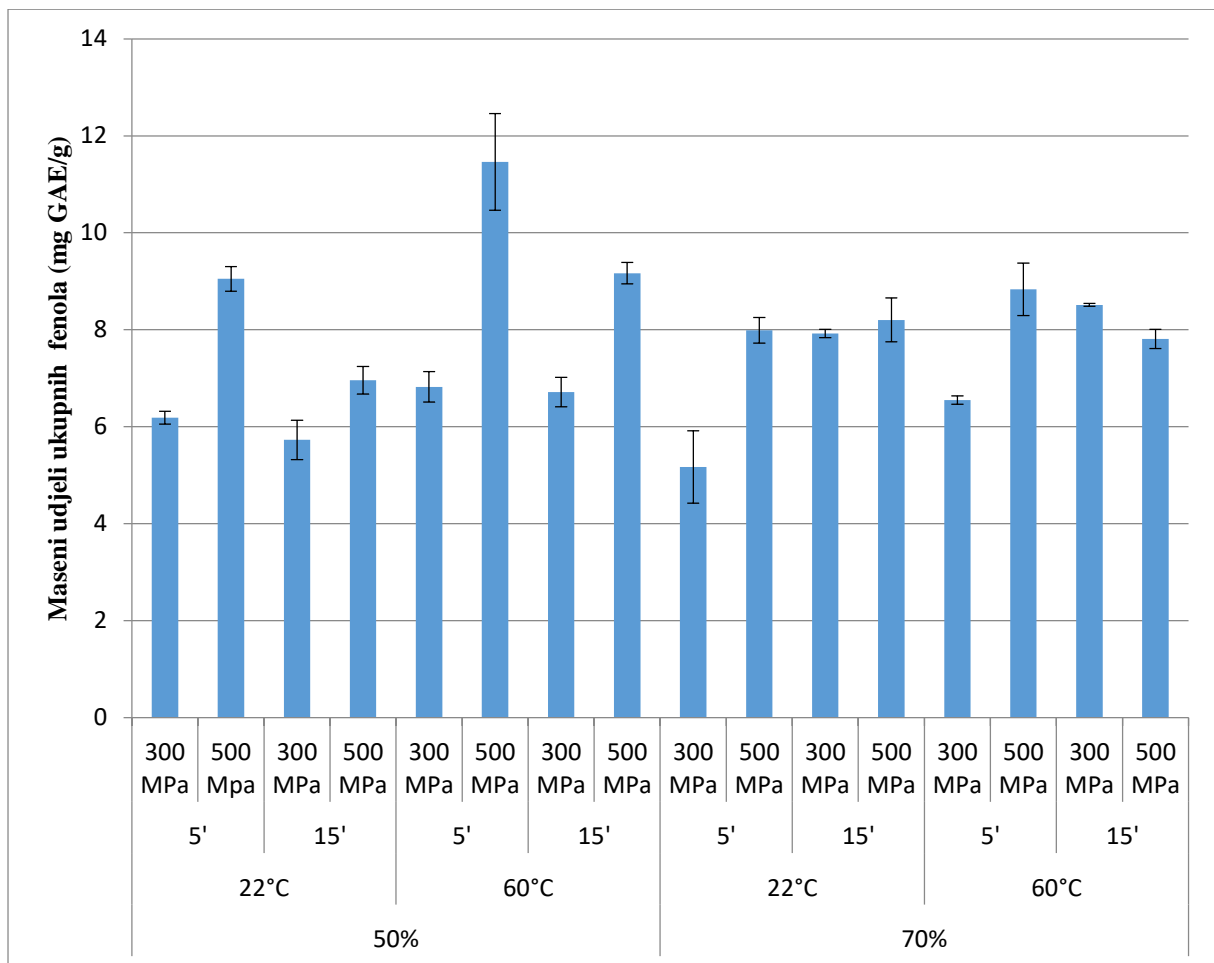
List maslačka



Slika 9. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz lista maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom

Najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u listu maslačka ($44,98 \text{ mg GAE g}^{-1}$) primjenom ekstrakcije pri visokom hidrostatskom tlaku određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri tlaku od 500 MPa, vremenu ekstrakcije 5 minuta, te temperaturi $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, koristeći 70 %-tnu vodenu otopinu etanola kao otapalo. Gotovo ista koncentracija ($43,71 \text{ mg GAE g}^{-1}$) dobivena je s otapalom u kojem je udio alkohola niži (50 %-tna vodena otopina etanola) ali pri dužem vremenu ekstrakcije (15 minuta), pri istom tlaku (500 MPa) i temperaturi ($60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) kao i u prethodnom uzorku.

Korijen maslačka



Slika 10. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom

Optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka ekstrakcijom potpomognutom visokim hidrostatskim tlakom su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C, vrijeme ekstrakcije 5 minuta, te tlak od 500 MPa.

Kod svih uzoraka pri višoj vrijednosti tlaka (500 MPa) dobiveni su veći prinosi fenolnih spojeva, bez obzira na udio alkohola u vodenim otopinama (polarnost), vrijeme i temperaturu. Uspoređujući tlak i vrijeme trajanja ekstrakcije, kraće vrijeme i viši tlak dali su bolje rezultate nego viši tlak tijekom duljeg vremena.

U istraživanju Ivanova (2014) proučavan je utjecaj otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista maslačka primjenom HPAE. U ekstrakciji fenolnih spojeva i dihidroksicimetnih kiselina kao otapalo se koristila vodena otopina etanola s udjelom alkohola od 50 % i 95 %, te voda. U istraživanju je utvrđeno da se prinos ukupnih fenolnih spojeva i dihidroksicimetnih kiselina povećavao s povećanjem udjela alkohola u otapalu (do 50%) za ekstrakciju. Daljnje povećanje udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu utjecalo je na smanjenje prinosa fenola. Također je uspoređivan utjecaj vode i 96%-tnog etanola na ekstrakciju fenolnih spojeva, a rezultati su pokazali da se veći prinosi dobivaju uz primjenu vode kao otapala. Znači, za ekstrakciju fenolnih spojeva i dihidroksicimetne kiseline iz maslačka optimalnim otapalom se pokazala vodena otopina etanola s udjelom alkohola od 50 %, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

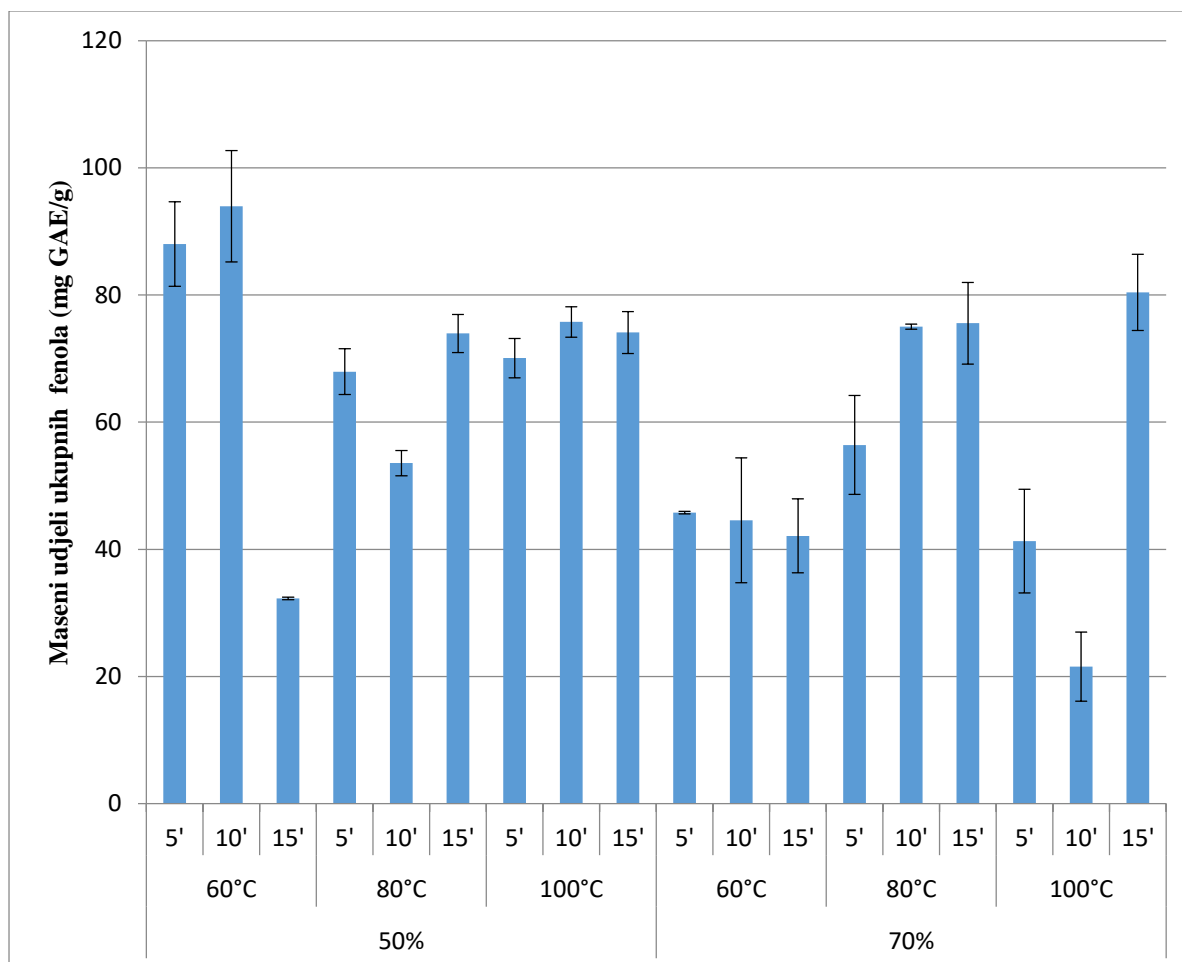
Prasad i suradnici (2009) su ispitivali utjecaj različitih tlakova (200 MPa, 300 MPa, 400 MPa, 500 MPa) na ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijski kapacitet i ukupan ekstrakcijski prinos iz perikarpa voća logan. Najveći prinos ukupnih fenola se ostvaruje pri tlaku od 500 MPa. Smanjenjem vrijednosti tlaka, smanjivao se i udio ukupnih fenola (400MPa: $18 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$; 300 MPa: $17,2 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$; 200 MPa: $16,5 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$), a time i antioksidacijski kapacitet. U ovom radu primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom također je dobiven bolji prinos primjenom tlaka od 500 MPa, nego primjenom tlaka od 300 MPa.

Corrales i suradnici (2009) su ispitivali utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa. Ispitivan je utjecaj tlaka od 200 MPa, 400 MPa i 600 MPa u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 do 90 minuta. Kao otapalo u ekstrakciji je korištena vodena otopina etanola u koncentracijama od 20 do 100 %, te je temperatura ekstrakcije iznosila od 20 do 70 °C. Povećanjem koncentracije etanola došlo je do povećanja prinosa antocijana, a najveći prinos je ostvaren pri temperaturi od 50 °C i tlaku od 600 MPa. U ovom radu je također viši tlak primjenom HPAE metode dao više prinose, a između temperature od 22 °C i 60 °C, ona od 60 °C je dala bolje rezultate.

Shouqin i suradnici (2005) su istraživali utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na ekstrakciju flavonoida iz propolisa. Ekstrakcija je provedena pri tlakovima od 100 do 600 MPa u trajanju od 1 do 10 minuta. Kao otapalo je korišten etanol u koncentracijama od 35 do 95 %. Najboljim za ekstrakciju se pokazao 70 %-tni etanol, tlak od 500 MPa i vrijeme trajanja ekstrakcije od 1 minute.

4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

List maslačka

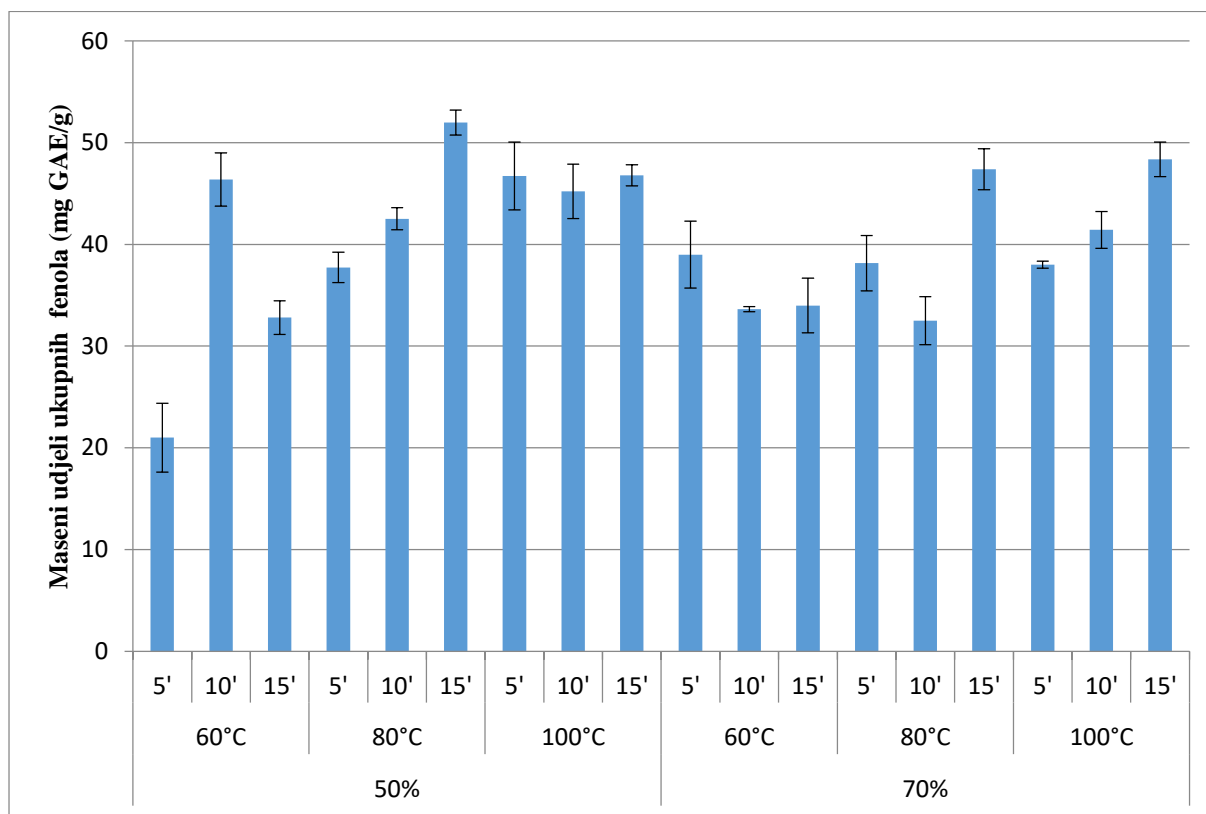


Slika 11. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz lista maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije pri povišenom tlaku

Kod lista maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku veće koncentracije fenolnih spojeva dobivene su primjenom otapala s udjelom alkohola od 50 %, bez obzira na primijenjenu temperaturu i vrijeme ekstrakcije.

Najviši prinosi ukupnih fenola (88,02 i 93,94 mg GAE g⁻¹) dobiveni su pri temperaturi od 60 °C, tijekom 5 i 10 minuta.

Korijen maslačka



Slika 12. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije pri povišenom tlaku

Kod ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u korijenu maslačka najveća koncentracija fenolnih spojeva dobivena je upotrebom 50 %-tne vodene otopine etanola, pri 80 °C i tijekom 15 minuta (3 ciklusa po 5 minuta). U većini uzoraka, pri istoj temperaturi, povećanjem broja ciklusa odnosno vremena ekstrakcije se povećala i koncentracija fenolnih spojeva.

Milek i Legath (2015) su ultrazvučnom ekstrakcijom izolirali fenolne spojeve iz cvijeta i lista maslačka. Kao otapalo su koristili metanol, etanol i aceton, u koncentraciji od 70 %. U izolaciji fenolnih spojeva iz lista najveće prinose je dala ekstrakcija acetonom ($0,586 \pm 0,007$ mg CE ml⁻¹), zatim metanolom ($0,553 \pm 0,014$ mg CE ml⁻¹), te etanolom ($0,533 \pm 0,040$ mg CE

ml⁻¹). Pri izolaciji fenolnih spojeva iz cvijeta metanol se pokazao kao najbolje otapalo (0,414±0,030 mg CE ml⁻¹), zatim aceton (0,385±0,008 mg CE ml⁻¹), a najmanje prinose je dao etanol (0,372±0,019 mg CE ml⁻¹).

Ivanov je u svom istraživanju (2014) ekstrakciju fenolnih spojeva iz maslačka proveo klasičnom metodom pri temperaturi od 80°C u trajanju od 1 sat.

Prema rezultatima našeg istraživanja i niža temperatura (60 °C) se pokazala dovoljnom za ekstrakciju fenolnih spojeva i to uz znatno kraće vrijeme.

Erdogan i Erdemoglu (2011) su određivali ukupne fenole u marelici (*Prunus armeniaca* L ili *Armeniace vulgaris* Lam) ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku. Kao otapalo su koristili metanol (100%), metanol/voda (70:30), metanol/aceton/voda (70:20:10), metanol/etilacetat/voda (70:20:10) i vodu (100%), pri temperaturama od 20, 40, 60 i 80 °C, tlaku od 500, 1,000, 1,500, 2,000 psi, te vremenu od 10, 20, 40, 60, 90 i 120 minuta. Optimalnim za ekstrakciju fenolnih spojeva se pokazalo otapalo metanol/voda (70:30), temperatura od 60°C, pri tlaku od 1,500 psi tijekom 60 minuta.

Uspoređujući rezultate Erdogana i Erdemoglua iz 2011e godine s rezultatima ovog rada vidljivo je da su oni koristili puno niži tlak (0,0103 MPa naprema 10 MPa korištenih u ovom radu), ali zato su i dulje provodili sam proces ekstrakcije (60 minuta naprema 15 minuta).

4.3.Usporedba prinosa fenolnih spojeva u ovisnosti o primijenjenoj metodi ekstrakcije

Usporedimo li prinose fenolnih spojeva izoliranih iz cvijeta i lista maslačka u ovisnosti o primijenjenoj metodi ekstrakcije može se zaključiti slijedeće:

- ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku postignuti su veći prinosi nego ekstrakcijom potpomognutom visokim hidrostatskim tlakom.
- u listu maslačka ASE metodom je određena najviša koncentracija fenolnih spojeva (93,94±8,75 mg GAE g⁻¹), dok je HPAE metodom dobivena niža koncentracija fenolnih spojeva (44,98±1,04 mg GAE g⁻¹).
- u korijenu maslačka ASE metodom je dobivena viša koncentracija fenolnih spojeva (51,99±1,22 mg GAE g⁻¹), nego HPAE metodom (11,46±0,99 mg GAE g⁻¹).

U ovom radu su potvrđeni rezultati González-Castejón i suradnika (2012), a to je da se u vanjskim dijelovima biljke tj. u listu, nalazi veći udio fenolnih spojeva nego u korijenu maslačka.

Stylianon i suradnici (2014) su dvjema metodama, maceracijom i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, određivali ukupne fenole u listu i korijenu maslačka. UAE metodom je dobivena viša koncentracija u oba dijela biljke, u listu $59 \pm 0,4147$ mg GAE g^{-1} , a u korijenu $15 \pm 0,0434$ mg GAE g^{-1} , dok je maceracijom u listu dobiveno $52,29 \pm 0,0178$ mg GAE g^{-1} , a u korijenu $9,61 \pm 0,1397$ mg GAE g^{-1} ukupnih fenola. Usporedimo li masene udjele fenolnih spojeva koji su dobiveni u našem istraživanju s rezultatima prethodno opisanog istraživanja može se zaključiti da su maseni udjeli fenolnih spojeva u našim ekstraktima koji su dobiveni primjenom HPAE bili niži, a u ekstraktima koji su dobiveni primjenom ASE vrijednosti ukupnih fenola su bile više. U korijenu maslačka je dobivena slična koncentracija kao i HPAE metodom, a ASE metodom je dobivena znatno veća koncentracija fenolnih spojeva u usporedbi s maceracijom i UAE.

Prasad i suradnici (2009) su uspoređivali prinos ekstrakcije fenolnih spojeva u plodu ličija (*Litchi chinensis* Sonn.) primjenom konvencionalne metode ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije primjenom visokog tlaka (400 MPa). Najveći udio fenolnih spojeva dobiven je primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom u trajanju od 3 minute i iznosio je $29,3 \pm 0,19$ %. Manji prinos je ostvaren primjenom ultrazvuka ($23 \pm 0,5$ %) u trajanju ekstrakcije od 30 minuta, a najmanji prinos je dala konvencionalna metoda ekstrakcije. U trajanju od 24 sata prinos je bio $19,9 \pm 1,12$ %. Količina flavonoida u istraživanju je bila čak deset puta veća primjenom visokog hidrostatskog tlaka u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije.

Hossain i suradnici (2011) su optimirali uvjete za izolaciju fenolnih spojeva koji pridonose boljem antioksidativnom kapacitetu ekstrakata ružmarina, origana i mažurana primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Za izolaciju fenolnih spojeva iz sve tri biljke najpovoljnija temperatura se pokazala 129 °C, otapalo za ružmarin je 56 %-tni metanol, za origano 33 %-tni metanol, te za mažuran 57 %-tni metanol. Sličnim volumnim udjelima alkohola i u našem istraživanju ostvareni su najbolji prinosi fenolnih spojeva, ali pri značajno nižoj temperaturi ekstrakcije što je prednost. Visoke temperature ekstrakcije mogu prouzročiti razgradnju termolabilnih fenolnih spojeva tijekom ekstrakcije.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Najveći prinos ukupnih fenola izoliranih iz lista maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom iznosio je $44,99 \pm 4,06$ mg GAE g^{-1} . Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz lista maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom su: 70%-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C, tlak 500 MPa i vrijeme ekstrakcije 5 minuta.
2. Najveći prinos ukupnih fenola izoliranih iz korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom iznosio je $11,46 \pm 0,99$ mg GA g^{-1} . Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C, tlak 500 MPa i vrijeme ekstrakcije 5 minuta.
3. Najveći prinos ukupnih fenola izoliranih iz lista maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je $93,94 \pm 8,75$ mg GA g^{-1} . Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz lista maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 60 °C i vrijeme ekstrakcije 10 minuta.
4. Najveći prinos ukupnih fenola izoliranih iz korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je $51,99 \pm 1,22$ mg GA g^{-1} . Optimalni uvjeti za izolaciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko otapalo, temperatura 80 °C i vrijeme ekstrakcije 15 minuta.
5. Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku izolirana je veća koncentracija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka u usporedbi s ekstrakcijom

potpomognutom visokim hidrostatskim tlakom. Pri istim uvjetima u korijenu maslačka dobivene su i do 4 puta više koncentracije fenolnih spojeva primjenom ASE metode, a u listu maslačka 2 puta više koncentracije nego HPAE metodom.

6. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku su metode ekstrakcije koje se mogu učinkovito primjenjivati u ekstrakciji fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka uz ostvarivanje visokih prinosa pri optimalnim uvjetima ekstrakcije.

6. LITERATURA

Altuner, E.M., İşlek, C., Çeter, T., Alpas, H. (2012) High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits. *Afr. J. Biotechnol.* **11**(4), 930-937.

Barba, F.J., Terefe, N.S., Buckow, R., Knorr, D., Orlie, V. (2015) New Opportunities and Perspectives of High Pressure Treatment to Improve Health and Safety Attributes of Foods. *Food Research International*. doi:[10.1016/j.foodres.2015.05.015](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.015)

Barros, F., Dykes, L., Awika, J.M., Rooney, L.W. (2013) Accelerated extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *Journal of Cereal Science*. **58**(2), 305-312.

Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol.* **59**, 205-212.

Bozan, B., Cigdem Altinay, R. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci. and Technol.* **20**(2), 409-414.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* **56**(11), 317-333.

Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuna, C., Jamett, F. (2015) High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *Food Sci. Technol.* **60**, 525-534.

Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V. (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 317-323.

Chkhikvishvili, I.D., Kharebava, G.I. (2001) Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia. *Appl. Biochem. Microbiol.* **37**(2), 188-191.

Corrales, M., Garcia, A.F., Butz, P., Tauscher, B. (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* **90**, 415-421.

Dias, M. I., Barrosa, L., Alvesb, R. C., Oliveirab, M.B.B., Santos-Buelgac, C., Ferreira, I. (2014) Nutritional composition, antioxidant activity and phenolic compounds of wild *Taraxacum* sect. *Ruderalia*

Elez Garofulić, I., Režak Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., Herceg, Z. (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry *Marasca* (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) juice. *Food Sci. Tehnol.* **62**(1), 894-900.

Erdogan, S., Erdemoglu, S. (2011) Evaluation of polyphenol contents in differently processed apricots using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography –diode array detector. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **62**(7), 729–739.

Erhatic, R., Vukobratović, M., Dudaš, S., Mužić, M. (2014) Kemijske karakteristike populacija maslačka s križevačkog i riječkog područja. *Agronomski glasnik* 3/2014, ISSN 002-1954.

González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Int. Life Sci. Inst.* **70**(9), 534-547.

Herceg, Z., Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Režek Jambrak, A., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2015) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665-672.

Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**(1), 339-346.

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

Ivanov, I.G. (2014) Polyphenols Content and Antioxidant Activities of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Dandelion) Leaves. *Int. J Pharma. Phyto. Research.* **6**(4), 889-893.

Jeon, HJ., Kang, HJ., Jung, HJ., Kang, YS., Lim, CJ., Kim, YM., & Park, EH. (2008). Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J. Ethnophar.* **115**, 82–88.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* **55**, 279-290.

Kenny, O., Smyth, T.J., , Hewage, C.M., Brunton, N.P. (2014) Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS/MS analysis of phenolic compounds in dandelion (*Taraxacum officinale*) root extracts. *Free Radicals and Antioxidants.* **4**(1), 55-61.

Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kemija u industriji* **60** (1), 11–19.

Lee, S.H, Park, J.B., Park, H.J., Cho, S.M., Park, Y., Sin, J.I. (2005) Biological Properties of Different Types and Parts of the Dandelions: Comparisons of Anti-Oxidative, Immune Cell Proliferative and Tumor Cell Growth Inhibitory Activities. *J.Food Sci.Nutr.* **10**, 172-178.

Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 1-24.

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

Milek, M., Legáth, J. (2015) Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of *Taraxacum officinale* Extracts Obtained with Different Solvents. *Res J. Chem. Environ. Sci.*, **3**(6), 59-63.

Mottaleb, M.A. and Sarker, S.D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation, u: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology (ur. Satyajit D. Sarker, Lutfun Nahar). 864, 75-87.

Prasad, K.N., Ismail, A., Shi, J., Jiang, Y.M. (2012) High Pressure-Assisted Extraction: Method, Technique, and Application. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 303-322.

Prasad, K.N., Yang, B., Zhao, M., Ruenroengklin, N., Jiang, Y. (2009) Application of ultrasonic or high pressure extraction of flavonoids from litchi fruit pericarp. *J. Food Process. Eng.* **32**, 828-843.

Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., Jiang, Y. (2009) Effects of high pressure extraction yield, total phenolic content and antioxidant activiti of logan fruit pericarp. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **10**(2), 155-159.

Rajha, H.N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H.G., Maroun, R.G. (2014) Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18640-18658.

Riedel, H., Saw, N.M.M.T., Akumo, D.N., Kütük, O., Smetanska, I. (2012) Wine as Food and Medicine. U: Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry (Valdez, B., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str. 399–418.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401-436.

Shouquin, Z., Jun, X., Changzheng, W. (2005) Effect of high hydrostatic pressure on extraction of flavonoids from propolis. *Food Sci. Tehnol. Int.* **11**, 213-216.

Stylianou, N., Gekas, V., Istudor, V., Ionita, C. (2014) Resarch regarding *Taraxacum officinale* (L.) weber with the intention of therapeutic exploring. *Farmacia*, **62**(2), 358-365.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.

Zaghoudia, K., Pontviannea, S., Framboisiera, X., Achardb, M., Kudaibergenovaa, R., Ayadi-Trabelsic, M., Kalthoum-cherifc, J., Vanderesseb, R., Frochota, C., Guiavarc'ha, Z. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Food Chem.* **184**, 131-139.