

Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost lista crnog ribiza

Franković, Tatjana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:998605>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Tatjana Franković

**UTJECAJ PARAMETARA
EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE
MIKROVALOVIMA NA SADRŽAJ
UKUPNIH FENOLA I
ANTIOKSIDACIJSKU
AKTIVNOST LISTA CRNOG
RIBIZA**

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 izv. prof. dr. sc. Ivone Elez Garofulić, te uz pomoć Erike Dobroslavić mag. ing..

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivoni Elez Garofulić na pruženoj prilici za izradu ovoga rada kao i na danim savjetima i pruženoj podršci. Hvala i mag. ing. Eriki Dobroslavić na pomoći oko eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Posebno hvala obitelji, prijateljima i svima koji su sa mnom dijelili lijepo ali i one manje lijepo trenutke tijekom mog fakultetskog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE POTPOMOŠNE MIKROVALOVIMA NA
SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST LISTA CRNOG RIBIZA
Tatjana Franković, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212946

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za izolaciju fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza te odrediti antioksidacijsku aktivnost (AOA) ekstrakta. Ekstrakt je dobiven pomoću MAE uz 30 %-tni etanol kao otapalo pri čemu je ispitan utjecaj temperature (60, 70 i 80 °C), vremena ekstrakcije (5 i 10 min) te omjera otapala i uzorka (20, 30 i 40 mL g⁻¹). Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva i AOA određeni su spektrofotometrijski, a dobivene prosječne vrijednosti su iznosile: za fenolne spojeve 50,89 mg GAE g⁻¹, za AOA ABTS metodom 552,49 μmol TE g⁻¹, DPPH metodom 379,45 μmol TE g⁻¹ i FRAP metodom 503,20 μmol TE g⁻¹. Statistička analiza je pokazala kako temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije nisu značajno utjecali na sadržaj ukupnih fenola kao ni na AOA ekstrakata ($p > 0,05$), dok se omjer otapala i uzorka pokazao kao statistički značajan parametar ($p \leq 0,05$) uzrokujući porast koncentracije ukupnih fenola i AOA prilikom primjene većih volumena otapala. Najveći udio fenolnih spojeva i najviša AOA zabilježeni su pri uvjetima MAE 60 °C/ 5 min/40 mL g⁻¹.

Ključne riječi: *crni ribiz, list, MAE, fenolnih spojevi, antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 54 stranica, 12 slika, 8 tablica, 94 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Pomoć pri izradi: Erika Dobrosravić mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (mentor)
3. doc. dr. sc. Maja Repajić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 17. srpnja 2023.

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

Graduate university study programme: Food Engineering

EFFECT OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION PARAMETERS ON THE CONTENT OF
TOTAL PHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLACKCURRANT LEAVES

Tatjana Franković, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058212946

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal parameters of microwave-assisted extraction (MAE) for the isolation of phenolic compounds from blackcurrant leaves and to determine the antioxidant activity (AOA) of the extract. The extract was obtained using MAE with 30% ethanol as a solvent, where the influence of temperature (60, 70 and 80 °C), extraction time (5 and 10 min) and the ratio of solvent and sample (20, 30 and 40 mL g⁻¹) was examined. The mass fraction of total phenolic compounds and AOA were determined spectrophotometrically, and the obtained average values were: for phenolic compounds 50.89 mg GAE g⁻¹, for AOA by the ABTS method 552.49 μmol TE g⁻¹, by the DPPH method 379.45 μmol TE g⁻¹ and by the FRAP method 503.20 μmol TE g⁻¹. Statistical analysis showed that the temperature and duration of the extraction did not significantly affect the content of total phenols, nor the AOA of the extracts (p>0.05), while the ratio of solvent to sample proved to be a statistically significant parameter (p≤0.05) causing an increase in the concentration of total phenols and AOA when using larger volumes of solvent. The highest content of phenolic compounds and the highest AOA were recorded under MAE conditions of 60 °C/ 5 min/40 mL g⁻¹.

Keywords: *black currant, leaf, MAE, phenolic compounds, antioxidant activity*

Thesis contains: 54 pages, 12 figures, 8 tables, 94 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ivona Elez Garofulić, PhD Associate professor

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić mag. ing.

Reviewers:

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

Thesis defended: July 17th,2023

Sadržaj

1. TEORIJSKI DIO	2
1.1. CRNI RIBIZ	2
1.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA CRNOG RIBIZA	4
1.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA LISTA CRNOG RIBIZA	8
1.5. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA	10
1.5.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)	11
1.5.2. Parametri koji utječu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.....	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO	16
2.1. MATERIJALI	16
2.1.1. Uzorak lišća crnog ribiza.....	16
2.1.2. Kemikalije	16
2.1.3. Aparatura	18
2.1.4. Pribor	18
2.2. METODE	19
2.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom MAE.....	19
2.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva.....	22
2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	23
2.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	25
2.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	27
3. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA UDIO FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA LISTA CRNOG RIBIZA	31
4.2. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST	37
4. ZAKLJUČCI	44
5. LITERATURA	45

1. UVOD

Crni ribiz (lat. *Ribes nigrum* L.) vrijedna je i korisna biljka koja je najpoznatija po svojim plodovima, međutim sve više se istražuje nutritivni sastav i ljekoviti potencijal lista ove biljke. Biljka pripada porodici ogrozdovka (*Grossulariaceae*), a svoju primjenu našla je u europskoj tradicionalnoj medicini kao lijek za reumatske bolove, respiratorne probleme i artritis. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako list crnog ribiza ima antioksidativno, antikancerogeno, antimikrobno, antivirusno i protuupalno djelovanje što se povezuje s prisustvom bioaktivnih komponenti u listu. List crnog ribiza pokazao se dobrim izvorom brojnih spojeva poput vitamina (A, C i B), fenolnih spojeva, organskih kiselina, nezasićenih masnih kiselina te u svojem eteričnom ulju sadrži monoterpene i seskviterpene.

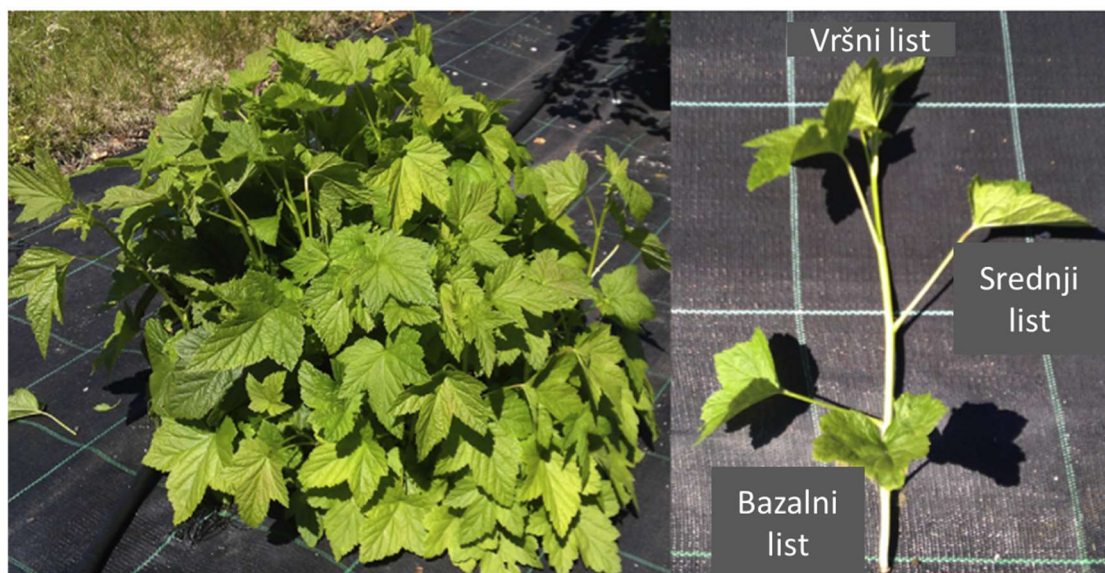
Za potrebe izolacije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala danas se u upotrebu sve više uvode nekonvencionalne metode ekstrakcije, a jedna od njih je i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Ova metoda smatra se ekološki prihvatljivijom od konvencionalnih metoda, jer se njenom upotrebom smanjuje količina potrebnog otapala, a primjenom mikrovalova zagrijavanje se postiže puno brže što skraćuje trajanje ekstrakcije, a i smanjen je gubitak topline u okolinu. Također, smanjeno vrijeme ekstrakcije smanjuje i vjerojatnost termičke razgradnje što povećava ukupni prinos fenolnih spojeva i njihovu kvalitetu, a ukupnu troškovi ekstrakcije su smanjeni. Kako bi ova metoda ekstrakcije bila uspješno provedena potrebno je optimirati parametre koji utječu na konačni prinos ekstrakcije. Optimiranje proces ekstrakcije bitno je i kako ne bi došlo do termičke razgradnje fenolnih spojeva.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) pri ekstrakciji ukupnih fenola iz lista crnog ribiza te odrediti antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. Kako bi se ostvario što viši prinos ekstrakcije svrha rada bila je odrediti optimalne parametre ekstrakcije pri čemu je ispitan utjecaj temperature (60, 70 i 80 °C), vremena ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer otapala i uzorka (20, 30 i 40 mL g⁻¹). U dobivenim ekstraktima, maseni udjeli ukupnih fenola određeni su spektrofotometrijski, a antioksidacijska aktivnost utvrđena ABTS, DPPH i FRAP metodom.

1. TEORIJSKI DIO

1.1. CRNI RIBIZ

Crni ribiz (lat. *R. nigrum* L.) je grmolika listopadna biljka iz porodice ogrozdovka (lat. *Grossulariaceae*). Raste u obliku grma, a dostiže visinu od 1 do 2 m (Nour i sur., 2014). Grane su uspravne, a na njima su naizmjenično smješteni listovi koji se nalaze na dugim i tankim peteljčkama. Listovi su jednostavni, sastoje se od pet dlanasto sastavljenih režnjeva s nazubljenim rubom. Lice im je glatko dok su na naličju dlakavi s ponekom vidljivom žutom točkastom žlijezdom. Na slici 1 prikazan je grm crnog ribiza, gdje je vidljivo da se na vrhu biljke nalaze vršni listovi mlađeg podrijetla dok se pri dnu biljke nalaze bazalni listovi starijeg podrijetla, a između njih srednji listovi (Vagiri i sur., 2015). Cvat biljke je viseći grozd u kojem su skupljeni mali, dvospolni, pravilni cvjetovi. Ocvijeće je dvostruko, čaška se sastoji od pet duguljastih unatrag uvinutih lapova, vjenčić je zvonolik, žućkasto zelen s crvenkastom unutrašnjosti. Tučak ima podraslu plodnicu s mnogim sjemenim zametcima, prašnika je pet. Cvate u travnju i svibnju. Plod ribiza su crne, sjajne, okrugle bobice promjera oko 1 cm. Na tjemenu imaju ostatke čaške i sočnog, kiselkastog su okusa. Plodovi dozrijevaju u lipnju.



Slika 1. Grm crnog ribiza i raspored listova (prema Vagiri i sur., 2015)

Prirodno stanište biljke je područje istočne i središnje Europe ali i zapadne i sjeverne Azije. Raste na vlažnom i humusu bogatom tlu, odgovara mu položaju s puno sunca iako podnosi i djelomičnu sjenu ali će prinosi biti manji. Uspijeva i u krajevima s oštrijom klimom. Poželjno

je mjesto sa stalnom cirkulacijom zraka kako bi se smanjila opasnost od pepelnice. S obzirom da cvate rano ne preporuča se sadnja u nizini jer postoji opasnost od mraza. Razmnožavanje biljke je moguće zelenim i drvenastim rezancima, dijeljenjem grma ili raslojavanjem. Razmnožavanje sjemenom također je moguće ali biljke dobivene ovom metodom nemaju iste karakteristike kao matična biljka. Ova biljke je prije svega poznata po svojim plodovima koji se najčešće koriste u prehrani. Uz primjenu u prehrani zabilježena je upotreba plodova u azijskoj i europskoj tradicionalnoj medicini kod liječenja različitih oboljenja (Gopalan i sur., 2012). Bobice crnog ribiza bogat su izvor fitokemikalija koje su moćni antioksidansi, mikrobiocidi te imaju protuupalna svojstva (Nour i sur., 2013). Lišće crnog ribiza također ima povijest upotrebe u medicinske svrhe. Tako se lišće crnog ribiza upotrebljava kao tradicionalni lijek za liječenje reumatskih bolova, respiratornih problema i artritisa u Europi (Stević i sur., 2010). Isto kao i bobice, lišće je pokazalo da ima antioksidativno i protuupalno djelovanje (Garbacki i sur., 2005). Ekstrakt crnog ribiza korišten je za ubrzavanje procesa izlučivanja i za regulaciju rada bubrega (Declume, 1989). Ekstrakt lista pokazao se kao potencijalni izvor novih molekula s antivirusnim djelovanjem protiv virusa gripe (Haasbach i sur., 2014). Raudsepp i sur. (2018) zabilježili su antimikrobno djelovanje ekstrakta lista crnog ribiza protiv gram-negativnih bakterija *Campylobacter jejuni* i *Yersinia ruckeri* i protiv gram-pozitivnih bakterija *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes*.

1.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA CRNOG RIBIZA

Niz kemijskih spojeva koje sadrži list crnog ribiza zanimljivi su s kemijskog gledišta, ali uz to mnogi od njih posjeduju biološki i terapijski učinak. Protuupalna, antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna svojstva neka su od brojnih povoljnih svojstava listova ove biljke (Puupponen-Pimiä i sur., 2005). List crnog ribiza sadrži velike količine mineralnih tvari (Staszowska-Karkut i Materska, 2020). Nour i sur. (2014) navode da se sadržaj kalcija kretao u rasponu od 9558 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 22,195 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe tvari (s.tv.), dok se raspon magnezija kretao između 4233 i 8592 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.tv.. Vrijednosti određene za kalij kretale su se između 6424 i 23082 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.tv. Od elemenata u tragovima zabilježene su veće količine željeza, mangana i bora (Nour i sur., 2014). Uz mineralne tvari listovi sadrže i vitamine od kojih su najzastupljeniji C, B₃ i A. Prosječna vrijednost vitamina C bila je 38 mg 100 g⁻¹, vitamina B₃ 14 mg 100 g⁻¹, a vitamina A 6 mg 100 g⁻¹. Listovi crnog ribiza između ostalog sadrže i masne kiseline. Većinom su to nezasićene masne kiseline kao što su α -linolenska, γ -linolenska, *cis*-7,10,13-

heksadekanska i stearinska kiselina (Ziobroń i sur., 2021). Uz navedeno sadrže i fosfatidilkolin i fosfatidilglicerol, a u svom sastavu eteričnih ulja sadrže monoterpene i seskviterpene. Na kemijski sastav lišća utječe mnogo čimbenika od kojih su neki vrijeme berbe, područje uzgoja i metoda ekstrakcije. Da vrijeme berbe utječe na kemijski sastav pokazali su Nour i sur. (2014) kada su kalcij, magnezij, željezo i bor najviše vrijednosti postigli u ekstraktu lista ubranog sredinom lipnja, dok je kalij maksimalnu vrijednost dosegao u ekstraktu lista ubranog prvog lipnja. Paunović i sur. (2017) pokazali su kako sastav zemlje u kojem je biljka ribiza uzgajana može utjecati na antimikrobna svojstva lišća. Osnovni kemijski sastav u lista crnog ribiza pratili su Ziobroń i sur. (2021) tijekom perioda od 2018. do 2019. godine, a prosječne vrijednosti prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Prosječan kemijski sastav lista crnog ribiza (*prema Ziobroń i sur., 2021*)

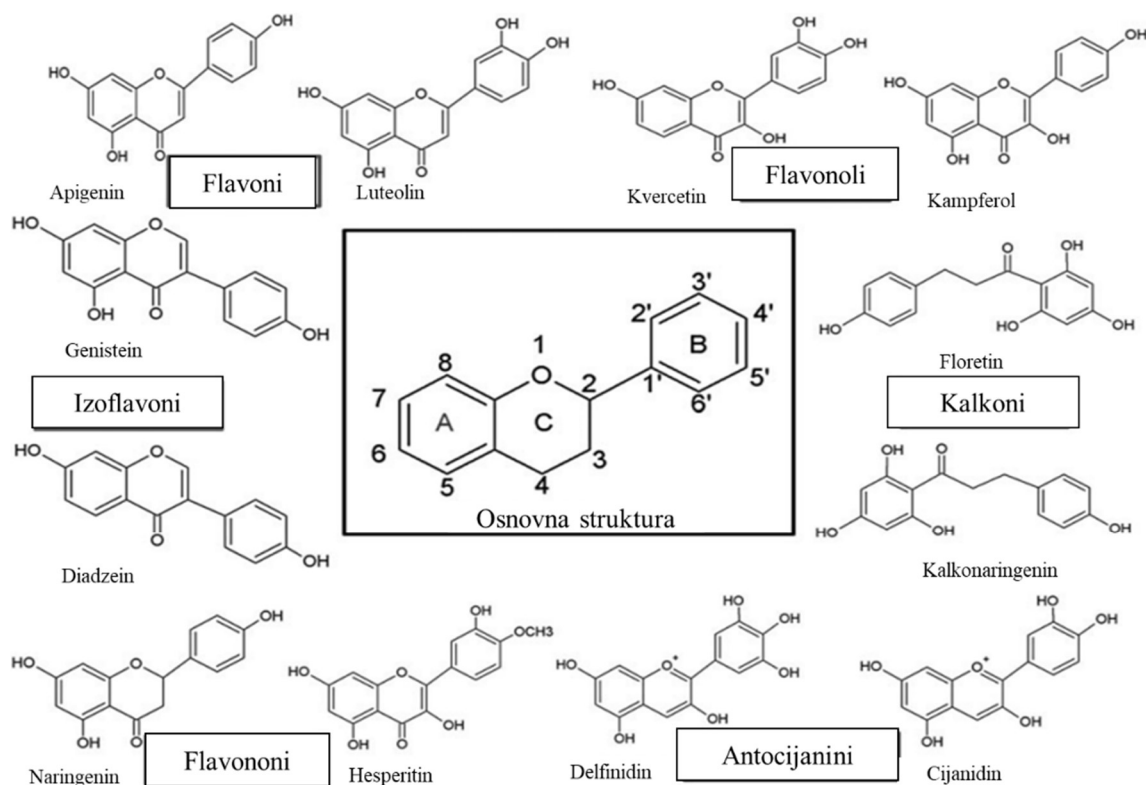
Nutrijenti	g 100 g ⁻¹ s.tv.
Proteini	15,73
Masti	5,32
Pepeo	13,56
Ugljikohidrati	65,39

1.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA CRNOG RIBIZA

Biološki aktivne tvari dijelimo na nutritivne (vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati) i nenutritivne. Sam naziv „biološki aktivna tvar“ najčešće se odnosi na spojeve bez nutritivne vrijednosti koji imaju pozitivan učinak na zdravlje. Oni pomažu u sprječavanju i liječenju bolesti djelujući kao pomoćna sredstva te poboljšavaju opće stanje organizma. Međusobno se razlikuju po funkciji u organizmu i kemijskoj strukturi. Neki od primjera biološki aktivnih tvari su: fenoli, flavonoidi, klorofili, steroli, pigmenti i drugi (Brahmi i sur., 2014).

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti i jedni su od najzastupljenijih fitokemikalija u biljkama. Sintetiziraju se putevima pentoza fosfata, šikamata i fenilpropanoida (Działo i sur., 2016). Fenolni spojevi međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi koja u osnovi uključuje aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilna skupina. U biljkama ovi spojevi obično sadržavaju više fenolnih prstenova pa se s toga nazivaju polifenolima. Fenole najčešće

dijelimo na flavonoide i neflavonoide (Panche i sur., 2016). Kemijska struktura flavonoida temelji se na dva aromatska prstena povezanih mostom koji se sastoji od tri ugljika (C6-C3-C6). Postoje mnoge podjele flavonoida, a na slici 2 je prikazana jedna od podjela koja ih dijeli na: flavone, flavonole, flavanone, izoflavone, antocijanine i kalkone (Panche i sur., 2016). Neke od manje zastupljene skupina flavonoida su: dihidrokalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auronini (Del Rio i sur., 2013). Flavonoidi čine najveću grupu fenolnih spojeva, od 8000 poznatih spojeva čak 6000 spojeva pripada flavonoidima (Vuolo i sur., 2019). Ove spojeve karakterizira kostur od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena označenih kao A, B i C (slika 2) sa različitim supstituentima prema kojima ih razvrstavamo u različite podklase (Birt i Jeffery, 2013). A i B su aromatski prstenovi, a C je most s tri ugljika, najčešće u obliku heterocikličkog prstena (Xu i sur.,2017).



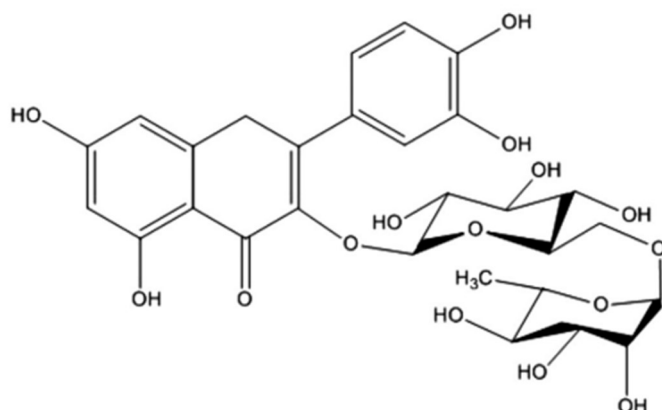
Slika 2. Osnovna struktura flavonoida i strukturne formule pojedinih flavonoida (prema Panche i sur., 2016)

Neflavonoidi se uglavnom pojavljuju kao kompleksni biopolimeri stoga im nedostaje definirana primarna ugljikova struktura, a kemijska struktura je posebna za svaki fenol. U neflavonoide ubrajamo: fenolne kiseline, lignane, stilbene, tanine i lignine (Działo i sur., 2016).

Fenolne kiseline prisutne su u ljudskoj prehrani, a pokazuju bogat spektar bioloških i farmakoloških svojstava štiteći od oksidativnog stresa i njemu povezanih bolesti, poput karcinoma, upalnih poremećaja, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Strukturno uglavnom predstavljaju fenolni prsten s funkcionalnom karboksilnom grupom. (Zhang i sur., 2018). Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne skupine: hidroksicimne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline te njihovi derivati.

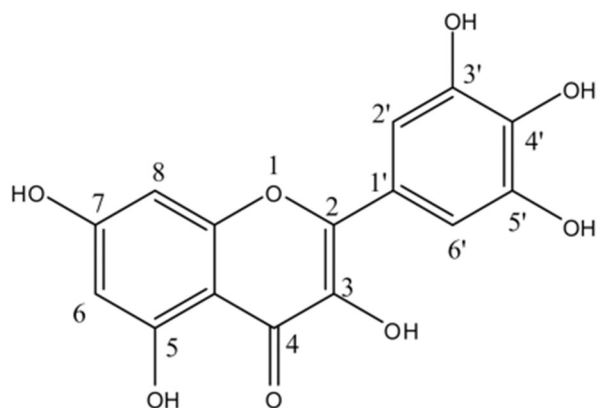
Flavonoidi koji su zabilježeni u listu crnog ribiza su u najvećem djelu rutin, miricetin, kvercetin te se uz njih u manjim udjelima nalaze hiperozid, kemferol-3-*O*-galaktozid, kemferol-3-*O*-glukozid (Nour i sur., 2014; He i sur., 2010). Također su zabilježeni i glikozidi antocijanina poput: cijanid-3-rutinozid i cijanid-3-glukozid (Paunović i sur., 2017).

Rutin u listu crnog ribiza odredili su Nour i sur. (2014) kada su istraživali fenolni sastav različitih sorti crnog ribiza, a njegova kemijska struktura prikazana je na slici 3. Udio rutina kretao se između 209,36 i 308,82 g g⁻¹ s.tv. sa srednjom vrijednosti od 266,91 ± 37,03 g g⁻¹ s.tv., a najveći udio određen je u sorti „Tenah“. D'Urso i sur. (2020) odredili su udio rutina u ekstraktu lista crnog ribiza u vrijednosti od 8,9 mg 100 g⁻¹ s.tv..



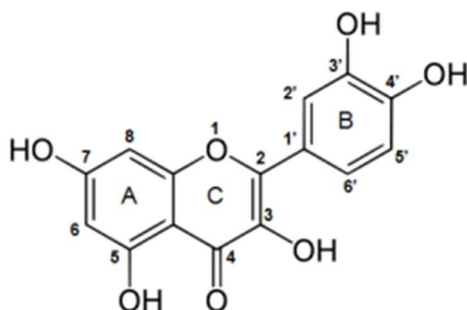
Slika 3. Kemijska struktura rutina (prema Frutos i sur., 2019)

Miricetin je određen u ekstraktu lista crnog ribiza u rasponu od 663,65 do 962,89 g g⁻¹ s.tv., a srednja vrijednosti iznosila je 831,03 ± 111,18 g g⁻¹ s.tv. (Nour i sur., 2014). Udio miricetina u ekstraktu lista crnog ribiza odredili su i Piotrowski i sur. (2016). U njihovom istraživanju udio miricetina u ekstraktu kretao se od 36,2 do 125,8 mg 100 g⁻¹ s.tv. Paunović i sur. (2017) odredili su udio miricetina u ekstraktu lista crnog ribiza od 0,19 do 0,26 mg na 100 g⁻¹ s.tv. ovisno o sorti crnog ribiza. Kemijska struktura miricetina prikazana je na slici 4.



Slika 4. Kemijska struktura miricetina (prema Yao i sur., 2014)

Kvercetin je u ekstraktu lista crnog ribiza određen u udjelu od 1119,17 do 1576,29 g g⁻¹ s.tv. (Nour i sur., 2014), a srednja vrijednost iznosila je 1359,02 ± 167,36 g g⁻¹ s.tv. iz čega vidimo da se naspram navedenih flavonoida (miricetina i rutina) nalazi u najvećem udjelu. Kemijska struktura kvercetina prikazana je na slici 5. Paunović i sur. (2017) također su odredili više udjele kvercetina naspram miricetina u rasponu od 0,54 do 0,63 mg 100 g⁻¹ s.tv.



Slika 5. Kemijska struktura kvercetina (prema D'Andrea, 2015)

Fenolne kiseline koju su zabilježene u lišću crnog ribiza su: kafeinska kiselina, galna kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, neoklorogenska kiselina, salicilna kiselina, karnozinska kiselina i druge (Nour i sur., 2014; Vagiri i sur., 2015; Staszowska-Karkut i Materska, 2020). Teleszko i Wojdyło (2015) odredile su udjelu ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktu ploda i lista crnog ribiza. Maseni udio u plodu iznosio je 34,92 mg 100 g⁻¹ s.tv. dok je u listu iznosio 52,94 mg 100 g⁻¹ s.tv., iz čega vidimo da je list crnog ribiza puno bolji izvor fenolnih kiselina nego plod.

Među njima najveće udjele u listu crnog ribiza imaju galna, *p*-kumarinska i salicilna. Nour i sur. (2014) određivali su udio fenolnih kiselina u ekstraktima lista crnog ribiza među različitim sortama, a udjeli pojedinih kiselina prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Udio fenolnih kiselina u ekstraktu lista crnog ribiza (prema Nour i sur., 2014)

Kiselina	Udio (g g ⁻¹ s.tv.)
<i>p</i> -kumarinska	285.92 ± 30.87
Salicilna	236.46 ± 27.48
Galna	198.35 ± 17.79
Kafeinska	88.86 ± 9.43
Sinapinska	12.92 ± 1.38
Klorogenska	7.31 ± 0.95
Ferulinska	17.18 ± 1.75

1.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJEVA LISTA CRNOG RIBIZA

U živim organizmima slobodni radikali nastaju raznim metaboličkim procesima zbog različitih utjecaja iz okoliša. To su uglavnom reaktivne kisikove vrste koje mogu negativno utjecati na bitne biomolekule u ljudskom organizmu poput lipida, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i proteina (Cetin Cakmak i Gulcin, 2019). Reaktivne kisikove vrste sadrže najmanje jedan nesporeni elektron ili reaktivan neradikalni spoji koji ima mogućnost oksidacije molekule.

Antioksidansi su spojevi koji kada su prisutni, u niskim koncentracijama, u hrani mogu kontrolirati, odgoditi ili spriječiti oksidativne procese koje vode do smanjenja kvalitete hrane, dok kada su prisutni u ljudskom tijelu sprječavaju nastanak i širenje degenerativnih bolesti u ljudskom tijelu (Shahidi i Zhong, 2015). Glavni izvor prirodnih antioksidansa su prvenstveno biljni fenolni spojevi koji se pojavljuju u svim dijelovima biljaka. Najistaknutiji predstavnici prehrambenih antioksidansa su vitamni C, tokoferoli, karotenoidi i flavonoidi (Gulcin, 2020). Uz prirodne antioksidanse razvijeni su i sintetski kako bi se razvio standardni sustav mjerenja aktivnosti antioksidansa koji se može usporediti s prirodnim antioksidansima. Uz to sintetski antioksidansi dodaju se u hranu kako bi joj se produljila trajnost te kako bi mogla podnijeti sve uvjete procesiranja. Neki od korištenih sintetskih antioksidansa su butil hidroksianisol (BHA),

butil hidroksitoluen (BHT), *tert*-butilhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) i oktil galat (OG) (Gulcin, 2020). S obzirom da je upotreba i dozvoljena količina sintetskih antioksidansa regulirana od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) potrebno je detaljnije istražiti prirodne izvore antioksidansa. Antioksidansi mogu usporiti oksidaciju na dva načina. Prvi način je da uklanjaju slobodne radikale koji dovode do procesa oksidacije, ovaj način povezujemo se primarnim antioksidansima. Drugi način obuhvaća mehanizme koji ne uključuje izravno uklanjanje slobodnih radikala i ovaj način povezujemo sa sekundarnim antioksidansima. Neki mehanizmi kojim djeluju sekundarni antioksidansi su: vezanje metalnih iona, uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta, pretvaranje hidroperoksida u neradikalne vrste, apsorpciju UV zračenja ili inaktivaciju singletnog kisika (Gulcin, 2020). Djelovanje antioksidansa nije vezano isključivo samo za njegovu kemijsku strukturu već mnogi čimbenici poput temperature, svjetla, koncentracije, utječu na njegovu aktivnost. Također prisutnost brojnih mikrokomponenti koje mogu djelovati kao prooksidansi ili sinergisti utječu na aktivnost antioksidansa. Do danas su razvijene brojne metode kako bi se pratila i mjerila antioksidacijska aktivnost komercijalnih antioksidansa, hrane, ali i medicinskih, farmaceutskih i bioloških uzoraka. Općenito metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti dijelimo na metode koje se temelje na prijenosu vodikovog atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i metode temeljene na pojedinačnom elektronskom prijenosu (engl. *Single Electron Transfer*, SET) (Dontha, 2016). Najčešće korištene SET metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*), ABTS (prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina i FC (Folin-Ciocalteu metoda), dok u HAT metode ubrajamo ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), DPPH (prema radikalu 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil), TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), β -karoten (metoda koja se temelji na izbjeljivanju β -karotena) i SASA (engl. *Scavenging of Superoxide Radical Formation by Alkaline*) (Prior i sur., 2005). U ovom radu korištene su ABTS, DPPH i FRAP metoda. Ziobroń i sur. (2021) određivali su antioksidacijsku aktivnost u ekstraktu lista crnog ribiza koji je ubran tijekom različitih mjeseci. Antioksidacijsku aktivnost mjerili su pomoću ABTS, DPPH i FRAP metode, a dobivene vrijednosti kroz različite mjesece vidimo u tablici 3.

Tablica 3. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata lista crnog ribiza u ovisnosti o terminu berbe (prema Ziobron i sur., 2021)

Datum berbe	ABTS ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$)
Svibanj 2019	6 989,44 \pm 81,46	7 877,82 \pm 101,60	6 749,45 \pm 30,64
Lipanj/srpanj 2019	4 918,81 \pm 19,97	7 794,50 \pm 99,62	5 987,46 \pm 53,46
Kolovoz 2019	2 006,18 \pm 61,50	4 820,47 \pm 102,28	6 772,73 \pm 61,69

Iz navedenih vrijednosti možemo zaključiti kako lišće crnog ribiza ubrano tijekom svibnja pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnosti. Teleszko i Wojdyło (2015) također su određivale antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista crnog ribiza pomoću ABTS i FRAP metode. Dobivena vrijednost za ABTS metodu iznosila je $32,91 \pm \text{mmol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$, a za FRAP metodu $19,16 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$. Burri i sur. (2017) određivali su antioksidacijsku aktivnost lista crnog ribiza ABTS metodom za različite sorte. Raspon određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kretao se od 98,3 do 108,9 mmol TE na $100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$, a najvišu vrijednost pokazala je sorta „Ben Finlay“. Za usporedu Sytařová i sur. (2019) određivali su antioksidacijsku aktivnost lista pasjeg trna u različitim sortama. Raspon određenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kretao se od 19,60 do 54,17 mmol TE $\text{g}^{-1} \text{ s.tv.}$.

1.5. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Ona predstavlja fizikalni proces kod kojeg zbog koncentracijskog gradijenta dolazi do difuzije spojeva iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012). Za ekstrakciju općenito vrijedi slijedeće: kod ekstrakcije čvrstih tvari potrebno je povećati dodirnu površinu usitnjavanjem, u sredini je potrebno povećati brzinu kretanja faza, a kod povećanja količine uzorka treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000). Parametri koji utječu na brzinu i učinkovitost ekstrakcije su temperatura, vrijeme, omjer kruto-tekuće, pH vrijednost i dr. (Rostagno i Prado, 2013). Uz navedene parametre potrebno je obratiti pažnju na topljivost željenih spojeva kako bi se odabralo otapalo u kojem će spojevi biti topljivi. Metode ekstrakcije možemo podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne. U konvencionalne metode ubrajamo: ekstrakciju po Soxhletu, maceraciju i hidrodestilaciju (Azmir i sur., 2013). Ove metode temelje se na učinkovitosti otapala uz primjenu topline i/ili miješanja.

Konvencionalne metode zahtijevaju dulje vrijeme ekstrakcije, velike količine otapala i više temperature koje mogu dovesti do termalne razgradnje biološki aktivnih spojeva (Dragović-Uzelac i sur., 2012). Zbog navedenih nedostataka sve češće se za ekstrakciju odabiru nekonvencionalne metode poput: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija superkritičnim otapalima i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

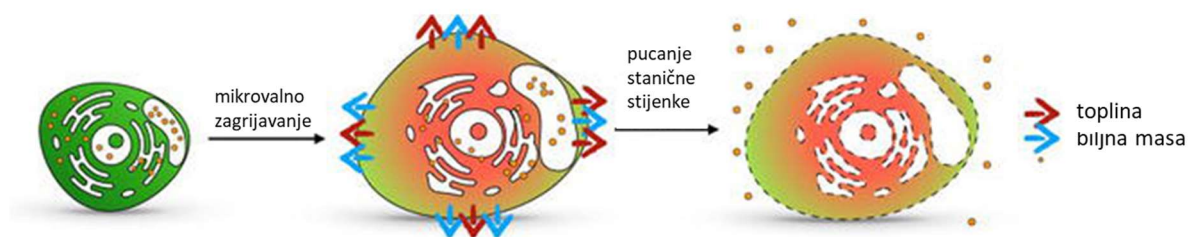
1.5.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

MAE (eng. *Microwave assisted extraction*) je proces u kojem se energija mikrovalova koristi za zagrijavanje otapala koje je u kontaktu s uzorkom kako bi došlo do izdvajanja analita iz matriksa uzorka u otapalo (Eskilsson i Björklund, 2000). Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koji se nalaze između nižih radijskih frekvencija i viših frekvencija infracrvenog zračenja odnosno frekvencije se kreću od 300 MHz do 300 GHz (Routray i Orsat, 2012). Frekvencija od 915 MHz smatra se najkorisnijom u industrijskoj primjeni, dok se frekvencija od 2450 MHz najčešće koristi u kućanstvima prilikom upotrebe mikrovalnih pećnica. Zbog činjenice da su elektromagnetski valovi ne ionizirajući, interakcija s materijalom odvija se putem zagrijavanja tako da samo oni materijali koji apsorbiraju elektromagnetsko zračenje mogu biti zagrijani. U procesu zagrijavanja pomoću mikrovalova prijenos energije odvija se pomoću dva mehanizma: ionska kondukcija i rotacija dipola (Veggi i sur., 2012). Pojmom ionska kondukcija opisuje se kretanje iona nakon što se na njih primjeni elektromagnetsko polje, a otpor otopine toku ionu rezultira trenjem koje zagrijava otopinu. Rotacija dipola opisuje pokušaj molekula dipola da se usklade s izmjeničnim električnim poljem u mediju koji proizvode mikrovalovi. Rotacija dipola dovodi do sudara između molekula dipola čime se oslobađa toplina. Oba mehanizma odvijaju se simultano, ali koji će se način zagrijavanja odvijati ovisi prvenstveno o temperaturi (Veggi i sur., 2012). Tijekom zagrijavanja u početku dominira zagrijavanje od strane rotacije dipola, dok s povećanjem temperature sve veći doprinos zagrijavanju daje ionska kondukcija. Za razliku od konvencionalnih metoda gdje se velik dio toplinske energije gubi i odlazi u okoliš kod upotrebe mikrovalova dolazi do ciljanog i selektivnog zagrijavanje zbog čega nema gubitka topline. Učinkovitost kojom se različita otapala zagrijevaju pod mikrovalovima ovisi o dielektričnom faktoru rasipanja ($\tan \delta$) koji je zapravo mjera sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i preda je kao toplinu okolnim molekulama (Zuloaga i sur., 1999).

Faktor rasipanja dan je jednadžbom [1]:

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon' \quad [1]$$

gdje je ε'' dielektrični gubitak koji pokazuje učinkovitost pretvaranja mikrovalne energije u toplinu. ε' je dielektrična konstanta koja je mjera sposobnosti apsorpcije mikrovalne energije (Mandal i sur., 2007). Iako se za ekstrakciju uglavnom koristi osušeni biljni materijal on u sebi i dalje sadrži mikro tragove vode koje su ciljane molekule tijekom zagrijavanja. Tijekom zagrijavanja dolazi do isparavanja vode iz biljne stanice čime se stvara pritisak na staničnu stijenku, a kada pritisak prijeđe snagu stanične stijenke dolazi do njenog pucanja i bioaktivni spojevi se otpuštaju u otapalo. Prilikom MAE i prijenos mase i prijenos topline odvijaju se iz stanice prema van što je prikazano na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz pucanja biljne stanice (prema Cavalloro i sur., 2021)

Uređaji za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima mogu biti ili zatvorene posude za ekstrakciju pod kontroliranim tlakom i temperaturom ili fokusirane mikrovalne pećnice na atmosferskom tlaku. Oba uređaja sastoje se od četiri glavne komponente: generatora mikrovalova, vodiča za mikrovalove, aplikatora i cirkulatora (Mandal i sur., 2007). Prednosti zatvorenog sustava nad otvorenim su: postižu višu temperaturu zbog mogućnosti ostvarivanja viših tlakova, a s povišenjem temperature se smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije, smanjen je gubitak hlapljivih tvari te je potrebna je manja količina otapala s obzirom da ne dolazi do isparavanja. Faktori koji utječu na učinkovitost MAE su: temperatura i vrijeme ekstrakcije, snaga mikrovalova, volumen i struktura otapala, struktura uzroka i omjer otapala i uzorka.

1.5.2. Parametri koji utječu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima

Temperatura je najistraženiji parametar koji utječe na MAE međutim ona je usko povezana sa snagom mikrovalova koja se primjenjuje. Viša temperatura dovodi do poboljšane ekstrakcije, jer se s povećanjem temperature povećava desorpcija analita s aktivnih mjesta u matriksu (Mandal i sur., 2007). S povećanjem temperatura otapalo ima veći kapacitet otapanja analita, jer dolazi do smanjenja površinske napetosti i viskoznosti otapala. U zatvorenom MAE sustavu, temperatura može porasti i do iznad točke vrelišta otapala što može dovesti do veće učinkovitosti ekstrakcije (Veggi i sur., 2012). Povećanje temperature rezultirati će povećanjem prinosa sve dok se ne postigne optimalna temperatura nakon koje dolazi do pada ekstrakcijskog prinosa. Vrijednost optimalne temperature povezana je s kemijskom strukturom ekstrahirane komponente te njenom termičkom stabilnosti. Općenito se pokazalo kako je optimalan raspon temperatura za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala prilikom upotrebe MAE od 60 do 90 °C (Kala i sur., 2016). Međutim Liazid i sur. (2007) pokazali su kako su neki fenolni spojevi stabilni i pri temperaturama od 100 °C, a neki čak i pri 120 °C. Primijenjena snaga mikrovalova mora omogućiti da se razvije dovoljna temperatura koja je pogodna za ekstrakciju, ali ona ne smije biti prejaka jer inače može doći do termalne razgradnje spojeva. Kaderides i sur. (2019) provodili su ekstrakciju fenolnih spojeva iz kore nara koristeći mikrovalove te su kao optimalnu snagu odredili 600 W. Nešto viša snaga pokazala se kao optimalna prilikom ekstrakcije fenola iz ružmarina. Švarc-Gajić i sur. (2013) zabilježili su najveći prinos fenolnih spojeva prilikom primjene snage mikrovalova od 800 W. Za razliku od njih dosta nižu snagu kao optimalnu za ekstrakciju fenolnih spojeva odredili su Hayat i sur (2009). Oni su ekstrahirali fenolne spojeve iz kore limuna te im se kao optimalna snaga pokazala ona od 152 W.

S primijenjenom snagom i temperaturom usko je vezano vrijeme provođenja ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije prilikom upotrebe MAE značajno je manje u usporedbi s primijenjenim vremenom kod konvencionalnih metoda ekstrakcije. Općenito produljenje vremena ekstrakcije dovodi do većeg prinosa ekstrakcije, ali također se povećava rizik od degradacije spojeva. Vrijeme mora biti prilagođeno odabranoj snazi mikrovalova kako ne bi došlo do pregrijavanja i termičke razgradnje uzorka pri visokim snagama mikrovalova. Predlaže se primjena niske do umjerene snage u kombinaciji s duljim trajanjem tretmana (Mandal i sur., 2007). Alara i Abdurahman (2019) provodili su ekstrakciju fenolnih spojeva pomoću mikrovalova iz cvijeta hibiskusa. Primijenjena snaga bila je konstantna u iznosu od 300 W, a vrijeme ekstrakcije se kretalo između 1 i 10 min. Udio ekstrahiranih ukupnih fenola rastao je do vremena od 3 min, nakon čega je zabilježen pad vrijednosti ukupnih fenola što su autori pripisali predugom

izlaganju mikrovalova prilikom čega je došlo do razgradnje spojeva. Slične rezultate zabilježili su i Vu i sur. (2019) prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz kore banane. Oni su kao optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije zabilježili vrijeme od 4 min nakon kojeg je došlo do pada vrijednosti ukupnih fenola.

Također kako bi se izbjegle negativne posljedice dugog vremena provođenja ekstrakcije može se primijeniti više kraćih uzastopnih ekstrakcija pri čemu se u svakom ciklusu dodaje nezasićeno otapalo čime se ostvaruje veći ekstrakcijski prinos (Veggi i sur., 2012). Ovakav način ekstrakcije istraživali su Ćurko i sur. (2019) prilikom izolacije fenolnih spojeva iz komine kožice grožđa. Oni su pokazali kako je ciklus od 6 uzastopnih ekstrakcija prilikom istih uvjeta doveo do sveukupno većeg prinosa fenola, za sve tri istraživane sorte grožđa ukupni prinos ovom metodom iznosio je 98 % (w/w) ukupnih fenola.

Odabir otapala također je bitan faktor prilikom provođenja MAE. Hoće li pojedino otapalo biti pogodno za provođenje ekstrakcije ovisi o topljivosti željenog spoja u tome otapalu, o njegovom prodiru i interakciji s matriksom uzorka, njegovoj dielektričnoj konstanti te kinetici prijenosa mase u procesu ekstrakcije (Veggi i sur., 2012). Poželjno je da otapalo ima visoku selektivnost prema spoju kojeg se želi ekstrahirati, dok prema ostatku komponenti matrice bude inertan. Odabrano otapalo mora moći apsorbirati mikrovalnu energiju i pretvoriti je u toplinu zagrijavanja. Ona otapala koja ne apsorbiraju mikrovalnu energiju ne mogu se koristiti, jer prilikom tretiranja mikrovalovima ne dolazi do zagrijavanja, primjer takvog otapala je heksan. Otapala poput vode, metanola i etanola pokazali su se izvrsnim otapalima prilikom provođenja MAE. Također kombiniranje različitih otapala pokazao se kao dobar način poboljšanja povećanja prinosa ekstrakcije. Tako se prilikom dodavanja vode organskom otapalu sprječava jačanje vodikovih veza među proteinima i fenolima koje se događa prilikom upotrebe čistog organskog otapala (Rajbhar i sur., 2015). Prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva najčešće koristi otopina etanola i vode (Osorio-Tobón, 2020). Još jedan parametar vezan uz otapalo bitno utječe na MAE, a to je omjer otapala i uzorka. Volumen otapala mora biti dovoljan da je cijeli uzorak potopljen u njemu cijelo vrijeme ekstrakcije. Volumenu otapala mora se prilagoditi i jačina mikrovalova te vrijeme trajanja ekstrakcije. Ukoliko je volumen otapala nedovoljan prinos ekstrakcije biti će manji, jer se neće moći ekstrahirati ukupna količina željenih spojeva zbog nedovoljne količine otapala. Akbari i sur. (2019) kao optimalan omjer za ekstrakciju fenolnih spojeva iz sjemenki piskavice odredili su 0,09 g mL⁻¹. Prilikom nižih omjera uzorka i otapala došlo je do značajno manjeg prinosa fenolnih spojeva, dok je kod većih omjera došlo do pada prinosa fenolnih spojeva. Pad prinosa prilikom većeg omjera autori su pripisali tome što je snaga mikrovalova ostala konstanta, dok se volumen uzorka povećao pri čemu se trebala

povećati i snaga mikrovalova. Da preveliki volumen otapala dovodi do manje prinosa ukupnih fenola pokazali su i Carniel i sur. (2017) prilikom provođenja MAE na biljci *Physalis angulata*. Istraživani omjeri bili su 10:1, 20:1 i 30:1 mL g⁻¹. Povećanje s omjera 10:1 na 20:1 doprinijelo je povećanju prinosa ukupnih fenola, međutim s povećanjem 20:1 na 30:1 došlo je do pada vrijednosti ukupnih fenola.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Uzorak lišća crnog ribiza

Kao materijal za istraživanje korišten je list crnog ribiza (lat. *R. nigrum* L.) podrijetlom iz Poljske (berba 2021. godina). Uzorak je nabavljen u trgovini za prodaju ljekovitog bilja, Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska) te je usitnjen do praškastog oblika pomoću električnog mlinca (CM 3260, Grundig, Njemačka).

2.1.2. Kemikalije

- Etanol, 96 %-tni (v/v) (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Etanol 30 %-tni

Priprema: S obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

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

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg mL⁻¹

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

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilksantol-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

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

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

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

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

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

Priprema: odvažuje 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 (Carlo Erba)
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: odvažuje 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 nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- 100 %-tni metanol
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno je čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 20 mM

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu Troloxa u koncentraciji 0,02 mol L⁻¹. Odvaga od 500 mg Troloxa se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL. Otopinu Troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježije pripremljena otopina standarda.

- 140 mM otopina kalijeva persulfata, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

Priprema: 0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi.

- 7 mM ABTS otopina

Priprema: 0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- stabilna ABTS•+ otopina

Priprema: 88 μ l $K_2S_2O_8$ otopine prenese se u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h, zamotano u aluminijsku foliju. Konačna koncentracija $K_2S_2O_8$ pri tome je 2,45 mmol L⁻¹.

- na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina ABTS•+

Priprema: 1000 μ l ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake. Podešava se koncentracija ABTS•+ tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$. Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

2.1.3. Aparatura

- Električni mlinac (CM3260, Grundig, Njemačka)
- Analitička vaga (ABT 220 – 4M, Kern, Njemačka)
- Tehnička vaga (RADWAG PS4500.R2, Poljska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE Ethos X, Sorisole (BG), Italija)
- Kupelj UP 400 S (Dr. Hielscher GmbH, Njemačka)

2.1.4. 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
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL
- Staklene kivete

- Magnetski mješači
- Lađice za vaganje
- Žličice (plastične/metalne)
- Pipete (100 μ L 200 μ L, 1 mL, 2 mL)
- Magnetni štapić

2.2. METODE

2.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom MAE

Izolacija fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza provedena je primjenom MAE uz upotrebu 30 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije s najvišim prinosom, tijekom provođenja eksperimenta varirani su parametri: temperatura (60, 70 i 80 °C), vrijeme (5 i 10 min) i omjer otapala i uzroka (20, 30 i 40 mL g⁻¹) Detaljan plan eksperimenta prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Plan eksperimenta izolacije fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom MAE

Uzorak	Omjer otapala i uzorka (mL g ⁻¹)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	20	60	5
2			10
3		70	5
4			10
5		80	5
6			10
7	30	60	5
8			10
9		70	5
10			10
11		80	5
12			10
13	40	60	5
14			10
15		70	5
16			10
17		80	5
18			10

Postupak ekstrakcije:

Odvažuje se masa usitnjenog uzorka prema planu eksperimenta (masa ovisi o omjeru otapala i uzorka, za omjer 20: $m=2,5$ g, za omjer 30: $m=1,67$ g, za omjer 40: $m=1,25$ g) u ćeliju ekstraktora i homogenizira se s 40 mL otapala za ekstrakciju. Potom se u svaku ćeliju ubaci magnetni mješalica te se postavljaju na rotor reaktora (slika 7). Na mikrovalnom ekstraktoru, postavljaju se parametri temperature i vremena ekstrakcije prema prikazu u tablici 1 te snaga mikrovalova 400 W. 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 (pomoću lijevka i filter papira) u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i do oznake nadopune 30 %-nim etanolom (slika 8). Pripremljeni uzorci prebace se u plastične

epruvete (Falcon) i dobro zatvore. Ekstrakti se skladište pri temperaturi +4 °C do trenutka provođenja spektrofotometrijskih analiza.



Slika 7. Mikrovalni reaktor (MILESTONE Ethos X) (*vlastita fotografija*)



Slika 8. Pripremljeni ekstrakti lista crnog ribiza (*vlastita fotografija*)

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Princip određivanja:

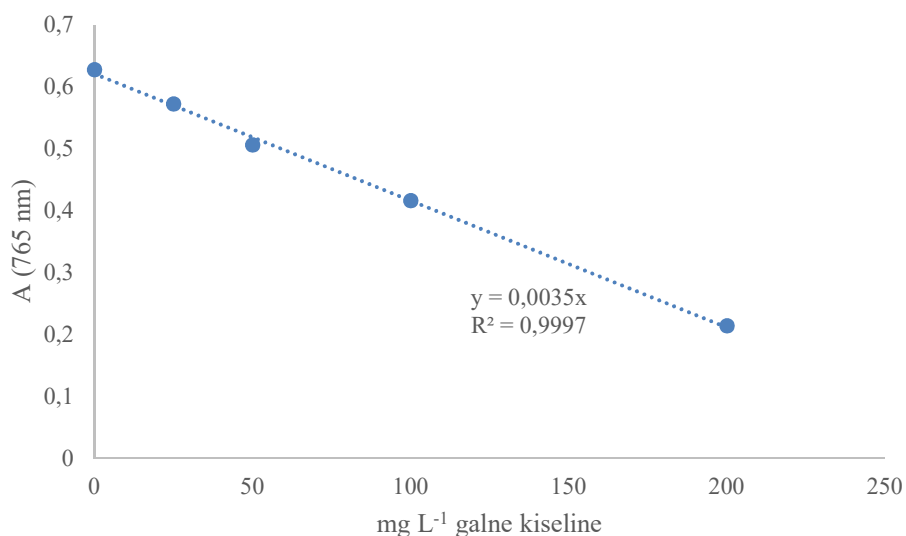
Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Navedene kiseline se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka, a plavo obojenje, čiji intenzitet je veći ukoliko je u uzorku prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U 100 μL ekstrakta dodaje se redom 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon 3 min 1 mL otopine natrijeva karbonata. Nakon miješanja pomoću Vortex miješalice pripremljeni uzorci se termostatiraju 25 min pri 50 °C, a zatim slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, a umjesto ekstrakta uzima se 100 μL ekstrakcijskog otapala.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremljena otopina galne kiseline (5 mg L^{-1}) razrijedi se destiliranom vodom u više razrjeđenja: 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira 100 μL galne kiseline određene koncentracije te se redom dodaje 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode, a nakon 3 min 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba umjesto galne kiseline sadrži 100 μL destilirane vode. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortexa i termostatiraju u vodenoj kupelji 25 min pri 50 °C. Nakon toga se pri valnoj duljini od 765 nm mjeri apsorbancija, a iz izmjerenih vrijednosti se pomoću programa Microsoft Excel crta baždarni pravac. Na apscisu baždarnog pravca nanose se koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 9).



Slika 9. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola [2]:

$$y = 0,0035 \cdot x (R^2 = 0,9997) [2]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE g⁻¹ uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

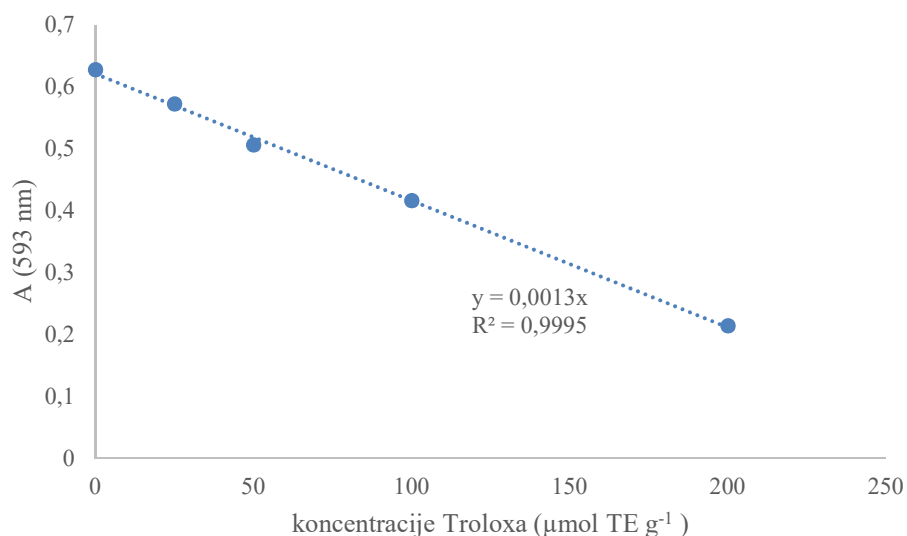
Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Postupak određivanja:

Za mjerenje apsorbancije uzoraka u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjernoj tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Na taj način dobije se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrjeđenja na sljedeći način: u tikvice se redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjavaju 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznose 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon toga se u staklene epruvete otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine Troloxa određene koncentracije i 2080 μL FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice izmješaju, a zatim se termostatiraju pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80 μL 96 %-tnog etanola. Slijedi mjerenje apsorbancije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm (slika 10).



Slika 10. Prikaz ovisnosti apsorbancije (593 nm) o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [3]:

$$y = 0,0013 \cdot x (R^2 = 0,9995) [3]$$

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 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja

Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja:

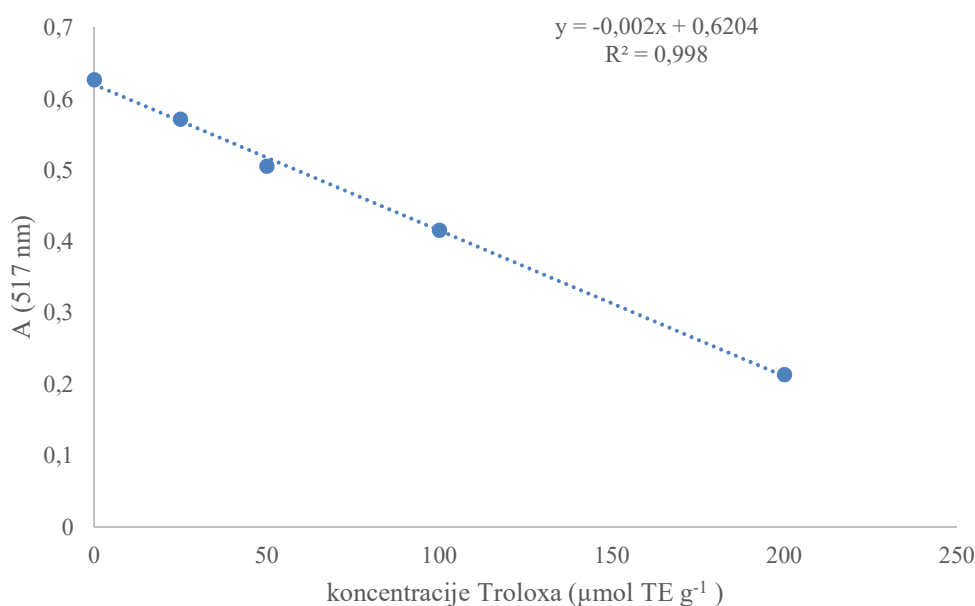
Provodi se prema metodi Shortle i sur. (2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μM .

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 517 nm (slika 11).



Slika 11. Prikaz ovisnosti apsorbanacije (517 nm) o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiselina (Trolox)

Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [4]:

$$y = -0,008 x + 1,3476 (R^2 = 0,9948) [4]$$

gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

x – ekvivalent Troloxa (TE) (μM)

R^2 – koeficijent determinacije

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

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip određivanja

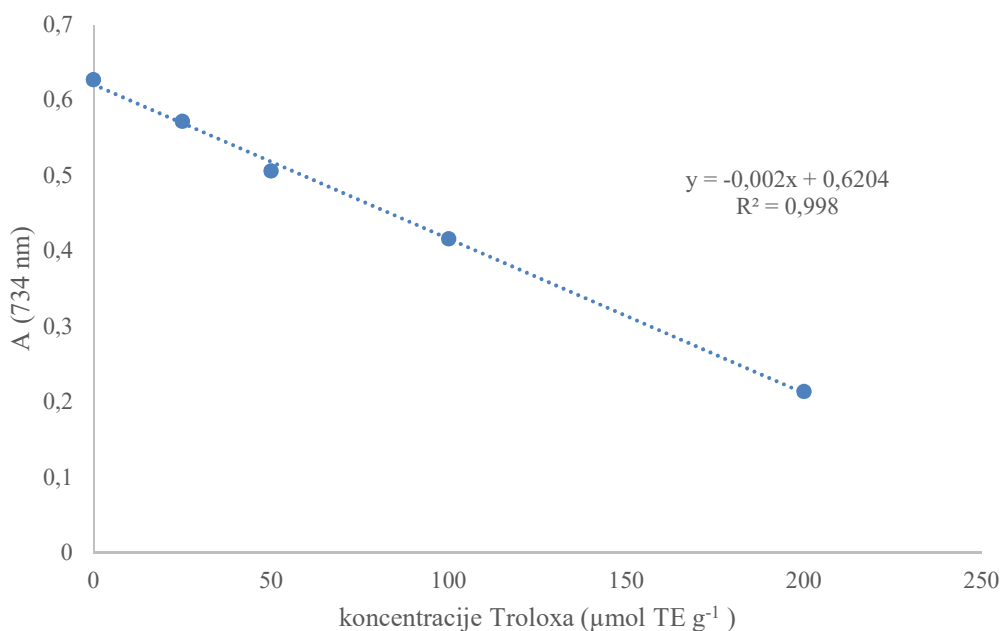
Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidanasa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). U prisutnosti antioksidanasa stabilni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ kation reducira se u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem plavo-zelene otopine (Pellegrini i sur., 2003). Vrijednosti dobivene za apsorbanciju uzorka izmjerenih $\text{ABTS}^{\bullet+}$ metodom preračunavaju se primjenom baždarnog pravca te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

Postupak određivanja

160 μL razrijeđenog uzorka pomiješa se s 2 mL 1 %-tnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu koristi se 96 %-tni etanol.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 0,02 mol L^{-1} standardna otopina Troloxa na način da se u plastičnoj lađici izvaže 500 mg Troloxa te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 100 i 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pipetiranjem redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se zatim do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom. U epruvetu se stavi 160 μL otopine Troloxa i pomiješa s 2 mL 1 %-tnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac tako što se na apscisu nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 734 nm (slika 12).



Slika 12. Prikaz ovisnosti apsorbancije (734 nm) o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [5]:

$$y = -0,002 x + 0,6204 (R^2 = 0,998) [5]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 734 nm

x – koncentracija Trolox otopine µM

R² – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u µmol TE g⁻¹ uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. Statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tusla SAD). Plan pokusa dizajniran je kao mješoviti puni faktorijski dizajn pri čemu su promatrane tri nezavisne varijable (faktora) na tri odnosno dvije razine, omjer otapala i uzorka, temperatura i vrijeme ekstrakcije, dok su kao zavisne varijable promatrani sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost ekstrakata određena FRAP, DPPH i ABTS metodama. Normalnost i homoskedastičnost raspodjele podataka su provjerene Shapiro-Wilks i Levene testovima pri čemu su normalno distribuirani i homoskedastični podaci analizirani multifaktorskom i jednosmjernom analizom varijance (engl. *one-way ANOVA*) te je

usporedba marginalnih prosjeka provedena post-hoc Tukey testom, dok su podaci s odstupanjem od normalne distribucije analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. Razina značajnosti korištena u svim testovima je bila $p \leq 0,05$ (*), a rezultati statističke analize su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza (*Ribes nigrum* L.) primjenom MAE te je određivana AOA ekstrakata pomoću tri metode: FRAP, ABTS i DPPH, pri čemu je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 30 %-tni etanol pri temperaturama 60, 70 i 80 °C, u vremenu trajanja ekstrakcije 5 i 10 min te pri omjeru otapala i uzorka 20, 30 i 40 mL g⁻¹.

Istraživan je utjecaj promatranih parametara na udio ukupnih fenolnih spojeva i AOA.

Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu i prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja ± standardna devijacija. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 11.0, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela fenolnih spojeva izoliranih iz lista crnog ribiza primjenom MAE prikazani su u tablici 5, dok je u tablici 6 dan prikaz statističke obrade dobivenih podataka. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja AOA pomoću metoda ABTS, DPPH i FRAP prikazani su u tablici 7, a statistička obrada navedenih rezultata u tablici 8.

4.1. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA UDIO FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA LISTA CRNOG RIBIZA

Tablica 5. Rezultati određivanja masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE g⁻¹) u ekstraktima lista crnog ribiza dobivenih primjenom MAE

Uzorak	Omjer otapala i uzorka (mL g ⁻¹)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Udio fenolnih spojeva (mg GAE g ⁻¹)
1	20	60	5	44,68 ± 1,13
2			10	47,94 ± 0,08
3		70	5	46,44 ± 1,86
4			10	45,80 ± 1,62
5		80	5	49,66 ± 0,08
6			10	48,23 ± 0,89
7	30	60	5	52,88 ± 1,03
8			10	48,56 ± 2,17
9		70	5	48,40 ± 1,99
10			10	49,03 ± 1,75
11		80	5	51,01 ± 0,18
12			10	41,87 ± 1,21
13	40	60	5	55,00 ± 2,18
14			10	56,97 ± 0,32
15		70	5	55,13 ± 0,32
16			10	52,20 ± 0,00
17		80	5	56,10 ± 2,90
18			10	66,19 ± 2,10

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija

Prema tablici 5 vidimo da se raspon ukupnih fenola kretao od $41,87 \pm 1,21$ mg GAE g⁻¹ do $66,19 \pm 2,10$ mg GAE g⁻¹. Najviši maseni udjeli ukupnih fenola određen je u uzorku 18 pri temperaturi od 80 °C, u vremenu trajanja ekstrakcije od 10 min te omjeru otapala i uzorka od 40 mL g⁻¹. Najniži maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku 12 pri temperaturi od 70 °C, u vremenu trajanja ekstrakcije od 10 min pri omjeru otapala i uzorka od 30 mL g⁻¹.

U tablici 6 prikazan je utjecaj temperature, vremena te omjera otapala i uzorka prilikom MAE na udio fenolnih spojeva (mg GAE g⁻¹). Temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije nisu se pokazali kao statistički značajni parametri ($p > 0,05$) dok se omjer otapala i uzorka pokazao kao statistički značajan parametar ($p \leq 0,05$).

Tablica 6. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima lista crnog ribiza

	N	Udio fenolnih spojeva (mg GAE g ⁻¹)
Temperatura		$p=0,52 \ddagger$
60°C	12	$51,01 \pm 1,33^a$
70°C	12	$49,50 \pm 1,03^a$
80°C	12	$52,17 \pm 2,30^a$
Vrijeme		$p=0,88 \ddagger$
5 min	18	$51,03 \pm 0,97^a$
10 min	18	$50,75 \pm 1,64^a$
Omjer otapalo i uzorak		$p < 0,01 \dagger$
20:1	12	$47,12 \pm 0,56^a$
30:1	12	$48,63 \pm 1,08^a$
40:1	12	$56,93 \pm 1,37^b$
Prosječna vrijednost	36	50,89

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

\ddagger statistički značajan faktor pri $p \leq 0,05$.

Vrijednosti unutar istog stupca označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$.

Iz rezultata statističke obrade u tablici 6 vidljivo je da je prosječna vrijednost masenog udjela fenolnih spojeva iznosila 50,89 mg GAE g⁻¹, što je slično literaturnim podacima o udjelu fenolnih spojeva od $50,62 \pm 1,30$ mg GAE g⁻¹ koji je dobiven u vodenom ekstraktu lista crnog

ribiza prilikom MAE (Cao-Ngoc i sur., 2020). Nešto više vrijednosti dobivene su i u istraživanju koje su proveli Vagiri i sur. (2015) koji su uspoređivali udio ukupnih fenola u listu crnog ribiza s obzirom na vrijeme berbe i položaj lista. Prosječna vrijednost udjela fenolnih spojeva u njihovom istraživanju s obzirom na vrijeme berbe i položaj lista iznosila je 67 mg GAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima ovog rada vidljivo je da povećanje temperature ekstrakcije sa 60 na 80 °C nije dovelo do značajnog porasta u vrijednosti ukupnih fenola. Iz navedenog može se zaključiti da je najniža primijenjena temperatura od 60 °C dovoljno učinkovita i optimalna za ekstrakciju, jer daljnjim povišenjem ne dolazi do značajnog rasta vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva.

Odabir temperature ekstrakcije u velikoj je mjeri ovisan o samoj prirodi materijala te strukturi fenolnih spojeva u materijalu. Povećanje temperature pospješuje ekstrakciju jer dovodi do smanjenja viskoznosti i površinske napetosti otapala čime je omogućeno bolje otapanje željenih spojeva (Talmaciu i sur., 2015). Povećanje temperature u ovom istraživanju nije dovelo do poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije, što bi mogla biti posljedica ispitivanja relativno uskog temperaturnog raspona koji se i u prethodnim istraživanjima pokazao kao najpogodniji za izolaciju fenolnih spojeva. Tako su Gao i sur. (2020) pokazali kako je optimalna temperatura za izolaciju fenola iz lista bijele murve 66 °C. Akbari i sur. (2021) su proveli MAE na uzorku lista pasjeg trna pri temperaturama od 40, 50, 60, 70 i 80 °C. Maksimalni udio ukupnih fenolnih spojeva postignut je pri 70 °C, no nakon postizanja maksimuma, došlo je do pada koji je najvjerojatnije posljedica degradacije prisutnih fenola pri višoj temperaturi, stoga je 70 °C utvrđeno kao optimalna temperatura za ekstrakciju najvećeg udjela ukupnih fenolnih spojeva. Međutim, u nekim istraživanjima optimalne temperature bile su značajno više od promatranog raspona u ovom radu. Tako su Ciulu i sur. (2017) proveli MAE na uzorku lista stevije pri temperaturama od 75, 100, 125 i 150 °C. Najbolji rezultati dobiveni su pri temperaturama 100, 125 i 150 °C ali s obzirom da među njima nije utvrđena statistički značajna razlika kao optimalna temperatura određena je 100 °C. U ostalim istraživanjima gdje se provodila ekstrakcija fenola potpomognuta mikrovalovima raspon korištenih temperatura kretao se od 45 pa sve do 200 °C, dok su najčešće korištene temperature bile u rasponu od 60 do 90 °C, što je u skladu s ovim istraživanjem (Kala i sur., 2016).

Primijenjena vremena ekstrakcije bila su 5 i 10 min, a prema dobivenim vrijednostima uočavamo da produljenjem vremena ekstrakcije nije došlo do značajne razlike u vrijednostima masenih udjela ukupnih fenola. S obzirom na navedeno, može se utvrditi da vrijeme izloženosti mikrovalovima nije značajan faktor unutar promatranog raspona te je kraći tretman od 5 min dovoljno učinkovit za izolaciju fenolnih spojeva lista crnog ribiza.

Vrijeme trajanja ekstrakcija prilikom upotrebe mikrovalova najčešće je puno kraće od vremena prilikom korištenja konvencionalnih tehnika ekstrakcija i obično varira od nekoliko minuta do pola sata, čime se izbjegava potencijalna termalna razgradnja i oksidacija spojeva koji se žele ekstrahirati (Chan i sur., 2011). Na vrijeme ekstrakcije mikrovalovima utječu i dielektrična svojstva otapala, tako se otapala poput vode, etanola i metanola mogu jako zagrijati prilikom duljeg izlaganja mikrovalovima čime se ugrožava stabilnost termolabilnih sastojaka (Veggi i sur., 2012).

Alupului i sur. (2012) su istraživali utjecaj vremena trajanja MAE na ekstrakciju fenola iz lista artičoke i dobiveni rezultati su pokazali kako je optimalno vrijeme ekstrakcije 5 min. Slične rezultate dobili su i Pan i sur. (2003) prilikom istraživanja utjecaja parametara MAE na izolaciju fenola iz lišća zelenog čaja. Kao optimalno vrijeme ekstrakcije pokazalo se 4 min, nakon čega je došlo do smanjenja udjela ukupnih fenola. Nešto niže vrijeme ekstrakcije u svom istraživanju odredili su Dahmoune i sur. (2015) koji su kao optimalno vrijeme za izolaciju fenola iz lista mirte utvrdili 62 s, dok su Ince i Sahin (2012) zaključili kako je 10 min optimalno vrijeme za ekstrakciju fenola iz lista koprive. U ostalim provedenim istraživanjima vrijeme trajanja MAE iznosilo je od 30 s pa sve do 5 h (Kala i sur., 2016). Općenito s povećanjem vremena ekstrakcije raste količina ekstrahirane aktivne komponente iako s duljim vremenom ekstrakcije postoji rizik od degradacije te iste komponente. Ponekad, kada je potrebno dulje vrijeme ekstrakcije uzorci se ekstrahiraju u više koraka koristeći uzastopne cikluse. U tom slučaju svježe otapalo dovodi se na zaostali talog, a proces se ponavlja kako bi se osiguralo iscrpljivanje svih željenih sastojaka iz matrice (Veggi i sur., 2012). Ovim postupkom je smanjeno vrijeme izlaganja mikrovalovima, a povećan je sveukupni prinos željenog spoja (Chan i sur., 2011). Tako su Lin i sur. (2020) pokazali kako se prinos ukupnih fenola ekstrahiranih pomoću mikrovalova iz lista jagode povećao kada su se umjesto jednog ciklusa ekstrakcije provela dva ciklusa pri istim uvjetima. Daljnjim povećanjem broja ciklusa nije zabilježeno veće povećanje prinosa ukupnih fenola.

Primijenjeni omjeri uzorka i otapala u ovom radu bili su 20, 30 i 40 mL g⁻¹, a prema dobivenim vrijednostima masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva možemo primijetiti kako s povećanjem omjera otapala i uzorka raste i maseni udio ukupnih fenola. Isto možemo zaključiti i prema podacima statističke analize, iz tablice 6, gdje vidimo da je omjer otapala i uzorka statistički značajan parametar za udio ukupnih fenolnih spojeva, odnosno da je povećanjem udjela otapala došlo do porasta u masenom udjelu ukupnih fenolnih spojeva. Vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva za omjere 20 i 30 mL g⁻¹ međusobno se statistički ne razlikuju, ali se značajno statistički razlikuju u usporedbi sa vrijednosti omjera 40 mL g⁻¹ pri kojem je i ostvaren najveći maseni

udio ukupnih fenolnih spojeva. Iz navedenog možemo zaključiti kako je optimalan omjer otapala i uzorka za ekstrakciju fenola 40 mL g^{-1} .

Omjer otapala i uzorka važan je parametar prilikom ekstrakcije, jer je potrebno da volumen otapala bude dovoljan kako bi cijeli uzorak bio uronjen u otapalo što je iznimno bitno za uzorke koji mogu nabubriti tijekom ekstrakcije (Tatke i Jaiswal, 2011). Nadalje, optimalan omjer otapala i uzorka osigurava homogenu i efektivno zagrijavanje cijelog sustava. Prevelika količina otapala može uzrokovati slabije zagrijavanje mikrovalovima, jer s povećanjem količine otapala dolazi do povećanja veličine uzorka dok se snaga mikrovalova održava konstantnom prilikom čega se gustoća snage smanjuje što dovodi do smanjenog zagrijavanja cijelog uzorka (Dahmoune i sur., 2014). Manjak otapala doveo bi do stvaranja barijere kod prijenosa mase s obzirom da dio uzorka potencijalno ne bi ostvario kontakt s otapalom prilikom čega ne bi bila omogućena ekstrakcija iz tog dijela uzorka (Li i sur., 2010). Povećanje omjera otapala i uzorka u optimalnim granicama dovodi do poboljšanja ekstrakcije jer dolazi do povećanja koncentracijskog gradijenta koji pokreće prijenos mase otopljenih tvari u vanjsko otapalo (Dahmoune i sur., 2014).

Slične rezultate dobivenim u ovom istraživanju dobili su Belwal i sur. (2016), gdje se kao optimalan omjer otapala i uzorka prilikom ekstrakcije fenola pokazao omjer 45 mL g^{-1} . Da je omjer otapala i uzorka značajan parametar prilikom korištenja MAE pokazali su i Bhuyan i sur. (2015). U svom su istraživanju ispitali utjecaj mase uzorka lista eukaliptusa (2, 5 i 8 g) u 100 mL otapala (voda) i pokazali kako s porastom udjela uzorka u 100 mL otapala dolazi do pada udjela ukupnih fenola, odnosno što je manji udio uzorka u istoj količini otapala prinos ekstrakcije je bolji. Slične rezultate su dobili i Lin i sur. (2020) gdje se kao idealan omjer za ekstrakciju fenola mikrovalovima iz lista jagode pokazao omjer od 60 mL g^{-1} . Da pretjerano povećanje omjera otapala i uzorka negativno utječe na prinos ukupnih fenola u svojem istraživanju zabilježili su Dahmoune i sur. (2014). U svom istraživanju određivali su udio izoliranih fenola iz lista pistacije prilikom kojeg su pratili utjecaj omjera otapala i uzorka na prinos fenola. Primijenjeni omjeri bili su 10, 20, 25, 30 i 40 mL g^{-1} . Prinos fenola povećavao se sa povećanjem omjera sve do omjera od 25 mL g^{-1} nakon kojeg je primijećen trend smanjivanja pri omjerima od 30 i 40 mL g^{-1} što je vjerojatno posljedica slabijeg zagrijavanja uslijed velike količine otapala u kojem se uzorak nalazi.

Međutim, sva tri parametra ekstrakcije koja su istraživana međusobno su usko povezana. Tako predugo izlaganje mikrovalovima pri niskim temperaturama ili snagama dovodi do smanjenja prinosa zbog narušavanja kemijske strukture aktivne komponentne (Chan i sur., 2011). S druge strane ukoliko se primjenjuju visoke temperature i jača snaga mikrovalova, vrijeme trajanja

ekstrakcije potrebno je prilagoditi tim uvjetima. Megawati i sur. (2019) provodili su MAE fenola iz lista kiselice u trajanju od 2, 4, 6, 8 i 10 min pri snagama 300, 450 i 600 W. Pri snazi od 300 i 450 W tijekom povećanja trajanja ekstrakcije povećavao se i udio fenolnih spojeva dok je pri snazi od 600 W do postizanja najvećeg udjela fenola došlo pri vremenu od 8 min, nakon čega je pri 10 min zabilježen smanjeni udio fenola. Slične rezultate u svojem istraživanju pokazali su i Saifullah i sur. (2021). Istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije, snage mikrovalova te omjera uzorka i otapala. Primijenjena vremena ekstrakcije bila su 2, 4 i 6 min, snaga 90, 495 i 900 W, a omjeri otapala i uzorka iznosili su 2, 5 i 8 g na 100 mL. Tako je primjerice pri istom omjeru otapala i uzorka od 2 g na 100 mL maksimalna vrijednost fenola pri snazi od 90 W postignuta za 6 min, dok je pri snazi od 900 W maksimum postignut za 4 min. Iz svega navedenog proizlazi važnost optimizacije svih parametara ekstrakcije u ovisnosti o karakteristikama istraživanih materijala i aktivnih komponenata.

Rezultati ovog rada pokazuju da su uvjeti za optimalnu MAE ukupnih fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza: temperatura od 60 °C, vrijeme ekstrakcije od 5 min te omjer uzorka i otapala u vrijednosti od 40 mL g⁻¹. Pri navedenim uvjetima ostvaruje se maseni udio ukupnih fenolnih spojeva od 55,00 ± 2,18 mg GAE g⁻¹.

4.2. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) ekstrakata lista crnog ribiza dobivenih primjenom MAE

Uzorak	Omjer otapala i uzorka (mL g^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Vrijeme (min)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)		
				ABTS	DPPH	FRAP
1	20	60	5	421,22 \pm 4,23	305,67 \pm 1,23	384,31 \pm 18,44
2			10	428,84 \pm 3,53	281,58 \pm 3,00	359,11 \pm 6,51
3		70	5	460,68 \pm 6,36	291,01 \pm 2,12	415,95 \pm 11,96
4			10	436,16 \pm 1,41	286,74 \pm 0,35	340,58 \pm 14,13
5		80	5	518,88 \pm 0,71	309,14 \pm 1,77	602,28 \pm 20,67
6			10	446,29 \pm 3,52	303,93 \pm 1,94	415,43 \pm 28,18
7	30	60	5	517,57 \pm 11,64	410,58 \pm 3,70	524,85 \pm 13,02
8			10	531,57 \pm 3,17	370,08 \pm 6,07	468,76 \pm 9,75
9		70	5	541,09 \pm 22,20	356,46 \pm 5,02	617,60 \pm 21,14
10			10	547,39 \pm 24,33	356,46 \pm 5,02	470,67 \pm 21,16
11		80	5	602,74 \pm 8,45	415,22 \pm 5,81	513,76 \pm 14,63
12			10	549,34 \pm 19,03	369,73 \pm 5,02	478,47 \pm 35,78

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) ekstrakata lista crnog ribiza dobivenih primjenom MAE (nastavak)

13	40	60	5	589,52 \pm 1,41	452,58 \pm 14,14	567,42 \pm 28,27
14			10	534,22 \pm 21,15	437,75 \pm 2,47	573,69 \pm 13,02
15		70	5	530,97 \pm 19,73	431,57 \pm 5,29	521,28 \pm 21,68
16			10	999,16 \pm 9,89	464,75 \pm 1,77	516,59 \pm 8,70
17		80	5	585,44 \pm 8,47	483,18 \pm 2,82	563,31 \pm 23,88
18			10	703,73 \pm 8,47	432,89 \pm 5,30	723,52 \pm 58,66

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna devijacija

U tablici 8 prikazan je utjecaj temperature, vremena i omjera uzorka i otapala prilikom MAE na AOA ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) određenu metodama ABTS, DPPH i FRAP. Temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije nisu se pokazali kao statistički značajni parametri ($p > 0,05$) dok se omjer otapala i uzorka pokazao kao statistički značajan parametar ($p \leq 0,05$).

Tablica 8. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta lista crnog ribiza

	N	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)		
		ABTS	DPPH	FRAP
Temperatura		p=0,28‡	p=0,93‡	p=0,27‡
60°C	12	503,82 ± 18,25 ^a	376,37 ± 19,43 ^a	479,69 ± 25,57 ^a
70°C	12	585,91 ± 57,23 ^a	376,30 ± 21,04 ^a	480,45 ± 26,54 ^a
80°C	12	567,74 ± 23,93 ^a	385,68 ± 19,64 ^a	549,46 ± 30,38 ^a
Vrijeme		p=0,30‡	p=0,28‡	p=0,22‡
5 min	18	529,79 ± 13,90 ^a	391,80 ± 16,24 ^a	523,42 ± 18,33 ^a
10 min	18	575,19 ± 41,18 ^a	367,10 ± 15,51 ^a	482,98 ± 26,94 ^a
Omjer otapalo:uzorak		p<0,01†	p<0,01†	p<0,01†
1:20	12	452,01 ± 9,82 ^a	296,34 ± 3,16 ^a	419,61 ± 26,26 ^a
1:30	12	548,28 ± 8,77 ^b	391,56 ± 8,21 ^b	512,35 ± 16,21 ^b
1:40	12	657,17 ± 49,30 ^b	450,45 ± 5,83 ^c	577,63 ± 21,77 ^b
Prosječna vrijednost	36	552,49	379,45	503,20

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

‡statistički značajan faktor pri $p \leq 0,05$.

Vrijednosti unutar istog stupca označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$.

Prema tablici 7 vidimo da se raspon AOA za ABTS metodu kretao od $421,22 \pm 4,23 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ do $999,16 \pm 9,89 \mu\text{mol TE g}^{-1}$. Najniža vrijednost izmjerena je u uzorku 1 pri temperaturi od 60 °C, u tijekom trajanja ekstrakcije od 5 min i pri omjeru otapala i uzorka od 20 mL g⁻¹. Najveća AOA ABTS metodom određena je u uzorku 16 pri temperaturi od 70 °C, tijekom trajanja ekstrakcije od 10 min i pri omjeru otapala i uzorka od 40 mL g⁻¹. AOA određena DPPH metodom kretala se od $281,58 \pm 3,00 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ do $483,18 \pm 2,82 \mu\text{mol TE g}^{-1}$. Najniža vrijednost određena je u uzorku 2 pri temperaturi od 60 °C, tijekom trajanja ekstrakcije od 10 minuta pri omjeru otapala i uzorka od 20 mL g⁻¹. Najveća vrijednost određena je u uzorku 17, pri temperaturi od 80 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 5 min pri omjeru otapala i uzorka

od 40 mL g⁻¹. Vrijednosti AOA određene FRAP metodom kretale su se od 340,58 μmol TE g⁻¹ ± 14,13 do 723,52 ± 58,66 μmol TE g⁻¹. Najveća vrijednost određena je u uzorku 18 pri temperaturi od 80 °C tijekom trajanja ekstrakcije od 10 min i omjera otapala i uzorka od 40 mL g⁻¹, dok je najmanja vrijednost određena u uzorku 4 pri temperaturi od 60 °C, u vremenu trajanja ekstrakcije od 10 min pri omjeru otapala i uzorka od 20 mL g⁻¹. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su rasponi za ABTS i FRAP metode veći od onih dobivenih DPPH metodom. Navedeno može biti posljedica toga što DPPH pokazuju bolje rezultate u vodenim otopinama i u otopinama nepolarnih organskih otapala (Prior i sur., 2005). Još jedan razlog nižih vrijednosti DPPH metode možemo pripisati tome da su u ekstraktu lista prisutni glikozidi antocijanina za koje se pokazalo mogu dovesti do interferiranja prilikom mjerenja apsorbancije uzorka (Shalaby i Shanab, 2013). Također možemo vidjeti kako je neovisno o primijenjenoj metodi, najviša AOA određena u ekstraktima dobivenim pri temperaturi od 80 °C te omjeru 40 mL g⁻¹, dok su najniže vrijednosti postignute pri temperaturi od 60 °C te omjeru 20 mL g⁻¹.

Prosječne vrijednosti AOA određene ABTS metodom blago rastu povećanjem temperature sa 60 na 70 i 80 °C. Međutim, prema rezultatima statističke analize u tablici 8 uočeni porast nije značajan. Kod mjerenja AOA DPPH metodom pregledom prosječnih vrijednosti pri ispitivanim temperaturama možemo zaključiti da nema razlike među promatranim rezultatima, što potvrđuje i statistička analiza. Slično kretanje vrijednosti s povećanjem temperature može se primijetiti i u rezultatima FRAP metode. Prosječne vrijednosti između prve dvije temperature gotovo se ne razlikuju, dok se pri najvišoj temperaturi vrijednost AOA blago povećava, no ne statistički značajno. S obzirom na navedeno kao optimalnu temperaturu možemo odrediti 60 °C, jer povišenjem temperature ne dolazi do značajnog rasta AOA bez obzira na primijenjenu metodu određivanja.

Nešto više temperature za postizanje maksimalne AOA u svom istraživanju dobili su Wan i sur. (2011). Oni su određivali AOA pomoću DPPH i ABTS metoda u ekstraktu lista *Gynura divaricate* pri temperaturama od 40, 60, 80, 90 i 100 °C od kojih im se kao optimalna pokazala temperatura od 90 °C. Gullón i sur. (2017) su najvišu AOA pomoću FRAP metode izmjerili u ekstraktu lista eukaliptusa koji je pripremljen pri temperaturi 25 °C. Za razliku od ovih rezultata u istraživanju koje su proveli Fernández-Agulló i sur. (2019) najbolji rezultati FRAP metode dobiveni su u ekstraktu lista lješnjaka koji je dobiven pri temperaturi od 75 °C. Za razliku od njih, nešto nižu temperaturu potvrdili su Dadi i sur. (2019) kada su određivali AOA u ekstraktu lista afričke moringe dobivenog ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Kao optimalna temperatura pokazala im se ona od 40 °C za sve tri metode. Iako u ovom radu nije uočen značajan utjecaj, temperatura je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na AOA (Réblová,

2012). Zagrijavanje općenito dovodi do ubrzanja reakcija inicijacije čime se smanjuje aktivnost prisutnim ili dodanim antioksidansima. Također varijacije u temperaturi mogu promijeniti mehanizam djelovanja nekih antioksidansa (Yanishlieva, 2001).

Prilikom produljenja trajanja ekstrakcije kod vrijednosti AOA izmjerene ABTS metodom vidimo da s porastom vremena trajanja ekstrakcije ne dolazi do značajnog porasta izmjerene vrijednosti AOA. S obzirom na to i rezultate statističke analize možemo zaključiti kako vrijeme ekstrakcije u promatranom rasponu nije statistički značajan parametar prilikom mjerenja AOA ABTS metodom. Kod dobivenih rezultata AOA izmjerene DPPH metodom vidimo da s porastom vremena trajanja ekstrakcije dolazi do blagog smanjenja vrijednosti AOA, no bez statističkog značaja. Isti se trend može uočiti i kod rezultata mjerenja AOA FRAP metodom.

Iz navedenog se može zaključiti kako produljenje MAE s 5 na 10 min nije značajno utjecalo na AOA ekstrakata lista crnog ribiza neovisno o metodi mjerenja, stoga se kao optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije može odabrati 5 min.

Da produljenje vremena trajanja ekstrakcije nije značajan faktor prilikom ekstrakcije u svom istraživanju zaključili su i Pollini i sur. (2020). Oni su u svom istraživanju proučavali utjecaj parametara, od kojih je jedan i vrijeme, ultrazvučne ekstrakcije na antioksidacijska svojstva lišća konjske rotkvice. Ispitivana vremena kretala su se između 10 i 60 min, a vrijednosti dobivene metodama DPPH i FRAP pri najkraćem i najduljem vremenu nisu se značajno razlikovale. Slične rezultate dobili su i Dadi i sur. (2019) prilikom istraživanja utjecaja parametara ultrazvučne ekstrakcije na AOA ekstrakta afričke moringe. Oni su kao optimalno vrijeme trajanje ekstrakcije odredili 10 min s obzirom da su sve tri metode (DPPH, FRAP i ABTS) pokazale najviše vrijednosti pri tom vremenu dok su se vrijednosti AOA smanjivale s povećanjem vremena trajanja ekstrakcije.

Iako povećanje vremena u nekim istraživanjima nije dovelo do značajnog porasta AOA, u drugim istraživanjima je pokazano kako produljenje ekstrakcije ipak može dovesti do povećanja vrijednosti AOA. Tchabo i sur. (2018) istraživali su utjecaj nekoliko parametara između ostalog i vremena na AOA vodenog ekstrakta lista duda. Ispitivana vremena bila su: 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90 i 120 min između kojih se kao optimalno vrijeme za sve tri metode (ABTS, FRAP i DPPH) pokazalo vrijeme od 40 min. Do vremena od 40 min vrijednosti AOA su rasle do najviše vrijednosti koja je ostvarena pri 40 min, nakon čega je vrijednost AOA počela padati. Ovaj pad vrijednosti AOA nakon 40 min možemo povezati i s padom vrijednosti pojedinih aktivnih komponenata poput klorogenske i kafeinske kiseline, odnosno možemo pretpostaviti da je došlo do degradacije navedenih spojeva. Slične rezultate u svojem istraživanju dobili su Shang i sur. (2020) kada su istraživali učinke MAE na AOA biljke

Lithocarpus polystachyus. Korištena vremena kretala su se između 10 i 60 min, a najviše vrijednosti AOA, metodama DPPH i FRAP pokazala je ekstrakcija u trajanju od 20 min. Vremena dulja od 20 min pokazala su pad vrijednosti AOA neovisno o metodi mjerenja.

Vrijednosti AOA dobivene ABTS metodom rastle su s povećanjem omjera otapala i uzorka. Da se radi o primjetnom rastu pokazali su i rezultati statističke analize. Između dobivenih vrijednosti za različite omjere možemo reći da se vrijednost dobivena kod omjera 20 mL g⁻¹ statistički značajno razlikuju od vrijednosti dobivenih kod omjera 30 i 40 mL g⁻¹. Međutim vrijednosti dobivene kod primijenjenih omjera od 30 i 40 mL g⁻¹ međusobno se značajno ne razlikuju. Iz navedenog možemo zaključiti kako bi optimalan omjer za AOA mjerenu ABTS metodom bio 30 mL g⁻¹, jer se ostvaruje sličan rezultat s manjom potrošnjom otapala. Sličan trend rasta vrijednosti s porastom omjera otapala i uzorka možemo primijetiti i kod DPPH metode. Vrijednosti dobivene DPPH metodom pri različitim omjerima međusobno se statistički značajno razlikuju, a najveća vrijednost ostvarena je prilikom upotrebe omjera od 40 mL g⁻¹. Vrijednosti FRAP metode također pokazuju trend rasta s povećanjem omjera otapala i uzorka. Kao i kod ABTS metode vrijednost dobivena pri 20 mL g⁻¹ statistički se značajno razlikuje od vrijednosti dobivenih pri omjerima 30 i 40 mL g⁻¹, dok se vrijednosti između ta dva omjera međusobno statistički značajno ne razlikuju. Iz navedenog možemo zaključiti kako bi optimalan omjer za FRAP metodu bio 30 mL g⁻¹. Dakle, za sve tri metode možemo uočiti kako s povećanjem omjera raste i izmjerena vrijednost AOA što potvrđuje i statistička analiza.

Slične rezultate su u svom istraživanju pokazali i Niu i sur. (2019) kada su optimirali uvjete MAE iz lišća galangala. U svojem istraživanju pratili su AOA pri omjerima 10, 15, 20, 25 i 30 mL g⁻¹ gdje su ABTS i DPPH metode najveću AOA imale kod omjera 30 mL g⁻¹. Međutim s obzirom da nije bilo statistički značajne razlike između vrijednosti dobivene pri 30 mL g⁻¹ i one izmjerene pri omjeru od 25 mL g⁻¹ kao optimalan odabrali su omjer od 25 mL g⁻¹ zbog manje potrošnje otapala. U istom istraživanju FRAP metoda pokazala je najveću vrijednost AOA pri 30 mL g⁻¹ te se ona statistički značajno razlikovala od vrijednosti izmjerene pri 25 mL g⁻¹ pa bi kao optimalan omjer za ovu metodu odabrali omjer 30 mL g⁻¹. Da omjer uzorka i otapala utječe na AOA pokazali su i Alara i sur. (2018). Oni su optimirali parametre MAE iz lista *Vernonia amygdalina*. AOA dobivenog ekstrakta određivali su metodama ABTS i DPPH. Istraživani omjeri uzorka i otapala kretali su se od 1:8 do 1:16 mL g⁻¹, a kao optimalan omjer pokazao se 1:10 jer s daljnjim povećanjem nije došlo do značajnog porasta vrijednosti AOA. Dobiveni rezultati su u skladu s zakonima prijenosa mase, odnosno činjenicom da je pokretačka sila tijekom prijenosa mase koncentracijski gradijent između krute i tekuće faze koji je veći s većim korištenim omjerom uzorka i otapala (Radojković i sur., 2012).

Vidimo da dobivene vrijednosti prilikom određivanja ukupnih fenola i AOA prate iste trendove, odnosno u oba slučaja se kao statistički značajan parametar pokazao omjer otapala i uzorka. Ovo zapažanje možemo povezati s time da su fenolnih spojevi jedni od glavnih antioksidansa u biljnim ekstraktima pa ukoliko dođe do povećanja masenog udjela ukupnih fenola možemo pretpostaviti da će doći i do povećanja izmjerene antioksidacijske aktivnosti. Povezanost vrijednost ukupnih fenola s određenom AOA pokazali su Amensour i sur. (2009) prilikom određivanja ukupnih fenolnih spojeva i AOA u ekstraktu lista mirte. Oni su utvrdili pozitivnu korelaciju udjela ukupnih fenolnih spojeva s AOA koju su mjerili pomoću DPPH metode. Slična opažanja u svojem su radu zabilježili Khiya i sur. (2021) prilikom istraživanja polifenolnog sastava i AOA ekstrakta lista ljekovite kadulje. Oni su također pokazali da ukupni fenolni spojevi imaju pozitivnu korelaciju s AOA izmjerenom pomoću DPPH i FRAP metode. S obzirom na sve navedeno, kao optimalni parametri MAE za postizanje najveće AOA mogu se izdvojiti temperatura od 60 °C, vrijeme trajanja ekstrakcije od 5 min te omjer otapala i uzorka od 40 mL g⁻¹. Pri navedenim uvjetima ostvarene su slijedeće vrijednosti AOA ekstrakata lista crnog ribiza: 589,52 ± 1,41 μmol TE g⁻¹ (ABTS), 452,58 ± 14,14 μmol TE g⁻¹ (DPPH) i 567,42 ± 28,27 μmol TE g⁻¹ (FRAP).

4. ZAKLJUČCI

1. Primjenom MAE iz lista crnog ribiza ekstrahirani su fenolni spojevi s prosječnom vrijednosti udjela ukupnih fenola od 50,89 mg GAE g⁻¹.
2. AOA ekstrakata određen je ABTS metodom s prosječnom vrijednošću 552,49 μmol TE g⁻¹, DPPH metodom s prosječnom vrijednošću 379,45 μmol TE g⁻¹ i FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 503,20 μmol TE g⁻¹.
3. Ispitivani parametri temperature i vremena ekstrakcije prilikom MAE nisu pokazali statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na udio ukupnih fenole i na AOA ekstrakata.
4. S povećanjem omjera otapala i uzorka došlo je do povećanja masenog udjela ukupnih fenola kao i do povećanja AOA.
5. Utvrđeni optimalni parametri za izolaciju ukupnih fenola lista crnog ribiza primjenom MAE su: temperatura 60 °C, vrijeme ekstrakcije 5 min, omjer otapala i uzorka 40 mL g⁻¹. Pri istim uvjetima ostvaruje se i najviši AOA.
6. Iz svega navedenog, MAE se pokazala učinkovitom metodom za ekstrakciju fenola iz lista crnog ribiza, čijom se primjenom ostvaruju visoki maseni udjeli ukupnih fenola kao i visoke vrijednosti AOA proizvedenih ekstrakata.

5. LITERATURA

Akbari S, Abdurahman NH, Yunus RM (2019) Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool. *C R Chim* **22**, 714-727. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.07.007>

Akbari S, Abdurahman NH, Yunus RM, Alsaggaf AHA, Ahmed N (2021) LC-QTOF-MS analysis of phenolics and saponins extracted from Aloe vera leaves via microwave technology in optimal condition. *S Afr J Bot* **139**, 362-373. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.027>

Alara OR, Abdurahman NH (2019) Microwave-assisted extraction of phenolics from Hibiscus sabdariffa calyces: Kinetic modelling and process intensification. *Ind Crops Prod* **137**, 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.053>

Alara OR, Abdurahman NH, Olalere OA (2018) Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids and antioxidants from Vernonia amygdalina leaf using response surface methodology. *Food Bioprod Process* **107**, 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.007>

Alupului A, Calinescu I, Lavric V (2012) Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Sci Bull B* **74**, 129-142.

Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J (2009) Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun* **4**, 819-824. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X0900400616>

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F i sur. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Belwal T, Bhatt ID, Rawal RS, Pande V (2017) Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves. *Ind Crops Prod* **95**, 393-403. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.049>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116.

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76.

Bhuyan DJ, Van Vuong Q, Chalmers AC, van Altena IA, Bowyer MC, Scarlett CJ (2015) Microwave-assisted extraction of Eucalyptus robusta leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Ind Crops Prod* **69**, 290-299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.044>

Birt DF, Jeffery E (2013) Flavonoids. *Adv Nutr* **4**, 576-577. <https://doi.org/10.3945/an.113.004465>

Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from Bauhinia tarapotensis. *J Nat Prod* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>

Brahmi F, Mechri B, Dabbou S, Dhibi M, Hammami M (2012) The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind Crops Prod* **38**, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.023>

Burri SC, Ekholm A, Håkansson Å, Tornberg E, Rumpunen K (2017) Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *J Funct Foods* **38**, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.003>

Cao-Ngoc P, Leclercq L, Rossi JC, Hertzog J, Tixier AS, Chemat F i sur. (2020) Water-based extraction of bioactive principles from blackcurrant leaves and Chrysanthellum americanum: A comparative study. *Foods* **9**, 1478. <https://doi.org/10.3390/foods9101478>

Carniel N, Dallago RM, Dariva C, Bender JP, Nunes AL, Zanella O, Billibio D, Luiz Priamo, W (2017) Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from Physalis angulata. *J Food Process Eng* **40**, e12433. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12433>

Cavalloro V, Martino E, Linciano P, Collina S (2021) Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices. U: Churyumov G (ured.) Microwave Heating - Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects, Intech Open, London, str. 35 – 56.

Cetin Çakmak K, Gülçin İ (2019) Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid—an activity-structure insight. *Toxicol Rep* **6**, 1273–1280. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.003>

Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A* **1218**, 6213-6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>

- Ciulu M, Quirantes-Piné R, Spano N, Sanna G, Borrás-Linares I, Segura-Carretero A (2017) Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Ind Crops Prod* **108**, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.024>
- Ćurko N, Kelšin K, Dragović-Uzelac V, Valinger D, Tomašević M, Kovačević Ganić, K. (2019) Microwave-assisted extraction of different groups of phenolic compounds from grape skin pomaces: Modeling and optimization. *Polish J Food Nutr Sci* **69**, 235-246. <https://doi.org/10.31883/pjfn/109423>
- D'Urso G, Montoro P, Piacente S (2020) Detection and comparison of phenolic compounds in different extracts of black currant leaves by liquid chromatography coupled with high-resolution ESI-LTQ-Orbitrap MS and high-sensitivity ESI-Qtrap MS. *J Pharm Biomed Anal*, **179**. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112926>
- Dadi DW, Emire SA, Hagos AD, Eun JB (2019) Effect of ultrasound-assisted extraction of *Moringa stenopetala* leaves on bioactive compounds and their antioxidant activity. *Food Technol Biotechnol* **57**, 77. <https://doi.org/10.17113/2Ffb.57.01.19.5877>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>
- Dahmoune F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K (2014) Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind Crops Prod* **61**, 31-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.035>
- D'Andrea G (2015) Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **106**, 256-271. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>
- Declume C (1989) Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves (*Ribes nigrum*). *J Ethnopharmacol* **27**, 91-98. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90081-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90081-0)
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tongnolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolic in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1818-1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>

- Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Jukić M, Penić M, Dent M (2012) The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol Biotechnol* **50**, 377-383.
- Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2**, 22-33.
- Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A (2016) The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int J Mol Sci* **17**, 160. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>
- Eskilsson S, Bjorklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chrom A* **902**, 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- Fernández-Agulló A, Castro-Iglesias A, Freire MS, González-Álvarez J (2019) Optimization of the extraction of bioactive compounds from walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) leaves: Antioxidant capacity and phenolic profile. *Antioxidants* **9**, 18. <https://doi.org/10.3390/antiox9010018>
- Frutos MJ, Rincón-Frutos L, Valero-Cases E (2019) Rutin. U: Nabavi SM, Sanches Silva A (ured.) Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements, Academic Press, London str. 111-117.
- Gao MZ, Cui Q, Wang LT, Meng Y, Yu L, Li YY, Fu YJ (2020) A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchem J* **154**, 104598. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104598>
- Garbacki N, Kinet M, Nusgens B, Desmecht D, Damas J (2005) Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM1. *J Inflamm Res* **2**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-9>
- Gopalan A, Reuben SC, Ahmed S, Darvesh AS, Hohmann J, Bishayee A (2012) The health benefits of blackcurrants. *Food Funct* **3**, 795-809. <https://doi.org/10.1039/c2fo30058c>
- Gulcin I (2020) Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol* **94**, 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

- Gullón B, Gullón P, Lú-Chau TA, Moreira MT, Lema JM, Eibes G (2017) Optimization of solvent extraction of antioxidants from Eucalyptus globulus leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Ind Crops Prod* **108**, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.014>
- Haasbach E, Hartmayer C, Hettler A, Sarnecka A, Wulle U, Ehrhardt C i sur. (2014) Antiviral activity of Lадania067, an extract from wild black currant leaves against influenza A virus in vitro and in vivo. *Front Microbiol* **5**, 171. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2014.00171>
- Hayat K, Hussain S, Abbas S, Farooq U, Ding B, Xia S, Jia C, Zhang X, Xia W (2009) Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Sep Purif Technol* **70**, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.012>
- He D, Huang Y, Ayupbek A, Gu D, Yang Y, Aisa HA, Ito Y (2010) Separation and purification of flavonoids from black currant leaves by high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **33**, 615-628. <https://doi.org/10.1080/10826071003608447>
- Ince AE, Sahin S, Sumnu G (2014) Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J Food Sci Technol* **51**, 2776-2782. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-012-0828-3>
- Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM (2019) Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chem Eng Process* **137**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
- Khiya Z, Oualcadi Y, Gamar A, Berrekhis F, Zair T, Hilali FE (2021) Correlation of total polyphenolic content with antioxidant activity of hydromethanolic extract and their fractions of the Salvia officinalis leaves from different regions of Morocco. *J Chem* **2021**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/8585313>
- Li DC, Jiang JG (2010) Optimization of the microwave-assisted extraction conditions of tea polyphenols from green tea. *Int J Food Sci Nutr* **61**, 837-845. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.489508>
- Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A* **1140**, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>

- Lin D, Ma Q, Zhang Y, Peng Z (2020) Phenolic compounds with antioxidant activity from strawberry leaves: a study on microwave-assisted extraction optimization. *Prep Biochem Biotechnol* **50**, 874-882. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1762213>
- Lloyd PJ, van Wyk J (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (ured.), Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, CRC Press, Boca Raton str. 1-24.
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha SJPR (2007) Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn Rev* **1**, 7-18.
- Megawati M, Astuti W, Arief UM, Ginting RR, Sammadikun W (2019) The increase of biodiesel B20 oxidation stability using antioxidant obtained from soursop leaves extraction through microwave assisted extraction technique. *IOP Conf* **625**, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/625/1/012026>
- Niu Q, Gao Y, Liu P (2020) Optimization of microwave-assisted extraction, antioxidant capacity, and characterization of total flavonoids from the leaves of *Alpinia oxyphylla* Miq. *Prep Biochem Biotechnol* **50**, 82-90. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1663535>
- Nour V, Stampar F, Veberic R, Jakopic J (2013) Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chem* **141**, 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.105>
- Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S (2014) Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. *Ind Crops Prod* **53**, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.022>
- Osorio-Tobón JF (2020) Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J Food Sci Technol* **57**, 4299-4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Pan X, Niu G, Liu H (2003) Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process* **42**, 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(02)00037-5)
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* **5**, 1-15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

- Paunović SM, Mašković P, Nikolić M, Miletić R (2017) Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) berries and leaves extract obtained by different soil management system. *Sci Hort* **222**, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.015>
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* **133**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Piotrowski W, Oszmiański J, Wojdyło A, Łabanowska BH (2016) Changing the content of phenolic compounds as the response of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves after blackcurrant leaf midge (*Dasineura tetensi* Rüb.) infestation. *Plant Physiol Biochem* **106**, 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.029>
- Pollini L, Tringaniello C, Ianni F, Blasi F, Manes J, Cossignani L (2020) Impact of ultrasound extraction parameters on the antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaves. *Antioxidants* **9**, 277. <https://doi.org/10.3390/antiox9040277>
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM (2005) Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 8–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1817-x>
- Radojković MM, Zeković ZP, Vidović SS, Kočar DD, Mašković PZ (2012) Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. *Hem ind* **66**, 547-552. <http://dx.doi.org/10.2298/HEMIND111111002R>
- Rajbhar K, Dawda H, Mukundan U (2014) Polyphenols: methods of extraction. *ChemComm* **51**, 1-6.
- Raudsepp P, Koskar J, Anton D, Meremae K, Kapp K, Laurson P i sur. (2018) Antibacterial and antioxidative properties of different parts of garden rhubarb, blackcurrant, chokeberry and blue honeysuckle. *J Sci Food Agric* **99**, 2311–2320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9429>
- Réblová Z (2012) Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech J Food Sci* **30**, 171-175. <http://dx.doi.org/10.17221/57/2011-CJFS>

Rostagno MA, Prado JM (2013) Natural Product Extraction - Principles and Applications. RSC, Cambridge, United Kingdom.

Routray W, Orsat V (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioproc Tech* **5**, 409-424. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>

Saifullah M, McCullum R, Vuong QV (2021) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Lemon Myrtle: Comparison of modern and conventional extraction techniques based on bioactivity and total polyphenols in dry extracts. *Processes* **9**, 2212. <https://doi.org/10.3390/pr9122212>

Shahidi F i Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

Shalaby EA, Shanab SM (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Mar Sci* **42**, 556-564.

Shang A, Luo M, Gan RY, Xu XY, Xia Y, Guo H, Liu Y, Li HB (2020) Effects of microwave-assisted extraction conditions on antioxidant capacity of sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.). *Antioxidants* **9**, 678. <https://doi.org/10.3390/antiox9080678>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP, (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Staszowska-Karkut M, Materska M (2020) Phenolic Composition, Mineral Content, and Beneficial Bioactivities of Leaf Extracts from Black Currant (*Ribes nigrum* L.), Raspberry (*Rubus idaeus*), and Aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients* **12**, 463 <https://doi.org/10.3390/nu12020463>

Stević T, Šavikin K, Ristić M, Zdunić G, Janković T, Krivokuća-Đokić D, Vulić T (2010) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivar Čačanska crna. *J Serb Chem Soc* **75**, 35-43. <http://dx.doi.org/10.2298/JSC1001035S>

- Sytařová I, Orsavová J, Snopek L, Mlček J, Byczyński Ł, Mišurcová L (2020) Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries and leaves of diverse ripening times. *Food chem* **310**, 125784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125784>
- Švarc-Gajić J, Stojanović Z, Carretero AS, Román DA, Borrás I, Vasiljević, I (2013) Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Food Eng* **119**, 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.030>
- Talmaciu AI, Volf I, Popa VI (2015) A Comparative Analysis of the 'Green' Techniques Applied for Polyphenols Extraction from Bioresources. *Chem Biodivers* **12**,1635-1651. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400415>
- Tatke P, Jaiswal Y (2011) An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *J Med Plant Res* **5**, 21-31. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.21.31>
- Tchabo W, Ma Y, Kwaw E, Xiao L, Wu M, T Apaliya M (2018) Impact of extraction parameters and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of aqueous extract mulberry leaf. *Int J Food Prop* **21**, 717-732. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446025>
- Teleszko M, Wojdyło A (2015) Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *J Funct Foods* **14**, 736-746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>
- Vagiri M, Conner S, Stewart D, Andersso SC, Verrall S, Johansson E, Rumpunen K (2015) Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum L.*) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chem* **172**, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.041>
- Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA (2012) Fundamentals of microwave extraction. U: Chemat F, Cravotto G, Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, Springer US, Boston, str. 15-52.
- Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2019) Maximising recovery of phenolic compounds and antioxidant properties from banana peel using microwave assisted extraction and water. *J Food Sci Technol* **56**, 1360-1370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03610-2>

Vuolo MM, Lima VS, Junior MRM (2019) Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. U: Campos MRS (ured.) Bioactive compounds, Woodhead Publishing, str. 33-50

Wan C, Yu Y, Zhou S, Liu W, Tian S, Cao S (2011) Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacogn mag* **7**, 40. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.75900>

Xu C, Wang B, Pu Y, Tao J, Zhang T (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin J Nat Med* **15**, 721- 731. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)

Yanishlieva-Maslarova NV (2001) Inhibiting oxidation. U: Pokorný J, Yanishlieva N, Gordon M (ured.) Antioxidants in food: Practical applications, Woodhead Publishing, str. 22-70.

Yao Y, Lin G, Xie Y, Ma P, Li G, Meng Q i sur. (2014) Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie* **69**, 19-26. <https://doi.org/10.1691/ph.2014.3076>

Zhang Y, Wu S, Qin Y, Liu J, Liu J, Wang Q i sur. (2018) Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chem* **240**, 1072-1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.100>

Ziobroń M, Kopeć A, Skoczylas J, Dziadek K, Zawistowski J (2021) Basic Chemical Composition and Concentration of Selected Bioactive Compounds in Leaves of Black, Red and White Currant. *Appl Sci* **11**. <https://doi.org/10.3390/app11167638>

Zuloaga O, Etxebarria N, Fernández LA, Madariaga JM (1999) Optimisation and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta* **50**, 345-357. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(99\)00028-4](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(99)00028-4)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Tatjana Franković) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tatjana Franković

Vlastoručni potpis