Ekstrakcija polifenola iz korijena biljke Urtica dioica L.

Paić-Karega, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:125124

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Matea Paić-Karega
6611/N

POLIFENOLI U KORIJENU BILJKE *Urtica dioica L.*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje
Mentor: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ KORIJENA BILJKE *Urtica dioica L.*

Matea Paić-Karega, 6611/N

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je usporediti različite metode ekstrakcije polifenola iz korijena koprive te prinose fenolnih spojeva u ovisnosi o primijenjenim metodama i uvjetima ekstrakcije. Uspoređivane su Soxhlet ekstrakcija te ekstrakcija superkritičnim CO_2. Za Soxhlet ekstrakciju kao otapala su korišteni 96%-tni etanol te n-heksan kako bi se prikazao i utjecaj odabira otapala na prinos ekstrakcije. Soxhlet ekstrakcijom uz primjenu 96%-tnog etanola prinos polifenola iznosio je 14,14%, dok je primjenom n-heksna prinos iznosio 0,768%. Ekstrakcija superkritičnim CO_2 dala je podjednake prinose kao i Shoxhlet ekstracija n-heksanom.

Ključne riječi: kopriva (*Urtica dioica* L.), polifenoli, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim CO_2
Rad sadrži: 24 stranica, 9 slika, 6 tablica, 42 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac*
Pomoć pri izradi: Dr. sc. Ivona Elez Garofulić
Rad predan: lipanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

POLYPHENOLS EXTRACTION FROM THE *Urtica dioica L.* ROOT

Matea Paić-Karega, 6611/N

Abstract:. The aim of this study was to compare different methods of polyphenol extraction from the nettle root and to show the influence off applied extraction methods and extraction conditions on the phenolic compounds yield. Soxhlet extraction and supercritical CO_2 extraction were compared. To show the effect of different solvent use on the yield of extraction 96% ethanol and n-hexane were used when Soxhlet extraction was conducted. Using ethanol the yield of polyphenols was 14,14% while with n-hexan as a solvent the yield of polyphenols was 0,768%. Supercritical CO_2 extraction gave similar results as Soxhlet extraction with n-hexane.

Keywords: nettle (*Urtica dioica* L.), polyphenols, Soxhlet extraction, supercritical CO_2 extraction

Thesis contains: 24 pages, 9 figures, 6 tables, 42 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: PhD Ivona Elez Garofulić

Thesis delivered: June, 2017

Sadržaj

1.UVOD..... 1
2.TEORIJSKI DIO 2
2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.) 2
2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE BILJKE 2
2.2.1. UZGOJ, RAZMNOŽAVANJE, BERBA 3
2.2.2 KEMIJSKI SASTAV 3
2.2.2.1. FITOSTEROLI 3
2.2.2.2. KAROTENOIDI 4
2.2.2.3. KLOROFIL 5
2.2.3. FENOLNI SPOJEVI KOPRIVE 6
FLAVONOIDI 7
NEFLAVONOIDI 8
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOPRIVE 9
2.3.1. SOXHLET EKSTRAKCIJA 9
2.3.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDOM (SFE) 10
2.3.3. NOVE TEHNIKE EKSTRAKCIJE 12
2.3.3.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA (UAE) 12
2.3.3.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA (MAE) 13
2.3.3.3. EKSTRAKCIJA VISOKIM HIDROSTATSKIM TLAKOM (HHPE) 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO 14
3.1. MATERIJALI 14
3.1.1. UZORCI KOPRIVE 14
3.1.2. PRIPREMA UZORKA I EKSTRAKCIJA 14
3.1.3. KEMIKALIJE I STANDARDI 15
3.2. METODE 15
3.2.1. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteau metodom ... 15
3.2.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom 16
4. REZULTATI 17
5. RASPRAVA 19
6. ZAKLJUČAK 20
7.LITERATURA 2

1. UVOD

Kopriva, latinskog naziva *Urtica dioica* L., je zeljasta, višegodišnja biljka s razgranjenim, puzećim podankom i s uspravnom, četverobridnom dlakavom stabljikom (Grlić, 1990.). Može se koristiti za jelo, kao čaj, gnojivo te za njegu kose. U te se svrhe najčešće koriste listovi i korijen koprive. Kopriva ima veliku prehrambenu i nutritivnu vrijednost. U biljci ima oko 18% proteina, 7% ugljikohidrata, 2,5% masti te mnogo željeza, kalcija, magnezija, natrija, fofora. Sadrži i velike količine vitamina A, C, riboflavina i K (Otles i Yalcin, 2012.). Osim značajnog udjela minerala i vitamina, kopriva je bogata taninima, fitosterolima, lecitinom i klorofilom. Poznata je i po značajnom udjelu fenolnih spojeva od koji su najzastupljeniji fenilpropan, kafeinska i klorogenska kiselina te skopoletin (Bucar i sur., 2006.). Zbog svega navedenog, kopriva je medicinski vrlo važna biljka za koju se smatra da ima antioksidativno, protuupalno, antikancerogeno i insekticidno djelovanje.

Udio djelatnih tvari značajno se razlikuje o dijelu biljke. Dosadašnja istraživanja su pokazala da korijen koprive sadrži skopoletin, sterole, masne kiseline, polisaharide i izolecitin (Taylor, 2005.). Važnu skupinu spojeva u korijenu koprive čine i polifenoli koji se strukturno međusobno razlikuju te je za učinkovitu ekstrakciju važno odabrati prikladne metode i parametre ekstrakcije.

Za izolaciju polifenola iz korijena koprive primjenjuju se različite metode ekstrakcije poput ekstrakcije otapalima (Soxhlet), ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije (Khoddami i sur., 2014.), a neovisno o primijenjenoj metodi učinkovitost ekstrakcije polifenola ovisi o brojnim faktorima kao što su: primjenjena otapala, temperature, vrijeme, metoda ekstrakcije i sl.

Stoga je svrha ovog rada bilo usporediti ekstrakciju polifenola iz korijena koprive primjenom Soxhlet ekstrakcije i ekstrakcije superkritičnim CO_2 te prinose fenolnih spojeva u ovisnosti o primijenjenim metodama i uvjetima ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.)

Kopriva (*Urtica dioica* L.) pripada carstvu *Plantae*, koljenu *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Urticales*, porodici *Urticaceae*, rodu *Urtica* (slika 1). U narodu je poznata i pod nazivima žariga, žarulja, žegavica, žeža, žigovica, koprva, obična kopriva, pasja kopriva, pasja kupina, pitoma kopriva, kopriva. Postoje brojni varijeteti koprive poput male, mrtve, mediteranske koprive (Grlić, 1990.).

Kopriva je biljka koja je ljudima poznata još od davnina. Raste u umjerenim klimatskim uvjetima u mnogim regijama Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Nalazimo je u ruralnim područjima, vrtovima, uz rubove šuma, rijeka i potoka, gdje raste kao korov (Krystofova i sur., 2010.).

Zabilježeno je da se 900 godina prije Krista, na području srednje Europe, kopriva koristila za proizvodnju tekstila, zajedno s lanom i industrijskom konopljom. Uzgajati se počela tek u 19. stoljeću te je bila glavna sirovina za tekstilnu industriju sve do Drugog svjetskog rata. Tada su uništene sve tvornice za preradu te se počinju koristiti jeftiniji izvori industrijskih vlakana. Danas se radi na popularizaciji koprive kao komercijalno isplative biljke, zbog vlaknaste stabljike, al i potpune iskoristivosti njenih listova, cvjetova, sjemenki te korijena.



Slika 1. *Urtica dioica*

2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE BILJKE

Ime koprive potječe od latinske riječi *uro*, što znači žariti, te *dioica*, što označava dvodomnost. Koprivu čini uspravna i čvrsta stabljika (visine od 1 do 2 m) koja je prekrivena dlačicama te su na njoj smješteni nazubljeni listovi srcolikog oblika. Površina listova je također prekrivena dlačicama koje nazivamo trihomima ili žaokama. U dodiru s ljudskom kožom trihomi se lome i poput igle se zabijaju u kožu, pritom ispuštajući smjesu kemijskih spojeva od kojih su najvažniji acetilkolin, histamin, 5-hidroksitriptamin (serotonin), moroidin i mravlja kiselina (Greenberg, 2003.). Oni izazivaju iritaciju kože koja se manifestira plikovima (urtikarija), crvenilom i lokalnim osjećajem žarenja koji traju čak do 12 sati (Oliver i sur., 1991.).

2.2.1. UZGOJ, RAZMNOŽAVANJE, BERBA

Kopriva za svoj rast zahtjeva vlažno i plodno tlo bogato organskim tvarima i nutrijentima, od kojih je najvažniji dušik (Bomme i sur., 1988,). Također, poželjno je koprivu saditi na zemlji na kojoj su prije rasle leguminozne vrste koje imaju sposobnost fiksiranja dušika iz atmosfere u tlo. Potreban joj je i učestali pritok vode pa se najbolji uvjeti postižu u krajevima s dosta oborina ili navodnjavanjem (Bredemann, 1959.). Kopriva se može razmnožavati sjemenom, međutim kako bi se postigao jednoličan kemijski sastav češće se koristi vegetativan način razmnžavanja. Kopriva se sama vegetativno dijeli vriježama. Za komercijalne svrhe koriste se reznice stabljike i listova koje se prije sadnje u polju čuvaju u staklenicima kako bi razvile razgranat i jak korijen (Vetter i sur., 1996).

Kopriva se kosi ili bere dok su biljke sasvim mlade, odnosno kada dostignu visinu od oko 30 cm. U našim uvjetima to se postiže već polovicom travnja, a druga je žetva moguća već nakon 15 - 20 dana. Pravovremenom košnjom može se postići 6 - 8 otkosa godišnje, a u povoljnijim klimatskim uvjetima i do 10. S površine od 1 ha može se dobiti 10 - 15 t svježih, odnosno 2 - 3 t suhih listova koprive.

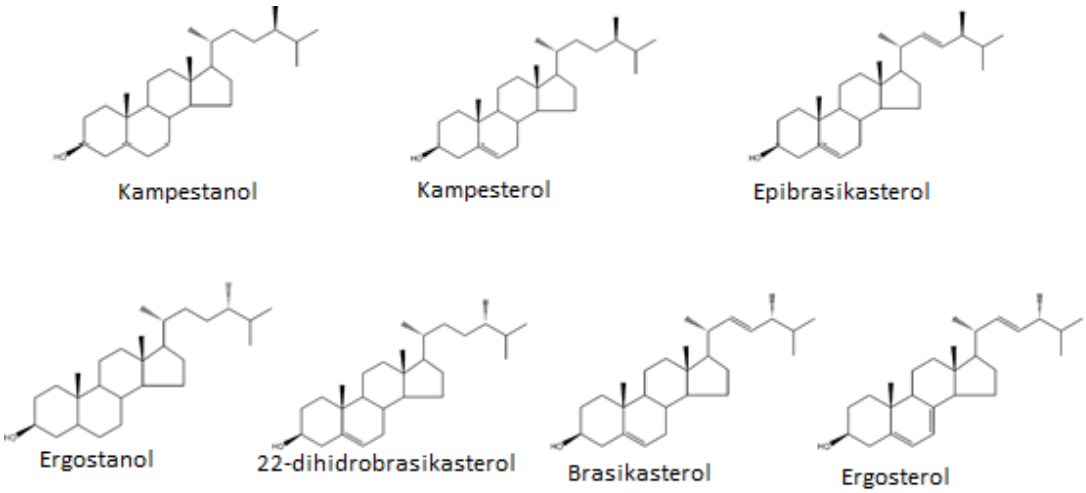
2.2.2 KEMIJSKI SASTAV

Kopriva ima bogat kemijski sastav te uz značajan sadržaj vitamina (A, C, riboflavin, K) i minerala (željezo, kalcij, magnezij, natrij), sadrži i značajan udio fenola, tanina, fitosterola, karotenoida, lecitina i klorofila (Otles i Yalcin, 2012.). U nastavku će biti izdvojeni i opisani najvažniji spojevi.

2.2.2.1. FITOSTEROLI

Fitosteroli (biljni steroli) su triterpeni koji su važne strukturne komponente biljnih membrane. Slobodni fitosteroli služe za stabilizaciju fosfolipidnog dvosloja u staničnoj membrani baš kao što to čini kolesterol u životinjskim membranama. Većina fitosterola sadrži 28 ili 29 ugljikovih atom te 1 ili 2 dvostruke ugljikove veze, u sterolnoj jezgri, a ponekad u alkilnom bočnom lancu (Slika 2). Fitostanoli su potpuno zasićena podgrupa fitosterola (ne sadrže dvostruke veze). Fitosteroli se kemijskom hidrogenacijom mogu konvertirati u fitostanole. U biljnom vrstama pronadeno je više od 200 različitih tipova fitosterola. Osim u slobodnom obliku, fitosterole pronalazimo i u obliku konjugata u kojima je 3β-OH skupina esterificiana masnom kiselinom, hidroksicimetnom kiselinom, ili glikolizirana heksozom (najčešće glukozom). Najpopularnije metode za analizu fitosterola uključuju hidrolizu estera te kapilarnu

GLC kromatografiju ukupnih fitosterola. Fitosteroli i fitostanoli dobili su mnogo pozornosti zadnjih godina zbog njihove sposobnosti da snizuju kolesterol (Moreau i sur., 2002.). Najpoznatiji fitosteroli korijena koprive su stigmasterol i kampesterol (Hirano i sur., 1993.)

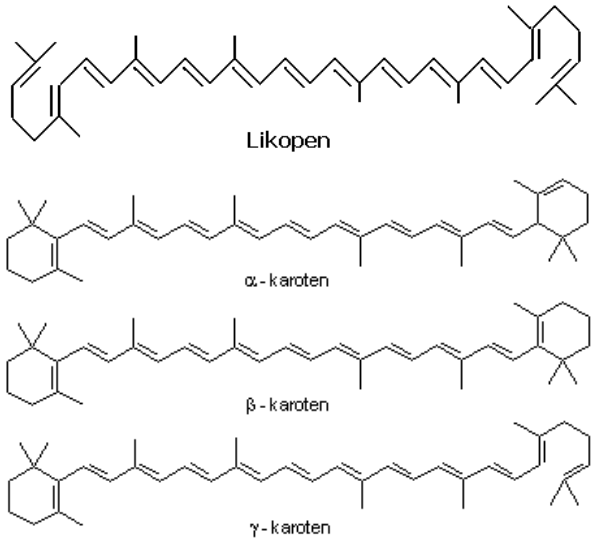


Slika 2. Fitosteroli (Moreau i sur., 2002.)

2.2.2.2. KAROTENOIDI

Karotenoidi su derivati izoprena s velikim brojem dvostrukih veza koje su odgovorne za njihovu boju. Dijele se na karotene i ksantofile. U karotene spadaju α, β i γ-karoten te likopen. Ksantofili su hidroksi, keto i metoksi derivate karotena.

U prirodi su najviše prisutni u *trans* obliku. Središnji dio mlekule čini dug niz konjugiranih dvostrukih veza (Slika 3). Imaju bitnu ulogu fotosintezi i foto-zaštiti u biljkama, a cijenjeni su i zbog provitaminskih i antioksidativnih učinaka (Lelas, 2008.). Od karotenoida u koprivi su prisutni β-karoten, hidroksi-β-karoten, lutoksantin, lutein epoksid i violaksantin (Ellnain-Wojtaszek i sur., 1986.).



Slika 3. Karotenoidi (Fiedor i sur., 2014.)

2.2.2.3. KLOROFIL

Klorofili su spojevi koji se pojavljuju u nekoliko oblika. Najzastupljeniji su klorofil a i klorofil b. Klorofil a je plavozelene, a klorofil b svijetlozelene boje. Odnos između klorofila a i b je 31:11.

Molekula klorofila sastoji se od četiri pirolna prstena koja su vezana preko metenskih mostova. U centru se nalazi magnezijev ion (Tablica 1). Hidrolizom klorofila nastaje feofitin (Lelas, 2008.).

Klorofil a je primarni fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok u sekundarne metabolite zbog pomoćne i zaštitne uloge, ubrajamo sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente (Taiz i Zeiger, 2010). Klorofili imaju anti-mutagenu i antioksidacijsku aktivnost zbog mogućnosti prekidanja reakcije radikala uzrokovane autooksidacijom putem mehanizma kojemu je vodik donor (Ferruzzi i sur., 2002.).

Tablica 1. Različiti oblici klorofila (Lelas, 2008.)

	klorofil *a*	**klorofil *b***	**klorofil *c1***	**klorofil *c2***	**klorofil *d***
formula	$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	$C_{35}H_{30}O_5N_4Mg$	$C_{35}H_{28}O_5N_4Mg$	$C_{54}H_{70}O_6N_4Mg$
C3 grupa	$-CH=CH_2$	$-CH=CH_2$	$-CH=CH_2$	$-CH=CH_2$	-CHO
C7 grupa	$-CH_3$	-CHO	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$
C8 grupa	$-CH_2CH_3$	$-CH_2CH_3$	$-CH_2CH_3$	$-CH=CH_2$	$-CH_2CH_3$
C17 grupa	$-CH_2CH_2COO$-fitil	$-CH_2CH_2COO$-fitil	-CH=CHCOOH	-CH=CHCOOH	$-CH_2CH_2COO$-fitil
C17-C18 veza	jednostruka	jednostruka	dvostruka	dvostruka	Jednostruka
prisutnost	svugdje	uglavnom biljke	različite alge	različite alge	neke crvene alge

2.2.3. FENOLNI SPOJEVI KOPRIVE

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u većini biljaka te namirnicama biljnog podrijetla. Uključuju spojeve raličite kemijske strukture čija je osnova aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). Imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu. U biljnom tkivu obično ih nalazimo vezane na druge molekule poput ugljikohidrata, ali i sa sulfatnim ili acetilnim skupinama.

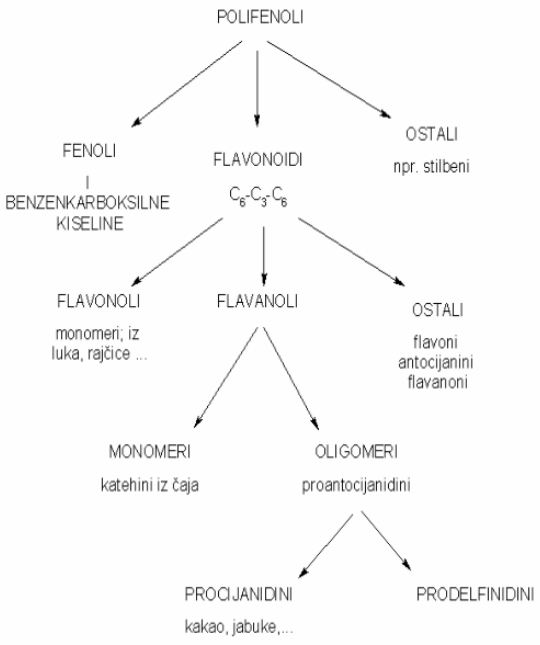
Dijele se na flavonoidne i neflavonoidne spojeve (Slika 4). U skupinu flavonoida spadaju flavani, flavone, antocijanidini i čalkoni koji se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićnosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena.

Neflavonoidi su fenolne kiseline, lignani te stilbeni (Riedel i sur., 2012).

Fenolni spojevi su najbrojnija skupina spojeva u biljnom "kraljevstvu" sa oko 8000 različitih spojeva. Jaki su antioksidansi te pomažu prevenciji bolesti kao što su rak i kardiovaskularne bolesti.

Dosad provedna istraživanja pokazala su sljedeći udio fenolnih spojeva u koprivi: korijen-7,82 mg GAE/g DM; stabljika-9,91 GAE/g DM; listovi-7,62 mg GAE/g DM (Hudec i sur., 2007.).

U drugom istraživanju u kojem je korištena vrećica čaja od koprive koja je sadržavala sve dijelove biljke, dobiveni su rezultati za ukupni sadržaj fenola od 2,5 mg GAE/g DM (Akis, 2010.) .

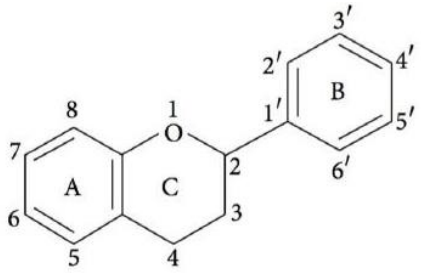


Slika 4. Osnova podjela polifenola (Berend i sur., 2008.)

FLAVONOIDI

Bazu flavonoida čini ugljični skelet od 15 C atoma koji grade 2 benzenska prstena (A i B) povezna heterocikličnim piranskim prstenom (C). Podijeljeni su u različite skupine poput flavona, flavonola, flavonona i drugih. Skupine se razlikuju prema stupnju oksidacije i supstituentima prestena C dok se spojevi unutar iste skupine razlikuju prema obrascu supstitucije prstena A i B. Pojavljuju se kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati (Slika 5).

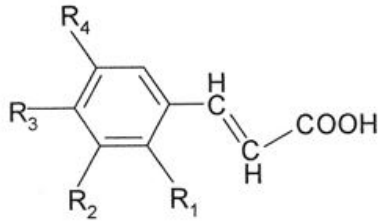
U ljudskoj prehrani najviše ima izoflavona, flavonola i flavona. Apsorpcija prehrambenih flavonoida ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima poput veličine čestica, topljivosti, lipofilnosti, pKa. Nakon apsorpcije, flavonoidi se konjugiraju u jetri sulfatima, metilnim skupinama, glukuronizacijom ili se metaboliziraju do manjih fenolnih spojeva (Kazazić, 2004; Ivanova i Stefova, 2011). U koprivi su od flavonoida najzastupljeniji kampferol, izoramnetin, kvercetin, izokvercetin, astragalin, rutin (Ellnain-Wojtaszek i sur., 1986.).



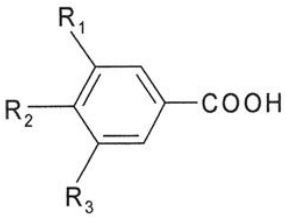
Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (Kazazić 2004.)

NEFLAVONOIDI

Neflavonoidi u svojoj strukturi sadrže samo jedan aromatski prsten (Slike 6 i 7). Najzastupljeniji su derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Goncalves i sur., 2013.). U koprivi možemo naći fenilpropane, kafeinsku i klorogensku kiselinu te skopoletin (Bucar i sur., 2006.).



Slika 6. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990.)



Slika 7. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina, (Robards i sur., 1999.)

2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOPRIVE

Budući da se fenolni spojevi međusobno strukturno značajno razlikuju, za učinkovitu ekstrakciju potrebno je odabrati adekvatnu metodu i optimalne parametre. Ekstrakcija je postupak odjeljivanja smjese tvari koje imaju razlicitu topljivost u različitim otapalima. To je prvi korak u izolaciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Dai i sur., 2010.). Zbog složene kemijske strukture fenolnih spojeva i njihove interakcije s drugim tvarima, ekstrakcija je zahtjevna. Ovisi o raznim čimbenicima poput korištenog otapala, temperature, vremenu kontakta, omjeru otapala i otopljene tvari, veličini čestica i pH (Takeuchi i sur., 2009.).

Ekstrakcije otapalima najčesće su korišteni postupci za pripremu ekstrakta iz biljnog materijala (Dai i sur.,2010.). Soxhlet, maceracija i ekstrakcija grijanim refluksom konvencionalne su metode koje se često koriste za izolaciju fenola iz krutog uzorka. Ekstrakcija refluksom provodi se na 90 °C tijekom nekoliko sati dok se maceracija provodi nekoliko dana na sobnoj temperaturi. Ove metode su jednostavne i zahtijevaju jeftinu aparaturu i rezultiraju relativno visokim prinosom fenolnih spojeva. Nedostaci ovih metoda su: (1) potrebno je koristiti veliki volumen agresivnih organskih otapala koju ugrožavaju zdravlje i okoliš; (2) dugo vrijeme ekstrakcije; (3) degradacija bioaktivnih spojeva zbog unutarnjih i vanjskih faktora poput svjetla, visokih temperatura, visoke koncentracije kisika, enzimskih reakcija.

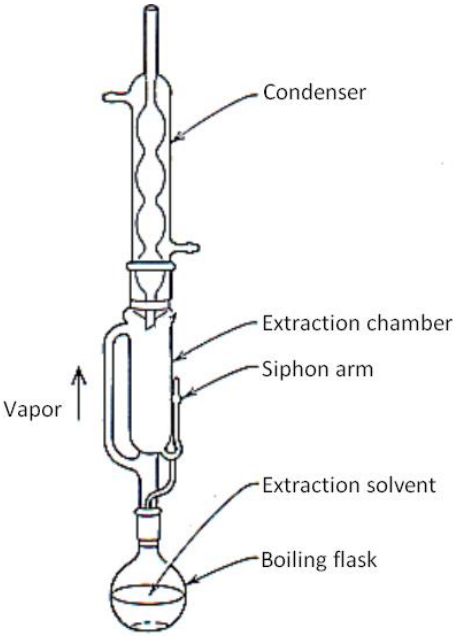
2.3.1. SOXHLET EKSTRAKCIJA

Soxhlet ekstrakcijom vrši se višestruka kontinuirana ekstrakcija u specijalnoj aparaturi s odgovarajućim otapalom nakon koje se otapalo otpari, a ostatak se suši, hladi i važe. Vremensko trajanje ekstrakcije ovisi o prirodi materijala, prirodi otapala, veličini površine koja je u kontaktu s otapalom, brzini cirkulacije samog otapa, relativnom odnosu otapalo/hrana. Ova je metoda pogodna za čvrste uzorke koji moraju biti suhi i što finije usitnjeni.

Željeni materijal stavlja se u papirnatu čahuru te se postavlja u srednji dio Soxhletove aparature (ekstraktor) koji se zatim spaja s hladilom i tikvicom. Kroz hladilo se, uz pomoć lijevka, ulijeva toliko otapala da se ekstarktor napuni i pomoću kapilarne cjevčice isprazni u tikvicu. Potom se dodaje još toliko otapala da se napuni do otprilike polovice ekstraktora. Tada se kroz hladilo pusti vrlo jak mlaz vode te se kreće sa zagrijavanjem. Zagrijavanje tikvice s otapalom vrši se u vodenoj ili pješčanoj

kupelji. Ekstrakcija se prekida u onom trenutku kad se otapalo iz ekstraktora prelije u tikvicu, a čahura u ekstraktoru bude bez otapala (Slika 8).

Soxhlet metoda ima nekoliko prednosti. To je vrlo jednostavna metoda koja zahtijeva malo vježbe te može ekstrahirati više mase uzorka od većine metoda. Međutim, najveći nedostatak je priprema uzorka koja je dugotrajna te količina ekstrakcijskog sredstva kojeg je potrebno puno nakon čega se baca i zagađuje okoliš. Zbog visoke temperature može doći do termičkog raspada termolabilnih komponenata uzorka (Luque de Castro i sur., 2010.).



Slika 8. Shema Soxhlet aparature (Luque de Castro i sur., 2010.)

2.3.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDOM (SFE)

Superkritični fluid je tip otapala koji se postiže kada se temperatura i tlak fluida podignu iznad njegove kritične točke. U tom stanju fluid ima svojstva tekućine (gustoća) i plina (viskoznost). Uobičajeni fluidi koji se koriste za ovaj tip ekstrakcije su metan, CO_2, etan, propan, amonijak, etanol, benzen i voda. Njihova svojstva prikazana su u tablici 2.

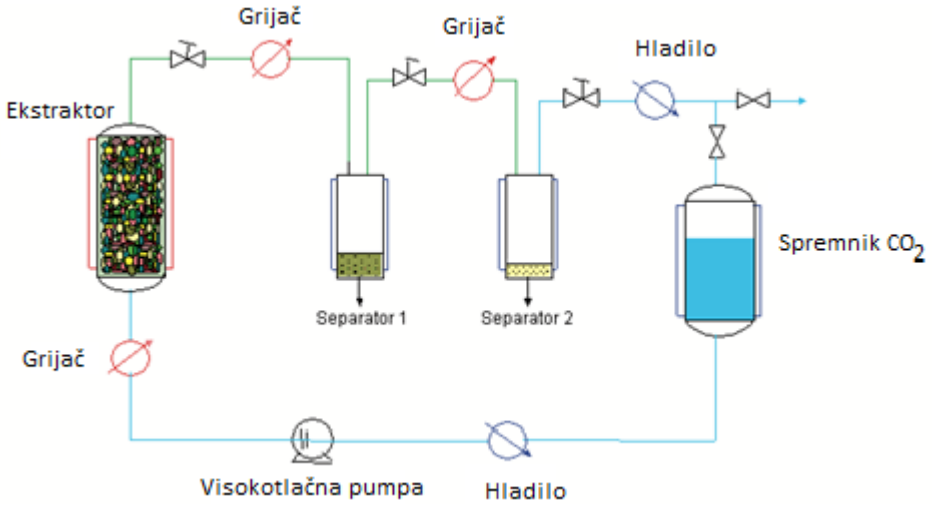
Tablica 2. Uobičajena otapala za SEF (Khoddami i sur., 2013.)

OTAPALO	P_C (bar)	T_c (°C)	GUSTOĆA (g/mL)
metan	46,41	-82,4	0,16
ugljični dioksid	73,87	31,2	0,47
etan	48,84	32,5	0,20
propan	42,46	97,3	0,22
amonijak	113,99	132,6	0,24
etanol	63,83	243,6	0,28
benzene	48,94	289,1	0,30
voda	221,19	374,3	0,32

CO_2 je najčešće korišteni medij u ekstrakciji superkritičnim fluidom. Kemijski je stabilan, ima nisku toksičnost, nezapaljiv je, ne stvara površinsku napetost te nije skup. Također, njegova kritična temperatura posiže se već pri oko 30 °C što je bitno kod ekstrakcije termolabilnih spojeva. Nadalje, lako se odvaja od uzorka pri završetku ekstrakcije. Nedostatak je što je CO_2 nepolaran i zbog toga nije pogodan za ekstrakciju polarnih spojeva. Ovaj problem riješava se dodatkom polarnog otapala poput etanola, metanola, etil-acetata i acetona.

Osnovna ekstrakcijska shema sastoji se od ekstrakcijeske posude napunjene suhim materijalom spremnim za ekstrakciju. Početni materijal mora biti u suhom i smrvljenom obliku kako bi se potpomognula ekstrakcija. Superkritični fluid putuje kroz ventil do separatora gdje se, zbog sniženog tlaka, ekstrakt otpušta iz plinovitog medija i sakuplja. Sofisticiranija shema ekstrakcije obuhvaća 2 ili više separatora. U tom je slučaju moguće frakcionirati ekstrakt u nekoliko frakcija različitog sastava, podešavajući temperaturu i tlak u separatorima (Slika 9).

Prednosti ove metode su manja upotreba toksičnih organskih otapala, povećana sigurnost i selektivnost, kraće vrijeme ekstrakcije, lako odvajanje ekstrakta od superkritičnog fluida. Najveći nedostatak jer veliko novčano ulaganje u opremu (Reverchon i sur., 2006.).



Slika 9. Shema ekstrakcije superkritičnim fluidom (Kőszegi i sur., 2014.)

2.3.3. NOVE TEHNIKE EKSTRAKCIJE

2.3.3.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA (UAE)

Ultrazvučno zračenje, koje ima frekvencije više od 20 kHz, olakšava ekstrakciju organskih i anorganskih spojeva iz čvrstog materijala korištenjem tekućih otapala. Odgovarajuće otapalo miješa se sa uzorkom i podvrgava se ultrazvučnim valovima pod kontroliranom temperaturom i tijekom određenog vremena. Također, na ekstrakciju utječe i frekvencija valova koja se koristi (Zougagh i sur., 2004.). Djelovanjem ultrazvuka moguće je poboljšati bioraspoloživost mikronutrijenata zadrzavajući pritom njihova izvorna svojstva. Također, moguće je izbjeći nastajanje slobodnih radikala, ali oni ponekad mogu biti korisni kod ciljane hidroksilacije polifenolnih i karotenoidnih spojeva cime se omogućuje povećanje njihove biološke aktivnosti (Ashokkumar i sur., 2008.). Ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više (Mason i sur., 1996.) te ne uzrokuje fizičke ni kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primjenjen te se zato smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, mjerenja teksture, sastava i sl.(Povey i sur., 1998.; Režek Jambrak i sur., 2010.).

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine - pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne snage (najčešće korišteno u prehrambenoj industirji). Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od oko 25 kHz električne energije. Pomoću ultrazvučnih pretvarača, električna ili mehanička energija pretvaraju se u energiju zvuka. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što pak

dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995.; Povey i sur., 1998.). Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka (kavitacija). Ultrazvučne zrake mogu biti usmjerene geometrijski; primjerice pomoću leća ili sa sfernim zakrivljenim sondama te elektroničkim putem; podešavanjem relativne faze elemenata u područje sonde ("faznom polju").

2.3.3.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA (MAE)

Ova se metoda već dugo koristi za istraživanje sekundarnih metabolita biljaka. Mikrovalovi su neionizirajuće zračenje čija je frekvencija između 300 MHz i 300 GHz. Bazira se na korištenju dielektričnog mehanizma da bi se zagrijao uzorak i ekstrahirali bioaktivni spojevi. Najčešće korištena otapala su acetonitril, voda, etanol, aceton, metanol i 2-propanol (Khoddami i sur., 2013.). Energija mikrovalova zagrije polarno otapalo u kontaktu s čvrstim uzorkom i na taj način smanjuje vrijeme ekstrakcije i količinu potrebnog otapala. (Veggi i sur., 2013.). Metoda se često upotrebljava za analizu izuzetno malih količina organskih spojeva u čvrstim materijalima, tj. za ekstrakciju prirodnih spojeva poput polifenola iz biljnih materijala. Pomoću MAE je moguće dobiti udjele ekstrahiranih tvari slične onima dobivenim tradicionalnim, standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme, što je zbog uštede na energiji (nema dodatnog zagrijavanja) ekonomski isplativo. MAE može i negativno djelovati na ekstrahirane tvari (bioaktivne spojeve uključujući polifenole) ako se temperatura otopine previše i/ili prenaglo povisi. U tom slučaju može doći do razgradnje polifenola ili do njihovog onečišćenja drugim, neželjenim komponentama biljnog materijala. Mikrovalna ekstrakcija je alternativa tradicionalnoj kruto - tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju sekundarnih metabolita iz biljaka (Veggi i sur., 2013.) Parametri ekstrakcije ovise o tipu i osobinama otapala te tvari koja se podvrgava ekstrakciji. Zagrijavanje otopine ovisi o sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Migracija otopljenih iona povećava prodiranje otapala u matriks čvrste tvari i tako potiče otapanje tvari koju želimo izolirati. Dva su dostupna sustava. Prvi, za ekstrakciju pri kontroliranom tlaku i temperaturi koristi zatvorene posude (za niske ili visoke temperature ekstrakcije), a drugi mikrovalne ekstraktore pri atmosferskom tlaku. Tlak u ekstrakcijskim posudama ovisi o vrsti, količini i vrelištu otapala (Favretto, 2004.).

2.3.3.3. EKSTRAKCIJA VISOKIM HIDROSTATSKIM TLAKOM (HHPE)

Ovo je novija metoda koja koristi netermalni visoki hidraulički tlak (1000-8000 bara) i funkcionira na principu stvaranja razlike u tlakovima u staničnoj membrani biljke. Obično se provodi na sobnoj temperaturi te se koriste različita otapala, od polarnih do nepolarnih, ovisno o spoju koji se ekstrahira. Vrijeme izloženosti određenom tlaku može varirati od nekoliko sekundi do 20 minuta (Krešić i sur., 2011.). Ova metoda nailazi na sve veću primjenu zbog manje štetnog utjecaja na okoliš te je priznata od strane FDA kao ekološki prihvatljiva metoda (Wang i sur., 2013.). Tijekom ovog procesa, povećanjem tlaka dolazi do povećanja topljivosti. Stanice pokazuju veću propusnost te više otapala ulazi u stanicu što za posljedicu ima veći prinos ekstrakta (Prasad i sur., 2009.). Glavni nedostatak ove metode je vrlo skupa oprema.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu je pregled istraživanja koje su proveli Kőszegi i sur. (2014.).

3.1. MATERIJALI

3.1.1. UZORCI KOPRIVE

Korišten je korijen koprive koji je nakon skupljanja osušen prirodno na zraku. Nakon sušenja, korijen je usitnjen na veličinu čestica od 1 mm. Veličina čestica je određivana primjenom Retsch AS 200 uredaja., a veličina pora na vibrirajućem situ bila je 0,1, 0,25, 0,315, 0,4, 0,5, 0,63, 0,8 i 1,0 mm. Materijal zadržan na situ izmjeren je analitičkom vagom.

3.1.2. PRIPREMA UZORKA I EKSTRAKCIJA

Nakon sušenja na zraku, uzorak je stavljen u pećnicu na 104ºC nakon čega je izmjerena suha tvar u korijenu koja je iznosila 91,07%.

Potrebna masa uzorka odvagana je u filter papir te postavljena u ekstraktor nakon čega je započela Soxhlet ekstrakcija. Kao otapalo se prvo koristila 96%-tna otopina etanola, a zatim otopina n-heksana. Otapala su se zagrijavala kako bi se postigao refluks. Ekstraktor sa uzorkom se polako puni otapalom do određene razine, kada se

automatski prazni, a otapalo se vraća u tikvicu. Ekstrakcija po Soxhletu provodila se 14-15 sati, s 4 ciklusa u svakome satu.

Pri provođenju ekstrakcije superkritičnim fluidom, kao otapalo se koristi CO_2. Materijal se stavlja u ekstraktor te se kroz njega propušta tekući CO_2 pomoću visokotlačne pumpe. Brzina protoka CO_2 bila je 7 kg/h. Primjenjene su vrijednosti od 300 bara i 40°C u ekstraktoru. Nakon prolaska kroz ekstraktor, superkritični fluid sadrži otopljenu supstancu, prolazi dalje kroz ventil te dolazi u prvi separator u kojem se tlak spušta na 40 bara, a temperatura na 20°C. Ekstrakt ostaje u separatoru 1, a CO_2 prolazi kroz drugi separator i izlazi iz sustava. Uzorci su uzimani svakih 35 min. Nakon svake sekcije mjeren je sadržaj suhe tvari u gramima te zatim preračunat u postotke. Zabilježen je i iskrišteni CO_2. mCO_2 je masa CO_2 korištena unutar jednog mjerenja. Količina ekstrakta opadala je u svakoj sekciji, dok se količina CO_2 povećavala. Korišteno je 1,0034 kg korijena koprive čija je suha tvar iznosila 0,914 kg. Ekstrakt je sakupljen u separatoru 1, a njegova količina je izražena u kg te u postotku u odnosu na početnu suhu tvar.

3.1.3. KEMIKALIJE I STANDARDI

Kemikalije: Folin-Ciocalteau reagens, destilirana voda, 96%-tni etanol (2,5 mg/mL), otopina natrijevog karbonata (29 g/L), otopina n-heksana, metanol, otopina DPPH, superkritični CO_2

Standardi: otopina pirogalola

Uredaji: Campsec M501 spektrofotometar, Retsch AS 200 uređaj, Soxhlet aparatura, analitička vaga, uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO_2.

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteau metodom

Za određivanje je korišten Campsec M501 spektrofotometar na 760 nm, nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Upotrebljena je otopina Folin-Ciocalteau reagensa, kao referentna otopina korišten je pirogalol, a kao slijepa proba destilirana voda. Koncentracija 96%-tnog etanola koji se koristio za ekstrakciju bila je 2.5 mg/mL. Od te otopine uzeto je 0,8 mL i pomiješano sa 4 mL destilirane vode, 0,4 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 14,8 mL Na_2CO_3 (konc. 29 g/L).

3.2.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

0,01 g uzorka iz tri različita ekstrakta otopljen je u 20 mL metanola. Iz svake otopine uzeto je 0,1, 0,2, 0,5, 0,75 i 1,0 mL i to je razrijeđeno sa 2,5 mL otopine DPPH. Prije mjerenja apsorbancija DPPH podešena je 0,7-0,9. Kontrolna otopina bio je metanol. Apsorbancija otopina mjerena je nakon 30 min inkubacije na 517 nm, Camspec M501 spektrofotometrom. Postotak inhibicije izračunat je prema formuli:

$$\%inhibicije = 100 \times \frac{Acontrol\ - Auzorak}{Acontrol}$$

gdje je: $A_{control}$ = apsorbancija otopine DPPH

A_{uzorak} = apsorbancija uzorka

Vrijednost inhibicije različitih uzoraka uspoređena je na 30%, što je koncentracija pri 30%-tnoj inhibiciji.

4. REZULTATI

Prikazani su rezultati za veličinu čestica usitnjenog korijena koprive, Soxhlet ekstrakcije etanolom i n-heksanom te superkritičnim CO_2 u tablicama (3-6).

Tablica 3. Podaci o situ i o osušenom korijenu koprive tijekom prosijavanja

Promjer mrežastog sita (mm)	Masa sita (g)	Masa sita + masa korijena koprive (g)	Masa korijena koprive (g)	Ostatak (%)
0	362,9	373,4	10,5	10,50
0,1	248,9	263,3	14,4	14,40
0,25	279,5	287,6	8,1	8,10
0,315	295,9	308	12,1	12,10
0,4	366,4	382,9	16,5	16,50
0,5	306,5	326,9	20,4	20,40
0,63	381,9	398,1	16,2	16,20
0,8	399,6	403,8	4,2	4,20
1	409,6	410	0,4	0,40

Tablica 4. Podaci Soxhlet ekstrakcije osušenog korijena koprive 96%-tnim etanolom

Masa osušenog korijena koprive (g)	Udio suhe tvari u osušenom korijenu DMC (g)	Udio suhe tvari ekstrakta DME (g)	(DME/DMC)*100 Prinos (%)	(DME/DMC)*100 Prosječan prinos (%)
19,81	18,16	2,53	13,90	14,14
20,13	18,46	2,65	14,38	

Tablica 5. Podaci Soxhlet ekstrakcije osušenog korijena koprive n-hexanom

Masa osušenog korijena koprive (g)	**Udio suhe tvari u osušenom korijenu DMC (g)**	**Udio suhe tvari ekstrakta DME (g)**	**(DME/DMC)*100 Prinos (%)**	**(DME/DMC)*100 Prosječan prinos (%)**
22,4170	20,44	0,149	0,728	0,768
20,6072	18,77	0,152	0,808	

Tablica 6. Koraci ekstrakcije superkritičnim CO_2

Mjerenja	**Vremenski intervali (min) mCO_2 (kg)**	**mCO_2 (kg)**	**Udio suhe tvari u ekstraktu**			**Iskorišten CO_2 (kg CO_2/kg suhe tvari)**
			kg	**%**	**Σ%**	
1.	26	3,028	$1,93*10^{-3}$	0,211	**0,211**	**3,313**
2.	26	3,004	$1,43*10^{-3}$	0,156	**0,367**	**6,600**
3.	34	3,962	$0,52*10^{-3}$	0,057	**0,424**	**10,934**
4.	34	4,015	$0,32*10^{-3}$	0,035	**0,459**	**15,327**
5.	43	4,990	$0,47*10^{-3}$	0,051	**0,510**	**20,787**
6.	43	5,016	$0,25*10^{-3}$	0,027	**0,537**	**26,265**
Σ	206	24,015	$4,92*10^{-3}$	0,537		31,663
Ukupna količina unesenog osušenog korijena koprive: 0,914 kg						

5. RASPRAVA

U tablici 3 prikazane su veličine sita na kojima je vršeno prosijavanje osušenog i usitnjenog korijena koprive, masa sita bez uzorka te s uzorkom, masa osušenog korijena te postotak usitnjenog korijena koprive koji se zadržao na svakom pojedinom situ. Na sitima promjera 0,4, 0,5, 0,63 zadržao se najveći dio čestica usitnjenog korijena, a na sitima promjera 0,8 i 1 najmanji. Rezultati ukazuju na nehomogenost usitnjenog osušenog korijena koprive. Također, prema navedenom je vidljivo da je najveći dio usitnjenog uzorka imao manju veličinu čestica što je kod ekstrakcije omogućilo da zbog veće aktivne površine ekstrakcija bude učinkovitija.

U tablicama 4 i 5 prikazani su rezultati Soxhlet ekstrakcije 96%-tnim etanolom i n-heksanom, a iz rezultata je vidljivo da je Shoxhlet ekstrakcijom uz primjenu 96%-tnim etanolom prinos iznosio 14,14%, dok je primjenom n-heksna prinos iznosio 0,768%. Prema navedenim rezultatima etanol se pokazao kao bolje otapalo u odnosu na n-heksan za ekstrakciju ukupnog polifenolnog sastava primjenom metode ekstrakcije po Soxhletu. Prema sastavu pojedinačnih fenola koprive i polarnosti bilo je za očekivati da će se primjenom etanola dobiti bolje iskorištenje.

U tablici 6 prikazani su rezultati provedbe ekstrakcije superkritičnim CO_2 koja je prikazana kroz 6 mjerenja. Ukupna masa korijena koprive bila je 1,0034 kg, a od toga je suha tvar iznosila 0,914 kg. Ekstrakt je sakupljan u separatoru 1 te je njegova količina izražavana u kg i postotku u odnosu na početnu masu. Ekstrakcija je provodena pri tlaku od 300 bara, a uzorci su uzimani svakih 35 minuta. Nakon svakog izuzimanja, mjeren je udio suhe tvari. Zabilježen je i iskorišteni CO_2 čija je najmanja količina iznosila 3,028 u prvom mjerenju, a najveća u zadnjem u kojem je bila 24,015 kg. Količina ekstrakta smanjivala se nakon svakog uzimanja uzorka dok se za to vrijeme količina korištenog CO_2 povećavala. Usporedbom rezultata vidljivo je da je prinos fenola uz ekstrakciju primjenom superkritičnog CO_2 podjednak kao i prinos fenola primjenom Soxlet ekstrakcije n-heksanom. Stoga se Soxhlet ekstrakcija primjenom 96%-tnog etanola pokazala učinkovitijom u usporedbi s ostalim.

6. ZAKLJUČAK

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

1. Distribucija čestica u uzorcima korijena koprive pokazuje kako usitnjeni korijen koprive nije homogeni materijal.
2. Od svih uspoređivanih metoda ekstrakcije, Soxhlet ekstrakcija s 96%-tnim etanolom dala je najveće prinose fenolnih spojeva.
3. Primjenom Soxhlet ekstrakcije n-heksanom i ekstrakcije superkritičnim CO2 dobiveni su podjednaki prinosi fenolnih spojeva.
4. Pri provođenju ekstrakcije superkritičnim CO_2, nakon svakog mjerenja, količina ekstrakta se smanjuje dok se masa korštenog CO_2 povećava.

7. LITERATURA

- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkhu, K., Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*., 155-160.
- Berend, S., Grabarić, Z., (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection method, *Arh Hig Rada Toksikol*. 59:205-12.
- Bomme, L., Bardi, G., Pandis, N., Fenge, C., Kronborg, O., Heim, S. (1998) Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: karyotypic comparisons of synchronous tumors. *Cancer Genet Cytogenet*.106:66–71.
- Bredemann, G. (1959). Die groûe Brennessel Urtica dioica L. Forschung über ihren Anbau zur Fasergewinnung. Akademieverlag, Berlin, Germany
- Bucar, F., Britzmann, B., Streit, B., Weigend, M.(2006) LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts aerial parts of Urtica species. *Planta Med*;72:152.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313-7352
- Ellnain-Wojtaszek, M., Bylka, W., Kowalewski, Z.(1986) Flavanoids compounds in Urtica dioica L. *Herba Pol*. 32:131-7.
- Favretto, L. (2004) Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications, Milestone, Bergamo
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* 67, 2589-2595.
- Fiedor, J., Burda, K., (2014) Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease, *Nutrients*. 6: 466–488.
- Goncalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., Camara, J. S. (2013) An attractive, sensitive and high – throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC – PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal* 106, 129 – 138.
- Greenberg, M.I. (2003). Occupational, industrial, and environmental toxicology. *Health Sci*. p.180.

- Grlić, Lj. (1990.) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2.izd., August Cesarec, Zagreb
- 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 394. hyperplasia. *Planta Med*. 60:30-33.
- Hudec, M.R., Jackson, M.P.A., (2007), Terra infirma: Understanding salt tectonics: *Earth-Sci. Rev.*, v. 82, p. 1–28,
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Kilár, F. (2011). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Res. Int*. 44, 2851-2860.
- Kazazić, P.S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. 55, 279-290.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2014) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375
- Kőszegi, K., Vatai, G., Békássy-Molnár, E., (2014) Comparison the Soxhlet and Supercritical Fluid Extraction of Nettle Root (Urtica dioica L.); *Period. Polytech. Chem.* 59, pp.168-173
- Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem. Ind*. 60, 11–19.
- Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., Kizek, R. (2010) Effects of various doses of selenite on stinging nettle (Urtica dioica L .) *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 7:3804–3815.
- Lelas, V. (2008) Procesi pripreme hrane, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, str. 16-18.
- Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea, *J Chromatogr A*. 1217:2383-9
- Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Mason, T.J., Luche, J.L. (1996): Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In: Chemistry under extreme or non classical conditions, van Eldk, R., Hubbard, C.D., (ed.), John Wiley and sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, New York., pp. 317-380.

- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B. (2002) Phytosterols, Phytostanols, and Their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-Promoting Uses. *Prog Lipid Res*. 41:457-500.
- Oliver, F., Amon, E.U., Breathnach, A., Francis, D.M., Sarathchandra, P., Kobza Black, A., Greaves, M.W. (1991). Contact urticaria due to the common stinging nettle (Urtica dioica)-histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clin. Exp. Dermatol*. 16:1-7.
- Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle*. Sci. World J*. 1-12
- Povey, M.J.W., Mason, T.J. (1998): Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic and Professional, London.
- Prasad, N. K., Yang, E., Yi, C., Zhao, M. i Jiang, Y. (2009) Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 10, 155- 159.
- Reverchon, E.; Adami, R.; Caputo, G. (2006) Supercritical assisted atomization: Performance comparison between laboratory and pilot scale. *J. Supercrit. Fluids,* 37, 298-306.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010): Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voca i povrca, *Kem. Ind*. 59, 169–177.
- Riedel, S.L., Bader, J., Brigham, C.J., Budde, C.F., Yusof, Z.A., Rha, C., Sinskey, A.J. (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by Ralstonia eutropha in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 109:74–83.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 66: 401–436.
- Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995): Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In: New methods of Food Preservation. Gould, G.W. (ed.), Blackie Academic and Professional: London.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) Stress Physiology. U: Plant Physiology (Bressan, R.A., Lacy R.B.,ured.), Sinauer Associates, Sunderland, str. 591-614.

- Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M. A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: Extracting bioactive compounds from food products (Meireles, M. A.A., ured.), Crc press, Taylor& Francis group, New york, str. 137-218.
- Taylor, K., (2009) "Biological flora of the British Isles: Urtica dioica L,"*J. Ecol.*, vol. 97, no. 6, pp. 1436–1458.
- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds Theory and Practice (Chemat, F., Cravotto G., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 15-52.
- Vetter, A., Wieser P., Wurl, G. (1996). Untersuchungen zum Anbau der Groûen Brennessel (Urtica dioica L.) und deren Eignung als VerstaÈrkungsfaser für Kunststoffe. Final report 2/ 1996 of the project Plants for Energy and Industry. No. 11.10.430. Thü ringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Dornburg, Germany.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends. Food. Sci. Tech*. 17, 300-312.
- Zougagh, M., García de Torres, A., Vereda Alonso, E., Cano Pavón, J.M. (2004) Automatic on line preconcentration and determination of lead in water by ICP-AES using a TS-microcolumn. *Talanta*. 27;62:503-10.