

Izolacija bioaktivnih spojeva lista pasjeg trna primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Susak, Neja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:314965>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Nejla Susak

1220/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA LISTA PASJEG TRNA
PRIMJENOM EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE
MIKROVALOVIMA**

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. Ivone Elez Garofulić Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovo istraživanje provedeno je u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093) koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020.

ZAHVALA

Zahvaljujem se dragoj mentorici doc.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić na ukazanoj podršci, pomoći, izdvojenom vremenu te stručnim savjetima koji su mi pomogli u izradi i učinili pisanje ovog rada lijepim iskustvom.

Hvala mojim dragim prijateljima i kolegama koji su sa mnom dijelili ovo razdoblje života, obogatili ga lijepim trenucima te period studiranja učinili mnogo lakšim i zabavnijim.

I na kraju, najveće hvala mojim roditeljima i bratu na vjeri u mene, razumijevanju i bez čije bezuvjetne podrške sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala Vam što ste uvijek moj oslonac i vjetar u leđa.

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

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA LISTA PASJEG TRNA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA

Nejla Susak, 1220/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je optimizirati parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za izolaciju fenolnih spojeva i biljnih pigmenata iz lista pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.). Uz 70 %-tni etanol kao otapalo, ispitan je utjecaj temperature (40, 60 i 80 °C), snage mikrovalova (300, 500 i 700 W) i vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Maseni udjeli analiziranih spojeva određeni su spektrofotometrijski, a prosječne vrijednosti iznose: ukupni fenoli 85,34 mg GAE g⁻¹, ukupni klorofili 1,15 mg g⁻¹, klorofil *a* 0,73 mg g⁻¹, klorofil *b* 0,42 mg g⁻¹, ukupni karotenoidi 0,29 mg g⁻¹. Također, određena je antioksidacijska aktivnost FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 802,35 μmol TE g⁻¹. Statistička analiza je pokazala kako sva tri varirana parametra ekstrakcije statistički značajno utječu ($p < 0,05$) na masene udjele bioaktivnih spojeva i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Najveći prinos ukupnih fenola dobiven je pri 60 °C/500 W/15 min, ukupnih klorofila pri 60 °C/700 W/10 min te ukupnih karotenoida pri 80 °C/700 W/5 min, a najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta dobivena je pri 80 °C/500 W/10 min.

Ključne riječi: *list pasjeg trna, MAE, ukupni fenoli, biljni pigmenti, antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 48 stranica, 8 slika, 10 tablica, 63 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 16. srpanj 2021.

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

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SEA BUCKTHORN LEAVES USING MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

Nejla Susak, 1220/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal conditions for the isolation of phenolic compounds and plant pigments from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction (MAE). Using 70 % ethanol as solvent, the influence of temperature (40, 60 and 80 °C), microwave power (300, 500 and 700 W) and extraction time (5, 10 and 15 min) was examined. Mass fractions of analyzed compounds were determined spectrophotometrically with average values: total phenols 85.34 mg GAE g⁻¹, total chlorophyll 1.15 mg g⁻¹, chlorophyll *a* 0.73 mg g⁻¹, chlorophyll *b* 0.42 mg g⁻¹, total carotenoids 0.29 mg g⁻¹. In addition, the antioxidant activity was determined by FRAP assay with an average value of 802.35 μmol TE g⁻¹. Statistical analysis showed that all three varied extraction parameters had a statistically significant effect ($p < 0.05$) on the mass fractions of bioactive compounds and the values of antioxidant capacity. The highest yield of total phenols was obtained at 60 °C/500 W/15 min, total chlorophylls at 60 °C/700 W/10 min, total carotenoids at 80 °C/700 W/5 min and the highest value of antioxidant capacity was determined at 80 °C/500 W/10 min.

Keywords: *sea buckthorn leaves, MAE, total phenols, plant pigments, antioxidant activity*

Thesis contains: 48 pages, 8 figures, 10 tables, 63 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. Ivona Elez Garofulić, Assistant professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: July 16th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PASJI TRN (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA	3
2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA PASJEG TRNA.....	5
2.3.1. Fenolni spojevi.....	5
2.3.2. Pigmenti	8
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA PASJEG TRNA...	10
2.5. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA.....	11
2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA	12
2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima..	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Uzorak.....	16
3.1.2. Aparatura i pribor	16
3.1.3. Otapala i reagensi	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista pasjeg trna primjenom MAE	18
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	20
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata	22
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	23
3.2.5. Statistička obrada rezultata.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA	27
4.2. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH KLOOROFILA	31
4.2. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH KAROTENOIDA	35
4.3. UTJECAJ MAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST	38
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) je izuzetno vrijedna i korisna biljka koja u posljednje vrijeme privlači sve više pozornosti, uglavnom zbog svog nutritivnog sastava i ljekovitog potencijala. Biljka pripada porodici Elaeagnaceae (zlolesina), a tradicionalno se primjenjivala u Kini, prije više od tisuću godina kao lijek za astmu, kožne bolesti, želučane tegobe te bolesti pluća i dišnih puteva. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je antioksidativno, imunomodulatorno, antiaterogeno, hepatoprotektivno, antistresno te radioprotektivno djelovanje pasjeg trna što se pripisuje prisustvu bioaktivnih komponenti. Svi dijelovi biljke smatraju se dobrim izvorom velikog broja spojeva, poput vitamina (A, C, E, K), karotenoida (karoten, likopen), fenolnih spojeva (flavonoidi i fenolne kiseline), fitosterola (ergosterol, stigmasterol, lanosterol, amirini), organskih kiselina (jabučna i oksalna kiselina), polinezasićenih masnih kiselina te nekih esencijalnih aminokiselina.

Radi varijabilnosti uzoraka te spojeva koji se izoliraju, potrebno je izabrati prikladnu metodu ekstrakcije kojom će udjeli ekstrahiranih spojeva biti što veći uz što manje gubitke. U ovom istraživanju, prilikom izolacije bioaktivnih spojeva (fenoli i biljni pigmenti) korištena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima koja spada u novije, nekonvencionalne metode ekstrakcije. Neconvecionalne metode su danas sve više u upotrebi radi veće ekološke prihvatljivosti čime se smanjuje upotreba otapala, a primjenom mikrovalova zagrijavanje se postiže puno brže što skraćuje trajanje ekstrakcije. Samim time, umanjuje se termička degradacija termolabilnih komponenti koja je kod konvencionalnih metoda česta što sve rezultira većim konačnim prinosom i povećanom kvalitetom izoliranih spojeva, dok su ukupni troškovi smanjeni.

Cilj ovog rada je ispitati učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) pri izolaciji bioaktivnih spojeva (fenoli, klorofili i karotenoidi) iz lista pasjeg trna te odrediti antioksidacijsku aktivnost uz primjenu 70 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Kako bi se dobili što veći konačni prinosi ekstrakcije, svrha rada je odrediti optimalne parametre ekstrakcije pri čemu je ispitan utjecaj temperature (40, 60 i 80 °C), snage mikrovalova (300, 500 i 700 W) te vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min). U dobivenim ekstraktima, maseni udjeli bioaktivnih spojeva određeni su spektrofotometrijski, a antioksidacijska aktivnost utvrđena FRAP (eng. *ferric reducing antioxidant power*) metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides* L.)

Pasji trn je trnovit, zimzeleni grm ili niže stablo iz porodice Elaeagnaceae (zlolesina). Raste do 6 m visine, s vrlo snažno razvijenim korijenskim sustavom i smeđe-crnom hrapavom korom. Listovi su naizmjenični, uski i kopljasti, prekriveni dlačicama, srebrenasto-sive boje, duljine 5–7 cm, s peteljkom dugom oko 0,5 cm. Cvjetovi su sitni (3 mm), dvodomni, razvijaju se na prošlogodišnjim ograncima, cvatu od ožujka do svibnja, prije listanja ili istodobno. Ocvjeća su neugledna, u obliku dvolapne čaške. Plodovi su sočne, crvene, narančaste ili žute bobice, duljine 7-8 mm, koji ostaju na grmu tijekom cijele godine (slika 1) (Nikolić i Topić, 2005).



Slika 1. Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) (Anonymous 1, 2021)

Prirodno raste u suhim, umjerenim i hladnim pustinjanskim područjima Himalaja, na nadmorskoj visini od 2590 do 4175 m. Njegova široka rasprostranjenost pokriva velika područja Azije i Europe – Indija, Kina, Nepal, sjeverni dijelovi Pakistana i Afganistana, Rusija, Finska, Poljska, Njemačka, Švedska, Norveška, Francuska, Danska i Nizozemska (Li i Shroeder, 1996;

Suryakumar i Gupta, 2011). U Republici Hrvatskoj je rijetko nađen uz šljunčane obale rijeke Drave, do slovenske granice. Pretpostavlja se da su ta prirodna staništa velikim dijelom uništena hidrotehničkim zahvatima na vodotoku rijeke Drave tijekom 20. stoljeća te se danas pasji trn smatra regionalnom izumrlom vrstom (RE) (Nikolić i Topić, 2005).

Ime roda *Hippophae* („sjajni konj“) potječe iz stare Grčke gdje je lišće pasjeg trna dodavano u hranu za konje što je rezultiralo gustom, sjajnom dlakom (Li i Schroeder, 1996). Pasji trn je dalje podijeljen u osam podvrsta od kojih je *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Turkestanica* najpoznatija (Suryakumar i Gupta, 2011).

Biljka je izdržljiva i može podnijeti ekstremne temperature od -40 do 40 °C. Otporna je na sušu, što se pripisuje obliku i strukturi listova. Zbog prostranog sustava korijenja, pasji trn je idealna biljka za kontrolu erozije tla i melioraciju zemljišta (Stobdan i sur., 2011). Također, korijenje je u stanju transformirati netopive organske i mineralne tvari u tlu u topljivija stanja (Li i Schroeder, 1996). Općenito, radi dobre prilagodljivosti, brzog rasta, sposobnosti zaštite od nanosa vjetra i pijeska, poboljšavanju tla učinkovitom fiksacijom dušika, omogućena je njegova široka primjena u obnavljanju i održavanju bioraznolikosti ekosustava (Wani i sur., 2016).

2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA

U različitim dijelovima biljke identificirani su različiti kemijski spojevi ovisno o klimatskim uvjetima, podrijetlu, sastavu tla, primjeni gnojiva, stupnju zrelosti i metodama ekstrakcije. Utvrđeno je prisustvo preko 190 bioaktivnih spojeva te se iz tog razlika smatra biljkom visokog potencijala u prehrambenim i zdravstvenim svrhama (Pundir i sur., 2020).

Plodovi pasjeg trna su sočne bobice koje su nutritivno vrlo bogate, a građene su od pulpe (68 %), sjemena (23 %) i kore (7,7 5%) (Stobdan i sur., 2011). Bobice su izvor mnogih vitamina, a posebice vitamina C (695 mg 100 g⁻¹) kojeg ima više nego u narančama i limunu. Ostali prisutni vitamini su: B1, B2, B9, E, K i A. Sok dobiven iz pulpe bobica, izuzetno je bogat esencijalnim aminokiselinama, proteinima, mineralima (K, Ca, Mg, P, Zn, Cu, Fe i Se) te organskim kiselinama (kininska kiselina, maleinska kiselina, vinska kiselina i oksalna kiselina). Osim toga, bobice sadrže visok udio karotenoida (3-15 mg 100 g⁻¹) koji je odgovoran za specifičnu boju bobica. Nadalje, bobice sadrže veliku količinu šećera, najviše fruktoze i glukoze, čija vrijednost značajno varira (0,6 -24,2 g 100 ml⁻¹) (Pundir i sur., 2020). S obzirom da bobice obiluju različitim masnim kiselinama, glavni proizvod je ulje koje se može ekstrahirati iz sjemenki ili

pulpe. Općenito, pulpa sadrži 4-13 % ulja, a sjemenke 8-20 % (Krejcarova i sur., 2015). Prema Ciesarova i sur. (2020) ulje dobiveno iz pulpe sadrži približno 48 % zasićenih masnih kiselina (palmitinska kiselina) i 52 % nezasićenih masnih kiselina kao što su palmitoleinska (ω -7, 29 %), oleinska (ω -9, 18 %), linolna (ω -6, 4 %) i linolenska kiselina (ω -3, 2 %). Ulje obiluje visokim sadržajem rijetke ω -7 masne kiseline čiji stvarni sadržaj varira u širem rasponu (20-45 %), a ovisi o podrijetlu biljke. Nasuprot tome, ulje dobiveno iz sjemenki sadrži neznatan udio palmitoleinske kiseline (ω -7) te niži udio zasićenih masnih kiselina (10-13 %) od kojih su dominantne palmitinska (7-9 %) i stearinska (2,5-3 %) kiselina. Što se tiče nezasićenih masnih kiselina, u velikom udjelu prisutne su: linolna kiselina (ω -6, 37-44 %), linolenska kiselina (ω -3, 27-31 %) i oleinska kiselina (ω -9, 17-20 %). Smatra se da je jedino ulje koje sadrži idealan omjer (1:1) ω -6 i ω -3 masnih kiselina.

Lišće pasjeg trna sadrži mnoge hranjive i bioaktivne tvari koje uglavnom uključuju flavonoide, karotenoide, slobodne i esterificirane sterole, triterpenole i izoprenole. Osim toga, lišće je jednako bogat izvor važnih antioksidansa, uključujući β -karoten, vitamin E, vitamin C (do 370 mg 100 g⁻¹) (Krejcarova i sur., 2015), katehine, elaginsku kiselinu, ferulinsku kiselinu, folnu kiselinu, te značajnih minerala (Ca, Mg i K) (Suryakamur i Gupta, 2011). Guan i sur. (2006) izvijestili su da je lišće vrijedan izvor klorofila (98,8 mg 100 g⁻¹) uz karotenoide (26,3 mg 100 g⁻¹), dok se sadržaj flavonoida kreće u razmjerima od 312 do 2100 mg 100 g⁻¹ sušenog lišća (Stobdan i sur., 2011). Proteini su, također, jedna od važnijih komponenti (15-20 %) zbog čega se listovi mogu koristiti u životinjskoj prehrani ili kao nekonvencionalni izvor proteina u prehrani ljudi. Međutim, koncentracija proteina u listu značajno varira ovisno o terminu berbe, a najviša koncentracija se postiže krajem srpnja i početkom kolovoza (Stobdan i sur., 2011). Usporedba kemijskog sastava ploda i lista pasjeg trna prikazana je u tablici 1 iz koje je vidljivo da se vrijednosti za list i plod značajno razlikuju.

Tablica 1. Prosječan kemijski sastav ploda i pasjeg trna (Ciesarova i sur., 2020; Biel i Jaroszevska, 2017)

Nutrijenti (g kg ⁻¹ suhe tvari)	Plod	List
<i>Ukupni ugljikohidrati</i>	394	579
<i>Masti</i>	404	61
<i>Proteini</i>	93	249
<i>Pepeo</i>	40	48
<i>Vlakna</i>	67,5	122

2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA PASJEG TRNA

2.3.1. Fenolni spojevi

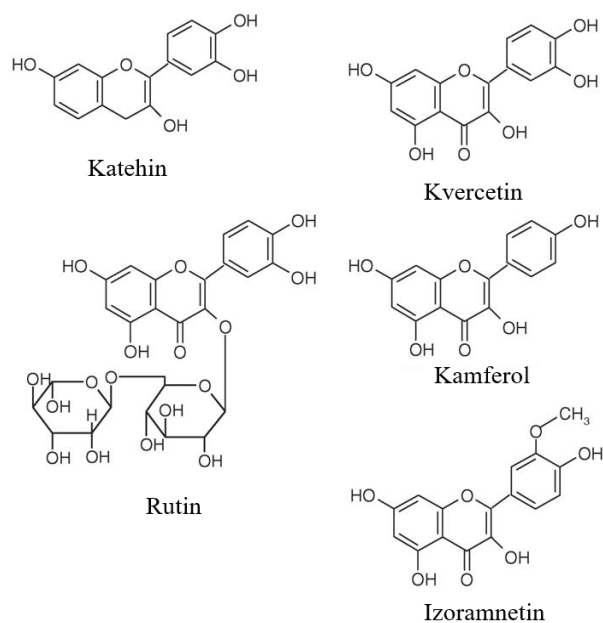
Fenolni spojevi čine raznoliku skupinu fitokemikalija nađenu u mnogim vrstama biljnog carstva, a kao sekundarni biljni metaboliti imaju širok raspon struktura i funkcija. Smatraju se najvažnijim i sveprisutnim spojevima, a sintetiziraju se tijekom normalnog razvoja biljke te kao odgovor na različite situacije, poput stresa i UV zračenja (Naczki i Shahidi, 2004). Osim što pridonose senzorskim karakteristikama i nutritivnoj vrijednosti voća i povrća, biljci pružaju učinkovitu zaštitu od patogena i grabežljivaca. Pokazuju dobra svojstva kao prehrambeni konzervansi, njihova primjena je moguća i u brojnim drugim industrijama, primjerice mogu se koristiti kao prirodna bojila, u proizvodnji papira ili u kozmetičkoj industriji (Ignat i sur., 2011). Nadalje, mnoge studije potvrđuju važnost prehrane obogaćene polifenolima kako bi se izbjegla oksidativna oštećenja koja dovode do starenja i bolesti, budući da oni djeluju kao antioksidansi koji sprečavaju štetno djelovanje reaktivnih vrsta kisika (ROS) (Haminiuk i sur., 2012).

Njihova široka rasprostranjenost i raznolikost dovela je do više načina po kojima se kategoriziraju, stoga se dijele prema izvoru podrijetla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi (Tsao, 2010). Osnovu strukture čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a njihove se strukture mogu kretati od jednostavnih fenolnih molekula do polimera visokih molekulskih masa. Trenutno je poznato više od 8000 različitih fenolnih spojeva, dok je među njima oko 4000 iz skupine flavonoida (Ignat i sur., 2011). Prema kemijskoj strukturi, dijele se na flavonoide, fenolne kiseline, tanine (hidrolizirajući i kondenzirani), stilbene i lignane (D'Archivio i sur., 2007).

Fenolne kiseline su neflavonoidni spojevi koji se dalje dijele na dvije podgrupe, a razlikuju se prema osnovnoj skeletnoj strukturi: hidroksicimetne kiseline (C6-C3) i hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1). Općenito su više zastupljene hidroksicimetne kiseline, a najčešći predstavnici su: kafeinska, ferulinska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina. S druge strane, u najčešće hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se: galna, vanilinska, siriginska i protokatehinska kiselina (Tsao i sur., 2010). Flavonoidi su građeni od 3 prstena, tako da osnovu strukture čine dva aromatska prstena A i B koja su spojena preko heterocikličkog prstena C (C6-C3-C6). Varijacijama prstena C, flavonoidi se mogu dalje podijeliti na flavonole, flavone, flavanone, flavanole i antocijanidine (Ignat i sur., 2011).

Svi dijelovi pasjeg trna – bobice, korijenje, lišće, stabljike i grane sadrže razne vrste fenolnih spojeva, uključujući flavonoide, tanine i fenolne kiseline koje su odgovorne za antimikrobni i antioksidacijski potencijal biljke. Od svih navedenih, spojevi iz skupine flavonoida su najviše zastupljeni u pasjem trnu, posebice flavonoli. Nalaze se uglavnom u glikoziliranim oblicima izoramnetina, kvercetina, miricetina i kamferola. Najzastupljeniji ostaci šećera u glikozidima su glukoza i galaktoza, iako su pronađeni i ostaci ramnoze, ksiloze i arabinoze. Glikozidi izoramnetina, a zatim kvercetin glikozidi su tipično najvažniji flavonoli pronađeni u plodovima i lišću. Općenito, koncentracija flavonol glikozida u lišću je viša za oko 15 puta nego u plodovima (Ciesarova i sur., 2020).

Morgenstern i sur. (2014) su u svom istraživanju odredili fenolni sastav listova prikupljenih s područja Švedske te je praćena fluktuacija identificiranih fenolnih spojeva ovisno o terminu berbe, u periodu od kraja travnja do kraja srpnja. HPLC-MS (eng. *high pressure liquid chromatography-mass spectrometry*) analizom izolirani i kvantificirani su: rutin (387-1310 $\mu\text{g g}^{-1}$), kvercetin (332-1381 $\mu\text{g g}^{-1}$), katehin (191-958 $\mu\text{g g}^{-1}$), kamferol-3-*O*-glukozid (56-101 $\mu\text{g g}^{-1}$), kvercetin-3-*O*-galaktozid (205-458 $\mu\text{g g}^{-1}$), izoramnetin-3-*O*-glukozid (254-339 $\mu\text{g g}^{-1}$), galna kiselina (39-304 $\mu\text{g g}^{-1}$), procijanidin monomer glikozid (5-383 $\mu\text{g g}^{-1}$), procijanidin dimerni aglikon (38-205 $\mu\text{g g}^{-1}$), kamferol (2,8–4,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) i epigalokatehin (23-48 $\mu\text{g g}^{-1}$) (slika 2). Promjene koncentracija spojeva kroz različite termine berbe specifične su za svaki pojedini spoj pa se tako koncentracija kamferol-3-*O*-glukozida, kvercetin-3-*O*-galaktozida i rutina smanjila tijekom kasnijih perioda berbe, a koncentracija katehina i kvercetina proporcionalno raste. Koncentracije kamferola i epigalokatehina se nisu značajno mijenjale. Nadalje, određena je i koncentracija ukupnih fenola, a najveća zabilježena je na kraju srpnja i iznosi 203 ± 4 mg GAE g^{-1} s.t. FRAP analizom određen je antioksidacijski potencijal koji je u korelaciji sa ukupnim fenolima i iznosi 276 ± 4 mmol Fe^{2+} 100 g^{-1} s.t.. Pop i sur. (2013) odredili su sadržaj ukupnih flavonoida u listovima šest različitih kultivara s područja Rumunjske. Zabilježen je udio ukupnih flavonoida u rasponu od $868 \pm 33,4$ mg RE 100 g^{-1} s.t. do $1356,5 \pm 123$ mg RE 100 g^{-1} s.t, čime je utvrđeno da udio ukupnih flavonoida te udio svakog pojedinog spoja značajno ovisi o sorti. UHPLC/PDA-ESI/MS (eng. *ultra high performance liquid chromatography/photodiode array detector-electrospray ionization mass spectrometry*) analizom identificirano je ukupno 19 komponenti, a najvažniji detektirani su: kvercetin-3-heksozid, izoramnetin-3-heksozid, izoramnetin-3-glukozid-7-ramnozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid-7-ramnozid i kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid.



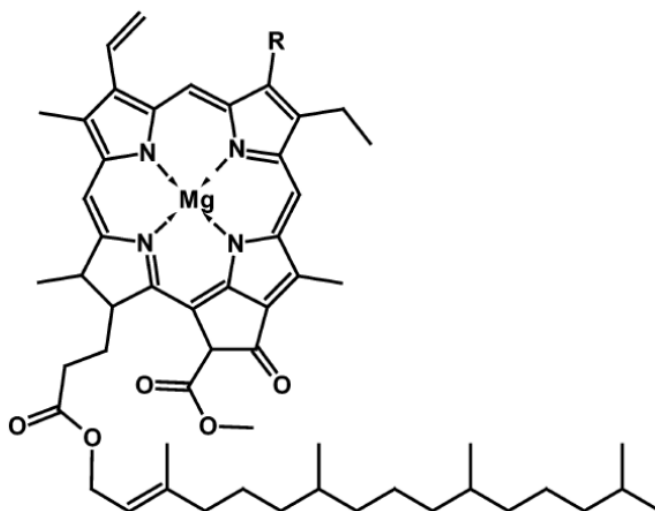
Slika 2. Kemijske strukture najznačajnijih flavonoida u ekstraktima lista pasjeg trna (Zu i sur., 2006)

Arimboor i sur. (2008) utvrdili su udio fenolnih kiselina prisutnih u listovima pasjeg trna sakupljenih s područja Himalaja, uzgajanih u regiji Ladakh. Prema njihovom izvješću, 67,8 % fenolnih kiselina se nalazi u obliku estera, dok se u slobodnom obliku, odnosno kao glikozidi, nalazi 21,1 % i 16,1 % ukupnih fenolnih kiselina. Kao dominantna, ističe se galna kiselina koja čini 84,6 % ukupne koncentracije fenolnih kiselina. Udio galne kiseline iznosi 4222 mg kg^{-1} , zatim slijede *p*-hidroksibenzojeva kiselina, cimetna kiselina i ferulinska kiselina, čiji udjeli iznose 247 mg kg^{-1} , 238 mg kg^{-1} i 175 mg kg^{-1} . U manjih udjelima zabilježene su i protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina i kafeinska kiselina u udjelima od 50 mg kg^{-1} i $37, 18 \text{ mg kg}^{-1}$.

Criste i sur. (2020) navode da je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida veći u listovima nego u plodovima. Usporedbom 4 različita kultivara s područja Rumunjske određen je udio ukupnih fenola u plodovima u rasponu od $10,12 \pm 0,26 \text{ mg GAE g}^{-1}$ do $14,61 \pm 0,4 \text{ mg GAE g}^{-1}$ i flavonoida od $6,57 \pm 0,13 \text{ mg QE g}^{-1}$ do $9,01 \pm 0,23 \text{ mg QE g}^{-1}$, dok je za listove sadržaj ukupnih fenola zabilježen u rasponu od $41,60 \pm 0,62 \text{ mg GAE g}^{-1}$ do $48,12 \pm 0,48 \text{ mg GAE g}^{-1}$ i flavonoida od $31,53 \pm 0,63 \text{ mg QE g}^{-1}$ do $36,58 \pm 0,18 \text{ mg QE g}^{-1}$.

2.3.2. Pigmenti

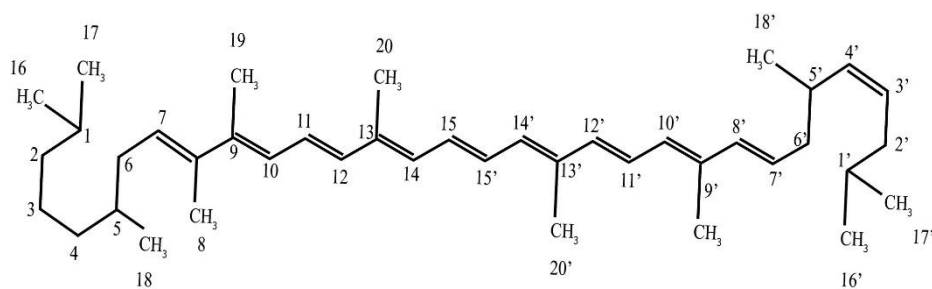
Klorofil je biljni pigment koji biljkama, algama i cijanobakterijama daje karakteristično zelenu boju te je primarni pigment koji se koristi u fotosintezi biljaka. Dva glavna klorofila su klorofil *a* i *b* koji koegzistiraju skupa u omjeru 3:1 (Humphrey, 2006). Osnovna kemijska struktura klorofila prikazana je na slici 3, a čini je ciklični porfirin koji se sastoji od četiri pirolna prstena, a svaki prsten pirola sadrži četiri atoma ugljika i jedan atom dušika. Svi atomi dušika okrenuti su prema unutra stvarajući središnji prostor u koji se lako veže metalni ion Mg^{2+} . Klorofil *a* sadrži metilnu skupinu na prstenu B, dok klorofil *b* na istom ugljikovom atomu ima aldehidnu skupinu. Ova strukturalna razlika rezultira klorofilom *a* plavo/zelenom bojom s maksimalnom apsorbancijom od 660 do 665 nm, a klorofilom *b* zeleno/žutom s maksimalnom apsorbancijom od 642 do 652 nm (Hosikian i sur., 2010).



Slika 3. Kemijska struktura klorofila *a* ($R=CH_3$) i klorofila *b* ($R=CHO$) (Mortensen, 2006)

Karotenoidni spojevi su topljivi u mastima, prirodno su prisutni u biljkama, gljivama, bakterijama i algama. Kao pigmenti, odgovorni su za crvenu, narančastu i žutu boju različitog voća i povrća u kojima se nalaze, gdje je intenzitet boje povezan s količinom prisutnih karotenoida. Pripadaju skupini izoprenoida, a osnovnu strukturu čini osam izoprenskih jedinica tvoreći kostur od 40 C atoma (slika 4). Prema strukturi se mogu dalje podijeliti na karotene koji sadrže samo atome ugljika i vodika, te ksantofile koji sadrže jedan ili više atoma kisika (Bhatt i Patel, 2020). Glavni predstavnici karotena su likopen, α -karoten i β -karoten, dok se u najznačajnije predstavnike ksantofila ubrajaju lutein, β -kriptoksantin i zeaksantin. Karoteni se

smatraju prekursorima vitamina A, odnosno imaju sposobnost stvaranja vitamina A (retinola) radi posjedovanja β -iononskog prstena u svojoj strukturi, uz prisustvo enzima dioksigenaze (Nabi i sur., 2020). Poznato je oko 700 karotenoida u prirodi, od kojih je samo 50-ak s prekursorskom aktivnošću, a najznačajniji su α - i β -karoten te β -kriptoksantin. Također, karotenoidi su povezani s mnogim zdravstvenim benefitima, djeluju antioksidacijski, preveniraju bolesti srca i krvnih žila, degenerativne te druge kronične bolesti (Amorim-Carrilho i sur., 2014).



Slika 4. Osnovna kemijska struktura karotenoida (Nabi i sur., 2020)

Udio ukupnih karotenoida u svježem lišću pasjeg trna iznosi 26,3 mg 100 g⁻¹ što je više nego u špinatu (17,7 mg 100 g⁻¹) i drugom zelenom povrću uključujući zelenu salatu, artičoku, šparoge, prokulice i zelenu papriku. Što se tiče klorofila, njegov udio u svježem lišću iznosi 98,8 mg 100 g⁻¹, podjednako kao u špinatu (93,4 mg 100 g⁻¹), a mnogo više od udjela prisutnog u brokoli, kupusu i prokulicama. Sušenjem lišća, koncentracije karotenoida i klorofila se značajno smanjuju, stoga su Guan i sur. (2006) ispitali utjecaj temperature sušenja na koncentracije spomenutih spojeva. Utvrđeno je da se koncentracija karotenoida značajno smanjila (s 0,616 mg g⁻¹ s.t. na 0,412 mg g⁻¹ s.t.) kako se temperatura povećavala (50, 60, 80, 100 °C). Zabilježen je ukupan pad karotenoida u suhom lišću za 42-64 % u odnosu na svježe lišće, ovisno o primijenjenoj temperaturi. Slično tome, koncentracija klorofila se sušenjem smanjila (s 2,222 mg g⁻¹ s.t. na 1,156 mg g⁻¹ s.t.) što čini ukupan gubitak od 45-72 %.

Pop i sur. (2014) svojim istraživanjem odredili su udio ukupnih karotenoida listova u šest različitih kultivara sa područja Rumunjske u rasponu 3,5-4,2 mg 100 g⁻¹ s.t. Identifikacijom i kvantifikacijom pokazalo se da sve sorte sadrže jednake pigmente s minimalnim razlikama u koncentraciji, izuzev zeaksantina koji je zabilježen u samo 3 kultivara. Prema koncentracijama, od najviše prema najmanjoj, prisutni su: lutein (0,8-1,0 mg 100 g⁻¹), β -karoten (0,7 – 0,9 mg

100 g⁻¹), violaksantin (0,5-0,6 mg 100 g⁻¹), neoksantin (0,5-0,6 mg 100 g⁻¹) i zeaksantin (0,5-0,6 mg 100 g⁻¹). Od klorofila, identificirani su: klorofil *a*, feofitin *a* i klorofil *b*.

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA PASJEG TRNA

Antioksidansi se definiraju kao kemijske tvari koje sprečavaju oksidaciju tvari podložnih oksidaciji (npr. lipidi) tako što onemogućuju djelovanje oksidansa (slobodnih radikala) kada su oni u suvišku, odnosno kada su iznad koncentracije potrebne za odvijanje normalnih fizioloških procesa (Halliwell, 1990). U biološkim sustavima, antioksidansi štite od oksidativnih oštećenja, pomažu u prevenciji kardiovaskularnih, kancerogenih i neuroloških bolesti (André i sur., 2010).

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti te su poznati po svojim antioksidacijskim učincima, a smatra se da je njihova antioksidacijska moć veća nego od vitamina C, E i karotenoida. Prema literaturnim navodima, uočena je određena korelacija između povećanog unosa voća i povrća koje je bogato fenolnim spojevima i smanjene učestalosti oboljevanja od raznih bolesti (Fernandez-Pancho i sur., 2008). Antioksidacijski potencijal fenola ovisi o njihovoj strukturi, točnije broju i položaju hidroksilnih skupina. Djeluju kao donori atoma vodika ili elektrona, stabilizirajući tako slobodne radikale (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Postoje različite analitičke metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti a dijele se na: spektrofotometrijske, elektrokemijske i kromatografske tehnike (Ahmad i sur., 2014). FRAP metoda koja je u ovome radu korištena za određivanje antioksidacijske aktivnosti lista pasjeg trna pripada spektrofotometrijskim metodama, a temelje se na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s molekulom antioksidansa koja donira atom vodika. FRAP metoda se temelji na redukciji kompleksa Fe³⁺ iona s 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazinom (Fe³⁺ - TPTZ) u kompleks Fe²⁺ - TPTZ djelovanjem antioksidansa prisutnih u uzorku. Rezultat je pojava plavog obojenja, a apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 593 nm (Kumar i sur., 2017).

Radi znatnog udjela fenolnih spojeva prisutnih u listu pasjeg trna, u različitim ekstraktima određene su značajne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Tako su Upadhyay i sur. (2010) odredili antioksidacijski kapacitet u vodenom ekstraktu lista pasjeg trna FRAP metodom u iznosu 114,68 ± 2,70 mg TE g⁻¹ s.t., dok je korištenjem 70 %-tnog etanola kao otapala dobivena viša vrijednost koja iznosi 153,42 ± 2,80 mg TE g⁻¹ s.t. Nadalje, primjenom ABTS metode (eng. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) dobivene su nešto više vrijednosti pa

antioksidacijska aktivnost u vodenom ekstraktu iznosi $119,86 \pm 3,18$ mg TE g⁻¹ s.t., dok je u etanolnom ekstraktu dobivena vrijednost $166,67 \pm 4,15$ mg TE g⁻¹ s.t.

2.5. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Ekstrakcija predstavlja jedan od najvažnijih koraka u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala te omogućuje daljnju separaciju i identifikaciju izoliranih komponenti u dobivenim ekstraktima. Princip ekstrakcije zasniva se na primjeni različitih otapala, tako da dolazi do otapanja i prijenosa topljivih komponenata iz početnog materijala u otapalo (Azwanida, 2015). Izbor ekstrakcijske metode ovisi o kemijskoj strukturi spojeva jer od nje zavisi njihova topljivost i sposobnost izolacije iz početnog materijala. Spojevi velike molekulske mase često su netopljivi, a isto vrijedi i za spojeve koji se nalaze u kompleksu sa ugljikohidratima i drugim biljnim komponentama. Radi olakšanja postupka ekstrakcije, često se koriste metode za pripremu uzoraka kao što su sušenje, homogenizacija, filtriranje i mljevenje (Alara i sur., 2021). Također, bitan je i izbor otapala koji ovisi o polarnosti ciljanih spojeva koji se žele ekstrahirati. Najčešće se primjenjuju etanol, metanol, aceton, etil acetat te njihove kombinacije s vodom (Naczki i Shahidi, 2004).

Postoje različite metode ekstrakcije, a najčešće se dijele na konvencionalne i nekonvencionalne. Općenito, idealna metoda ekstrakcije treba biti kvantitativna, nedestruktivna te uštedjeti vrijeme (Yang i sur., 2011).

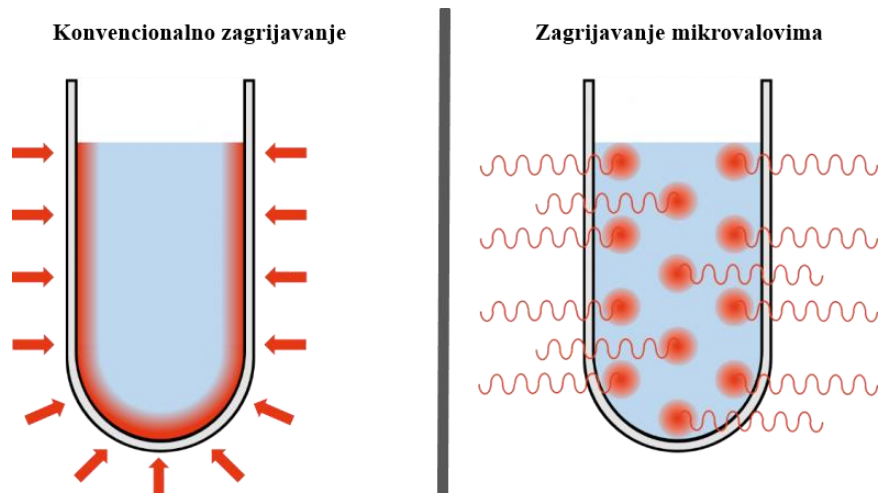
Konvencionalne metode smatraju se tradicionalnim načinom ekstrakcije. Temelje se na ekstrakcijskoj moći otapala, primjeni topline i miješanja, a sve u svrhu poboljšanja topljivosti i učinkovitosti prijenosa mase. Najznačanije su: maceracija, hidrodestilacija i Soxhlet ekstrakcija (Azmir i sur., 2013). Iako ove metode i dalje imaju široku upotrebu radi dobre uhodanosti same tehnike ekstrakcije i niske cijene, njihova primjena rezultira malim prinosima ekstrakcije, velikom potrošnjom energije i dugim trajanjem cijelog procesa (Yang i sur., 2011). Osim toga, dolazi do isparavanja velike količine otapala, a samo otapalo koje se primjenjuje je obično skupo i trebalo bi biti visoke čistoće. Nadalje, selektivnost ekstrakcije je niska, a radi primjene visokih temperatura dolazi do termičke degradacije termolabilnih spojeva što sve utječe na kvalitetu i konačan prinos izoliranih bioaktivnih spojeva. Kako bi se izbjegli nedostaci konvencionalnih metoda, u posljednje vrijeme pribjegava se primjeni novijih, nekonvencionalnih metoda. U te metode ubrajaju se: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

(MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta enzimima (EAE), ekstrakcija tekućinama pri povišenom tlaku (PLE), ekstrakcija superkričnim CO₂ (SC-CO₂), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (PEF), ekstrakcija superkričnim fluidom (SFE) i ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišen tlak (ASE). Prema literaturnim podacima, navedene metode nude brojne prednosti, uključujući manju toksičnost, smanjenu potrošnju ekstrakcijskih otapala, povećanu selektivnost, veći ekstrakcijski prinos, bolju ponovljivost procesa i kraće vrijeme ekstrakcije. U skladu sa svime navedenim, smatraju se „zelenim“ tehnologijama koje su manje štetne za okoliš (Alara i sur., 2021; Azmir i sur., 2013).

2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Mikrovalovi su neionizirani elektromagnetski valovi, a kao dio elektromagnetskog spektra smješteni su između radiovalnog područja i infracrvenog zračenja. Područje mikrovalova nalazi se unutar frekvencijskog raspona od 300 MHz to 300 GHz i valnom duljinom od 1 mm do 1 m. 915 MHz se smatra najkorisnijom u industrijskoj primjeni, dok se frekvencija 2450 MHz koristi u kućanstvu (mikrovalne pećnice) i u analitičke svrhe što odgovara snazi od 600-700 W (Routray i Orsat, 2012; Altehmimi i sur., 2017).

Djelovanjem mikrovalova dolazi do zagrijavanja posredstvom dva mehanizma: rotacije dipola i ionske kondukcije, a djeluju istovremeno. Za razliku od konvencionalnog zagrijavanja gdje se zagrijavanje vrši izvana prema unutra (konvekcijom i kondukcijom) na temelju temperaturnog gradijenta, ovdje elektromagnetski valovi djeluju izravno na polarne molekule ciljanog materijala ili otapala koje apsorbiraju energiju mikrovalova čime se ona transformira u toplinu (slika 5). Rotacija dipola dešava se pod djelovanjem promjenjivog električnog polja koje se mijenja $4,9 \times 10^4$ puta s^{-1} , a dipolne molekule pokušavaju se uskladiti i prilagoditi brzim promjenama električnog polja. To posljedično dovodi do njihove vibracije i oslobađanja topline radi trenja. Zagrijavanje uzrokuje gubitak vlage isparavanjem u stanicama biljnog materijala, stanica bubri, te pod pritiskom dolazi do puknuća stanične stijenke i oslobađanja bioaktivnih komponenata u okolni medij. Slično tome djeluje i ionska kondukcija. Promjena elektromagnetskog polja djeluje na kretanje iona što uzrokuje otpor okolne otopine, a konačan rezultat je pojava trenja i zagrijavanje otopine (Veggi i sur., 2013; Khoddami i sur., 2013).



Slika 5. Razlika zagrijavanja kod konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Anonymous 2, 2021)

Dielektrični faktor rasipanja ($\tan \delta$) se smatra najvažnijim svojstvom pri primjeni mikrovalova, a izražava sposobnost materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i odvodi toplinu na okolne molekule što utječe na učinkovitost mikrovalnog zagrijavanja. Stupanj apsorpcije mikrovalne energije ovisi o dielektričnoj konstanti, a ona je veća kod polarnijih otapala, stoga izbor otapala ima velik utjecaj na učinkovitost ekstrakcije (Veggi i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima koristi se za ekstrakciju bioaktivnih spojeva radi bržeg zagrijavanja, samim time i kraćeg trajanja cijelog procesa, a dobiveni ekstrakcijski prinosi su veći u odnosu na konvencionalne tehnike. Također, odlikuje se većom selektivnosti, a ubraja se u „zelene“ tehnike radi smanjene potrošnje otapala (Azmir i sur., 2013). S druge strane, primjena mikrovalova limitirana je na spojeve manjih masa kao što su fenolne kiseline (galna kiselina i elaginska kiselina), kvercetin, izoflavin i *trans*-resveratrol koje su stabilne zagrijavanjem do 100 °C tijekom 20 min, dok će polimeri većih molekulskih masa (tanini i antocijanini) biti podložni degradaciji na visokim temperaturama (Azwanida, 2015).

Komercijalno su u upotrebi dvije vrste sustava: otvoreni i zatvoreni. Zatvoreni MAE sustavi primjenjuju se pri kontroliranim uvjetima tlaka i temperature, a općenito se koriste za potrebe ekstrakcije pri drastičnim uvjetima kao što su povišena temperatura, dok tlak u posudi ovisi o volumeni i vrelištu otapala. Otvoreni MAE sustavi djeluju pri atmosferskom tlaku gdje je maksimalna temperatura određena točkom vrelišta otapala (Wang i Weller, 2006). Izuzev otvorenog i zatvorenog tipa sustava, modificirane su i druge metode ekstrakcije temeljene na kombinaciji mikrovalova i drugih tehnika ekstrakcije, a sve u svrhu daljnjeg unapređenja

procesa ekstrakcije. Najznačajnije su: vakumska ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *vacuum microwave-assisted extraction*, VMAE), ultrazvučna ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *ultrasonic microwave-assisted extraction*, UMAE) dinamična ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *dynamic microwave-assisted extraction*, DMAE) i ekstrakcija bez otapala potpomognuta mikrovalovima (eng. *solvent-free microwave-assisted extraction*, SFME) (Chan i sur., 2011).

2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Učinkovitost ekstrakcije izravno je povezana s optimizacijom parametara koji utječu na mehanizam procesa ekstrakcije i dobiveni prinos. Prije provođenja ekstrakcije, bitno je poznavati biljni materijal i karakteristike spojeva koji se žele izolirati kako bi se odredili uvjeti i parametri koji će dati što veće iskorištenje procesa.

Odabir otapala je od primarne važnosti za kvalitetno provođenje ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Pravilan odabir ovisi o topljivosti željenih spojeva, prodiranju otapala i interakciji s matriksom uzorka te dielektričnoj konstanti (Veggi i sur., 2013). Također, otapalo bi trebalo imati visoku selektivnost prema željenim spojevima isključujući tako neželjene komponente matriksa (Mandal i sur., 2007). Kao što je ranije spomenuto, otapala s visokom dielektričnom konstantom bolje apsorbiraju energiju mikrovalova postižući tako bolje zagrijavanje pa se tako najčešće primjenjuju polarna otapala poput etanola, metanola, acetona i vode. Do sada, etanol je najčešće korišteno otapalo i smatra se idealnim za ekstrakciju mnogih bioaktivnih spojeva iz biljaka (Chan i sur., 2011). Nadalje, svojstva otapala mogu se modificirati njihovim kombiniranjem čime se postiže bolja selektivnost za spojeve koji se izoliraju. Tako se za izolaciju termolabilnih spojeva može rabiti kombinacija polarnih s nepolarnim otapalima (heksan, kloroform i toluen) čime će se spriječiti pregrijavanje uzorka te njihova degradacija (Khoddami i sur., 2013). Također, bitna se pokazala i koncentracija otapala koja utječe na učinkovitost ekstrakcije. Zhang i sur. (2009) primijenili su različite koncentracije etanola pri ekstrakciji rutina i kvercetina te je najveći ekstrakcijski prinos dobiven povećanjem koncentracije etanola s 30 % na 50 %, dok je s daljnjim povećanjem koncentracije etanola ekstrakcijski prinos fenolnih spojeva padao.

Snaga mikrovalova određuje količinu energije koju uzorak apsorbira i prevodi u toplinu, a samim time utječe na porast ekstrakcijskog prinosa uslijed povećanja temperature sustava.

Također, primjenom snage se djeluje na matriks čime se olakšava difuzija analita iz matriksa u otapalo. Stoga će povećanje snage rezultirati većim prinosom i kraćim vremenom ekstrakcije (Chan i sur., 2011). Obično se koristi kombinacija niske do umjerene snage kroz dulje vrijeme, a visoka snaga i produljeno vrijeme ekstrakcije dovodi do rizika od degradacije komponenti i smanjene učinkovitosti ekstrakcije (Mandal i sur., 2007).

Temperatura je još jedan od bitnih parametara pri optimiranju MAE jer utječe na povećanje ekstrakcijskog prinosa. Povećanje temperature uzrokuje povećanje intermolekularnih interakcija unutar otapala, a također utječe na porast tlaka unutar stanica biljnog materijala što rezultira puknućem stanica i boljim kontaktom oslobođenih bioaktivnih spojeva s otapalom. S druge strane, mnogim istraživanjima uočeno je da učinkovitost ekstrakcije raste povećanjem temperature dok se ne postigne optimalna temperatura, a zatim daljnjim povećanjem temperature ukupan prinos počinje padati što ovisi o termolabilnosti komponenti koje se izoliraju (Routray i Orsat, 2012). Tako su Tsubaki i sur. (2010) proveli ekstrakciju fenolnih spojeva oolong čaja gdje je najveći prinos dobiven pri 170 °C, koja se smatra optimalnom, a daljnjim temperaturnim povećanjem prinos je počeo padati.

Vrijeme trajanja ekstrakcije potpomognuto mikrovalovima je znatno kraće od konvencionalnih metoda, a obično varira od nekoliko minuta do pola sata. Trajanje ekstrakcije potrebno je prilagoditi karakteristikama uzorka kako bi se izbjegla oksidacija i degradacija termolabilnih spojeva uzrokovanih pregrijavanjem sustava. Iako dulje vrijeme ekstrakcije obično pridonosi povećanju prinosa ekstrakcije, utvrđeno je da je porast vrlo mali s daljnjim povećanjem vremena (Veggi i sur., 2013). Ako postoji potreba za duljim trajanjem procesa, rizik od degradacije može se smanjiti uvođenjem više ciklusa ekstrakcije. U tom slučaju, dodaje se svježe otapalo u prvotni uzorak i ponavlja postupak čime se postiže veći prinos izbjegavajući tako dugo zagrijavanje (Chan i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Kao materijal za istraživanje korišten je list pasjeg trna ubran na području Hrvatskog zagorja, Hrvatska u srpnju 2020. godine. Uzorci lišća su nakon branja očišćeni od mehaničkih nečistoća, liofilizirani, pakirani u vrećice te skladišteni na suhom i tamnom mjestu. Neposredno prije provođenja analiza, uzorak lišća je usitnjen u električnom mlinu.

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Mikrovalni reaktor (MILESTONE Ethos Easy, Sorisole (BG), Italija)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- Tehnička vaga (AXIS BTA2100D, Gdansk, Poljska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex miješač (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumily, Francuska)

Pribor:

- Menzure, volumena 50, 100 i 500 mL
- Staklene čaše, volumena 50, 100 i 200 mL
- Odmjerne tikvice, 50, 100 i 1000 mL
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapić
- Filter papir
- Pipete, volumena 5 i 10 mL
- Propipete
- Staklene epruvete i stalak za epruvete

- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL
- Staklene kivete
- Magnetski mješači
- Lađice za vaganje

3.1.3. Otapala i reagensi

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 70 % (v/v)
- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

- Standard galne kiseline

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

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

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

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- Trolox, 2 mM

Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista pasjeg trna primjenom MAE

Izolacija fenolnih spojeva, klorofila i karotenoida iz lista pasjeg trna provedena je primjenom MAE uz upotrebu 70 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije s najvišim prinosom, tijekom provođenja eksperimenta varirani su parametri: temperatura (40, 60 i 80 °C), snaga (300, 500 i 700 W), vrijeme (5, 10 i 15 min). Detaljan plan eksperimenta prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz plana optimiranja uvjeta MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)
1	40	300	5
2			10
3			15
4		500	5
5			10
6			15
7		700	5
8			10
9			15
10	60	300	5
11			10
12			15
13		500	5
14			10
15			15
16		700	5
17			10
18			15
19	80	300	5
20			10
21			15
22		500	5
23			10
24			15
25		700	5
26			10
27			15

Postupak ekstrakcije:

Odvaže se približno 1 g usitnjenog uzorka u ćeliju ekstraktora i homogenizira se s 40 mL otapala za ekstrakciju. Potom se u svaku ćeliju ubaci magnetni mješač te se postavljaju na rotor reaktora (slika 6). Na mikrovalnom ekstraktoru, postave se parametri temperature, snage i vremena ekstrakcije prema prikazu u tablici 2. Osim toga, postavlja se: snaga miješanja na 50 %, vrijeme zagrijavanja do željene temperature na 4 min, ventilacija i hlađenje nakon ekstrakcije na 2 min, a temperatura je održavana konstantnom tijekom postupka. Nakon završene ekstrakcije, uzorci se kvantitativno prenesu u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i do oznake nadopune 70 %-tnim etanolom. Pripremljeni uzorci prebace se u plastične epruvete (Falcon) i dobro zatvore. Ekstrakti se skladište pri temperaturi +4 °C do trenutka provođenja spektrofotometrijskih analiza.



Slika 6. Mikrovalni reaktor MILESTONE Ethos Easy (vlastita fotografija)

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

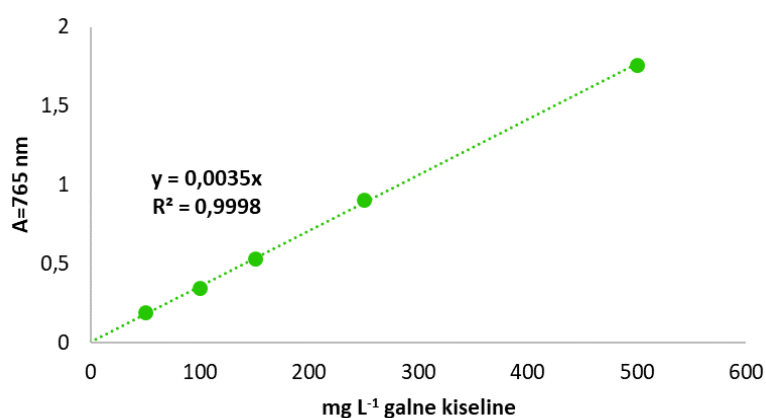
Određivanje ukupne koncentracije fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Nastali plavo obojeni kompleks intenzivniji je što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Zasićena otopina natrijeva karbonata (1 mL) dodaje se nakon 3 min. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol). Nakon toga slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pripremljenih uzoraka 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjernej tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 7). Koncentracija ukupnih fenola izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 7. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2=0,9998) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE g^{-1} lista pasjeg trna kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata

Princip određivanja:

Određivanje biljnih pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida) bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u etanolnom ekstraktu pri valnim duljinama 470, 649 i 664 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom) (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Postupak određivanja:

Kvantitativno određivanje biljnih pigmenata provodi se spektrofotometrijski pri sljedećim valnim duljinama: 648,6 i 664,1 za klorofil *a* i *b* (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom, etanolom) i 470 nm za karotenoide. Svako mjerenje provodi se najmanje u paraleli. Kao slijepa proba koristi se otapalo koje je korišteno za ekstrakciju (70 %-tni etanol). Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorpcije uzorka, a tako dobivena vrijednost koristi se za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Etanol:

$$c_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664,1} - 5,19 A_{648,6} \quad [2]$$

$$c_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{648,6} - 8,12 A_{664,1} \quad [3]$$

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

gdje je:

A = apsorbancija

c_a = klorofil *a*

c_b = klorofil *b*

$c_{(x+c)}$ = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila te ukupnih karotenoida izražene su u mg g^{-1} lista pasjeg trna kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

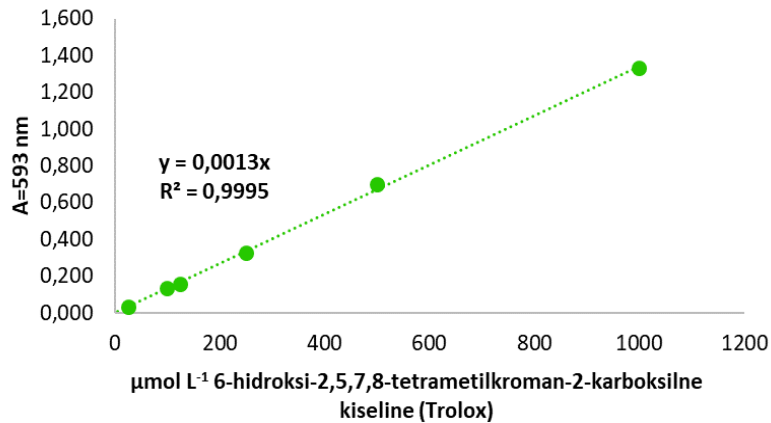
Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa (pomoću Vortexa) te 5 min termostatira pri $T=37^\circ\text{C}$. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom se nadopunjavaju do oznake 96 %-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pri $T=37^\circ\text{C}$. Apsorbancija se mjeri pri 593

nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 96 %-tni etanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 8). Antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2=0,9995) \quad [5]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ lista pasjeg trna kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Statistička obrada rezultata

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn na tri razine.

S ciljem optimiranja parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju bioaktivnih spojeva lista pasjeg trna ispitan je utjecaj temperature ekstrakcije (40, 60 i 80 °C), snage mikrovalova (300, 500 i 700 W) i vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) na udio ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista pasjeg trna. Za usporedbu uzoraka korištena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA).

Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je izolacija fenola te biljnih pigmenata (klorofil *a* i *b* te karotenoidi) iz lista pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE).

Prilikom MAE kao otapalo primijenjen je 70 %-tni etanol. S ciljem optimiranja uvjeta ekstrakcije, radi dobivanja najvećeg masenog prinosa uz što manji utrošak energije, varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (40, 60 i 80 °C), snaga mikrovalova (300, 500 i 700 W) te vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Nakon tretiranja mikrovalima, u dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, karotenoida te antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom. Svi dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu te prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija. Nadalje, provedena je statistička obrada u programskom sustavu Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD), a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

4.1. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA

Tablica 3. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE g⁻¹) izoliranih iz lista pasjeg trna primjenom MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Ukupni fenoli (mg GAE g ⁻¹)
1	40	300	5	72,08 ± 0,32
2			10	66,50 ± 0,74
3			15	72,55 ± 3,02
4		500	5	81,97 ± 6,84
5			10	78,88 ± 6,56
6			15	90,84 ± 5,06
7		700	5	65,14 ± 2,25
8			10	96,71 ± 8,12
9			15	93,91 ± 1,77
10	60	300	5	94,77 ± 6,58
11			10	79,57 ± 1,55
12			15	77,56 ± 1,15
13		500	5	77,19 ± 4,17
14			10	84,88 ± 2,63
15			15	105,46 ± 6,60
16		700	5	107,79 ± 5,57
17			10	78,69 ± 0,31
18			15	79,35 ± 3,30
19	80	300	5	86,66 ± 4,31
20			10	91,92 ± 0,42
21			15	93,64 ± 2,06
22		500	5	97,07 ± 5,00
23			10	86,47 ± 6,25
24			15	99,55 ± 2,58
25		700	5	81,98 ± 6,52
26			10	77,96 ± 1,89
27			15	84,92 ± 5,31

Kako je vidljivo iz prikaza rezultata u tablici 3, maseni udjeli ukupnih fenola u listovima pasjeg trna nakon provedene ekstrakcije određeni su u rasponu 65,14 ± 2,25 mg GAE g⁻¹ do 107,79 ± 5,57 mg GAE g⁻¹ s prosječnom vrijednošću od 85,34 ± 1,54 mg GAE g⁻¹ (tablica 4). Najviši maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku broj 16 (107,79 ± 5,57 mg GAE g⁻¹) pri temperaturi od 60 °C, primijenjenoj snazi 700 W te vremenu od 5 min, dok je najniži maseni udio dobiven u uzorku broj 7 (65,14 ± 2,25 mg GAE g⁻¹) pri 40 °C, snazi 700 W u trajanju od 5 min. Korekar i sur. (2011) odredili su maseni udio ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu

lista pasjeg trna u iznosu $61,00 \pm 0,75$ mg GAE g⁻¹ što je u skladu s najnižom vrijednošću dobivenom u ovom radu.

Tablica 4. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio ukupnih fenola lista pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg GAE g ⁻¹)
Temperatura (°C)	p < 0,05*
40	79,84 ± 1,04 ^a
60	87,25 ± 1,04 ^b
80	88,91 ± 1,04 ^b
Snaga (W)	p < 0,05*
300	81,69 ± 1,04 ^a
500	89,15 ± 1,04 ^b
700	85,16 ± 1,04 ^a
Vrijeme (min)	p < 0,05*
5	84,96 ± 1,04 ^a
10	82,40 ± 1,04 ^a
15	88,64 ± 1,04 ^b
Prosječna vrijednost	85,34 ± 1,54

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

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

U tablici 4 su prikazani rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio ukupnih fenola. U uzorcima 1-9 primijenjena je temperatura od 40 °C gdje dobivena prosječna vrijednost iznosi $79,84 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹, u uzorcima 10-18 primijenjena je temperatura od 60 °C s dobivenom prosječnom vrijednosti od $87,25 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹, dok je u nizu uzoraka 19-27 pri 80 °C prosječna vrijednost ukupnih fenola $88,91 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹. Iako je povećanjem temperature ostvaren veći prinos, promjenom temperaturnog režima sa 60 °C na 80 °C nije uočena statistički značajna razlika što je dokazano statističkom analizom. Primjerice, maseni udjeli u uzorcima 14 i 23 pri različitim temperaturama (60 i 80 °C), a istim parametrima snage i vremena (500 W i 10 min) iznose $84,88 \pm 2,63$ mg GAE g⁻¹ i $86,47 \pm 6,25$ mg GAE g⁻¹. Općenito vrijedi da se usporedno s povećanjem temperature povećava topljivost fenolnih spojeva te raste koeficijent prijenosa mase između matriksa materijala i ekstrakcijskog medija. To je posljedica degradacije stanične stijenke čime dolazi do prodora otapala u stanice pospješujući tako otapanje fenola (Asofiei i sur., 2016). Sukladno tome, porastom temperature ostvaruje se veći ekstrakcijski prinos pa samim time temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) pri određivanju ukupnih fenola iz lista pasjeg trna. Iako

temperatura ima pozitivan učinak na ekstrakciju fenolnih spojeva, Liazid i sur. (2007) su istraživali kakav utjecaj ima primjena viših temperatura (50-175 °C) na stabilnost fenolnih spojeva tijekom MAE. Ukupno su analizirana 22 fenolna spoja različitih kemijskih struktura te je nakon tretmana svih uzoraka u vremenu od 20 min zaključeno kako su svi spojevi stabilni do 100 °C, a daljnjim povećanjem na 125 °C uočena je značajna degradacija epikatehina, resveratrola i miricetina. Degradacija ovisi o strukturi pa su tako spojevi koji sadrže veći broj hidroksilnih grupa pokazali veću podložnost razgradnji.

Asofiei i sur. (2016) proveli su MAE lista pasjeg trna na 3 različite temperature (60, 90 i 120 °C). Iako se maksimalna koncentracija fenola najbrže postiže pri 120 °C (100 s vs. 450 s za 60 i 90 °C), ubrzo krene naglo padati što se može objasniti ubrzanom degradacijom fenola pri višoj temperaturi. Zaključeno je kako se optimalnom temperaturom može smatrati 90 °C, što je viša vrijednost od rezultata dobivenog u ovom radu. Isto tako, utvrđena je važnost otapala pa pri 60 °C, upotrebom 50 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala koncentracija ukupnih fenola se udvostručila (134,96 mg GAE g⁻¹) u odnosu na koncentraciju gdje je kao otapalo korištena voda (66,00 mg GAE g⁻¹) i 25 %-tni etanol (95,02 mg GAE g⁻¹). Istim istraživanjem ispitana je razlika MAE i konvencionalne ekstrakcije te je dobiveno da primjenom mikrovalova koncentracija fenola doseže svoj maksimum za 7,5 min, nasuprot konvencionalne metode koja istu koncentraciju postiže za 30 min. Time je dokazano da se primjenom mikrovalova znatno smanjuje vrijeme ekstrakcije i ukupan utrošak energije.

Daljnjom analizom dobivenih rezultata, utvrđeno je da osim temperature, snaga također pokazuje statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj na masene udjele ukupnih fenola. Tako u uzorcima s primijenjenom snagom 300 W prosječna vrijednost ekstrakata iznosi $81,69 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹, povećanjem na 500 W dobivena prosječna vrijednost je $89,15 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹, a pri 700 W iznosi $85,16 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹. Iz navedenog proizlazi da se vrijednost ukupnih fenola povećava s porastom snage na 500 W, dok se porastom snage na 700 W počinje smanjivati. Dahmoune i sur. (2015) su istraživali utjecaj snage mikrovalova na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva lista mirte te utvrđuju kako primjenom snage između 400 i 500 W raste maseni udio ukupnih fenola ($134,63$ mg GAE g⁻¹ – $152,25$ mg GAE g⁻¹), dok se daljnjim povećanjem snage vrijednost ukupnih fenola smanjuje što je u skladu s rezultatima ovoga rada. Isti rezultat dobiven je i u istraživanju Belwal i sur. (2017) u kojem je najveći prinos ukupnih fenola lista žutike (*Berberis asiatica* Roxb.) ostvaren primjenom snage od 500 W koja se smatra optimalnom.

Pri istim uvjetima temperature i snage, a s produljenjem trajanja ekstrakcije, uočeno je povećanje ukupnih fenola ispitivanih uzoraka. Nasuprot tome, predugo vrijeme ekstrakcije može dovesti do oksidacije ili promjene strukture fenolnih spojeva čime se smanjuje masene vrijednosti ispitivanih uzoraka (Proestos i sur., 2006). U ekstraktima pri vremenskom režimu od 5 min prosječna vrijednost ukupnih fenola iznosi $84,96 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹, dok u ekstraktima koji su tretirani 10 i 15 min dobivene vrijednosti iznose $82,40 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹ i $88,64 \pm 1,04$ mg GAE g⁻¹. Iz priloženih podataka, može se zaključiti da vrijeme kao parametar ekstrakcije statistički značajno utječe ($p < 0,05$) na prinos ukupnih fenolnih spojeva, iako se ekstrakcije provedene pri 5 i 10 min signifikantno ne razlikuju. Najveći prinos ukupnih fenola pri vremenu ekstrakcije od 15 min, zabilježen je u uzorku 15, pri 60 °C i 500 W, a iznosi $105,46 \pm 6,60$ mg GAE g⁻¹. Iako je najveća vrijednost ukupnih fenola zabilježena u uzorku 16 ($107,79 \pm 5,57$ mg GAE g⁻¹) pri 60 °C, 700 W i 5 min, ona se značajno ne razlikuje od one dobivene u uzorku 15 pri nižoj vrijednosti snage. Stoga se na temelju dobivenih rezultata i provedene statističke analize može zaključiti da su optimalni parametri ekstrakcije za izolaciju fenolnih spojeva iz lista pasjeg trna: temperatura 60 °C, snaga 500 W i vrijeme 15 min.

Sličan trend povećanja prinosa fenolnih spojeva u ovisnosti o trajanju ekstrakcije dokazan je istraživanjem Rafiee i sur. (2011) gdje su 3 različita varijeteta lista masline podvrgnuta ekstrakciji fenolnih spojeva primjenom mikrovalova. Maseni udjeli fenola određeni su u vremenskom intervalu od 2 do 15 min, a najveća vrijednost $42,852 \pm 0,17$ mg TAE g⁻¹ dobivena je u vodenom ekstraktu nakon 15 min. Također, u skladu s rezultatima ovog rada, vrijednosti masenih udjela u trajanju od 6 do 10 min se statistički značajno ($p < 0,05$) ne razlikuju.

4.2. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH KLOROFILA

Tablica 5. Maseni udjeli klorofila (mg g^{-1}) izoliranih iz lista pasjeg trna primjenom MAE

Uzorak	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Klorofil <i>a</i> (mg g^{-1})	Klorofil <i>b</i> (mg g^{-1})	Ukupni klorofili (mg g^{-1})
1	40	300	5	$0,68 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,00$	$0,97 \pm 0,01$
2			10	$0,76 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,06$
3			15	$0,81 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,03$
4		500	5	$0,59 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,01$
5			10	$0,65 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,05$
6			15	$0,69 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,01$
7		700	5	$0,72 \pm 0,00$	$0,36 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$
8			10	$0,71 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,00$
9			15	$0,75 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,04$
10	60	300	5	$0,86 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,00$	$1,30 \pm 0,01$
11			10	$0,81 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,01$
12			15	$0,92 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,02$
13		500	5	$0,81 \pm 0,00$	$0,36 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$
14			10	$0,77 \pm 0,00$	$0,43 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,03$
15			15	$0,78 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,00$
16		700	5	$0,84 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,04$
17			10	$0,61 \pm 0,00$	$0,53 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,04$
18			15	$0,85 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,02$
19	80	300	5	$0,54 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,02$
20			10	$0,67 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,00$	$1,06 \pm 0,02$
21			15	$0,63 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,02$
22		500	5	$0,70 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,01$	$1,20 \pm 0,00$
23			10	$0,74 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,00$	$1,26 \pm 0,01$
24			15	$0,59 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,01$
25		700	5	$0,78 \pm 0,00$	$0,56 \pm 0,00$	$1,35 \pm 0,01$
26			10	$0,75 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,02$
27			15	$0,78 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$1,28 \pm 0,01$

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 5, maseni udjeli klorofila *a* u listu pasjeg trna određeni su u rasponu od $0,54 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ do $0,86 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, nasuprot masenih udjela klorofila *b* koji se kreću u rasponu od $0,29 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ do $0,56 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$. Tako prosječna vrijednost klorofila *a* iznosi $0,73 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 6) što je za približno dva puta više u odnosu na prosječnu vrijednost klorofila *b* koja iznosi $0,42 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 6).

Najviši maseni udio klorofila *a* određen je u uzorku 10 ($0,86 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi 60°C , snazi 300 W i vremenu ekstrakcije od 5 min, nasuprot klorofila *b* određenog u uzorku 5 ($0,56 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi 40°C , snazi 500 W i vremenu ekstrakcije od 10 min. Najniži maseni udio klorofila *a* određen je u uzorku 19 ($0,54 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi 80°C , snazi mikrovalova 300 W i vremenu ekstrakcije 5 min, nasuprot klorofila *b* određenog u

uzorku 1 ($0,29 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, snazi mikrovalova 300 W u trajanju od 5 min .

Maseni udjeli ukupnih klorofila (klorofili *a* i *b*) ekstrahiranih iz lista pasjeg trna određeni su u rasponu od $0,89 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1}$ do $1,37 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 5) s prosječnom vrijednosti koja iznosi $1,15 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 6). Najviši maseni udio ukupnih klorofila određen je u uzorku 12 ($1,37 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, snazi mikrovalova 300 W i vremenu ekstrakcije od 15 min , dok je najniži maseni udio određen u uzorku 19 ($0,89 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, snazi 300 W , u trajanju od 5 min

Tablica 6. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio klorofila lista pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Klorofil <i>a</i> (mg g^{-1})	Klorofil <i>b</i> (mg g^{-1})	Ukupni klorofili (mg g^{-1})
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$
40	$0,71 \pm 0,00^b$	$0,39 \pm 0,01^a$	$1,10 \pm 0,01^a$
60	$0,80 \pm 0,00^c$	$0,42 \pm 0,01^b$	$1,23 \pm 0,01^c$
80	$0,69 \pm 0,00^a$	$0,45 \pm 0,01^c$	$1,14 \pm 0,01^b$
Snaga (W)	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$
300	$0,74 \pm 0,00^b$	$0,38 \pm 0,01^a$	$1,12 \pm 0,01^a$
500	$0,70 \pm 0,00^a$	$0,46 \pm 0,01^b$	$1,15 \pm 0,01^b$
700	$0,76 \pm 0,00^c$	$0,44 \pm 0,01^b$	$1,20 \pm 0,01^c$
Vrijeme (min)	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$	$p < 0,05^*$
5	$0,72 \pm 0,00^a$	$0,41 \pm 0,01^a$	$1,13 \pm 0,01^a$
10	$0,72 \pm 0,00^a$	$0,44 \pm 0,01^b$	$1,16 \pm 0,01^b$
15	$0,75 \pm 0,00^b$	$0,41 \pm 0,01^a$	$1,17 \pm 0,01^b$
Prosječna vrijednost	$0,73 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,01$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

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

Obradom dobivenih rezultata (tablica 6), vidljivo je kako sva tri ispitana parametra statistički značajno ($p < 0,05$) utječu na prirast klorofila *a* u listovima pasjeg trna. Usporedbom prosječnih vrijednosti u ovisnosti o temperaturi, najviša prosječna vrijednost iznosi $0,80 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$, a dobivena je pri temperaturi od $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, dok je daljnjim povećanjem temperature na $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zabilježen pad s prosječnom vrijednosti $0,69 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$. Najviši prosječni maseni udjeli dobiveni su primjenom najviše snage od 700 W ($0,76 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$), u usporedbi s nižim prosječnim vrijednostima pri 300 W ($0,74 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$) i 500 W ($0,70 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$). Što se tiče utjecaja vremena na ekstrakciju, produljenjem ekstrakcije na 15 min povećava se prosječna

vrijednost masenog udjela klorofila *a* i iznosi $0,75 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$, dok se dobivene vrijednosti pri 5 i 10 min statistički značajno ne razlikuju ($0,72 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$).

Identično važi i za klorofil *b*, odnosno svi parametri pokazuju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na koncentraciju klorofila *b* u listovima pasjeg trna. Povećanjem temperature rastu vrijednosti masenog udjela, pa je tako najmanja prosječna vrijednost $0,39 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ postignuta pri temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C}$, a najviša $0,45 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Što se tiče snage, najniža prosječna vrijednost je dobivena pri 300 W u iznosu $0,38 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, dok se prosječne vrijednosti pri 500 i 700 W statistički značajno ne razlikuju ($0,46 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ i $0,44 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$). Nadalje, optimalnim se pokazalo trajanje ekstrakcije od 10 min s prosječnom vrijednosti $0,44 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, a ekstrakcijom tijekom 5 i 15 min među dobivenim prosječnim vrijednostima ne postoji statistički značajna razlika ($0,41 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$).

Što se tiče ukupnih klorofila, u uzorcima 1-9 primijenjena je temperatura od $40 \text{ }^\circ\text{C}$ gdje dobivena prosječna vrijednost iznosi $1,10 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, dok u nizu uzoraka 10-18 pri temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$ te u uzorcima 19-27 pri temperaturi od $80 \text{ }^\circ\text{C}$ dobivene prosječne vrijednosti iznose $1,23 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ i $1,14 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$. Prema navedenom, temperatura kao parametar ekstrakcije pokazuje statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) pri ekstrakciji ukupnih klorofila, a najviši prinos dobiven je pri temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Povećanjem temperature na $80 \text{ }^\circ\text{C}$, a pri istim parametrima snage i vremena ekstrakcije, bilježi se smanjenje prinosa ukupnih klorofila.

Nadalje, statističkom analizom utvrđeno je da i snaga kao parametar statistički značajno utječe ($p < 0,05$) na ekstrakciju ukupnih klorofila. Povećanjem snage, povećava se i maseni udio klorofila, pa tako u nizovima uzoraka 1-3, 10-12 i 19-21 primjenom snage od 300 W prosječna vrijednost iznosi $1,12 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, a povećanjem snage na 500 W (uzorci 4-6, 13-15 i 22-24) i 700 W (uzorci 7-9, 16-18 i 25-27) prosječne vrijednosti iznose $1,15 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ i $1,20 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$.

Produljenje vremena ekstrakcije također utječe na prinos klorofila, stoga ono, uz temperaturu i snagu, pokazuje statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$). U uzorcima u kojima je primijenjeno najkraće vrijeme ekstrakcije od 5 min dobivena prosječna vrijednost iznosi $1,13 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, a daljnjim povećavanjem vremena ekstrakcije na 10 i 15 min prosječne vrijednosti iznose $1,16 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ i $1,17 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$. Iz navedenog proizlazi kako ne postoji statistički značajna razlika u vrijednostima dobivenim pri 10 i 15 min, stoga se kao optimalno može primijeniti vrijeme ekstrakcije od 10 min.

Nguyen i sur. (2020) proveli su ekstrakciju klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila iz lista *Sauropus androgynus* gdje je praćen utjecaj snage (100 W do 800 W) i vremena ekstrakcije (30 s do 4 min) na ukupne prinose. Kao optimalna, pokazala se snaga pri 300 W gdje je ostvaren najveći maseni udio klorofila *a* ($10,12 \mu\text{g mL}^{-1}$), klorofila *b* ($4,56 \mu\text{g mL}^{-1}$) te ukupnih klorofila ($14,68 \mu\text{g mL}^{-1}$). Daljnjim povećanjem snage, vrijednosti postepeno opadaju radi degradacije spojeva uslijed prevelikog zagrijavanja. Što se tiče vremena ekstrakcije, najveći prinosi ukupnih klorofila ostvareni su pri trajanju od 2 min ($14,43 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je pri duljem vremenu ekstrakcije uočen pad vrijednosti. Dobiveni rezultati nisu u skladu s vrijednostima dobivenih u ovome radu gdje ukupne vrijednosti klorofila povećanjem snage i vremenom ekstrakcije rastu. Uzrok tomu mogu biti različite karakteristike i vrsta uzorka te interakcije s drugim komponentama prisutnima u uzorku.

Michalak i sur. (2015) istraživali su utjecaj različite temperature (25, 40 i 60 °C) na maseni udio ukupnih klorofila u biljci *Lepidium sativum* L. te je utvrđeno kako maseni prinos raste s porastom temperature pa je tako najviša vrijednost ostvarena pri 60 °C i iznosi $33,56 \text{ mg L}^{-1}$. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima ovog rada gdje je najveći maseni udio ostvaren pri 60 °C, a povećanjem temp na 80 °C ukupan prinos počinje padati.

4.3. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH KAROTENOIDA

Tablica 7. Maseni udio ukupnih karotenoida (mg g^{-1}) izoliran iz lista pasjeg trna primjenom MAE

Uzorak	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Ukupni karotenoidi (mg g^{-1})
1	40	300	5	$0,27 \pm 0,01$
2			10	$0,18 \pm 0,00$
3			15	$0,25 \pm 0,00$
4		500	5	$0,18 \pm 0,01$
5			10	$0,18 \pm 0,00$
6			15	$0,19 \pm 0,01$
7		700	5	$0,24 \pm 0,00$
8			10	$0,29 \pm 0,01$
9			15	$0,23 \pm 0,01$
10	60	300	5	$0,31 \pm 0,00$
11			10	$0,32 \pm 0,01$
12			15	$0,33 \pm 0,01$
13		500	5	$0,33 \pm 0,01$
14			10	$0,30 \pm 0,02$
15			15	$0,30 \pm 0,01$
16		700	5	$0,31 \pm 0,02$
17			10	$0,28 \pm 0,02$
18			15	$0,33 \pm 0,02$
19	80	300	5	$0,32 \pm 0,01$
20			10	$0,33 \pm 0,00$
21			15	$0,32 \pm 0,01$
22		500	5	$0,30 \pm 0,00$
23			10	$0,32 \pm 0,00$
24			15	$0,34 \pm 0,01$
25		700	5	$0,34 \pm 0,00$
26			10	$0,35 \pm 0,02$
27			15	$0,37 \pm 0,00$

Maseni udjeli ukupnih karotenoida u listu pasjeg trna određeni su u rasponu vrijednosti od $0,18 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ do $0,37 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 7) s prosječnom vrijednosti od $0,29 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ (tablica 8). Najviši maseni udio određen je u uzorku 27 ($0,37 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$) pri temperaturi 80°C , primijenjenoj snazi 700 W, te vremenu ekstrakcije od 15 min. S druge strane, najniži maseni udjeli određeni su u uzorcima 2 i 5 ($0,18 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$) pri istim vrijednostima parametara temperature i vremena ekstrakcije (40°C , 10 min), a primjenom snaga od 300 i 500 W (tablica 7).

Tablica 8. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio ukupnih karotenoida lista pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Ukupni karotenoidi (mg g ⁻¹)
Temperatura (°C)	p < 0,05*
40	0,22 ± 0,00 ^a
60	0,31 ± 0,00 ^b
80	0,33 ± 0,00 ^c
Snaga (W)	p < 0,05*
300	0,29 ± 0,00 ^b
500	0,27 ± 0,00 ^a
700	0,30 ± 0,00 ^c
Vrijeme (min)	p < 0,05*
5	0,29 ± 0,00 ^b
10	0,28 ± 0,00 ^a
15	0,30 ± 0,00 ^b
Prosječna vrijednost	0,29 ± 0,01

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

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

Prema rezultatima statističke analize (tablica 8), povećanjem temperature, a pri istim uvjetima snage i vremena ekstrakcije, bilježi se blagi prirast ukupnih karotenoida. Pa tako u uzorcima 1-9 gdje je primijenjena temperatura od 40 °C, prosječna vrijednost iznosi $0,22 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$, dok povećanjem temperature na 60 i 80 °C, prosječne vrijednosti iznose $0,31 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ i $0,33 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$. Prema tome, temperatura kao parametar ekstrakcije pokazuje statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$).

Što se tiče utjecaja snage, najviši prirast karotenoida zabilježen je primjenom najviše snage od 700 W, a čija prosječna vrijednost iznosi $0,30 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$. Nasuprot toga, u uzorcima gdje su primijenjene snage od 300 i 500 W prosječne vrijednosti iznose $0,29 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ i $0,27 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$. Samim time, statističkom analizom utvrđeno je da snaga statistički značajno utječe ($p < 0,05$) na prinos ukupnih karotenoida.

Nadalje, statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) utvrđen je i primjenom različitog vremena ekstrakcije. Najmanji prinos ukupnih karotenoida ostvaren je u uzorcima koji su ekstrahirani 10 min s prosječnom vrijednosti od $0,28 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$. Iz tablice 8, vidljivo je kako ne postoji statistički značajna razlika u masenim udjelima ukupnih karotenoida primjenom vremena od 5 i 15 min. Primjenom vremena ekstrakcije od 5 min prosječna vrijednost iznosi $0,29 \pm 0,00 \text{ mg}$

g^{-1} , dok u uzorcima koji su ekstrahirani 15 min dobivena prosječna vrijednost iznosi $0,30 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$.

Chuyen i sur. (2017) proveli su MAE ukupnih karotenoida iz kore voća *Momordica cochinchinensis* Spreng. Praćen je udio karotenoida u ovisnosti o primijenjenoj snazi (120, 240 i 360 W) i vremenu ekstrakcije (1 min do 30 min). Uočeno je da je tijekom vremena ekstrakcije od 4 min ekstrakcijski prinos značajno porastao (156 do $236 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) primjenom najviše snage od 360 W. Iste vrijednosti ostvarene su primjenom 240 W u trajanju od 6 min i kombinacijom snage od 120 W u trajanju od 10 min. Razlog tome je što primjena veće snage naglo utječe na povećanje temperature sustava što dovodi do bržeg postizanja ekstrakcijskog prinosa. Nasuprot tome, primjenom najniže snage od 120 W temperatura je kroz dulje vrijeme ekstrakcije (30 min) ostala stabilna što je rezultiralo najvećim prinosom karotenoida pri 25 min trajanja ekstrakcije ($262 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Isti trend uočen je i u ovom radu, gdje su najveće prosječne vrijednosti ostvarene pri najvišoj snazi od 700 W u najkraćem trajanju ekstrakcije od 5 min.

Utjecaj temperature na prinos karotenoida iz havajske spiruline (*Arthrospira platensis*) primjenom MAE istražili su Esquivel-Hernández i sur. (2016). Maksimalni prinos ostvaren je pri temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ i iznosi $629 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, dok se povećanjem na $70 \text{ }^\circ\text{C}$ prinos počinje smanjivati. Također, mnoge studije bilježe kako najosjetljiviji karotenoidi (violaksantin) degradiraju pri temperaturama višim od $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Međutim, to nije slučaj u ovom radu budući da se $80 \text{ }^\circ\text{C}$ smatra optimalnom temperaturom za ekstrakciju karotenoida iz lista pasjeg trna što se može povezati s razlikom u sastavu karotenoida između različitih biljnih vrsta.

4.4. UTJECAJ MAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Tablica 9. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) lista pasjeg trna

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)
1	40	300	5	729,02 ± 35,82
2			10	729,30 ± 7,15
3			15	672,23 ± 16,83
4		500	5	694,18 ± 30,25
5			10	805,08 ± 28,04
6			15	770,30 ± 19,06
7		700	5	748,62 ± 13,75
8			10	715,28 ± 53,95
9			15	709,89 ± 50,48
10	60	300	5	740,45 ± 25,87
11			10	737,30 ± 18,05
12			15	761,45 ± 11,22
13		500	5	779,30 ± 11,22
14			10	815,14 ± 19,83
15			15	892,42 ± 37,49
16		700	5	849,22 ± 6,94
17			10	884,56 ± 12,50
18			15	777,55 ± 11,12
19	80	300	5	834,16 ± 7,08
20			10	929,02 ± 54,68
21			15	737,30 ± 26,38
22		500	5	792,19 ± 29,45
23			10	920,09 ± 28,04
24			15	985,69 ± 47,21
25		700	5	896,25 ± 55,23
26			10	846,18 ± 55,23
27			15	911,17 ± 37,86

Iz rezultata prikazanih u tablici 9, antioksidacijska aktivnost u ekstraktima listova pasjeg trna određena je FRAP metodom te se kreće u rasponu od $672,23 \pm 16,83 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ do $929,02 \pm 54,68 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s prosječnom vrijednosti $802,35 \pm 11,61 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ (tablica 10). Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti postignuta je u uzorku broj 20 ($929,02 \pm 54,68 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) pri temperaturi $80 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi 300 W i vremenu ekstrakcije od 10 min, dok je najniža vrijednost određena u uzorku broj 3 ($672,23 \pm 16,83 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi 300 W i trajanju od 15 min.

Tablica 10. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta lista pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$p < 0,05^*$
40	$730,43 \pm 7,58^a$
60	$804,16 \pm 7,58^b$
80	$872,45 \pm 7,58^c$
Snaga (W)	$p < 0,05^*$
300	$763,36 \pm 7,58^a$
500	$828,26 \pm 7,58^b$
700	$815,41 \pm 7,58^b$
Vrijeme (min)	$p < 0,05^*$
5	$784,82 \pm 7,58^a$
10	$820,22 \pm 7,58^b$
15	$802,00 \pm 7,58^{a,b}$
Prosječna vrijednost	$802,35 \pm 11,61$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

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

U uzorcima 1-9 pri primijenjenoj temperaturi od 40°C dobivena prosječna vrijednost iznosi $730,43 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, u uzorcima 10-18 pri primijenjenoj temperaturi 60°C prosječna vrijednost iznosi $804,16 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, dok je u uzorcima 19-27 povećanjem temperaturnog režima na 80°C dobivena prosječna vrijednost $872,45 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ (tablica 10). Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako s porastom temperature rastu i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pri istim uvjetima vremena ekstrakcije i snage mikrovalova. Statističkom analizom, utvrđeno je da se dobivene prosječne vrijednosti na sva 3 različita temperaturna režima statistički značajno razlikuju, čime se može zaključiti da temperatura kao parametar statistički značajno utječe ($p < 0,05$) na antioksidacijski kapacitet lista pasjeg trna, a najveći ekstrakcijski prinos utvrđen je pri najvećoj vrijednosti temperature od 80°C .

Daljnijim pregledom rezultata iz tablice 10, vidljivo je kako snaga kao parametar ekstrakcije također pokazuje statistički utjecaj ($p < 0,05$) na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. U uzorcima pri primjeni najniže snage od 300 W dobivena prosječna vrijednost iznosi $763,36 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, daljnjim povećavanjem na 500 W bilježi se statistički značajan porast prosječne vrijednosti u iznosu $828,26 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, dok je konačnim povećanjem na 700 W dobivena prosječna vrijednost $815,41 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$. Prema ovome, vidljivo je da se

prosječna vrijednost porastom snage na 700 W statistički značajno ne razlikuje od one dobivene primjenom 500 W. Stoga se, kao optimalna vrijednost parametra snage smatra 500 W.

Uz temperaturu i snagu, vrijeme ekstrakcije također pokazuje statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Pa tako primjenom vremena od 5 min prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti iznosi $784,82 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, dok su povećanjem na 10 i 15 min, prosječne vrijednosti više te iznose $820,22 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ i $802,00 \pm 7,58 \mu\text{mol TE g}^{-1}$. Iako vrijeme kao parametar utječe na određivanje antioksidacijske aktivnosti, primjenom vremena od 15 min ne povećava se prosječna vrijednost u odnosu na onu dobivenu pri 5 i 10 min, stoga se kao optimalno može primijeniti vrijeme ekstrakcije od 10 min.

Sharma i sur. (2008) su odredili antioksidacijski kapacitet lista pasjeg trna ABTS i DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) metodom te usporedili dobivene vrijednosti ovisno o metodi ekstrakcije (maceracija, Soxhlet, MAE i UAE). Ekstrakcija etanolnih uzoraka koja je potpomognuta mikrovalovima provodila se pri temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi 150 W, u trajanju od 20 min, a dobivene vrijednosti iznose $41,14 \pm 0,40 \text{ mg TE g}^{-1}$ (ABTS) i $56,82 \pm 0,19 \text{ mg TE g}^{-1}$ (DPPH). Zaključeno je kako su navedene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima tretiranim mikrovalovima značajno veće od onih tretiranih ultrazvukom ($13,72 \pm 0,41 \text{ mg TE g}^{-1}$ i $18,91 \pm 0,25 \text{ mg TE g}^{-1}$) i maceracijom ($9,80 \pm 0,40 \text{ mg TE g}^{-1}$ i $17,52 \pm 0,12 \text{ mg TE g}^{-1}$), dok su neznatno više od vrijednosti dobivenih Soxhlet ekstrakcijom ($37,16 \pm 0,46 \text{ mg TE g}^{-1}$ i $39,55 \pm 0,43 \text{ mg TE g}^{-1}$). Istim istraživanjem uspoređeni su i maseni udjeli ukupnih fenola ovisno o metodi ekstrakcije pa tako udio ukupnih fenola primjenom MAE iznosi $10,8 \pm 0,38 \text{ mg GAE g}^{-1}$ što je značajno više u odnosu na vrijednosti dobivene UAE ($5,9 \pm 0,39 \text{ mg GAE g}^{-1}$) i maceracijom ($2,7 \pm 0,39 \text{ mg GAE g}^{-1}$), a neznatno više u usporedbi sa Soxhlet ekstrakcijom ($9,7 \pm 0,35 \text{ mg GAE g}^{-1}$). Prema svemu navedenom, dokazana je snažna korelacija između masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti pa tako najviši maseni udjeli ukupnih fenola pokazuju i najviši antioksidacijski kapacitet (MAE). Slično istraživanje provodili su Dahmoune i sur. (2015) koji su određivali antioksidacijski kapacitet lista mirte ABTS, DPPH i ORAC (eng. *oxygen radical absorption capacity*) metodom primjenom nekonvencionalnih načina ekstrakcije (MAE i UAE) te primjenom konvencionalne ekstrakcije otapalima (CSE). MAE se provodila pri optimalnim uvjetima: vrijeme ekstrakcije 1,04 min, koncentracija etanola 40 %, snaga mikrovalova 500 W i omjer otapalo/krutina 32:1 mL g^{-1} . Pregledom svih dobivenih rezultata vidljivo je kako se vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom statistički značajno ne razlikuju za MAE i CSE. Nadalje, vrijednost određena DPPH metodom je značajno niža za MAE od onih određenih UAE i CSE. Nasuprot tome, kod

određivanja antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom, vrijednost dobivena primjenom MAE ($757,77 \pm 31,18 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) se statistički značajno razlikuje ($p \leq 0,05$) od onih dobivenih primjenom UAE ($428,48 \pm 28,00 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) i CSE ($459,00 \pm 53,49 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). Na temelju svega navedenog može se zaključiti kako primjena mikrovalova pokazuje brojne prednosti utječući na viši prinos pri ekstrakciji ukupnih fenolnih spojeva i veći antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Primjenom MAE iz lista pasjeg trna izolirani su sljedeći bioaktivni spojevi s prosječnim vrijednostima: ukupni fenoli ($85,34 \text{ mg GAE g}^{-1}$), klorofil *a* ($0,73 \text{ mg g}^{-1}$), klorofil *b* ($0,42 \text{ mg g}^{-1}$), ukupni klorofili ($1,15 \text{ mg g}^{-1}$) i ukupni karotenoidi ($0,29 \text{ mg g}^{-1}$). Antioksidacijski kapacitet određen je FRAP metodom s prosječnom vrijednošću $802,35 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$.
2. Svi ispitivani parametri ekstrakcije (temperatura, snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije) pokazuju statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na masene udjele ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila, ukupnih karotenoida te vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.
3. Prema statističkoj analizi, općenito su najviši ekstrakcijski prinosi ostvareni varijacijom temperature 60 i/ili $80 \text{ } ^\circ\text{C}$, primjenom snage mikrovalova 500 i/ili 700 W , u trajanju ekstrakcije 10 i/ili 15 min . Najniži prinosi bioaktivnih spojeva dobiveni su pri najnižim primijenjenim vrijednostima ($40 \text{ } ^\circ\text{C}$, 300 W i 5 min), izuzev utjecaja kraćeg vremena ekstrakcije na veći prinos ukupnih karotenoida.
4. Optimalni parametri pri ekstrakciji ukupnih fenola potpomognutom mikrovalovima su: temperatura $60 \text{ } ^\circ\text{C}$, snaga 500 W i vrijeme ekstrakcije 15 min , dok je najviši antioksidacijski kapacitet dobiven pri temperaturi od $80 \text{ } ^\circ\text{C}$, snazi 500 W , u trajanju od 10 min .
5. Najveći prinos klorofila *a* ostvaren je pri temperaturi $60 \text{ } ^\circ\text{C}$, snazi 700 W , u vremenu od 15 min , dok je najveći prinos klorofila *b* ostvaren pri temperaturi $80 \text{ } ^\circ\text{C}$, snazi mikrovalova 500 W , u vremenu od 10 min . Nadalje, optimalni parametri pri ekstrakciji ukupnog klorofila (*a* + *b*) su: temperatura $60 \text{ } ^\circ\text{C}$, snaga mikrovalova 700 W i vrijeme ekstrakcije 10 min .
6. Najviši maseni udio ukupnih karotenoida utvrđen je pri optimalnim parametrima ekstrakcije: temperatura $80 \text{ } ^\circ\text{C}$, snaga mikrovalova 700 W i vrijeme ekstrakcije 5 min .
7. Prema svemu navedenom, MAE se pokazala učinkovitom metodom za izolaciju fenola, klorofila i karotenoida iz lista pasjeg trna čijom se primjenom ostvaruju visoki maseni prinosi bioaktivnih spojeva kao i visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I. (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci.* **4**, 200–214.

Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., Lightfoot, D. (2017) Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants.* **6(4)**, 42.

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *Trend Anal Chem.* **56**, 49–73.

André, C., Castanheira, I., Cruz, J. M., Paseiro, P., Sanches-Silva, A. (2010) Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends Food Sci Tech.* **21(5)**, 229–246.

Anonymous 1 (2021) <<https://selectseedlingnursery.com/product/sea-buckthorn/>>. Pristupljeno 16. siječnja 2021

Anonymous 2 (2021) < <https://thetrendingtimes.com/new-study-could-improve-the-use-of-microwaves/6005/> > pristupljeno 10. lipnja 2021

Arimboor, R., Kumar, K. S., Arumughan, C. (2008) Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *J Pharmaceut Biomed.* **47(1)**, 31–38.

Asofiei, I., Calinescu, I., Trifan, A., David, I. G., Gavrilă, A. I. (2016) Microwave-assisted batch extraction of polyphenols from sea buckthorn leaves. *Chem Eng Comm.* **203(12)**, 1547–1553.

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.

Azwanida N.N. (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Arom Plants.* **4(3)**, 196.

Belwal, T., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., Pande, V. (2017) Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves. *Ind Crop Prod.* **95**, 393–403.

- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bhatt, T., Patel, K. (2020) Carotenoids: Potent to prevent diseases review. *Nat. Prod. Bioprospect.* **10**, 109–117.
- Biel, W., Jaroszewska, A. (2017) The nutritional value of leaves of selected berry species. *Scientia Agricola*, **74(5)**, 405–410.
- Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F. W.-L. (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A.* **1218(37)**, 6213–6225.
- Chuyen, H. V., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., Parks, S. E. (2017) Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Sci Nutr.* **6(1)**, 189–196.
- Ciesarová, Z., Murkovic, M., Cejpek, K., Kreps, F., Tobolková, B., Koplík, R., Belajová, E., Kukurová, K., Daško, L., Panovská, Z., Revenco, D., Burčová, Z. (2020) Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Res Int.* **133**, 109170.
- Criste A, Urcan AC, Bunea A, Pripon Furtuna FR, Olah NK, Madden RH, Corcionivoschi N. (2020) Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four Romanian sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties. *Molecules.* **25(5)**, 1170.
- D’Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità.* **43(4)**, 348–361.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.* **166**, 585–595.
- Esquivel-Hernández, D., López, V., Rodríguez-Rodríguez, J., Alemán-Nava, G., Cuéllar-Bermúdez, S., Rostro-Alanis, M., Parra-Saldívar, R. (2016) Supercritical carbon dioxide and microwave-assisted extraction of functional lipophilic compounds from *Arthrospira platensis*. *Int J Mol Sci.* **17(5)**, 658.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **48(7)**, 649–671.

- Guan, T. T. Y., Cenkowski, S., Hydamaka, A. (2006) Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) leaves. *J Food Sci.* **70(9)**, 514-518.
- Halliwell, B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* **9(1)**, 1-32.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., Peralta, R. M. (2012) Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Tech.* **47(10)**, 2023–2044.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M. K. (2010) Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *Int J Chem Eng.* 1–11.
- Humphrey, A. M. (2006) Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J Food Sci.* **69(5)**, 422–425.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126(4)**, 1821–1835.
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* **18(2)**, 2328–2375.
- Korekar, G., Stobdan, T., Singh, H., Chaurasia, O., Singh, S. (2011) Phenolic content and antioxidant capacity of various solvent extracts from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit pulp, seeds, leaves and stem bark. *Acta Aliment.* **40(4)**, 449–458.
- Krejcarova, J., Strakova, E., Suchy, P., Herzig, I., Karaskova, K. (2015) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities - a review. *Acta Vet Brno.* **84**, 257–268.
- Kumar, S., Sharma, S., Vasudeva, N. (2017) Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chin. J. Integr. Med.* 1-12.
- Li, T. S. C., Schroeder, W.R. (1996) Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): a multipurpose plant. *Hort. Technol.* **6(4)**, 370–380.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J Chrom A.* **1140**, 29–34.

- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1–F4.3.8.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7–18.
- Michalak, I., Tuhy, Ľ., Chojnacka, K. (2015) Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chem.* **13(1)**, 1183–1195.
- Morgenstern, A., Ekholm, A., Scheewe, P., Rumpunen, K. (2014) Changes in content of major phenolic compounds during leaf development on sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Agr Food Sci.* **23**, 207–219.
- Mortensen, A. (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl Chem.* **78(8)**, 1477–1491.
- Nabi, F., Arain, M. A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., Liu, J. (2020) Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *J Animal Physiol An N.* **104(6)**, 1809-1818.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromat A.* **1054**, 95–111.
- Nguyen, N. H. K., Tien, H. T. C., Truc, T. T., Quoc, L. P. T. (2020) Chlorophyll content and antioxidant activity from folium sauropi (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) with microwaveassisted extraction. *Mater. Sci. Eng.* **991**, 1-7.
- Nikolić, T., Topić, J. (2005) Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str. 99-101.
- Pop, R. M., Socaciu, C., Pintea, A., Buzoianu, A. D., Sanders, M. G., Gruppen, H., Vincken, J.-P. (2013) UHPLC/PDA-ESI/MS analysis of the main berry and leaf flavonol glycosides from different Carpathian *Hippophaë rhamnoides* L. Varieties. *Phytochem Anal.* **24(5)**, 484–492.
- Pop, R. M., Weesepeel, Y., Socaciu, C., Pintea, A., Vincken, J.-P., Gruppen, H. (2014) Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem.* **147**, 1–9.

- 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(4)**, 664–671.
- Pundir, S., Garg, P., Dwiwedi, A., Ali, A., Kapoor, V. K., Kapoor, D., Saurabh, K., Lal, U.R., Negi, P. (2020) Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review. *J Ethnopharmacol.* 113434.
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21(4)**, 738-745.
- Routray W., Orsat, V. (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food Bioprocess Technol.* **5(2)**, 409–424.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods*, **18**, 820–897.
- Sharma, U. K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H. P., Sinha, A. K. (2008) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). *J Agr Food Chem.* **56(2)**, 374–379.
- Shortle, E., O’Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.
- Stobdan, T., Yadav, A., Mishra, G.P., Chaurasia, O.P., Srivastava, R. B. (2011) Seabuckthorn: The super plant (production, characterization, postharvest & health applications), Defence Institute of High Altitude Research, Defence Research and Development Organisation, Leh-Ladakh.
- Suryakumar, G., Gupta, A. (2011) Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol.* **138(2)**, 268–278.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* **2(12)**, 1231–1246.

- Tsubaki, S., Sakamoto, M., Azuma, J. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tea residues under autohydrolytic conditions. *Food Chem.* **123(4)**, 1255–1258.
- Upadhyay, N. K., Yogendra Kumar, M. S., Gupta, A. (2010) Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food Chem Toxicol.* **48(12)**, 3443–3448.
- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles. M.A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds, (Chemat, F., Cravotto G., ured.), Springer, New York, str. 15-53.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech.* **17(6)**, 300–312.
- Wani, T. A., Wani, S. M., Ahmad, M., Ahmad, M., Gani, A., Masoodi, F. A. (2016) Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Cogent Food Agric.* **2**, 1128519.
- Yang, B., Jiang, Y., Shi, J., Chen, F., Ashraf, M. (2011) Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit - A review. *Food Res Int.* **44(7)**, 1837–1842.
- Zhang, F., Yang, Y., Su, P., Guo, Z. (2009) Microwave assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochem Analysis.* **20(1)**, 33–37.
- Zu, Y., Li, C., Fu, Y., Zhao, C. (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharmaceut Biomed.* **41(3)**, 714–71.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Nejla Fusak

Ime i prezime studenta