

Izolacija fenolnih spojeva lista aronije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima

Čupić, Anita

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:159:717923>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Anita Čupić

**IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA LISTA
ARONIJE PRIMJENOM UBRZANE
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć dr. sc. Ene Ceglić.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta “Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća” (IP-2022-10-5499) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na srdačnoj pomoći i stručnim savjetima. Također, veliko hvala dr. sc. Eni Cegledi na savjetima koji su me vodili prilikom pisanja rada i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima, osobito roditeljima i sestri Ivoni na bezuvjetnoj podršci tijekom izrade diplomskog rada kao i tijekom cijelog razdoblja obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA LISTA ARONIJE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA

Anita Čupić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215969

Sažetak: Istraživanje je provedeno s ciljem optimiranja uvjeta ekstrakcije (temperatura, vrijeme te omjer otapala i biljnog materijala) pri kojima se postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista aronije. Ekstrakti su proizvedeni primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz primjenu 30 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala, a u dobivenim ekstraktima određeni su ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet DPPH, FRAP i ABTS metodama. Optimalni uvjeti pri kojima je postignut najviši prinos fenolnih spojeva (80,01 mg/g suhe tvari lista aronije) su temperatura 150 °C, vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer otapala i biljnog materijala 30 mL/g. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena ABTS i FRAP metodama je dobivena pri temperaturi 150 °C, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala 30 mL/g, dok je primjenom DPPH metode određena pri istoj temperaturi, vremenu ekstrakcije 10 min i omjeru otapala i biljnog materijala 40 mL/g.

Ključne riječi: list aronije, ASE, ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 41 stranica, 14 slika, 2 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: dr.sc. Ena Cegledi

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)

Datum obrane: 23. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF ARONIA LEAVES USING ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

Anita Čupić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215969

Abstract: The research was carried out with the aim of optimizing the extraction conditions (temperature, time and solvent/sample (SS) ratio) in which a more efficient extraction of phenolic compounds from chokeberry leaves is achieved. The extracts were produced using accelerated solvent extraction using a 30 % aqueous ethanol solution as an extraction solvent, and the total phenols and antioxidant capacity by the DPPH, FRAP and ABTS methods were determined in the obtained extracts. The optimal conditions under which the highest yield of phenolic compounds (80.01 mg/g dry weight of chokeberry leaf) was achieved were temperature of 150 °C, extraction time of 5 min and SS ratio of 30 mL/g. The highest value of antioxidant capacity determined by the ABTS and FRAP methods was obtained at a temperature of 150 °C, an extraction time of 5 min and a SS ratio of 30 mL/g, while using the DPPH method, the highest value of antioxidant capacity was determined at the same temperature, an extraction time of 10 min and a SS ratio of 40 mL/g.

Keywords: aronia leaves, ASE, total phenolic compounds, antioxidant capacity

Thesis contains: 41 pages, 14 figures, 2 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: Ena Cegledi, 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, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23rd, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ARONIJA	2
2.1.1 Kemijski sastav aronije	3
2.2. FENOLNI SPOJEVI	4
2.2.1. Antioksidacijska svojstva fenola.....	6
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	7
2.3.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom (ASE)	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Uzorak lista aronije	12
3.1.2. Laboratorijski uređaji i pribor	12
3.1.3. Kemikalije i standardi	13
3.2. METODE RADA	16
3.2.1. Određivanje suhe tvari	16
3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista aronije primjenom ASE	16
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola	18
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	20
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	21
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	23
3.2.7. Statistička analiza	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA	26
4.2. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	29
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina ekstrakti različitih biljaka bogati prirodnim bioaktivnim spojevima počeli su sve više zamjenjivati sintetske antioksidanse kao sastojke u funkcionalnim prehrambenim proizvodima. Mnoge degenerativne bolesti, kao što su rak i arterioskleroza, se pojavljuju kao posljedica štetnih učinaka slobodnih radikala na stanične sustave (Staszowska-Karkut i Materska, 2020). Aronija je jedna od biljaka čiji ekstrakti sadrže visok sadržaj antocijana i fenolnih spojeva, bioaktivnih spojeva koji pokazuju visok antioksidacijski kapacitet i imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. U svijetu se uzgaja više od 100 godina, a zbog visokog udjela antioksidansa postala je popularna i široko rasprostranjena u prehrambenoj industriji. Tijekom prerade plodova aronije u sok zaostaje trop kao nusproizvod, a sadrži visoko vrijedne nutrijente poput minerala, proteina, organskih kiselina, vitamina, ugljikohidrata (Oszmianski i Wojdylo, 2005). Osim tropa, list je također važan nusproizvod koji predstavlja značajan izvor bioaktivnih spojeva (Staszowska-Karkut i Materska, 2020).

Kako bi se što efikasnije ekstrahirali visoko vrijedni fenolni spojevi iz lista aronije, a da pri tome ne dođe do njihove degradacije, poželjno je konvencionalne tehnike ekstrakcije zamijeniti naprednim tehnikama. Jedna od njih je ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) razvijena 90-tih godina, a predstavlja tehniku ekstrakcije krutih i polukrutih uzoraka tekućim otapalom pri povišenom tlaku i temperaturi. Glavne prednosti ubrzane ekstrakcije otapalima su što je automatizirana tehnika pri kojoj otapalo ostaje u tekućem stanju čak i iznad temperature vrelišta, koristi kratko vrijeme ekstrakcije, smanjena je potrošnja otapala te nije potrebno filtrirati ekstrakte (Tena, 2019).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio optimirati uvjete ekstrakcije (temperatura, vrijeme te omjer otapala i biljnog materijala) kako bi se postigla učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista aronije. Tehnika koja je korištena za proizvodnju ekstrakta je ubrzana ekstrakcija otapalima, a kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 30 %-tna vodena otopine etanola. U dobivenim ekstraktima određeni su ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet DPPH, FRAP i ABTS metodama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ARONIJA

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je višegodišnji listopadni grm koji pripada obitelji Rosaceae, podobitelji Maloideae, rodu *Aronia* (Mahoney i sur., 2019). Tri autohtone sjevernoameričke vrste roda *Aronia* su: *A. arbutifolia* (L.) Pers (crvena aronija), *A. prunifolia* (Marshall) Rehder (ljubičasta aronija) i *A. melanocarpa* (Michx) Elliot (crna aronija). *A. prunifolia* se smatra hibridom te sadrži obilježja *A. melanocarpe* i *A. arbutifolie*. Ljubičasto-crni plodovi sazrijevaju u listopadu i studenom, a mladi listovi su joj dlakavi koji tek u zrelosti postaju glatki (Kokotkiewicz i sur., 2010). Raste isključivo u močvarnim predjelima dostižući visinu od 5 m. *A. melanocarpa* se koristi kao vrijedan sastojak hrane (bobice se koriste za proizvodnju soka, vina i pekmeza), izvor prirodnih pigmenata i kao dodatak prehrani. Cvjetovi su joj bijele do bijelo-ružičaste boje i cvjetaju u svibnju. Listovi su sjajni i glatki, duljine 3 do 7 cm. U ljetnim mjesecima, na crvenim peteljka se nalaze ljubičasto-crne okrugle bobice koje su sakupljene u grozdove, a ovisno o sorti njihov promjer iznosi od 6,1 do 17,8 mm, dok se masa 100 plodova nalazi u rasponu od 32 do 111,7 g (Sidor i Gramza-Michalowska, 2019). Postoji i četvrta euroazijska vrsta aronije latinskog naziva *A. mitschurinii* koja je nastala hibridizacijom od *A. melanocarpe* i *Sorbus aucuparie* L. Uzgaja se u Skandinaviji i istočnoj Europi, a povremeno se sadi kao kultura bobičastog voća u Sjevernoj Americi. Morfološki, sve vrste aronije su drvenaste biljke, s naizmjeničnim, fino nazubljenim listovima i cvjetovima s pet latica koji posjeduju jedan tučak i jabučasti plod (Brand i sur., 2022).

Aronija potječe iz istočnih dijelova Sjeverne Amerike, a uzgoj ovog grma za prehrambenu industriju započeo je 1990-ih godina u hladnim područjima Sibira odakle se proširio po cijeloj Rusiji. U prvoj polovici 20. stoljeća uzgoj aronije se proširio u druge europske zemlje poput Poljske, Češke, Danske, Švedske. Otporna je na sušu, kukce i različita zagađenja, a prirodna staništa su joj močvarna područja, savane i vlažne šume. Zbog otpornosti na niske temperature može se uzgajati u područjima gdje se temperature spuštaju i ispod -35 °C (Ćujić i sur., 2018). Za uzgoj je idealno blago kiselo tlo, a sorte koje se najčešće uzgajaju su: Viking (Finska), Nero (Češka), Galicjanka (Poljska), Hugin (Švedska), Rubina (Rusija) i Aron (Danska) (Platonova i sur., 2021). Aronija se može uzgajati kao grm ili stablašica, pri čemu se najčešće uzgaja u obliku grma. Sastav i nutritivna vrijednost ploda ovisi o mnogim čimbenicima kao što su sorta, okolišni i klimatski uvjeti, zrelost ploda. Danas se aronija široko koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji prirodnih prehrambenih bojila, sokova, džemova, pirea, sirupa, vina, alkoholnih i energetskih pića, čajeva i aroma za široku paletu prehrambenih proizvoda (Jia i sur., 2022).

2.1.1 Kemijski sastav aronije

Aroniju nazivaju super voćem jer ima visoku nutritivnu, a nisku kalorijsku vrijednost. Sadrži mnoge spojeve koji su važni za zdravlje organizma poput pektina, bioaktivnih fenolnih spojeva (flavonoida, antocijana, tanina i fenolnih kiselina), a bogata je i vitaminima kao što su: vitamin A (0,77 mg/100 g), vitamin B₂ (0,016 - 0,027 mg/100 g), vitamin B₃ (0,27 - 0,34 mg/100 g), vitamin B₆ (0,024 - 0,029 mg/100 g), vitamin C (31 mg/100 g) (Shi i sur., 2024). Od makroelemenata najzastupljeniji su natrij (12,5 - 16,8 mg/100 g), magnezij (83,3 - 314,2 mg/100 g), kalcij (119,0 - 552,3 mg/100 g), fosfor (257,0 - 417,5 mg/100 g) i kalij (1356,3 - 3659,7 mg/100 g) (Šnebergrova i sur., 2014).

Plodovi dozrijevaju tijekom mjeseca kolovoza, a na grmu se mogu zadržati i do 2 mjeseca. Opasnost od kasne berbe predstavljaju ptice koje konzumiraju bobice čime smanjuju urod i oštećuju plodove. Osim slatkoće, zreli plodovi aronije posjeduju i određenu razinu trpkosti zbog prisustva tanina, zbog čega nisu toliko popularni za jelo kao svježije voće. Oporost ovog voća rezultat je visoke količine sekundarnih metabolita, fenola, koji se smatraju korisnim za ljudsko zdravlje, a koji su pronađeni u visokim koncentracijama u pojedinim dijelovima biljke, posebno u plodovima, sjemenkama i listovima (Medvedova i sur., 2023). Na slici 1 su prikazane bioaktivne komponente aronije (Shi i sur., 2024).



Slika 1. Bioaktivne komponente aronije (prema Shi i sur., 2024).

Nakon prerade aronije, zaostaju visoko vrijedni nusproizvodi koji se dalje mogu koristiti na različite načine te omogućuju iskorištavanje otpadnog materijala aronije na održiv način, doprinoseći smanjenju otpada i izvlačenju dodatne vrijednosti iz ovog voća. Nusproizvod kao što je komina je izvrstan izvor bioaktivnih sastojaka u usporedbi s bobicama. Prema istraživanju Mayer-Miebach i sur. (2012) koncentracija polimernih proantocijana, glavne klase fenolnih spojeva u aroniji, je u soku aronije iznosila oko 1578,79 mg/100 g suhe tvari, a u

komini je iznosila oko 8191,58 mg/100 g suhe tvari. Glavne klase fenolnih spojeva u aroniji su: proantocijani, oligomerni katehini i epikatehini i polimerni katehini i epikatehini (Medvedova i sur., 2023).

Listovi su nusproizvod prerade aronije te predstavljaju važan izvor bioaktivnih spojeva koji potječu od fenolnih spojeva poput flavonoida te pigmenta poput klorofila (Do Thi i Hwang, 2014). Pokazalo se kako datum berbe utječe na sadržaj sekundarnih metabolita u listovima aronije. Listovi koji se prikupljaju u srpnju sadrže veću koncentraciju fenolnih spojeva (1191,8 mg/100 g suhe tvari) u odnosu na listove koji se beru u rujnu (772,1 mg/100 g suhe tvari) (Do Thi i Hwang, 2014). Prema istraživanju Cvetanović i sur. (2018) ekstrakt lista aronije sadrži 10 puta veću koncentraciju ukupnih fenola (131,53 mg galne kiseline/g) i flavonoida (88,64 mg rutina/g) u odnosu na bobice (13,88 mg galne kiseline/g i 10,00 mg rutina/g).

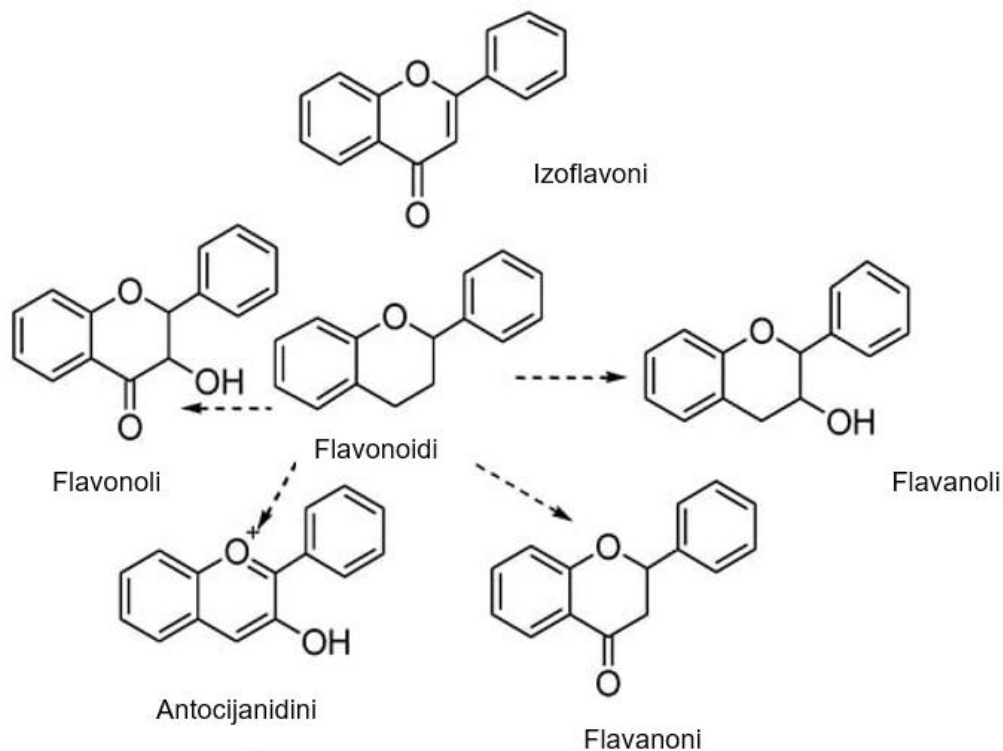
Osim fenola, u listovima su prisutni i karotenoidi i klorofili čiji sadržaj varira ovisno o vrsti, sorti, kultivaru, zrelosti, svjetlosti, tlu i temperaturi. Listovi aronije sadrže veći udio ukupnih karotenoida (9,88 mg/g suhe tvari) i klorofila (66,32 mg/g suhe tvari) u odnosu na lisnato povrće (cikorija, maslačak, rukola) kod kojih se ukupni sadržaj klorofila kreće u rasponu od 2,00 mg/g do 3,59 mg/g (Do Thi i Hwang, 2014). Od makroelemenata, listovi predstavljaju dobar izvor fosfora (1031,58 mg/kg), magnezija (827 mg/kg), natrija (18,2 mg/kg), kalcija (3,73 mg/kg) i kalija (760,32 mg/kg) (Cvetković i sur., 2018). Zbog visoke razine makroelemenata ekstrakt listova aronije može biti pogodan za nadoknadu dnevne potrebe za hranjivim tvarima te se zbog toga može koristiti kao prirodan dodatak prehrani. Najznačajniji mikroelementi su željezo (16,56 mg/kg), cink (11,64 mg/kg), mangan (6,44 mg/kg) i bakar (1,98 mg/kg) (Cvetković i sur., 2018). Geografsko podrijetlo biljke može utjecati na različitu bioraspodjelbu i koncentraciju minerala. Različita koncentracija minerala može biti posljedica razlika u botaničkoj građi biljaka, kao i sposobnosti biljaka da akumuliraju elemente iz okoline (Buksh i sur., 2007).

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju važnu fiziološku ulogu. Sadrže hidroksilnu skupinu izravno vezanu na aromatsku ugljikovodičnu skupinu benzenskog prstena. Možemo ih klasificirati u dvije glavne skupine: flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi sadrže dva aromatska prstena povezana heterocikličkim piranskim prstenom. Prema heterocikličkom prstenu možemo ih podijeliti u 6 podskupina: izoflavoni, flavanoli, flavoni, flavanoni, antocijanidini i flavonoli (Gan i sur., 2019) (slika 2).

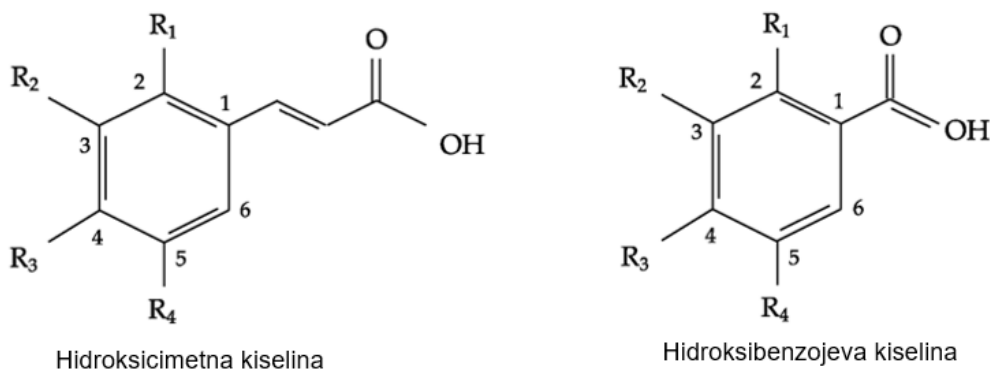
Ako se kategoriziraju prema obliku u kojem se pojavljuju, fenolni spojevi se uglavnom pojavljuju u topljivom ili vezanom obliku u biljnom carstvu. Najtopljiviji fenolni spojevi sintetiziraju se u intracelularnom endoplazmatskom retikulumu biljaka i pohranjuju se u

vakuolama. Fenolni spojevi koji se pojavljuju u vezanom obliku nastaju prijenosom topljivih fenolnih spojeva do stanične stijenke, nakon čega se konjugiraju s makromolekulama stanične stijenke kao što su celuloza i proteini pomoću esterske i glikozidne veze, čime doprinose stvaranju stanične stijenke (Agati i sur., 2012). Pojedini flavonoidi se razlikuju po broju, vrsti i položaju supstituenata u molekuli, koji određuju njihova kemijska i fizikalna svojstva te utječu na individualni metabolizam i biološku aktivnost svakog spoja. Imaju visoku sposobnost apsorpcije UV zračenja i na taj način štite od njegovih štetnih učinaka. Stabiliziraju reaktivne kisikove vrste te reguliraju aktivnost mnogih enzima koji su uključeni u reakcije njihovog nastajanja.



Slika 2. Strukturne formule flavonoida (prema Ullah i sur., 2020)

U skupinu neflavonoida spadaju fenolni spojevi vrlo raznolike kemijske strukture. Najvažnija skupina neflavonoida u voću i povrću su fenolne kiseline koje sadrže jednu fenilnu skupinu supstituiranu jednom karboksilnom skupinom i jednu ili više hidroksilnih skupina. Fenolne kiseline mogu se podijeliti na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline, a međusobno se razlikuju po duljini lanca koji sadrži karboksilnu skupinu (slika 3).



Slika 3. Strukturne formule neflavonoida (prema Gutierrez-Grijalva i sur., 2018)

Hidroksibenzojeve kiseline sadrže sedam atoma ugljika ($C_6 - C_1$), a hidroksicimetne sadrže devet atoma ugljika ($C_6 - C_3$). Bobičasto voće, orasi, čaj, cikorija i neki začini su dobar izvor tih spojeva. Hidroksibenzojeve kiseline se rijetko nalaze u slobodnom obliku, a obično se pojavljuju u glikoliziranom obliku, odnosno povezane na male organske kiseline (kininska, maleinska ili vinska) ili vezane na strukturne komponente biljnih stanica kao što su: celuloza, proteini ili lignin (de la Rosa i sur., 2019). Flavonoidi su kao skupina bioaktivniji i najzastupljeniji su fenolni spojevi u voću i povrću. Koncentracija fenolnih spojeva u biljkama ovisi o mnogim čimbenicima kao što su kultivar, način uzgoja, mjesto pojave, vremenske prilike, vrijeme berbe, metode ekstrakcije i analize.

Samonikle biljke obično sadrže veću koncentraciju sekundarnih metabolita, nego kultivirane vrste, a sadržaj fenolnih spojeva je obično veći u listovima nego u plodovima (Teleszko i Wojdyło, 2015). Prema istraživanju Szopa i sur. (2017) listovi aronije sadrže visok udio flavanola kao što su: kvercetin, kvercitrin, i rutin (62,1 – 367,0 mg/100 g suhe tvari), kao i klorogenske kiseline (724,2 mg/100 g suhe tvari), neoklorogenske kiseline (482,7 mg/100 g suhe tvari) i ružmarinske kiseline (154,7 mg/100 g suhe tvari). Pored velikog antioksidacijskog potencijala, plodovi i proizvodi od aronije, pružaju zaštitu od nastajanja kardiovaskularnih oboljenja, antikancerogeno, antitumorsko, antivirusno, antialergijsko, protuupalno i gastroprotektivno djelovanje (Jurendić i Ščetar, 2021).

2.2.1. Antioksidacijska svojstva fenola

Fenoli imaju strukturne značajke koje karakteriziraju njihov antioksidacijski kapacitet kao što je prisutnost supstituenata koji doniraju vodik i sposobnost da delokaliziraju nastali slobodni elektron zbog čega nastali radikal nema dovoljno energije za daljnje reakcije. Delokalizacija elektronskog naboja koji nastaje kao rezultat stvaranja kompleksa između

liganda i metala visokog ionskog potencijala dovodi do povećanja antioksidacijskih svojstava i do 10 puta (Speisky i sur., 2022).

Antioksidacijska svojstva flavonoida i drugih fenolnih spojeva iz prirodnih izvora se procjenjuju određivanjem njihove aktivnosti za uklanjanje radikala koji nastaju oksidacijom lipida ili drugog biološkog procesa. Antioksidacijska svojstva se povećavaju ukoliko se u njihovoj strukturi nalazi hidroksilna skupina, kateholni dio i 2,3 dvostruka veza u konjugaciji s keto skupinom (Speisky i sur., 2022). Ako su prisutne sve tri strukturne značajke može se očekivati postizanje maksimalnog potencijala uklanjanja radikala.

Shi i sur. (2023) su pokazali da cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-arabinozid, ekstrahirani iz aronije, imaju dobru sposobnost uklanjanja DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl-hydrate*) slobodnih radikala. Ekstrakt dobiven iz sjemenki aronije ima jači *in vitro* antioksidativni kapacitet u odnosu na ekstrakt sjemenki ploda nekog drugog bobičastog voća (Wang i sur., 2023). Ekstrakti listova aronije pokazuju veću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na ekstrakte listova kupine (Do Thi i Hwang, 2014).

Antioksidacijska svojstva fenola mogu se odrediti brzim i jednostavnim metoda kao što su DPPH, FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant power*) i ABTS (eng. *2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid*). Antioksidativni profil listova aronije varira tijekom sazrijevanja, a ukupni sadržaj fenola i flavonoidnih spojeva mladih listova aronije je približno dvostruko veći u odnosu na starije listove (Do Thi i Hwang, 2014). Na antioksidacijski kapacitet listova aronija pridonose derivati kafeoilkininske kiseline kao glavne komponente ekstrakta. Derivati kafeinske kiseline posjeduju snažno antioksidativno, antikancerogeno i antifungalno djelovanje.

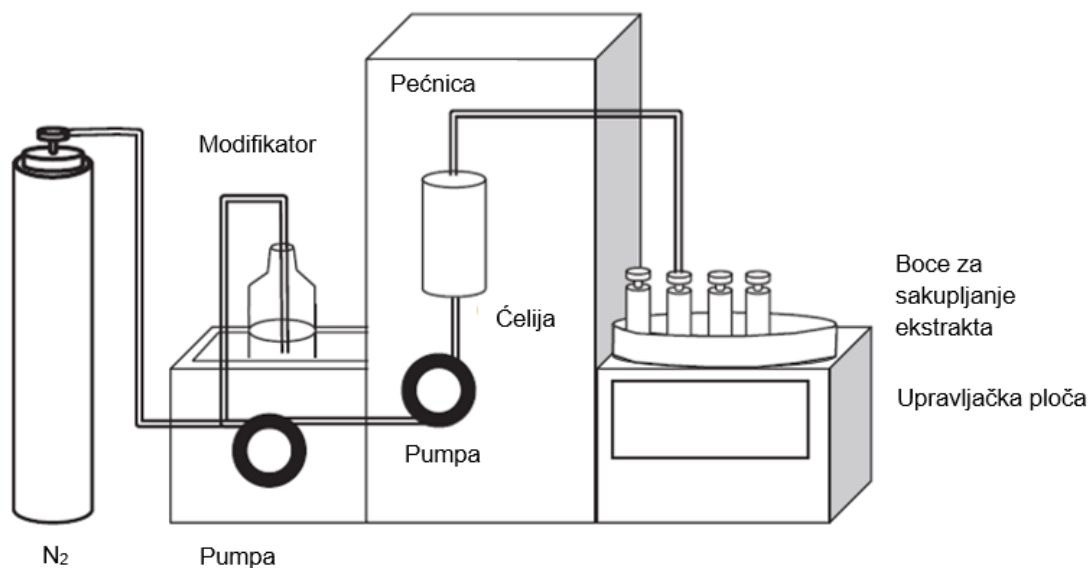
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Kako bi se visokovrijedni bioaktivni spojevi izolirali iz biljnog materijala, potrebno je provesti proces ekstrakcije. Ekstrakcija je separacijski proces kojim se provodi izolacija spojeva iz biljnog materijala ili matriksa na temelju različite topljivosti spojeva u otapalu kojim se provodi ekstrakcija. Predstavlja prvi korak u analizi biljnog materijala, a faktori koji utječu na ekstrakciju su: temperatura, veličina čestica, pH vrijednost, gibanje otapala, fizikalno-kemijska svojstva molekula. Primarni i sekundarni metaboliti se mogu ekstrahirati iz biljaka različitim tehnikama koje možemo podijeliti na konvencionalne i napredne (Lefebvre i sur., 2020). Konvencionalne tehnike uključuju: Soxhlet ekstrakciju, maceraciju, ekstrakciju tekuće - tekuće, ekstrakciju zagrijavanjem uz refluks i ekstrakciju čvrsto - tekuće. Ove tehnike karakterizira jednostavna izvedba, upotreba velike količine uzoraka i otapala, visoka temperatura koja može dovesti do degradacije termolabilnih komponenata, niska selektivnost, negativan utjecaj na

okoliš, visoki troškovi i dugo vrijeme ekstrakcije. Kako bi se prevladala ograničenja konvencionalnih tehnika došlo je do razvoja naprednih tehnika poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcije uz upotrebu superkritičnih tekućina, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrakcije potpomognute enzimima. Za razliku od konvencionalnih tehnika, napredne tehnike karakterizira upotreba manje količine otapala, veća učinkovitost ekstrakcije i iskorištenja, kraće vrijeme ekstrakcije, smanjenje troškova i negativnog utjecaja na okoliš (Osorio-Tobon, 2020).

2.3.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalom (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE ili *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) je ekstrakcijska tehnika kod koje se koriste povišene temperature (obično između 50 i 200 °C) i tlakovi (između 10 i 15 MPa) u zatvorenim posudama koji omogućavaju da se ekstrakcija završi u kratkom vremenskom periodu (< 20 min) i s malom količinom otapala (< 50 mL). Shematski prikaz sustava ASE prikazan je na slici 4. Instrument se sastoji od spremnika otapala, pumpe, pećnice koja sadrži ekstrakcijske ćelije, različitih ventila i restriktora, boce dušika te staklenih bočica za sakupljanje ekstrakta. Spremnik otapala spojen je s visokotlačnom pumpom koja uvodi otapalo u sustav i pomaže ispustiti ekstrakt nakon što je proces završen. Proces ekstrakcije odvija se unutar ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika u koju se stavlja uzorak pomiješan sa nekim inertnim materijalom kako bi se izbjeglo nakupljanje čestica uzorka koje utječe na učinkovitost ekstrakcije. Kao inertni materijal obično se koristi dijatomejska zemlja, bazična glinica, natrijev sulfat i kvarcni pijesak. Zatim se ekstrakcijske ćelije automatski stavljaju u pećnicu. Različiti ventili i restriktori neophodni su za kontrolu tlaka ekstrakcije. Staklene bočice za sakupljanje ekstrakta se postavljaju na kraj sustava za ekstrakciju (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Na kraju ekstrakcije uzorak se ispere sa određenim volumenom svježeg otapala, a zatim se cijeli sustav čisti sa dušikom kako bi se uklonili ostaci uzorka iz ASE sustava (Tena, 2019).



Slika 4. Shematski prikaz sustava ASE (prema De la Guardia i Armenta, 2011)

Upotrebom selektivnih otapala uz povišenu temperaturu i tlakove postižu se bolji učinci u usporedbi s ekstrakcijama koje se provode na sobnoj temperaturi i atmosferskim tlakovima zbog efekta topljivosti, prijenosa mase i poremećaja površinske ravnoteže. Visoke temperature pospješuju desorpciju fenolnih spojeva iz matriksa u otapalo jer se smanjuju međumolekularne interakcije (Van der Waalsove sile, vodikove veze) koje vežu fenolne spojeve na matriks (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Toplinska energija može prevladati kohezivne i adhezivne interakcije smanjenjem energije aktivacije potrebne za proces desorpcije. Uvođenjem svježeg otapala dolazi do povećanja koncentracijskog gradijenta između otopine prisutne u stanici i na površini matriksa uzorka. Što je koncentracijski gradijent veći to je brži prijenos mase prema I. Fickovom zakonu difuzije. Viša temperatura smanjuje viskoznost otapala, čime se postiže bolje prodiranje u čestice matriksa i poboljšanje ekstrakcije (Saini i Keum, 2018). Osim smanjenja viskoznosti, povećana temperatura će smanjiti površinsku napetost otopljenog tvari. Obe promjene će omogućiti bolji kontakt fenolnih spojeva sa otapalom i pojačati ekstrakciju. Upotreba visokih temperatura mora se pažljivo procijeniti kada su ciljni spojevi termolabilni jer tijekom procesa ekstrakcije može doći do degradacije analita (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Ekstrakcija se provodi pod tlakom radi održavanja otapala u tekućem stanju pri visokim temperaturama. Ako se vrši dovoljan pritisak na otapalo tijekom ekstrakcije, moguće je koristiti visoke temperature iznad točke vrelišta (Tena, 2019). Upotreba tlaka trebala bi olakšati ekstrakciju iz uzoraka u kojima su analiti prisutni u porama matriksa. Tlak tjera otapalo u područje matriksa koja ne bi dolazila u kontakt s otapalima pri korištenju atmosferskih uvjeta. Upotrebom povišenih tlakova i temperature, dolazi do smanjenja viskoznosti i površinske napetosti otapala zbog čega otapalo učinkovitije prodire u pore matriksa i olakšava ekstrakciju

fenolnih spojeva koji se nalazi u unutarnjim porama matriksa (Saini i Keum, 2018).

Postupak ekstrakcije može se provesti pri statičkom ili dinamičkom načinu rada. Kod statičkog načina temperatura i vrijeme su kritični parametri ekstrakcije, a učinkovitost ovisi o topljivosti fenolnih spojeva u statičkom procesu. Statički proces započinje zagrijavanjem ekstrakcijske ćelije s uzorkom do određene temperature, nakon čega slijedi postupak statičke ekstrakcije. Tijekom ovog postupka fenolni spojevi se izoliraju iz uzorka u stabilnim statičkim uvjetima. Dugotrajno izlaganje uzorka otapalu omogućuje bubrenje matriksa i poboljšava prodiranje otapala u međuprostore uzorka i kontakt otapala s analitima. Visoko koncentrirani uzorci ili slabo topljivi analiti mogu dovesti do nepotpune ekstrakcije zbog korištenja ograničenog volumena otapala. Kako bi se to izbjeglo primjenjuje se rad u ciklusima, a svakim novim ciklusom se uvodi svježe otapalo pri čemu se proces ekstrakcije nastavlja. Na taj način se omogućava maksimalna ekstrakcija ciljne komponente. Važan parametar koji treba uzeti u obzir je omjer otapala i uzorka koji bi trebao biti što je moguće manji kako bi se izbjeglo razrjeđivanje ekstrakta, ali u isto vrijeme dovoljno velik kako bi se osigurao najveći mogući prinos ekstrakcije. Kod dinamičkog načina rada svježe otapalo se kontinuirano uvodi u ekstrakcijsku ćeliju, pri čemu je ovaj način rada teoretski povoljniji za potpunu ekstrakciju matriksa (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Matriks se može obraditi prije ekstrakcije sušenjem i usitnjavanjem s ciljem smanjenja veličine čestica. Čvrsti uzorci obično se moraju samljeti, usitniti i homogenizirati. Veličina čestica utječe na prijenos mase zbog čega ju je potrebno optimizirati kako bi se povećala kontaktna površina. Veća površina po jedinici mase rezultira boljom dostupnošću otapala fenolnim spojevima, a brzina migracije fenolnih spojeva kroz pore matriksa povećava se smanjenjem veličine čestica. Mehaničkom obradom se razbija stanična stijenka i struktura stanica što dovodi do povećanja difuzije fenolnih spojeva. Međutim, veličina čestica treba biti dovoljno velika kako bi se izbjegla aglomeracija čestica (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Fizikalno-kemijska svojstava kao što su vrelište, polaritet, specifična gustoća, toksičnost potrebno je uzeti u obzir pri odabiru otapala za ekstrakciju. ASE se može provesti sa širokim rasponom otapala osim jakih baza i kiselina kao i otapala koja su samozapaljiva pri temperaturama od 40 do 200 °C. Otapala kao što su metanol, voda, toluen, diklormetan, etil-acetat i acetonitril su korišteni za ASE tehniku za pripremu uzoraka hrane i stočne hrane (Sun i sur., 2012). Uzorci hrane se razlikuju po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima, vrsti prisutnih spojeva ili granulaciji. Ovi parametri utječu na sorpciju i retenciju analita. Složenost analitičkog procesa raste sa povećanjem broja organskih spojeva prisutnih u uzorku. Na učinkovitost ekstrakcije može utjecati prisutnost vode u uzorku, pa se preporučuje uzorke liofilizirati ili dodati sredstva za sušenje prije ekstrakcije (Tena, 2019). Najčešće korištena otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva su metanol, etanol i njihova kombinacija s vodom u različitim

omjerima. Važno je sistematski odabrati kombinaciju otapala jer je pokazano da odgovarajući izbor otapala može utjecati na prinos ekstrakcije fenolnih spojeva.

Prednosti primjene ubrzane ekstrakcije otapalom su upotreba znatno manje količine otapala u usporedbi sa konvencionalnim tehnikama, kreće vrijeme ekstrakcije, zahtijeva manje radne snage, brza je i jednostavna priprema uzorka, daje mogućnost provođenja ekstrakcije u ciklusima, moguće je koristiti pojedinačna otapala ili smjesu otapala, veća je reproducibilnost metode, a visoki tlakovi koji se koriste tijekom ekstrakcije omogućuju ekstrakciju termolabilnih komponenata i pri visokim temperaturama procesa (Alvarez-Rivera i sur., 2019). Nedostaci su visoka cijena opreme, uzorke je potrebno pročitati prije same analize zbog osjetljivosti i razlučivosti kromatografske analize koja se znatno pogorša ukoliko uzorci nisu pročišćeni, tlak i temperatura utječu na selektivnost ekstrakcije (Alvarez-Rivera i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak lista aronije

Kao materijal korišten je list aronije ubran u kolovozu 2023. godine sa područja Koprivničko-križevačke županije. Nakon branja, uzorci su prirodno osušeni na zraku pri čemu je suha tvar osušenog lišća iznosila 90,15 %. Neposredno prije ekstrakcije, uzorci suhog lišća aronije su usitnjeni pomoću električnog mlinca (slika 5).



Slika 5. Osušeni list aronije (vlastita fotografija, 2024)

3.1.2. Laboratorijski uređaji i pribor

- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska)
- Analizator vlage (Ohaus MB25, Parsippany, New Jersey)
- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Staklene boce za prikupljanje ekstrakta (Thermo Scientific, 250 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- Staklene kivete
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Vodena kupelj
- Mikropipete Eppendorf (100 i 1000 μ L, 5 mL)
- Pipete
- Propipeta
- Plastične ladice za vaganje
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapić
- Odmjerne tikvice
- Staklene čaše, volumena 50 mL
- Plastične falcon epruvete, volumena 50 mL
- Filter papir
- špatula
- Menzura

3.1.3. Kemikalije i standardi

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)
- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Etanol, 30 %-tni

Priprema: s obzirom na potrebni volumen 30 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a odmjerne tikvice 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 se ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjerne tikvici od 1000 mL i filtrira nakon 24 h.

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

Priprema: odvažuje 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 nadopuni do oznake destiliranom vodom.

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

Priprema: odvažuje se 0,0501 g Trolox-a i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koju nadopunimo do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Njemačka)
- Klorovodična kiselina, 40 mmol/L

Priprema: otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, c (TPTZ) = 10 mmol/L

Priprema: odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL koja se nadopuni do oznake 40 mmol/L klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Otopina željezo (III)-klorid heksahidrata, c ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) = 20 mmol/L

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

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Njemačka)
- Natrijev-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer, 0,3 mmol/L, pH 3,6

Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetata trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno

se prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L. Zatim se u odmjernu tikvicu 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
- Otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal, c (DPPH) = 0,2 mmol/L

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

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

Priprema: 500 mg Trolox-a se odvažuje u plastičnoj lađici za vaganje te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi se u 100 %-tnom metanolu. Odmjerna tikvica se nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Otopinu je potrebno čuvati na tamnom, stoga se tikvica zamota u aluminijsku foliju i koristi se uvijek svježije pripremljena otopina standarda.

- Otopina kalijeva persulfata, c ($K_2S_2O_8$) = 140 mmol/L

Priprema: 0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvažuje se u tikvicu volumena 5 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- 7 mmol/L ABTS otopina

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

- Stabilna ABTS• + otopina

Priprema: 88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine prenese se u odmjernu tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina i dobro se promiješa. Odmjerna tikvica se zatvori, zamota u aluminijsku foliju i tako se čuva pri sobnoj temperaturi u mraku 12-16 h. Konačna koncentracija $K_2S_2O_8$ je 2,45 mmol/L.

- 1 %-tna otopina ABTS• +

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

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje suhe tvari

Suha tvar lista aronije je određena pomoću analizatora vlage. Oko 2 g usitnjenog uzorka postavlja se na pliticu analizatora, pri čemu se uzorak pravilno rasporedi po cijeloj površini plitice. Analizator vlage koristi infracrveno zračenje te proizvodi toplinu koja se prenosi na uzorak, uzrokujući isparavanje vlage. Izmjerena vrijednost suhe tvari lista aronije iznosi 90,15 %.

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista aronije primjenom ASE

Fenolni spojevi su ekstrahirani iz lista aronije primjenom ASE uz korištenje 30 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1.

Tablica 1. Plan eksperimenta

Uzorak	Temperatura (°C)	Statičko vrijeme (min)	Omjer otapala i biljnog materijala (mL/g)
1	100	5	20
2	100	5	30
3	100	5	40
4	100	10	20
5	100	10	30
6	100	10	40
7	125	5	20
8	125	5	30
9	125	5	40
10	125	10	20
11	125	10	30

Tablica 1. Plan eksperimenta (nastavak)

Uzorak	Temperatura (°C)	Statičko vrijeme (min)	Omjer otapala i biljnog materijala (mL/g)
12	125	10	40
13	150	5	20
14	150	5	30
15	150	5	40
16	150	10	20
17	150	10	30
18	150	10	40

Korišteni ekstraktor je Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor (slika 6). Kako bi odredili uvjete ekstrakcije za postizanje najvećeg prinosa fenolnih spojeva optimirani su uvjeti ekstrakcije za temperaturu (100, 125 i 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) i omjer biljnog materijala i otapala (20, 30 i 40 mL/g).



Slika 6. Ekstaktor Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (vlastita fotografija, 2024)

Postupak ekstrakcije

U laboratorijskoj čaši na analitičkoj vagi se odvažuje 2,5; 1,67 i 1,25 g osušenog lista aronije te se doda oko 2 g dijatomejske zemlje, a zatim se sve zajedno promiješa. Odvagani uzorak zajedno sa dijatomejskom zemljom se prebaci u 34 mL ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika u koju smo prethodno na dno postavili 2 celulozna filtera. Nakon što dodamo još jedan sloj dijatomejske zemlje, postavimo jedan celulozni filter na vrh i čvrsto zatvorimo ekstrakcijsku ćeliju, koju stavljamo na brojem označeno mjesto u uređaju. Staklene boce za prikupljanje ekstrakta se postavljaju na označene pozicije u donjem dijelu uređaja. Prije pokretanja samog procesa ekstrakcije, postavljaju se željeni parametri vremena i temperature, te fiksni uvjeti: tlak od 10,34 MPa, 3 ekstrakcijska ciklusa, volumen ispiranja od 30 % i vrijeme propuhivanja dušikom od 30 s. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakti se profiltriraju pomoću filter papira u odmjerne tikvice od 50 mL i nadopune do oznake 30 %-tnom vodenom otopinom etanola. Tako pripremljeni ekstrakti, čuvaju se u plastičnim falcon epruvetama pri +4 °C do provođenja analiza.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

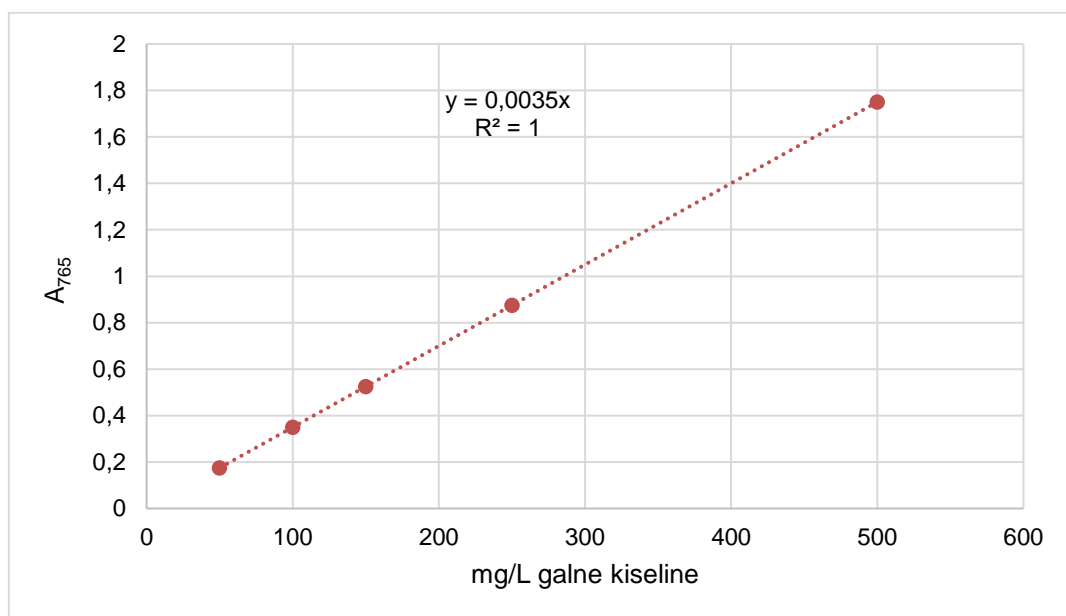
Metoda određivanja ukupnih fenola se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina. Oksidacijom fenolnih spojeva u lužnatim uvjetima, dolazi do redukcije fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline u wolframov oksid i molibdenov oksid koji daju plavo obojenje. Intenzitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Prisutnost većeg broja hidroksilnih ili oksidirajućih skupina fenolnih spojeva daje veći intenzitet plavog obojenja (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U epruvetu otpipetiramo redom 100 µL ekstrakta kojeg smo prethodno razrijedili ekstrakcijskim otapalom prema potrebi, 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i nakon 3 min 1 mL otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, ali umjesto ekstrakta uzima se 100 µL ekstrakcijskog otapala odnosno 30 %-tne vodene otopine etanola. Tako pripremljeni uzorci se promiješaju na Vortex miješalici i termostatiraju se u vodenoj kupelji 25 min pri 50 °C, a potom se na spektrofotometru mjeri apsorbanacija pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se galna kiselina koncentracije 5 mg/L koja se razrijedi destiliranom vodom u više razrjeđenja tako da konačne koncentracije u odmjernim tikvicama od 100 mL budu: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake odmjerne tikvice otpipetira se u staklenu epruvetu po 100 μ L otopine standarda galne kiseline, a zatim se redom doda 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i nakon 3 min 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. U slijepu probu se umjesto otopine standarda otpipetira 100 μ L destilirane vode. Tako pripremljeni uzorci se promiješaju na Vortex mješalici i termostatiraju u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C tijekom 25 min. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 765 nm, a iz izmjerenih vrijednosti se konstruira baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel. Koncentracije galne kiseline nanose se na apscisu koordinatnog sustava, a izmjerene vrijednosti apsorbancije pri $\lambda=765$ nm nanose se na ordinatu (slika 7).



Slika 7. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola

A – apsorbancija

Koncentracija ukupnih fenola računa se prema jednadžbi 1:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad [1]$$

pri čemu je:

Y – apsorbancija pri $\lambda=765$ nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Dobivene koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

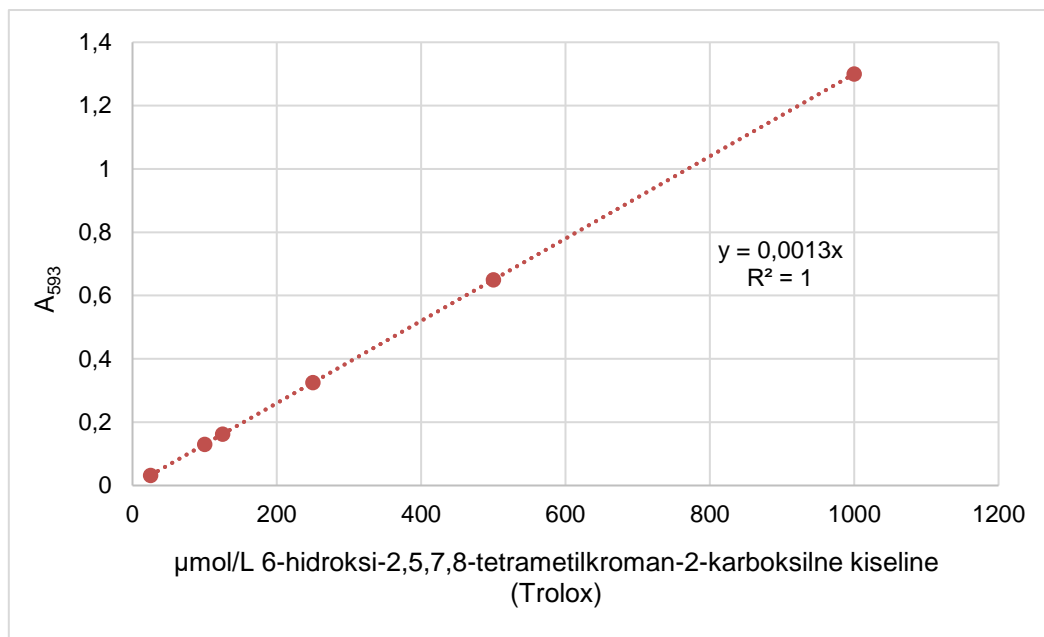
Ova metoda se zasniva na redukciji željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) koji je žuto obojeni kompleks u plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriiazina, čiji je apsorpcijski maksimum pri $\lambda=593$ nm (Shortle i sur., 2014). Tijekom reakcije antioksidansi doniraju elektrone slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima, pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidanasa. Dobiveni rezultati se najčešće izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Postupak određivanja:

Ekstrakte lista aronije potrebno je razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi. U staklenu epruvetu se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. U slijepu probu se umjesto uzorka otpipetira 80 μL ekstrakcijskog otapala. Tako pripremljeni uzorci se promiješaju na Vortex miješalici, a zatim se termostatiraju 5 min pri 37 °C, nakon čega se mjeri apsorpcija pri $\lambda=593$ nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) koncentracije 2 mmol/L koja se pripravi u odmjernoj tikvici od 100 mL otapanjem 0,0501 g Trolox-a u 96 %-tnom etanolu. Iz ishodne otopine se naprave razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se u tikvice otpipetira redom 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota ishodne otopine. Odmjerne tikvice se zatim nadopune 96 %-tnim etanolom do oznake, a koncentracije standardne otopine Trolox-a u tako pripremljenim otopinama iznose 25, 100, 125, 500 i 1000 $\mu\text{mol/L}$. U staklene epruvete se zatim otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine Trolox-a određene koncentracije i 2080 μL FRAP reagensa. U slijepu probu se umjesto otopine Trolox-a dodaje 80 μL 96 %-tnog etanola. Tako pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortex miješalice i termostatiraju se pri 37 °C, nakon čega se mjeri apsorpcija pri $\lambda=593$ nm. Pomoću programa Microsoft Excel konstruira se baždarni pravac tako da se izmjerene apsorbacije nanese na ordinatu koordinatnog sustava, a koncentracije otopine Trolox-a se nanese na apscisu (slika 8).



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom FRAP – eng. *Ferric Reducing Antioxidant power*; A - apsorbancija

Antioksidacijski kapacitet uzorka računa se prema jednadžbi 2:

$$Y = 0,0013 \cdot X \quad [2]$$

pri čemu je:

Y – apsorbancija pri $\lambda=593$ nm

X – ekvivalent Trolox-a (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol/TE g}$ s.tv. uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja:

Određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom se temelji na korištenju stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala koji zbog nesporenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra pri $\lambda=517$ nm i daje ljubičasto obojenje. Sparivanjem nesporenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa nastaje reducirani oblik DPPH-H koji daje žuto obojenje. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem

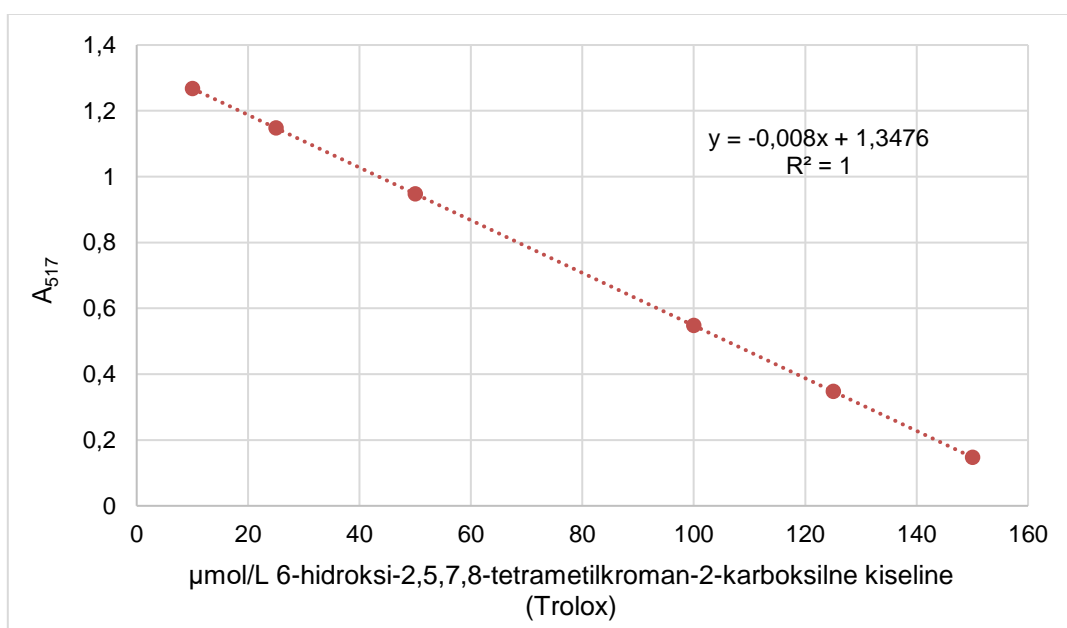
sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja:

Ekstrakte lista aronije je potrebno razrijediti ekstrakcijskim otapalom prema potrebi. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provodi se tako da se u staklenu epruvetu otpipetira 0,75 mL ekstrakta i 1,5 mL 0,2 mmol/L otopine DPPH. Slijepa proba sadrži 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Pripremljeni uzorci stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri $\lambda=517$ nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca korištena je 1 mmol/L otopina Trolox-a (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koja se pripravi u odmjerne tikvici od 100 mL otapanjem 0,025 g Trolox-a u metanolu. Iz tako pripremljene otopine naprave se razrjeđenja čije su koncentracije 10, 25, 50, 100, 125 i 150 μmol . U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Trolox-a i 1,5 mL 0,2 mmol/L otopine DPPH. Slijepa proba sadrži 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Pripremljeni uzorci stoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri $\lambda=517$ nm. Iz dobivenih vrijednosti pomoću programa Microsoft Excel konstruira se baždarni pravac tako da se na apscisi nanesu koncentracije Trolox-a ($\mu\text{mol/L}$), a na ordinati se nanesu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri $\lambda=517$ nm (slika 9).



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; A - apsorbancija

Antioksidacijski kapacitet uzorka računa se prema jednadžbi 3:

$$Y = -0,008 \cdot X + 1,3476 \quad [3]$$

pri čemu je:

Y – apsorbancija uzorka pri $\lambda=517$ nm

X – ekvivalent Trolox-a (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip određivanja:

Ova metoda se zasniva na mogućnosti molekula antioksidansa da reduciraju radikal kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+}). U prisutnosti antioksidanasa stabilni ABTS[•] + kation se reducira u ABTS, pri čemu dolazi do obezbojenja plavo-zelene otopine (Pellergini i sur., 2003). Vrijednosti koje su dobivene mjerenjem apsorbancije uzorka preračunavaju se primjenom baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE).

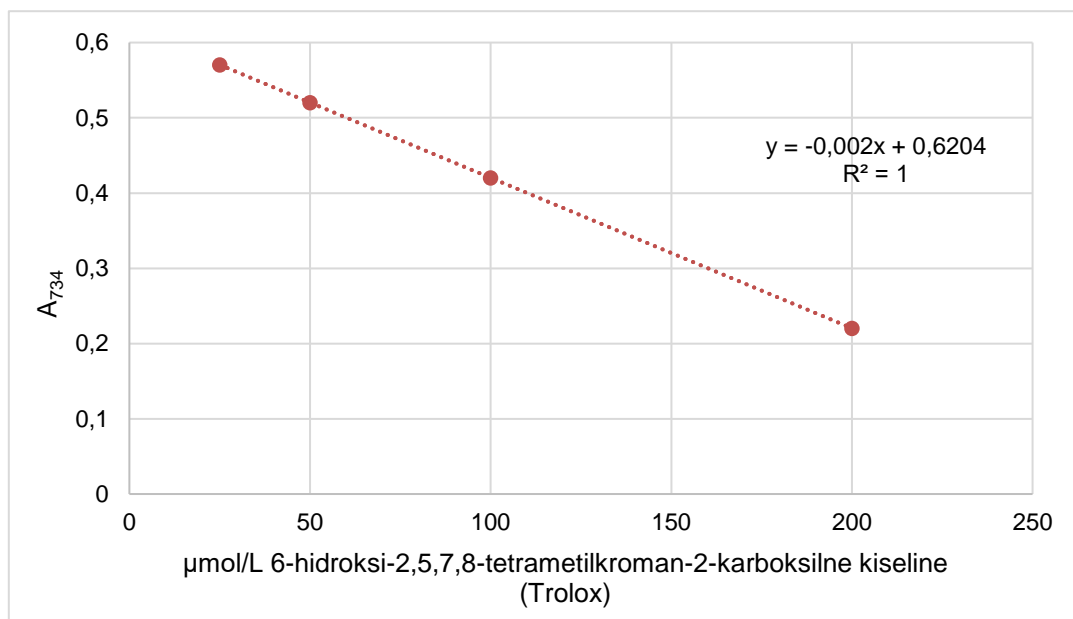
Postupak određivanja:

Ekstrakte lista aronije je potrebno razrijediti prema potrebi ekstrakcijskim otapalom. U epruvetu se otpipetira 160 μL uzorka i 2 mL 1 %-tnog ABTS[•] + te se nakon 1 min mjeri apsorbancije pri $\lambda=734$ nm. Kao slijepa proba koristi se 96 %-tni etanol.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca korištena je standardna otopina Trolox-a koncentracije 0,02 mol/L koja se pripravi tako da se 500 mg Trolox-a izvaže u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se nadopuni do oznake 100 %-tnim etanolom. Iz standardne otopine pripreme se razrjeđenja tako da se u odmjerne tikvice redom otpipetira 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL otopine standarda koje se zatim nadopune do oznake 100 %-tnim metanolom. Konačne koncentracije u odmjernim tikvicama iznose 25, 50, 100 i 200 $\mu\text{mol/L}$. U epruvetu se zatim otpipetira 160 μL otopine Trolox-a i 2 mL 1 %-tnog ABTS[•] + te se nakon 1 min mjeri apsorbancija pri $\lambda=734$ nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije konstruira se

baždarni pravac tako da se na apscisu koordinatnog sustava nanese koncentracije otopine Trolox-a, a na ordinatu se nanese izmjerene vrijednosti apsorbancije pri $\lambda = 734$ nm (slika 10).



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); A - apsorbancija

Antioksidacijski kapacitet uzorka računa se prema jednadžbi 4:

$$Y = -0,002 \cdot X + 0,6204 \quad [4]$$

pri čemu je:

Y – apsorbancija pri $\lambda=734$ nm

X – koncentracija Trolox otopine ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u $\mu\text{mol TE/g}$ s. tv. uzorka kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.7. Statistička analiza

Eksperimentalni dizajn pokusa i statistička obrada podataka provedeni su u programskom sustavu Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Kao zavisne varijable promatrani su ukupni fenoli te antioksidacijski kapaciteti određeni FRAP, DPPH te ABTS metodom, dok su nezavisne varijable bili temperatura, statičko vrijeme te omjer biljnog

materijala i otapala. Za statističku analizu primijenjena je multifaktorska analiza varijance (ANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedenom uz Tukey HSD test. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

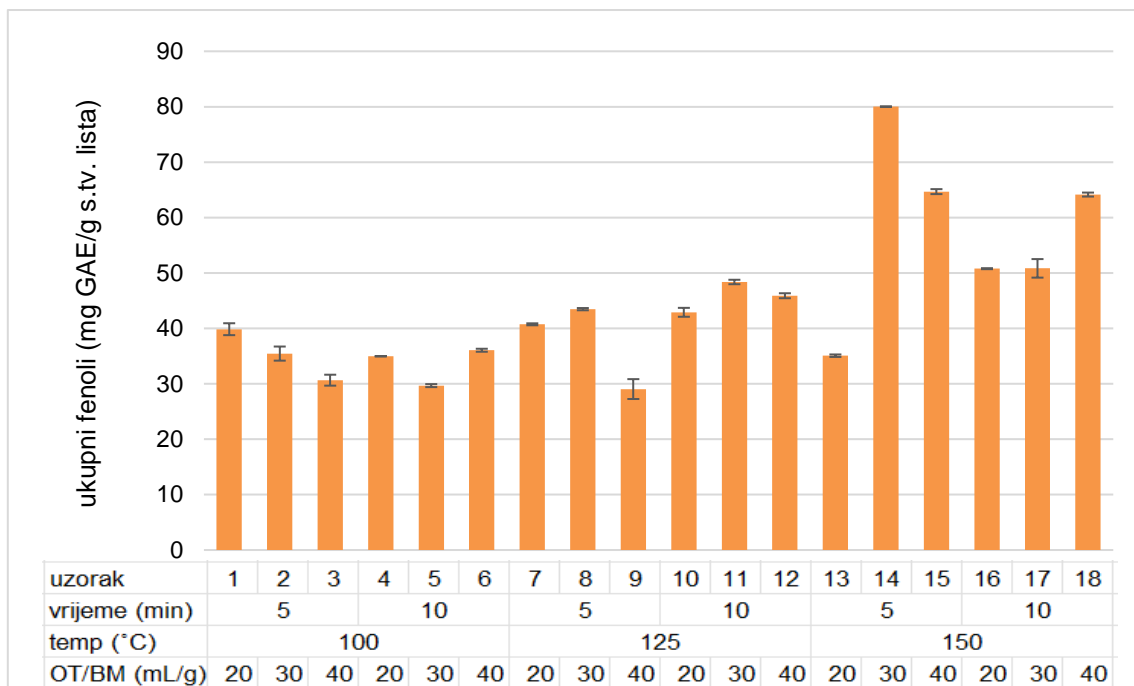
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju je provedena izolacija fenolnih spojeva iz osušenog lista aronije primjenom ASE uz primjenu 30 %-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala.

Uvjeti ekstrakcije su optimirani s ciljem postizanja najvećih prinosa fenolnih spojeva te najvećih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta pri čemu su varirani sljedeći parametri: temperatura (100, 125 i 150 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te omjer otapala i biljnog materijala (20, 30 i 40 mL/g). Dobiveni ekstrakti su korišteni za spektrofotometrijsko određivanje udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta FRAP, ABTS i DPPH metodama. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 11, 12, 13 i 14., statistički su obrađeni, a u tablici 2 prikazan je utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet.

4.1. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA

Maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima lista aronije nakon provedene ASE metode određeni su u rasponu od 29,05 do 80,02 mg GAE/g suhe tvari (slika 11). Najviši maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku 14 dobivenom pri temperaturi od 150 °C, statičkom vremenu od 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala od 30 mL/g, a najniži udio ukupnih fenola određen je u uzorku 9 koji je ekstrahiran pri temperaturi od 125 °C, statičkom vremenu od 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala od 40 mL/g. Više temperature uz isto statičko vrijeme utječu na bolji prijenos mase i učinkovitost ekstrakcije, dok veći omjer otapala i biljnog materijala ne pridonosi dodatnom prijenosu ciljnih fenolnih spojeva iz biljnog matriksa u otapalo.



Slika 11. Maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima lista aronije dobivenim primjenom ASE
ASE – ubrzana ekstrakcija otapalima; OT/BM – omjer otapala i biljnog materijala; GAE – galna kiselina

Prosječna vrijednost ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima lista aronije iznosila je 44,58 mg GAE/g suhe tvari (tablica 2). Nešto niže vrijednosti dobili su Owczarek i sur. (2022) koji su u svom istraživanju ekstrahirali fenolne spojeve iz lista aronije 70 %-tnim metanolom, a prosječna vrijednost ukupnih fenola je iznosila 32,8 mg GAE/g suhe tvari. U istraživanju koje su provodili Do Thi i Hwang (2014) korištena je konvencionalna ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista aronije te dvije vrste otapala, 80 %-tni etanol i destilirana voda. Prosječna vrijednost ukupnih fenola koji su ekstrahirani 80 %-tnim etanolom je iznosila $139,3 \pm 3,1$ mg GAE/g suhe tvari, dok je kod onih ekstrahiranih destiliranom vodom iznosila $69,5 \pm 2,7$ mg GAE/g suhe tvari. Viši maseni udio fenolnih spojeva u usporedbi s rezultatima ovog rada može biti posljedica različitog izbora ekstrakcijske tehnike, ekstrakcijskog otapala ili vremena berbe lišća.

Tablica 2. Utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet

Izvor varijacije	N	UKUPNI FENOLI (mg GAE/g s.tv. lista)	ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. lista)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. lista)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. lista)
Temperatura		$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$	$p = 0,24$
100	12	$34,44 \pm 1,05^a$	$345,95 \pm 11,25^a$	$277,09 \pm 11,64^a$	$623,56 \pm 30,94^a$
125	12	$41,73 \pm 1,87^{ab}$	$364,37 \pm 18,41^a$	$281,71 \pm 30,06^a$	$633,67 \pm 32,94^a$
150	12	$57,58 \pm 4,26^b$	$525,06 \pm 36,84^b$	$449,95 \pm 36,23^b$	$702,44 \pm 47,46^a$
Vrijeme (min)		$p = 0,31$	$p = 0,21$	$p = 0,11$	$p = 0,53$
5	18	$44,33 \pm 3,89^a$	$399,37 \pm 32,88^a$	$317,71 \pm 36,25^a$	$641,23 \pm 31,26^a$
10	18	$44,84 \pm 2,38^a$	$424,21 \pm 21,17^a$	$354,79 \pm 20,52^a$	$665,22 \pm 31,67^a$
Omjer otapalo:uzorak		$p = 0,67$	$p = 0,02^*$	$p = 0,72$	$p < 0,01^*$
20	12	$40,71 \pm 1,62^a$	$346,66 \pm 14,55^a$	$340,08 \pm 25,03^a$	$503,51 \pm 7,42^a$
30	12	$47,97 \pm 4,85^a$	$465,49 \pm 40,72^b$	$362,73 \pm 42,81^a$	$669,79 \pm 20,42^b$
40	12	$45,08 \pm 4,43^a$	$423,23 \pm 32,53^b$	$305,94 \pm 38,83^a$	$786,38 \pm 21,99^b$
Prosječna vrijednost	36	44,58	411,79	336,25	653,22

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednosti \pm standardna pogreška. Vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,05$.

GAE – galna kiselina; TE – Trolox; ASE – ubrzana ekstrakcija otapalima; DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); FRAP - eng. *Ferric Reducing Antioxidant power*

Elez Garofulić i sur. (2024) su u svom istraživanju koristili ASE kako bi ekstrahirali fenolne spojeve iz listova crnog ribiza i borovnice uz primjenu 30 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Uzorke su ekstrahirali tijekom 5 i 10 min pri 100, 125 i 150 °C, dok su omjeri otapala i biljnog materijala iznosili 20, 30 i 40 mL/g. Udio ukupnih fenola u listovima crnog ribiza određen je u rasponu od 42,92 do 78,90 mg GAE/g suhe tvari, a u ekstraktima borovnice se kretao u rasponu od 33,74 do 70,55 mg GAE/g suhe tvari što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

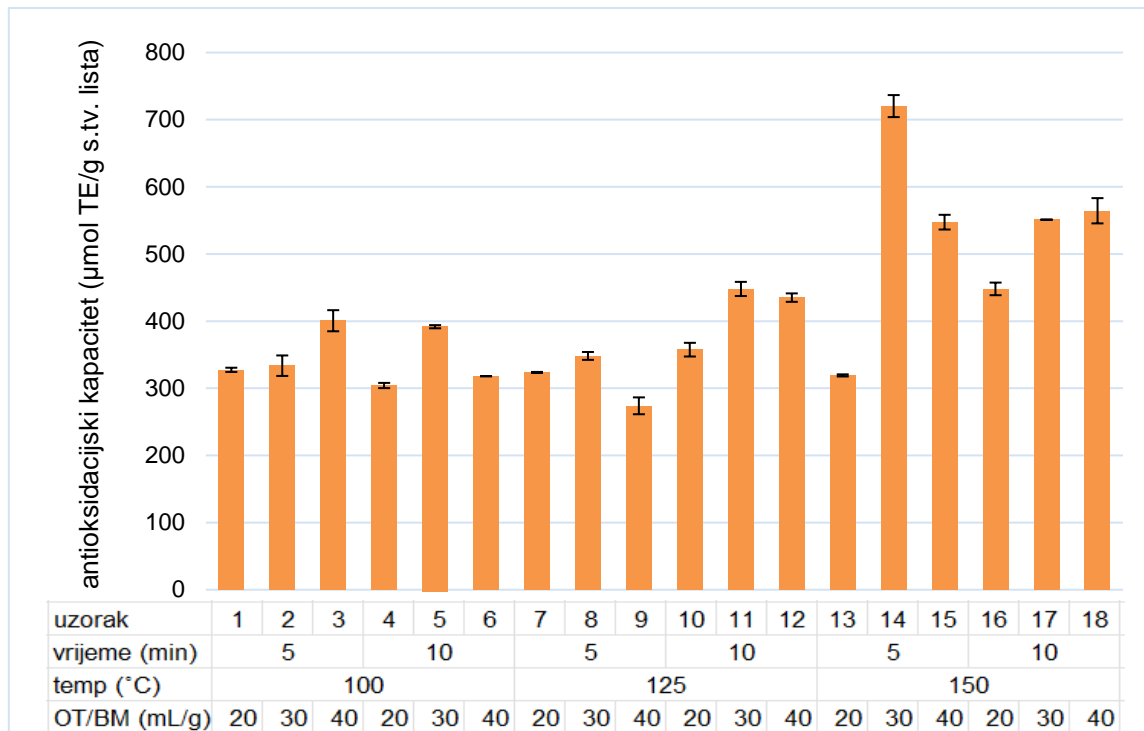
Kod prvih 6 uzoraka osušenih listova aronije temperatura ekstrakcije je iznosila 100 °C,

a prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola je iznosila $34,44 \pm 1,05$ mg GAE/g suhe tvari. U uzorcima koji su ekstrahirani pri $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ prosječna vrijednost ukupnih fenola je iznosila $41,73 \pm 1,87$ mg GAE/g suhe tvari. Najviša prosječna vrijednost ukupnih fenola je dobivena primjenom temperature $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ i iznosila je $57,58 \pm 4,26$ mg GAE/g suhe tvari. Slijedom navedenog te prema statističkoj analizi, temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim iz osušenih listova aronije. Povećanje temperature pridonijelo je povećanju prinosa ukupnih fenola na način da regulira desorpciju analita u ekstrakcijskom otapalu, a najviša vrijednost je postignuta pri temperaturi od $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Povećanjem temperature smanjuje se viskoznost korištenog otapala čime se postiže bolje vlaženje matriksa biljnog materijala te bolja topljivost analita u otapalu (Perez-Vazques i sur., 2023). Shang i sur. (2014) su ekstrahirali fenolne spojeve iz osušenih listova crnog bambusa primjenom ASE, pri 4 i $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Povišenjem temperature koncentracija ukupnih fenola se povećala 300 %, odnosno sa $775 \pm 1,2$ na $2682 \pm 0,9$ mg GAE/100 g osušenih listova. Do istog zaključka došli su i Medvedova i sur. (2023) koji su u svom istraživanju ekstrahirali bioaktivne spojeve iz plodova aronije pri 40 i $140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najviša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva je dobivena pri $140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Iz rezultata je vidljivo kako vrijeme te omjer otapala i biljnog materijala nemaju statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u ekstraktima listova aronije. Razlog tome može biti zasićenje otapala i postizanje ekstrakcijske ravnoteže (Elez Garofulić i sur., 2024) te primjena višestrukih ciklusa ekstrakcije i dovoda svježeg otapala u svakom ciklusu čime se smanjio učinak zasićenja otapala ciljnim spojevima (Santos i sur., 2021).

4.2. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima listova aronije nakon provedene ubrzane ekstrakcije otapalima određen je ABTS metodom u rasponu od 273,90 do 720,27 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista s prosječnom vrijednošću od 411,79 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista (slika 12). Najniži antioksidacijski kapacitet je određen u uzorku 9 koji je ekstrahiran pri $125\text{ }^{\circ}\text{C}$, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala od 40 mL/g. Najviša vrijednost je određena u uzorku 14 koji je ekstrahiran pri $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, vremenu ekstrakcije 5 min te omjeru otapala i biljnog materijala od 30 mL/g.



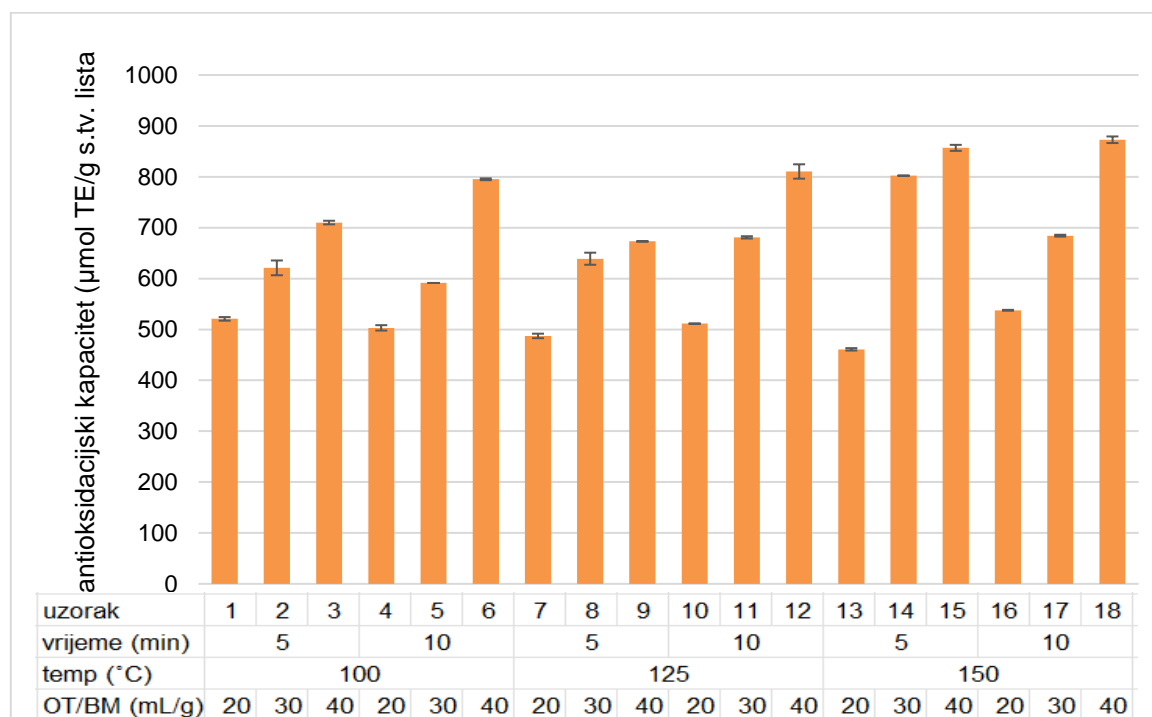
Slika 12. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista aronije određen ABTS metodom ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); OT/BM – omjer otapala i biljnog materijala; TE - Trolox

Teleszko i Wojdylo (2015) su proveli istraživanje u kojem su usporedili fenolne spojeve i antioksidacijski kapacitet plodova i listova nekoliko odabranih biljaka. Ekstrakte su pripremili stavljanjem zamrznutog lišća u smjesu metanola HPLC čistoće, askorbinske kiseline i octene kiseline, nakon čega su ekstrakti tretirani ultrazvukom tijekom 15 min i centrifugirani tijekom 10 min pri 4 °C. Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta listova aronije određena ABTS metodom je iznosila $50,01 \pm 0,00$ mmol TE/100 g suhe tvari što su nešto veće vrijednosti u odnosu na rezultate ovog rada. Owczarek i sur. (2022) su u svom istraživanju dobili nešto nižu prosječnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta koja je iznosila $1,02 \pm 0,04$ mmol TE/g ekstrakta. Razlog može biti primjena konvencionalne ekstrakcije te različit izbor otapala.

Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta uzoraka koji su ekstrahirani pri 100 °C je iznosila $345,95 \pm 11,25$ µmol TE/g suhe tvari lista. Kod uzoraka kod kojih je ekstrakcija provedena pri 125 °C, prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta je iznosila $364,37 \pm 18,41$ µmol TE/g suhe tvari lista. Najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta je iznosila $525,06 \pm 36,84$ µmol TE/g suhe tvari lista, a određena je u uzorcima koji su ekstrahirani pri 150 °C.

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima listova aronije određen je DPPH metodom u rasponu od 460,91 do 872,80 µmol TE/g suhe tvari lista, s prosječnom vrijednošću od 653,22

μmol TE/g suhe tvari lista (slika 13). Najniži antioksidacijski kapacitet je određen u uzorku 13 koji je ekstrahiran pri 150 °C, vremenu ekstrakcije 5 min, dok je omjer otapala i biljnog materijala iznosio 20 mL/g. Najviša vrijednost određena je u uzorku 18 čija je vrijednost ukupnih fenola iznosila 64,15 mg/g suhe tvari lista, a koji je ekstrahiran pri 150 °C, vremenu ekstrakcije 10 min te omjeru otapala i biljnog materijala od 40 mL/g.

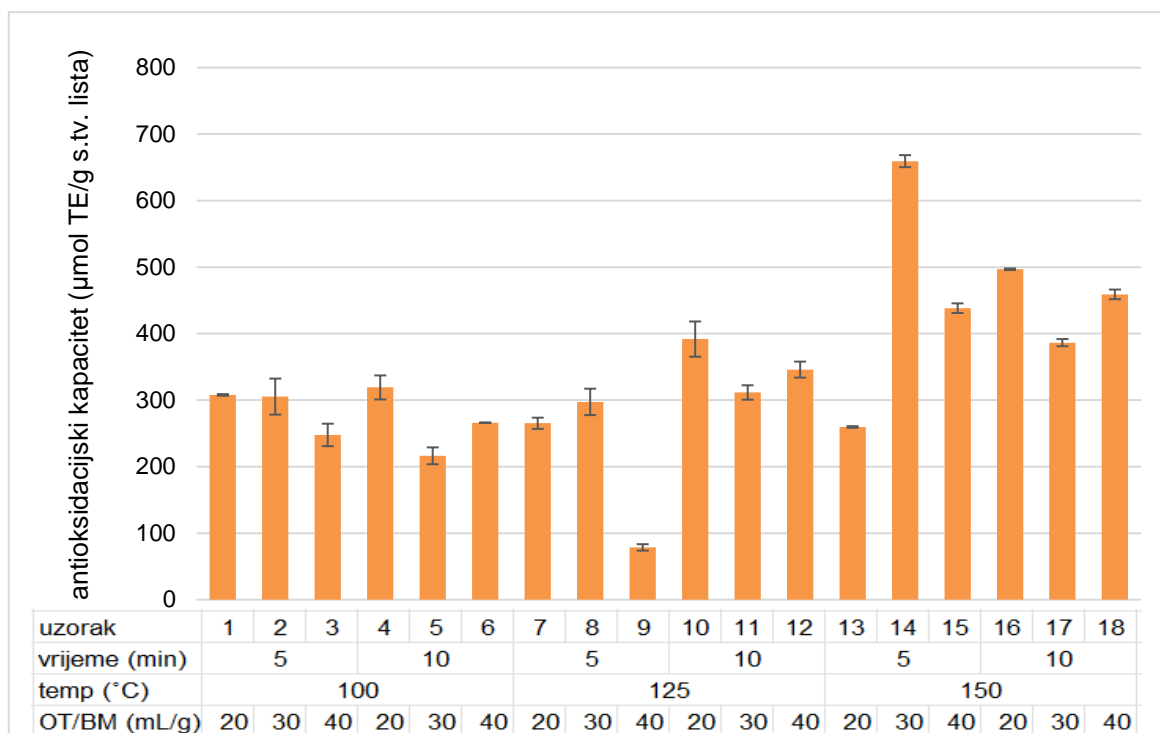


Slika 13. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista aronije određen DPPH metodom DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; OT/BM – omjer otapala i biljnog materijala; TE - Trolox

Cvetković i suradnici (2018) su ekstrahirali fenolne spojeve iz lista aronije primjenom maceracije uz korištenje 30, 50 i 75 %-tnog etanola. Optimirali su omjer otapala i biljnog materijala (0,10, 0,15 i 0,20 mL/g) te vrijeme ekstrakcije (30, 60 i 90 min). Rezultati antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta koji je ekstrahiran 30 %-tnim etanolom su određeni u rasponu od $67,26 \pm 0,42$ do $76,11 \pm 0,02$ μg/mL. Razlog nižih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta koje su dobili Cvetković i suradnici u svom istraživanju u odnosu na rezultate ovog rada može biti primjena konvencionalne ekstrakcije i različit omjer otapala i biljnog materijala. U istraživanju koje su proveli Elez Garofulić i suradnici (2024) prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta lista borovnice je iznosila $495,98 \pm 0,90$ μmol TE/g suhe tvari lista, što je nešto niža vrijednost u odnosu na rezultate dobivene u ovom istraživanju.

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima listova aronije određen je FRAP metodom u rasponu od 78,54 do 659,41 μmol TE/g suhe tvari lista, s prosječnom vrijednosti od 336,25 μmol TE/g suhe tvari lista. Najniža vrijednost određena je u uzorku 9 koji je ekstrahiran pri

temperaturi od 125 °C, vremenu ekstrakcije od 5 minuta i omjeru otapala i biljnog materijala od 40 mL/g, a najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u uzorku 14 kod kojeg je određena i najviša vrijednost fenolnih spojeva (80,02 mg GAE/g suhe tvari), a ekstrahiran je pri temperaturi od 150 °C, vremenu ekstrakcije od 5 minuta i omjeru otapala i biljnog materijala od 30 mL/g.



Slika 14. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista aronije određen FRAP metodom FRAP – eng. *Ferric Reducing Antioxidant power*; OT/BM – omjer otapala i biljnog materijala; TE - Trolox

Teleszko i Wojdylo (2015) su u svom istraživanju dobili nešto višu prosječnu vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta koja je iznosila $40,55 \pm 0,00$ mmol TE/100 g suhe tvari.

Najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene su DPPH metodom, a najniže FRAP metodom. Razlog tomu je različit mehanizam reakcija pomoću kojih antioksidansi mogu neutralizirati djelovanje slobodnih radikala. Reakcijski mehanizam na kojem se zasniva DPPH metoda uključuje reakcije prijenosa atoma vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i prijenosa elektrona (eng. *Single Electron Transfer*, SET), dok se FRAP metoda zasniva samo na reakciji prijenosa elektrona. DPPH je topljiviji u organskim otapalima, kao što je vodena otopina etanola, što može dovesti do povećanja interakcije između DPPH radikala i antioksidanasa u uzorku što rezultira većim izmjerenim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta.

Prema rezultatima statističke analize (tablica 2) temperatura je imala statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na antioksidacijski kapacitet određen primjenom ABTS i FRAP

metode, dok na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom nije imala statistički značajan utjecaj ($p = 0,24$). Iz dobivenih rezultata je vidljivo kako ne postoji statistički značajna razlika u prosječnoj vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata dobivenih pri 100 i 125 °C. Također, prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata dobivenih pri 150 °C značajno je viša u odnosu na vrijednosti dobivene pri nižim temperaturama (tablica 2), što je u skladu s prosječnim vrijednostima koncentracije ukupnih fenola. Pereira i sur. (2019) su također dobili najvišu prosječnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenu primjenom FRAP metode pri najvišoj temperaturi ekstrakcije (85 °C), dok za prosječne vrijednosti dobivene pri nižim temperaturama ekstrakcije (40, 55 i 70 °C) nije postojala statistički značajna razlika. Neki autori su izvijestili kako ekstrakcija pri visokim temperaturama može pogodovati povećanju antioksidacijskog kapaciteta zbog stvaranja antioksidanasa kao produkata Maillardove reakcije (Vergara-Salinas, 2013). Brojna istraživanja su pokazala povezanost između visokog udjela bioaktivnih spojeva i visokog antioksidacijskog kapaciteta pri čemu se promjene u udjelu bioaktivnih spojeva odražavaju i na promjene antioksidacijskog kapaciteta (Bebek-Markovinović i sur., 2023).

Statističko vrijeme kao parametar ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj na prosječne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene primjenom ABTS, DPPH i FRAP metoda, stoga je bolje koristiti kraće vrijeme zbog uštede energije te kako bi se spriječila moguća oksidacija bioaktivnih komponenata zbog dužeg izlaganja visokim temperaturama. U istraživanju koje su proveli Elez Garofulić i sur. (2024) vrijeme također nije imalo statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet. Razlog može biti povezan s dotokom svježeg otapala unutar svakog ekstrakcijskog ciklusa pri čemu je spriječeno zasićenje otapala ciljnim spojevima.

Iz dobivenih rezultata statističke analize vidljivo je kako omjer otapala i biljnog materijala ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet ekstrakata listova aronije određen ABTS ($p = 0,02$) i DPPH metodom ($p < 0,01$), dok vrijednosti određene FRAP metodom nisu imale statistički značajan utjecaj ($p = 0,72$). U uzorcima kod kojih je omjer otapala i biljnog materijala iznosio 20 mL/g prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta iznosila je $346,66 \pm 14,55 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista odnosno $503,51 \pm 7,42 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista. Ekstrakti u kojima je omjer otapala i biljnog materijala iznosio 30 i 40 mL/g pokazale su statistički veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, no nisu se statistički međusobno razlikovali s obzirom na prosječnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ($465,49 \pm 40,72$ i $423,23 \pm 32,53 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista) odnosno ($669,79 \pm 20,42$ i $786,38 \pm 21,99 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari lista) (tablica 2). Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena primjenom ABTS metode se neznatno smanjila kada je omjer otapala i biljnog materijala povećan s 30 na 40 mL/g što ukazuje na moguće postizanje ekstrakcijske ravnoteže. S druge

strane prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određen DPPH metodom je bila najveća pri najvišem omjeru otapala i biljnog materijala (40 mL/g), što se podudara sa rezultatima istraživanja koje su proveli Terpinč i sur. (2023) u kojem su ekstrahirali fenolne spojeve iz listova divlje jagode primjenom ASE.

Osim fenolnih spojeva, antioksidacijskom kapacitetu pridonose i drugi spojevi. DPPH i ABTS metode se temelje na istom mehanizmu prijenosa jednog elektrona i mehanizmu prijenosa vodikovog atoma, međutim aktivnost pojedinih fenolnih spojeva prema ABTS i DPPH radikalu može biti različita. Obe reakcije se mogu koristiti istovremeno za deaktivaciju slobodnih radikala ovisno s svojstvima antioksidanasa i reakcijske okoline. Antioksidansi jednostavne strukture i reaktivne skupine brzo postižu ravnotežu, dok spojevi složene strukture zahtijevaju dulje vrijeme reakcije. Spojevi sa sličnom osnovom strukturom a različitom prirodom supstituenata u prstenastim strukturama mogu se razlikovati u mehanizmu reakcije koji prevladava u određenom testu (Abuelizz i sur., 2020). U ovom istraživanju reaktivnost ekstrakata da reduciraju DPPH radikal je viša nego za ABTS radikal. DPPH metoda može bolje reagirati na određene vrste fenolnih spojeva koji su dominantni u listovima aronije. Treba uzeti u obzir da nepovoljni uvjeti ekstrakcije mogu dovesti do stvaranja derivata i izomera izvornih spojeva sa kojima DPPH radikal može reagirati. U istraživanju koje su proveli Terpinč i sur. (2023) najveća antiradikalna aktivnost DPPH radikala u etanolu određena je za fenole koji sadrže više hidroksilnih skupina, dok su jednostavni fenoli bez supstituenata aromatskog prstena bili gotovo neaktivni prema DPPH radikalu što je u suprotnosti sa ABTS•+.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Povišenje temperature ekstrakcije pridonijelo je povećanju masenih udjela fenolnih spojeva, a najveći prinos postignut je pri 150 °C.
2. Povišenje temperature je utjecalo i na povećanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta određenog ABTS, DPPH i FRAP metodama. Očekivano, u ekstraktima s najvećim masenim udjelom fenolnih spojeva dobivenim pri 150 °C određen je i najviši antioksidacijski kapacitet primjenom svih korištenih metoda, ABTS, DPPH i FRAP.
3. Vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) nije imalo statistički značajan utjecaj na prinos fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet ekstrakta osušenih listova aronije te je zbog uštede energije bolje postaviti vrijeme ekstrakcije na 5 min.
4. Povećanje omjera otapala i biljnog materijala dovelo je do povišenja antioksidacijskog kapaciteta koji je određen ABTS i DPPH metodom, dok na prinos fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet određenu FRAP metodom nije imalo statistički značajan utjecaj.
5. Prema rezultatima statističke analize, optimirani uvjeti ekstrakcije pri kojima se postižu najveći udjeli fenolnih spojeva (80,01 mg GAE/g suhe tvari lista) su temperatura 150 °C, vrijeme ekstrakcije 5 min te omjer biljnog materijala i otapala 30 mL/g. Najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene su pri istim uvjetima ekstrakcije pri kojima je postignut najveći udio fenolnih spojeva izuzev vrijednosti koje su određene DPPH metodom.
6. Na temelju provedenog istraživanja može se donijeti generalni zaključak da je list aronije kao nusproizvod koji zaostaje nakon berbe dobar izvor fenolnih spojeva te da kvaliteta ekstrakta procijenjena na temelju masenog udjela fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ovisi o primijenjenim uvjetima ekstrakcije.

6. LITERATURA

Abuelizz HA, Anouar E, Marzouk M, Taie HAA, Ahudhaif A, Al-Salahi R (2020) DFT study and radical scavenging activity of 2-phenoxy pyridotriazolo pyrimidines by DPPH, ABTS, FRAP and reducing power capacity. *Chem Pap* **74**, 2893-2899. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01126-0>

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci* **196**, 67-76.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>

Alvarez-Rivera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibañez E (2020) Pressurized Liquid Extraction, U: Poole CF (ured.) Liquid-Phase Extraction, Elsevier, Amsterdam, str. 375-398.

Bebek-Markovinović A, Milošević S, Teslić N, Pavlić B, Putnik P, Brčić Karačonji I i sur. (2023) Development of a Pressurized Green Liquid Extraction Procedure to Recover Antioxidant Bioactive Compounds from Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo* L.). *Plants* **12**, 1 - 13.
<https://doi.org/10.3390/plants12102006>

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.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

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>

Brand MH, Obae SG, Mahoney JD, Connolly BA (2022) Ploidy, genetic diversity and speciation of the genus *Aronia*. *Sci Hortic* **291**, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110604>

Buksh E, Malik SA, Ahmad SS, (2007) Estimation of nutritional value and trace elements content of *Carthamus Oxyacantha* *Eruca Sativa* and *Plantago Ovata*. *Pak. J. Bot.* **39**, 1181 – 1187.

Cvetanović A, Zengin G, Zeković Z, Švarc-Gajić J, Ražić S, Damjanović A i sur. (2018) Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems,

leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction, *FTC* **121**, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.045>

Cvetković D, Stanojević Lj, Zvezdanović J, Savić S, Ilić D, Karabegović I (2018) Aronia leaves at the end of harvest season — Promising source of phenolic compounds, macro- and microelements. *Sci Horti* **239**, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.015>

Čujić N, Šavikin K, Vidović Kardum N, Zdunić G (2018) Potential of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* L.) as a Therapeutic Food. U: Holban AM, Grumezescu AM (ured.) Handbook of Food Bioengineering, Andre Gerhard Wolff, London, str. 209-237

De la Guardia M, Armenta S (2011) Green Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam.

De la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia EM, Carrillo-Lopez A (ured.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, Woodhead Publishing, Sawson, str. 253-271.

Do Thi N, Hwang E-S (2014) Bioactive Compound Contents and Antioxidant Activity in Aronia (*Aronia melanocarpa*) Leaves Collected at Different Growth Stages. *Prev Nutr Food Sci* **19**, 204-212. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2014.19.3.204>

Elez Garofulić I, Repajić M, Cegledi E, Dobrosravić E, Dobrinčić A, Zorić Z i sur. (2024) Green Approach to Enhance the Recovery of Polyphenols from Blackcurrant and Bilberry Leaves: Evaluation of Microwave-Assisted and Pressurized Liquid Extraction. *Mol* **29**, 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules29061351>

Gan R-Y, Chan C-L, Yang Q-Q, Li H-B, Zhang D, Ge Y-Y i sur. (2019) Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains, U: Feng H, Nemzer B, Devries JW (ured.) Sprouted Grains, Woodhead Publishing and AACC International Press, Sawston, Cambridge, str. 191-246

Gutierrez-Grijalva EP, Picos-Salas MA, Leyva-Lopez N, Criollo-Mendoza MS, Vazquez-Olivo G, Basilio Heredia J (2018) Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* **7**, 1-23. <https://doi.org/10.3390/plants7010002>

Jia G, Jiang M, Sun A, Gan Z (2022) Quality Changes in Black Chokeberry Juice Treated by Thermal-Assisted High Hydrostatic Pressure during Cold Storage. *Mol* **27**, 1-8.

<https://doi.org/10.3390/molecules27185892>

Jurendić T, Ščetar M (2021) Aronia melanocarpa Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxid* **10**, 1-16. <https://doi.org/10.3390/antiox10071052>

Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M (2010) Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J Med Food* **13**, 255-269. <https://doi.org/10.1089=jmf.2009.0062>

Labo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* **4**, 118-126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E (2020) Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A Review. *J Chromatogr A* **1635**, 1-59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>

Mahoney JD, Hau TM (2019) Sexual and Apomictic Seed Reproduction in Aronia Species with Different Ploidy Levels. *Hortic Sci* **54**, 642-646. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13772-18>

Mayer-Miebach E, Adamiuk M, Behnlian D (2012) Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product. *Ag* **2**, 244-258. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030244>

Medved'ová K, Nahliková L, Stržincová P, Dubaj T, Kreps F (2023) Extraction of biologically active compounds from *Aronia melanocarpa*: Comparison of techniques and multiple response optimization. *Acta Chim Slovaca* **16**, 92-98. <https://doi.org/10.2478/acs-2023-0009>

Osorio-Tobon 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>

Oszmianski J, Wojdylo A (2005) Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* **221**, 809-813. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0002-5>

Owczarek K, Sosnowska D, Kajszyk D, Lewandowska U (2022) Evaluation of phenolic composition, antioxidant and cytotoxic activity of *Aronia melanocarpa* leaf extracts. *J Physiol Pharmacol* **73**, 233-243. <https://doi.org/10.26402/jpp.2022.2.06>

Pereira DTV, Tarone AG, Cazerin CBB, Barbero GF, Martinez J (2019) Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *J Food Eng* **240**, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019>

Perez-Vazquez A, Carpena M, Barciela P, Cassani L, Simal-Gandara J, Prieto MA (2023) Pressurized Liquid Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Seaweeds for Food Industry Application: A Review. *Antioxid* **12**, 1-27. <https://doi.org/10.3390/antiox12030612>

Platonova EY, Shaposhnikov MV, Lee H-Y, Lee J-H, Min K-J, Moskalev A (2021) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts in terms of geroprotector criteria. *Trends Food Sci Technol* **114**, 570–584. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.020>

Prior RL, Wu XL, Schaich K, (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Santos PH, Kammers JC, Silva AP, Oliveira JV, Hense H (2021) Antioxidant and antibacterial compounds from feijoa leaf extracts obtained by pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Food Chem* **344**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128620>

Saini RK, Keum Y-S (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem* **240**, 90-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Shang YF, Kim SM, Um B-H (2014) Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. *Food Chem* **154**, 164-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.050>

Shi D, Xu J, Sheng L, Song K (2024) Comprehensive Utilization Technology of *Aronia melanocarpa*. *Mol* **29**, 1-24. <https://doi.org/10.3390/molecules29061388>

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 Science* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Sidor A, Gramza-Michałowska A (2019) Black Chokeberry *Aronia Melanocarpa* L. - A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Mol* **24**, 2-57.
<https://doi.org/10.3390/molecules24203710>

Speisky H, Shahidi F, Costa de Camargo A, Fuentes J (2022) Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxid* **11**, 1-28. <https://doi.org/10.3390/antiox11010133>

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*). *Nutr* **12**, 1-14.
<https://doi.org/10.3390/nu12020463>

Sun H, Ge X, Lv Y, Wang A (2012) Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *J Chromatogr A* **1237**, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.003>

Szopa A, Kokotkiewicz A, Kubica P, Banaszczak P, Wojtanowska-Krośniak A, Krośniak M i sur. (2017) Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities. *Eur Food Res Technol* **243**, 1645-1657. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2872-8>

Šnebergrova J, Čížkova H, Neradova E, Kapci B, Rajchl A, Voldrich M (2014) Variability of Characteristic Components of Aronia. *Czech J Food Sci* **32**, 25-30.
<https://doi.org/10.17221/540/2012-CJFS>

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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>

Tena MT (2019) Pressurized Liquid Extraction. U: Worsfold P, Townshend A, Poole CF, Miro M (ured.) *Encyclopedia of Analytical Science*, 3. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 78-83.

Terpinc P, Dobrosłavić E, Elez Garofulić I, Repajić M, Cegledi E, Dobrinčić A i sur. (2023) Maximizing the Recovery of Phenolic Antioxidants from Wild Strawberry (*Fragaria vesca*) Leaves Using Microwave-Assisted Extraction and Accelerated Solvent Extraction. *Processes* **11**, 1-22. <https://doi.org/10.3390/pr11123378>

Ullah A, Munir S, Lal Badshah S, Khan N, Ghani L, Poulson BG i sur. (2020) Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Mol* **25**, 1-39.

<https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

Vergara-Salinas JR, Bulnes P, Zúñiga MC, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Mateos- Martín ML i sur. (2013) Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *J Agric Food Chem* **61**, 6929–6936.

<https://doi.org/10.1021/jf4010143>.

Wang L, Wang R, Dong J, Wang Y, Huang X, Chen C (2023) Research on the extraction, purification and determination of chemical components, biological activities, and applications in diet of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Chin J Anal Chem* **51**, 1-9.

<https://doi.org/10.1016/j.cjac.2023.100301>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Anita Čupić 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.

Anita Čupić

Vlastoručni potpis