

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

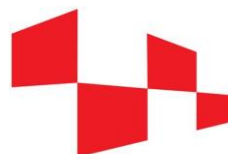
Zagreb, rujan 2020.

Nikolina Pavković

1282/USH

**BIOAKTIVNI POTENCIJAL
SAMONIKLE KOPRIVE (*Urtica
dioica* L.)**

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



HrZZ
Hrvatska zaklada
za znanost

Ovaj rad izraden je u okviru projekta “Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma” (PlantBioPower, IP-01-2018-4924) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Zahvaljujem se dragoj mentorici doc.dr.sc. Maji Repajić na stručnim savjetima, motivirajućoj radnoj atmosferi i srdačnosti. Također, hvala na dobronamjernim kritikama koje su me navodile u pisanju ovoga rada.

Isto tako, hvala Valentini Kruk, mag.ing.tech.aliment. na nesebičnoj pomoći i strpljenju tokom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Puno hvala Filipu, prijateljima i obitelji na bezuvjetnoj podršci te na lijepim trenucima koji su olakšali ovo razdoblje obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

BIOAKTIVNI POTENCIJAL SAMONIKLE KOPRIVE (*Urtica dioica* L.)

Nikolina Pavković, 1282/USH

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj lokacije i klimatskih uvjeta na udio bioaktivnih spojeva u listu i stabljici samonikle koprive ubrane s 14 lokacija u RH s područja Ozlja i okolice, Zagreba, Žumberka, Ogulina, Like i Istre. Liofilizirani uzorci ekstrahirani su ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlakom (ASE) pri prethodno definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije: a) za uzorke lista - temperatura 110 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 10 minuta i 4 ciklusa ekstrakcije, i b) za uzorke stabljike - temperatura 80 °C te statičko vrijeme ekstrakcije 5 minuta i 4 ciklusa ekstrakcije. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski je određen udio ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida. Prema dobivenim rezultatima, list koprive sadržavao je znatno više udjele analiziranih spojeva u odnosu na stabljiku. Najviši udio ukupnih fenola u listu određen je u uzorku s područja Ozlja i okolice (1162,95±36,33 mg GAE 100 g⁻¹), dok je najviši udio ukupnih fenola u stabljici određen u uzorku s područja Istre (245,39±3,33 mg GAE 100 g⁻¹). Najviši udjeli ukupnih klorofila u listu i stabljici određeni su u uzorcima s područja Istre (list 1110,24±11,15 mg 100 g⁻¹; stabljika 72,34±2,39 mg 100 g⁻¹), kao i najviši udio ukupnih karotenoida (list 148,59±5,53 mg 100 g⁻¹; stabljika 17,50±0,59 mg 100 g⁻¹).

Ključne riječi: *kopriva, ASE, bioaktivni spojevi, lokacija, klimatski uvjeti*

Rad sadrži: 44 stranica, 21 slika, 4 tablica, 64 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentorica: *doc.dr.sc. Maja Repajić*

Pomoć pri izradi: *Valentina Kruk, mag.ing.tech.aliment.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Doc.dr.sc. Maja Repajić
3. Doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić
4. Izv.prof.dr.sc. Sandra Balbino (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

BIOACTIVE POTENTIAL OF WILD STINGING NETTLE (*Urtica dioica* L.)

Nikolina Pavković, 1282/USH

Abstract: In this work, the influence of location and climatic conditions on the content of bioactive compounds in the leaf and stem of wild nettle harvested from 14 locations in the Republic of Croatia from Ozalj area, Zagreb, Žumberak, Ogulin, Lika and Istria was examined. Lyophilized samples were extracted using accelerated solvent extraction (ASE) under the previously optimized extraction conditions: a) for leaf samples - temperature 110 ° C, static extraction time 10 minutes and 4 extraction cycles, and b) for stem samples - temperature 80 ° C, static extraction time 5 minutes and 4 extraction cycles. In obtained extracts, content of total phenols, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophylls and total carotenoids was determined spectrophotometrically. According to the obtained results, nettle leaf contained considerably higher content of analyzed compounds when compared to the stem. The highest content of total phenols in the leaf was determined in the sample from the Ozalj area (1162.95±36.33 mg GAE 100 g⁻¹), while the highest total phenols in the stem were determined in the sample from Istria (245.39±3.33 mg GAE 100 g⁻¹). The highest total chlorophylls in leaf and stem were determined in samples from Istria (leaf 1110.24±11.15 mg 100 g⁻¹; stem 72.34±2.39 mg 100 g⁻¹), as well as the highest content of total carotenoids (leaf 148,59±5.53 mg 100 g⁻¹, stem 17.50±0.59 mg 100 g⁻¹).

Keywords: *stinging nettle, ASE, bioactive compounds, location, climate conditions*

Thesis contains: 44 pages, 21 figures, 4 tables, 64 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Maja Repajić, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Valentina Kruk, M.E.*

Reviewers:

1. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
3. PhD. *Ivona Elez Garofulić*, Assistant professor
4. PhD. *Sandra Albino*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 23rd, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KOPRIVA (<i>Urtica dioica</i> L.).....	2
2.2. FITOKEMIJSKI SASTAV KOPRIVE.....	4
2.2.1. Fenolni spojevi	5
2.2.2. Pigmenti.....	7
2.3. UTJECAJ OKOLIŠNIH UVJETA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA	9
2.4. TEHNIKE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA	10
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)	11
2.5. PRIMJENA EKSTRAKATA KOPRIVE	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL.....	15
3.2. METODE RADA.....	18
3.2.1. Priprema uzorka.....	19
3.2.2. ASE.....	20
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	21
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje pigmentata.....	23
3.2.5. Statistička analiza	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO UKUPNIH FENOLA.....	27
4.2. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO KLOOROFILA	29
4.3. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO UKUPNIH KAROTENOIDA	34
4.4. UTJECAJ KLIMATSKIH UVJETA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA	36
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja, zeljasta i dvodomna biljna vrsta koja pripada obitelji *Urticaceae*. Listovi koprive izvor su klorofila, karotenoida, tanina, terpenoida, masnih kiselina i aminokiselina, sterola, polisaharida, vitamina, minerala i izolektina. Nadzemni dio koprive sadrži siringinsku kiselinu, kvercetin, kempferol, mircetin, klorofile i karotenoide te antocijane. Ekstrakti koprive, najčešće lista i korijena, bogati su fenolima kao što su klorogenska kiselina, rutin, kvercetin i izokvercetin te im se zbog njenog bogatog fitokemijskog sastava pripisuju mnogobrojna ljekovita svojstva.

Od davnina se kopriva navodi kao lijek za unutarnja i vanjska krvarenja, dijareju, artritis, reumu i mišićnu paralizu. U novijim istraživanjima navodi se primjena ekstrakata lista koprive u sprječavanju zgrušavanja krvi, smanjenju kolesterola u krvi te u poboljšanju funkcije jetre. Također, vodeni ekstrakti koprive primjenjuju se u liječenju raka prostate, prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti te kod alergijskog rinitisa i drugih upalnih procesa. Svoju primjenu je našla i u funkcionalnim prehrambenim proizvodima, agrikulturi, akvakulturi te raznim kozmetičkim proizvodima.

Kopriva raste diljem svijeta u umjerenoj i toploj klimi. Odgovaraju joj sjenovita i vlažna područja pa se često raste u šumama, uz potoke i cestu. Istraživanja su pokazala da različiti dijelovi koprive, ovisno o njihovoj funkciji, imaju različite koncentracije bioaktivnih tvari, a na njihov sastav i koncentracije utječu lokacija, vrijeme branja, starost biljke, fertilizacija dušikom i okolišni uvjeti. Lokacije branja mogu se razlikovati u vrsti tla, nadmorskoj visini, izloženosti suncu i padalinama. Neke elementarne nepogode kao što je, primjerice, suša značajno utječu na promjenu koncentraciju pigmenata i flavonoida.

U ovom radu je ispitan je utjecaj lokacije i okolišnih uvjeta na koncentracije bioaktivnih tvari u listu i stabljici samonikle koprive (*Urtica dioica* L.). U uzorcima lista i stabljike koprive sakupljenim s 14 lokacija diljem Republike Hrvatske različitih klimatskih uvjeta spektrofotometrijski su određene koncentracije ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.)

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je dvodomna zeljasta biljka koja pripada rodu *Urtica*, obitelji *Urticaceae* te pripada velikoj grupi kritosjemenjača, tj. cvjetnjača. Rod *Urtica* sažima 46 vrsta cvjetnjača, a najistaknutiji predstavnici su obična kopriva (*Urtica dioica* L.) i mala kopriva (*Urtica urens* L.) (Kregiel i sur., 2018). Zbog svoje prilagodljivosti rasprostranjena je u umjerenom, ali dijelom i tropskom pojasu: Europa, Azija, sjeverna Afrika i Amerika (Ernst i sur., 2006; Di Virgilio i sur., 2015). Općenito koprive, pa tako i vrstu *Urtica dioica* L. karakteriziraju srednja veličina, nazubljeni listovi te žarne dlačice. Stabljike su šuplje, do 3 mm debele te variraju od svjetlozelene do smeđe boje. Listovi koprive imaju nazubljene rubove, s gornje strane su tamnozeleni, a s donje su svjetliji s vidljivom venacijom (Slika 1). Vrstu *Urtica dioica* L. je zbog izgleda listova lako zamijeniti s vrstom *Urtica urens* L. koja je ipak nešto manja i tamnijih listova od *U. dioica* L. vrste (Upton, 2013).



Slika 1. Morfološka obilježja koprive, *Urtica dioica* L. (Anonymous 1, 2020)

Ime roda *Urtica* dolazi od latinskog *uro*, goriti ili od *urere*, peći (Grieve, 1931). Stabljike i listovi mogu imati žarne dlačice poznate još i kao trihomi koji su golim okom jedva vidljivi te biljci služe kao zaštita od kukaca (Slika 2). U dodiru s kožom, zaobljeni vrhovi trihoma se otkidaju te ispuštaju oštre iglice koje kada se zabiju u kožu otpuštaju mravlju kiselinu. Osim mravlje kiseline trihomi sadrže i acetilkolin, 5-hidroksitriptamin (serotonin) i histamin. Kada ti toksini dođu do kože uzrokuju svrab i peckanje (Kregiel i sur., 2018). *Urtica dioica* L. može i ne mora imati cvjetove koji su istospolni sa sferičnim peludnim zrcima s puno malih kristala kalcijeva oksalata (Upton, 2013). Kopriva cvjeta od svibnja do rujna i njeni cvjetovi su mali i zeleni. Plod koprive je također malen, suh, ima jedno sjeme i ovalni, duguljasti oblik (Otles i Yalcin, 2012).



Slika 2. Trihomi na stabljici koprive (Nonenmacher, 2011)

Kopriva se zbog brzog rasta, široke pokrivenosti i prilagodljivosti u prirodi smatra korovom. Ipak, zbog bogatog fitokemijskog sastava s ekonomskog i ekološkog aspekta opravdano se uzgaja (Kregiel i sur., 2018). Koristi se u prehrambenoj, tekstilnoj, kozmetičkoj, papirnoj i mnogim drugim industrijama (Upton, 2013; Di Virgilio i sur., 2015). Ljekovita svojstva koprive poznata su stoljećima, a u posljednje vrijeme mnoga su i dokazana: protuupalno, antidijabetsko, hipoglikemijsko, antioksidacijsko, antimikrobno, antiulcerozno i analgetsko (Radman i sur.,

2015). Tako je, recimo, u turskoj narodnoj medicini poznata kao lijek za želučane probleme. Također, koristila se i za reumatske bolove, prehladu, kašalj i kod smanjenje funkcije jetre (Gülçin i sur., 2004). Drugi autori navode kako se koristila za giht, gubitak kose i blaga krvarenja (Ullah i sur., 2017).

2.2. FITOKEMIJSKI SASTAV KOPRIVE

Širok spektar ljekovitih svojstava je posljedica bogatog kemijskoga sastava koprive. Ona je izvor minerala, vitamina, proteina te bioaktivnih komponenata kao što su karotenoidi i polifenoli (Biesiada i sur., 2009; Radman i sur., 2015), no na fitokemijski sastav utječu različiti čimbenici kao što su vrsta, genotip, klima, tlo, stadij vegetacije, vrijeme žetve, način skladištenja i procesiranja (Kregiel i sur., 2018).

Đurović i sur. (2017) potvrdili su širok spektar kemijskih spojeva u listovima koprive *Urtica dioica* L.: polifenole, masne kiseline, karotenoide i minerale. Listovi koprive sadrže i klorofil, vitamin C te vitamin K, pantotensku kiselinu, grupu B vitamina, tanine, eterična ulja, proteine i minerale (Fe, Cu, Mn and Ni), a korijen i stabljika flavonoide (Chaturvedi, 2001; Akbay i sur., 2003). Osim navedenih spojeva Kregiel i sur. (2018) navode da listovi koprive sadrže terpenoide, esencijalne aminokiseline, ugljikohidrate, sterole, polisaharide i izolektine. Ekstrakti nadzemnih dijelova koprive sadrže više polifenola, dok korijen sadrži oleinsku kiselinu, sterole i sterol glikozide (Kregiel i sur., 2018). Ullah i sur. (2013) su osim već poznatih tvari β -amirina, β -sitosterola, stigmasterola i oleinske kiseline po prvi puta izolirali derivat benzena, diokanol iz cijele biljke.

U istraživanju u kojem se analizirao korijen koprive potvrđen je sastav sljedećih masnih kiselina: linoleinska, palmitinska, oleinska, palmitoleinska, stearinska, gadoleinska i eruka kiselina (Guil-Guerrero i sur., 2003).

2.2.1. Fenolni spojevi

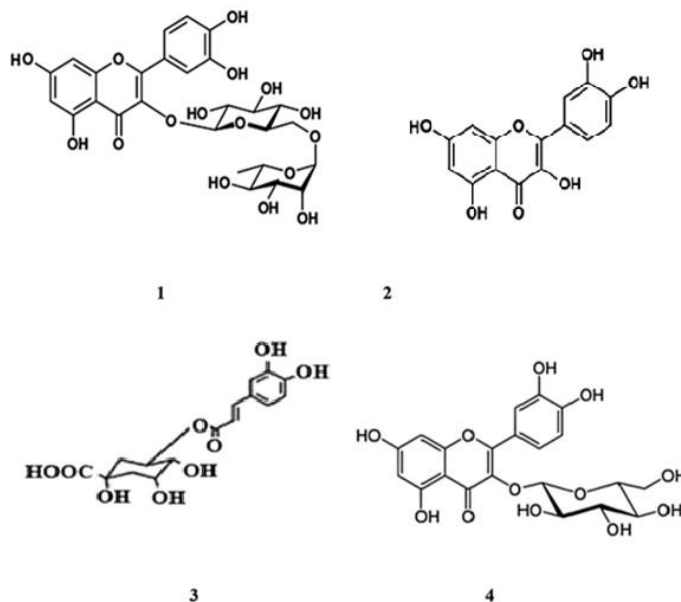
Fenolni spojevi ili polifenoli su jedna od najvećih grupa fitokemikalija i sastavni su dio brojnih biljnih vrsta, a za mnoge od fenolnih spojeva dokazano je da djeluju kao snažni antioksidansi koji potpomažu funkciji antioksidativnih vitamina i enzima u obrani protiv oksidativnog stresa koji je uzrokovan reaktivnim kisikovim vrstama (ROS). Trenutno je poznato više od 8000 fenolnih spojeva od kojih je preko 4000 pripada skupini flavonoidi. Postoje razni načini kategoriziranja polifenola zbog njihove raznolikosti i rasprostranjenosti. Klasificiraju se prema izvoru porijekla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Većina polifenola u biljkama postoje kao glikozidi s različitim jedinicama šećera i aciliranim šećerima na različitim pozicijama na polifenolnom kosturu. Podjela na temelju kemijske strukture aglikona je sljedeća: fenolne kiseline, flavonoidi, polifenolni amidi i ostali polifenoli. Fenolne kiseline su neflavonoidni polifenoli koji se dijele na dva glavna tipa: skupine hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina (Tsao, 2010). Predstavnici hidroksibenzojevih kiselina su: vanilinska, siriginska, galna, protokatehinska, *m*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksibenzojeva i gentisinska kiselina (Liu, 2004). U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se: *p*-kumarinska, sinapinska, ferulinska i kafeinska kiselina (Adom i Liu, 2002). Flavonoidi se dijele na podskupine: antocijani, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni i flavonoli (Tsao, 2010).

Otles i Yalcin (2012) utvrdili su prisustvo *p*-kumarinske, izoramnetina i kvercetina u listovima koprive te siringinske kiseline, miricetina, kvercetina, rutina i kempferola u stabljici koprive (Slika 3). Proestos i sur. (2006) analizirali su metanolne ekstrakte lista koprive te su identificirali siringinsku, galnu i ferulinsku kiselinu. Također, identificirali su i (-)- epikatehin i (+)-katehin u listovima koprive.

Pinelli i sur. (2008) su u svježim listovima i stabljikama koprive identificirali hidroksicimetne kiseline (klorogenska kiselina i 2-*O*-kafeomalična kiselina) i flavonoide (rutin, kvercetin, *p*-kumaroil-glukozid, kamferol 3-*O*-glukozid, kamferol 3-*O*-rutinozid, izoramnetin 3-*O*-rutinozid).

Carvalho i sur. (2017) istraživali su kemijski sastav i antioksidativnu aktivnost više vrsta koprive (*U. dioica* L., *U. membranaceae* L. i *U. urens* L.). *U. dioica* L. je pokazala najveće prisustvo fenolnih spojeva (7,9 g 100 g⁻¹) kao i najviše vrijednosti antioksidativnog kapaciteta. U fenolnom sastavu *U. dioica* L. najviše su bile zastupljene hidroksicimetne kiseline (2,54 g 100 g⁻¹). U

hidroalkoholnim ekstraktima nadzemnih dijelova (stabljika i listovi) kopriva *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L. i *Urtica membranacea* L. identificirano je 15 hidroksicimetnih kiselina i 16 flavonoida, flavon-glikozida i flavonol-glikozida (Carvalho i sur., 2017).

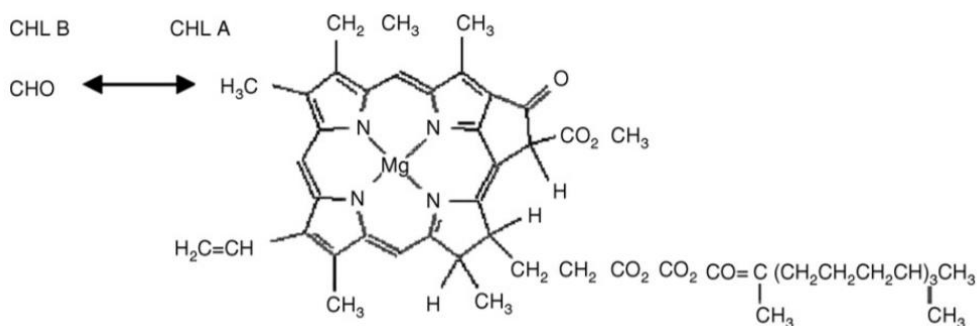


Slika 3. Fenolni spojevi u ekstraktima lista koprive: **1** rutin; **2** kvercetin; **3** 5-O-kafeoilkina kiselina; **4** izokvercetin (Jan i sur., 2016)

Orčić i sur. (2013) kvantificirali su različite fenolne spojeve u metanolnim ekstraktima *U. dioica* L. Analizirali su posebno listove, stabljiku, korijen i cvjetove kopriva koje su ubrane s različitih lokacija u Srbiji. Također su zaključili da polifenolni sastav ovisi o dijelu biljke te lokaciji s koje je biljka ubrana. Rezultati su pokazali da cvjetni dijelovi koprive sadrže najviše fenola i to najviše klorogenske kiseline, potom rutina i izokvercetina.

2.2.2. Pigmenti

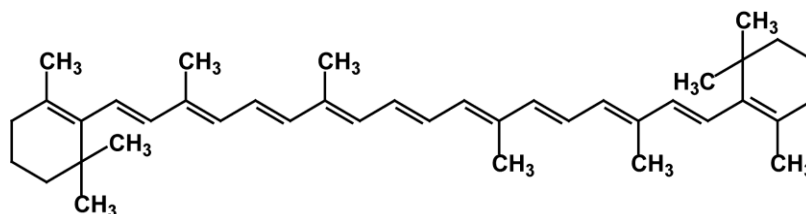
Klorofili, glavni fotoreceptori u fotosintezi, pigmenti su odgovorni za karakterističnu zelenu boju voća i povrća. Klorofil *a* i klorofil *b* (Slika 4) uglavnom se nalaze u ekstraktima zelenih biljaka kao glavni pigmenti u omjeru 3:1. Klorofil *a* ima metilnu skupinu na C-3 ugljiku, a klorofil *b* na istom ugljikovu atomu ima aldehidnu skupinu. Ekstrakti klorofila koriste se kao bojila u prehrambenoj industriji, sapunima, smolama, voskovima, kozmetici, losionima, parfemima, vodicama za ispiranje usta i bojila za kožu (Hojnik i sur., 2007). Prema nekim istraživanjima klorofil potencijalno ima antimutagena i antikancerogena svojstva i može pomoći u zaštiti od toksina te smanjuje nuspojave nekih lijekova (Guil-Guerrero i sur., 2003).



Slika 4. Kemijska struktura klorofila *a* i *b* (Hojnik i sur., 2007)

Osim njih, u ekstraktima zelenih biljaka mogu se pronaći i karotenoidi. Karotenoidi su također prirodni pigmenti koji se često pojavljuju u prirodi. Do sada ih je okarakterizirano preko 600 vrsta, a β -karoten je najistaknutiji predstavnik (Slika 5). Karotenoidi su lipofilne molekule koje se akumuliraju u lipofilnim dijelovima stanice kao što su lipoproteini i membrane. Unikatna struktura karotenoida određuje njihovu biološku funkciju. Većina karotenoida se sastoji od kostura kojeg čini 40 C-atoma i sistema dvostrukih konjugiranih veza. Prema strukturi dijele se na: a) karotene – sadrže samo atome ugljika i vodika, i b) ksantofile – sadrže barem jedan atom kisika (Stahl i Sies, 2003). Ljudi ne mogu sintetizirati karotenoide u svom organizmu već ih moraju unositi putem hrane ili suplemenata. Najčešće se nalaze u voću, povrću, biljkama, algama i fotosintetskim

bakterijama. Karotenoidi pružaju mnoge benefite za ljudsko zdravlje. Primjerice, β -karoten je prekursor vitamina A, a lutein i zeaksantin apsorbiraju svjetlost pri određenim valnim duljinama i time štite vid (Eggersdorfer i Wyss, 2018).



Slika 5. Kemijska struktura β -karotena (Anonymous 2, 2020)

Osim u medicinske i kulinarske svrhe, kopriva se koristi i za ekstrakciju klorofila koji se primjenjuje kao komercijalno bojilo E140 u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Guill-Guerrero i sur. (2003) u svome istraživanju identificirali su 9 vrsta karotenoida u listovima koprive. Lutein, izomeri luteina, β -karoten i izomeri β -karotena bili su prisutni u listovima kopriva svih stadija zrelosti, a neoksantin, violaksantin i likopen su se isto pojavljivali, ali u specifičnim fazama zrelosti. Đurović i sur. (2017) su u listovima koprive (*Urtica dioica* L.) odredili koncentraciju klorofila od 304,63 mg 100 g⁻¹ te karotenoida od 69,07 mg 100 g⁻¹. Koncentracija klorofila u listovima se povećava kako listovi rastu, a smanjuje se tokom starenja listova (Kregiel i sur., 2018). Ovisno o klimatskim i okolišnim uvjetima listovi koprive roda *Urtica* u prosjeku sadrže oko 4,8 mg g⁻¹ suhe tvari klorofila. Rezultati istraživanja Hojnik i sur. (2007) su dokazali da je u listovima koprive više klorofila nego u stabljici. Također u listovima je pronađeno više klorofila *a* nego klorofila *b*. Pinelli i sur. (2008) su u svježim listovima i stabljikama između ostaloga identificirali i antocijane (peonidin 3-*O*-rutinozid, rozinidin 3-*O*-rutinozid, peonidin 3-*O*-(6"-*O*-*p*-kumaroilglukozid). Glikozidi antocijana pronađeni su samo u ekstraktima stabljika, a dobiveni su ekstrakcijom pomoću hidroalkoholne otopine mravlje kiseline pri pH=2 kako bi se izbjegla degradacija antocijana.

2.3. UTJECAJ OKOLIŠNIH UVJETA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Koprive rastu na raznim tlima, od umjerene do toplije klime. Preferiraju vlažnu zemlju na otvorenim, ali djelomično zasjenjenim lokacijama. Često se mogu naći u šumama, uz rijeke, potoke i uz cestu. *Urtica dioica* L. preferira rast na tlu bogatom dušikom i često se može pronaći na zemljištima koja sadrže puno anorganskog dušika i metala (Kregiel i sur., 2018). Koprive ubrane sa sjenovitih područja sadrže više klorofila i karotenoida. Također, koncentracija klorofila i karotenoida je različita u biljkama različite starosti (Kukrić i sur., 2012).

Temperatura, svjetlost i nutrijenti u zemlji su bitni okolišni uvjeti koji utječu na proizvodnju sekundarnih metabolita u biljci. Rahnavard i sur., (2012) uočili su da upravo ti faktori utječu na koncentraciju hipericina, ukupnih fenola, flavonoida i pigmenata u *H.perforatum*. Uzorke su uzimali s 3 nadmorske visine i 5 različitih lokacija te su zaključili da je najviša koncentracija hipericina i ukupnih fenola na srednjoj nadmorskoj visini (700-1200 m) Kelardasht regije, a najviša koncentracija klorofila *a* i *b* na srednjoj nadmorskoj visini Javaherdeh regije.

Otles i Yalcin (2012) analizirali su koprivu (*Urtica dioica* L.) sakupljenu s obalnih područja Turske: Sredozemnog, Egejskog, Crnog mora i Mramorne regije. Višu koncentraciju ukupnih fenola imala je kopriva ubrana s područja umjerene do vruće klime, puno sunca i nutritivno bogatog tla (Crno more i Mramorna regija). Stabljike koprive ubrane na obali Crnog i Sredozemnog mora imale su višu koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na stabljike ubrane s ostalih lokacija. Također, listovi kopriva ubranih s područja Egejskog mora i Marmare imali su višu koncentraciju ukupnih fenola od listova ubranih s ostalih lokacija.

Koczka i sur. (2015) su zaključili da listovi koprive ubrani u ekološki zaštićenim područjima imaju više fenolnih spojeva nego listovi ubrani uz cestu ili iz jaraka, tj. s nezaštićenih lokacija.

Stadij branja kao i starost koprive mogu utjecati na sadržaj njenih bioaktivnih spojeva u biljkama. Slično kao kod koprive i kod drugih biljnih vrsta također se mogu primjeniti zakonitosti različitih utjecaja na akumulaciju bioaktivnih molekula tijekom vegetacije. Škevin i sur. (2003) su istraživali utjecaj sorte i vremena branja maslina na gorčinu i koncentraciju fenolnih spojeva u maslinovom ulju te su došli do zaključka da vremenski uvjeti, odnosno vrijeme branja maslina značajno utječu na zrelost, a potom i sadržaj fenola. Berezina i sur. (2017) su istraživali utjecaj starosti i stadija zrelosti američke borovnice (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) na koncentraciju bioaktivnih spojeva

(fenolni spojevi, askorbinska kiselina i fotosintetski pigmenti). Zaključili da biljke reproduktivne starosti akumuliraju manje fenolnih spojeva u svome tkivu te da je u listovima tokom cvjetanja najniža koncentracija fenola. Također, primjetili su da je najniža koncentracija pigmenata u listovima tokom rasta ploda te da opada svake godine kako biljka stari. Moguće je da se koncentracije svih bioaktivnih tvari u američkim borovnicama snižavaju s reproduktivnom zrelošću biljke.

Vrlo visoke ili vrlo niske temperature, suša, patogeni i nametnici mogu izazvati stres kod biljaka te uzrokovati promjenu koncentracije bioaktivnih tvari (Rahnavard i sur., 2012; Berezina i sur., 2017). Biljke iz istraživanja Berezina i sur. (2017) u rujnu 2010.-e godine imale su porast koncentracija katehina, antocijanina i udjela flavonoida od ukupnih fenola upravo zbog visokih temperatura i suša koje su biljke pretrpjele tokom prethodnih ljetnih mjeseci.

2.4. TEHNIKE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA

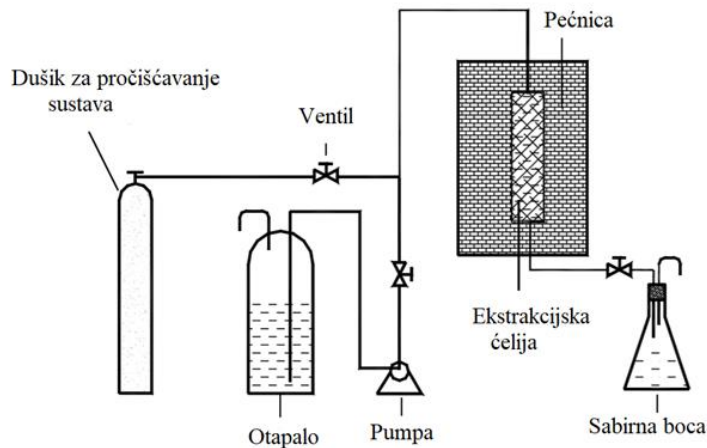
Separacija, identifikacija i karakterizacija bioaktivnih komponenata provodi se u ekstraktima koji se dobivaju iz biljnog materijala primjenom različitih tehnika. Tehnika ekstrakcije odabire se ovisno o uvjetima pri kojima se vrši ekstrakcija i ovisno izvoru bioaktivnih komponenti. Iako se za ekstrakciju ciljane vrste bioaktivnih spojeva mogu primjenjivati razne tehnike, sve imaju zajedničke ciljeve: a) izolacija ciljane bioaktivne komponente iz složenog biljnog uzorka; b) povećanje selektivnosti analitičkih metoda; c) povećanje osjetljivosti biološkog testa koncentriranjem ciljane komponente; d) izdvojenu komponentu pretvoriti u neku drugu vrstu tvari koja je lakša za identifikaciju i separaciju i e) stvoriti ponovljivu metodu koja je neovisna o varijaciji uzoraka (Azmir i sur., 2013). Bioaktivni spojevi iz biljaka mogu se ekstrahirati konvencionalnim i nekonvencionalnim naprednim tehnikama. Postoje razne klasične, tj. konvencionalne tehnike ekstrakcije, a sve se temelje na ekstrakcijskoj moći određenog otapala i primjeni topline i/ili miješanja. Najčešće klasične tehnike ekstrakcije su: Soxhlet ekstrakcija, maceracija i hidrodestilacija (Azmir i sur., 2013).

Pozitivna strana konvencionalnih tehnika je što su jeftine, dostupne i lako prilagodljive za široki spektar uzoraka. Ipak, imaju dosta nedostataka kao što su: utrošak velikih količina energije, vremena i otapala, koja su nerijetko toksična, te početnog materijala za ekstrakciju. Također,

konvencionalne ekstrakcijske tehnike teško je automatizirati, stvaraju veliku količinu otpada te predstavljaju rizik od degradacije termolabilnih komponenata (Blicharski i Oniszczyk, 2017). Kako bi se izbjegli ti nedostaci počele su se koristiti nekonvencionalne, odnosno napredne ekstrakcijske tehnike kao što su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *ultrasound-assisted extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta enzimima (eng. *enzyme-assisted extraction*, EAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (eng. *pulsed electric field extraction*, PEF), ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. *supercritical fluid extraction*, SFE) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE ili *pressurized liquid extraction*, PLE). Neke od tih metoda se smatraju „zelenim“ tehnikama ekstrakcije jer upotrebljavaju otapala sigurna za okoliš kao što su etanol, voda, etil acetat, etil laktat i *D*-limonen (Azmir i sur., 2013; Alvarez-Rivera i sur., 2019).

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

ASE je inovativna zelena tehnika koja se odvija pri povišenim temperaturama od 50 do 200 °C i tlakovima u rasponu 10 do 15 MPa (Wang i Weller, 2006). Ova tehnika temelji se na principu da se primjenom visokoga tlaka tekuće otapalo zadržava ispod svoje točke ključanja (Azmir i sur., 2013). Uporabom ASE tehnike postiže se brža ekstrakcija uslijed interakcije tekućeg otapala i molekula matriksa te povišene temperature i tlaka za učinkovitu ekstrakciju ciljanih spojeva. Osiguravajući temperaturu iznad temperature ključanja primjenjenog otapala uz povišeni tlak postiže se bolja topljivost i brži transfer molekula između matriksa i otapala. Osim bolje topljivosti analita i bržeg prijenosa mase, povišena temperatura omogućuje i smanjenje viskoznosti te površinske napetosti otapala čime se ubrzava ekstrakcija (Ameer i sur., 2017; Alvarez-Rivera i sur., 2019). Za ekstrakciju ASE tehnikom potrebno je uzorak staviti u ekstrakcijsku ćeliju koja se pod tlakom napuni otapalom (Slika 6). Proces ekstrakcije započinje kada se postignu zadana temperatura i tlak. Prilikom ekstrakcije, uz temperaturu, moguće je varirati statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije, čime se omogućuje višestruko punjenje ekstrakcijske ćelije svježim otapalom, a time postiže veća učinkovitost ekstrakcije. Za pročišćavanje zaostalog otapala u ekstrakcijskoj ćeliji može se koristiti inertni plin dušik (Ameer i sur., 2017).



Slika 6. Shematski prikaz sustava ASE sustava (Wang i Weller, 2006)

Prednosti primjene ASE tehnike su da zahtjeva manju količinu otapala od nekih konvencionalnih tehnika zbog kombinacije visokoga tlaka i temperature što ubrzava ekstrakciju. Osim brže ekstrakcije i manje potrošnje otapala, ASE tehnika je automatizirana što zahtjeva manje radne snage i veća je reproducibilnost metode (Alvarez-Rivera i sur., 2019)

ASE tehnika se do sada primjenjivala za ekstrakciju organskih zagađivača koji su stabilni pri visokim temperaturama iz prirodnog okoliša (Wang i Weller, 2006) i ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz morskih spužvi (Ibáñez i sur., 2012), no u posljednje vrijeme sve je šira primjena ASE za ekstrakciju različitih spojeva u različitim područjima. Primjerice, Rostagno i sur. (2003) su primjenom ASE pod optimalnim uvjetima iz soje ekstrahirali izoflavone, dok su Howard i Pandjaitan (2008) pomoću ASE ekstrahirali flavonoide iz špinata. Ekstrakcija je bila uspješnija kada su koristili binarno otapalo, kombinaciju etanola i vode (70:30) pri 50-150 °C, nego prilikom korištenja vode kao otapala pri 50-130 °C.

2.5. PRIMJENA EKSTRAKATA KOPRIVE

Ekstrakti koprive, pogotovo lista, koriste se diljem svijeta u ljekovite svrhe (Akbay i sur., 2003). Metanolni ekstrakt korijena *Urtica dioica* L. uspješno se koristi kao lijek za benignu hiperplaziju prostate (BHP). Naime, provedena su mnoga istraživanja kako bi se utvrdila poveznica između fitokemijskog sastava i ljekovitog djelovanja koprive (Hirano i sur., 1994). Spojevi kao što su steroidi, terpenoidi, fenilpropanoidi, lignani, kumarini, polisaharidi i lignani (*Urtica dioica* aglutinin) izolirani su iz korijena koprive (Kraus i Spiteller, 1990; Akbay i sur., 2003). Polisaharidi izolirani iz vodenih ekstrakata korijena su u nekim slučajevima stimulirali limfocite T, a u drugim čitav komplement (imunosni sustav) *in vitro*. Imunomodulatorna aktivnost izolektinske smjese na T limfocite i direktna inhibicija proliferacije stanica prouzročena *Urtica dioica* aglutininom pokazuju da te komponente iz korijena koprive zbilja utječu na smanjenje aktivnosti prostate (Wagner i sur., 1994).

Akbay i sur. (2003) navode kako se u Turskoj sjemenke i vodeni ekstrakti nadzemnih dijelova koprive koriste u svrhu liječenja ljudi oboljelih od raka. Isti autori su istraživali *in vitro* imunomodularnu aktivnost glavnih glikozida nadzemnih dijelova koprive. Rezultati su pokazali da postoji mogućnost da ekstrakti nadzemnih dijelova, tj. glikozidi imaju ljekovito svojstvo i pomažu pacijentima oboljelima od raka, ali potrebna su daljnja *in vivo* istraživanja kako bi se ta hipoteza potvrdila.

Daher i sur. (2006) ispitivali su utjecaj vodenih i petrol eter ekstrakata nadzemnih dijelova koprive na lipidni profil krvi. Ekstrakti koprive dodavani su u hranu te su štakori tako hranjeni 30 dana. U konačnici se dokazalo da ekstrakti koprive djeluju i poboljšavaju lipidni profil krvi. Došlo je do znatnog smanjenja ukupnog kolesterola, LDL-a i omjera LDL/HDL.

Istraživan je utjecaj vodenih ekstrakata listova koprive na aktivnost adenozin deaminaze (ADA) u tkivu prostate pacijenata oboljelih od raka prostate. Dokazano je da vodeni ekstrakti lista imaju značajan utjecaj na inhibiciju ADA aktivnosti te su autori zaključili da ti ekstrakti potencijalno imaju povoljan učinak u liječenju raka prostate (Durak i sur., 2004).

β -sitosterol, kojim je *Urtica dioica* bogata, pokazao se kao faktor koji olakšava urinarne simptome kod bolesnika s urinarnim bolestima (Berges i sur., 1995).

Rezultati istraživanja El Haouari i sur. (2006) podržavaju tradicionalnu primjenu ekstrakata lista *Urtica dioica* u liječenju i prevenciji kardiovaskularnih bolesti kao što su tromboza i ateroskleroza.

Ekstrakti listova koprive pokazali su *in vitro* inhibiciju ključnih upalnih procesa koji uzrokuju simptome sezonske alergije. Roschek i sur. (2009) su po prvi put dokazali da postoji mehanizam koji objašnjava ulogu bioaktivnih tvari koprive u smanjenju alergijskog rinitisa i drugih upalnih procesa.

Johnson i sur. (2013) smatraju da lipofilni ekstrakti dijelova koprive (korijen, stabljika, listovi i cvijet) imaju bolji učinak u liječenju od tradicionalnih tinktura (vodeni, metanolni i etanolni ekstrakti) u liječenju upalnih bolesti, posebno artritisa.

Osim u medicinske kopriva se koristi i u prehrambene, farmaceutske, kemijske i druge stvrhe.

Mladi listovi koprive dodaju se salatama i juhama, a mogu se i osušiti te kozumirati u obliku čaja (Shonte i sur., 2020). Međutim, u zadnje vrijeme kopriva se pojavljuje i kao sastojak funkcionalne hrane. Tako se, primjerice, sušeni listovi koprive dodaju u tjesteninu kako bi je obogatili karotenoidima i poboljšala funkcionalna svojstva (Marchetti i sur., 2018). Đurović i sur. (2017) su istraživali utjecaj dodatka listova i ekstrakata lista koprive na kvalitetu kruha te su došli do zaključka da su svi uzorci kruha s dodacima pokazali znatnu antioksidacijsku aktivnost. Ipak, dodatak lista koprive u uzorke je snizio kvalitetu kruha, dok je dodatak ekstrakta lista koprive poboljšao kvalitetu kruha.

De Vico i sur. (2018) navode da kopriva posjeduje biološka svojstva koja su se pokazala korisnima i u akvakulturi kao dodatak prehrani za ribe. Pokazala se kao prirodnija i bolja alternativa pesticidima, dezinfektima i antibioticima koji imaju štetno djelovanje.

Također, ekstrakti koprive su dobro poznati sastojci u kozmetičkim proizvodima kao što su šamponi i losioni za rast kose (Kukrić i sur., 2012; López-Hortas i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Za provođenje eksperimentalnog dijela korišteni su stabljika i list samonikle koprive (*Urtica dioica* L.) koji su sakupljeni nakon cvatnje s više lokacija u Republici Hrvatskoj u listopadu 2019. godine. Nakon ubiranja, svježi uzorci koprive dopremljeni su u laboratorij te su skladišteni pri temperaturi od -18 °C do liofilizacije. Uzorci lista i stabljike sakupljeni su na 14 lokacija u RH koje su podijeljene prema regijama, a popis uzoraka i lokacija nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Popis uzoraka lista i stabljike koprive (*Urtica dioica* L.)

Regija	Lokacija	List	Stabljika
Ozalj i okolica	Sela Žakanjska	L1	S1
	Sopčić vrh	L2	S2
	Žakanje	L3	S3
Zagreb	Gračani	L4	S4
	Vrapče	L5	S5
Žumberak	Koretići	L6	S6
Ogulin	Ogulin	L7	S7
Lika	Čovići 1	L8	S8
	Čovići 2	L9	S9
Istra	Poreč	L10	S10
	Limski zaljev	L11	S11
	Bale	L12	S12
	Vodnjan	L13	S13
	Muntrilj	L14	S14

Obzirom na raznolikost geografskog smještaja i klimatskih uvjeta lokacija uzoraka samonikle koprive, prikupljeni su geografski podaci (nadmorska visina, geografska širina i geografska dužina) te meteorološki podaci (srednja mjesečna temperatura, najniža dnevna temperatura, najviša dnevna temperatura i ukupna mjesečna količina oborina) za klimatske uvjete tijekom rujna i listopada 2019. godine (Tablica 2). Meteorološki podaci prikupljeni su sa sljedećih meteoroloških

postaja (MP) Državnog hidrometeorološkog zavoda: za Sela Žakanjska, Sopčić vrh i Žakanje korišteni su podaci s MP Karlovac, za Gračane MP Zagreb-Maksimir, za Vrapče MP Zagreb-Grič, za Koretiće MP Sošice, za Ogulin MP Ogulin, za Čoviće 1 i 2 MP Ličko Lešće, za Poreč i Limski zaljev MP Poreč, za Bale i Vodnjan MP Pula-aerodrom te za Muntrilj MP Pazin.

Tablica 2. Geografski i meteorološki podaci za lokacije uzoraka samonikle koprive

Lokacija	NV/GŠ/GD	Rujan				Listopad			
		s.m. T (°C)	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	u.o. (mm)	s.m. T (°C)	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	u.o. (mm)
Sela Žakanjska	244 m 45° 36' 27,80" N 15° 20' 38,21" E	16,3	2,9	30,5	101,8	12,7	0,7	26,7	55,6
Sopčić vrh	177 m 45° 34' 14,88" N 15° 20' 24,98" E								
Žakanje	178 m 45° 36' 34,38" N 15° 20' 14,96" E								
Gračani	119 m 45° 51' 31,10" N 15° 58' 19,34" E	17,2	4,6	33,1	150,1	13,2	2,2	25,9	42,3
Vrapče	119 m 45° 49' 8,69" N 15° 52' 49,84" E	18,4	8,5	32,7	131,6	14,8	5,2	24,6	39,5
Koretići	410 m 45° 48' 47,23" N 15° 33' 36,18" E	14,5	1,5	28,2	120,2	13,3	3,5	22,8	59,5
Ogulin	320 m 45° 15' 47,84" N 15° 13' 42,36" E	15,6	2,8	29,3	143,6	13	3	25,9	64,2
Čovići 1	456 m 44° 49' 44,07" N 15° 17' 57,29" E	14	-2	29,6	106,9	10,6	1,2	25,1	31,8
Čovići 2	456 m 44° 49' 50,05" N 15° 17' 57,18" E								

NV=nadmorska visina, GŠ=geografska širina, GV=geografska dužina, s.m. T= srednja mjesečna temperatura, T_{min}=najniža dnevna temperatura, T_{max}=najviša dnevna temperatura, u.o.=ukupna mjesečna količina oborina

Tablica 2. Nastavak

Lokacija	NV/GŠ/GD	Rujan				Listopad			
		s.m. T (°C)	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	u.o. (mm)	s.m. T (°C)	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	u.o. (mm)
Poreč	0,34 m 45° 13' 37,03" N 13° 35' 39,64" E	19,4	7,3	30,9	143,2	15,7	6,3	25,7	38,6
Limski zaljev	17 m 45° 7' 56,45" N 13° 39' 13,78" E								
Bale	129 m 45° 2' 25,93" N 13° 47' 8,88" E	19,8	7,5	33	91,1	15,5	5,8	25,5	42
Vodnjan	141 m 44° 57' 28,79" N 13° 51' 6,10" E								
Muntrilj	342 m 45° 14' 30,84" N 13° 48' 38,44" E	16,4	2,3	31,7	90,5	13,1	2,5	25,2	26,4

NV=nadmorska visina, GŠ=geografska širina, GV=geografska dužina, s.m. T= srednja mjesečna temperatura, T_{min}=najniža dnevna temperatura, T_{max}=najviša dnevna temperatura, u.o.=ukupna mjesečna količina oborina

Aparatura i pribor:

- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Liofilizator, Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific, 250 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumily, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL i volumena 10 mL
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD) i staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete, stakleni lijevci

- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Staklene čaše, volumena 50 mL
- Plastične kivete, volumena 50 mL

Otapala i reagensi:

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)
- Destilirana voda
- 96 %-tni etanol, (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Ekstrakcijsko otapalo (96 %-tni etanol) potrebno je ultrazvučno odzračiti u trajanju od 30 do 45 minuta neposredno prije provedbe ASE ekstrakcije.

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena 20 % -tna otopina natrijeva karbonata

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

- Standard galne kiseline (5 g L⁻¹)

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

3.2. METODE RADA

Bioaktivni spojevi iz prethodno liofiliziranih listova i stabljike koprive ekstrahirani su ASE tehnikom uz primjenu 96%-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala.

3.2.1. Priprema uzorka

Prethodno zamrznuti uzorci lista i stabljike koprive raspoređeni su na plitice te su dodatno zamrznuti pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ neposredno prije liofilizacije. Liofilizacija je provedena pri $-55\text{ }^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ (Slika 7). Nakon liofilizacije, listovi koprive (Slika 8) usitnjeni su u tarioniku, a stabljika u električnom mlincu. Uzorci usitnjenog materijala zapakirani su u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni te pohranjeni pri temperaturi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja ASE.



Slika 7. Liofilizacija uzoraka koprive (vlastita fotografija, 2019)



Slika 8. Liofilizirani listovi i stabljike koprive (vlastita fotografija, 2019)

3.2.2. ASE

ASE tehnikom provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva, klorofila te karotenoida iz liofiliziranih i usitnjenih listova i stabljike koprive *U. dioica* L. U tu svrhu korišten je ekstraktor ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Slika 9).



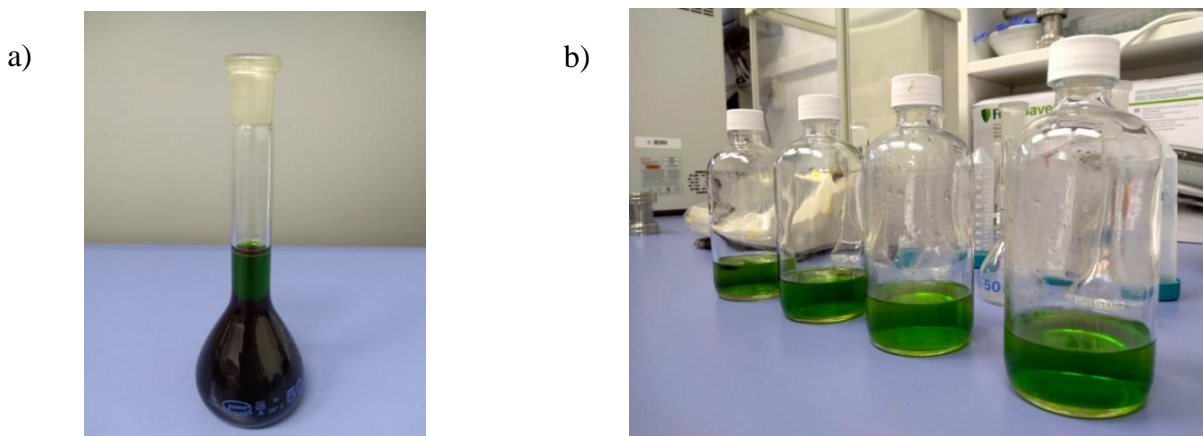
Slika 9. Ekstraktor ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (vlastita fotografija, 2019)

Postupak ekstrakcije:

Na analitičkoj vagi odvaže se približno $1 \pm 0,001$ g uzorka liofiliziranog i usitnjenog lista, odnosno stabljike koprive (u plastičnoj čašici). Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika postavljaju celulozni filteri, po dva u svaku ćeliju. U plastičnu čašicu dodaju se jedna mjerica dijatomejske zemlje ($\sim 2,0$ g) i odvagani uzorak lista/stabljike te se sadržaj čašice promiješa i pažljivo prenese u ćeliju. Prije zatvaranja ćelije dodaje se još jedan sloj dijatomejske zemlje do ispuna gotovo cijelog volumena ekstrakcijske ćelije. Ćelija se čvrsto zatvara te se postavlja na uređaj ASE Dionex 350®. Na zaslonu uređaja unose se zadani parametri ekstrakcije: temperatura, vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa.

Za uzorke lista i stabljike koprive parametri ekstrakcije su prethodno definirani: a) za uzorke lista: temperatura 110 °C, statičko vrijeme 10 minuta i 4 ciklusa, i b) za uzorke stabljike: temperatura

80 °C, statičko vrijeme 5 minuta te 4 ciklusa. Ekstrakcija se provodi u sekvenci: četiri pripremljene ekstrakcijske ćelije se redom stavljaju na brojevima označena mjesta, a staklene bočice za prikupljanje ekstrakta se stavljaju na iste pozicije označene brojevima, ali u donjem dijelu uređaja. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti prikupljeni u staklene bočice se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL te se nadopune do oznake ekstrakcijskim otapalom (Slika 10). U konačnici, ekstrakti se prenose u plastične kivete volumena 50 mL te se skladište do daljnjih spektrofotometrijskih analiza.



Slika 10. Ekstrakti lista (a) i stabljike (b) koprive *Urtica dioica* L. (vlastita fotografija, 2019)

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

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

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μ L etanolnog ekstrakta, 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Zatim se doda 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se

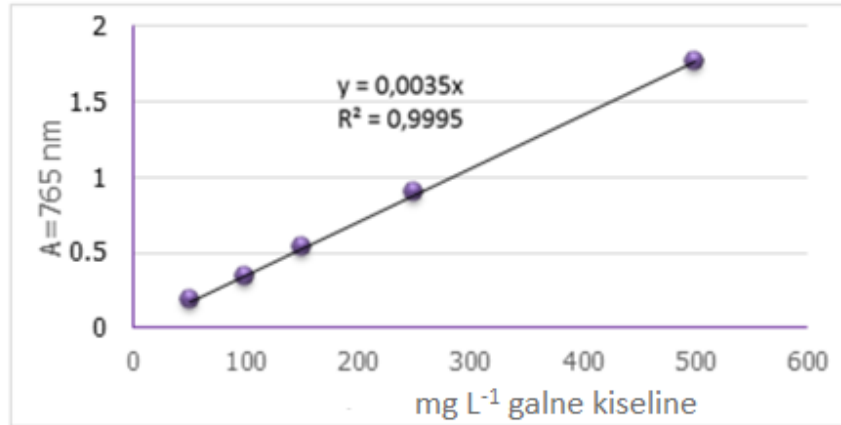
sve skupa kratko promiješa pomoću Vortex uređaja. Uzorci se potom termostatiraju 25 min u kupelji pri 50 °C. Slijepa proba se pripremi na isti način kao i uzorak, ali se umjesto ekstrakta dodaje ekstrakcijsko otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Uzorke ekstrakta lista i stabljike koprive nije bilo potrebno prethodno razrijediti za određivanje ukupnih fenola.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline te se odvaži otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici volumena 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL. U tikvice se redom pipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice 100 µL otopine standarda otpipetira se u staklene epruvete te se redom dodaje 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon toga doda se 1 mL otopine natrijeva karbonata te se sve skupa promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C. Na isti način se priprema slijepa proba, samo se umjesto otopine standarda dodaje 100 µL destilirane vode. Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm te se iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtaju baždarni pravci pomoću Excel-a. Na apscisi su nanesene vrijednosti koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca [1] (Slika 11).

Dobivene koncentracije ukupnih fenola (mg GAE L⁻¹) preračunate su u masene udjele (mg GAE 100 g⁻¹ liofiliziranog uzorka). Rezultat se izražava kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ± standardna devijacija.



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \qquad R^2 = 0,9995 \qquad [1]$$

gdje je:

Y –apsorbancija pri 765 nm

X –koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R² –koeficijent determinacije

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje pigmenata

Princip metode:

Svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama te se na tome temelji spektrofotometrijsko određivanje pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida). Spektrofotometrijsko mjerenje se provodi u etanolnom ekstraktu uzorka uz korištenje ekstrakcijskog otapala te mjerenjem pri valnim duljinama 470, 649 i 664 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim

otapalom) (Lichtenthaler i sur., 2001). Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra. Apsorpcijski maksimum za klorofil *a* je u plavom dijelu spektra (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm), a apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* nalaze se između dvaju maksimuma klorofila *a* - oko 450 i 640 nm.

Postupak određivanja:

Dobivene ekstrakte za kvantitativno određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida je potrebno prethodno razrijediti s 96 %-tnim etanolom te se potom mjeri apsorbanca na 470, 649 i 664 nm. Ekstrakti lista koprive razrijeđeni su 15 x, a ekstrakti stabljike koprive razrijeđeni su 5 x. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto uzorka uzima 96 %-tni etanol. ApSORBANCIJU slijepa probe potrebno je oduzeti od apSORBANCIJU uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama [2, 3 i 4] (Lichtenthaler i Buschmann, 2001):

Etanol:

$$c_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [2]$$

$$c_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [3]$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2,13 c_a - 97,64 c_b)/209 \quad [4]$$

gdje su:

A = apsorbanca

c_a = maseni udio klorofila *a*

c_b = maseni udio klorofila *b*

$c_{(x+c)}$ = maseni udio karotenoida (ksantofili + karoteni)

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$) potom su preračunate i izražene kao $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ liofiliziranog uzorka, a rezultat je prikazan kao srednja vrijednost dvaju mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.5. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Za usporedbu uzoraka provedena je jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA), pri čemu je nezavisna varijabla bila lokacija, a kao zavisne varijable promatrane su: udio ukupnih fenola ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), klorofila *a* ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), klorofila *b* ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), ukupnih klorofila ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i ukupnih karotenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Također, izračunati su Pearsonovi koeficijenti korelacije između analiziranih spojeva i meteoroloških podataka (srednja mjesečna temperatura i ukupna mjesečna količina oborina) za lokacije. Statistički značajna razlika u svim provedenim testovima razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj lokacije na koncentraciju ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹), klorofila *a* (mg 100 g⁻¹), klorofila *b* (mg 100 g⁻¹), ukupnih klorofila (mg 100 g⁻¹) i ukupnih karotenoida (mg 100 g⁻¹) u listu i stabljici samonikle koprive (*Urtica dioica* L.) sakupljene na 14 lokacija u RH (Tablica 1). Navedeni bioaktivni spojevi ekstrahirani su ASE tehnikom.

Tablica 3. Rezultati analize varijance utjecaja lokacije na udio ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹), klorofila *a* (mg 100 g⁻¹), klorofila *b* (mg 100 g⁻¹), ukupnih klorofila (mg 100 g⁻¹) i ukupnih karotenoida (mg 100 g⁻¹) u listu i stabljici samonikle koprive

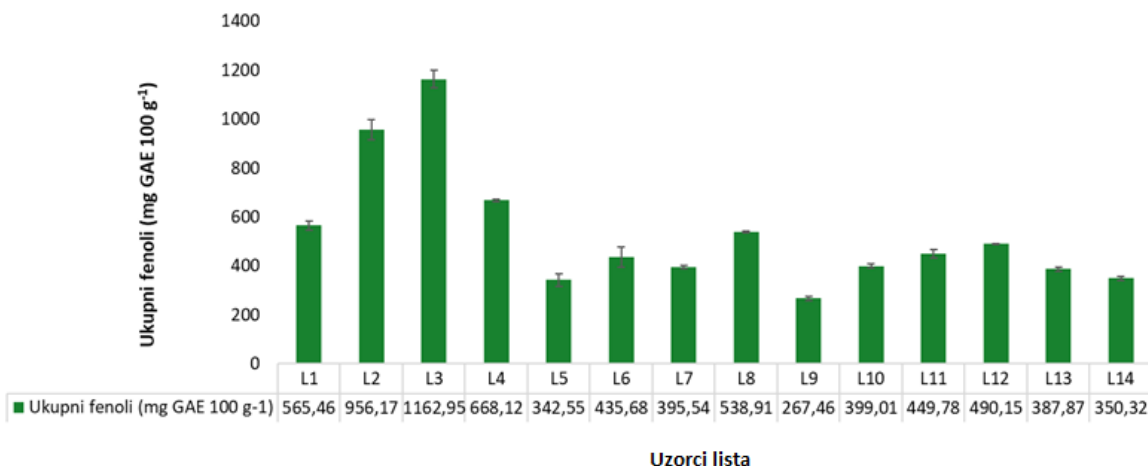
Analizirani spojevi	List		Stabljika	
	F	p	F	p
Ukupni fenoli	269,84	<0,01*	78,57	<0,01*
Klorofil <i>a</i>	51,46	<0,01*	291,29	<0,01*
Klorofil <i>b</i>	73,63	<0,01*	77,60	<0,01*
Ukupni klorofili	64,32	<0,01*	284,62	<0,01*
Ukupni karotenoidi	28,23	<0,01*	64,95	<0,01*

F=F-vrijednost, p=p-vrijednost

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05.

Rezultati analize varijance utjecaja lokacija na koncentracije navedenih bioaktivnih spojeva prikazani su u Tablici 3. Iz rezultata je vidljivo da se koncentracije određivanih spojeva statistički značajno razlikuju ovisno o lokaciji (p<0,01).

4.1. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO UKUPNIH FENOLA

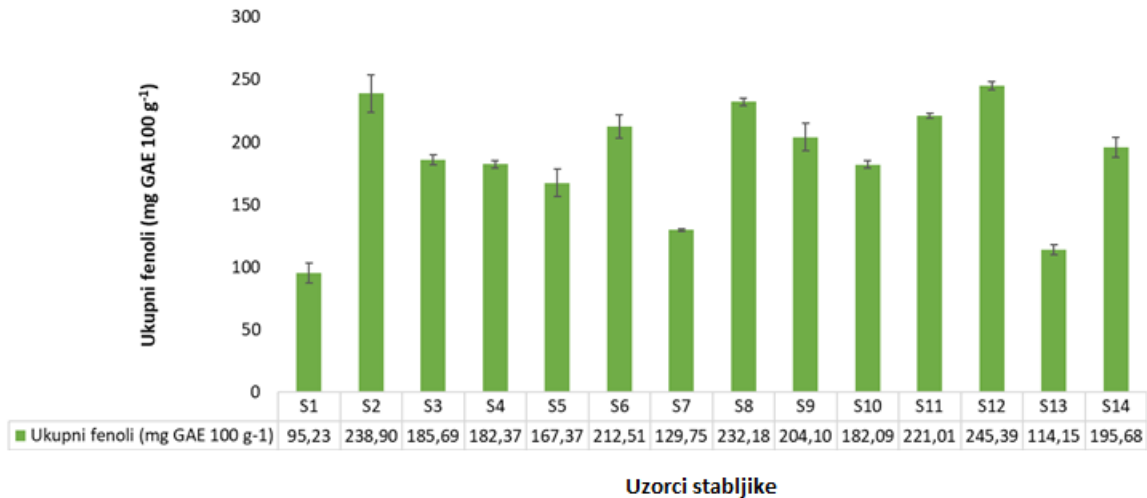


Slika 12. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima lista koprive

Slika 12 prikazuje masene udjele ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹) određene u liofiliziranim uzorcima lista samonikle koprive sakupljenih na 14 lokacija na području RH. Maseni udjeli ukupnih fenola u listu koprive određeni su u rasponu od 267,46±8,41 (L9) do 1162,95±36,33 mg GAE 100 g⁻¹ (L3). Prosječna vrijednost ukupnih fenola (UF) u listu iznosi 529,28 mg GAE 100 g⁻¹. Uzorci iz regije Ozalj i okolica (L1, L2 i L3) sadrže najviše koncentracije UF u rasponu od 565,46±18,09 do 1162,95±36,33 mg GAE 100 g⁻¹. Također, visoka koncentracija UF određena je u uzorku s područja Zagreba (L4), 668,12±4,82 mg GAE 100 g⁻¹. Izdvaja se još i uzorak L8 s područja Like čija koncentracija UF iznosi 538,91±3,61 mg GAE 100 g⁻¹. U ostalim uzorcima određene su uglavnom niže koncentracije UF u odnosu na prosječnu vrijednost, a najniža koncentracija UF zabilježena je u uzorku s područja Like (L9 267,46±8,41 mg GAE 100 g⁻¹).

Augspole i sur. (2017) su u svježim listovima koprive odredili koncentraciju ukupnih fenola od 743,4±96,3 mg GAE 100 g⁻¹ što je u rasponu koncentracija UF određenom u ovom istraživanju.

Dvije najvažnije skupine fenolnih spojeva u koprivi su flavonoidi i derivati hidroksicimetnih kiselina (Vajić i sur., 2015). Bucar i sur. (2006) su identificirali šikiminsku, kafeinsku, klorogensku i kafeoilomaličnu kiselinu u koprivi. Drugi autori navode i udjele određenih fenolnih kiselina od ukupnih fenola u listovima divlje koprive: klorogenska, 71,5 % i kafeoilomalična, 76,5 % (Pinelli i sur., 2008).



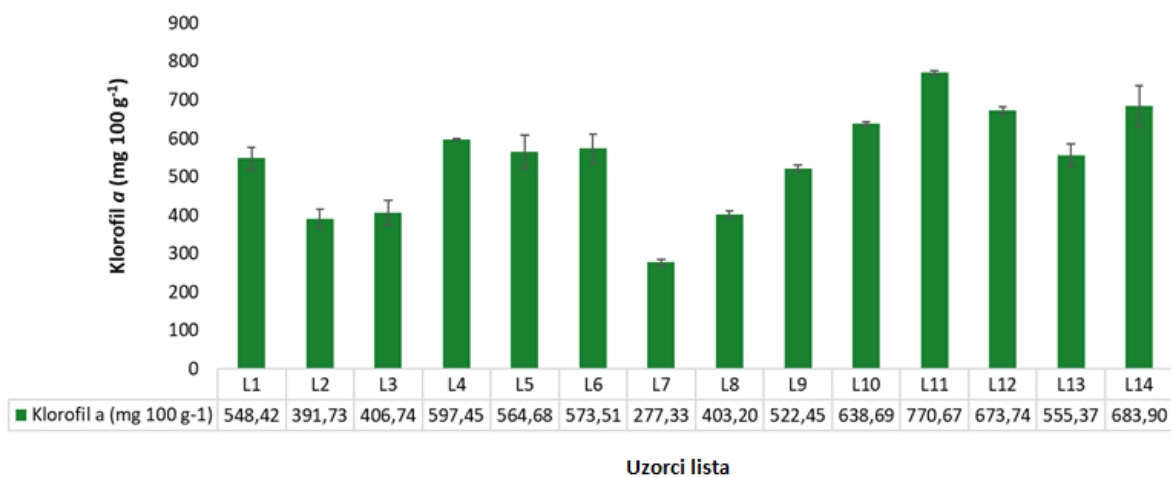
Slika 13. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima stabljike koprive

Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima stabljike prikazani su na Slici 13. Maseni udjeli UF u stabljici koprive određeni su u rasponu od 95,23±8,04 (S1) do 245,39±3,33 mg GAE 100 g⁻¹ (S12). Prosječna vrijednost UF u stabljici iznosi 186,17 mg GAE 100 g⁻¹. Uzorak s najvišom koncentracijom UF (S12) je s područja Istre. U ostalim uzorcima s područja Istre (S10, S11 i S14) određene su više vrijednosti UF u odnosu na prosječnu vrijednost, osim S13, u kojem je vrijednost UF ispod prosjeka. Uzorci s područja Žumberka i Ogulina pokazuju niže vrijednosti UF u odnosu na ostale regije. Uzorak S1 (Ozalj i okolica) karakterizira najniža koncentracija UF, dok ostali uzorci iz te regije bilježe više vrijednosti. U istraživanju Pinelli i sur. (2008) stabljike kultiviranih kopriva sadrže 3,67±0,20 mg g⁻¹ UF, a samoniklih kopriva 0,75±0,10 mg g⁻¹. Vrijednosti dobivene u ovom istraživanju u skladu su s rezultatima istraživanja Pinelli i sur. (2008).

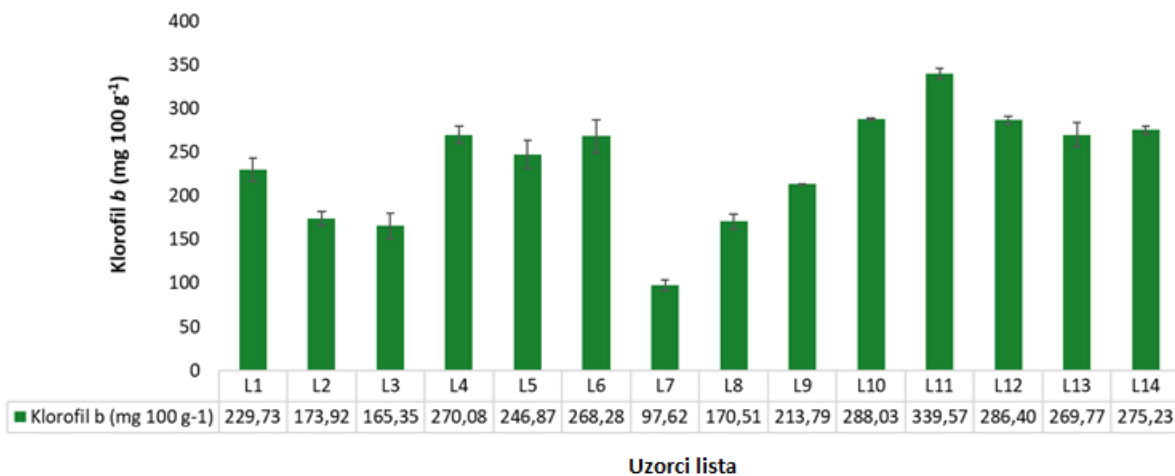
Uspoređujući vrijednosti UF u listu i u stabljici, vidljivo je da su koncentracije UF znatno više u listu, što je u skladu s literaturnim podacima. Tako su Pinelli i sur. (2008) zabilježili da je koncentracija UF u listovima dvostruko viša nego u stabljici. Također, Pinelli i sur. (2008) primjetili su da listovi sadrže visoke koncentracije klorogenske kiseline i 2-*O*-kafeoilmaleične

kiseline, dok u stabljikama prevladavaju flavonoidi: 54,4 % od ukupnih fenola u kultiviranim biljkama i 31,2 % u samoniklim uzorcima.

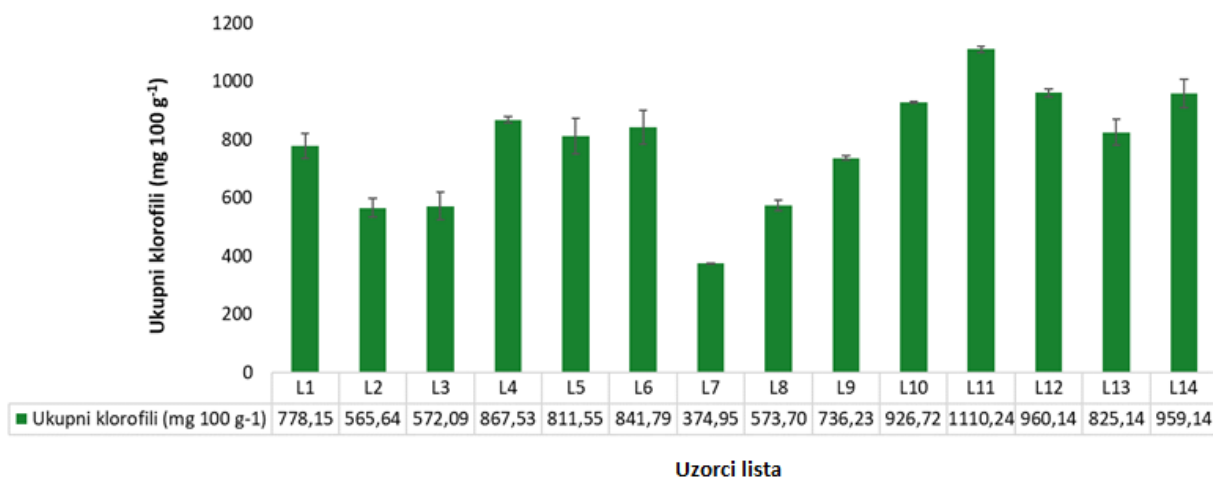
4.2. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO KLOROFILA



Slika 14. Maseni udjeli klorofila *a* (mg 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima lista koprive



Slika 15. Maseni udjeli klorofila *b* (mg 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima lista koprive



Slika 16. Maseni udjeli ukupnih klorofila ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u liofiliziranim uzorcima lista koprive

Maseni udjeli klorofila *a* (Ch-*a*) u uzorcima lista koprive određeni su u rasponu od $277,33 \pm 7,94$ do $770,67 \pm 4,82 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Slika 14), a maseni udjeli klorofila *b* (Ch-*b*) od $97,62 \pm 6,36$ do $339,57 \pm 6,34 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Slika 15). Prosječna koncentracija Ch-*a* u listu unutar svih 14 lokacija iznosi $543,42 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a Ch-*b* $235,37 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, iz čega je vidljivo da su koncentracije Ch-*a* u listu više u odnosu na koncentracije Ch-*b*, odnosno nalaze se u omjeru 3:1 što potvrđuje navode Jan i sur. (2017) da je u listovima koprive 75 % klorofila *a* i 25 % klorofila *b* od ukupnih klorofila.

Najviše koncentracije Ch-*a* i Ch-*b* određene su u uzorku L11 i iznose $770,67 \pm 4,82 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Ch-*a*) i $339,57 \pm 6,34 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Ch-*b*). Općenito uzorci s područja Istre bilježe najviše koncentracije Ch-*a* i Ch-*b*. Visoke koncentracije Ch-*a* i Ch-*b* su, također određene u uzorcima s područja Zagreba: L4 (Ch-*a* $597,45 \pm 1,08$; $270,08 \pm 10,09 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i L5 (Ch-*a* $573,51 \pm 38,20$; Ch-*b* $268,28 \pm 19,06 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te u uzorku L6 (Ch-*a* $564,68 \pm 44,17$; Ch-*b* $246,87 \pm 16,27 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Žumberka. Najniža koncentracija Ch-*a* ($277,33 \pm 7,94 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), kao i Ch-*b* ($97,62 \pm 6,36 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) određena je u uzorku s područja Ogulina (L7).

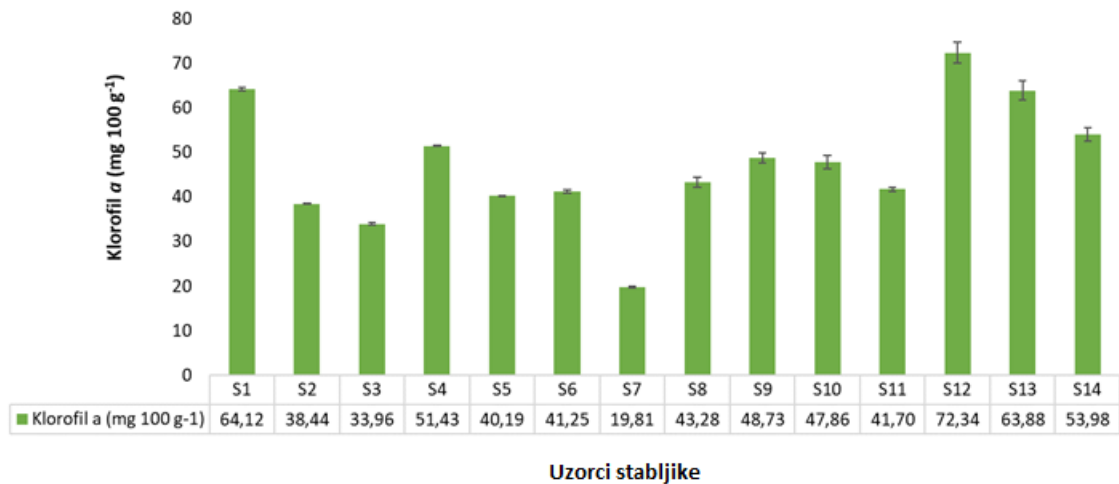
Đurović i sur. (2017) su u svojim metilen kloridnim ekstraktima lista koprive izmjerili koncentraciju klorofila *a* ($208,96 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i klorofila *b* ($95,68 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Navedene koncentracije su niže čak i od najnižih koncentracija Ch-*a* i Ch-*b* u ovom istraživanju. Uzrok znatno viših koncentracija u ovom istraživanju može biti primjena drugačijeg otapala (96 %-tni

etanol) koji daje bolju iskoristivost te primjena druge tehnike ekstrakcije. Naime, Đurović i sur. (2017) su koristili klasičnu Soxhlet ekstrakciju, dok je u ovom radu primjenjena ASE.

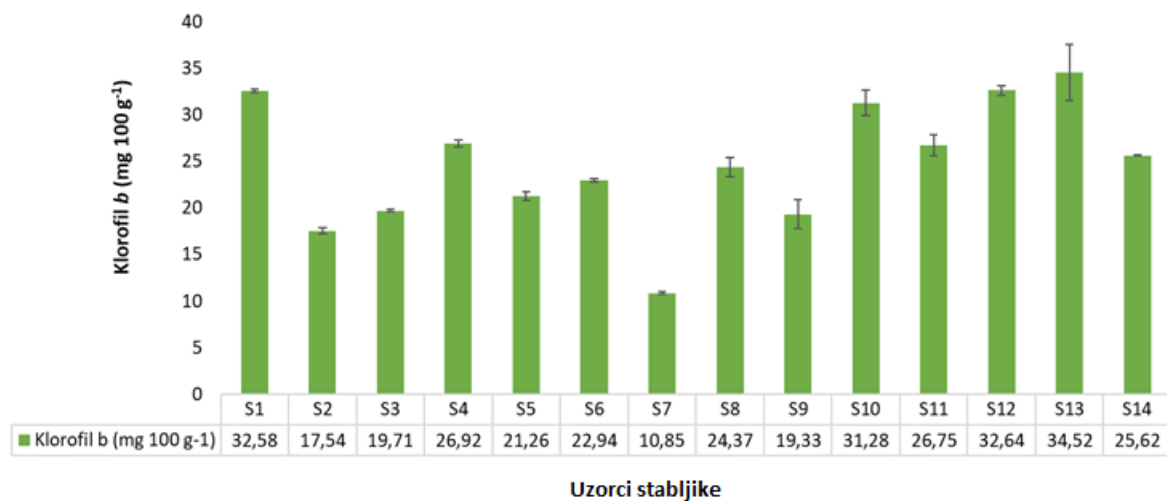
Promatrajući udio ukupnih klorofila ($Ch-a + Ch-b$) u listu (Slika 16) koncentracije su određene u rasponu od $374,95 \pm 1,58$ do $1110,24 \pm 11,15$ mg 100 g^{-1} , a prosječna vrijednost iznosi $778,79$ mg 100 g^{-1} . Odnos između uzoraka obzirom na koncentraciju ukupnih klorofila prati trend kao i kod koncentracija pojedinačnih klorofila te je tako u uzorku L11 s područja Istre određena najviša koncentracija ukupnih klorofila ($1110,24 \pm 11,15$ mg 100 g^{-1}). Ostali uzorci s područja Istre također pokazuju višu koncentraciju u odnosu na prosječnu vrijednost ($825,14 \pm 44,15$ do $960,14 \pm 13,75$ mg 100 g^{-1}). Uzorci L4 ($867,53 \pm 11,18$ mg 100 g^{-1}) i L5 ($841,79 \pm 57,25$ mg 100 g^{-1}) s područja Zagreba te L6 ($811,55 \pm 60,43$ mg 100 g^{-1}) s područja Žumberka imaju vrijednosti iznad prosjeka. Uzorci s područja Ozlja i okolice bilježe nešto niže koncentracije ukupnih klorofila u rasponu od $565,64 \pm 32,41$ do $778,15 \pm 42,10$ mg 100 g^{-1} , a uzorak s područja Ogulina (L7) je ponovno uzorak s najnižom koncentracijom ukupnih klorofila ($374,95 \pm 1,58$ mg 100 g^{-1}).

U istraživanju Kukrić i sur. (2012) ispitivane su koncentracije navedenih bioaktivnih spojeva za mlade i stare listove koprive ubrane u lipnju na šumovitom području. U mladim listovima izmjerene su sljedeće vrijednosti: $Ch-a$ $88,20$ mg 100 g^{-1} , $Ch-b$ $28,50$ mg 100 g^{-1} te ukupni klorofili $117,4$ mg 100 g^{-1} , a u starim $Ch-a$ $69,80$ mg 100 g^{-1} , $Ch-b$ $32,00$ mg 100 g^{-1} i ukupni klorofili $102,00$ mg 100 g^{-1} . Navedene vrijednosti su znatno niže u odnosu na vrijednosti u ovom istraživanju bez obzira na starost listova što može biti zbog razlike u lokaciji staništa koprive, vremenu branja, broju sunčanih sati, kao i tehnici izolacije i određivanja bioaktivnih spojeva.

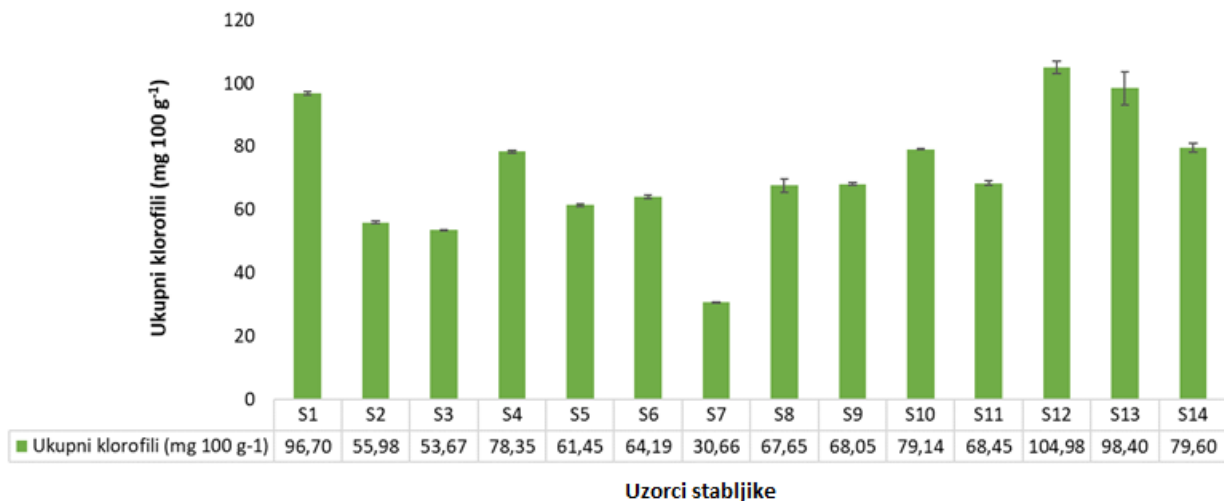
Kruk i sur. (2019) su ekstrahirali ukupne klorofile iz lista koprive pomoću ASE te su dobili rezultate u rasponu od $161,31$ do $936,43$ mg 100 g^{-1} što je približno jednako rezultatima ovoga rada. Uzorak L6 ($841,79$ mg 100 g^{-1}) iz ovog eksperimenta je s područja Žumberka kao i uzorci u istraživanju Kruk i sur. (2019).



Slika 17. Maseni udjeli klorofila *a* (mg 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima stabljike koprive



Slika 18. Maseni udjeli klorofila *b* (mg 100 g⁻¹) u liofiliziranim uzorcima stabljike koprive



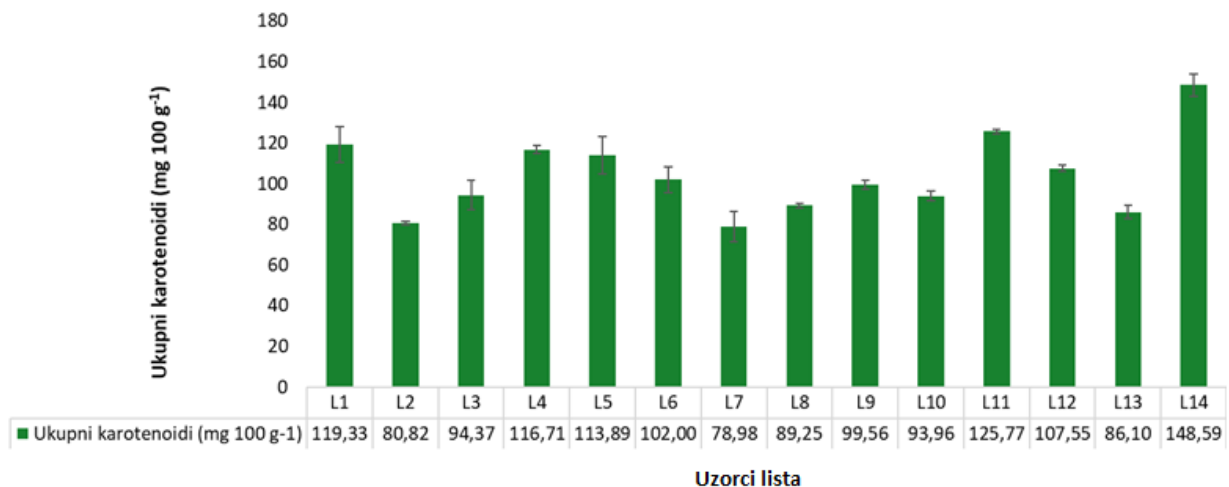
Slika 19. Maseni udjeli ukupnih klorofila ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u liofiliziranim uzorcima stabljike koprive

Slika 17 prikazuje vrijednosti masenih udjela Ch-*a* ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$), a Slika 18 masenih udjela Ch-*b* ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u liofiliziranim uzorcima stabljike koprive. Iz rezultata je vidljivo da stabljika sadrži znatno niže koncentracije Ch-*a* i Ch-*b* u odnosu na list. Maseni udjeli Ch-*a* u uzorcima stabljike određeni su u rasponu od $19,81 \pm 0,23$ do $72,34 \pm 2,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a maseni udjeli Ch-*b* od $10,85 \pm 0,14$ do $34,52 \pm 2,98 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Prosječna koncentracija Ch-*a* u stabljici iznosi $47,21 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a Ch-*b* $24,74 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Najviša koncentracija Ch-*a* se nalazi u uzorku S12 s područja Istre i iznosi $72,34 \pm 2,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, dok se najviša koncentracija Ch-*b* također nalazi u uzorku s područja Istre, ali s lokacije S13 te iznosi $34,52 \pm 2,98 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Također, koncentracije Ch-*a* i Ch-*b* više od prosjeka bilježe uzorci S1 (Ch-*a* $64,12 \pm 0,38$; Ch-*b* $32,58 \pm 0,20 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Ozlja i okolice te S4 (Ch-*a* $51,43 \pm 0,14$; Ch-*b* $26,92 \pm 0,34 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Zagreba. Kao i kod lista, najniže koncentracije Ch-*a* i Ch-*b* su određene u uzorku s područja Ogulina (Ch-*a* $19,81 \pm 0,23 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; Ch-*b* $10,85 \pm 0,14 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). U uzorcima stabljike koncentracije Ch-*a* su više u odnosu na koncentracije Ch-*b*, gdje se vrijednosti Ch-*a* i Ch-*b* proporcionalno mijenjaju ovisno o lokaciji. U uzorcima s nižom koncentracijom Ch-*a* niža je i koncentracija Ch-*b*, i obrnuto.

Koncentracije ukupnih klorofila u stabljikama (Slika 19) kopriva određene su u rasponu od $30,66 \pm 0,09$ do $104,98 \pm 1,88 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a prosječna vrijednost iznosi $71,95 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Uzorak s najvišom koncentracijom ukupnih klorofila je s područja Istre (S12 $104,98 \pm 1,88 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$),

jednako kao i u uzorku lista. Ostali uzorci s područja Istre također pokazuju višu koncentraciju ukupnih klorofila, osim uzorka S11, čija je koncentracija ukupnih klorofila ispod prosječne vrijednosti. Uzorak S4 s područja Zagreba također bilježi višu koncentraciju ($78,35 \pm 0,48 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Dvije lokacije s područja Ozlja i okolice imaju niže koncentracije ukupnih klorofila u odnosu na većinu uzoraka, a iznenađujuće je da uzorak S1 s područja Ozlja i okolice ima znatno višu koncentraciju ukupnih klorofila ($96,70 \pm 0,58 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u odnosu na ostale uzorke s tog područja. Uzorak s najnižom koncentracijom ukupnih klorofila ($30,66 \pm 0,09 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) je s područja Ogulina (S7).

4.3. UTJECAJ LOKACIJE NA UDIO UKUPNIH KAROTENOIDA

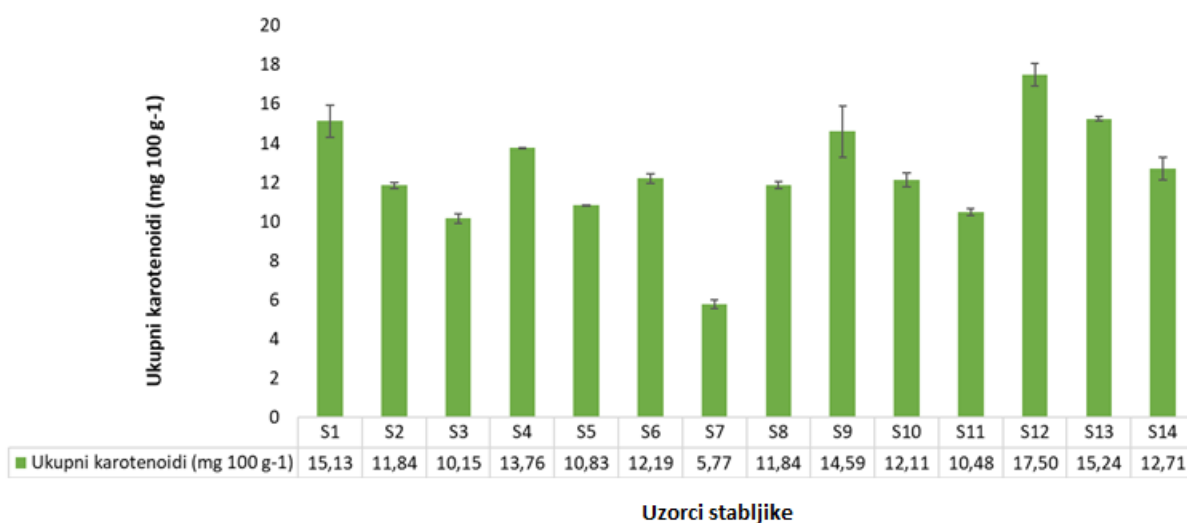


Slika 20. Maseni udjeli ukupnih karotenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u liofiliziranim uzorcima lista koprive

Karotenoidi imaju ulogu suzbijanja štetnih fotokemijskih reakcija, pogotovo onih koje uključuju kisik te time sprječavaju degradaciju i inaktivaciju klorofila. U listovima koprive pronađeno je 9 karotenoida od kojih su najzastupljeniji β -karoten, izomeri β -karotena, lutein i izomeri luteina (Jan i sur., 2017; Marchetti i sur., 2018). Koncentracija ukupnih karotenoida u listovima kopriva određena je u rasponu od $78,98 \pm 7,43$ do $148,59 \pm 5,53 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Slika 20), a prosječna vrijednost iznosi $104,06 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Uzorak s najvišom koncentracijom ukupnih karotenoida je s područja Istre (L14 $148,59 \pm 5,53 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), dok je L7 s područja Ogulina uzorak s najnižom koncentracijom ($78,98 \pm 7,43 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). U uzorcima s područja Like L8 i L9 određene su niže

koncentracije u odnosu na prosječnu vrijednost. Osim uzorka L14 s područja Istre koji bilježi najvišu koncentraciju ukupnih karotenoida, uzorke L11 i L12 također karakteriziraju koncentracije iznad prosječne vrijednosti, dok su koncentracije u ostalim uzorcima L10 i L13 koncentracije niže od prosječne vrijednosti. Uzorci L1 ($119,33 \pm 8,86 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Ozlja i okolice, L4 ($116,71 \pm 2,00 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Zagreba i L6 ($113,89 \pm 9,25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) s područja Žumberka također bilježe vrijednosti ukupnih karotenoida više od prosjeka.

Repajić i sur. (2020) u listovima koprive s područja Sela Žakanjska odredili su koncentraciju ukupnih karotenoida u rasponu od 31,48 do 65,81 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ što je nešto niže od rezultata u ovom istraživanju, a mogući razlozi tome su vrijeme branja koprive i faza starosti biljke budući su u oba istraživanja primjenjene iste tehnike ekstrakcije. Adhikari i sur. (2015) navode više koncentracije ukupnih karotenoida u listu ($349,67 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u odnosu na ovo istraživanje, a razlog tomu mogu biti faza starosti biljke u trenutku branja, okolišni uvjet te drugačija obrada koprive nakon branja.



Slika 21. Maseni udjeli ukupnih karotenoida ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) u liofiliziranim uzorcima stabljike

Koncentracija ukupnih karotenoida u uzorcima stabljike određena je u rasponu od $5,77 \pm 0,23$ do $17,50 \pm 0,59 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Slika 21), a prosječna vrijednost iznosi $12,44 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Najviša koncentracija ukupnih karotenoida u stabljici određena je u uzorku S12 s područja Istre i iznosi $17,50 \pm 0,59 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. U ostalim uzorcima s područja Istre, osim S13 i S14, koncentracije su niže od prosječne vrijednosti. Također, koncentracije ukupnih karotenoida u S2 i S3 s područja Ozlja i

okolice su niže od prosječne vrijednosti, dok se S1 s istog područja ističe s koncentracijom ukupnih karotenoida višom od prosjeka. Kao i u uzorcima lista, najniža koncentracija ukupnih karotenoida određena je u uzorku s područja Ogulina (S7) koja iznosi $5,77 \pm 0,23 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a određene lokacije s područja Ozlja i okolice (S1 $15,13 \pm 0,83 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te Zagreba (S4 $13,76 \pm 0,01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) bilježe vrijednosti više od prosjeka.

Općenito visoke koncentracije kako karotenoida tako i klorofila u koprivi u ovom istraživanju mogu se objasniti vremenom branja. Naime, koprive brane u rujnu imaju više koncentracije klorofila i karotenoida u odnosu na koprive brane u svibnju ili lipnju (Biesiada i sur., 2010).

4.4. UTJECAJ KLIMATSKIH UVJETA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Obzirom na raznolikost geografskog smještaja i klimatskih uvjeta lokacija uzoraka samonikle koprive, izračunati su Pearsonovi koeficijenti korelacije između analiziranih spojeva i meteoroloških podataka (srednja mjesečna temperatura i ukupna mjesečna količina oborina) za lokacije kako bi se ispitala međusobna veza utjecaja klimatskih uvjeta na akumulaciju bioaktivnih spojeva. Izračunati koeficijenti korelacije prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Koeficijenti korelacije između analiziranih spojeva ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) lista i stabljike samonikle koprive te meteoroloških podataka (srednja mjesečna temperatura i ukupna mjesečna količina oborina) za lokacije koprive

Analizirani spojevi	List		Stabljika	
	s.m. T (°C)	u.o. (mm)	s.m. T (°C)	u.o. (mm)
Ukupni fenoli	-0,11	0,05	-0,01	-0,22
Klorofil a	0,60*	-0,19	0,37	-0,61*
Klorofil b	0,68*	-0,15	0,59*	-0,38
Ukupni klorofili	0,63*	-0,18	0,46	-0,55*
Ukupni karotenoidi	0,10	-0,22	0,25	-0,64*

s.m. T= srednja mjesečna temperatura, u.o.=ukupna mjesečna količina oborina

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da postoji jaka korelacija između srednje mjesečne temperature (s.m. T) i masenih udjela Ch-*a*, Ch-*b* i ukupnih klorofila u listu koprive ($r=0,60 - 0,68$). S druge strane, korelacija između s.m. T i koncentracije Ch-*b* u stabljici koprive je umjerena ($r=0,59$). Ostali analizirani spojevi u listu i stabljici nisu pokazali korelaciju sa s.m. T. Obzirom na vrijednosti za s.m. T, može se pretpostaviti da više temperature pogoduju akumulaciji klorofila. González-Talice i sur. (2013) su tijekom dvije godine istraživali utjecaj izloženosti plodova Gala jabuka sunčevom svjetlu obzirom na položaj plodova unutar krošnje na udio pigmenata i fenolnih spojeva. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da su udjeli ispitivanih spojeva bili viši u plodovima koji su bili izloženi sunčevom svjetlu u odnosu na plodove koji su bili u sjeni, odnosno u unutrašnjosti krošnje. Nasuprot tome, Rahnavard i sur. (2012) u svome radu bilježe da je do porasta koncentracije klorofila u *Hypericum perforatum* L. došlo pri nižim temperaturama. Ipak, radi se o lokacijama s drugačijom klimom. Također, listovi biljaka koji se nalaze u sjeni, tj. koje rastu na području s manjim brojem sunčanih sati, imaju veće kloroplaste i više klorofila kako bi se prilagodili manjku svjetlosti. Stoga, zasjenjeni listovi obično imaju tamnozelenu boju (Hansen, 2020). Lubimenko i Hubbenet (1932) su došli do zaključka da se klorofil u sadnicama kritosjemenjači ubrzano akumulirao do optimalne temperature (26 °C), a nakon te temperature akumulacija klorofila se postepeno usporavala.

Nadalje, statistička analiza pokazala je postojanje srednje jake do jake negativne korelacije ($r=-0,55 - -0,64$) između ukupne mjesečne količine oborina (u.o.) i koncentracija Ch-*a*, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida u stabljici koprive, pokazujući da veća količina oborina utječe na smanjenu akumulaciju pigmenata u stabljici.

Hanson i sur. (2009) pokazali su da je koncentracija ukupnih karotenoida u pak choi (*B. rapa* convar. *Chinesis*) za 36 % viša pri nižim temperaturama (18,4 °C) i u sušnoj sezoni (10 mm) u usporedbi s koncentracijama u sezoni s višim temperaturama (28,6 °C) i većom količinom oborina (822 mm). Dakle, kao i u ovom istraživanju veća količina oborina utječe na smanjenje koncentracije pigmenata, ali, kao i u radu Rahnavard i sur.(2012), niža temperatura je pogodovala akumulaciji pigmenata.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti sljedeće:

1. Uzorci lista i stabljike samonikle koprive ubrane na različitim lokacijama u RH pokazali su veliku raznolikost u udjelima analiziranih bioaktivnih spojeva, gdje su statističkom analizom utvrđene statistički značajne razlike ($p < 0,01$) u udjelu ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila te ukupnih karotenoida u listu i stabljici koprive obzirom na lokaciju.
2. Koncentracije analiziranih bioaktivnih spojeva znatno su više u listu koprive u odnosu na stabljiku: općenito list sadrži oko 75 % više ukupnih fenola, 90 % više ukupnih klorofila i 90 % više ukupnih karotenoida.
3. Udio ukupnih fenola u listu koprive određen je u rasponu od $267,46 \pm 8,41$ do $1162,95 \pm 36,33$ mg GAE 100 g^{-1} , ukupnih klorofila od $374,95 \pm 1,58$ do $1110,24 \pm 11,15$ mg 100 g^{-1} (Ch-*a* $277,33 \pm 7,94$ do $770,67 \pm 4,82$; Ch-*b* $97,62 \pm 6,36$ do $339,57 \pm 6,34$ mg 100 g^{-1}) te udio ukupnih karotenoida od $78,98 \pm 7,43$ do $148,59 \pm 5,53$ mg 100 g^{-1} . Udio ukupnih fenola u stabljici koprive određen je u rasponu od $95,23 \pm 8,04$ do $245,39 \pm 3,33$ mg GAE 100 g^{-1} , ukupnih klorofila od $30,66 \pm 0,09$ do $104,98 \pm 1,88$ mg 100 g^{-1} (Ch-*a* $19,81 \pm 0,23$ do $72,34 \pm 2,39$; Ch-*b* $10,85 \pm 0,14$ do $34,52 \pm 2,98$ mg 100 g^{-1}) te udio ukupnih karotenoida od $5,77 \pm 0,23$ do $17,50 \pm 0,59$ mg 100 g^{-1} .
4. Obzirom na lokaciju, uzorci s područja Istre koje karakterizira viša temperatura zraka i niža ukupna količina oborina generalno su sadržavali više udjele pigmentata u listu i stabljici koprive u odnosu na ostale ispitivane lokacije, dok se za udio ukupnih fenola u oba dijela biljke nije pokazao uniforman trend među lokacijama.
5. Statistička analiza pokazala je određenu korelaciju između klimatoloških parametara i udjela pigmentata, gdje viša temperatura zraka pozitivno utječe na akumulaciju klorofila u listu koprive, odnosno viša količina oborina rezultira sniženim udjelima pigmentata u stabljici koprive.

6. LITERATURA

- Adhikari, B.M., Bajracharya A., Shrestha, A.K. (2015) Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Sci.Nutr.* **4**, 119–24.
- Adom, K.K., Liu, R.H. (2002) Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6182–7.
- Akbay, P., Basaran, A.A, Undeger, U., Basaran, N. (2003) In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phyther. Res.* **17**, 34–7.
- Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J.A., Ibañez, E. (2019) Pressurized liquid extraction. *Liq. Extr.* **1**, 375–98.
- Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.H. (2017) Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 295–315.
- Anonymous 1 (2020) <<https://www.ipavelvana.eu/en/medicinal-herbs/20-stinging-nettle-leaves-50g-8594015480756.html>>. Pristupljeno 16. ožujka 2020.
- Anonymous 2 (2020) <<https://www.wikiwand.com/pl/%CE%92-Karoten>>. Pristupljeno 05. kolovoza 2020.
- Augspole, I., Duma, M., Ozola, B., Cinkmanis, I. (2017) Phenolic profile of fresh and frozen nettle, goutweed, dandelion and chickweed leaves. *Proceedings of the 11th Baltic Conference on Food Science and Technology*. Food Science and Technology in a Changing World, Jelgava, str. 27-28.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 36–426.
- Berezina, E.V., Brilkina, A.A., Veselov, A.P. (2017) Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia) *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **218**, 46–139.

- Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., Senge.,T., (1995) Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia *Lancet*. **345**, 39–1529.
- Biesiada, A., Kucharska, A., Sokół-Łętowska, A., Kuś, A. (2010) Effect of the Age of Plantation and Harvest Term on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Ecol. Chem. Eng. A*. **17**, 8–1061.
- Biesiada, A., Wołoszczak, E., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A.Z., Nawirska-olszańska, A. (2009) The effect of nitrogen form and dose on yield, chemical composition and antioxidant activity of stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Herba Pol.* **55(3)**, 84-93.
- Blicharski, T., Oniszczyk, A. (2017) Extraction Methods for the Isolation of Isoflavonoids from Plant Material. *Open Chem.* **15**, 34–45.
- 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**, 1028-1029.
- Carvalho, A.R., Costa, G., Figueirinha, A., Liberal, J., Prior, J.A.V., Lopes, M.C., Cruz, M.T., Batista, M.T. (2017) *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res. Int.* **99**, 94–485.
- Daher, C.F., Baroody, K.G., Baroody, G.M. (2006) Effect of *Urtica dioica* extract intake upon blood lipid profile in the rats. *Fitoterapia.* **77**, 8–183.
- De Vico, G., Guida, V., Carella, F. (2018) *Urtica dioica* (stinging nettle): A neglected plant with emerging growth promoter/immunostimulant properties for farmed fish. *Front. Physiol.* **9**, 1–5.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E.G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., Wielgusz, K. (2015) The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Ind. Crops Prod.* **68**, 9–42.
- Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sözen, S., Avci, A. (2004) Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 7–855.

- Durović, S., Pavlic, B., Šorgić, S., Popov, S., Savic, S., Pertonićević, M., Radojković, M., Cvetanovic, A., Zekovic, Z. (2017) Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J. Funct. Foods* **32**, 18–26.
- Durović, S., Vujanović, M., Radojković, M., Filipović, J., Filipović, V., Gašić, U., Tešić, Ž., Mašković, P., Zeković, Z. (2019) The functional food production: Application of stinging nettle leaves and its extracts in the baking of a bread. *Food Chem.* **312**, 126091.
- Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018) Carotenoids in human nutrition and health. *Arch. Biochem. Biophys.* **652**, 18–26.
- Ernst, E., Pittler, M. H., Wider, B. (2006) The desktop guide to complementary and alternative medicine: an evidence-based approach, Elsevier Health, Philadelphia, str. 443.
- González-Talice, J., Yuri, J. A., del Pozo, A. (2013) Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala apple strains according to canopy position and light environment. *Sci. Hortic.* **151**, 83–89.
- Grieve, M. (1931) A modern herbal, 3. izd., Tiger Books Int., London, str.912.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., Torija Isasa, M.E. (2003) Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food Compos. Anal.* **16**, 9–111.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.I., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E. (2004) Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *J. Ethnopharmacol.* **90**, 15–205.
- Hansen, J. (2020) Sun vs. Shade Leaves, <<https://www.hunker.com/12276476/sun-vs-shade-leaves>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2020.
- Hanson, P., Yang, R.Y., Chang, L.C., Ledesma, L., Ledesma, D. (2009) Contents of carotenoids, ascorbic acid, minerals and total glucosinolates in leafy brassica pakchoi (*Brassica rapa* L. chinensis) as affected by season and variety. *J. Sci. Food Agric.* **89**, 14–906.
- Hirano, T., Homma, M., Oka, K., (1994) Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na⁺,K⁺-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Med.* **60**, 3–30.
- Hojnik, M., Škerget M., Knez, Ž. (2007) Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica*

- dioica* L.). *Sep. Purif. Technol.* **57**, 37–46.
- Howard, L., Pandjaitan, N. (2008) Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach *J. Food Sci.* **73**, 151-157.
- Ibáñez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A., Castro-Puyana, M. (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. U: *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (Hayes, M., ured.), Springer, str. 55-98.
- Jan, K.N., Zarafshan, K., Singh, S. (2017) Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential *J. Food Meas. Charact.* **11**, 33–423.
- Koczka, N., Petersz, D., Stefanovits-Banyai, E. (2015) Total phenol content and antioxidant capacity (frap) of *Urtica dioica* L. leaf extracts *Acta Hort.* **1099**, 10–207.
- Kraus, R., Spiteller, G. (1990) Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry* **29**, 9–1653.
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., Antolak, H. (2018) *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules* **23**, 1–21.
- Kruk, V., Repajić, M., Cinar, F., Radman, S., Dragović-Uzelac, V. (2019) Bioactive compounds in nettle leaves influenced by pressurized liquid extraction. *Book of Abstracts of the 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH*, Osijek, str.65.
- Kukrić, Z.Z., Topalić-Trivunović, L.N., Kukavica, B.M., Matoš, S.B., Pavičić S.S., Boroja, M.M., Savić, A.V. (2012) Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Period. Technol.* **43**, 72–257.
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, **1(1)**, F4-3.
- Liu, R.H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* **134**, 3479-3485.

- López-Hortas, L., Le Juge, C., Falqué, E., Domínguez, H., Torres, M.D. (2020) Bioactive extracts from edible nettle leaves using microwave hydrodiffusion and gravity and distillation extraction techniques. *Process Biochem.* **94**, 66–78.
- Lubimenko, V.N., Hubbenet, E.R. (1932) the Influence of Temperature on the Rate of Accumulation of Chlorophyll in Etiolated Seedlings. *New Phytol.* **31**, 26–57.
- Marchetti, N., Bonetti, G., Brandolini, V., Cavazzini, A., Maietti, A., Meca, G., Mañes, J. (2018) Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a functional food additive in egg pasta: Enrichment and bioaccessibility of Lutein and β -carotene *J. Funct. Foods* **47**, 53–547.
- Nonenmacher, R.A. (2011) Stinging nettle (*Urtica dioica*) stem, greatly enlarged, < https://en.wiktionary.org/wiki/stinging_nettle#/media/File:Urtica_dioica_2848.jpg>. Pristupljeno 16. ožujka 2020.
- Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic Compounds Analysis of Root , Stalk , and Leaves of Nettle. *ScientificWorldJournal.* **2012**, 2-5.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., Romani, A. (2008) Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 32–9127.
- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., Komaitis, M. (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* **95**, 71–664.
- Radman, S., Žutić, I., Fabek, S., Žlabur, J.Š., Benko, B., Toth, N., Čoga, L. (2015) Influence of nitrogen fertilization on chemical composition of cultivated nettle. *Emirates J. Food Agric.* **27**, 96–889.
- Rahnavard, A., Daneshian, J., Heravan, E.M., Valadabadi, S.A., Golein, B. (2012) Investigation of the most important secondary metabolites of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in Caspian climate. *J. Food, Agric. Environ.* **10**, 81–375.
- Repajić, M., Cegledi, E., Kruk, V., Pedisić, S., Činar, F., Kovačević, D.B., Žutić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Accelerated solvent extraction as a green tool for the recovery of polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes* **8**, 803.

- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003) Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A* **1012**, 8–119.
- Shonte, T.T., Duodu, K.G., De Kock, H.L. (2020) Effect of drying methods on chemical composition and antioxidant activity of underutilized stinging nettle leaves. *Heliyon* **6**, e03938.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98** (4), 828-834.
- Stahl, W., Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 51–345.
- Škevin, D., Rade, D., Štruceļj, D., Mokrovčak, Ž., Nederal, S., Benčić, D. (2003) The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 41–536.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 46–1231.
- Ullah, R., Hussain, I., Ahmad, S. (2017) Diocanol; one new phenol derivative isolated and characterized from *Urtica dioica*. *Arab. J. Chem.* **10**, 6–1284.
- Upton, R. (2013) Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J. Herb. Med.* **3**, 9–38.
- Vajić, U.J., Grujić-Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Godevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., Mihailović-Stanojević, N. (2015) Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **74**, 7–912.
- Wagner, H., Willer, F., Samtleben, R., Boos, G. (1994) Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine* **1**, 24–213.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 12–300.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Nikolina Pavković

Nikolina Pavković