Utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva trnine (Prunus spinosa L.)

Menalo, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:092925

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016

Marijana Menalo
656/PI

UTJECAJ EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM NA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA TRNINE (Prunus spinosa L.*)*

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod mentorstvom prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac uz pomoć više asistentice dr.sc. Ivone Elez Garofulićte laboratoriju za tehničku termodinamiku na zavoda za procesno inženjerstvo uz stručno vodstvo prof.dr.sc. Mladena Brnčića i uz pomoć Dr.sc.Filipa Dujmića.

Zahvaljujem svim kolegama i kolegicama Laboratorija za procese konzerviranja i preradu voća i povrća, te Laboratorija za tehničku termodinamiku koji su na bilo koji način pomogli pri izvođenju ovog rada, a posebice hvala višoj asistentici dr. sc. Ivoni Elez Garofulić i dr.sc. Filipu Dujmiću na pruženom znanju, iskustvu i volji da pomognu u bilo kojem trenutku.

Od srca hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na trudu i pomoći, te brojnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada koji su izradu ovog rada učinili još ljepšim iskustvom.

Hvala mojim roditeljima Josipu i Mileni, bratu Antoniu i sestri Martini, te zaručniku Petru što su oduvijek vjerovali u mene i podržavali me u svemu što sam željela ostvariti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM NA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA TRNINE *(Prunus spinosa L.)*

Marijana Menalo, 656/PI

Sažetak: Cilj rada je bio odrediti utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na ekstrakciju biološki aktivnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) iz cvijeta trnine (*Pruni Spinosi Flos*) pri čemu je ispitivan utjecaj sljedećih parametara: utjecaj vrste i polarnosti otapala (50 i 70 % -tne vodene otopine metanola i etanola), vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 10 minuta), te amplitude (50, 75 i 100%). U ekstraktima dobivenim pri prethodno navedenim uvjetima određivani su ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavanoli spektrofotometrijski. Bolja učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojava ostvarena je primjenom etanola kao otapala. Neovisno o vrsti otapala veće koncentracije fenolnih spojeva dobivene su primjenom otapala u kojemu je udio alkohola bio 70 %. Povećanjem vremena trajanja ekstrakcije i amplitude tijekom ekstrakcije utjecalo se na veće prinose fenolnih spojeva. Vrijeme trajanja ekstrakcije od 9 minuta i amplituda od 100% omogućilo je najveće prinose svih fenolnih spojeva osim hidroksicimetnih kiselina. Povećanje vremena trajanja ekstrakcije i povećanje amplitude nisu značajno utjecali na prinose hidroksicimetnih kiselina.

Ključne riječi: cvijet trnine, fenolni spojevi, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
Rad sadrži: 51 stranice, 19 slika, 4 tablice, 69 literaturnih navoda,
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
Pomoćpri izradi: dr.sc. Ivona Elez Garofulić, viši asistent i dr.sc. Filip Dujmić, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. Branka Levaj
2. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
3. Prof.dr.sc. Mladen Brnčić
4. Doc.dr.sc.Danijela Bursać Kovačević(zamjena)

Datum obrane: 01. Srpnja 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Facultyof Food Technology and Biotechnology
Department of food technology engineering
Laboratory for technology of fruit and vegetables preservation and processing

Scientificarea: Biotechnical Sciences
Scientificfield: Food Technology

INFLUENCE OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION ON ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLACKTHORN (*Prunus spinosa* L.)

Marijana Menalo 656/PI

Abstract: The objective of the study was to determine the effect of ultrasound assisted extraction (UAE) on the extraction of bioactive compounds (total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols) from blackthornflower (*Pruni Spinosi Flos*) where the influence of the extraction parameters were explored: solvent type and polarity (50 and 70 % of aqueous methanol and ethanol, v/v), extraction time (3, 6 and 10 minutes), and the amplitudes (50, 75 and 100 %). In the obtained extracts total phenols, total flavonoids, hydroxycinnamic acid and total flavanols were determined spectrophotometrically. Better polyphenolic yields is obtained by ethanol solvent in which the alcohol content was 70 %. By increasing the extraction time and amplitude during extraction resulted in higher yields of phenolic compounds. Obtained results indicated that extraction at 9 minutes resulted with the highest yields of phenolic compounds.The extraction time of 9 minutes and amplitude of 100% allowed the highest yields of phenolic compounds other than hydroxycinnamic acid. By increasing the extraction time and ultrasound amplitude did not considerably affected the content of hydroxycinnamic acids.

Keywords: flower of blackthorn, phenolic compounds, ultrasound assisted extraction (UAE)

Thes is contains: 51 pages, 19 figures, 4 tables, 69 references,

Original in: Croatian

GraduateThes is inprinted and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

Technical support and assistance: Ph.D. Ivona Elez Garofulić, Scientific Assistant and Ph.D Filip Dujmić, Scientific Asistant

Reviewers:
1. Ph. D. Branka Levaj, Full professor
2. Ph. D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. Ph. D. Mladen Brnčić, Full professor
4. Ph. D. Danijela Bursać-Kovačević, Assistant professor(substitute)

Thes is defended: 01 July 2016

Sadržaj **Stranica**

1. UVOD……1

2. TEORIJSKI DIO……..……..2

2.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)…….…... 2
2.1.1. Opće karakteristike biljke i botanička obilježja…….……..……..2
2.1.2. Kemijski sastav……..…….……..3
2.2. FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA…….…….5
2.2.1. Flavonoidi trnine……...……..5
2.2.2. Fenolne kiselina i srodni spojevi…….……9

2.3. METODE IZOLACIJE/EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA……..……12
2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM……..……14
2.4.1. Ultrazvuk…….14
2.4.2. Mehanizam djelovanja ultrazvuka…….……15
2.4.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom…….……16

3. EKSPERIMENTALNI DIO…….……..18

3.1. MATERIJALI……...……18
3.2. METODE RADA…….…….19
3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz uzorka cvijeta trnine……19
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola……...……20
3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida…….……22
3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola……..……25

4. REZULTATI I RASPRAVA……...…….……..29

4.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola…….……..29
4.2. Rezultati određivanja flavonoida…….…….33
4.3. Rezultati određivanja flavonola……37
4.4. Rezultati određivanja hidroksicimetnih kiselina……...…40

5. ZAKLJUČCI……..……..……..45

6. LITERATURA……..……...……46

7. PRILOZI

1.UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samonikla biljna vrsta koja je u Republici Hrvatskoj široko rasprostranjena te raste u prirodnim, odnosno optimalnim uvjetima bez izravne ljudske intervencije, što je prednost u odnosu na kultivirano bilje koje se tretira raznim insekticidima i pesticidima. Cvijet, list i plod trnine imaju poznata ljekovita svojstva te se najčešće konzumiraju u obliku infuzija i sirupa, ali se također prerađuju u sokove, pekmeze, marmelade, vina te likere. Trnina sadrži značajnu količinu biološki aktivnih spojeva, posebno vitamina, minerala te fenolnih spojeva (flavonoidi, flavanoli, procijanidini, flavonoli te fenolne kiseline i srodni spojevi).Značajna skupina fenolnih spojeva koji su prisutni u cvijetu trnine su flavan-3-oli, procijanidini (B1, B2, B4 i dimeri tipa A) te antocijani (peonidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glikozid, cijanidin-3-rutinozid). U cvijetu trnine je izolirano sedam flavonoida (razni kemijski oblici kvercetina te kamferola).

Za izolaciju fenolnih spojeva trnine koriste se različite metode ekstrakcije, a prinos ekstrakcije ovisi o brojnim faktorima kao što su metoda ekstrakcije, vrsta i polarnost otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije, veličina čestica, omjer volumena otapala i uzorka itd. Uz konvencionalne metode ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala sve više se primjenjuju i nove metode poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrakcije mikrovalovima, ekstrakcije superkritičnim fluidima, turboekstrakcije. Prednosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pred konvencionalnim metodama su postizanje većeg prinosa ciljanih spojeva pri značajno kraćem vremenu trajanja ekstrakcije, jednostavno rukovanje, primjena nižih temperatura, troši se značajno manja količina otapala, metoda je ekološki prihvatljivija.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj vodenih otopina metanola i etanola (50% i 70%, v/v), vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min) te amplitude (50%, 75% i 100%) na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta trnine (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola te hidroksicimetnih kiselina)primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. U pripremljenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli, flavonoidi, flavonoli te hidroksicimetne kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

2.1.1. Opće karakteristike biljke i botanička obilježja

Rod *Prunus*, sadrži oko 2000 vrsta, a smatra se da potječe iz istočne Azije i izvor je mnogih vrsta voća kao što su marelice, šljive, breskve, bademi i višnje (The Wild Fruit and Nut Plants of Kazahstan, 2004). Trnina (*Prunus spinosa* L.) pripada rodu ***Prunus***, potporodica ***Prunoideae***, porodici ***Rosaceae*** (Gursky, 1999). Raširena je po cijeloj Europi, Maloj Aziji, Iranu i djelomično sjevernoj Africi. U Hrvatskoj je veoma rasprostranjena kao grm. Može rasti i među drugim grmljem i živicama, u svijetlim hrastovim šumama, po brežuljcima, kamenitom i sunčanom tlu. Trnina ima ljekovita svojstva, pomaže kod problema s crijevima, čisti krv, pospješuje mokrenje (Pleše,2002). Pekmez od trnine se preporučuje za regulaciju probave (Willfort, 1989), dok se u domaćinstvu od trnine pripravljaju sokovi, pekmez, liker i vino (Grlić, 1986; Gelenčir, 1991).

Trnina je grm, visok 1 do 3 m, kojemu su mladi izdanci baršunasto dlakavi, a prostrane grane završavaju oštrim trnjem. Kora drveta je crno-smeđe boje. Listovi su s peteljkom (Slika 1.), ovalna oblika, nazubljeni, dok s donje strane u početku razvoja oskudno dlakavi, a kasnije goli. Bijeli cvjetovi se pojavljuju neposredno prije listanja tako da se jedva zamjećuje grane (Slika 2.)

Plod trnine je koštunica okruglog oblika, plavkasto-crne boje (Özbeck, 1987) promjera 1-1,5 cm (Slika 1.). Meso im je zelenkasto, trpko i kiselo, te se teško odvaja od koštice. Plodovi se čvrsto drže pa na granama ostanu preko cijele zime. Nakon nekoliko promrzavanja uslijed jesenskih mrazova gube trpak okus te postaju slađi i ukusniji, a meso im postaje plavo-crveno. Osim tanina plodovi sadrže i značajnu količinu organskih kiselina, antocijana, jabučne i cijanovodične kiseline (Šilić, 1983), te vitamina C i minerala (Gelenčir, 1991; MarakoğLu i sur., 2005).




Slika 1.List i plod trnine (*Prunus spinosa* L.) *Slika 2*. Cvijet trnine (*Prunus spinosa* L.)

(Anonymous,1) (Anonymous, 2)

Botanički gledano, postoji samo jedna vrsta biljke *Prunus spinosa*, no pojedini grmovi pokazuju znakove hibridizacije s ostalim vrstama divljih šljiva (MarakoğLu i sur., 2005).

2.1.2. Kemijski sastav

Plodovi trnine su jestivi, a nakon prvoga mraza postaju slađi. Trnina ima puno veću suhu tvar, te količinu proteina i masti u odnosu na većinu drugih voćnih vrsta (Tablica 1.)

Tablica 1.Kemijski sastav svježeg ploda trnine (MarakoğLu i sur., 2005).

SASTOJAK	***VRIJEDNOST***
Voda (%)	69,37
Proteini, ukupno (%)	3,4
Masti, ukupno (%)	2,06
Prehrambena vlakna, ukupno (%)	4,06
Minerali, ukupno (%)	2,72
Vitamin C (mg/100g)	8,3-26
Invertni šećer (%)	6,7-7,1
pH	3,53
Kiselost (%)	1,97
Pektinske tvari (%)	0,68-1,5
Tanini (%)	0,9-1,7
Ekstrakt topljiv u vodi (%)	78,28
Ekstrakt topljiv u alkoholu (%)	14,74

Najznačajniji kemijski sastojci u plodu trnine su (MarakoğLu i sur., 2005):

- voda (oko 70%),
- šećer (invertni šećer u količini 6-7%),

- prehrambena vlakna (oko 4,06%) – sastavni dio staničnih stijenki, sjemenki i srži plodova,
- tvari s dušikom (3,4%) – nalaze se u obliku bjelančevina i aminokiselina,
- pektinske tvari (oko 4%) – nalaze se u obliku protopketina (netopljivi oblik) koji zrenjem prelazi u topljivi oblik – pektin,
- taninske tvari – teško se hidroliziraju te su otporne na djelovanje enzima. Njihov je sadržaj u zelenim i nezrelim plodovima vrlo visok te doprinosi oporom okusu. Količina tanina smanjuje se dozrijevanjem (Pejić i Nikolovski, 1989),
- tvari arome – doprinose osvježavajućem okusu. Tvari arome smjesa su različitih hlapljivih spojeva (aldehida, ketona, hlapljivih kiselina, estera i dr.),
- tvari boje – prirodna plavo-crna boja trnine potječe od velike količine antocijana, a tijekom oštećenja ili prerade dolazi do degradacije prirodnih (specifičnih) pigmenata,
- minerali (oko 2,72%, tablica 2.) – u najvećoj koncentraciji prisutni su sumpor, kalij, kalcij, fosfor, magnezij, natrij, bor i aluminij (MarakoğLu i sur., 2005).

Tablica 2. Sadržaj minerala u plodovima trnine (MarakoğLu i sur., 2005).

MINERALI	***KOLIČINA (mg kg^{-1})***
Al	26,33 ± 1,88
B	26,99 ± 1,44
Ca	1524,22 ± 88,11
Fe	16,18 ± 1,70
K	18706,98 ± 553,02
Mg	968,15 ± 7,65
Na	530,11 ± 75,49
P	1514,54 ± 215,90
S	500025,97 ± 5966,05

Osim podataka o kemijskom sastavu ploda trnine, postoje i podaci o sastavu koštice. U tablici 3 prikazan je sastav koštice ploda trnine.

Tablica 3. Kemijski sastav koštice ploda trnine (The Wild Fruit and Nut Plants of Kazahstan, 2004).

SASTOJAK	*VRIJEDNOST*
Ulje (%)	37
Amigdalin (%)	3

2.2. FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji su prisutni u velikom broju biljaka u značajnim količinama. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, s kemijskog stajališta, osnovno obilježje svih fenolnih spojeva je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzinskih prstenova (Blanco i sur., 2005).

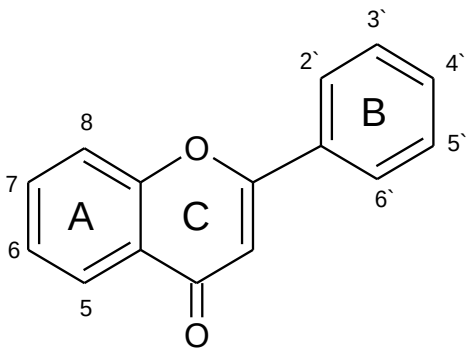
Prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na :

1. Flavonoide
2. Neflavonoide (fenolni kiseline i srodne spojeve)

Fenolni spojevi se obično pojavljuju u biljnom tkivu vezani za druge molekule. Najčešće su povezani glikozidnim ostacima, ali i sa sulfatnim ili acetilnim ostacima (Harborne, 1980).

2.2.1. Flavonoidi trnine

Flavonoidi su spojevi koji imaju strukturu, koju tvori difenilpropanski kostur C_{15}(C_6-C_3-C_6), tj. dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 3.). Do danas je poznato više od 4000 flavonoida (Harborne i Baxter, 1999).



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Macheix i sur., 1990)

Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren (Macheix i sur. 1990; Harborne, 1980).

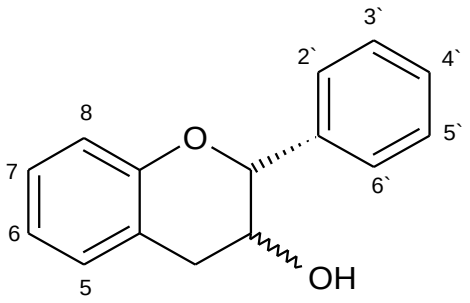
Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, flavonoidi se dijele u brojne podskupine (Tsao i Yang, 2003):

- antocijani,
- flavoni,
- izoflavoni,
- flavanoni,
- flavanoli,
- flavonoli,

Nastajanje flavonoida u biljkama uvjetovano je brojnim faktorima kao što su svjetlost, uvjeti okoliša, genetika biljke, stupanj zrelosti i vrsta biljke (Fruhbeck, 1996).

Rezultati istraživanja su pokazala da je sadržaj flavonoida u cvjetovima trnine koja je prisutna u Poljskoj značajan. Oko 2,7% nalazi se u obliku aglikona i 3,8% u obliku glikozida (Olszewska i sur., 2001).

Flavanoli su najraširenija skupina flavonoida, poznati su i kao katehini. Imaju zasićenu vezu između C_2 i C_3 atoma (slika 4.).



Slika 4. Kemijska struktura flavanola (Robards i sur., 1999)

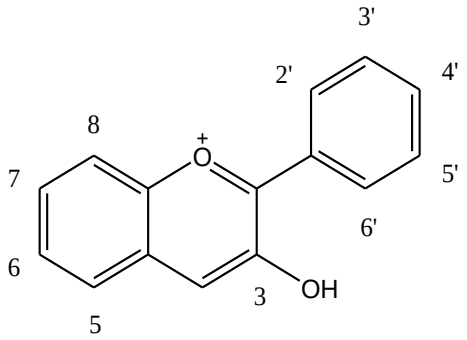
Flavan-3-oli, za razliku od većine flavonoida u voću, češće su prisutni u slobodnom obliku nego u obliku glikozida. Flavan-3-oli međusobnim povezivanjem tvore procijanidine (Weinges i Piretti, 1971).

Prema nekim autorima (Haslam, 1977, 1981) **procijanidinima** se nazivaju nehidrolizirani tanini, a monomerni flavan-3,4-dioli nazivaju se leukoantocijanidinima. Osnovnu strukturu procijanidina čine više ili manje polimerizirani flavan-3-oli koji se međusobno povezuju C-C vezama između C_4 atoma jedne molekule flavanola i C_6 ili C_8 atoma druge molekule, a rjeđe su C-O veze (Spanos i Wrolstad, 1994). Ovakvim povezivanjem nastaju oligomerne i polimerne strukture procijanidina.

Odgovorni su za trpkost koju definiramo kao osjećaj stezanja u ustima. Svojstva im ovise o stupnju polimerizacije, a najtrpkiji su tetrameri. Najvažniji procijanidini u biljnim tkivima su dimerni procijanidini B skupineB_1, B_2, B_3 i B_4 (Haslam, 1981).

Procijanidini koji su prisutni u cvjetovima trnine su uglavnom procijanidini tipa A (Olszewska i Wolbis, 2000). Procijanidini ili kondenzirani tanini značajni su predstavanici fenola koji su prisutni u pokožici i mesnatom usplođu trnine (Santos-Buelga i sur., 2000).

Antocijani su derivati 2-fenilbenzopirilijevih (flavilijevih) soli koje se nalaze u biljkama u obliku glikozida, dok se njihovi aglikoni nazivaju antocijanidini (Slika 5.). U prirodi je pronađeno oko dvadeset različitih antocijanidina, a najvažniji sucijanidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin, petunidin imalvidin (Fennema, 1985).



Slika 5. Kemijska struktura antocijana (Robards i sur., 1999)

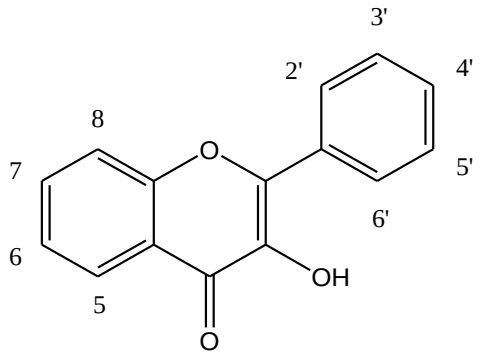
U plodovima trnine iz skupine antocijana identificirani su peonidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid te cijanidin-3-rutinozid. Identificirani antocijani su bili zastupljeni u niskim koncentracijama (Jurasović, 2006).

Flavonoli su široko rasprostranjeni u carstvu biljaka.. Do sada je u biljkama identificirano oko 200 različitih flavonola**.** Flavonoli imaju nezasićenu vezu između C_2 i C_3 atoma C prstena, imaju hidroksilnu skupinu vezanu na C_3 atomu C prstena (Slika 6.).

Glavni predstavnici flavonola su:

- kvercetin (3,5,7,3',4-pentahidroksiflavon),
- kamferol (3,5,7,4'-tetrahidroksiflavon),
- miricetin (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavon) i
- izomiricetin (3,5,7,4'-tetrahidroksi-3'-metoksiflavon).

Od flavonola najzastupljeniji su kvercetin i kamferol. Uglavnom su prisutni u obliku glikozida te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom. Akumuliraju se u površinskim tkivima (pokožici i listovima) jer svijetlo stimulira njihovu biosintezu pa stoga i njihova koncentracija u plodovima jako ovisi o izloženosti sunčevim zrakama.



Slika 6. Kemijska struktura flavonola (Robards i sur., 1999)

U cvijetu trnine flavonoli su prisutni u obliku monoglikozida, uglavnom kamferola i kvercetina (Olszewska, 2000). U cvijetu trnine izolirano je sedam flavonoida: kvercetin 3-O-α-L-arabinopiranozid, 3-O-α-L-ramnopiranozid, 3-O-β-D-ksilo-piranozid i 3-O-β-glukopiranozid, kamferol 3,7-di-O-α-L-ramnopiranozid, kamferol i kvercetin 3-O-α-L-ramnopiranozid (Olszewska i Wolbis, 2001). Ruiz-Rodrigez i sur. (2014) u svome istraživanju u plodovima trnine podrijetlom iz Madrida HPLC- metodom identificirali su kvercetin-3-glikozid.

Ispitivanjem sadržaja flavonoida u cvjetovima trnine u Rumunjskoj utvrđeno je da 1,6% od ukupnih flavonoidnih aglikona predstavlja kvercetin. Prema literaturi, cvjetovi i listovi trnine sadrže komplekse flavonoida, derivate flavonola: kvercetin, kamferol i njihove glikozide s arabinozom, ramnozom i ksilozom (Horhammer i sur., 1957).

Flavonol glikozidi (kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-ramnozid) su jedni od značajnijih spojeva koji su prisutni u plodu trnine i njenim proizvodima. Flavonol glikozidi koji su prisutni u trnini najviše su zastupljeni kao kvercetin-3-rutinozid (56,81mg/100g s.t.) (Tomas-Barberan i sur, 2001).

2.2.2. Fenolne kiseline i srodni spojevi

Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne grupe:

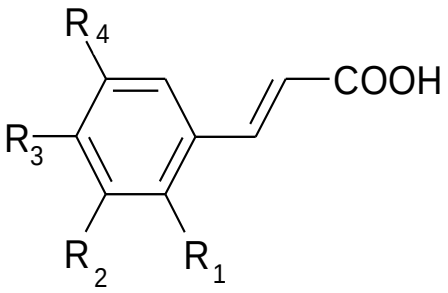
- hidroksibenzojeve kiseline (C_6-C_1)
- hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3) i njihovi derivati.

Razlika u strukturi između pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990).

Osnovna struktura **hidroksicimetnih kiselina** je C_6-C_3 (Slika 7.). Najvažnije hidroksicimetne kiseline su:

- kafeinskakiselina (3,4-dihidroksicimetna),
- ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna),
- *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna) i
- sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna) kiselina(Bravo, 1998).

U prirodi se uglavnom nalaze u obliku estera. Najpoznatiji ester je 5'-kafeoilkina kiselina ili poznatija pod trivijalnim imenom klorogenska kiselina (Macheix i sur., 1990).



HIDROKSICIMETNE KISELINE
Kava R_1=R_2=H; R_3=R_4=OH
Ferulinska R_1=R_2=H;R_3=OH;R_4=OCH_3
p-kumarinska R_1=R_2=R_4=H; R_3=OH
Sinapinska R_1=H; R_3=OH;R_2=R_4=OCH_3

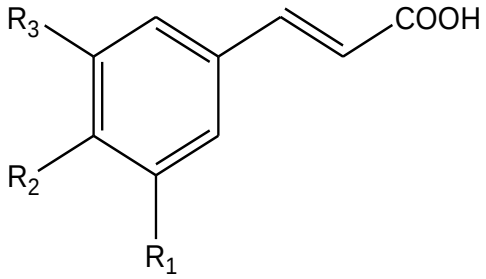
Slika 7. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Robards i sur., 1999)

Hidroksibenzojeve kiseline, osnovne strukture C_6-C_1 (Slika 8.) nastaju izravno iz benzojeve kiseline i obično su prisutne kao slobodne kiseline.

U ovu skupinu se ubraju:

- galna,
- *p*-hidroksibenzojeva,
- protokatehinska,
- siringinska,
- vanilinska,
- elaginska i
- salicilna kiselina (Bravo, 1998).

U prirodi se nalaze uglavnom u slobodnom obliku, ali se povezuju i s konjugiranim šećerima i organskim kiselinama (Schuster i Hermann, 1985; Strack, 1997). Mogu tvoriti kompleksne strukture kao što su hidrolizirani tanini (npr. galotanini).



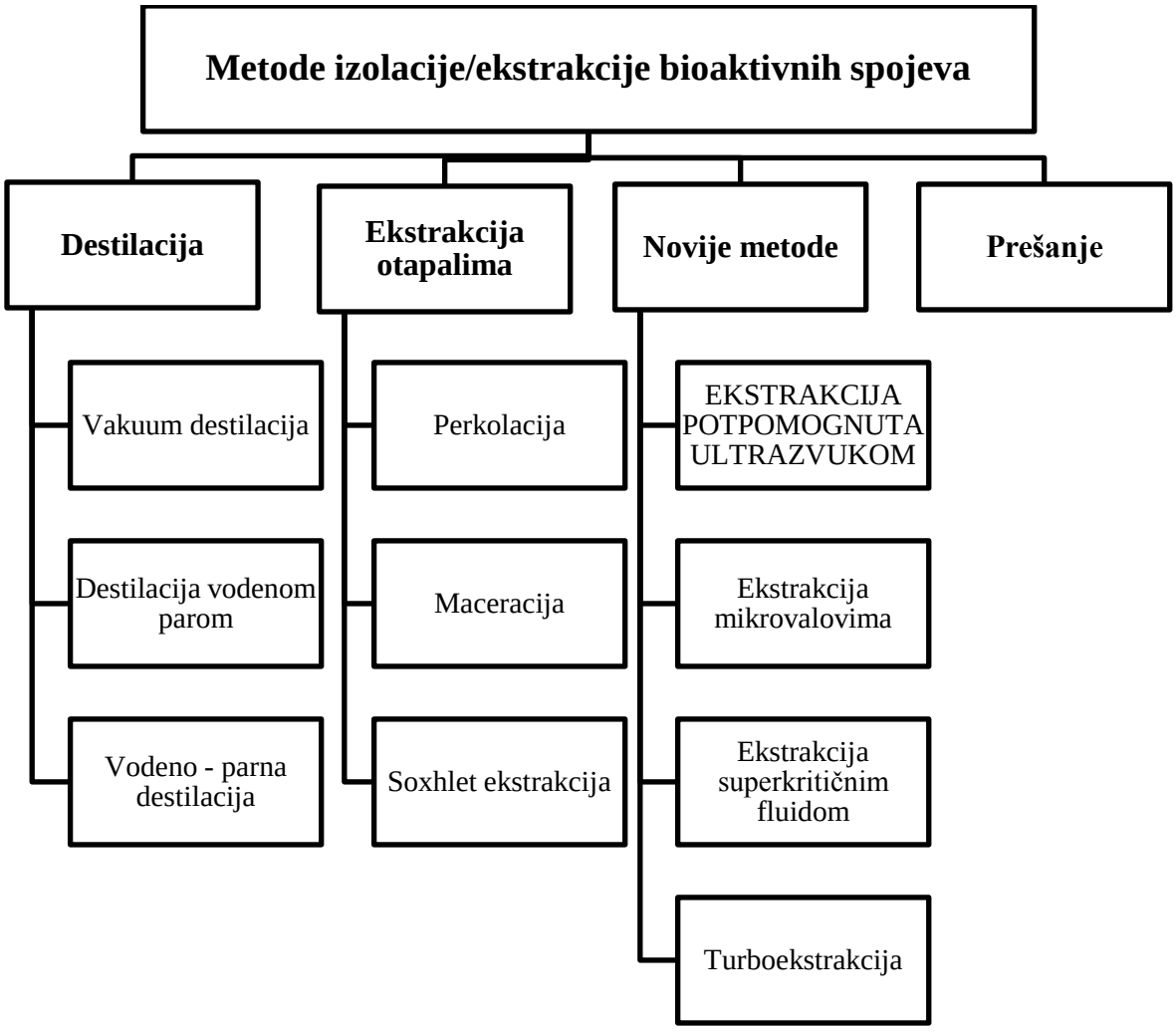
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE
Galna R_1=R_2=R_3=OH
Protokatehinska R_1=H; R_2=R_3=OH
Siringinska R_2=OH; R_1=R3=OCH_3
Vanilinska R_1=H; R_2=OH; R_3=OCH_3

Slika 8. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

U granama trnine identificirane su pomoću HPLC DAD i HPLC-ESI-MS/MS metode galna, kafeniska te protokatehinska kiselina (Calvo, 2015). Tijekom istraživanja Ruiz-Rodrigez i sur. (2014) primjenom HPLC-metode identificirali su u svježim plodovima trnine galnu i kafeinsku kiselinu.

2.3. METODE IZOLACIJE/ EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Da bi bilo moguće analizirati ciljane bioaktivne spojeve u nekom uzorku potrebno ih je izolirati. Metode izolacije odnosno ekstrakcije (Slika 9.) mogu biti različite i mogu se kombinirati ovisno o polarnosti, veličini, stabilnosti i naboju molekula i vrsti uzorka.



*Slika 9.*Metode izolacije bioaktivnih tvari (Eskilsson i Bjorklund, 2000)

Ekstrakcija je izdvajanje neke tvari iz homogene smjese na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima, koja se međusobno ne miješaju. Pri tome dolazi do razdvajanja tvari između dva otapala. Većinom su to voda odnosno vodena otopina tvari i neko organsko otapalo koje se ne miješa s vodom. Dobiveni ekstrakt može se pročistiti kako bi izdvojili bioaktivne spojeve u čistom obliku. Pročišćavanje ekstrakta provodi se

filtriranjem, odnosno dodatkom aktivne tvari na koje se vežu pojedini sastojci i talože, te centrifugiranjem (Blekić i sur., 2011). Ekstrakcija iz krutine ili neke druge tekućine koja sadrži željenu tvar se može provesti korištenjem tekućine, tj. otapala. Za ekstrakciju je vrlo važan izbor otapala, što ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju se želi izolirati. Tijekom izbora otapala u obzir se treba uzeti polarnost otapala, vrelište koje treba biti što niže da bi se izdvajanje komponenti olakšalo. Otapalo ne smije reagirati s ekstraktom (reaktivnost), mora imati nisku viskoznost, stabilnost na toplinu, kisik i svijetlo. Tijekom primjene otapala ne smije biti zapaljivo, štetno za tehničara i konzumenta. Tijekom odlaganja treba biti ekološki prihvatljivo, te dostupno u dovoljnim količinama i pogodno za ponovnu upotrebu (Drmić i Jambrak, 2010)

Čimbenici koji utječu na brzinu i efikasnost ekstrakcije su topljivost tvari u otapalu, temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija, veličina čestica, površina namirnice izloženoj otapalu i gibanju otapala. Pogodno je provođenje ekstrakcije na višim temperaturama zbog toga jer dolazi do povećanja brzine otapanja tvari, povećanja brzine difuzije tvari u volumen otapala (Drmić i Jambrak, 2010). Vrlo je bitno odabrati optimalno vrijeme i temperaturu ekstrakcije kako bi se izbjeglo moguće oštećenje željene komponente ili izolacije nepoželjnih tvari. Prije ekstrakcije namirnice se usitnjavaju zbog proporcionalnog odnosa brzine difuzije i površine namirnice te se prema potrebi homogeniziraju (Jerman i sur., 2010).

Uz klasične metode ektstrakcije kao što su destilacija, maceracija, perkolacija, i dr. sve se više upotrebljavaju novije metode kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidom.

2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM

2.4.1 Ultrazvuk

Zvuk je val koji se širi prostorom, ispunjenim medijem pogodnim za širenje zvučnih valova. S obzirom na frekvenciju titranja samoga vala te na slušne mogućnosti pojedinca, sve ono što zapravo čujemo i ne čujemo može se podijeliti na (Brnčić i sur., 2009):

- Infrazvuk (0 – 16 Hz)
- Zvuk (16 Hz – 18 kHz)
- Ultrazvuk (više od 20 kHz)
- Hiperzvuk (frekvencija viših od 10^{10} Hz) (Slika 10).

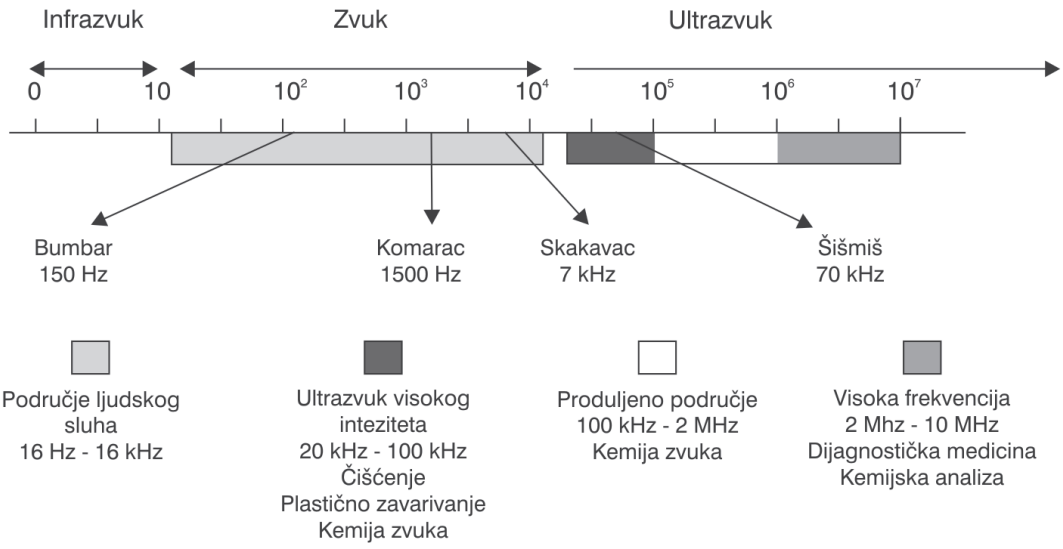
Ultrazvukom se naziva područje zvučnih valova iznad 20 kHz, koje ljudsko uho više ne čuje. Ultrazvuk se može podijeliti na:

- ultrazvuk visokih frekvencija (niska energija)
- ultrazvuk niskih frekencija (visoka energija)

Ultrazvuk niskog intenziteta radi na frekvencijama višim od 2 MHz. On ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene zbog male snage kojom djeluje na materijal,te se zato smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika (Roselló-Sotoi sur., 2015; Šic Žlabur i sur., 2015; Drmić i Jambrak, 2010).

Ultrazvuk visokog intenziteta frekvencije od 20 do 100 kHz može uzrokovati fizikalne promjene materijala te određene kemijske promjene u materijalima na kojima je primijenjen. Primjenjuje se za čišćenje, odzračivanje tekućina, homogenizaciju tekućina, sušenje, ekstrakciju, destilaciju i uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama(Dent i sur., 2015; Koubaa i sur., 2015; Herceg i sur., 2009).

Ultrazvučni valovi tijekom svoga djelovanja oštećuju stanične stjenke biljnih materijala čime olakšavaju ulaz otapala u materijal te povećavaju efikasnost izmjene i prijenosa mase.U ranoj fazi istraživanja vjerovalo se da su ova oštećenja zbog zagrijavanja, no kasnijim razvojem istraživanja došlo se do spoznaje da je pojava kavitacije najvažnija prilikom razaranja tkiva ultrazvukom visokog intenziteta (Ninčević Grassino i sur., 2015; McClements, 1995).



Slika 10. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

2.4.2. Mehanizam djelovanja ultrazvuka

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine kao što su pokretanjem tekućine, mlazom plina ili na najčešće upotrebljavani način u prehrambenoj industriji je pomoću električne snage. Električna ili mehanička energija se pomoću ultrazvučnog pretvarača pretvaraju u energiju zvuka. Piezoelektrični kristali se šire i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju. Kao posljedica privlačenja polariziranih molekula dolazi do pojave mehaničkih vibracija koje se pojačavaju na pojačalu te se ultrazvučni valovi sondom emitiraju u medij. Tijekom prolaska ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnog vala, što dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka. Dolazi do formiranja mikroskopskih mjehurića, koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. Kavitacija je niz procesa koji uključuju stvaranje, rast i snažno rasprsnuće mjehurića ili praznina u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka. Prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije tek ekspanzivnih vrtloga. Kao rezultat oscilacija tlaka u mediju mjehurići osciliraju te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Drmić i Jambrak, 2010). U određenom trenutku mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu i ne može više učinkovito apsorbirati energiju te se on urušava sam u sebe. Kritična veličina mjehurića ovisi o primijenjenoj frekvenciji i mediju koji se tretira.

Ultrazvuk visoke snage zbog djelovanja kavitacije na stanični materijal dovodi do oštećenja stjenke, čime se poboljšava prijenos mase i olakšava prodiranje otapala u materijal,što rezultira većim prinosom ekstrakcije. Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena efikasnost.

2.4.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE - „Ultrasound assisted extraction“) od velike je važnosti u tehnologiji prerade hrane zbog povećanja ekstrakcije komponenti iz biljnog i životinjskog materijala. Tehnologijom UAE može se povećati ekstrakciju određenih komponenti kao što su polifenoli, antocijani, aromatske tvari, polisaharidi i funkcionalni spojevi (Drmić i Jambrak, 2010). Mnoga istraživanja su pokazala da je upotrebom manjih frekvencija djelovanje ultrazvuka učinkovitije (Vinatoru, 2001).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može biti:

- Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji
- Ekstrakcija s uronjenom sondom

Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno su jeftine. Elementi pretvornika su smješteni na dnu spremnika i glavnina ultrazvučnih kupelji radi na frekvenciji od 20-40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur. 2009).

Ekstrakcija s direktno uronjenom sondom provodi se na način da se u uzorak, koji se nalazi u tekućem agregatnom stanju uroni ultrazvučna sonda. Uzorak se tretira ultrazvukom uz miješanje kako bi se temperatura koja nastaje tijekom kolapsa kavitacijskih mjehurića ravnomjerno prenijela na čitav uzorak. Potrebno je pratiti temperaturu uzorka, te isti po potrebi hladiti ili zagrijavati (De Casto i Capote 2007).

Optimizacija procesa ekstrakcije važan je dio tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Amplituda (%), ciklus (%), frekvencija (kHz) i nazivna izlazna energija (W) moraju se pravilno odabrati i uzeti u obzir (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010;Dujmić i sur., 2013) (Tablica 4).

Tablica 4. Parametri koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije (Wang i sur., 2006)

ULTRAZVUK	EKSTRAKCIJA
Frekvencija	Vrijeme trajanja
Ciklus	Otapalo
Amplituda	Temperatura
Akustična snaga	

Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom mogu se povećati učinkovitosti brzina ekstrakcije, što u industriji predstavlja ekonomsku dobit u odnosu na standardne metode ekstrakcije. Kod UAE postoji mogućnost zamjene organskih otapala s onima koje su opće priznati kao sigurni (npr. CO_2). Za dobivanje fenolnih spojeva iz biljaka u mnogim istraživanjima su se primjenjivale mješavine metanol/etanol voda (Albu i sur., 2004; Wang i sur., 2004), zatim aceton voda (Wang i sur., 2004) kao otapalo. Paniwnyk i sur. (2009) su istraživali utjecaj različitih metoda ekstrakcije na izolaciju karnozinske kiseline iz ružmarina te su najbolji učinak postigli primjenom etanola u odnosu na metanol i primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom frekvencije 20 kHz, nešto slabiji učinak u ultrazvučnoj kupelji (45 kHz) te najslabiji klasičnom ekstrakcijom. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može pružiti bolju ekstrakciju bioaktivnih spojeva osjetljivih na toplinu. Primjenom ultrazvuka skraćuje se vrijeme i temperatura ekstrakcije uz mogućnost primjene ekološki prihvatljivijeg otapala kao što je etanol, a ekstrakcijski kapacitet je veći u odnosu na klasičnu ekstrakciju.Za razliku od klasične ekstrakcije gdje se unaprijed odredi temperaturua koja se konstantno održava za vrijeme ekstrakcije, kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom potrebna je stalna kontrola temperature. Uslijed djelovanja ultrazvuka dolazi do zagrijavanja sustava te je važno održavati i kontrolirati temperaturu tijekom procesa ekstrakcije kako ne bi došlo do razgradnje termolabilnih spojeva koji se žele ekstrahirati (Ren i sur., 2013). Klen i Vodopivec (2012) su tijekom svog istraživanja na ekstra djevičanskom maslinovom ulju dali prednost primjeni uređaja s direktno uronjenom sondom u odnosu na ultrazvučnu kupelj jer je izlazna snaga višestruko veća. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz maslinova ulja je postignut primjenom 10 minutne ekstrakcije s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom. Duljim trajanjem ekstrakcije do 20 minuta nije zabilježen ekstrakcijski prinos fenolnih spojeva. Tijekom procesa ekstrakcije potrebno je povećavati amplitudu ultrazvuka jer je ona potrebna za dobivanje vibracija koje potiču kavitaciju (Santos i sur., 2008). Zhang i

sur. (2008) su u svome istraživanju pokazali da primjenom veće amplitude, ultrazvučni val kroz tekući medij putuje tako da stvara puno više kavitacijskih mjehurića. Primjenom veće snage ultrazvuka uslijed agresivnog djelovanja kavitacijskog mehanizma na staničnim stijenkama uzrokovanog bržim kretanjem molekula, dolazi do većeg ekstrakcijskog kapaciteta. Balachandran i sur. (2006) su u svome istraživanju varirali izlaznu snagu ultrazvuka od 100 do 300 W prilikom ekstrakcije gingerola iz gingera, te su u prvih 10 minuta ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom ekstrahirali veći udio traženih spojeva, duljim vremenom ekstrakcije ekstrakcijski kapacitet se nije povećavao.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pojavljuje se kao potencijalna metoda kojom se može ubrzati prijenos tvari, prijenos topline, povećati ekstrakcijski kapacitet, te spriječiti degradacija termolabilnih spojeva kao što su polifenoli (Chemat i sur., 2011).

Učinak ultrazvuka proučavan je na više od stotinu biljnih vrsta. Učinak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na cvijet trnine u znanstvenoj literaturi do sada nije proučavan, te do sada nisu dostupne nikakve studije o optimizaciji parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provedene na ekstraktu cvijeta trnine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Za istraživanje je korišten cvijet trnine (*Pruni Spinosi Flos)* nabavljen u suradnji sa Suban d.o.o. Cvijet trnine je sakupljen na području Republike Hrvatske te je osušen prirodnim načinom sušenja. Nakon sušenja osušeni cvjetovi zapakirani su u kartonske vrećice te su do provođenja analiza čuvani pri sobnoj temperaturi i na tamnom mjestu.

Priprema uzoraka za analize: Neposredno prije provođenja analiza cvjetovi trnine usitnjeni su pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita, Italy) u sitni prah.



Slika 11. Cvijet trnine (Vlastita fotografija, 2016)

3.2. METODE RADA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka cvijeta trnine provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UZV) uz upotrebu vodenih otopina etanola (50%, 70%) i metanola (50%, 70%). Uzorci su tretirani pomoću ultrazvučnog uređaju UP400S (Hielscher, Njemačka). Korištena je sonda promjera 7 mm izrađena od titana. Uzorci su tretirani kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta pri različitim amplitudama od 50%, 75% i 100%. Ciklus je podešen na 1, što predstavlja puno vrijeme obrade ultrazvukom. U ekstraktima trnine provedeno je određivanje ukupnih flavonoida, ukupnih fenola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola primjenom spektrofotometrijskih metoda.

3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz uzorka cvijeta trnine

Aparatura i pribor:

1. Analitička vaga (METTLER), ±0,0001g
2. Ultrazvučni uređaj UP400S (Hielscher, Njemačka)
3. Centrifuga (HETTICH, Rotofix 32)
4. Staklene čaše (100mL)
5. Menzure, volumena 100mL i 1L
6. Stakleni štapić
7. Pipete (20 i 25 mL)
8. Odmjerne tikvice volumena 50 mL
9. Erlenmeyer-ove tikvice volumena 25 mL
10. Magnetska mješalica
11. Falkonice (plastične kivete)

Kemikalije i otapala

1. otapalo 50%-tna vodena otopina etanola (1000 mL otapala: u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se 520,84 mL 96%-tnog etanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)
2. otapalo 70%-tna vodena otopina etanola (1000 mL otapala: u odmjernu tikvicu od 1000 mL 729,16 mL 96%-tnog etanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)

3. otapalo 50%-tna vodena otopina metanola (1000 mL otapala: u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se500,00 mL 100%-tnog metanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)
4. otapalo 70%-tna vodena otopina metanola (1000 mL otapala: u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se700,00 mL 100%-tnog metanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)

Postupak ekstrakcije:

1g (±0.01) samljevenog uzorka homogenizira se otapalom (50%, 70% vodena otopina metanola i 50% , 70% vodena otopina etanola, v/v) u staklenoj čaši. Čaša s uzorkom i otapalom postavlja se na predviđeni prostor na postolju u ultrazvučnom uređaju sa uronjenom sondom promjera7mm do polovice čaše. Na procesoru postavimo određenu amplitudu (50 %,70 %, 100 %) i ciklus ultrazvuka te mjerimo vrijeme ekstrakcije (3, 6, 9 min) štopericom.
Nakon obavljene ekstrakcije uzorci se kvantitativno preliju u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopune se otapalom koje je korišteno za ekstrakciju do oznake te se cijeli sadržaj prebaci u falkonice. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 5500 okretaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem oddekantirase od nastalog taloga u čiste falkonice od 50 mL. Tako pripremljeni ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na temperaturi -18°C do trenutka njihovih primjene za analitičke metode u ovome slučaju za određivanje fenolnih spojeva spektrofotometrijskom metodom.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

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

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti ±0,01g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL

6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

3. Standard galne kiseline

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

Priprema uzorka

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano prethodno u poglavlju ekstrakcija polifenola. Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Razrjeđenja:

Ekstrakti cvijeta trnine dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 10 puta.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa(pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1}. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagesna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode.. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i koncentracija otopine galne kiselinenacrta se baždarni pravac (Prilog 7.1.) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$Y = 0{,}0035^{x} X$ [1]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

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

R^2- koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji flavonoida s

aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti ±0,01g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Mikropipete od 100 i 1000 μL
7. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
8. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
9. Staklene epruvete
10. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Etanol, 96 %-tni
2. Metanol, 100 %-tni
3. Aluminijev klorid, 10%-tni

   Priprema: 1 g aluminijeva klorida (aluminj-klorid–heksahidrat,p.a.) otopi se 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
4. Kalijev acetat, 1 M

   Priprema: 9,845 g kalijeva acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
5. Standard kvercetina (100 mg L^{-1})

   Priprema: Odvaže se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u zadanom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrjeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1}.

Priprema uzorka

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u prethodnom poglavlju ekstrakcija polifenola.

Razrjeđenja:

Ekstrakti cvijeta trnine dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 5 puta.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10%-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg L^{-1}. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1}. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg L^{-1}.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10%-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac (Prilog 7.2.) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije kvercetina (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$Y = 0{,}0069^{x} X + 0{,}0002$ [2]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg L^{-1}).

R^2- koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje se provodi u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
4. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
5. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
6. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
7. Staklene epruvete
8. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
2. Etanol, 96%
3. Klorovodična otopina masene koncentracije 1g L^{-1} HCl (u 96% etanola).
   Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.
4. Klorovodična otopina masene koncentracije 2gL^{-1}HCl
   Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

5. Standard kafeinske kiseline (100 mg L^{-1})

   Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg L^{-1}. Odvaže se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u zadanom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

6. Standard kvercetina (100 mg L^{-1})

   Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg L^{-1}. Odvaže se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u zadanom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

7. Standard klorogenske kiseline (100 mg L^{-1})

   Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg L^{-1}. Odvaže se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Priprema uzorka

Ekstrakti se pripremaju kao što je prethodno opisano u poglavlju ekstrakcija polifenola (3.2.1.).

Razrjeđenja:

Ekstrakti cvijeta trnine dobiveni pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 2,5 puta.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL ekstrakta, 250 μL 1g L^{-1}HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog Pravca (Prilog 7.4.) za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca (Prilog 7.4) za kvercetin.

a) *Kafeinska kiselina*

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg L^{-1} potrebno je prirediti razrjeđenja: 9,23, 23,99, 49,82, 99,63, 147,60, 228,78 mg L^{-1}.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g L^{-1}HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol.Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$Y = 0,0047X + 0,0231$ [3]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

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

R^2- koeficijent determinacije

Klorogenska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mgL^{-1} potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg L^{-1} na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g L^{-1}HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$Y = 0{,}0035X - 0{,}0082$ [4]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

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

R^2- koeficijent determinacije

b) *Kvercetin*

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg L^{-1} potrebno je prirediti razrjeđenja: 2.5, 5, 10, 25, i 50 mg L^{-1} na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1g L^{-1} HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$Y = 0{,}0031\ X$ [5]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kverecetina (mg L^{-1}).

R^2- koeficijent determinacije

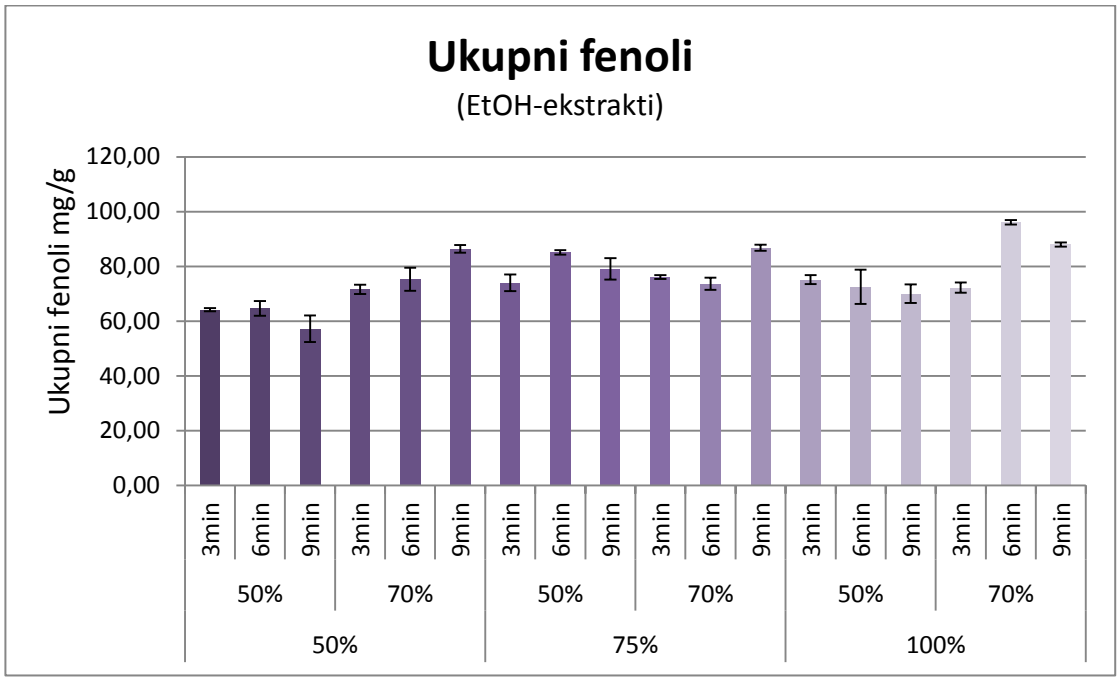
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu ispitan je utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz upotrebu različitih otapala etanola i metanola (50% i 70% vodene otopine)na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta trnine(ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina). Ekstrakcija je provedena sondom promjera 7 mm, u trajanju od 3, 6 i 9 minuta pri različitim amplitudama (50%,75%, 100%).

Dobiveni rezultati su prikazani pomoću stupičastih grafova uređenih tako da je na y-osi prikazana koncentracija određivanih spojeva u mg g^{-1}, a na x-osi su prikazani uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom; vrijeme trajanja ekstrakcije, amplituda i polarnost otapala.

4.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Na slikama 12. i 13. su prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola u cvijetu trnine u ovisnosti o utjecaju vodenih otopina metanola i etanola (50%, 70%), utjecaju trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%).



Slika 12. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina etanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

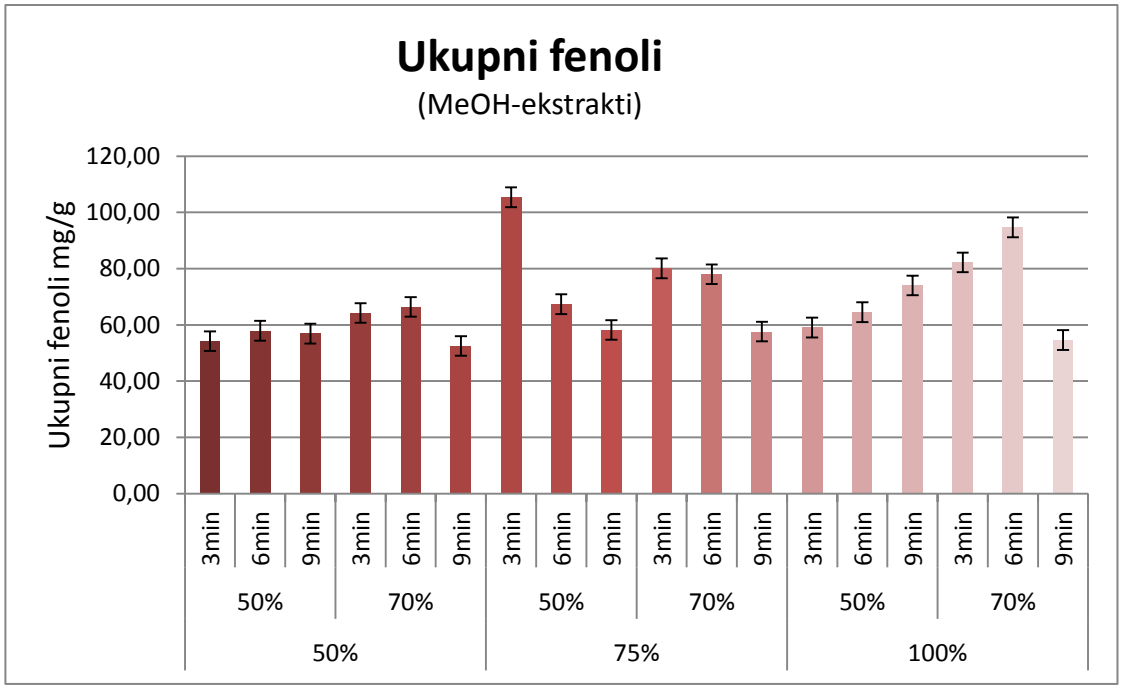
Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela etanola)daje veći prinos ukupnih fenola tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine etanola ostvaren je prinos ukupnih fenola u prosjeku 71,33 mgGAE g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine etanola ostvaren prinos ukupnih fenola u prosjeku od 77,46 mgGAE g^{-1}.

Izolacija ukupnih fenola provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele fenolnih spojeva. Udio ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 72,21 mgGAE g^{-1},te se povećanjem vremena ekstrakcije povećavao. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosilo 77,90 mgGAE g^{-1}, a dok je nakon 9 minuta postignut neznatno veći udio ukupnih fenola, u prosjeku je iznosio 77,92 mgGAE g^{-1}.

Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom tijekom procesa izolacije ukupnih fenola koristili smo različite amplitude 50%, 75% i 100%. Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da je maseni udio ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 69,89 mgGAE g^{-1}, primjenom amplitude75% i 100% vrijednosti su bile podjednake (79,13 mgGAE g^{-1} i 79,02 mgGAE g^{-1}). Na temelju rezultata može se zaključiti da je povećanje amplitude utjecalo na veću učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine.

Hossain i sur. (2012) su proveli istraživanje utjecaja ultrazvuka na izolaciju fenolnih spojeva iz mažurana gdje su utvrdili da je na izolaciju fenolnih spojeva značajan utjecaj imala amplituda ultrazvuka, a u manjoj mjeri vrijeme i temperatura. Ekstrakcija je provedena primjenom ultrazvučnog procesora snage 1500 W, promjera sonde 19 mm u trajanju 5 do 15 minuta pri temperaturi 15 do 35 °C s 80%-tnim metanolom. Tijekom našeg istraživanja primjenom etanola kao otapala ekstrakcija fenolnih spojeva bila je učinkovitija pri većoj amplitudi.

Kada se u obzir uzmu svi parametri ekstrakcije ukupnih fenola iz cvijeta trnine, može se zaključiti da se najbolji prinosi dobivaju primjenom 70 % vodene otopine etanola, tijekom vremena trajanja ekstrakcije od 6 minuta, primjenom amplitude od 75%.



Slika 13. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina metanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela metanola) ne utječe značajno na povećanje prinosa ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta trnine. U usporedbi 50% vodene otopine metanola sa 70 % vodenom otopinom metanola može se vidjeti da je primjenom 50% vodene otopine metanola ostvaren prinos ukupnih fenola u prosjeku 66,41 mgGAE g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine metanola ostvaren prinos ukupnih fenola u prosjeku od 70,04 mgGAE g^{-1}.

Izolacija ukupnih fenola provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele fenolnih spojeva tako što je maseni udio fenolnih spojeva pri vremenu ekstrakcije od 3 i 6 minuta bio podjednak, a duljim vremenom trajanja ekstrakcije smanjivao. Udio ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 74,21 mgGAE g^{-1}, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 71,49 mgGAE g^{-1} a dok je nakon 9 minuta postignut najmanji udio ukupnih fenola, u prosjeku je iznosio 58,97 mgGAE g^{-1}.

Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom tijekom izolacije ukupnih fenola koristili smo različite amplitude 50%, 75% i 100%, a rezultati pokazuju da je maseni udio

ukupnih fenola ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 58,69 mgGAE g^{-1}, primjenom amplitude75% iznosio je 74,46 mgGAE g^{-1}, dok je primjenom amplitude100% maseni udio ukupnih fenola u prosjeku iznosio 71,52 mgGAE g^{-1}. Povećanje amplitude do 75% utjecalo je na povećanje fenolnih spojeva tijekom ekstrakcije, dok daljnje povećanje amplitude do 100% nije imalo utjecaj na povećanje prinosa ukupnih fenola. Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva iz masline Jerman i suradnici (2010) su u vremenu trajanja ekstrakcije od 4 do 30 minuta utvrdili da se tijekom prvih 10 minuta ekstrahiralo oko 60% fenolnih spojeva te da dulja ekstrakcija u trajanju od 30 minuta ne rezultira povećanjem ekstrakcijskog kapaciteta. Na ekstrakcijski kapacitet veći utjecaj je pokazala promjena amplitude ultrazvuka od vremena trajanja ekstrakcije. Dobiveni rezultati su u skladu s našim rezultatima, na prinos fenolnih spojeva veći utjecaj je imalo povećanje amplitude, dok vrijeme trajanja ekstrakcije nije značajno utjecalo.

Kada se u obzir uzmu svi parametri ekstrakcije ukupnih fenola iz cvijeta trnine, može se zaključiti dasu najbolji prinosi dobiveni primjenom 50 % vodene otopine metanola, u trajanja ekstrakcije od 3 minute pri amplitudi od 75%.

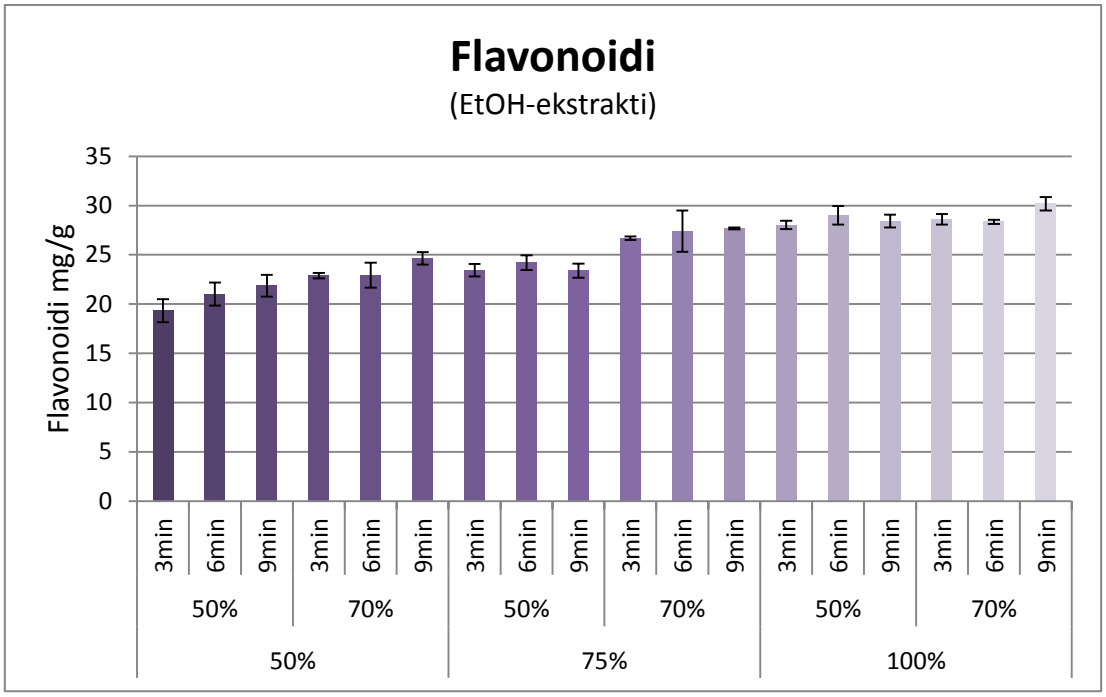
Iz dobivenih grafičkih podataka dobivenih spektrofotometrijskom metodom određivanja može se zaključiti da upotreba 70% vodenih otopina etanola i metanola omogućuje veće ekstrakcijske kapacitete u odnosu na 50% vodene otopine. Vodena otopina etanola pokazala je bolji ekstrakcijski kapacitet u odnosu na vodenu otopinu metanola. Maseni udio ukupnih fenola primjenom etanola u prosjeku iznosi 76,01 mgGAE g^{-1}, a primjenom metanola u prosjeku iznosi 68,22 mgGAE g^{-1}.

Na uzorcima cvijeta i lista gloga provedeno je istraživanje (klasična ekstrakcija, maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te su istraženi utjecaji temperature, otapala, snage i vremena trajanja ekstrakcije) utjecaja ekstrakcijskih parametara na ekstrakciju fenolnih spojeva, HPLC-UV/PAD metodom. Omjer uzorak: otapalo bio je 0.05g mL^{-1} za sve ekstrakcije. I ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima daju bolje prinose fenolnih spojeva. Kao otapala koristili su se etanol (25%, 50%, 75%, 96%), metanol (25%, 50%, 75%, 100%) te voda, u trajanju ekstrakcije od 60 minuta. Kao najbolje otapalo pokazao se 50% etanol u trajanju ekstrakcije do 30 minuta (Martino i sur. 2008). U našem istraživanju vodena otopina etanola se također pokazala kao bolje otapalo i omogućila je veće prinose fenolnih spojeva.

Wang i sur. (2004) su istraživali utjecaj otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz kadulje, timijana, bosiljka i lavande. Kao otapala koristili su različite koncentracije otopina metanola, etanola, acetona (30-60%). Veće ekstrakcijske kapacitete postigli su primjenom vodenih otopina etanola te su utvrdili da se primjenom otapala sa većim udjelom alkohola dobiju veći prinosi fenolnih spojeva tijekom ekstrakcije. Tijekom našeg istraživanja vodena otopina etanola s većim udjelom alkohola je pokazala veće prinose tijekom ekstrakcije, što je u skladu s njihovim rezultatima.

4.2. Rezultati određivanja flavonoida

Na slikama 14. i 15. su prikazani rezultati ukupnih flavonoida u cvijetu trnine. Prikazan je utjecaj vodenih otopina metanola i etanola, različitih volumnih udjela (50%, 70%) u otapalu za ekstrakciju, utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%) na izolaciju ukupnih flavonoida iz cvijeta trnine.



Slika 14. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina etanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima, utvrđeno je da se smanjenjem polarnosti otapala (povećanjem udjela etanola) ostvaruje veći prinos ukupnih flavonoida tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine etanola ostvaren je prinos flavonoida u prosjeku 24,31 mgg^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine etanola ostvaren prinos flavonoida u prosjeku od 26,61 mgg^{-1}.

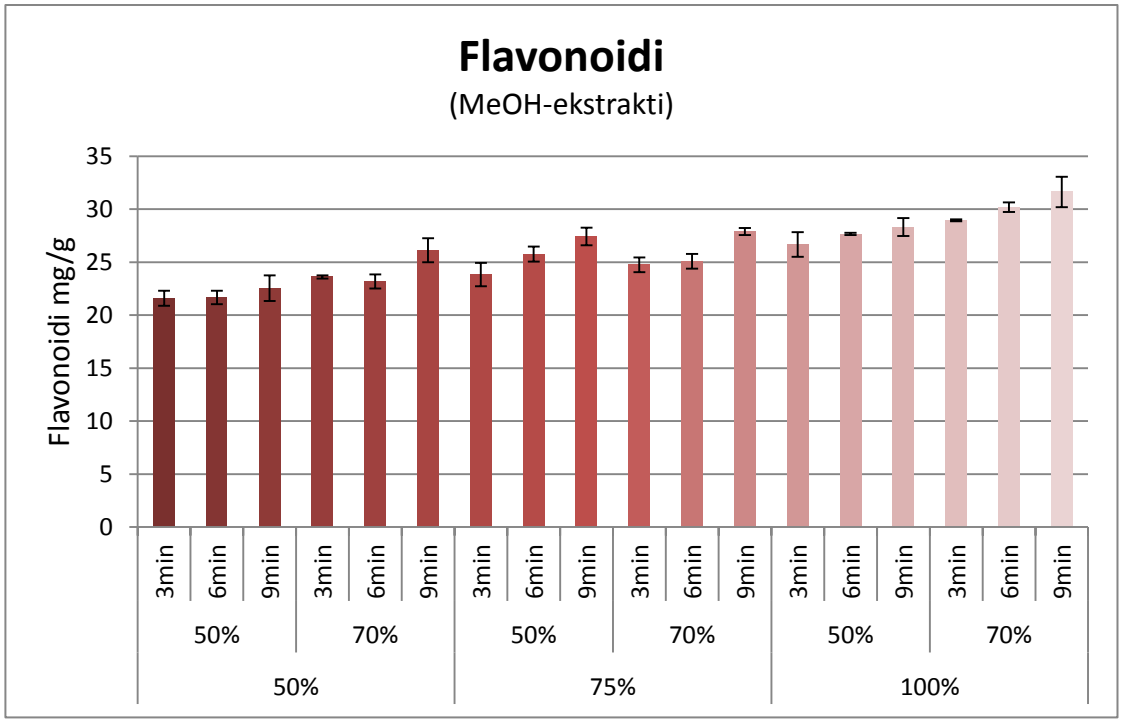
Wang i sur. (2012) istraživali su utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na ekstrakciju ukupnih flavonoida iz korijena biljke *I. Helenium*, primjenom različitih koncentracija vodene otopine etanola. Tijekom ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji najbolji prinos ukupnih flavonoida dobiveni su primjenom 60% etanola u trajanju ekstrakcije od 20 minuta. Rezultati naših istraživanja također su potvrdili da se primjenom otapala manje polarnosti dobivaju veći prinosi flavonoida.

Pan i sur. (2012) su proveli istraživanje učinka ultrazvučne ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih flavonoida iz sjemena gloga. Ekstrakcija se odvijala u ultrazvučnoj kupelji uz upotrebu vodene otopine etanola različite koncentracije. Za ukupne flavonoide određeni su optimalni parametri ekstrakcije: 72% etanol, temperatura 65 ° C te vrijeme 37 minuta. Najveći prinos ukupnih flavonoida je bio 16,45±0,02 mg g^{-1}. Rezultati naših istraživanja također su potvrdili da se primjenom otapala manje polarnosti dobivaju veći prinosi flavonoida.

Izolacija flavonoida provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele flavonoida, možemo vidjeti linearan porast masenog udjela flavonoida. Udio flavonoida u ekstraktu dobivenom nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 24,83 mgg^{-1}, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 25,48 mg g^{-1} a dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio flavonoida, u prosjeku je iznosio 26,03 mg g^{-1}.

Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da je maseni udio flavonoida ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 22,11 mg g^{-1}, primjenom 75% amplitude iznosio je 25,47 mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio flavonoida u prosjeku iznosio 28,77 mg g^{-1}.

Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su najbolji prinosi dobiveni primjenom 70 % vodene otopine etanola, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije i povećanjem amplitude ostvaruju se veći ekstrakcijski prinosi flavonoida.



Slika 15. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina metanolau vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela metanola) daje veći prinos flavonoida tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine metanola ostvaren prinos flavonoida u prosjeku 25,05 mgg^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine metanola ostvaren prinos flavonoida u prosjeku od 26,81 mgg^{-1}.

Izolacija flavonoida provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na povećanje masenog udjele flavonoida. Udio flavonoida u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 24,89 mg g^{-1}, te se povećanjem vremena ekstrakcije povećavao, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 25,58 mg g^{-1}, a dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio flavonoida, u prosjeku je iznosio 27,32 mg g^{-1}.

Na temelju dobivenih rezultata može se vidjeti da je maseni udio flavonoida ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 23,11 mg g^{-1}, primjenom 75% amplitude iznosio je 25,78 mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio flavonoida u prosjeku iznosio 28,91 mg g^{-1}. Povećanjem amplitude tijekom ekstrakcije flavonoida maseni udio flavonoida se povećavao.

Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su najbolji prinosi dobiveni primjenom 70 % vodene otopine metanola, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije i povećanjem amplitude ostvaruju se veći ekstrakcijski prinosi flavonoida.

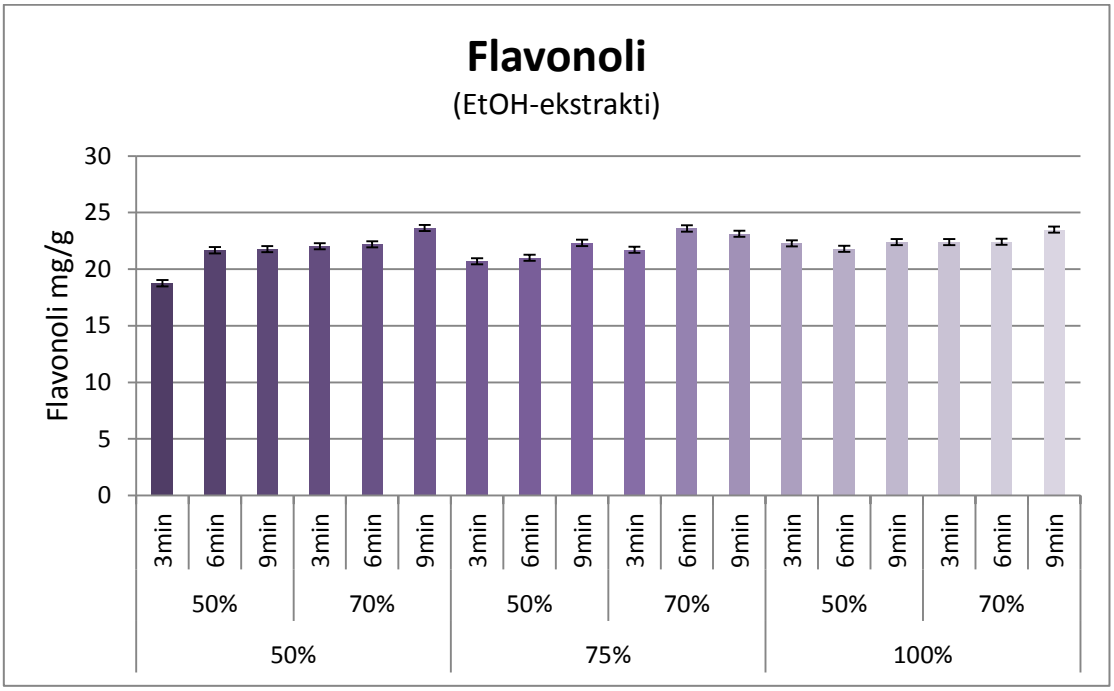
Iz grafičkih podataka dobivenih spektrofotometrijskom metodom određivanja može se zaključiti da upotreba 70% vodenih otopina etanola i metanola omogućuje veće ekstrakcijske kapacitete u odnosu na 50% vodene otopine. Vodena otopina metanola pokazala je nešto veći ekstrakcijski kapacitet u odnosu na vodenu otopinu etanola, ali te razlike su jako male. Maseni udio flavonoida etanolom iznosi u prosjeku 25,44 mg g^{-1}, a metanolom 25,93 mgg^{-1}.

Zhang i sur. (2008) su u svome istraživanju pokazali da primjenom veće amplitude, ultrazvučni val kroz vodeni medij putuje tako da stvara puno više kavitacijskih mjehurića. Primjenom veće snage ultrazvuka uslijed agresivnog djelovanja kavitacijskog mehanizma staničnim stijenkama uzrokovanog bržim kretanjem molekula, dolazi do većeg ekstrakcijskog kapaciteta. Na temelju naših rezultata (Slika 14. i 15.) iz grafa se može vidjeti da se povećanjem amplitude povećava ekstrakcijski kapacitet flavonoida, što je u skladu s navedenim istraživanjem.

Fecka i Tureck (2008) su u svome istraživanju proveli ekstrakciju flavonoida iz timijana i mažurana u ultrazvučnoj kupelji primjenom 30%, 50% i 70% vodene otopine metanola u trajanju 15-30 minuta, te su zaključili da količina ekstrahiranih flavonoida ovisi o postotku vodene faze u otapalu. Oni su koristili ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji i zaključili su da je najpovoljnije otapalo 50% vodena otopina metanola. U našem radu se na temelju dobivenih podataka primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s direktno uronjenom sondom pokazalo da je 70% vodena otopina metanola bolje otapalo. Iz navedenih rezultata se može naći poveznica da primjenom otapala manje polarnosti ostvaruju se veći ekstrakcijski kapaciteti flavonoida.

4.3. Rezultati određivanja flavonola

Na slikama 16. i 17. su prikazani rezultati ukupnih flavonolau cvijetu trnine. Prikazan je utjecaj vodenih otopina metanola i etanola, različitih volumnih udjela (50%, 70%) u otapalu za ekstrakciju, utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%) na izolaciju ukupnih flavonola iz cvijeta trnine.



Slika 16. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonola u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina etanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

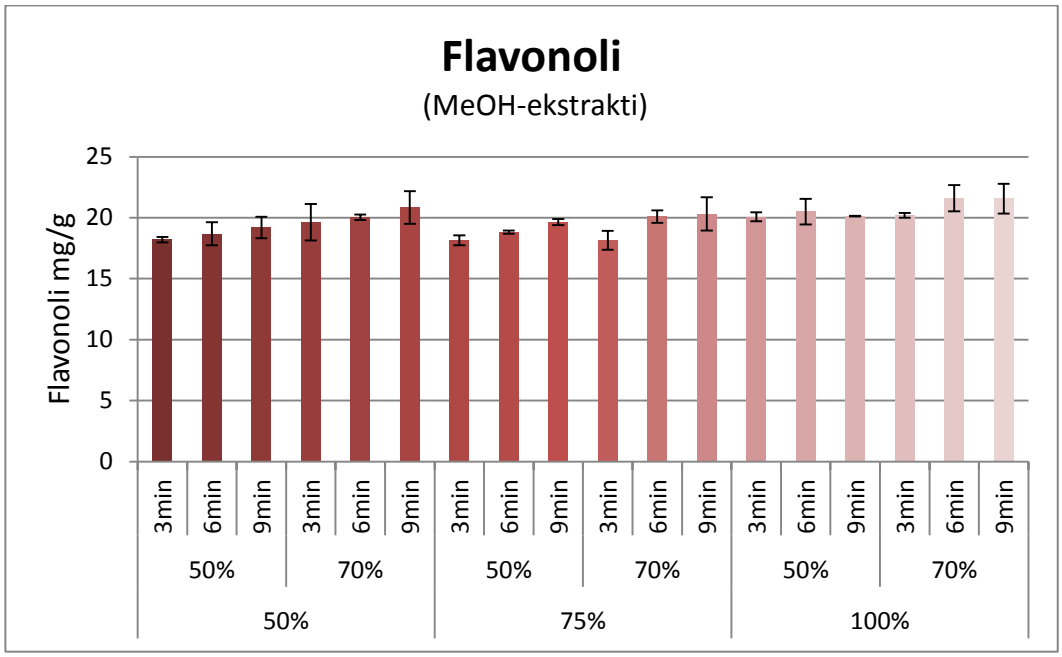
Prema dobivenim rezultatima o utjecaju vrste i polarnosti otapala na ekstrakciju flavonola, utvrđeno je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela etanola) daje veće prinose flavonola tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine etanola ostvaren je prinos flavonola u prosjeku 21,42 mg g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine etanola ostvaren prinos flavonola u prosjeku od 22,74 mg g^{-1}.

Izolacija flavonola provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Udio flavonola u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 21,31 mg g^{-1}, te se povećanjem vremena trajanja povećavao, nakon 6 minuta u prosjeku je

iznosio 22,12mgg^{-1}, a dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio flavonola, u prosjeku je iznosio 22,79 mg g^{-1}.

Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom tijekom procesa izolacije flavonola koristili smo različite amplitude 50%, 75% i 100%. Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da je maseni udio flavonola ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 21,68 mg g^{-1}, te se povećanjem amplitude povećavao, primjenom 75% amplitude iznosio je 22,08mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio flavonola u prosjeku iznosio 24,47mg g^{-1}.

Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su najbolji prinosi dobiveni primjenom 70 % vodene otopine etanola, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije i povećanjem amplitude ostvaruju se veći ekstrakcijski prinosi flavonola.



Slika 17. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonola u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina metanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima o utjecaju vrste i polarnosti otapala na ekstrakciju flavonola, utvrđeno je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela metanola) daje veće prinose flavonola tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine metanola ostvaren prinos flavonola u prosjeku 19,27 mg g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine metanola ostvaren prinos flavonola u prosjeku od 20,27 mg g^{-1}.

Izolacija flavonola provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele flavonola tako što se udio maseni spojeva duljim vremenom trajanja ekstrakcije linearno povećavao. Udio flavonola u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 19,07 mg g^{-1}, te se povećanjem vremena trajanja ekstrakcije povećavao, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 19,95 mg g^{-1}, a dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio flavonola, u prosjeku je iznosio 20,28 mg g^{-1}

Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da se maseni udio flavonola ostvaren promjenom amplituda povećavao. Primjenom amplitude od 50% u prosjeku je maseni udio iznosio 19,43mg g^{-1}, primjenom 75% amplitude iznosio je 19,21mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio flavonola u prosjeku iznosio 20,71mg g^{-1}.

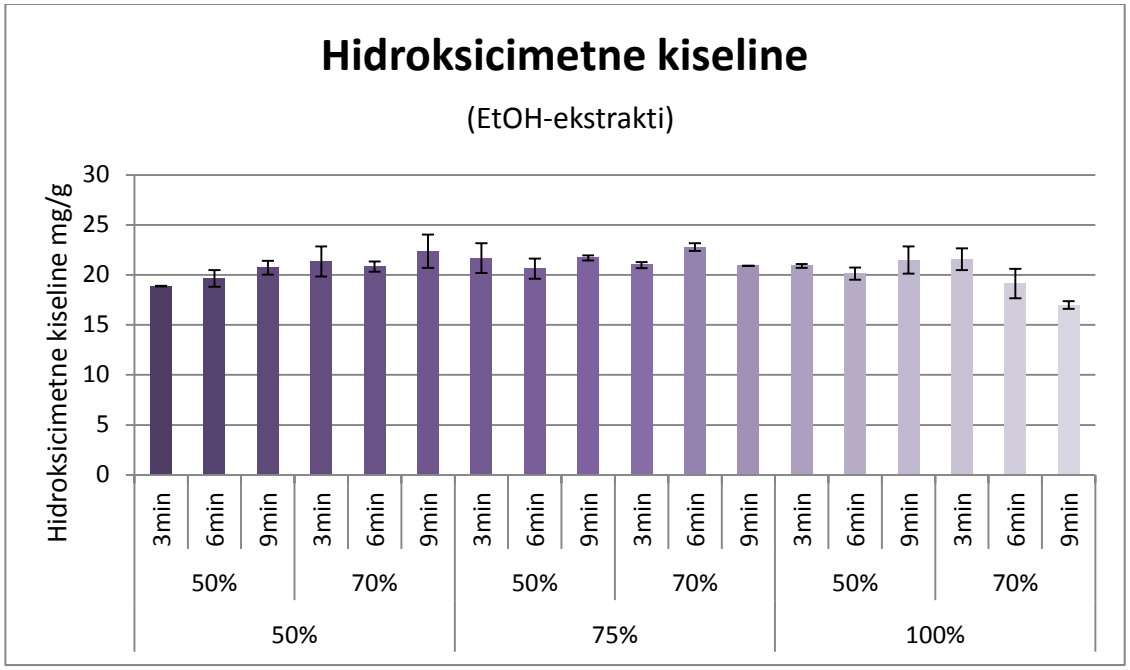
Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su najbolji prinosi dobiveni primjenom 70 % vodene otopine metanola, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije ostvaruju se veći prinosi flavonola, promjenom amplitude prinosi fenola se također povećavaju.

Iz grafičkih podataka dobivenih spektrofotometrijskom metodom određivanja može se zaključiti da upotreba 70% vodenih otopina etanola i metanola omogućuje veće ekstrakcijske kapacitete u odnosu na 50% vodene otopine. Vodena otopina etanola pokazala je veći ekstrakcijski kapacitet u odnosu na vodenu otopinu metanola. Maseni udio flavonola etanolom iznosi u prosjeku 22,07 mg g^{-1}, a metanolom 19,77mg g^{-1}.

Fecka i Tureck (2008) su u svome istraživanju proveli ekstrakciju flavon glikozida iz timijana i mažurana u ultrazvučnoj kupelji primjenom 30%, 50% i 70% vodene otopina metanola u trajanju 15-30 minuta, te su zaključili da količina ekstrahiranih flavon glikozida ovisi o postotku vodene faze u otapalu. Oni su koristili ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji i zaključili su da je najpovoljnije otapalo 50% vodena otopina metanola. Dobiveni rezultati se razlikuju od naših rezultata, u našem istraživanju je 70% vodena otopina metanola bila povoljnija tijekom ekstrakcije ultrazvukom s direktno uronjenom sondom.

4.4. Rezultati određivanja hidroksicimetnih kiselina

Na slikama 18. i 19. su prikazani rezultati ukupnih hidroksicimetnih kiselinau cvijetu trnine. Prikazan je utjecaj vodenih otopina metanola i etanola, različitih volumnih udjela (50%, 70%) u otapalu za ekstrakciju, utjecaj trajanja vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%) na izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina iz cvijeta trnine.



Slika 18. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina etanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima o utjecaju vrste i polarnosti otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina, utvrđeno je da smanjenjem polarnosti otapala (povećanjem udjela etanola) oba otapala su pokazala podjednake količine ekstrahiranih hidroksicimetnih kiselina. Primjenom 50% vodene otopine etanola ostvaren prinos hidroksicimetnih kiselina u prosjeku 20,64 mg g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine etanola ostvaren prinos hidroksicimetnih kiselina u prosjeku od 20,77 mg g^{-1}.

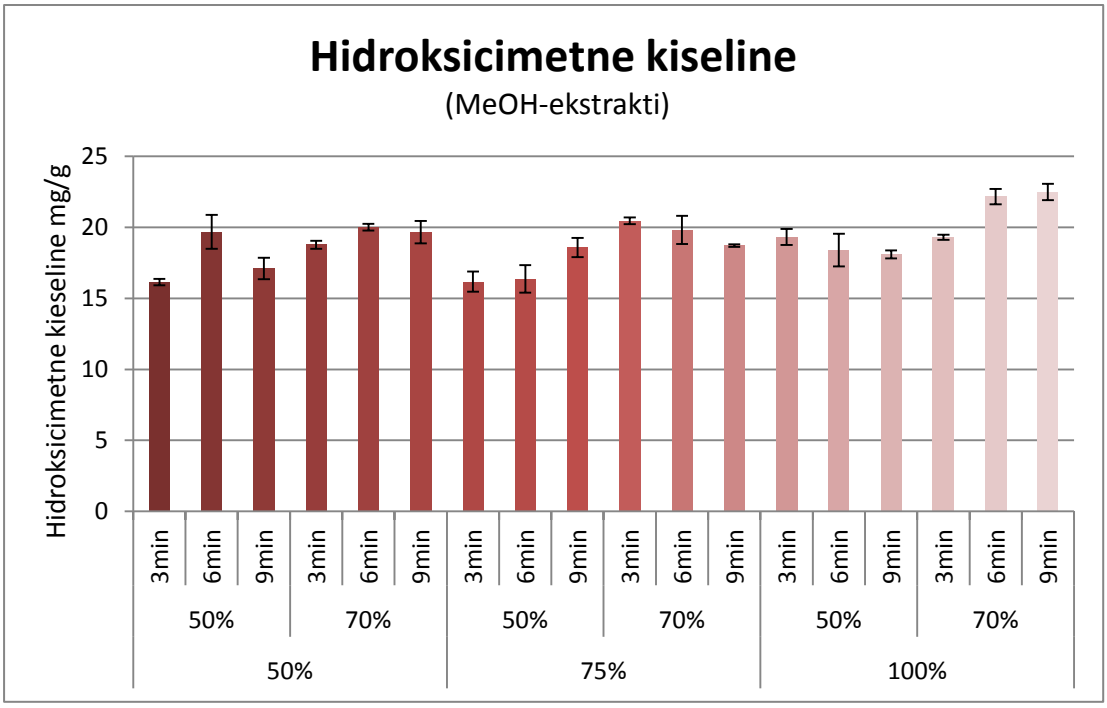
Liu i sur. (2015) su ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom iz biljke *Cimicifugae rhizoma* izolirali različite fenolne kiseline (klorogensku, feruličnu i izoferuličnu kiselinu).

Kao otapalo korištene su vodene otopine etanola (40%, 60%, 80%). Povećanjem udjela alkohola u otopini prinos navedenih kiselina se povećavao. Dobiveni rezultati su u skladu s našim rezultatima, gdje je utvrđeno da se smanjenjem polarnosti otapala količina ekstrahiranih hidroksicimetnih kiselina povećava.

Izolacija hidroksicimetnih kiselina provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na masene udjele hidroksicimetnih kiselina. Udio hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 20,89mg g^{-1}, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 20,52mg g^{-1}, dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio hidroksicimetnih kiselina u prosjeku 20,70mg g^{-1}.

Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da je maseni udio hidroksicimetnih kiselina ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 20,63mg g^{-1}, primjenom 75% amplitude iznosio je 21,45mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio hidroksicimetnih kiselina u prosjeku iznosio 20,04mg g^{-1}.

Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su oba otapala omogućila podjednake masene prinose hidroksicimetnih kiselina, promjenom vremena trajanja ekstrakcije također su dobiveni podjednaki maseni prinosi, dok je amplituda od 75% pokazala najveće prinose iako se značajno ne razlikuje od primjene ostalih amplituda.



Slika 19. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u cvijetu trnine (mg g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom 50 % i 70% vodenih otopina metanola u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta pri amplitudama od 50%, 75% i 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Prema dobivenim rezultatima o utjecaju vrste i polarnosti otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina, utvrđeno je da smanjenje polarnosti otapala (povećanjem udjela metanola) daje veće prinose hidroksicimetnih kiseline tijekom ekstrakcije. Primjenom 50% vodene otopine metanola ostvaren prinos hidroksicimetnih kiselina u prosjeku 17,75mg g^{-1}, dok je kod primjene 70% vodene otopine metanola ostvaren prinos hidroksicimetnih kiselina u prosjeku od 20,14mg g^{-1}.

Izolacija hidroksicimetnih kiselina provedena je pri vremenu trajanja ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele hidroksicimetnih kiselina. Udio hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu dobivenom uz primjenu nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 18,35mg g^{-1}, te se povećao, nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 19,41mg g^{-1}, a dok se nakon 9 minuta neznatno smanjio, postignuti udio hidroksicimetnih kiselina, u prosjeku je iznosio 19,09mg g^{-1}.

Na temelju dobivenih podataka može se vidjeti da se maseni udio hidroksicimetnih kiselina povećava primjenom veće amplitude. Primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 18,55mg g^{-1}, primjenom 75% amplitude iznosio je 18,34mg g^{-1}, dok je primjenom 100% amplitude maseni udio hidroksicimetnih kiselina u prosjeku iznosio 19,95mg g^{-1}.

Na temelju ovoga grafa može se zaključiti da su najbolji prinosi dobiveni primjenom 70 % vodene otopine metanola, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije nema nekih značajnih promjena, povećanje amplitude također ne utječe značajno na masene udjele hidroksicimetnih kiselina.

Iz grafičkih podataka dobivenih spektrofotometrijskom metodom određivanja može se zaključiti da upotreba 70% vodenih otopina etanola i metanola omogućuje veće ekstrakcijske kapacitete u odnosu na 50% vodene otopine. Vodena otopina etanola pokazala je veći ekstrakcijski kapacitet u odnosu na vodenu otopinu metanola. Maseni udio hidroksicimetnih kiselina etanolom iznosi u prosjeku 20,71mg g^{-1}, a metanolom 18,95mg g^{-1}.

Iz dobivenih rezultata spektrofotometrsijkom metodom određivanja hidroksicimetnih kiselina primjenom različitih vrsta otapala metanola i etanola te promjenama amplitude i vremena trajanja ekstrakcije može se zaključiti da je primjenom 70% vodene otopine etanola postignut malo bolji ekstrakcijski kapacitet hidoksicimetnih kiselina. Promjenom amplitude i vremenom trajanja ekstrakcije mogu se uočiti promjene u prinosu hidroksicimetnih kiselina, ali te promjene nisu toliko značajne.

Paniwnyk i sur. (2009) su istraživali utjecaj različitih metoda ekstrakcija na izolaciju fenolnih kiselina iz ružmarina te se najbolji učinak postigao primjenom etanola u odnosu na metanola primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom. Iz naših rezultata također se može vidjeti da je primjenom etanola postignut bolji prinos spojeva koje smo određivali.

Jun (2009) je istraživao optimalne ekstrakcijske uvjete za ekstrakciju kafeina iz zelenog čaja primjenom visokog tlaka. Ispitivan je utjecaj ekstrakcijskih otopina etanola, metanola, acetona i vode, u koncentracijama 0-100%, pri tlaku 100-600 MPa. Najveći prinos je postignut primjenom 50%-tne otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala, pri tlaku od 500 MPa i vremenu ekstrakcije 1 min. Dobiveni rezultati su u skladu s našim rezultatima, gdje se etanol pokazao kao bolje ekstrakcijsko otapalo od metanola.

Veličković i sur. (2006) su proveli usporedbu klasične ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na kadulji upotrebom otapala različite polarnosti pri čemu je

ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bila učinkovitija. Provedenom ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji udio ekstrahiranih komponenti raste s polarnošću otapala. Dobiveni rezultati su u skladu s našim rezultatima tijekom cijelog istraživanja, 70% vodene otopine su dale veće ekstrakcijske prinose.

5. ZAKLJUČCI

1. Bolja učinkovitost izolacije svih skupina fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina) iz cvijeta trnine (*Pruni Spinosi Flos)*, uz primjenu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ostvarena je uz primjenu etanola kao otapala. Također bolji prinosi su ostvareni uz primjenu otapala s većim udjelom alkohola (i kod etanola i metanola), tj.veće koncentracije fenolnih spojeva dobivene su otapalima u kojima je udjel alkohola bio 70 % (neovisno o vrsti otapala).
2. Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ostvareni su veći ekstrakcijski prinosi ukupnih fenola, flavonoida i flavonola iz cvijeta trnine (*Pruni Spinosi Flos)*pri dužem vremenu trajanja ekstrakcije. Najveći prinos ukupnih fenola, flavonoida i flavonola ostvaren je u etanolnim ektraktimau vremenu trajanja ekstrakcije od 9 minuta. Vrijeme trajanja ekstrakcije nije utjecalo na ekstrakcijske prinose hidroksicimetnih kiselina.
3. Bolja učinkovitost izolacije svih fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina) iz cvijeta trnine (*Pruni Spinosi Flos),* uz primjenu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ostvarenaje povećanjem amplitude. Tijekom izolacije ukupnih fenola u etanolnim i metanolinim ekstraktima primjenom amplitude od 75% ostvareni su najveći prinosi. Najveći prinos flavonoida i flavonola u etanolnim i metanolnim ekstraktima postignut je primjenom amplitude od 100%. Tijekom izolacije hidroksicimetnih kiselina povećanje amplitude nije utjecalo na masene prinose.
4. Optimalni uvjeti izolacije ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina iz cvijeta trnine primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ostvareni su pri sljedećim uvjetima:
   - ukupni fenoli (77, 46 mg g^{-1}) i hidroksicimetne kiseline (20,77 mg g^{-1}) - pri amplitudi 75 % i trajanju ekstrakcije 9 minuta
   - flavonoidi (26,81 mg g^{-1}) i flavonoli (22,74 mg g^{-1}) - pri amplitudi 100 % i trajanju ekstrakcije 9 minuta

6.LITERATURA

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2004) Potential for the use of ultrasound int he extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasound. Sonochem*. **11,** 261-265.
- Anonymous 1. http://www.prirodni-lijek.com/ pristupljeno 23.02.2016
- Anonymous2. http://www.koval.hr/ (pristupljeno 23.02.2016
- Balachandar, N., Kentish, S.E., Mawson, R., Ashokkumar, M. (2006) Ultrasonic enchancement oft he supercritical extraction from ginger. *Ultrasound. Sonochem.* **13,** 471-479.
- Blasco, A.J., Rogerio, M.C., González, M.C., Escarpa, A. (2005) "Electrochemical Index" as a screening method to determine "Total polyphenolics" in foods: A proposal. *Anal. Chim. Acta.***539**, 237-244.
- Blekić, M., Jambrek-Režek, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**(2), 32-47.
- Brajdić, Z. (2005)Promjena fenolnih spojeva u plodu trnine (*Prunus spinosa L.*) tijekom dozrijevanja, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.***56**, 317-333.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, B., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka niskog inteznziteta pri obradi hrane. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr*. **4** (1-2), 32-37
- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava, A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra-red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatmant. *Afr. J. Biotech*. **9** (41), 6907.
- Calvo, Dra. M.I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.*)* and influence on in vitro digestion an their antioxidant capacity, Facultad de Farmacia, Univeridad de Navarra.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation, preservation and extraction. *Ultrasoun. Sonochem*. **11**, 281-285
- De Castro, L. M. D., Capote, P. F. (2007) Analytical applications of ultrasound. Elsevier Science, Langford Lane, Oxford, Great Britian.

- 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.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29** (3) 475-484
- Dobričević, N., Voća, S., Žlabur-Šic, J., Ćališ, LJ., Galić, A., Pliestić, S. (2014) Nutritivna vrijednost soka šljive sorte 'Stanley' (49. hrvatski i 9. međunarodni simpozij agronoma, Dubrovnik, Hrvatska).
- Drmić, H., Jambrek-Režek, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva.*Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**.(2)22-33.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., Mofardin, I. (2013) Ultrasound-assisted infrared drying of Pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.***36**, 397.
- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000) Analytical- Scale Microwave Assisted Exstraction. *J. Chromatogr*.**902**, 227-250.
- Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.***108**, 1039-1053.
- Fennema, O.R. (1985) Food Chemistry, Marcel Dekker, Inc, New York, str. 557-564.
- Fruhbeck, G. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality. *Br. Med. J*. **312**, 1479.
- Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A. (1994) Influence of variety, maturity and processing on phenolic copmounds of apricot juices and jams. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. **19**, 433-436
- Gelenčir, J. (1991) Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb.
- Grlić, Lj. (1986) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb.
- Gursky, Z. (1999) Zlatna knjiga ljekovitog bilja, 5. Izd., Nakladni Zavod Matice Hrvatske, Zagreb.
- Harborne, J.B., (1980) Plant Phenolich, U: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol 8, (Bell, E.a., Charlwood, B.V., ured.), Springer-Verlag, Berlin.
- Harborne, J.J., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chichester.
- Haslam, E. (1977) Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry, *Phytochem*. **16**, 1625-1630.

- Haslam, E. (1981) Vegetable tannins, u: *The Biochemistry pf Plants*, (Stumpf, P.K., Conn, E.E., ured.), Academic Press, New York, USA, str. 527-556.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambrek Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo,* **59** (1), 65-69.
- Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.*, **19**, 582-590.
- Hromádková, Z., Kováčiková, J., Ebringerová, A. (2001) Study oft he classical and ultrasound-assisted extraction oft he corn cob xylan. *Ind. Crops Prod.,* **9,** 101-109.
- Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodipivec, B. (2010) Ultrasonud-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea Europaea*) phenolic copmouds. *Food Chem*. **123**, 175-182
- Jun, X. (2009) Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing.*J. Food Eng.***94,** 105–109.
- Jurasović, K. (2006) Određivanje antocijana i antioksidativne aktivnosti u plodovima, sirupu i nektarima trnine *(Prunus spinosa L.)* Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Klen, T.J., Vodopivec, B.M. (2012) Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food Chemistry*, **134**, 2481-2488
- Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić,M., Grimi, N.,
- Boussetta,N., Barba, F.J. (2015) Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from Stevia rebaudiana Bertoni. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 63, 6835-684
- Liu, L., Shen, B.J., Xie, D.H., Cai, B.C., Qin, K.M., Cai, H. (2015) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from*Cimicifugae rhizoma* with response surface methodology, *Phcog. Mag.* **11**(44), 682-689.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- MarakoğLu, T., Arslan, D., Özcan, M., Hacisefoğullan, H. (2005) Proximate copmosition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa L.*) subsp. *Dasyphylla* (Schur)) fruits, *J. Food Eng.* **68**, 137-142.
- Martino, E., Collina, S., Rossi, D., Bazzoni, D., Gaggeri, R., Bracco, F., Azzolina, O. (2008) Influence of the Extraction Mode on the Yield of Hyperoside, Vitexin and Vitexin-2″-*O*-Rhamnoside from *Crataegusmonogyna* Jacq. (Hawthorn). *Phytochem. Anal.* **19**, 534–540.
- McClements, D.J. (1995) Advances int he appliction of ultrasound in food analysis and processing, *Trends in Food Science*, **45**, 293.
- Ninčević Grassino A., **Brnčić M**., Vikić-Topić D., Roca S., Dent M., Rimac Brnčić S. (2016) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chemistry*, 198, 93-100
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2000) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa L. Herba Polon. Pharm*., **46**, 234-249
- Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts nad wines, 2. izd., John Wiley & sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Özbeck, S. (1987) Special friuts, *Cukurova Univ. Agric Fac. Publ*. **128**, 223-252.
- Panywnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J., Cole, R. (2009) The enhancement and scale up oft he extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason. Sonochem*. **16**, 287-292.
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. (2012) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounda (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem*. **19**, 486-490.
- Pleše, V. (2002) Trnina, crni trn (*Prunus spinosa L.*), *Hrvatske šume,* **65**, 24-25.
- Pejkić, B., Nikolovski, I. (1989) Kajsija, Nolit, Beograd, str. 11-19.
- Ren, Y-Z., Wu, Z-L, Franke, M., Braeutigam, P., Ondruschka, B., Comeskey, D.J., King, P.M. (2013) Sonoelectrochemical degradation of phenol in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**, 715-721.
- Robards K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.***66**, 401-436.
- Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnčić, M., V. Orlien, Trujillo F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015) Clean Recovery of Antioxidant Compounds from Plant Foods, By-Products and Algae Assisted by Ultrasounds

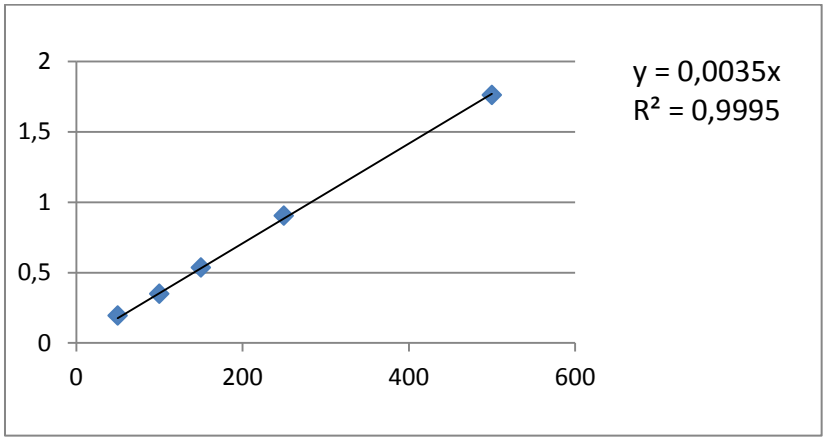
Processing: Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends in Food Science & Technology*. 42, 134-149.

- Ruiz_rodrigez, B.M., Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., Fernandez-Ruiz, V., Sanchez-Mata, M.C., Camara, M., Tardio, J. (2014) Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as aluable sources of antioxidants. *Fruits*, **69**, 61-73.
- Santos-Buelga, C., Scalber, A. (2000) Review- Proanthocyanidinis and tannin- like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. J. *Sci. Food Agric*. **80,** 1094-1117.
- Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J. (2008) The Power of Ultrasound. U:Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications (Capelo-Martínez, J.L., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1-15.
- Schuster, B., Herrmann, K., (1985) Hydroxybenzoic and hydroksycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytocemistry*. **24**, 2761-2764.
- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1994) Phenolics of Apple, Pear and White Grape Juices and their Changes with Processing and storage-Rewiev. *J. Agric. Food. Chem*. **40**, 1478-1487.
- Strack, D. (1997) Phenolic metabolism. U: *Plant biochemistry*, (Dey, P.M.; Harborne, J.B., ured.), Academic Press, London, UK, str. 387-416.
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S., (2015) Optimization of Ultrasound assisted extraction of functional ingredients from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29, 231-237
- Šilić, Č. (1983) Atlas drveća i grmlja, 2. izd., Svjetlost, Sarajevo.
- Šoštarić, R., Dizdar, M., Kušan, D., Hršak, V., Mareković, S. (2006) Comparative Analysis of Plant Finds from Early Roman Graves in Ilok (*Cuccium*) and Šćitarjevo (*Andautonia),* Croatia- A Contribution to Understanding Burial Rite sin Southern Pannonia, *Coll. Antropol*. **30**, 429-436.
- The Wild Fruit and Nut Plants of Kazahstan, (2004) Kazahstan Academy of Science Interbranch Laboratory for the Protection of gemplasm, Almaty, Republic of Kazahstan.
- Tomás-Barberán, A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.I., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2001) HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Copmounds in Nectarines, Peaches and Plums, *J.Agric.Food Chem*. **49**, 4748-4760.

- Tsao, R., Yang, R. (2003) Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic indexusing high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1018**, 29–40.
- Veličković, D.T., Milenović, D.M., veljković, V.B. (2006) Kinetics of ultrasonic extractio of extractive substances from garden (*Salvia officinalis L.)* and glutinous (*Salvia glutinosa L.)* saga, *Ultrason. Sonochem*., **13**, 150-156.
- Vinatoru, M. (2001) An overwiev oft he ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.*, **8**, 303-313.
- Wang, H., Provan, G., Helliwel, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* **87**, 307-311.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Techno.l*, **17**, 300-312.
- Wang, J., Zhao, Y.M., Guo, C.Y., Zhang, S.M., Liu, C.L., Zhang, D.S., Bai, X.M. (2012) Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Inula Helenium, Phcog. Mag*., **8**, 166-170.
- Weinges, K., Piretti, M.V. (1971) Isolation of procyanidin B1 from grapes. *Justus Liebig Ann. Chem.* **748**, 218-224.
- Willfort, R. (1989) Ljekovito bilje i njegova upotreba, 3. izd., Mladost, Zagreb.
- Wu, J., Lin, L., Chau, F.T. (2001) Ultrasound-assisted extraction of ginseg cell. *Ultrason. Sonochem.*, **8,** 347-352.
- Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Li, D., Jao, S.S., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008) Ultrasound assisted extraction of oil from flaxseed. *Sep. Purif. Technol.*, **62**, 192-198.

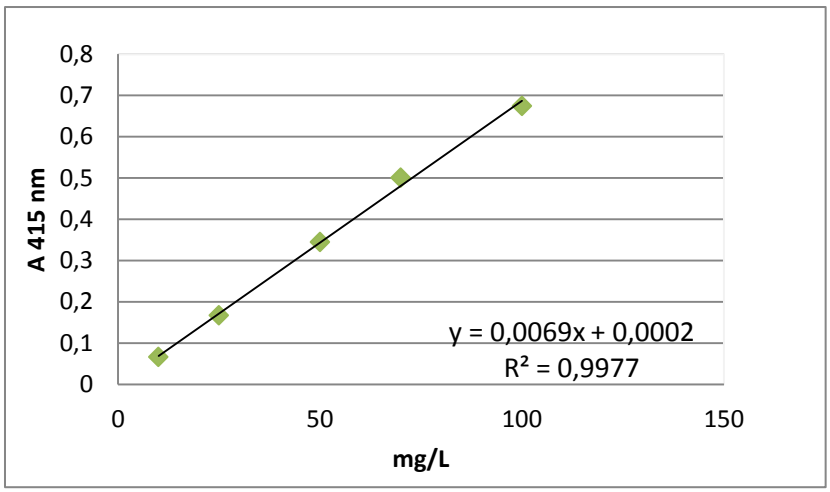
7. PRILOZI

7.1. Baždarni dijagram za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola



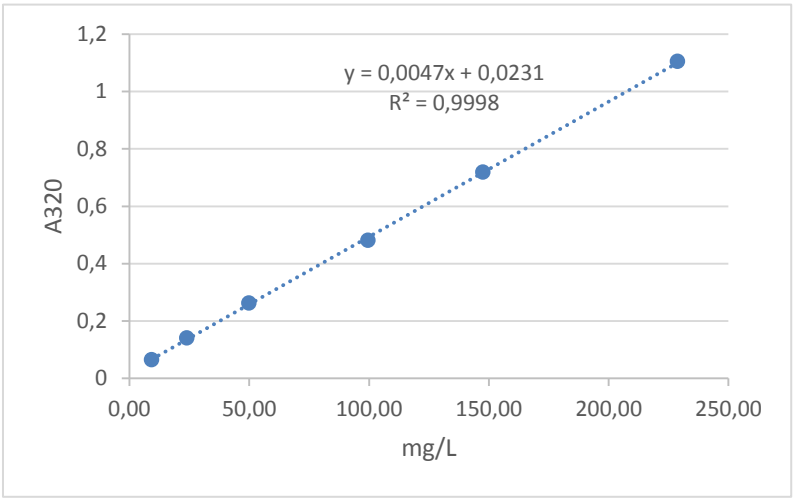
mg L^{-1}	A 765 nm
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

7.2. Baždarni dijagram za izračunavanje koncentracije flavonoida



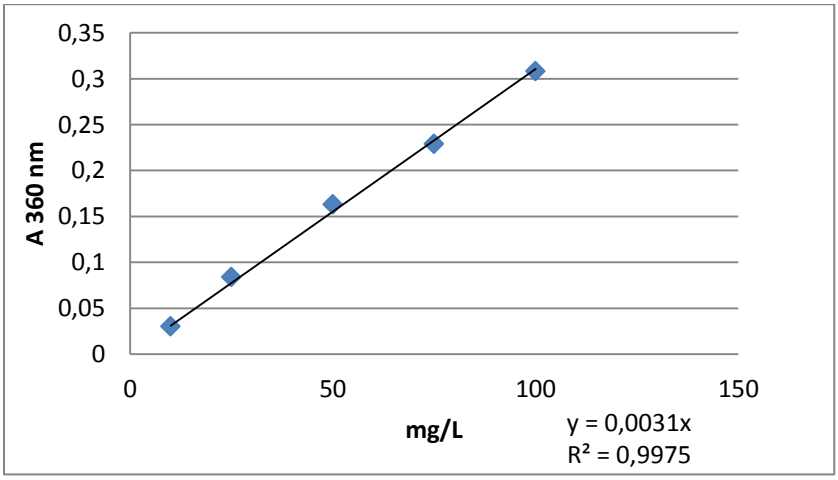
γ (mg L^{-1})	A 415 nm
10	0,066
25	0,167
50	0,344
70	0,5
100	0,674

7.3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije hidroksicimetnih kiselina



γ (mg/L)	A 320 nm
9,23	0,065
23,99	0,141
49,82	0,262
99,63	0,481
147,60	0,718
228,78	1,104

7.4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije flavonola



γ (mg L^{-1})	A 360 nm
10	0,03
25	0,084
50	0,163
75	0,229
100	0,308