

Optimiranje ultrazvukom potpomognute ekstrakcije polifenolnih spojeva iz lista crnog ribiza (*Ribes nigrum* L.)

Didović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:260133>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**OPTIMIRANJE ULTRAZVUKOM
POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ LISTA
CRNOG RIBIZA (*Ribes nigrum* L.)**

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć asistentice dr. sc. Erike Dobroslavić.

Ovaj diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-IP-2022-10-5499), voditeljice prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

OPTIMIRANJE ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNE EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ LISTA CRNOG RIBIZA (*Ribes nigrum* L.)

Iva Didović, univ. bacc. ing. techn. aliment,

0113146326

Sažetak : Listovi crnog ribiza bogati su polifenolima, bioaktivnim spojevima koji se iz biljnog materijala mogu izolirati različitim tehnikama ekstrakcije. Cilj ovog rada bio je definirati optimalne uvjete izolacije fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom ultrazvučne ekstrakcije koristeći 30 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo. Utvrđivani su utjecaji amplitude (50, 75, 100 %) te trajanja ekstrakcije (5, 10 min) na maseni udio ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet (ABTS, FRAP, DPPH) ekstrakata lista crnog ribiza. Uvjeti ekstrakcije značajno su utjecali na maseni udio fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ekstrakata pri čemu je udio fenola varirao od 17,03 do 38,09 mg GAE g⁻¹, a antioksidacijski kapacitet od 146,88 do 487,34 μmol TE g⁻¹ (FRAP), 165,89 - 348,27 μmol TE g⁻¹ (DPPH), 188,35 - 455,47 μmol TE g⁻¹ (ABTS). Optimalni uvjeti pri kojima su određeni najviši udjeli fenolnih spojeva bili su: omjer otapalo:uzorak 40:1, amplituda 100 % te vrijeme ekstrakcije 10 min.

Ključne riječi: list crnog ribiza, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, polifenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži : 40 stranica, 7 slika, 4 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika : hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: dr. sc. Erika Dobroslavić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Rad obranjen: 26.9.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Engineering

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOL COMPOUNDS FROM BLACKCURRANT LEAVES (*Ribes nigrum* L.)

Iva Didović, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0113146326

Abstract: Blackcurrant leaves are rich in polyphenols, bioactive compounds that can be isolated from plant material by various extraction techniques. The aim of this work was to define the optimal conditions for the isolation of phenolic compounds from blackcurrant leaves using ultrasonic extraction using a 30% aqueous ethanol solution as an extraction solvent. The influence of amplitude (50, 75 and 100 %) and duration of extraction (5 and 10 min) on the mass fraction of total phenolic compounds and antioxidant capacity (ABTS, FRAP, DPPH) of blackcurrant leaf extracts was determined. The extraction conditions significantly influenced the mass fraction of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the extracts with the phenol fraction varying from 17,03 - 38,09 mg GAE g⁻¹ and the antioxidant capacity from 146.88 to 487.34 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (FRAP), 165.89 – 348.27 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (DPPH), 188.35 – 455.47 mol TE g⁻¹ (ABTS). The optimal conditions under which the highest proportions of phenolic compounds were determined were: solvent:sample ratio 40:1, amplitude 100 % and extraction time 10 min.

Keywords: black currant leaf, ultrasound-assisted extraction, polyphenolic compounds, antioxidant capacity

Thesis contains : 40 pages, 7 figures, 4 tables, 49 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić, PhD

Reviewers:

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

Thesis defended: 26.9.2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRNI RIBIZ	2
2.1.1 Botanička obilježja i opće karakteristike.....	2
2.1.2 Kemijski sastav crnog ribiza	3
2.2 UPOTREBA CRNOG RIBIZA.....	6
2.3 TEHNIKE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	7
2.3.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	8
2.4 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA NA LISTU CRNOG RIBIZA.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1 MATERIJALI.....	13
3.2 METODE RADA.....	15
3.2.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	15
3.2.2. Postupak određivanja ukupnih fenola	16
3.2.3 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	18
3.2.4 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	20
3.2.5 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	23
3.2.6 Određivanje udjela suhe tvari	25
3.2.7 Eksperimentalni dizajn i statistička obrada rezultata	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. UTJECAJ OMJERA OTAPALA I UZORKA NA UDIO UKUPNIH FENOLA	30
4.2 UTJECAJ AMPLITUDE NA UDIO UKUPNIH FENOLA.....	31
4.3 UTJECAJ VREMENA NA UDIO UKUPNIH FENOLA.....	32
4.4 UTJECAJ OMJERA OTAPALA I UZORKA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	33
4.5 UTJECAJ AMPLITUDE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET.....	34
4.6 UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	34
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

Biološki aktivne molekule su sekundarni biljni metaboliti sa širokim spektrom bioloških djelovanja koji mogu imati pozitivan učinak na ljudsko zdravlje te stoga nalaze primjenu u proizvodnji dodataka prehrani i funkcionalnoj hrani. Crni ribiz (*Ribes nigrum* L.) je grmolika biljka porijeklom iz Europe i Azije koja se široko uzgaja u umjerenim zonama diljem svijeta, primarno zbog ploda koji se na tržište plasira svjež ili u obliku različitih prerađevina poput sokova i želiranih proizvoda. Prilikom proizvodnje, nerijetko kao nusproizvod zaostaju listovi koji predstavljaju vrijedan izvor bioaktivnih molekula među kojima se ističu polifenolni spojevi koji uključuju flavonoidne od kojih među značajnijim treba istaknuti kamferol, kvercetin i fenolne kiseline. Kako bi se ovi spojevi mogli učinkovito iskoristiti, nužno ih je ekstrahirati iz biljnog materijala tehnikama ekstrakcije te pri optimalnim uvjetima koji omogućavaju dobivanje većih prinosa.

Bioaktivne molekule iz biljnog materijala najčešće se ekstrahiraju konvencionalnim tehnikama poput maceracije, perkolacije ili dekokcije, ali se zbog njihove dugotrajnosti i potrošnje energije sve više istražuju i napredne tehnike ekstrakcije. Jedna od novijih tehnika koja se posljednjih godina sve više koristi u prehrambenoj industriji, pa tako i kod ekstrakcije je ultrazvuk, a prednosti primjene ultrazvuka u ekstrakciji fenolnih spojeva su povećanje prinosa ciljanih spojeva, smanjen utrošak energije, upotreba manje količine otapala za ekstrakciju te kraće vrijeme ekstrakcije. Postupci ekstrakcije se optimiraju s obzirom na zahtjeve biljnog materijala te ciljane bioaktivne molekule koje se izdvajaju. Stoga je za svaku biljnu vrstu i ciljnu skupinu bioaktivnih molekula potrebno provesti optimizaciju postupka ekstrakcije uz postizanje maksimalnog prinosa.

Cilj ovog rada bio je optimirati postupak ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza uz 30 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo uz primjenu tehnike ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Pri tome je istraživao utjecaj amplitude (50, 75 i 100 %), vremena ekstrakcije (5 i 10 min) na udio ukupnih fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza te su definirani optimalni uvjeti pri kojima se postižu maksimalni prinosi fenolnih spojeva i najveći antioksidacijski kapacitet.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRNI RIBIZ

2.1.1 Botanička obilježja i opće karakteristike

Crni ribiz (*R. nigrum* L.) je listopadna trajna biljka iz obitelji ogrozdovki (Grossulariaceae). Raste u obliku grma do 1-2 m visine. Listovi su naizmjenično smješteni, blijedozelene boje, nalaze se u dugim i tankim peteljka, lice im je glatko, a na naličju su dlakavi i ponekad su vidljive žute, točkaste žlijezde. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, mali, skupljeni u male grozdaste cvatove i cvjetaju tijekom proljeća. Plodovi su crne, okruglaste bobice promjera oko 1 cm (slika 1), jajne su i sočnog, kiselkastog okusa. Boja pupoljaka postaje intenzivnija tijekom zimskih mjeseci (Vagiri, 2012).



Slika 1. Listovi i plodovi crnog ribiza

Prirodno raste na području istočne i središnje Europe, te zapadne i sjeverne Azije, u dijelu šikara na vlažnom i humusom bogatom tlu. Cijela biljka ima vrlo karakterističan, pomalo neugodan miris. Na području Europe se rijetko uzgaja, a uspijeva u krajevima s oštrom klimom te mu odgovara polusjenovito mjesto. Razmnožava se uglavnom vegetativno reznicama ili generativno sjemenom radi kreiranja novih sorti (Vagiri, 2012).

2.1.2 Kemijski sastav crnog ribiza

Plodovi crnog ribiza smatraju se jedinstvenim zbog sastava i količine kemijskih spojeva. Crni ribiz je izvor brojnih biološki vrijednih spojeva uključujući značajan udio vitamina C, vitamina E i vitamina B, mineralnih elemenata poput željeza, magnezija, fosfora, cinka, dijetalnih vlakana, fitoncida, pepela. Plodovi crnog ribiza sadrže organske kiseline kao što su jabučna, vinska, salicilna, limunska i druge. Sadrže različite fenolne spojeve, od kojih antocijanini daju plodovima intenzivnu boju te su poznati po svojim baktericidnim i regenerirajućim svojstvima (Vagiri, 2012).

Često uzgajane sorte crnog ribiza sadrže razine askorbinske kiseline u rasponu 130 - 200 mg 100 mL⁻¹ soka do preko 350 - 450 mg 100 mL⁻¹ soka. Prema Nour i sur. (2014) koncentracija askorbinske kiseline u plodu može varirati u rasponu 0,5 - 2,8 mg g⁻¹ što doprinosi važnosti crnog ribiza za industriju pića i hrane (Woznicki i sur., 2017). Prisutnost visokog udjela γ -linolenske kiseline (GLA) i α -linolenske kiseline (ALA) u sjemenkama crnog ribiza, pozitivno utječe na utrživost njegovog ulja kao dodatka prehrani.

Listovi crnog ribiza sadrže veću količinu vitamina C (2,6 mg g⁻¹) koji ima ulogu u poboljšanju regulacije metabolizma, povećava snagu i elastičnost krvnih žila i kapilara smanjujući njihovu propusnost, jača imunološki sustav, ubrzava regeneraciju tkiva, inhibira upalne procese. Osim vitamina C, listovi crnog ribiza bogati su i eteričnim uljima, fitoncidima, omega-3 i omega-6 masnim kiselinama, pektinom i organskim kiselinama. Fitoncidi, hlapljive biološki aktivne tvari koje stvara biljka, suzbijaju rast i razvoj bakterija, gljivica i virusa.

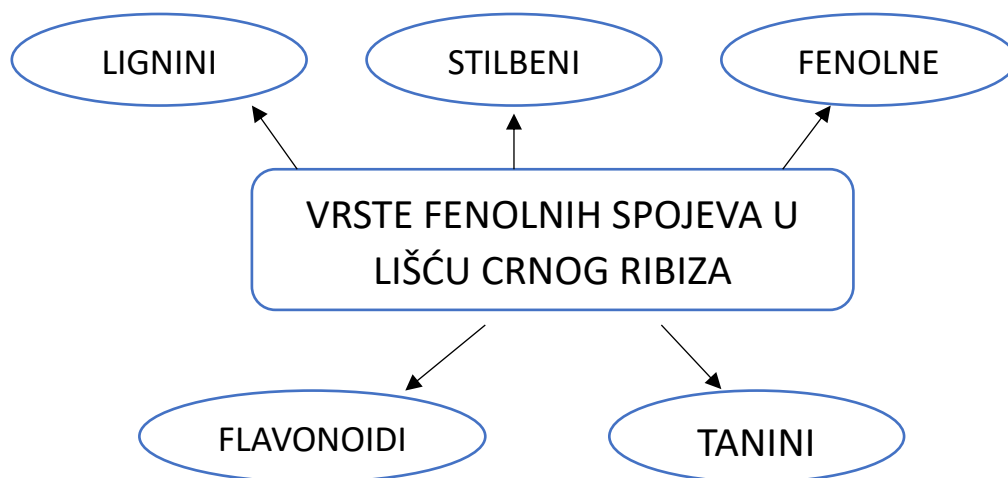
Lišće crnog ribiza sadrži i šećere (73 mg g⁻¹) u obliku fruktoze, glukoze, saharoze kao i razne glikozide, tanine i dušične tvari. Prinos ulja iz listova crnog ribiza je 0,08 - 0,74 mg g⁻¹ ovisno o metodi izolacije (Orav i sur., 2002). Listovi imaju diuretski, dijaforetski, protuupalni, antimikrobni i regenerirajući učinak, te blagi laksativni učinak pri čemu potiču peristaltiku crijeva. Zbog svog sastava, lišće crnog ribiza učinkovito je profilaktičko sredstvo za onkološke bolesti. Zdravstveni benefiti bioaktivnih molekula, izražen antioksidativni kapacitet te visoke doze vitamina C neutraliziraju štetno djelovanje slobodnih radikala, sprječavaju nastanak i rast stanica raka, povećavaju otpornost organizma na vanjske i unutarnje podražaje (Ziobron i sur., 2021). Osim spomenutih biološki aktivnih molekula, u listovima crnog ribiza, osobito se ističu fenolni spojevi čiji je sadržaj u listovima pet puta veći nego u plodovima. Sastav polifenola lišća crnog ribiza uključuje flavonoidne derivate poput kamferola, kvercetina i fenolnih kiselina (Tabart i sur., 2006).

Sok dobiven od crnog ribiza sadrži više od 120 hlapljivih aromatskih spojeva koji uključuju terpene, estere i alkohole (Varming i sur., 2004). Sadrži bjelančevine, vitamine, minerale (Fe, K, Ca, Na, P, Mg), fenolne spojeve (visok je sadržaj antocijana) i tanine. Sadržaj topljive suhe tvari crnog ribiza je visok (prosječno 13-15 %) kao i sadržaj ukupnih kiselina. Od šećera najzastupljeniji su glukoza i fruktoza, a od organskih kiselina jabučna i limunska (Howard i sur., 2003).

2.1.2.1 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena na koje su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH). Većina fenola se u prirodi pojavljuje u obliku derivata u kombinaciji sa šećerima, organskim kiselinama i esterima. Ekstrakt lišća crnog ribiza sadrži širok raspon fenolnih spojeva (slika 2) kao što su flavonoidi, tanini, fenolne kiseline, lignani i stilbeni. Najzastupljeniji flavonoidi su kvercetin (0,01359 mg g⁻¹ s.t.), miricetin (0,00831 mg g⁻¹ s.t.), rutin (0,00266 mg g⁻¹ s.t.) i u malim količinama katehini. Otkrivena je prisutnost i fenolnih kiselina poput salicilne kiseline (0,00236 mg g⁻¹ s.t.), *p*-kumarinske kiseline (0,00266 mg g⁻¹ s.t.), galne i kininske kiseline, ali i male količine klorogenske, sinapinske, ferulinske i kafeinske kiseline. U literaturi, koncentracija fenolnih spojeva u lišću crnog ribiza varira od 40 mg GAE g⁻¹ koliko su odredili Nour i sur. (2014) do 97 mg GAE g⁻¹ (Vagiri i sur., 2012) ili čak 260 mg g⁻¹ s.t. (Kendir i sur., 2015). Tabart i sur. (2006) su u svom radu dokazali da lišće crnog ribiza sadrži najviše fenolnih spojeva nakon što plodovi dostignu svoju punu zrelost.

Koncentracija fenolnih spojeva u lišću crnog ribiza, maline i aronije usporediva je s njihovim razinama u lišću drugih biljaka, ali lišće samoniklih vrsta općenito sadrži više fenola nego kultivirano (Vagiri i sur., 2012). Literaturni podaci pokazuju da pojedini fenolni spojevi u lišću crnog ribiza pokazuju hidrofilan karakter. Prisutnost ostataka šećera povećava polarnost flavonola, a klorogenska kiselina pokazuje veću hidrofilnost u usporedbi s drugim fenolnim kiselinama (Cyboran i sur., 2014).



Slika 2. Vrste fenolnih spojeva u lišću crnog ribiza (*vlastita shema*)

Zbog bogatog polifenolnog sastava ekstrakti lišća crnog ribiza imaju potencijalnu primjenu u zaštiti organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Cyboran i sur. (2014) su u svojem radu proveli kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata lišća crnog ribiza u kojoj su analizirali biološku aktivnost fenolnih spojeva sadržanih u listovima crnog ribiza u odnosu na biološke membrane i modele lipidnih membrana. Rezultati su pokazali da su ispitivani ekstrakti bogati izvor polifenola, prvenstveno iz skupine flavonoida, a dominiraju flavonoli. Ekstrakti lista sadržavali su 194 mg g^{-1} fenolnih spojeva, gdje su dominirali flavonol glikozidi, osobito kvercetin.

Koncentracija fenolnih spojeva u biljkama ovisi o mnogim čimbenicima kao što su vremenski uvjeti i vrijeme berbe, kod kultiviranog bilja način uzgoja, a sadržaj fenolnih spojeva u listovima često je veći nego u plodovima.

Nour i sur. (2014) određivali su antioksidacijski kapacitet i udio fenolnih spojeva u različitim etanolnim ekstraktima lista crnog ribiza primjenom hidroalkoholne ekstrakcije fenola. Listovi crnog ribiza ekstrahirani su vodom pri 80°C , koristeći 40 %-tnu i 80 %-tnu vodenu otopinu etanola kao otapala. Najviši udio fenolnih spojeva u ekstraktima lista crnog ribiza dobiven je ekstrakcijom koristeći 40 %-tnu vodenu otopinu etanola. Primjenom DPPH metode u ekstraktima lišća crnog ribiza izmjerene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u

ekstraktima dobivenim 40 %-tnom vodenom otopinom etanola, dok su najniže izmjerene u ekstraktima dobivenim sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola.

Cyboran i sur. (2014) su potvrdili da ekstrakti lišća crnog ribiza imaju visoku antioksidacijski kapacitet koji ne ovisi samo o ukupnom fenolnom sastavu nego i o vrsti i količini svakog pojedinog fenolnog spoja u ekstraktu.

2.2 UPOTREBA CRNOG RIBIZA

Riječ ribiz potječe od starogrčke riječi za grad Korint i korišten je za ilustraciju grožđa koje se uzgaja u regiji. U Sjevernoj Europi crni ribiz uzgaja se više od 400 godina. Prvi su ga opisali travari iz 17. stoljeća govoreći o upotrebi crnog ribiza kao sastojka čajeva i medicinskih pripravaka. John Tradescant uvezao je crni ribiz u Ujedinjeno Kraljevstvo 1611. godine iz Nizozemske i do 1800.-te godine bili su popularni grmovi koji su se uzgajali u kućnim vrtovima u Velikoj Britaniji. Tijekom drugog svjetskog rata agrumi su teško uzgajani i bili skupi za uvoz u Europu, a kako je crni ribiz imao visok udio vitamina C, njegov uzgoj se poticao radi proizvodnje sokova (Barney i Hummer, 2005).

Bobice, pupovi i listovi sakupljaju se u srpnju. Jedu se sirovi ili se prerađuju u kompote, sokove ili marmelade te sušenjem u čajeve. Plodovi crnog ribiza smatraju se visokovrijednom prirodnom sirovinom za proizvodnju pića poznato je da se lišće crnog ribiza koristi za pripremanje osvježavajućeg finskog pića „louhissari“ (Tabart i sur., 2006). Voće ima izražena organoleptička svojstva poput boje, okusa i arome te se koristi u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda (Piry i sur., 1995). Također, koriste se u kozmetici, medicini i kulinarstvu. U tradicionalnoj europskoj medicini lišće crnog ribiza, odnosno infuzije dobivene od lišća koristile su se za ublažavanje simptoma te liječenje različitih oboljenja poput reume, artritisa i respiratornih problema te ateroskleroze, bolesti mjehura, detoksikacije jetre, upale grla, krajnika i bolova u vratu, a pokazale su se učinkovitim i u liječenju različitih oboljenja bubrega. Brojni pozitivni utjecaji u prevenciji ili liječenju navedenih oboljenja koji se pripisuju bioaktivnim molekulama lista crnog ribiza najvećim dijelom se povezuju sa antibakterijskim i antioksidativnim djelovanjem.

Pozitivne utjecaje pokazuju i ekstrakti pupoljaka crnog ribiza, a pokazali su se učinkovitim u regulaciji krvnog tlaka, kod liječenja hiperuremije te upalnih procesa u tijelu.

Ekstrakti pupoljaka crnog ribiza sadrže silikate poznate po svojim remineralizirajućem i restrukturirajućem djelovanju na koštano tkivo (Vagiri, 2012).

2.3 TEHNIKE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je jedan od separacijskih procesa u različitim granama brojnih industrija. Definira se kao proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Ekstrakcija se odvija u tri faze: prvo se miješa smjesa iz koje se ekstrahiraju tvari i otapala u jednom ili više stupnjeva, zatim se smjesa zadržava u otapalu određeno vrijeme i otapalo se odvaja zajedno s otopljenim tvarima (Herceg, 2011).

Tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva odabiru se s obzirom na njihovu strukturu i oblik u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Prvi korak izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala prije daljnje upotrebe ili analize je ekstrakcija. Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli, a važno je odabrati optimalnu tehniku ekstrakcije vodeći računa o kemijskim i molekulskim svojstvima uključujući i topljivost spojeva koje želimo ekstrahirati te ekstrakcijsko otapalo (Dai i Mumper, 2010).

Trajanje procesa ekstrakcije ovisi o topljivosti ciljane komponente koju ekstrahiramo u odabranom otapalu (što je topljivost ciljane komponente veća, vrijeme potrebno za ekstrakciju će biti kraće), temperaturi ekstrakcije (viša temperatura doprinosi boljoj topljivosti topljive ciljane komponente i brzini njezine difuzije u otapalu, a samim time pospješuje i ekstrakciju), površini ciljane komponente iz koje ekstrahiramo, viskoznosti i protoku otapala te unutarnjoj difuziji otapala kroz materijal (Herceg, 2011). Iz tih razloga, pogodno je da se ekstrakcija provodi pri višim temperaturama zbog ubrzavanja samog procesa, jer time dolazi do povećanja brzine otapanja komponente kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala.

Tehnike ekstrakcije dijele se na konvencionalne i napredne. Konvencionalne tehnike poput Soxhlet ekstrakcije, maceracije i vodene destilacije baziraju se na primjeni visokih temperatura i duljeg vremena ekstrakcije što može dovesti do degradacije bioaktivnih spojeva te potrošnju i isparavanje velikih količina otapala. Zbog tih razloga sve se češće primjenjuju napredne tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije superkritičnim fluidima, ekstrakcije uz primjenu visokog tlaka, ekstrakcije potpomognute enzimima, mikrovalovima ili ultrazvukom. Cilj ovih tehnika je smanjena upotreba opasnih hlapljivih organskih otapala, postizanje veće kvalitete

ekstrakata, skraćeno vrijeme ekstrakcije, provedba pri nižim temperaturama, ekonomičnost i ekološka prihvatljivost (Sahne i sur., 2016).

Prednosti ovih metoda su brzina, selektivnost, ekološka prihvatljivost, upotreba manjih količina otapala, veći prinos od klasične ekstrakcije te mogućnost regulacije temperature ekstrakcije.

2.3.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

2.3.1.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val frekvencije između 20 kHz i 100 MHz, izvan dosega ljudskog sluha. Energija ultrazvuka je opisana snagom i intenzitetom zvuka te gustoćom zvučne energije. Može se podijeliti na ultrazvuk niskog intenziteta, ispod 1 W cm^{-3} , koja koristi frekvencije više od 100 kHz i ultrazvuk visokog intenziteta, iznad 1 Wcm^{-3} , u rasponu frekvencija 18 - 100 kHz. Ultrazvuk je određen amplitudom, valnom duljinom, koeficijentom prigušenja i frekvencijom (Sahne i sur., 2016). Ultrazvučni postav se sastoji od generatora, koji pretvara električnu energiju u visoku frekvenciju izmjenične struje i pretvornika koji pretvara visoku frekvenciju izmjenične struje u mehaničke vibracije. Mehaničke vibracije koje nastaju uzrokuju kavitaciju. S obzirom na način izvedbe ultrazvučni postav sadrži ultrazvučnu sondu ili ultrazvučnu kupelj prikazanu na slici 3. Ultrazvučna sonda najčešće koristi frekvenciju od 20 kHz, a pretvornik je direktno povezan sa sondom koja se uranja direktno u uzorak. Time se smanjuje gubitak ultrazvučne energije, a intenzitet se prenosi kroz manju površinu u usporedbi s ultrazvučnom kupelji. Nedostatak upotrebe ultrazvučne sonde je neprestani kontakt sonde i uzorka uslijed čega se smanjuje ponovljivost i preciznost, temperatura u uzorku se povisuje i veći je rizik od onečišćenja i stvaranja pjene. Ultrazvučna kupelj se sastoji od spremnika s jednim ili više ultrazvučnih pretvornika, te koristi frekvencije od 40 kHz. Ultrazvučne sonde u jeftine i dostupne, može se tretirati više uzoraka istodobno, ponovljivost je manja, a intenzitet ultrazvuka se smanjuje prolaskom kroz vodu u spremniku (Khoddami i sur., 2013).



Slika 3. Ultrazvučni postav sa sondom (*vlastita fotografija*)

2.3.1.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je ekstrakcijska tehnika koja koristi ultrazvuk visokog intenziteta najčešće u rasponu frekvencija od 20 do 40 kHz. Karakterizira ju visoka reproducibilnost u kratkom vremenu, veći prinosi bioaktivnih sastojaka, jednostavnija manipulacija, niže temperature tijekom procesa, smanjenje količine otapala i manja potrošnja energije. Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje fizičke promjene biljnog materijala, pri čemu dolazi do skraćivanja vremena provedbe i povećanja učinkovitosti ekstrakcije (Dolatowski i sur., 2017). Provodi se na uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde ili ultrazvučne kupelji koja je uronjena u medij koji se ekstrahira. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom koristi se za dobivanje polifenola iz biljaka korištenjem najčešće etanola, vode i acetona, te kombinacije etanol/voda kao otapala (Wang i sur., 2004). U ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom upotreba etanola doprinosi povećanju ukupnog antioksidacijskog

kapaciteta te se etanol uz manju toksičnost i dobivanje iz obnovljivih izvora pokazao kao efikasno otapalo za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (Dent i sur., 2015).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bazira se na pojavi fenomena kavitacije. Prolaskom zvučnih valova ultrazvuka kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi, koji uzrokuju izmjene ciklusa ekspanzije i kompresije. Izmjenjuju se visoki i niski tlak, pri čemu se u otapalu stvara velik broj mjehurića plina čija veličina oscilira s tlakom te su u fazi ekspanzije veći nego što se smanjuju tijekom kompresije. Kada mjehurić plina dosegne određenu veličinu, više ne može apsorbirati energiju te dolazi do implodije mjehurića plina pri čemu se oslobađa velika količina energije i dolazi do porasta temperature i tlaka. Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da se zadrži plinska faza dolazi do kondenzacije plinovitih mjehurića i uslijed njihova sudaranja dolazi do nastanka šok valova koji uzrokuju porast temperature. Implodija nastalih kavitacijskih mjehurića uzrokuje kemijske, fizikalne i mehaničke promjene u biljnom materijalu. Time dolazi do oštećenja staničnih stijenki i povećanja njezinih pora, a posljedično se olakšava difuzija otapala u stanice materijala, olakšava se otpuštanje bioaktivnih spojeva iz stanica i povećava se prijenos mase (Dent i sur., 2015). Kavitacija ovisi o amplitudi, frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka, duljini ekstrakcije, temperaturi, vlažnosti, svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti). Tijekom ekstrakcije uslijed ultrazvučne energije uzorci se zagrijevaju, te je stoga potrebno kontrolirati temperaturu. Visoka temperatura otapala pojačava difuziju prijenosa tvari, ali i smanjuje kavitaciju te dolazi do razgradnje termolabilnih bioaktivnih spojeva (Tiwari, 2015).

Skraćeno vrijeme ekstrakcije, niže temperature ekstrakcije, ponovljivost, veći prinosi bioaktivnih spojeva, upotreba manjih količina otapala, veća čistoća i selektivnost ekstrakta, povećana produktivnost, ušteda energije i ekološka prihvatljivost neke su od prednosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u odnosu na konvencionalne metode. Kao nedostatak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom može se navesti povremeni štetan utjecaj energije ultrazvuka na bioaktivne spojeve začinskog i ljekovitog bilja, što dovodi do formiranja slobodnih radikala i neželjenih promjena na molekulama (Dent i sur., 2015).

2.4 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA NA LISTU CRNOG RIBIZA

U literaturi je dostupan značajan broj znanstvenih istraživanja koja su se bavila proučavanjem bioaktivnih i drugih spojeva u svim dijelovima crnog ribiza, a najviše u plodu i listu, a veliki fokus je upravo na proučavanju fenolnih spojeva. Analize crnog ribiza temelje se na istraživanju njegovog kemijskog sastava, nutritivne vrijednosti i antioksidacijskih svojstava, a velik broj provedenih istraživanja potvrđuju da je list crnog ribiza značajan izvor različitih skupina fenolnih spojeva.

Nour i sur. (2014) provodili su hidroalkoholnu ekstrakciju fenolnih spojeva i određivanje antioksidacijskog kapaciteta iz lišća crnog ribiza. Najviše fenolnih spojeva te najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određeni su u ekstraktima proizvedenim uz 40 %-tnu vodenu otopinu etanola.

Raudsepp i sur. (2010) su istraživali udio fenolnih spojeva u lišću crnog ribiza, a sastav fenolnih ekstrakata određivali su primjenom HPLC analize. U ekstraktima lista crnog ribiza utvrđene su koncentracije katehina $7,86 \text{ mg g}^{-1}$, klorogenske kiseline $14,93 \text{ mg g}^{-1}$, kvercetin glukozida $19,47 \text{ mg g}^{-1}$ i kvercetin rutinozida $3,99 \text{ mg g}^{-1}$.

Staszowska-Karkut i Materska (2019) istraživali su fenolni sastav, sastav minerala i bioaktivne spojeve u ekstraktima listova crnog ribiza. Ekstrakti proizvedeni iz mlađih listova crnog ribiza pokazali su veći antioksidacijski kapacitet od onih koji su sakupljeni u kasnijim fazama rasta. Najzastupljeniji mineral u ekstraktu lista crnog ribiza bio je kalcij ($0,022 - 9,558 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$), zatim kalij i magnezij ($4,233 - 8,592 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$), dok je natrija bilo u znatno manjoj količini.

Ziobron i sur. (2021) u svojem radu istraživali su koncentraciju ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima listova crnog, bijelog i crvenog ribiza. Ekstrakti su prikupljeni tokom dvije godine (2018. i 2019.) u svibnju, lipnju i kolovozu. Cilj rada bio je odrediti udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet FRAP, ABTS i DPPH metodom. Rezultati su pokazali da je koncentracija polifenola bila značajno niža u lišću bijelog ribiza, dok je u lišću crnog ribiza udio ukupnih fenola bio viši. Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je u lišću crvenog ribiza iz razdoblja berbe 2018. godine, provedbom ABTS i FRAP metode. Listovi crnog ribiza iz razdoblja berbe 2019. godine pokazali su najveći antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom.

Paunović i sur. (2022) istraživali su fitokemijsko i antimikrobno djelovanje u ekstraktima lišća crnog ribiza. Rezultati su pokazali da ekstrakti lišća crnog ribiza sadrže 62,7 % flavonoida. Određivali su količinu kondenziranih tanina i galotonina. Koncentracija kondenziranih tanina iznosila je 1,71 mg GAE g⁻¹, a koncentracija kondenziranih galotonina iznosila je 1,25 mg GAE g⁻¹. Rezultati antimikrobne aktivnosti u ekstraktima lišća crnog ribiza kretali su se od 0,0558 - 0,1992 g L⁻¹. Lišće je pokazalo najveće antimikrobno djelovanje protiv bakterije *Escherichia coli*, a najveće antifungalno djelovanje bilo je protiv *Candida albicans*.

Cyboran i sur. (2014) proveli su istraživanje kojim je obuhvaćeno određivanje utjecaja fenolnih spojeva ekstrakata listova crnog ribiza na biološke membrane i modele lipidnih membrana. U navedenom istraživanju utvrđeno je da vodeni ekstrakti polifenola lista crnog ribiza ne uzrokuju značajne promjene u anizotropiji fluorescencije DPH(1,6-difenil-1,3,5-heksatrien) sonde u DPPC(dipalmitoilfosfatidilkolin) membrani i time se ne mijenja fluidnost hidrofobne unutrašnjosti DPPC(dipalmitoilfosfatidilkolin) membrana.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

Uzorci lista crnog ribiza

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišten je suhi list crnog ribiza (*R. nigrum* L.), LOT (L) broj: 20251, porijeklom iz Poljske kojeg na tržište RH stavlja Suban d.o.o (Strmec, Hrvatska).

Kemikalije

- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Etanol, 30 %-tna vodena otopina
- Destilirana voda
- Metanol, 100 %-tni (Honeywell, Sjeverna Karolina, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Galna kiselina ($C_7H_6O_5$) (Sigma Aldrich, St.Louis,SAD), 5mg mL^{-1}
- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 90 mL acetatnog pufera (0,3 M), 9 mL TPTZ reagensa i 2 mL otopine željezo (III) klorida u omjeru 10:1:1

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

Priprema: odvaži se 0,0156 g TPTZ-a (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 5 mL te nadopuni do oznake s 40 Mm klorovodičnom kiselinom

- Klorovodična kiselina, 40 Mm

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

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

Priprema: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

U plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom

- 140 Mm otopina kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$

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

Instrumenti i pribor

- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g), (OHAUS, AX224, Parsippany, SAD)
- Spektrofotometar (VWR, UV-1600PC Spectrophotometer, Pennsylvania, SAD)
- Termokupelj (BÜCHI, Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Ultrazvuk (Heilscher, UP200Ht ultrasonic processor, Teltow, Njemačka); sonda od titanijske, Ø 14 mm, (154 mm²), duljine cca. 80 mm, vanjski naboj M6x0,75, za uzorke od 50 mL do 1000 mL, omjer amplitude cca. 1:1,2
- Automatske pipete 100-1000 µL, 0,5-5 mL
- Filter papir
- Plastične kivete za čuvanje uzoraka
- Menzure (50,100,500 mL)
- Odmjerne tikvice od 100,50 mL
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Stakleni lijevci

3.2 METODE RADA

3.2.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je prema eksperimentalnom dizajnu prikazanom u tablici 1. S obzirom na omjer otapala i uzorka (mL g^{-1}) odvagane su odgovarajuće mase suhog lista, varirano je vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min), amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %), a otapalo korišteno za ekstrakciju bila je 30 % -tna vodena otopina etanola. Sve ekstrakcije su provedene pri konstantnoj frekvenciji (26 kHz) i snazi ultrazvuka (200 W), primjenom sonde promjera 14 mm.

Tablica 1. Eksperimentalni dizajn za izolaciju fenolnih spojeva crnog ribiza primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

UZORAK	OMJER OTAPALA I UZORKA (mL g^{-1})	AMPLITUDA (%)	VRIJEME (min)
1	20:1	50	5
2			10
3		75	5
4			10
5		100	5
6			10
7	30:1	50	5
8			10
9		75	5
10			10
11		100	5
12			10
13	40:1	50	5
14			10
15		75	5
16			10
17		100	5
18			10

Za ekstrakciju se odvaže odgovarajuća masa suhog, usitnjenog lista crnog ribiza te se prelije s 40 mL otapala. Sonda ultrazvuka se uroni u sredinu tikvice s otapalom i uzorkom te se ekstrakcija provodi prema zadanim parametrima. Tijekom ekstrakcije temperatura se hlađenjem reakcijske smjese ledom održava ispod 50 °C kako ne bi došlo do razgradnje fenolnih spojeva uslijed visokih temperatura. Nakon ekstrakcije, uzorci se centrifugiraju i filtriraju kroz filter papir u odmjerne tikvice od 50 mL, te se nadopune do oznake s odgovarajućim otapalom i prebace u plastične kivete. Dobiveni ekstrakti skladište se pri temperaturi od +4 °C do provođenja analiza.

Ekstrakti iz osušenog lista crnog ribiza dobiveni su ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, a nakon toga je u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski određen ukupan udio fenola, antioksidacijski kapacitet FRAP metodom, antioksidacijski kapacitet DPPH metodom te antioksidacijski kapacitet ABTS metodom

3.2.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosfowolframove 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).

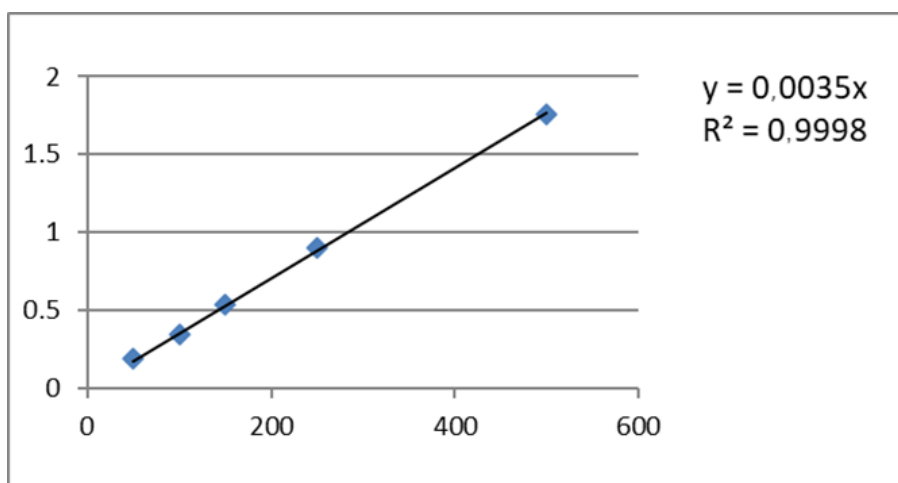
Prethodno pripremljene ekstrakte iz lista crnog ribiza dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom za potrebe određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijom potrebno je prethodno razrijediti 5 puta.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 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 u vodenoj kupelji, a zatim slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba se priprema 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 te se pripreme razrjeđenja kako slijedi: 50, 100, 150, 200 i 500 mg L^{-1} . U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μL galne kiseline određene koncentracije te se redom dodaje 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode, a nakon 3 min dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba sadrži umjesto galne kiseline 100 μL destilirane vode. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortexa i termostatiraju u vodenoj kupelji 25 min pri 50°C .

Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm, a iz izmjerenih vrijednosti se pomoću programa Microsoft Excel nacrtava baždarni pravac. Na apscisu se nanosi koncentracija galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 4). Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola.



Slika 4. Baždarni dijagram galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca je:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2 = 0,9997) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

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

R^2 – koeficijent determinacije

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

3.2.3 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

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-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Metoda se temelji na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

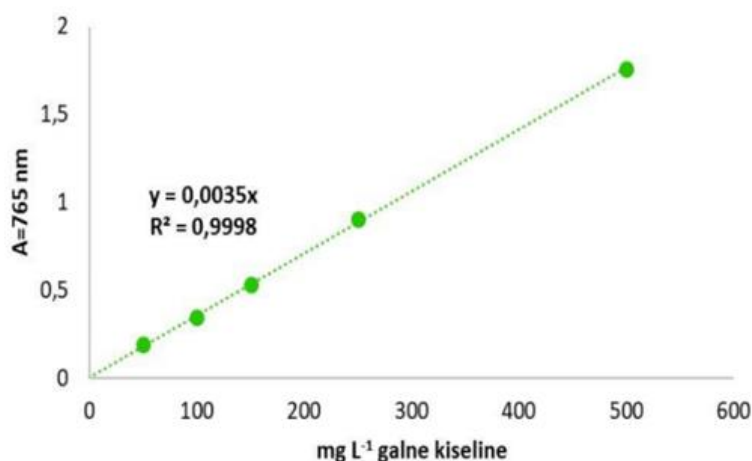
Postupak određivanja

Prethodno pripremljene ekstrakte iz lista crnog ribiza dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom za potrebe određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom potrebno je prethodno razrijediti 100 puta.

U staklene epruvete otpipetira se redom 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Zatim se pripremljeni uzorci promiješaju pomoću Vortex miješalice i termostatiraju 5 min pri 37 °C u vodenoj kupelji. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, a umjesto uzorka dodaje se ekstrakcijsko otapalo (30 %-tni etanol).

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu otopi se 0,0501 g Troloxa u odmjernoj tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Time se dobije 2 mM otopina Troloxa od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrjeđenja tako da se u tikvice redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjuju 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 izmiješaju pomoću Vortexa, 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 nacrtat će se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm. (slika 5) Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzorka.



Slika 5. Baždarni dijagram Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

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

gdje je :

Y – apsorbancija pri 593 nm

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

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražava se u $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ osušenog lovorovog lista kao srednja vrijednost dvaju mjerenja

3.2.4 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

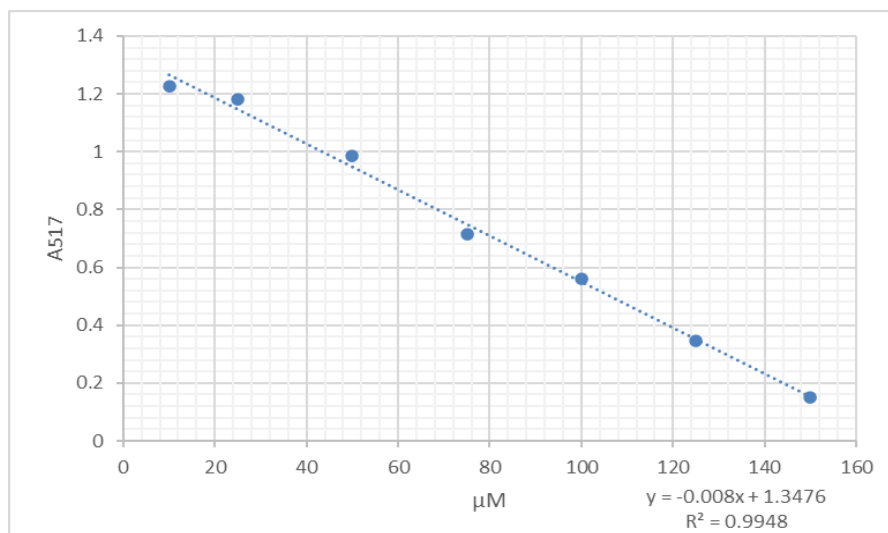
Ova metoda se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta spojeva u hrani korištenjem stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje 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 (Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja

Prethodno pripremljeni ekstrakti lista crnog ribiza razrijeđeni su ekstrakcijskim otapalom 100 puta. U staklenu epruvetu otpipetira se 0,75 mL ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se dodaje 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izrada baždarnog dijagrama

Za pripremu baždarnog dijagrama pripremi se 1 mM otopina Troloxa tako da se prvo odvaže 0,025 g Troloxa te se otopi u metanolu i nadopuni se 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 staklenu epruvetu otpipetira se 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija 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 ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 517 nm (slika 6). Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka.



Slika 6. Baždarni dijagram Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$Y = -0,008 X + 1,3476 \quad (R^2 = 0,9948)$$

[3]

gdje je:

Y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent troloxa (TAE) ($\mu\text{g mol}^{-1}$)

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

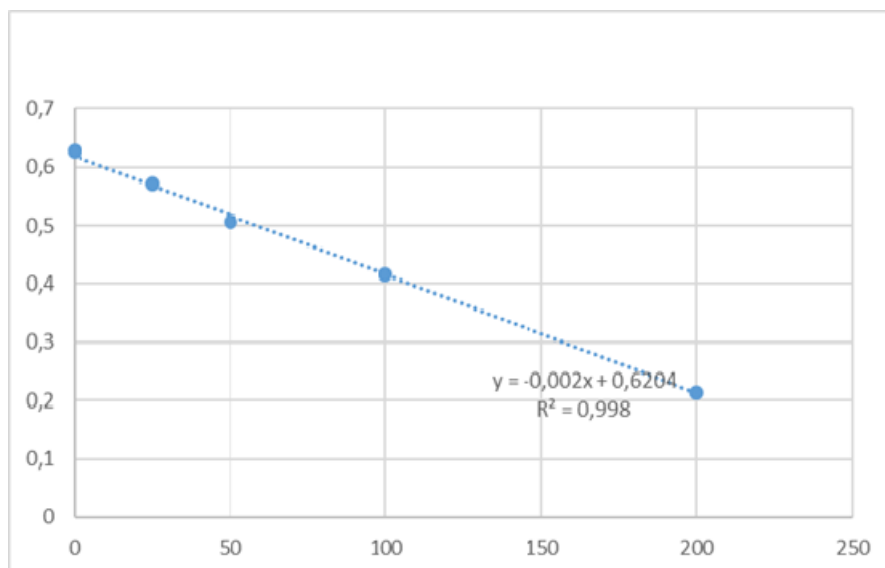
Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidanasa da reduciraju stabilni radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). U prisutnosti antioksidanasa stabilni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ kation se reducira u ABTS, a u reakciji se manifestira obezbojenjem 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

Prethodno pripremljeni ekstrakti lista crnog ribiza prethodno su razrijeđeni ekstrakcijskim otapalom 100 puta. U staklene epruvete otpipetira se 160 μL razrijeđenog uzorka u koje se zatim dodaje 2 mL 1 %-tnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri 734 nm. Za slijepu probu uzima se 96 %-tni etanol.

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 0,02 mol L^{-1} standardna otopina Troloxa tako 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 doda 160 μL otopine Troloxa i pomiješa se 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 7). Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka.



Slika 7. Baždarni dijagram Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$Y = -0,002 X + 0,6204 \quad (R^2 = 0,998)$$

[4]

gdje je :

Y – apsorbancija pri 734 nm

X – koncentracija Trolox otopine (mmol L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

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

3.2.6 Određivanje udjela suhe tvari

U osušenu aluminijsku posudicu stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić, te se suši u sušioniku pri 105 °C u trajanju od 60 min sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se s napola poklopljenim poklopcem hladi u eksikatoru a zatim se izvaže s točnošću od $\pm 0,0002$ g. U ovako pripremljenu posudicu izvaže se 2,5 g uzorka lista s točnošću $\pm 0,0002$ g i pomoću staklenog štapića dobro se izmiješa s kvarcnim pijeskom. Zatim se posudica s uzorkom stavi u sušionik zagrijan na $105 \pm 0,5$ °C i zagrijava 60 min sa skinutim poklopcem. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja, sušenje se nastavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Važe se s točnošću 0,0002 g. Izračunavanje: Nakon hlađenja u eksikatoru, posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar pomoću sljedeće formule:

$$\text{Suha tvar (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100 \quad [5]$$

gdje je:

m_0 – masa lončića

m_1 – masa lončića i uzorka na početku

m_2 – masa lončića i uzorka na kraju

3.2.7 Eksperimentalni dizajn i statistička obrada rezultata

Eksperimentalni dizajn te statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su ukupni fenoli i antioksidacijski kapaciteti određeni FRAP, DPPH i ABTS metodom te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: a) omjer otapalo:uzorak b) amplituda c) vrijeme. Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multifaktorske analize varijance (ANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeno je optimiranje postupka izolacije fenolnih spojeva iz lista crnog ribiza primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz 30 %-tnu vodenu otopinu etanola kao ekstrakcijsko otapalo, a varijable čiji utjecaji su određivani su amplituda 50, 75 i 100 %, te vrijeme ekstrakcije 5 ili 10 min. Kao izlazni parametri praćen je udio fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet određen FRAP, DPPH i ABTS metodama. U tablici 2 prikazani su dobiveni rezultati udjela ukupnih fenola u ekstraktima lista crnog ribiza, a u tablici 3 su prikazane vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima lista crnog ribiza koji je dobiven provedbom FRAP, DPPH i ABTS metoda.

Tablica 2. Udio ukupnih fenola ekstrakata lista crnog ribiza ovisno o omjeru otapalo:uzorak, amplitudi ultrazvuka i vremenu ekstrakcije

UZORAK	OMJER OTAPALO:UZORAK	AMPLITUDA (%)	VRIJEME (min)	UKUPNI FENOLI (mg GAE g ⁻¹)
1	20:1	50	5	17,11±0,16
2	20:1		10	20,84±0,42
3	20:1	75	5	17,03±0,02
4	20:1		10	22,05±0,10
5	20:1	100	5	17,16±0,02
6	20:1		10	22,57±0,24
7	30:1	50	5	21,20±0
8	30:1		10	20,21±0,30
9	30:1	75	5	28,98±0,94
10	30:1		10	31,12±0,60
11	30:1	100	5	33,54±0,09
12	30:1		10	35,02±1,06
13	40:1	50	5	28,27±1,21
14	40:1		10	34,85±0,24
15	40:1	75	5	32,93±0,36
16	40:1		10	31,62±0,36
17	40:1	100	5	30,13±1,21
18	40:1		10	38,09±0,08

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. GAE=ekvivalent galne kiseline.

Tablica 3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza ovisno o omjeru otapalo:uzorak, amplitudi ultrazvuka i vremenu ekstrakcije

UZORAK	OMJER OTAPALO:UZORAK	AMPLITUDA (%)	VRIJEME (min)	FRAP ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)
1	20:1	50	5	146,88 $\pm$ 3,26	166,60 $\pm$ 1,41	188,35 $\pm$ 1,41
2	20:1		10	266,07 $\pm$ 6,53	184,22 $\pm$ 4,42	293,31 $\pm$ 4,24
3	20:1	75	5	233,71 $\pm$ 0	165,68 $\pm$ 2,65	252,75 $\pm$ 9,19
4	20:1		10	232,88 $\pm$ 1,09	200,48 $\pm$ 1,41	287,16 $\pm$ 7,07
5	20:1	100	5	223,84 $\pm$ 14,14	165,89 $\pm$ 3,18	241,39 $\pm$ 8,48
6	20:1		10	256,63 $\pm$ 10,87	203,04 $\pm$ 3,00	295,56 $\pm$ 2,12
7	30:1	50	5	249,18 $\pm$ 4,87	216,87 $\pm$ 7,65	413,36 $\pm$ 3,17
8	30:1		10	258,88 $\pm$ 11,39	219,35 $\pm$ 7,40	346,12 $\pm$ 6,35
9	30:1	75	5	386,92 $\pm$ 3,26	273,80 $\pm$ 6,35	436,98 $\pm$ 9,53
10	30:1		10	333,73 $\pm$ 0	308,40 $\pm$ 4,23	291,57 $\pm$ 3,17
11	30:1	100	5	417,81 $\pm$ 27,67	292,75 $\pm$ 6,35	314,82 $\pm$ 4,23
12	30:1		10	384,29 $\pm$ 22,78	324,43 $\pm$ 5,29	571,98 $\pm$ 0
13	40:1	50	5	333,71 $\pm$ 6,52	313,67 $\pm$ 21,20	213,71 $\pm$ 4,24
14	40:1		10	386,09 $\pm$ 10,88	329,50 $\pm$ 1,06	337,75 $\pm$ 9,90
15	40:1	75	5	373,01 $\pm$ 2,17	348,27 $\pm$ 3,17	299,13 $\pm$ 7,06
16	40:1		10	396,86 $\pm$ 4,35	327,75 $\pm$ 1,41	320,75 $\pm$ 5,66
17	40:1	100	5	287,26 $\pm$ 15,21	329,05 $\pm$ 13,77	241,43 $\pm$ 1,41
18	40:1		10	487,34 $\pm$ 2,17	344,55 $\pm$ 12,72	455,47 $\pm$ 21,20

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. TE= ekvivalent Troloxa.

U tablici 2 prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola ekstrakata lista crnog ribiza s obzirom na omjer otapala i uzorka, amplitudu i vrijeme. Udio ukupnih fenola varirao je u rasponu 17,03 - 38,09 mg GAE g⁻¹, što je nešto niže u usporedbi sa rezultatima istraživanja drugih autora. Nour i suradnici (2014) određivali su ukupan sadržaj fenola u 40 %-tnim etanolnim ekstraktima lista crnog ribiza Folin-Ciocalteu metodom koristeći galnu kiselinu kao standard te su udjel ukupnih fenolnih spojeva odredili u rasponu 32,16 – 44,84 mg GAE g⁻¹. Staszowska – Karkut i Materska (2020) su u svom radu dali pregled udjela fenolnih spojeva u lišću različitog bobičastog voća te su istaknuli da u usporedbi s ostalim bobičastim voćem listovi crnog ribiza imaju najniži udio fenolnih spojeva (40 - 78 mg GAE g⁻¹). Razlozi neujednačenih udjela fenolnih spojeva u ekstraktima lista crnog ribiza među uspoređivanim istraživanjima može biti povezan s brojnim faktorima poput sorte, vremena berbe lista, postupanjem s listom nakon berbe te također primijenjenih uvjeta ekstrakcije.

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom varirao je u rasponu 146,88 – 487,34 μmol TE g⁻¹. Orban i sur. (2021) istraživali su antioksidacijski kapacitet pomoću FRAP metode u metanolnom i etanolnom ekstraktu lista crnog ribiza koristeći askorbinsku kiselinu kao standard. Izmjereni rezultati pokazali su da je antioksidacijski kapacitet varirao u rasponu 130 - 320 μmol AsA g⁻¹, što navodi na zaključak da su ekstrakti fenolnih spojeva lista crnog ribiza imali slične vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kao što je dobiveno u ovom istraživanju. Potpuna usporedba nije primjenjiva budući nisu izražavani na isti ekvivalent.

Antioksidacijski kapacitet proveden DPPH metodom određen je u rasponu 165,89 - 348,27 μmol TE g⁻¹, a antioksidacijski kapacitet proveden ABTS metodom u rasponu 188,35 – 455,47 μmol TE g⁻¹. Dobivene vrijednosti su u skladu s istraživanjima drugih autora. Nour i sur. (2014) mjerili su antioksidacijski kapacitet u različitim etanolnim ekstraktima lista crnog ribiza primjenom DPPH metode, te su najveći antioksidacijski kapacitet izmjerili u ekstraktu dobivenom uz 40 %-tnu vodenu otopinu etanola kao otapala, a iznosio je 257,8 – 386,8 μmol TE g⁻¹. Burri Stina i sur. (2017) u svojem radu su pomoću ABTS metode određivali antioksidacijski kapacitet u ekstraktima lišća crnog ribiza te se antioksidacijski kapacitet kretao u rasponu 98,3 – 108,9 mmol TE g⁻¹ što je više od vrijednosti dobivenih u ovom radu. Generalno, može se zaključiti da su primjenom svih metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta dobivene visoke vrijednosti, koje se mogu povezati s udjelom bioaktivnih molekula odnosno u ekstraktima prisutnih fenolnih spojeva.

Tablica 4. Utjecaj omjera otapalo:uzorak, amplitude i vremena na maseni udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP, DPPH i ABTS metodom

Izvor varijacije	N	Ukupni fenoli mg GAE g ⁻¹	Antioksidacijski kapacitet $\mu\text{mol TE g}^{-1}$		
			DPPH	FRAP	ABTS
Omjer otapalo:uzorak					
20:1	12	p<0,01† 19,46 ± 0,17 ^a	p<0,01† 180,98 ± 2,26 ^a	p<0,01† 226,67 ± 3,22 ^a	p<0,01† 259,75 ± 2,20 ^a
30:1	12	28,34 ± 0,17 ^b	272,60 ± 2,26 ^b	338,47 ± 3,22 ^b	395,80 ± 2,20 ^c
40:1	12	32,65 ± 0,17 ^c	332,13 ± 2,26 ^c	377,38 ± 3,22 ^c	311,37 ± 2,20 ^b
Amplituda (%)					
50	12	p <0,01† 23,75 ± 0,17 ^a	p<0,01† 238,37 ± 2,26 ^a	p<0,01† 273,47 ± 3,22 ^a	p<0,01† 298,76 ± 2,20 ^a
75	12	27,29 ± 0,17 ^b	270,73 ± 2,26 ^b	326,18 ± 3,22 ^b	314,72 ± 2,20 ^b
100	12	29,42 ± 0,17 ^c	276,62 ± 2,26 ^b	342,86 ± 3,22 ^c	353,44 ± 2,20 ^c
Vrijeme (min)					
5	18	p<0,01† 25,15 ± 0,14 ^a	p<0,01† 252,51 ± 1,84 ^a	p<0,01† 294,70 ± 2,63 ^a	p<0,01† 289,10 ± 1,79 ^a
10	18	28,49 ± 0,14 ^b	271,30 ± 1,84 ^b	333,64 ± 2,63 ^b	355,52 ± 1,79 ^b
Prosječna vrijednost	36	26,82	261,91	314,17	322,31

†Statistički značajan čimbenik. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne pri $p \leq 0,05$.

4.1. UTJECAJ OMJERA OTAPALA I UZORKA NA UDIO UKUPNIH FENOLA

Svojstva otapala utječu na proces ekstrakcije fenolnih spojeva, a najčešća otapala koja se koriste su voda ili alkoholi poput etanola ili metanola te njihove vodene otopine. Omjer otapala i uzorka kao i broj ponovljenih ekstrakcija provedenih za svaki uzorak utječu na ekstrahiranu količinu fenola. Koncentracija ukupnih fenola ovisi o omjeru uzorka i otapala, a povećanjem volumena otapala često dolazi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije, dok niži volumeni otapala mogu smanjiti učinkovitost ekstrakcije zbog učinka zasićenja (Wong Paz i sur., 2017). U ovom radu, povećanjem omjera otapala i uzorka dolazi do statistički značajnog porasta udjela ukupnih fenola te je najveći udio zabilježen pri omjeru 40:1, što navodi na zaključak da se uz veći omjer otapalo/uzorak postiže bolja ekstrakcija fenola iz lista crnog ribiza. Rezultati udjela ukupnih fenola prikazani su u tablici 2. Ovi rezultati su u skladu s načelima prijenosa mase, gdje se pokretačkom silom za prijenos mase smatra koncentracijski gradijent između uzorka i otapala. Što je veći omjer uzorka i otapala veći je i koncentracijski gradijent što dovodi do povećane brzine difuzije spojeva iz ekstrahiranog krutog materijala u otapalo, ali i određuje povećanje potrebnog vremena za postizanje ravnoteže (Upadhyay i sur., 2015).

Predescu i sur. (2016) provodili su ekstrakciju fenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala uz upotrebu vodene otopine etanola kao otapala te su usporedno koristili dva omjera uzorak i otapalo, 1/5 i 1/10. Istraživanja su pokazala da je za ekstrakciju bolji omjer 1/10, jer su primjenom tog omjera izmjerene veće vrijednosti ukupnih fenola u ekstraktu šipka i gloga. Slične zaključke donose i druga istraživanja.

Yin Tay i sur. (2014) provodili su ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala *Aquilaria crassna*, gdje je nakon provedenog istraživanja utvrđeno da se udio ukupnih fenola povećao kada se omjer uzorka i otapala povećao s 1/10 na 1/20, pri čemu se može zaključiti da se s povećanjem omjera uzorak:otapalo povećava i udio ukupnih fenola u biljnom materijalu. Al-Farsi i Lee (2008) izvijestili su da je omjer otapala i uzorka od 60:1 u dvostupanjskom postupku dovoljan za ekstrakciju većine fenola iz biljnih tkiva.

4.2 UTJECAJ AMPLITUDE NA UDIO UKUPNIH FENOLA

Amplituda je mjera količine energije koju prenosi val. Ultrazvučni intenzitet proporcionalan je amplitudi ultrazvuka te razina kavitacije ovisi o amplitudi, no veća amplituda nužno ne znači učinkovitiju ekstrakciju (Tiwari, 2015). Primjenom viših amplituda može biti dovoljna kraća ekstrakcija da bi se ekstrahirao isti udio fenolnih spojeva. U ovom radu, porastom amplitude dolazi do porasta masenog udjela ukupnih fenola, a najveći udio zabilježen je pri amplitudi 100 %, prikazan u tablici 2, što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Carrera i sur. (2012), gdje je istraživao utjecaj amplitude (20, 50 i 100 %) na prinos fenolnih spojeva grožđa. Najveći maseni udio fenolnih spojeva bio je pri amplitudi od 100 %, dok su korištenjem niže amplitude (20 %) prinosi masenih udjela značajno manji. Za razliku od toga, Carrera i sur. (2011) zaključili su da je optimalna vrijednost amplitude za provedbu ekstrakcije fenolnih spojeva u crvenom grožđu 70 %, dok su veće vrijednosti amplitude rezultirale ekstrakcijskim gubicima.

4.3 UTJECAJ VREMENA NA UDIO UKUPNIH FENOLA

Vrijeme procesa ekstrakcije utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva, te što je topljivost ciljanih komponenti veća, vrijeme potrebno za ekstrakciju je kraće (Upadhyay i sur., 2015). U ovom radu, povećavanjem vremena dolazi do porasta masenog udjela ukupnih fenola, a veći udio zabilježen je pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom uz trajanje ekstrakcije od 10 min. Dobiveni podaci pokazuju da je najveća masena koncentracija ukupnih fenola određena u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri trajanju ekstrakcije do 10 min, prikazano u tablici 2, a slično je potvrđeno i u istraživanju koje je obuhvatilo utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na biljci tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) (Upadhyay i sur., 2015). Tijekom ekstrakcije dulje od 10 min, došlo je do smanjenja masenog udjela ukupnih fenola, jer dulje tretiranje uzrokuje zagrijavanje ekstrakcijskog otapala, što dovodi do degradacije osjetljivih termolabilnih bioaktivnih spojeva (Upadhyay i sur., 2015). Osim temperature, koja je kontrolirana tijekom ekstrakcije, frekvencija ultrazvuka također utječe na proces ekstrakcije različitih biljnih materijala, pri čemu frekvencije iznad 20 kHz mogu uzrokovati degradaciju fenolnih spojeva zbog povećane produkcije vodikovih atoma (H) i hidroksilnih radikala (OH^{*}), koji potiču njihovu razgradnju (Dzah i sur., 2020). Također, u istraživanju Altemimi i sur. (2016) utvrđena je značajna razlika između 37 i 80 kHz prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz breskve i bundeve. Rezultati su pokazali da je najveći udio ukupnih fenola dobiven kada je frekvencija bila 37 kHz, a ista frekvencija korištena je i u ovom istraživanju. Primjena više frekvencije (80 kHz) može uzrokovati kolaps mjehurića u uzorcima te onemogućiti kavitacijskim mjehurićima da uspiju razoriti biljni materijal dovoljno da se ekstrahiraju svi ciljni spojevi. Više frekvencije povezane su s manjim valnim duljinama i većom energijom što rezultira povećanom aktivnošću kavitacije i većom vjerojatnošću implozije mjehurića (Siddiqui i sur., 2023). Ultrazvuk može razgraditi antocijane, a primjenom u vrlo kratkom vremenskom razdoblju i kroz cikluse ta degradacija se može minimizirati. S druge strane, duže vrijeme ultrazvuka predstavlja značajno smanjenje ukupne količine fenola pa se preporučuje koristiti ultrazvuk u kratkim intervalima (Aliano-Gonzalez i sur., 2020).

Aliano-Gonzalez i sur. (2020) određivali su ukupne fenole primjenom procesa ekstrakcije potpomognute ultrazvukom koristeći različita vremena ekstrakcije (5, 10, 15, 20 i 25 min) na uzorcima lista borovnice. Maksimalni ukupni sadržaj fenola ($32,18 \text{ mg g}^{-1}$) postignut je uz vrijeme ekstrakcije bilo 15 min, što je nešto dulje od trajanja ekstrakcije u našem istraživanju. Nakon 10 minuta udio ukupnih fenola se smanjivao. Orban i sur. (2021) su također određivali udio fenolnih spojeva u listu i pupovima crnog ribiza i došli su do zaključka da se udio fenolnih spojeva povećavao sa vremenom trajanja procesa te je pri vremenu trajanja od 15 min sadržaj ukupnih fenola bio viši u lišću i iznosio je 89 - 97 mg GAE g^{-1} .

4.4 UTJECAJ OMJERA OTAPALA I UZORKA NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Iz rezultata prikazanih u tablici 3 može se vidjeti da porastom omjera otapala i uzorka raste i antioksidacijski kapacitet ekstrakta. Kako je određeno provedbom DPPH i FRAP metoda, antioksidacijski kapacitet statistički značajno raste te je najveća vrijednost izmjerena pri omjeru otapalo/uzorak 40:1. Provedbom ABTS metode pokazalo se kako je najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjerena pri omjeru 30:1. Antioksidacijski kapacitet ovisi o omjeru otapala i uzorka i u uskoj je vezi s masenim udjelom fenolnih spojeva u ekstraktima. Kako je već prethodno komentirano, povećanjem volumena otapala povećava se i učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva, te posljedično veći maseni udjeli fenolnih spojeva, ali sastav izoliranih skupina fenolnih spojeva doprinose većem antioksidacijskom kapacitetu. Tan i sur. (2011) istraživali su utjecaj omjera otapala i uzorka na antioksidacijski kapacitet *Pelage (Centella Asiatica)*, a kao otapalo korišten je etanol. Primjenom ABTS i DPPH metode rezultati su pokazali najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta pri omjeru 15:1, gdje je kapacitet iznosio $0,8133 \text{ mmol L}^{-1}$ za ABTS metodu i $2,0945 \text{ mmol L}^{-1}$ za DPPH metodu. Daljnje povećanje omjera na 20:1 nije značajno utjecalo na izmjerene vrijednosti. Wong i sur. (2013) određivali su antioksidacijski kapacitet *Dukung Anak (Phyllanthus niruri)* ABTS i DPPH metodom. Najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjerena je pri omjeru otapala i uzorka 20:1, $0,820 \text{ mmol L}^{-1}$ (ABTS) i $1,598 \text{ mmol L}^{-1}$ (DPPH).

4.5 UTJECAJ AMPLITUDE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Iz tablice 3 može se vidjeti da antioksidacijski kapacitet određena FRAP i ABTS metodama primjenom veće amplitude raste te je najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren pri amplitudi od 100 %. Provedbom DPPH metode najniža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta izmjerena je pri amplitudi 50 %, dok pri amplitudama 75 i 100 % nema statistički značajne promjene u antioksidacijskom kapacitetu ekstrakta lista crnog ribiza. Generalno, očekuje se da antioksidacijski kapacitet raste s porastom amplitude budući da se povećavanjem ulazne snage povećava prinos ekstrakcije zbog veće amplitude ultrazvuka, te se u takvim ekstraktima očekuje veći maseni udio fenolnih spojeva koji pridonose i većem antioksidacijskom kapacitetu. Ultrazvuk potiče stvaranje manjih mjehurića koji su podvrgnuti brzom adijabatskoj kompresiji i ekspanziji, koje ovise o amplitudi ultrazvučnih valova, izazivajući time povećanje temperature i tlaka što dovodi do pucanja stijenke. Što je veća amplituda ultrazvuka, to je veći broj perforacija, a samim time i maksimalni prinos ekstrakcije te posljedično antioksidacijski kapacitet zbog prisustva antioksidanata (Borrás-Enríquez Anahí i sur., 2021).

4.6 UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Prema rezultatima multifaktorske analize varijance (ANOVA) vrijeme ekstrakcije je statistički značajno utjecalo na antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista crnog ribiza određenog FRAP, ABTS i DPPH metodom. Antioksidacijski kapacitet bio je najveći pri vremenu ekstrakcije u trajanju od 10 min, što je u skladu i s prinosom fenolnih spojeva koji je također bio najveći u ekstraktima dobivenim pri istom vremenu ekstrakcije. Borrás-Enríquez i sur. (2021) određivali su antioksidacijski kapacitet u kori, endokarpu i jezgri manga (*Mangifera indica* L. var. Manililla) ABTS i DPPH metodom. Ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom provodili su u različitim vremenima (10, 20 i 30 min). Rezultati su pokazali značajnu razliku u ukupnoj koncentraciji polifenola, dok ukupni flavonoidi i antioksidacijski kapacitet nisu pokazali značajan učinak. Stoga se može pretpostaviti da se u 10 min ekstrahira najveća količina flavonoida pa tako povećanje vremena s 20 na 30 min ne dovodi do značajnog porasta koncentracije flavonoida.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Udio ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima lista crnog ribiza ovisno o omjeru otapala i uzorka, amplitudi i vremenu varirao je od 17,03 do 38,09 mg GAE g⁻¹ te se stoga ekstrakti lista crnog ribiza mogu smatrati značajnim izvorom fenolnih spojeva.
2. Omjer otapalo/uzorak utječe na udio ukupnih fenola, a povećanjem omjera otapala i uzorka dolazi do značajnog porasta masenog udjela ukupnih fenola u ekstraktu lista crnog ribiza. Najveći maseni udio ukupnih fenola zabilježen je pri omjeru 40:1 mL g⁻¹.
3. Amplituda ultrazvučnih valova značajno je utjecala na prinos fenola te je primjenom većih amplituda rastao i udio fenolnih spojeva u ekstraktu lista crnog ribiza, a najviša vrijednost zabilježena je pri amplitudi 100 %.
4. Duže vrijeme ekstrakcije utjecalo je na veći prinos fenolnih spojeva te je pri vremenu ekstrakcije od 10 min udio ukupnih fenola iznosio 28,49 mg GAE g⁻¹.
5. Na temelju rezultata FRAP, DPPH, ABTS metoda utvrđeno je da ekstrakti lista crnog ribiza imaju visok antioksidacijski kapacitet, pri čemu je primjenom FRAP metode određen u rasponu od 146,88 do 487,34 μmol TE g⁻¹, primjenom DPPH metode u rasponu od 165,89 do 348,27 μmol TE g⁻¹ te primjenom ABTS metode u rasponu od 188,35 do 455,47 μmol TE g⁻¹.
6. Kao i kod ukupnih fenola omjer uzorak/otapalo imao je značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet te su pri većim omjerima određene i veće vrijednosti. Provedbom DPPH i FRAP metoda, najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je pri omjeru 40:1 mL g⁻¹, a ABTS metodom pri omjeru 30:1 mL g⁻¹.
7. Amplituda ultrazvučnih valova i vrijeme ekstrakcije značajno su utjecali na antioksidacijski kapacitet. Primjenom FRAP i ABTS metoda najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je pri amplitudi 100 %, a kod DPPH metode pri amplitudi 75 %. Kod svih metoda najveći antioksidacijski kapacitet određen je pri vremenu ekstrakcije od 10 min.
8. Na temelju rezultata statističke analize optimalni uvjeti za postizanje maksimalnog prinosa fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta su: omjer otapalo:uzorak 40:1 mL g⁻¹, amplituda 100 % te vrijeme ekstrakcije 10 min.

6. LITERATURA

Al-Farsi M, Lee CY (2008) Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food.Chem.* **108**(3), 977-985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009>

Aliaño-González MJ, Jarillo JA, Carrera C, Ferreiro-González M, Palma M, Ayuso J i sur.(2020) Optimization of a Novel Method Based on Ultrasound-Assisted Extraction for the Quantification of Anthocyanins and Total Phenolic Compounds in Blueberry Samples (*Vaccinium corymbosum* L.). *Foods* **9**, 1763. <https://doi.org/10.3390/foods9121763>

Altemimi A, Watson, DG, Choudhary R, Dasari M R, Lightfoot DA(2016) Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *Plos one* **11**(2), e0148758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>

Anonymus 1, <https://www.vrtlarica.hr/>, Pristupljeno: 18.2.2024.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* **127**(1), 183-198. [10.1039/b009171p](https://doi.org/10.1039/b009171p)

Borrás-Enríquez AJ, Reyes-Ventura E, Villanueva-Rodríguez SJ, Moreno-Vilet L (2021) Effect of Ultrasound-Assisted Extraction Parameters on Total Polyphenols and Its Antioxidant Activity from Mango Residues (*Mangifera indica* L. var. *Manililla*). *Separations* **8**(7), 94. <https://doi.org/10.3390/separations8070094>

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

Carrera C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta* **732**,100-104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>

Cyboran S, Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H,Zylka R, Oszmianski J, Kleszczynska H (2014) Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Int. Food Res.* **65**, 47-58. [10.1016/j.foodres.2014.05.03](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.03)

Cortez RE, Gonzalez de Mejia E (2019) Blackcurrants (*Ribes nigrum*): A Review on Chemistry, Processing, and Health Benefits. *J. Food Sci.* **84**, 2387-2401. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14781>

- 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. Biotech.* **57**(1), 77-86. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.01.19.5877>
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dent M., Dragović-Uzelac V., Elez Garofulić I., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Che. Biochem. Eng. Q.* **29** (3), 475 - 484. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2168>
- Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G, Ma H (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci.* **35**, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Golmohamadi A, Möller G, Powers J, Nindo C (2013) Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrason. Chem.* **20**, 1316-1323. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.020>
- Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, Plejada, Zagreb, str. 98 - 103.
- Howard LR, Clark JR, Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Food Agri.* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>
- Hummer KE, Dale A (2010) Horticulture of *Ribes*. *Forest Pathol.* **40**, 251-263. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00657.x>
- Kendir G, Köroğlu A. (2015) In vitro Antioxidant Effect of the Leaf and Branch Extracts of *Ribes* L. Species in Turkey. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2**, 2394-1502. <http://dx.doi.org/10.15344/2394-1502/2015/108>
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328 - 2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kostecka-Gugała A, Ledwożyw-Smoleń I, Augustynowicz J, Wyżgolik G, Kruczek M, Kaszycki P (2015) Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open chem.* **13**, 1313-1325. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0143>
- Lee SG, Vance TM, Nam TG, Kim DO, Koo SI, Chun OK (2015) Contribution of anthocyanin composition to total antioxidant capacity of berries. *Plant Foods Hum. Nutr.* **70**(4), 427–432. [10.1007/s11130-015-0514-5](https://doi.org/10.1007/s11130-015-0514-5)

- Maier A, Padureanu V, Lupu MI, Canja CM, Badarau C, Padureanu C, Alexa E, Poiana MA (2023) Optimization of A Procedure to Improve the Extraction Rate of Biologically Active Compounds in Red Grape Must Using High-Power Ultrasound. *Sustainability* **15**, 6697. <https://doi.org/10.3390/su15086697>
- 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. Crop. Prod.* **53**,133-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.022>
- Orav A, Kailas T, Müürisepp M (2002) Composition of blackcurrant aroma isolated from leaves, buds, and berries of *Ribes nigrum* L. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* **51**, 225-234.
- Orbán CS, Kis É, Albert CS, Molnos É (2021) Antioxidant capacity of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves and buds. *Acta univ. sapientiae, alimentaria* **14**, 117-130. [10.2478/ausal-2021-0007](https://doi.org/10.2478/ausal-2021-0007)
- Piry J, Pibela A, Durcanska J, Farkas P (1995) Fractionation of volatiles from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) by different extractive methods. *Food Chem.* **54**, 73-77. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)92665-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)92665-7)
- Paunović S, Mašković P, Milinković M(2022) Phytochemical and antimicrobial profile of black currant berries and leaves. *Acta agric. Serb.*, 27(53), 25-29.
- Predescu, NC, Papuc C, Nicorescu V, Gajaila I, Goran GV, Petcu C, Stefan G (2016) The influence of solid-to-solvent ratio and extraction method on total phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts. *Rev. Chim.* **67**, 1922-1927.
- Raudsepp P, Kaldmäe H, Kikas A, Libek A-V, Püssa T (2010) Nutritional quality of berries and bioactive compounds in the leaves of black currant (*Ribes Nigrum* L.) cultivars evaluated in Estonia. *Journal of berry Research* **1(1)**, 53-59. [10.3233/BR-2010-006](https://doi.org/10.3233/BR-2010-006)
- Schuelter Boeing J, Oliveira Barizão E, Costa e Silva B, Fernandes Montanher P, de Cinque Almeida V, Vergilio Visentainer J (2014) Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent. J.* **8**, 1-9. [10.1186/s13065-014-0048-1](https://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1)
- Siddiqui SA, Redha AA, Salauddin M, Azmy Harahap I, Vasantha Rupasinghe HP (2023) Factors Affecting the Extraction of (Poly)Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction. *Critical reviews in analytical chemistry*, 1-22. <https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2266846>

Sik B, Ajtony Z, Lakatos E, Szekelyhidi R (2022) The effects of extraction conditions on the antioxidant activities, total polyphenol and monomer anthocyanin contents of six edible fruits growing wild in Hungary. *Heliyon* **8(12)**. <https://doi.org/10.1016/>

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(2)**, 463. <https://doi.org/10.3390/nu12020463>

Tabart J, Kever C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J (2007) Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chem.* **105**, 1268-1275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.005>

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J (2006) Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6271-6276. <https://doi.org/10.1021/jf061112y>

Tan PW, Tan CP, Wai HC (2011) Antioxidant properties: Effect of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga(*Centella Asiatica*). *Int. Food Res. J.* **18(2)**, 557-562.

Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trend Anal. Chem.* **71**, 100 - 109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Ummat V, Tiwari BK , Jaiswal AK, Condon K, Garcia-Vaquero M, O'Doherty J, O'Donnell C, Rajauria G (2020) Optimisation of Ultrasound Frequency, Extraction Time and Solvent for the Recovery of Polyphenols, Phlorotannins and Associated Antioxidant Activity from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* **18(5)**, 250. <https://doi.org/10.3390/md18050250>

Upadhyay R, Nachiappan G, Mishra HN (2015) Ultrasound-assisted extraction of flavonoids and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves. *Food Sci. Biotechnol.* **24(6)**, 1951 – 1958. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0257-y>

Vagiri M, Ekholm A, Andersson SC, Johansson E, Rumpunen K (2012) An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10501-10510. <https://doi.org/10.1021/jf303398z>

Vagiri M, Johansson E, Rumpunen K (2017) Phenolic compounds in black currant leaves – an interaction between the plant and foliar diseases? *J. Plant Interact.* **12**, 193-199. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1316524>

- Varming C, Petersen MA, Poll L (2004) Comparison of isolation methods for the determination of important aroma compounds in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice, using nasal impact frequency profiling. *J. Agri. Food Chem.* **52**, 1647-1652. <https://doi.org/10.1021/jf035133t>
- Wong BY, Tan CP, Ho CW (2013) Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak” (*Phyllanthus niruri*). *Int. Food Res. J.* **20(1)**: 325-330.
- Wong-Paz JE, Muñiz-Márquez DB, Aguilar-Zárate P, Ascacio-Valdés JA, Cruz K, Reyes-Luna C i sur. (2017) Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies, 229-252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00005-3>
- Woznicki TL, Sørnsteby A, Aaby K, Martinsen BK, Heide OM, Wold AB, Remberg SF (2017) Ascorbate pool, sugars and organic acids in black currant (*Ribes nigrum* L.) berries are strongly influenced by genotype and post-flowering temperature. *J Sci. Food Agri.* **97(4)**, 1302–1309. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7864>
- Yin Tay P, Ping Tan C, Abas F, Seng Yim H, Wai Ho C (2014) Assessment of Extraction Parameters on Antioxidant Capacity, Polyphenol Content, Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin Gallate (ECG) and Iriflophenone 3-C-β-Glucoside of Agarwood (*Aquilaria crassna*) Young Leaves. *Molecule* **19**,12304-12319. <https://doi.org/10.3390/molecules190812304>
- Ziobron M, Kopec 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**, 7638. <https://doi.org/10.3390/app11167638>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis