

Bioaktivni spojevi praha korijena koprive (Urtica dioica L.)

Simonović, Niki

Undergraduate thesis / Završni 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:159:246366>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Niki Simonović

6412/PT

**BIOAKTIVNI SPOJEVI EKSTRAKTA PRAHA KORIJENA
KOPRIVE (*URTICA DIOICA* L.)
ZAVRŠNI RAD**

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

BIOAKTIVNI SPOJEVI PRAHA KORIJENA KOPRIVE (*URTICA DIOICA L.*)

Niki Simonović, 6412/PT

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti količinu bioaktivnih spojeva u vodenim ekstraktima praha korijena koprive, uzgojenih uz gnojidbu (100 kgN/ha) i bez gnojidbe (0 kgN/ha), te u ekstraktu komercijalnog praha korijena koprive. Određivanje ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola provedeno je spektrofotometrijski. Najviše koncentracije fenolnih spojeva određene su u komercijalnom prahu korijena koprive. Koncentracije ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola više su u uzorcima prahova gnojenih rizoma koprive u odnosu na one uzgojene bez gnojidbe.

Ključne riječi: bioaktivni spojevi, fenoli, ekstrakcija, sušanje raspršivanjem, rizomi koprive

Rad sadrži: 29 stranica, 12 slika, 1 tablicu, 36 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. Maja Repajić, viši asistent*

Rad predan: Srpanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory of Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

BIOACTIVE COMPOUNDS IN NETTLE (*URTICA DIOICA* L.) ROOT POWDER Niki Simonović, 6412/PT

Abstract: The aim of this study was to determine the quantity of bioactive compounds in aqueous extracts of nettle root, grown with nitrogen fertilization (100 kg n/ha) and without fertilization (0 kg n/ha), and in the extract of commercial nettle root powder. Determination of total phenols, hydroxycinnamic acids and flavan-3-oles was carried out spectrophotometrically. The highest concentrations of bioactive compounds were determined in the commercial powder. The concentrations of total phenols, hydroxycinnamic acids and flavan-3-oles are higher in fertilized rhizome powder compared to unfertilized.

Keywords: bioactive compounds, phenols, extraction, spray drying, nettle rhizomes

Thesis contains: 29 pages, 12 figures, 1 table, 36 references

Original in: Croatian

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

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

Technical support and assistance: *PhD. Maja Repajić, Scientific Assistant*

Thesis delivered: July, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KORIJEN KOPRIVE	2
2.2. FENOLNI SPOJEVI KOPRIVE	2
2.2.1. Flavonoidi koprive.....	3
2.2.2. Fenolne kiseline.....	4
2.3. UTJECAJ OTAPALA NA EKSTRAKCIJU FENOLNIH SPOJEVA	5
2.4. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	6
2.5. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Prahovi rizoma koprive (<i>Urtica dioica</i> L.).....	10
3.1.2. Priprema ekstrakata rizoma koprive i ekstrakata prahova rizoma koprive.....	11
3.1.3. Postupak sušenja raspršivanjem	12
3.1.4. Kemikalije i standardi.....	13
3.1.5. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	16
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina	18
3.2.3. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA	26

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je vrsta samonikle biljke koja se smatra korovom, a pripada rodu *Urtica*. Rasprostranjena je u područjima umjerene klime. S obzirom na veliku rasprostranjenost, biljka ima niz podvrsta. Cvjeta od proljeća do jeseni. Dvodomna je zeljasta biljka koja ima uspravnu stabljiku koja može narasti do 1,5 m visine, a listovi mogu biti dugi od 3 do 15 cm, srolikog su oblika, rastu na maloj peteljci i imaju dlačice duž cijele površine. Listovi i peteljke su prekrivene žarnicama s mravljom kiselinom koja izaziva osjećaj peckanja. Cvjetovi su maleni i zeleni. Korijen je prilično velik i koristi se za dobivanje žute boje, te ima niz ljekovitih svojstava. Biljka se kroz povijest koristila za liječenje niza bolesti, a posljednjih godina sve se više upotrebljava (Otles i Yalcin, 2011).

U korijenu koprive prisutni su bioaktivni spojevi koji imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Korijen koprive sadrži 18 različitih fenolnih spojeva, te 8 različitih lignana. Neki od tih spojeva su elagična, ferulična, galna, fumarna, kafeinska, klorogenska, p-kumarna i vanilinska kiselina, te isorhamnetin, katehin, kemferol, kvercetin, miricetin, naringin i rutin (Otles i Yalcin, 2011). Znanstvena istraživanja su pokazala da fenolni spojevi povoljno utječu kod srčanih bolesti i visokog tlaka, dijabetesa, karcinoma, virusnih i parazitskih oboljenja, te psihičkih poremećaja.

Ekstrakt korijena koprive sadrži željezo, a koristi se kod opadanja kose, povoljno utječe na krvožilni sustav i kod problema s mokrenjem. Pripravci korijena se također koriste kod benigne hiperplazmije prostate (Lichius i Muth, 1997). Ekstrakti zaustavljaju rast i metabolizam stanica prostate inhibirajući njihovu enzimsku aktivnost (Hirano, Homma i Oka, 1994). Pripravci korijena koji se koriste su dekokti, tinkture i suhi ekstrakti često dobiveni postupkom sušenja raspršivanjem. Suhi ekstrakti se na tržištu mogu naći i u obliku tableta, kapsula ili prahova.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj bioaktivnih spojeva odnosno ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i polimernih proantocijanidina u prahovima korijena koprive dobivenih sušenjem raspršivanjem.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KORIJEN KOPRIVE

Korijen koprive koristi se za pripremu raznih ljekovitih pripravaka kao što su dekoti, tinkture i ekstrakti jer je po kemijskom sastavu bogat bioaktivnim spojevima i mineralima koji se koriste u farmakologiji i prehrani. Osim što je bogat željezom i ostalim mineralima, sadrži proteine, lektine, polisaharide, vitamine K, B i C, karotenoide, klorofile, lecitin, sterole i šećerne derivate sterola, tanine, lignane, ceramide, hidrokسي masne kiseline i fenolne spojeve. Smatra se da su prema djelovanju izuzetno važni steroli i fenolni spojevi (Radman, 2015).

2.2. FENOLNI SPOJEVI KOPRIVE

Fenolni spojevi ekstrakta korijena koprive imaju niz povoljnih zdravstvenih učinaka. Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koncentrirani u sjemenkama, pokožici i mesu voća i povrća, žitaricama, kori drveća, lišću i cvijeću, korijenima te gotovo svim vrstama začinskog i aromatskog bilja. Identificirano je više od 8000 fenolnih spojeva biljnog porijekla s raznim funkcijama kao što su zaštita od UV zračenja, pigmentacija, obrana od nametnika, privlačenje oprašivača i raspršivanje sjemena (Riedel i sur., 2012). Polifenoli imaju važnu ulogu u senzorskoj i nutritivnoj kvaliteti voća i povrća (Ignat i sur., 2011). Također, imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, zaštiti protiv patogena i predatora, te utječu na senzorske karakteristike voća, povrća, aromatskog i začinskog bilja (Ignat i sur., 2011).

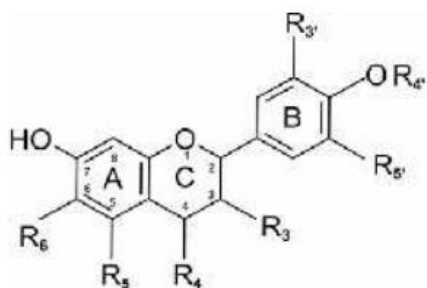
Dijele se na flavonoide i ne-flavonoidne spojeve. U skupinu flavonoida svrstavaju se flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, te antocijani, a primarna razlika među njima je stupanj oksidacije piranskog prstena. Ne-flavonoidni spojevi su fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), lignani i stilbeni (Riedel i sur., 2012).

Korijen koprive bogat je flavanoidima i fenolnim kiselinama, a količina pojedinih spojeva varira s obzirom na način uzgoja i klimatske uvjete (Grevsen i sur., 2008).

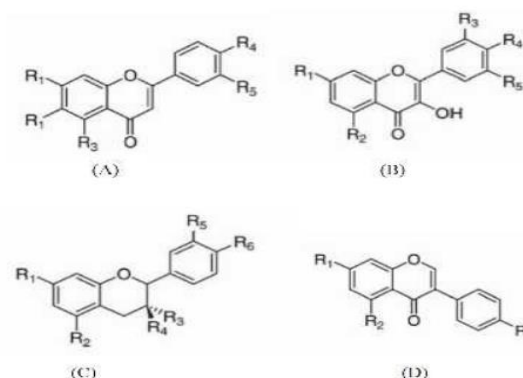
2.2.1. Flavonoidi koprive

Flavonoidi predstavljaju najbrojniju skupinu fenolnih spojeva koju nalazimo u različitim biljnim vrstama, a identificirano ih je više od 6400 (Winkel-Shirley, 2001). Flavonoidi su fenolni spojevi male molekulske mase, a sastavljeni od 15 atoma ugljika s dva aromatska prstena (A i B) međusobno povezana trećim (C). Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C6-C3-C6 konfiguracija) tj. 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg se odvodi određeni broj osnovnih struktura: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni (Ignat i sur., 2011).

Flavonoidima se pripisuju i brojna terapijska svojstva, poput antibakterijskog, antimutagenog protuupalnog, antialergijskog, antiviralnog i antikancerogenog svojstva, a znatno utječu na boju i okus hrane (Harbone i Williams, 2000). Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju značajno izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sur., 1995). Budući da imaju izražene farmakološke učinke koriste se u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji.



Slika 1. Osnovna kemijska struktura flavonoida
(Pietta, 2000)



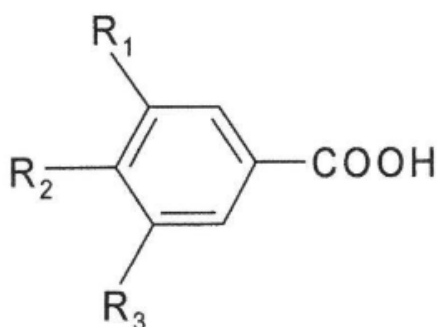
Slika 2. Kemijska struktura flavonoida: flavon (A), flavonol (B), flavanol (C), izoflavon (D)
(Heim i sur., 2002)

Flavonoidi pronađeni u korijenu koprive su isorhamnetin, katehin, kemferol, kvercetin, miricetin, naringin i rutin. Kvercetin se smatra pretečom flavonoida, a ljekovito djeluje na srčana oboljenja i alergije, te se preventivno koristi protiv karcinoma. Ostali flavanoidi povoljno utječu na snižavanje razine kolesterola u krvi, srčane bolesti, dijabetes, te karcinome. Kemferol i miricetin imaju antiviralno djelovanje, te povoljno utječu na dijabetes (Spina i sur., 2008).

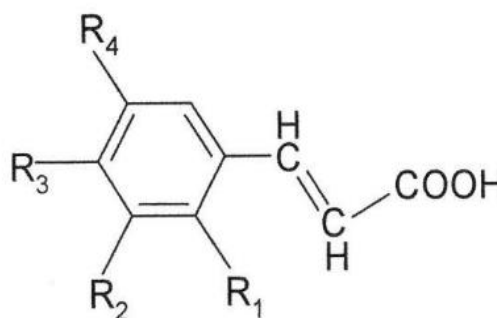
2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su široko rasprostranjeni biljni sekundarni metaboliti. Prema osnovnoj strukturi dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline predstavljaju skupinu hidroksiliranih derivata benzojeve kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C6-C1, a međusobno se razlikuju u hidroksilaciji i metilaciji benzenskog prstena. Hidroksicimetne kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C6-C3su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Dewick, 2007).

Većina fenolnih kiselina je vezana esterskim, eterskim ili acetalnim vezama za strukturne komponente biljke (celuloza, lignin, proteini), veće polifenole, manje organske molekule ili druge prirodne spojeve (terpeni). Fenolne kiseline široko su rasprostranjene u voću, povrću, žitaricama ali i u ljekovitim biljnim vrstama. Sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu ovisi o mnogim čimbenicima, a najveći utjecaj imaju klima, uvjeti uzgoja te vegetacijsko razdoblje (Arceus i sur., 2013).



Slika 3. Osnovna struktura hidroksibenzojeve kiseline (Dent, 2013)



Slika 4. Osnovna struktura hidroksicimetne kiseline (Dent, 2013)

Fenolne kiseline pronađene u korijenu koprive su elagična, ferulična, galna, fumarna, kafeinska, klorogenska, p-kumarna i vanilinska kiselina. Navedene kiseline imaju antifungalna, antiviralna i antikancerogena svojstva, a neke od njih imaju izražena antioksidacijska svojstva poput galne i klorogenske kiseline. Fumarna kiselina usporava razvoj multiple skleroze (Harborne i Williams, 2000).

2.3. UTJECAJ OTAPALA NA EKSTRAKCIJU FENOLNIH SPOJEVA

Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala su alkoholi, premda nisu visoko selektivni za fenole, daju visoki prinos ekstrakta, a to su metanol, etanol i njihove vodene otopine. Osim alkohola još se koriste aceton te etil acetat (Spigno i sur., 2007). Usporedbom utjecaja otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz voća metanol je ~~bi~~ učinkovitiji za ekstrakciju fenolnih spojeva nižih molekularnih masa, a aceton za ekstrakciju flavanola viših molekularnih masa (Prior i sur., 2001). Bitno je istaknuti da na ekstrakcijski kapacitet osim odabira otapala utječe i sam kemijski sastav uzorka, te količina vlage u biljnom materijalu.

Kod ekstrakcije suhog biljnog materijala bolji učinak se postiže s većim udjelom vodene faze u organskoj fazi (Robards, 2003). U industrijskim uvjetima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, zbog manje toksičnosti (Ignat i sur., 2011).

Prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu, jer voda pospješuje proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala, a primjena čistog etanola ili acetona nije se pokazala učinkovitom u ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Primjenom otapala različite polarnosti utvrđeno je da se polarnije molekule flavonoida lakše ekstrahiraju iz biljnog tkiva primjenom polarnijih otapala kao što je 80 % etanol. Dodatak vode (30 %) u etanol povećava polarnost otapala te se ekstrahira više flavonoidnih spojeva nego primjenom čistog etanola.

Za ekstrakciju fenolnih kiselina prisutnih u netopljivom obliku (vezane, esteri ili glikozidni kompleksi) osim primjene organskih otapala često se primjenjuje kiselinska i bazna hidroliza. Dodatkom lužine, kiseline ili oboje dolazi do hidrolize i oslobađaju se vezane fenolne kiseline, ali hidroliziraju se neki nestabilni spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina (Rostagno i Prado, 2013).

2.4. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

U današnje vrijeme traže se alternativna rješenja toplinskim tretmanima tokom procesiranja hrane u težnji da se postigne što bolja učinkovitost, što manji gubici bioaktivnih spojeva i što manje otpadnih kemikalija nakon samih procesa. Danas se u tu svrhu istražuju metode koje primjenjuju ultrazvuk, visoke tlakove, pulsirajuće električno i magnetno polje. Metodom ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih spojeva teži se smanjiti uporaba ekstrakcijskih otapala ili potpuno ih izbjeći u samome postupku. Također, snižava se temperatura ekstrakcije, a povećavaju se prinosi procesa. Sam ultrazvuk omogućuje veće prodiranje otapala u materijal, te bolji prijenos mase, dolazi do direktnog kontakta sadržaja stanice čija se stjenka razara i time se poboljšava učinkovitost ekstrakcije (Vinatoru, 2001).

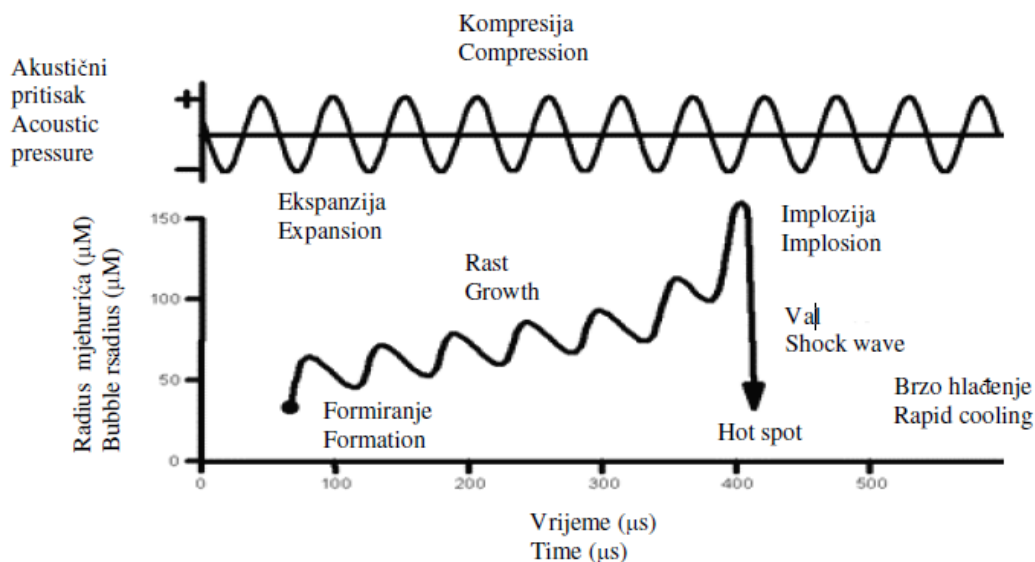
Djelovanjem ultrazvuka moguće je poboljšati biorasploživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva. Također, moguće je izbjeći nastajanje slobodnih radikala, ali oni ponekad mogu biti korisni kod ciljane hidroksilacije polifenolnih i karotenoidnih spojeva čime se omogućuje povećanje njihove biološke aktivnosti (Ashokkumar i sur., 2008). Do sada korištene metode ekstrakcije, poput ekstrakcije vrućom vodom ili lužinom mogu uzrokovati znatnu degradaciju bioaktivnih spojeva zbog visoke temperature i dugog vremena ekstrakcije. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata ultrazvukom (20-100 kHz) je tehnika koja omogućuje reproducibilnost u kraćem vremenu tretiranja (Caili i sur., 2006), jednostavnije korištenje, niže temperature i korištenje manje količine otapala (Chemat, Tomao i Viro, 2008). Tijekom ultrazvučnog tretiranja fenomen kavitacije uzrokuje bubrenje stanica i posljedično probijanje stanične stjenke (Vinatoru, 2001), a upravo to omogućuje bolju i bržu difuziju. Međutim, osim temperature, za učinkovitu ekstrakciju i maksimalan prinos, potrebno je optimizirati parametre kao što su frekvencija ultrazvuka, snaga i izbor otapala (Wang i Weller, 2006).

U prehrambenoj industriji otkrivena je primjena ultrazvuka kao metode ne-toplinske obrade hrane budući da može uzrokovati inaktivaciju enzima i mikroorganizama (Lopez-Malo i sur., 2001), poboljšavanje emulgiranja i dispergiranja, ubrzavanje određenih kemijskih reakcija, a također i poboljšanje procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva.

2.4.1. Kavitacija

Prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije medija na koji se djeluje i ekspanzivnih vrtloga. Posljedica oscilacija tlaka su mjehurići koji osciliraju. Oni u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Suslick, 1990). U trenutku kada mjehurić dosegne kritičnu veličinu gubi mogućnost apsorpcije energije, a bez ulazne energije šupljina se ne može samo održavati i mjehurić se urušava sam u sebe.

Kritična veličina mjehurića uvjetovana je primijenjenom frekvencijom i mediju koji se tretira, npr. pri frekvenciji ultrazvuka od 20 kHz, kritična veličina je okvirno 170 μm (Suslick, 1994). Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da se zadrži plinska faza, u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije, te se kondenzirane molekule sudaraju velikom brzinom, pri čemu nastaju udarni valovi. Takvi udarni valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa) (Leighton, 2007; Suslick, 1990), što dovodi do mijenjanja fizikalno kemijskih svojstava lokalnih molekula.



Slika 5. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije s formiranjem, rastom i eksplozijom kavitacijskog mjehurića (Suslick, 1994)

2.5. SUŠENJE RASPRŠIVANJEM

Sušenje raspršivanjem postupak je sušenja tekućih i polutekućih namirnica, a danas se sve više primjenjuje zbog poželjnih osobina poput kratkog vremena zadržavanja sirovine u sušari, velike površine izmjene topline i nešto nižih temperatura potrebnih za sam proces. U komorama za sušenje sušeni materijal i zrak se mogu kretati istostrujno ili protustrujno. Kod istostrujnog gibanja nema opasnosti od zagorijevanja, dok se protustrujno gibanje koristi za sušenje materijala veće gustoće.

Tekuća tvar se suši u struji toplog zraka u obliku sitnih kapljica te je površina izmjene topline materijala i toplog zraka vrlo velika zbog idealnog omjera mase i volumena kapljice. Na taj način, sušenje traje kratko, svega 15 do 30 sekundi, pa se bez obzira na temperaturu toplog zraka suši. Također, kratko vrijeme izmjene topline ovu tehniku sušenja svrstava u pogodne tehnike koje se primjenjuju za sušenje namirnica koje sadrže toplinski osjetljive sastojke. Zbog navedenog efekta degradacija i gubitak tvari sušenog materijala svodi se na minimalne vrijednosti, te su vrlo dobro očuvana organoleptička svojstva. Također, tim postupkom se dobiva praškasti proizvod koji je stabilan i visoke kvalitete (Desobry i sur., 1997).

Kvaliteta krajnjeg proizvoda ovisi o dobro optimiranim parametrima sušenja, samim svojstvima materijala i o karakteristikama uređaja. Fizikalno kemijska svojstva proizvoda ovise o temperaturi medija za sušenje, protoku zraka, protoku materijala koji se suši, brzini raspršivanja, vrsti nosača i o koncentraciji nosača (Obon i sur., 2009). Sam izbor raspršivača ovisi o prirodi i viskoznosti smjese, pa se mogu koristiti različiti oblici mlaznica poput tlačnih, pneumatskih mlaznica ili rotirajućih diskova.

Sušenje se odvija u dvije faze. Prva faza je faza konstantne brzine sušenja gdje vlaga isparava s površine, a stupanj difuzije iz unutrašnjosti jednak je brzini isparavanja namirnica s površine kapljice. Druga faza je faza padajuće brzine sušenja gdje se formira čvrsta kora na površini kapljice i smanjuje se stupanj difuzije vode iz unutrašnjosti kapljice (Gianfrancesco i sur., 2009). Po završetku sušenja potrebno je odvojiti prah. Teže čestice praha padaju na dno komore za sušenje, a sitnije čestice se uvode u ciklone gdje se izdvajaju. Također, izlazni zrak se filtrira gdje se odvajaju sitnije čestice.

Sušenje raspršivanjem pokazalo se vrlo primjenjivim za očuvanje biološki aktivnih spojeva, flavanoida i fenolnih kiselina, u proizvedenim prahovima. Biološki aktivni spojevi osjetljivi su na visoku temperaturu i lako podliježu oksidacijskim procesima tijekom sušenja. U tu svrhu potrebno je odabrati optimalne parametre sušenja poput nosača i njihove koncentracije te temperaturu sušenja, s time da što je veća razlika ulaznog naspram izlaznog zraka sušenje je brže. Istraživanja su pokazala da za sušenje biljnih materijala u cilju očuvanja biološki aktivnih spojeva, kao što je i ekstrakt korijena koprive, najbolje je sušiti uzorke s manje suhe tvari pri nižoj temperaturi uz nosače za raspršivanje (Desobry i sur., 1997).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Prahovi rizoma koprive (*Urtica dioica* L.)

Za istraživanje korišteni su prahovi rizoma koprive dobiveni sušenjem raspršivanjem. Rizomi koprive prethodno su uzgojeni iz presadnica zasađenih u proljeće 2013. godine i izvađenih u jesen 2014. godine, te su osušeni na zraku. Jedan uzorak rizoma dobiven je iz presadnica za koje je korištena gnojidba od 100 kg N/ha, a za drugi uzorak 0 kg N/ha, tj. nije bilo gnojidbe (tablica 1). Također, za usporedbu analiziran je komercijalno dostupan prah ekstrakta rizoma koprive s 2 % silika gela (tablica 1).

Tablica 1. Oznake analiziranih uzoraka

P1	Uzorak rizoma koprive gnojen s 100 kg N/ha
P2	Uzorak rizoma koprive bez gnojidbe
P3	Gotov prah 'Nettle root extract', (2 % Silica)

3.1.2. Priprema ekstrakata rizoma koprive i ekstrakata prahova rizoma koprive

Za dobivanje praha sušenjem raspršivanjem, pripremljeni su ekstrakti rizoma koprive. Odvagano je 15 g usitnjenih suhих rizoma koprive i pomiješano s 450 mL destilirane vode te ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji 30 min/70 °C. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su prenešeni u odmjernu tikvicu od 500 mL, nadopunjeni otapalom do oznake, centrifugirani 10 min na 5500 o/min i filtrirani. Tako pripremljeni ekstrakti poslani su u Centar za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru gdje su sušeni raspršivanjem.

Ekstrakti prahova P1, P2 i P3 pripremljeni su na isti način kao i ekstrakti rizoma koprive uz razliku u odvazi uzorka i volumenu otapala. Za ekstrakciju svih prahova odvagano je 1 g praha. Prahovi P1 i P2 ekstrahirani su s 10 mL otapala, a prah P3 s 50 mL otapala.



Slika 6. Priprema ekstrakta rizoma koprive (vlastita fotografija)

3.1.3. Postupak sušenja raspršivanjem

Postupak sušenja raspršivanjem proveden je na laboratorijskom uređaju za sušenje raspršivanjem SD 06 (slika 7). Tijekom sušenja raspršivanjem ulazna temperatura bila je 155 °C, a izlazna temperatura je bila u temperaturnom rasponu od 72 do 75 °C. Brzina protoka zraka bila je 3,5 m/s, a protok uzorka bio je 485 mL/h. Promjer mlaznice je 1 mm. Korišteni nosač prilikom postupka bio je maltodekstrin dekstrozni ekvivalent 13-17 (MD 13-17 DE) koji je bio pomiješan s uzorkom u omjeru 1:2.



Slika 7. Sušionik za sušenje raspršivanjem SD 06

3.1.4. Kemikalije i standardi

Kemikalije za pripremu ekstrakata za sušenje raspršivanjem

- Destilirana voda
- Maltodekstrin dekstrozni ekvivalent 13-17 (MD 13-17, Sigma-Aldrich, SAD)

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Anhidrid natrijeva karbonata (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna

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

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Standard galne kiseline

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

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France)
- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni etanolom (96 %) do oznake

- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

- Metanol, 100 %-tni (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Klorogenska kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)

- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standardne klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi se u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom

Kemikalije i standardi za određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

- Metanol, 100 %-tni (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

- 1 %-tna metanolna otopina vanilina (Acros organics, Geel, Belgija)

Priprema: 1 g vanilina se u odmjernoj tikvici od 100 mL nadopuni 100 % -tnim metanolom do oznake

- Koncentrirana sumporna kiselina, 96 %-tna (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France)

- Otopina sumporne kiseline, 25 %-tna

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne sumporne kiseline prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u kojoj je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (oko 20 mL). Tikvica se obratno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a koncentrirana sumporna kiselina dodaje se u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom

- Katehin (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: odvažuje se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom

3.1.5. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β , Velika Britanija)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Centrifugalni separator (Rotofix 32, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (UC-50A, Biobase, Kina)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Sušionik s raspršivanjem (SD 06, Labplant, Velika Britanija)
- Mlinac (Dolcevit, Imetec, Italija)

Pribor:

- staklene kivete
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- propipeta
- mikropipete od 100 i 1000 μ L
- odmjerne tikvice, volumena od 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL i 1000 mL
- Erlemeyerove tikvice od 50 mL i 500 mL
- menzura, volumena 100 mL i 1 L
- staklene epruvete
- plastična lađica za vaganje
- termometar
- laboratorijska čaša, volumena 50 mL, 100 mL, 250 mL i 500 mL
- lijevak
- vodena kupelj
- stalak za epruvete
- falcon kivete
- stakleni štapić
- laboratorijska žlica

3.2. METODE

3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolornoj reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μ L ekstrakta, 200 μ L 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, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u vodenoj kupelji. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm za sva tri uzorka. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Uzorci P1 i P2 prethodno su razrijeđeni 3 puta. Svi uzorci su analizirani u paraleli.

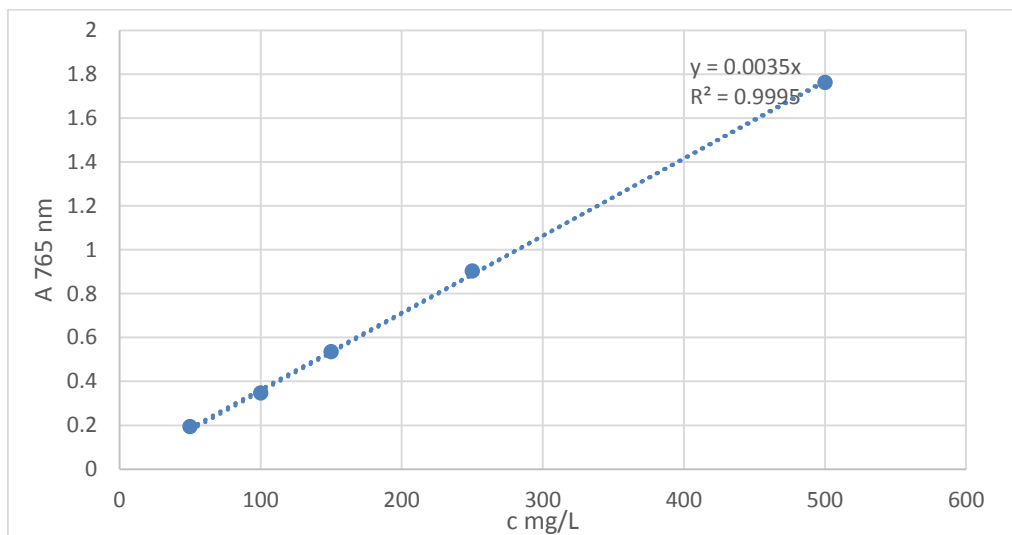
Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C. Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 7. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \cdot X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Određivanje se provodi u vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L ekstrakta, 250 μ L 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Svi uzorci su analizirani u paraleli.

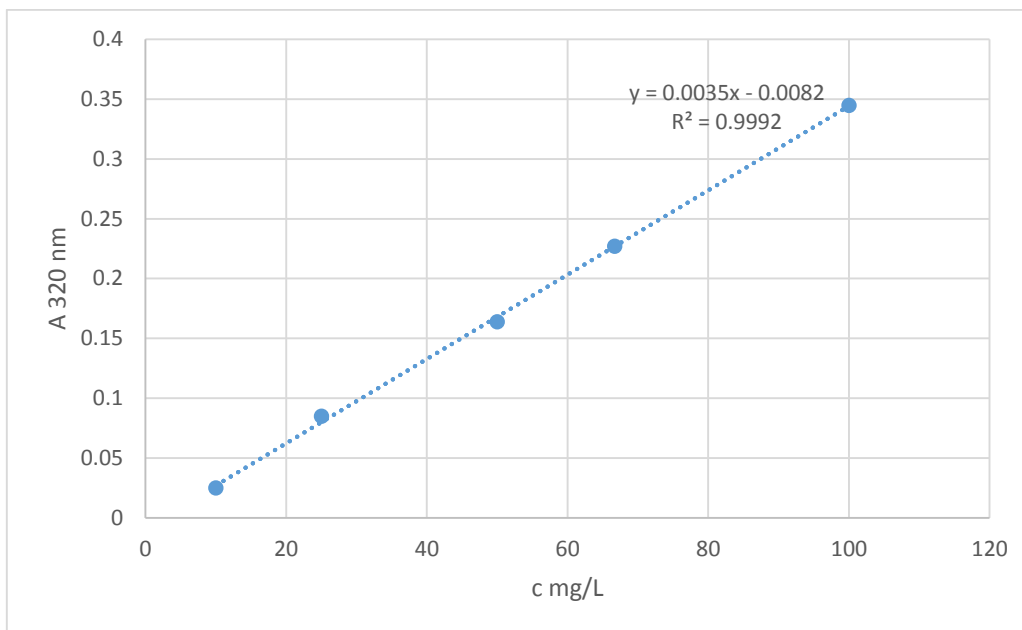
Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu:

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.



Slika 8. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji klorogenske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \cdot X - 0,0082$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L).

3.2.3. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

Postupak određivanja:

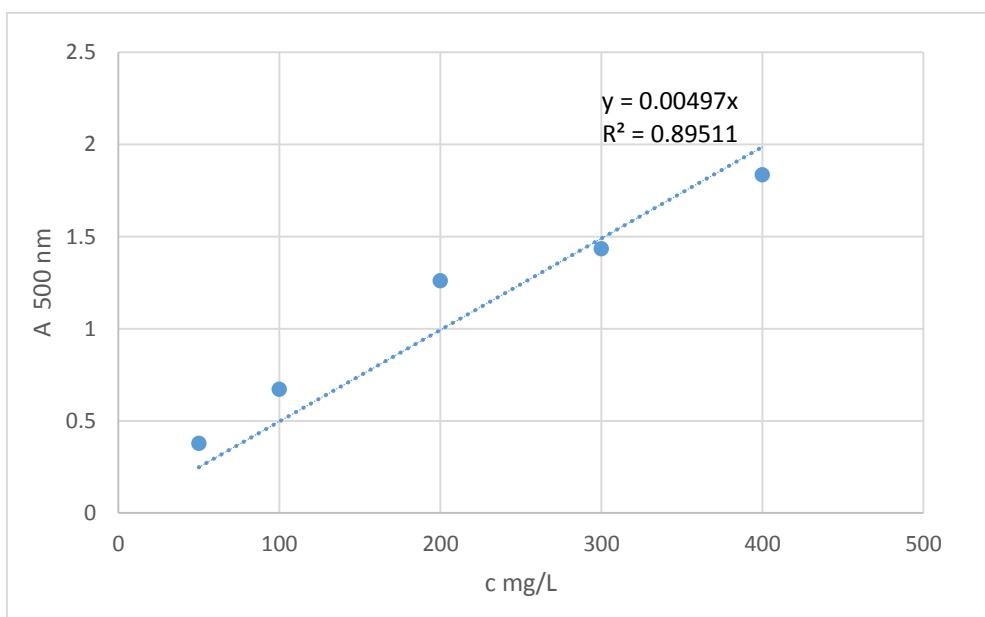
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄ i 1 mL ekstrakta. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Uzorci P1 i P2 prethodno su razrijeđeni 3 puta. Svi uzorci su analizirani u paraleli.

Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina koncentracije 5g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine prirede se slijedeća razrijeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se otpipetira redom: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄. Uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima za metanol.



Slika 9. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji katehina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,00497 \cdot X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm,

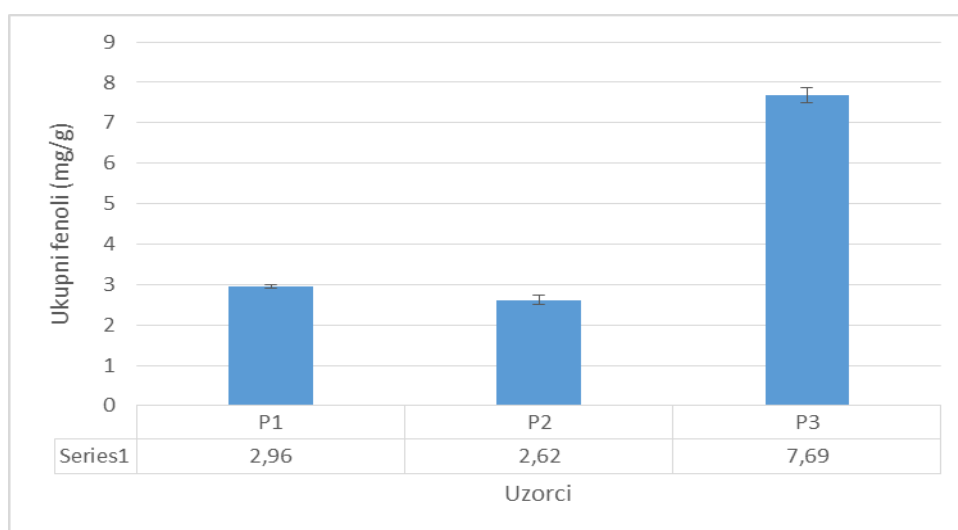
X – koncentracija katehina (mg/L).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola iz prahova ekstrakata rizoma koprive, sa ili bez gnojidbe te iz komercijalnog gotovog praha korjena koprive.

4.1. Koncentracije ukupnih fenola u prahovima rizoma koprive

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola prikazani su grafički kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja prikazanih na slici 10.



Slika 10. Koncentracija ukupnih fenola u prahovima ekstrakta korijena koprive izražena u mg galne kiseline/g uzorka

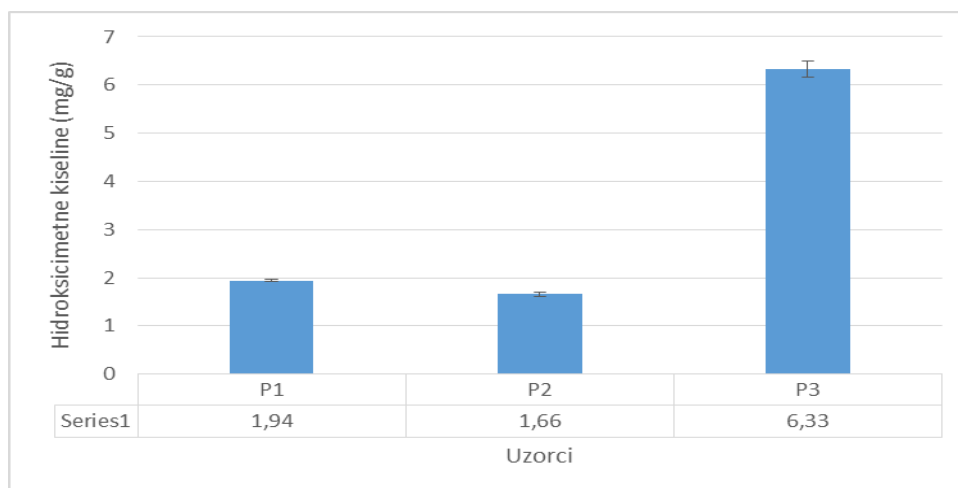
P1 je uzorak rizoma koprive gnojen s 100kg N/ha, P2 je uzorak rizoma koprive bez gnojidbe i P3 je gotov prah 'Nettle root extract', (2% Silica).

Pokazalo se da je najviša koncentracija ukupnih fenola određena u uzorku P3, dok su u P1 i P2 određene 2,5 puta niže koncentracije. Razlog ovakvih razlika u koncentraciji ukupnih fenola između prahova koji su dobiveni iz uzgojenih rizoma koprive i komercijalnog praha rizoma koprive mogu biti način uzgoja, uvjeti proizvodnje ekstrakta te način provođenja postupka sušenja raspršivanjem. Usporedimo li koncentracije ukupnih fenola u prahovima koji su dobiveni iz ekstrakata rizoma koprive sa i bez gnojidbe, vidljivo je da gnojidba utječe na povišenje koncentracije ukupnih fenola, gdje je viši udio UF određen u ekstraktu gnojenog rizoma.

Prema istraživanju Zdravković i sur. (2012) zabilježeno je da povećanjem udjela vode u vodeno-etanolnim ekstraktima lista koprive povećava se i udio ekstrahiranih ukupnih fenola. Također je prema istraživanju Fabek (2011) ustanovljeno da se gnojenjem brokule povećava koncentracija ukupnih fenola u biljci, što je primjenjivo i na ekstrakte drugih biljaka.

4.2. Koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prahovima rizoma koprive

Na slici 11 prikazane su koncentracije hidroksicimetnih kiselina u analiziranim prahovima. Prikazani rezultati su srednja vrijednost dva paralelna mjerenja.



Slika 11. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prahovima ekstrakata rizoma koprive izražena u mg klorogenske kiseline/g uzorka

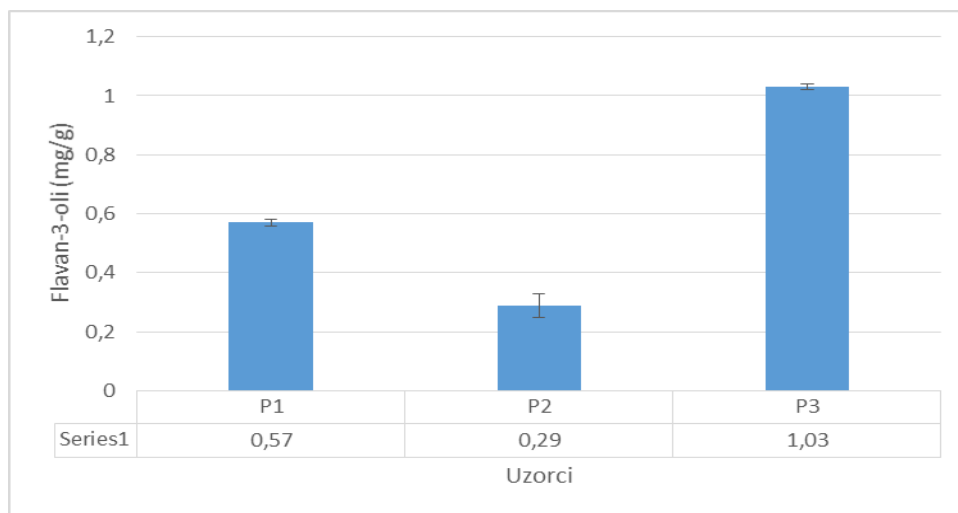
P1 je uzorak rizoma koprive gnojen s 100kg N/ha, P2 je uzorak rizoma koprive bez gnojidbe i P3 je gotov prah 'Nettle root extract', (2% Silica).

Pokazalo se da je najviša koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina određena u uzorku P3 tj komercijalnom prahu rizoma koprive. U uzorcima P1 i P2 određena je trostruko niža koncentracija, a razlozi su vjerojatno isti kako je navedeno kod rezultata određivanja ukupnih fenola. Prema rezultatima vidljivo je da gnojidba utječe na povišenje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u korijenu koprive, gdje je viša koncentracija hidroksicimetnih kiselina određena u P1 u odnosu na P2.

Prema provedenom istraživanju Radman (2015) ustanovljeno je da gnojenje koprive utječe na povećanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

4.3. Koncentracije flavan-3-ola u prahovima rizoma koprive

Koncentracije ukupnih flavan-3-ola prikazani su grafički uzimajući u obzir srednju vrijednost dva paralelna mjerenja, što je prikazano na slici 12.



Slika 12. Koncentracija flavan-3-ola u prahovima ekstrakata rizoma koprive izražena u mg katehina/g uzorka

P1 je uzorak rizoma koprive gnojen s 100kg N/ha, P2 je uzorak rizoma koprive bez gnojidbe i P3 je gotov prah 'Nettle root extract', (2% Silica).

Kao i u slučaju ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina, pokazalo se da je najviša koncentracija flavan-3-ola određena u uzorku P3. U uzorku P1 određena koncentracija flavan-3-ola bila je 2 puta niža (0,55 mg/g) u odnosu na koncentraciju u P3, dok je uzorak P2 sadržavao najnižu koncentraciju flavan 3-ola (0,29 mg/g).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je također da se gnojidba dušikom povoljno odražava na koncentraciju flavan-3-ola, kao što je to slučaj i kod koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina, te ukupnih fenola. Prema istraživanju Spina i sur. (2008) kojime su utvrđene razlike koncentracija flavanoidnih spojeva kultiviranih i nekultiviranih biljaka, utvrđeno je da je koncentracija tih spojeva viša kod kultiviranih nego divljih biljaka.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, prezentiranih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. U svim analiziranim prahovima ekstrakta rizoma koprive određeni su ukupni fenoli, ukupne hidroksicimetne kiseline i flavan-3-oli.
2. Koncentracije ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola bile su najviše u komercijalnom prahu rizoma koprive. U prahovima koji su proizvedeni iz ekstrakata rizoma koprive uzgojenih sa i bez gnojidbe koncentracije svih fenolnih spojeva bile su značajno niže (2-3 puta).
3. Koncentracije ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola bile su više u prahu dobivenom iz ekstrakta rizoma koprive uzgojenih uz gnojidbu (100 kg N/ha) iz presadnica nego u prahu dobivenom iz ekstrakta rizoma koprive iz presadnica bez gnojidbe.

6. LITERATURA

Arceus, A., Wesolowski, M., Konieczynski, P. (2013) Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1821-1829.

Ashokkumar M., Sunartio D., Kentish S., Mawson R., Simons L., Vilku K., Versteeg C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**, 155–160.

Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006) Ultrasound assisted extraction of oxyloglucan from apple pomace, *Ultrason. Sonochem.* **13**, 511-516.

Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008) Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: Handbook of food analysis instruments, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötles, 85- 103.

Dent, M. (2013) Utjecaj postupaka ekstrakcije na sastav i količinu fenolnih spojeva kadulje. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Desobry, S., Neto, F., Labuza, T. (1997) Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation. *Food Science* **63** (6), 1158-1162.

Dewick, P. (2007) Medicinal natural products A biosynthetic approach, John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England, 121-132.

Fabek, S. (2011) Pravilna gnojidba brokule. *Gospodarski list* 13/14: 28.

Grevsen, K., Fretté, X., & Christensen, P. (2008) Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by high nitrogen fertilization and by harvest time. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 73(1), 20-27.

- Gianfrancesco, A. Turchiuli, C., Flick, D., Dumoulin, E. (2009) CFD Modeling and Simulation of Maltodextrin Solution Spray Drying to Control Stickness. *Food Bioprocess Technol*, **3**, 946- 955.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- He, F., Pan, Q.H., Shi, Y., Duan, C.Q. (2008) Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants. *Molecules* **13** (10), 2674-2703.
- Heim, K, Tagliaferro, A., Bobilya, D. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572-584.
- 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 Medica* **60** (1), 30-33.
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agr.* **83** (12), 1238-1247.
- 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
- Leighton T. (2007) What is ultrasound?, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 3–83.
- Lichius, J., Muth, C. (1997) The inhibiting effects of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. *Planta Medica* **63** (4), 307-310.
- Lopez-Malo, A., Jimenez-Fernandez, M., Palou, E. (2001) *Penicillium digitatum* spores inactivation by combining thermoultrasonification treatments and antimicrobial agents, IFT 2001 Annual meeting Technical Program Abstracts, str. 151.

Obon, J., Castellar, M., Alacid, M. and Fernández-López, J. (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J. Food Eng.* **90**, 471–479

Otles, S. i Yalcin, B. (2012) Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *Scientific World J.*, 2012, 1-12.

Pietta, P. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat Prod.* **63**, 1035-1042.

Prior, R.L., Lazarus, S.A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J.F. (2001) Identification of procyanidins and antocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 1270-1276.

Radman, S. (2015) Utjecaj gnojidbe dušikom i načina uzgoja na kemijski sastav dvodomne koprive (*Urtica dioica* L.). Doktorski rad. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

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, 399–418.

Rostagno, M.A., Prado, J.M., (2013) Natural Product Extraction - Principles and Applications. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98** (4), 828-834.

Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**, 793–801.

Spina, M., Cuccioloni, M., Sparapani, L., Acciarri, S., Eleuteri, A.M., 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.

Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.* **46** (10), 4267-4274.

Suslick, K.S. (1994): The chemistry of ultrasound. In: The Yearbook of Science and the Future 1994; Encyclopaedia Britannica: Chicago, 138-155.

Suslick K. (1990): Sonochemistry, *Science* **247**, 1439- 1445.

Vinatoru, M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.

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

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

Zdravković, A., Stanojević, Lj., Stanković M., Cakić, M., Nikolić, V., Nikolić, Lj., Ilić, D. (2012) Uticaj operativnih uslova i tehnike ekstrakcije na prinos, kinetiku i sastav vodenometanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.) *Savremene tehnologije* **1** (1), 30-37.