Optimiranje parametara ekstrakcije fenolnih spojeva gloga (Crataegi folium cum flore) primjenom ultrazvuka

Bunoza, Dragica

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:159:576813

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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.

Dragica Bunoza
658/PI

OPTIMIRANJE PARAMETARA ESKTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA GLOGA (*Crataegi folium cum flore*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Rad je izrađen pod mentorstvom prof.dr.sc Branke Levaj te uz pomoć dr.sc Ivone Elez-Garofulić dijelom u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te dijelom uz nadzor prof.dr.sc. Mladena Brnčića u Laboratoriju za tehničku termodinamiku Zavoda za procesno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

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

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.

Od srca hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Branki Levaj na trudu i pomoći, te brojnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima Mari i Željku, bratu Anti i dečku Ivanu što su oduvijek vjerovali u mene i podržavali me u svemu.

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

OPTIMIRANJE PARAMETARA EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA GLOGA (*Crataegi folium cum flore*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Dragica Bunoza 658/PI

Sažetak: Svrha ovog istraživanja bila je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljne mješavine cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*). Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudi 50 %,75 % i 100 % uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola različitih udjela (50 % i 70 %, v/v) pri različitom vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta. U ekstraktima gloga provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonola i ukupnih flavonoida. Najveći ekstrakcijski prinos za istraživane skupine fenolnih spojeva bio je kako slijedi: za flavonoide-11,00 mgQE g^{-1} uz 70%-tni etanol, pri amplitudi 100 % i trajanju ekstrakcije 6 minuta, za hidroksicimetne kiseline- 22,017 mgCAE g^{-1} uz 70 %-tni etanol, pri amplitudi 50 % i trajanju ekstrakcije 3 minute, za flavonole-23,12 mgQE g^{-1} uz 70 %-tni etanol, pri amplitudi 75 % i trajanju ekstrakcije 3 minute.

Ključne riječi: glog, fenolni spojevi, ekstrakcija, ultrazvuk

Rad sadrži: 49 stranica, 11 slika, 5 tablica, 67 literaturnih navoda, 3 priloga

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. Branka Levaj*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Ivona Elez-Garofulić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Prof. dr. sc. *Branka Levaj*
3. Prof. dr. sc. *Mladen Brnčić*
4. Izv. prof. dr.sc. *Sandra Balbino* (zamjena)

Datum obrane: 1.srpnja 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of of Food Technology
Laboratory for conservation processes and processing of fruits and vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF HAWTHORN (*Crataegi folium cum flore*) PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION BY APPLICATION OF ULTRASOUND

Dragica Bunoza 658/PI

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal conditions for the extraction of phenolic compounds from the flower and leaf of the hawthorn herbal mixture (*Crataegi folium cum flore*). The extraction of the phenolic compounds was performed using ultrasound assisted extraction (amplitude 50 %,75 % and 100 %), using different aqueous solution of ethanol and methanol (50 % and 70 % w,w), during different extraction time of 3, 6 and 9 minutes. Total hydroxycinnamic acids, total flavonols and total flavonoids were determined in hawthorn extracts by spectrophotometerically. The highest yield of extraction of the phenolic compounds were as follows: the total flavonoids- 11,00 mg QE g^{-1} with 70 % aqueous solution of ethanol, at amplitude 100 % and the extraction time 6 minutes, the total hydroxycinnamic acids- 22,017 mg CAE g^{-1} with 70 % aqueous solution of ethanol, at amplitude 50 % and extraction time 3 minutes, the total flavonols- 23,12 mg QE g^{-1} with 70 % aqueous solution of ethanol, at amplitude 75 % and extraction time 3 minutes.

Keywords: *hawthorn, phenolic compounds, extraction, ultrasound*

Thesis contains: 49 pages, 11 figures, 5 tables, 67 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. *Branka Levaj* Full Professor

Technical support and assistance: *PhD Ivona Elez-Garofulić*

Reviewers:
1. PhD. *Verica Dragović-Uzelac* Full professor
2. PhD. *Branka Levaj* Full professor
3. PhD. *Mladen Brnčić* Full professor
4. PhD. *Sandra Balbino* Associate professor (substitute)

Thesis defended: 1 July 2016

Sadržaj

1.UVOD.....1

2.TEORIJSKI DIO.....2
2.1 Glog (*Crataegus spp*.).....2
2.2 Kemijski sastav gloga.....4
2.3 Fenolni spojevi gloga.....5
2.4 Ekstrakcija fenolnih spojeva.....10
2.4.1 Izbor otapala u ekstrakciji.....11
2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....12

3. EKSPERIMENTALNI DIO.....16
3.1 Materijali.....16
3.2 Metode.....16
3.2.1 Ekstrakcija polifenola iz mješavine lista i cvijeta gloga.....18
3.2.2 Određivanje ukupnih flavonoida spektrofotometrijskom metodom.....19
3.2.3 Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....22
3.2.4 Statistička analiza.....25

4. REZULTATI I RASPRAVA.....26
4.1 Ukupne hidroksicimetne kiseline.....27
4.2 Ukupni flavonoli.....32
4.3 Ukupni flavonoidi.....37

5. ZAKLJUČAK.....43
6. LITERATURA.....44
7. PRILOZI

1. UVOD

Glog (*Crataegu*s spp.) je biljka koja priprada porodici Rosaceae, podporodici Maloideae, rodu Crataegus (Gundogdau i sur., 2014). Glog je grm ili stablo s jako razgranatim granama, a cvate u travnju i svibnju. Cvijetovi su bijeli sa crvenkastim prašnicima, a plod je ovalna bobica. Raste po šikarama, livadama i skoro na svim zemljištima. Gotovo svi dijelovi gloga, cvijet, plod, kora, sadrže bioaktivne spojeve među kojima su najznačajniji fenolni spojevi.

Fenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla, a uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih fenola, fenolnih kiselina (hidroksibenzojeve, hidroksicimetne kiseline), antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina. Flavonoidima se pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno. Od različitih dijelova biljaka bogatih fenolnim spojevima i drugim biološki aktivnim spojevima mogu se proizvoditi ekstrakti, koji se koriste kao dodaci prehrani, u prehrambenoj industriji te u kozmetičke i farmaceutske svrhe.

Za ekstrakciju raznih polifenolnih spojeva koriste se različite metode s obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva s različitom strukturom i svojstvima. Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju. Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Stoga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. ultrasonic-assisted extractions, UAE).

U ovom radu ispitana je učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, na izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonola i ukupnih flavonoida iz mješavine lista i cvijeta gloga, to jest utvrditi optimalne uvijete ekstrakcije pri kojima bi se ostvario najveći ekstrakcijski kapacitet pojedinih skupina fenolnih spojeva. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodena je primjenom vodenih otopina metanola i etanola (50 % i 70 %, v/v), različitom vremenu trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta), te amplitudi 50 %, 75 % i 100 %.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1 GLOG (CRATAEGUS SPP.)

Glog (*Crataegus* spp.) je biljka koja priprada porodici Rosaceae, podporodici Maloideae, rodu *Crataegus* (Gundogdau i sur., 2014). Latinsko ime roda Crataegus potječe od grčke riječi kratos (snaga, tvrdoća). Široko je rasprostranjen na području Azije, Afrike, Sjeverne Amerike te Sjeverne Europe. Postoji 165-200 vrsta gloga u svijetu (Ercisli, 2004).

Glog je grm ili stablo s jako razgranatim granama. Cvate u travnju i svibnju. Cvijetovi su bijeli sa crvenkastim prašnicima, a plod je ovalna bobica. Raste po šikarama, livadama i skoro na svim zemljištima. Cvjetovi se beru u proljeće, u travnju i svibnju dok je dio cvata još u pupovima. Listovi se beru do srpnja, a plodovi bez peteljke i kora s mladih grana u jesen (Žilić, 2014). List gloga se sastoji od dva listića, a listovi su dugački 15 mm do 5 cm. Cvijetovi rastu u 5 do 12 svežnjeva, a boja im varira od bijele preko roze do crvene. Dvospolni su jer sadrže i prašnike i tučke, a oprašuju se kukcima koje privlači miris cvijeta (Kumar i sur., 2012).

Rod *Crataegu*s je vrlo bogat vrstama koje rastu u Sjevernoj Americi, i nešto manje u Europi i Aziji. Obuhvaćaju listopadne trnovite grmove ili niže drveće. U Hrvatskoj je nekoliko vrsta raširenо u šumama, šikarama i živicama. Kao samonikle ili uzgojene biljke najpoznatije su vrste: bijeli glog (*C. monogyna*), crveni glog (*C. oxyacantha*), panonski crni glog (*C. nigra*) i dr.

Crveni glog (*Crataegus oxyacantha*) je trnovit, razgranat grm ili nisko drvo, može narasti do 5 metara u visinu. Kora grana je sivkastosmeđa dok su jednogodišnji ogranci zelenkastosmeđi. Plod je jajolika ili kuglasta oblika, širine do 1 centimetar, crvene boje s ostatkom čaške na tjemenu, te nosi 2-3 sjemenke.

Bijeli glog (*Crataegus monogyna*) je trnovit grm ili do 8 metara visoko drvo. Dlakavi drški cvjetova te dublje razdvojeni režnjevi na listovima razlikuju ga od crvenog gloga. Bijeli cvjetovi sa crvenim prašnicima manji su od cvjetova crvenog gloga te se razvijaju 15 dana kasnije. Plodovi su manji s po jednom sjemenkom. Ime vrste monogyna znači s jednim tučkom (Anonymus 2016).

Panonski crni (*C. Nigra*) glog ima crno obojene plodove te raste kao grm visine do 7 metara. Listovi su trokutasti ili jajoliki sa 7-11 nazubljenih režnjeva, gusto dlakavog naličja.

Plod je okruglast, promjera oko 8 mm, pri sazrijevanju je crvenkast, a kasnije crn, sjajan i sočan. Sadrži 3–5 uglastih koštunica (Franjić i sur., 2006).



Slika 1. Glog (Žilić, 2014)

Glog je tradicionalna europska ljekovita biljka koja se i danas uzgaja i pridonosi u liječenje različitih bolesti. Ljekoviti dijelovi biljke su kora, listovi, cvjetovi i plodovi, te se u Europi i svijetu upotrebljavaju za različite pripravke u pučkoj medicini, ali i u farmaceutskoj industriji. Ti se pripravci koriste za liječenje pacijenata s crijevnim tegobama, za liječenje arterioskleroze (suženja krvnih žila zbog nakupljanja naslaga na stjenkama), normaliziranje tlaka (posebno visokog krvnog tlaka), za liječenje srčanih bolesti (poput upale srčanog mišića, loše cirkulacije krvi zbog oslabljenog srca, prokrvljenost samog srčanog mišića) i za umirenje (razdražljivost, napetost, nesanica) (Kumar i sur., 2012). U azijskim zemljama, koristi se i za prehranu (sokovi, marmelade) (Liu i sur., 2010).

2.2 KEMIJSKI SASTAV GLOGA

Kemijski sastav ovisi o dijelu biljke, tako se razlikuje kemijski sastav cvijeta, lista ili ploda. Dosadašnja istraživanja o kemijskom sastavu gloga s područja Azije, Sjeverne Amerike i Europe uključuju: 49 različitih flavonoida, 5 hidroksicimetnih kiselina, 6 šećera, 10 organskih ili fenolnih kiselina, 26 terpena, te 56 sastojaka esencijalnih ulja (Edwards i sur., 2012).

Plod i to zreli ima najveću koncentraciju glukoze i fruktoze, dok nezreli plodovi imaju najnižu koncentraciju šećera (Edwards i sur., 2012). Nadalje, zreli plod sadrži zasićene masne kiseline, dok nezreo plod sadrži najviše polinezasićenih masnih kiselina (Barros i sur., 2011).

List i cvijet gloga sadrže šećere i šećerne alkohole, organske kiseline, terpene, biljna esencijalna ulja, fenilpropanoide, hidroksicimetne kiseline, lignane i flavonoide.

Šećeri se sintetiziraju u listovima i transportiraju u vakuole i slobodni prostor ploda tijekom njegovog razvoja (Edwards i sur., 2012). Glukoza prevladava u svim dijelovima gloga.

Jabučna, limunska, jantarna, limunska, vinska, kininska, 3-4-hidroksibenzojeva, salicilna i siringinska kiselina su otkrivene u Crataegus vrstama. Limunska kiselina je predominantna u listovima i cvijetovima gloga.

Cvijet gloga sadrži najveću količinu limunske kiseline i tokoferola, kao i bolji omjer n3/n6 masnih kiselina u odnosu na zreli plod gloga, koji ima veću koncentraciju–zasićenih masnih kiselina (Barros i sur., 2011).

Biljna eterična ulja su smjese koje se sastoje najčešće od terpena i fenilpropanoida. U biljkama, biljna eterična ulja mogu privući oprašivače ili odvratiti biljojede i insekte, te također pokazuju antifungalna, antivirusna i antibakterijska svojstva. Spojevi pronađeni u uljima cvijeta gloga uključuju monoterpene, seskviterpene te triterpenoide (Edwards i sur., 2012).

Fenolni spojevi čine najznačajniju grupu biološki aktivnih spojeva gloga. Vrsta i udio fenolnih spojeva se razlikuju ovisno o dijelovima biljke i znatno variraju s obzirom na podrijetlo i stupanj zrelosti biljke (Nabavi i sur., 2015, Yang i Liu, 2012).

2.3 FENOLNI SPOJEVI GLOGA

Fenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih hidroksicimetnih kiselina, antocijanina do složenijih flavonoida i tanina. Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Blasco i sur. 2005). Identificirano je više od 8000 fenolnih spojeva, a među njima preko 4000 flavonoida (Tsao, 2010). Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjelovati u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štititi ih od infekcija mikroorganizmima, djelovati kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlačiti oprašivače, te pridonose pigmentaciji biljaka (Naszk i Shahidi., 2004). Polifenoli su klasificirani prema njihovom porijeklu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Raznolikost polifenola u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije ovih spojeva koji se prirodno pojavljuju (Tsao, 2010).

Polifenoli su razvrstani u dvije osnovne skupine:

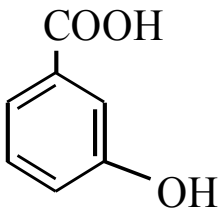
1. Fenolne kiseline

2. Flavonoidi

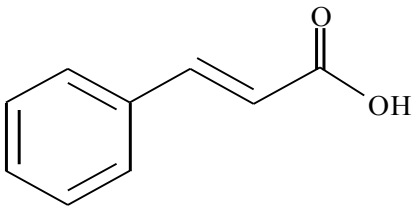
1. Fenolne kiseline

Razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati hidroksibenzojeve kiseline (slika 2) i derivati hidroksicimetne kiseline (slika 3). U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubraja se: vanilinska, siringinska, galna, *m*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksibenzojeva i gentizinska kiselina, dok u derivate hidroksicimetne kiseline ubraja se: *o*-kumarinska, *p*-kumarinska, ferulična, kafeinska i klorogenska kiselina (Tsao, 2010). Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina je C_6-C_1, a hidroksicimetnih C_6-C_3. One pripadaju različitim biosintetskim putevima; hidroksibenzojeve pripadaju aminobenzoatnom putu, a hidroksicimetne kiseline fenilpropanoidnom putu biosinteze zbog čega imaju sličnosti s flavonoidima. Fenolne kiseline moguće je izolirati pomoću organskih otapala: metanola, etanola ili acetona dok je za izolaciju vezanih fenolnih kiselina potrebna upotreba enzima hidroksilaza (Navas-Lopez i sur., 2014). Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je prisutna u mnogim biljkama, kemijske formule $C_6H_2(OH)_3COOH$, nalazi se u prirodi u slobodnom obliku i kao dio u vodi topivih tanina. Tanine nalazimo u brojnim biljnim porodicama viših biljaka, a kemijska struktura tanina ovisi i o biljci iz koje su izolirani. Galna

kiselina se često koristi kao standard za određivanje fenolnog sadržaja u raznim materijalima putem Folin-Ciocalteau testa čiji rezultati se navode u ekvivalentima galne kiseline (Waterhouse, 2012).



Slika 2. m-hidroksibenzojeva kiselina

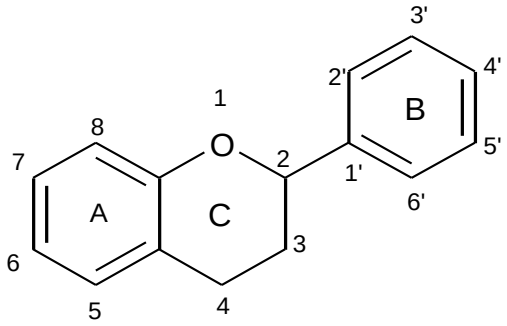


Slika 3. Cimetna kiselina (Tsao 2010).

Fenolne kiseline pronađene u listu, cvijetu i plodu gloga su klorogenska, 4-hidroksibenzojeva, 4-aminohidroksibenzojeva, kafeinska te neoklorogenska. Klorogenska kiselina i njeni izomeri glavne su komponente cvjetova i staničnih suspenzija *C. monogyna* (Nabavi i sur., 2015). Pronađena je u svim vrstama gloga, a njezin izomer neoklorogenska kiselina pronađena je samo u plodu *C. Grayana*. Dominantne fenolne kiseline u kineskom glogu su 4-hidroksibenzojeva i 4-aminohidroksibenzojeva kiselina. Kafeinska kiselina pronađena je u europskom glogu *C. Monogyna* (Jurikova i sur., 2012). Kafeinska kiselina otkrivena je i u listovima *Crataegus laevigata* (Svedström i sur., 2006) i plodu *Crataegus germanica* u koncentraciji 0,0024-0,0570 mg g^{-1} (Edwards i sur., 2012). Galna kiselina i hidroksibenzojeva kiselina pronađene su u lišću *Crataegus cuneata* (Liu, 2012).

2. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina fenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalsku aktivnost. Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno. Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Osnovnu strukturu flavonoida (slika 4) čini difenilpropan (C_6-C_3-C_6) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena nastaje flavan od kojeg se dobiva određeni broj osnovnih struktura. Prema topljivosti dijele se na lipofilne i hidrofilne flavonoide, a najčešće su prisutni u obliku O- i C- glikozida (Kazazić, 2004).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida (Kazazić, 2014)

Slično fenolnim hidroksicimetnim kiselinama, flavonoidi se sintetiziraju pomoću fenilpropanoid metaboličkog puta. U flavonoide se ubrajaju: flavoni (apigenin, luteolin, tangeretin), flavanoni (naringenin, hesperitin), flavanoli (katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin), flavonoli (kamferol, kvercetin, miricetin), flavanonoli (taksifolin), procijanidini (teaflavin, B1, B2, A2, C1), antocijani (delfidin, cijanidin, malvidin, petunidin, peonidin, pelargonidin), izoflavoni (daidzein, genistein), čalkoni (floretin, ksantohumol), neoflavonoidi (dalbergin) (Tsao 2010).

Najzastupljeniji flavonoidi u glogu su procijanidini, flavonoli i flavonol glikozidi, flavoni i flavanoli. Flavonoidi, a posebno flavonoli i flavoni nalaze se u izobilju u cvjetnim pupovima, dok se procijanidini nalaze u većoj količini u nezrelim plodovima.

Spektrofotometrijskom analizom najviši udio flavonoida zabilježen je u listovima (Nabavi i sur., 2015). Sadržaj flavonoida u listu i cvijetu vrsta *C. monogyna*, *C. laevigata* i njhovih hibrida varira od 3-19 g kg^{-1} suhe tvari (prosjek je 12 g kg^{-1}) (Peschel i sur., 2008). Najveći sadržaj flavonoida u listu vrste *C. monogyna* je u periodu predcvatnje i cvatnje. Nakon tog perioda, količina flavonoida u listu opada (Rehwald i sur., 1994). Najveća koncentracija flavonoida zabilježena je u zrelim listovima sa cvjetnim pupoljcima, dok je najmanja koncentracija flavonoida zabilježena u zrelim listovima sa zrelim plodom (Edwards i sur., 2012). Garcia-Mateos i sur. (2013) su identificirali 4 flavonoida iz skupine flavonol glikozida u ekstraktima cvijetova gloga, a to su kvercetin 3-O-glukozid, kvercetin 3-O-ramnozid, kvercetin 3-O-ramnozil-(1 → 6)-glukozid te kvercetin 3-O-ramnozil-(1-2)-[ramnozil-(1 - 6)]-glukozid.

Flavanoli su složena podvrsta flavonoida koji obuhvaćaju jednostavne monomere katehin, njegov izomer epikatehin, oligomerne i polimerne procijanidine (Robbins i sur. 2006). Naime, katehini i epikatehini često prolaze oksidacijske reakcije u biljkama u obliku

dimera, trimera i oligomera koji se nazivaju procijanidini (Nabavi i sur., 2015). Općenito, najraširenija su skupina flavonoida i javljaju se u četiri izomerna oblika. Glavni predstavnici flavanola su: (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galaktokatehin i (-)-epigalokatehin (Weinges i Piretti, 1971). Kod *C. monogyna* najzastupljeniji su katehin i epikatehin. Epikatehin je prisutan u cijeloj biljci, dok je katehin samo u nadzemnim dijelovima biljke i stanicama suspenzijskih kultura (Nabavi i sur., 2015). Epikatehin prevladava u plodovima kineskog gloga. Sadržaj epikatehina u plodovima različit je i varira 0,9-11,7 mg g^{-1} suhe tvari (Jurikova i sur., 2012).

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini sastoje se od flavanolskih jedinica kojih može biti i do 17 u jednoj molekuli. Za ljudsku prehranu najvažniji od tih spojeva su procijanidini koji se sastoje od monomera (+)- katehina i (–)-epikatehina (Bais i sur., 2003). I **procijanidini** u glogu najčešće se sastoje od flavan-3-ol jedinica i to katehina i epikatehina (Svedström i sur., 2002). Više od 30 oligomernih procijanidina pronađeno je u lišću i plodu *Crataegus spp.* (Liu, 2012). (-)-Epikatehin, procijanidin dimeri B2, B4 i B5, procijanidin trimer C1, (-)-epikatehin-(4β→6)-(-)-epikatehin-(4β→8)-(-)-epikatehin i (-)-epikatehin-(4β→8)-(-)-epikatehin- (4β→6)-(-)-epikatehin, procijanidin tetramer D1 i pentamer E1 su najviše zastupljeni i u listu i u cvijetu *C. laevigata* (Svedström i sur., 2002).

Istraživanja su pokazala da su u europskom glogu *C. monogyna* prisutni flavonol glikozidi i procijanidi B-tipa, a u kineskom glogu *C. Pinnatifida* procijanidini B-tipa najvažniji su fenolni spojevi. U kineskom glogu *C. Pinnatifida* pronađeni su epikatehin, procijanidini C-tipa te rutin. Vrijednosti procijanidina u bobicama kineskog gloga, manje su nego u europskog gloga, vjerovatno zbog prisutnosti raznih organskih kiselina u kineskom glogu (Jurikova i sur., 2012). (–)-Katehini i (+)-epikatehini su fitotoksini i neke ih biljke sintetiziraju u korijenu da bi spriječile naseljavanje drugih biljaka na tom području (Bais i sur., 2003).

Flavonoli i flavoni sinetiziraju se u biljnim tkivima kao dio fenilpropanoid puta. Najznačajniji flavonol aglikoni su kvercetin, miricetin i kamferol. U biljnim tkivima se nalaze konjugirani sa šećerima (Herrmann, 1988). Kemferol i kvercetin su najzastupljeniji flavonol aglikoni, a hiperozid, izokvercetin i rutin su glavni flavonol glikozidi u glogu (Liu i sur. 2012). Melikoglu i sur. (2004) izolirali su kvercetin iz listova i cvijetova *C. Microphylla*. Hiperozid je glavna komponenta cvijetova (Nabavi i sur., 2015). Kempferol je dominantan flavonol u plodu kineskog gloga *C. Pinnatifida* (Jurikova i sur., 2012). Koncentracija flavonol

glikozida u plodu kineskog gloga je 0.2-1.1 mg g^{-1} suhe mase. Većina flavona u listu i cvijetovima gloga su derivati apigenina ili luteolina, kao što su orientin, izoorientin, viteksin, izoviteksin, acetilviteksin (Wu i sur., 2014). Viteksin i njegovi derivati najzastupljeniji su flavoni u lišću gloga (Ringl i sur., 2007). Cui i sur. (2006) su identificirali viteksin-2"-ramnosid kao tipičnu komponentu listova kod 4 vrste kineskog gloga. Liu i sur. (2003) su pomoću kapilarne elektroforeze izolirali iz *C. Pinnatifida* viteksin-2"-ramnozid, hiperozid, viteksin i rutin, te je koncentracija ovih spojeva bila veća u listovima nego u plodovima..

Antocijani su glavni sastojci cvijeća, te im daju prepoznatljivu boju. Antocijani su spojevi flavanske strukture koja se sastoji od piranske jezgre povezane na nekondenzirani benzenski prsten. U *C. monogyna* identificiran je cijanidin-3-O-galaktozid kao nosioc boje cvijetova gloga (Nabavi i sur., 2015). U zrelih plodova gloga identificirane su tri vrste antocijana među kojima su cijanidin-3-O-glikozid, pelargonidin-3-O-glikozid te peonidin-3-O-glukozid, a prezreli plodovi su imali najviše koncentracije antocijana (Rodrigues i sur., 2014).

Ostali fenolni spojevi u glogu. Lignani pomažu u regulaciji normalnih fizioloških procesa biljke. Šest lignana u sastavu je lista samo jedne vrste i to vrste C. pinnatifida. Tih 6 lignana su (-)-2α-O-(β-D-glukopiranozil)-lionirezinol, tortozid A, eritro-1-(4-O-β-D-glukopiranozil-3-methoksifenil)-2-[4-(3-hiroksipropil)-2,6-dimetoksifenoksi]-1,3propanediol, (7S,8R)-urolignozid, (7S,8R)-5-metoksidihidrodehi drodikoniferil alohol-4-O-β-D-glukopiranozid and acernikol-4″-O-β-D-glukopiranozide (Gao i sur., 2010).

2.4 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakti ili tinkture pripremljene od lista, cvijeta ili ploda gloga koriste se još od davnina (Bahorun i sur., 2003), a postupci ekstrakcije predstavljaju bitan korak u izdvajanju biološki aktivnih komponenti iz različitih materijala. Od ljekovitih biljaka rade se ekstrakti, koji se koriste u ljekovite svrhe, kao dodaci prehrani, a mogu se koristiti i u kozmetičke i farmaceutske svrhe. Također, u svrhu identifikacije i kvanitifikacije određenih bioaktivnih tvari u nekom uzorku potrebno ih je izolirati. Metode izolacije, to jest ekstrakcije mogu biti različite i mogu se kombinirati, a najvažnije je da su učinkovite. Fenomen ekstrakcije može se definirati kao izdvajanje neke tvari iz otopine, suspenzije ili čvrste tvari. Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odvajanja tvari iz homegenih smjesa, na osnovu njezine različite topljivosti u otapalima koja se međusobno ne mješaju (Lianfu i Zelong, 2008). Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su:

1. Destilacija: direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom

2. Ekstrakcija otapalima: ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima

3. Hladno prešanje

4. Nekonvencionalne tehnike: ekstrakcija superkritičnim fluidima, Turbo–ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili suhih uzoraka biljnog materijala. Takvi se uzorci često, prije ekstrakcije, usitnjavaju i homogeniziraju. Ekstrakcija fenolnih spojeva najčešće se provodi klasičnim metodama ekstrakcije, koje uključuju razna organska otapala. Metode ekstrakcije otapalima temelje se na miješanju uzorka s prikladnim otapalom i/ili prevođenju uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobno slabo topljiva (Dai i Mumper, 2010). Proces ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz različitih dijelova biljke predstavlja prijenos mase pri čemu se ciljane skupine sadržane u matriksu prenose u otapalo do ravnoteže koncentracije (Dornenburg i Knoor, 1993.) Za ekstrakciju raznih polifenolnih spojeva koriste se različite metode s obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva s različitom strukturom i svojstvima. Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju (Valls i sur., 2009). Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne

za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Zbog tih razloga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. microwave-assistend extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. ultrasonic-assisted extractions, UAE) te ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. pressurized liquid extraction, PLE).

2.4.1 Izbor otapala u ekstrakciji

Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini namirnice izloženoj otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Iz tih razloga, pogodno je provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama zbog ubrzavanja procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala (Raso i sur., 1999). Ipak, temperature rijetko prelaze 100 ºC jer tada uglavnom dolazi do oštećenja željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Budući da je brzina prijenosa mase direktno proporcionalna površini namirnice, prije ekstrakcije namirnica se usitnjava do određenog stupnja i homogenizira. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći sloj krutih čestica, a također, veći protok otapala smanjuje granični sloj izmedu koncentrirane otopine i površine čestica, te time povećava brzinu ekstrakcije (Drmić i Režek-Jambrak, 2010).

Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Prilikom izbora potrebno je uzeti u obzir (Albu i sur., 2004):

- polarnost; točka ključanja - treba biti što niža, da olakša odvajanje otapala od komponente; reaktivnost
- otapalo ne smije reagirati sa ekstraktom, niti se smije razgrađivati
- viskoznost- otapalo mora imati nisku viskoznost
- stabilnost otapala na toplinu, kisik i svjetlo
- sigurnost pri upotrebi – po mogućnosti
- nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš
- mora biti dostupno u dovoljnim količinama

- cijena – po mogućnosti što jeftinije
- pogodnost za ponovnu upotrebu

Otapala, kao što su metanol, etanol, aceton, etil acetat, i njihove kombinacije često su korišteni su za ekstrakciju fenola iz biljnog materijala u različitim omjerima vode. Odabirom pravog otapala utječe se na količinu esktrahiranih polifenola. Metanol je efikasan za ekstrahiranje polifenola manje molekulske mase, dok se flavonoidi bolje ekstrahiraju vodenom otopinom acetona. Također etanol je dobro otapalo za ekstrakciju, te je siguran za ljude (Dai i Mumper, 2010).

Flavonoidi su topljivi u polarnim otapalima i najčešće se ekstrahiraju s metanolom, etanolom ili acetonom. Aglikoni flavonoida su netopljivi u vodi, a glikozidi flavonoida zbog prisutnih polarnijih skupina topljivi su u vodenim organskim sustavima. Ekstrahiranje flavonoida ovisi o koncentraciji vodene otopine etanola, koja može varirati od 40 do 96 % (v/v), a kao najučinkovitija pokazala se 70 % vodena otopina etanola (Urbonavičiūtėa i sur., 2006). Vrlo polarne fenolne kiseline ne mogu se ekstrahirati čistim otapalom, već se preporučuje kombinacija otapalo-voda (Stalikas, 2007).

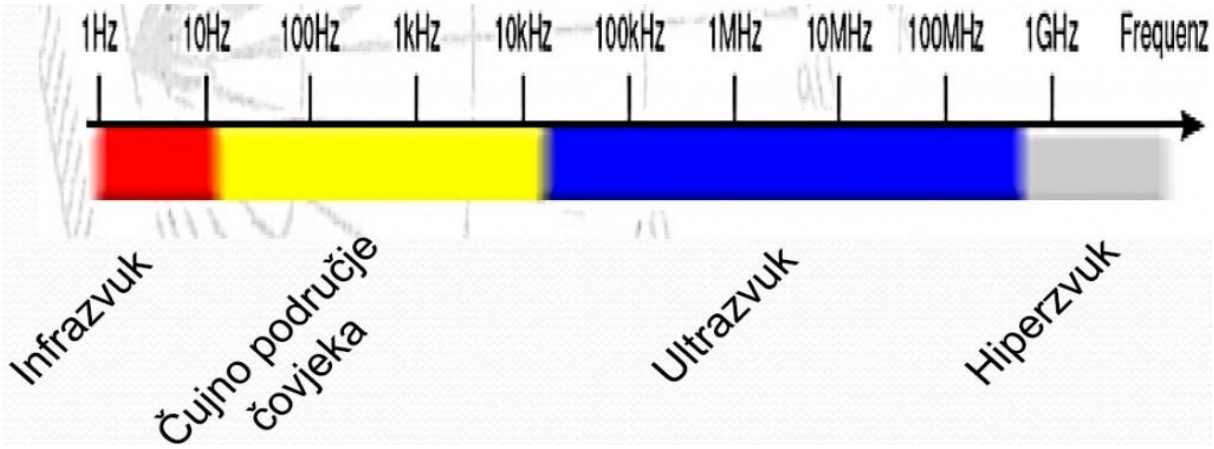
Također je važan pH otapala za ekstrakciju. Za polifenole, većina ekstrakcija se izvodi u kiselim uvjetima, jer su općenito stabilniji u niskom pH, a kiseli uvjeti pomažu polifenolima da ostanu neutralni, čime se lako ekstrahiraju s organskim otapalima. To je učinjeno pomoću slabe kiseline ili niske koncentracije jake kiseline. Visoka koncentracija kiselina može uzrokovati hidrolizu glikozida (Tsao, 2010).

Albu i sur. su proveli istraživanje ekstrakcije ultrazvukom kanozinske kiseline iz ružmarina, koristeći butanon, etil-acetat i etanol kao otapala. Ekstrahirani su suhi i svježi listovi biljke. Etanol je pokazao efikasnost ekstrakcije kao i ostala otapala. Takoder, ekstrakcija osušene biljke sa etanolom se pokazala efikasnijom od one sa svježim materijalom, vjerojatno zbog prisutnosti vode (Albu i sur., 2004).

2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Novi pristup ekstrakciji, djelovanjem ultrazvuka omogućava poboljšanu bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva (Ashokkumar i sur., 2008; Šic Žlabur i sur., 2015).

Ultrazvučni val je gibanje mehaničkog poremećaja kroz sredstvo, a u praktičnoj primjeni ga susrećemo u obliku impulsa ili harmonijskog vala (Brnčić i sur., 2009a). Ultrazvučni valovi su slični zvučnim valovima, ali imaju frekvencije više od 16 kHz (slika 5), pa ih ljudsko uho ne može čuti. U prehrambenoj industriji primjenjuju se ultrazvučni valovi dvaju područja frekvencija. To su UZ valovi niskog intenziteta (manje od 1 Wcm^{-2}) frekvencija 5 do 10 MHz, te UZ valovi visokog intenziteta (10 do 1 000 Wcm^{-2}) i frekvencija viših od 2,5 MHz (Lelas, 2006).



Slika 5. Područje ultrazvuka (Anonymus, 2016)

Ultrazvuk poboljšava ekstrakciju otapalima svojim mehaničkim djelovanjem na uzorak. Ultrazvuk visoke snage koristi se za ekstrakciju, te uslijed djelovanja kavitacija na stanični materijal omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te povećava prijenos mase (Roselló-Soto i sur., 2015). Uslijed pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Primjena ultrazvukom potpomognute ekstrakcije u tehnologiji prerade hrane od interesa je zbog povećanja ekstrakcije komponenti iz biljnog i životinjskog materijala (Ninčević Grassino i sur., 2016). Tehnologijom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije može se potencijalno povećati ekstrakciju određenih komponenti, kao što su polifenoli, antocijani i aromatske tvari.

Učinak ultrazvuka je puno korisniji pri nižim frekvencijama (18–40 kHz), dok je zanemariv u rasponu od 400-800 kHz, jer kod nižih frekvencija dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije (Drmić i Režek-Jambrak, 2010). Do nastanka kavitacije doći će prilikom obrade materijala ultrazvukom, kada zvučni val dođe do tekuće sredine te nastaju longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije. Tada se formiraju mjehurići plina u materijalu (Patist i Bates, 2008). Kavitacije mogu biti stabilne,

te tada dolazi do sudaranja kavitacijskih mjehurića i prijelazne kada mjehurići implodiraju te tako prenose energiju u okolni medij. Kada mjehurić dosegne maksimalnu veličinu te kada procesi koji se događaju unutar kavitacijskog mjehurića postanu kritični, dolazi do kolapsa mjehurića i širenja energije. Pucanje kavitacijskih mjehurića uzrokuju vrlo visoke temperature i tlakovi u mediju. Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, amplitudi), okolnim uvijetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) te svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) (Brnčić i sur., 2009b).

Kako bi iskorištenje procesa bilo maksimalno, potrebno je podesiti sve parametre ultrazvuka i ekstrakcije koji su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Parametri koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije (Wang i sur., 2006)

ULTRAZVUK	EKSTRAKCIJA
Frekvencija	Vrijeme trajanja
Ciklus	Otapalo
Amplituda	Temperatura
Akustična snaga	

Prednosti ultrazvučne esktrakcije nad klasičnim postupcima:

- Ekstrakcija se provodi pri nižim tempraturama
- Vrijeme ekstrakcije se smanjuje
- Troši se znatno manja količina otapala
- Ekološki je prihvatljiva metoda (Wang i Weller., 2006).

Ultrazvuk značajno utječe na brzinu različitih procesa u bioprocesnom inženjerstvu i industriji hrane. Mnogo je pozornosti usmjereno na primjenu ultrazvuka za ekstrakciju prirodnih spojeva kojima su obično potrebni sati ili dani do završetka s konvencionalnim metodama. Koristeći ultrazvuk, puno ekstrakcija sada može biti provedeno u nekoliko minuta s visokom ponovljivosti, smanjujući potrošnju otapala, pojednostavljujući rukovanje i obradu, dajući veću čistoću konačnog produkta, eliminirajući naknadnu obradu otpadnih voda i konzumiranje samo dijela otapala koji su potrebni za konvencionalne metode kao što su ekstrakcije Soxhlet ekstrakcijom, maceracija ili parna destilacija (Chemat i sur., 2010). U usporedbi s drugim ekstrakcijskim tehnikama kao što je ekstrakcija potpomognuta

mikrovalovima i konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija je jeftina i učinkovita alternativa, a rad s tom ekstrakcijom je olakšan (Pan i sur. 2012).

Ultrazvučna ekstrakcija može biti:

- Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji
- Ekstrakcija sa 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. 2009c).

Ekstrakcija sa 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).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom fenolnih spojeva iz lišća gloga *C. Pinnatifida* pokazala se boljom u odnosu na konvencionalne metode. Bolji su prinosi fenolnih spojeva, a ekstrakti pokazuju bolju antioksidacijsku aktivnost. Ekstrakcija je učinkovita i alternativna je metoda, a ekstrakti se mogu koristiti kao sastojci u farmaceutskoj industriji te kao dodaci zdravoj prehrani. Kao optimalni uvijeti ekstrakcije za fenolne spojeve pokazali su se: temperatura 41 °C, vrijeme tretiranja 31 minutu te koncentracija etanola 39 % (Luo i sur., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

U istraživanju je korištena biljna mješavina cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) nabavljena u suradnji sa Suban d.o.o., sakupljena na području RH te osušena. Biljna mješavina cvijeta i lista gloga samljevena je pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita, Italy) u fini prah.

3.2 METODE

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka lista i cvijeta gloga provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, a u ekstraktima gloga je provedeno određivanje ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola, hidroksicimetnih kiselina.

Uzorci su tretirani ultrazvučnim procesorom UP 400 S (Hielscher, Njemačka), sa sondom promjera 7 mm. Ekstrakcija je provedena uz primjenu vodenih otopina metanola ili etanola različitih koncentracija (50 % i 70 %) kao otapala, u vremenu trajanja ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta, s amplitudama ultrazvuka od 50 %, 75 % te 100 %, pri punom ciklusu.

Eksperimentalni dizajn ekstrakcije prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Eksperimentalni dizajn izolacije fenolnih spojeva iz mješavine cvijeta i lista gloga primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

	Otapalo	Amplituda (%)	Polarnost (%)	Vrijeme (min)
1	Etanol	50	50	3
2	Etanol	50	50	6
3	Etanol	50	50	9
4	Etanol	50	70	3
5	Etanol	50	70	6
6	Etanol	50	70	9
7	Etanol	75	50	3
8	Etanol	75	50	6
9	Etanol	75	50	9
10	Etanol	75	70	3
11	Etanol	75	70	6
12	Etanol	75	70	9
13	Etanol	100	50	3
14	Etanol	100	50	6
15	Etanol	100	50	9
16	Etanol	100	70	3
17	Etanol	100	70	6
18	Etanol	100	70	9
19	Metanol	50	50	3
20	Metanol	50	50	6
21	Metanol	50	50	9
22	Metanol	50	70	3
23	Metanol	50	70	6
24	Metanol	50	70	9
25	Metanol	75	50	3
26	Metanol	75	50	6
27	Metanol	75	50	9
28	Metanol	75	70	3
29	Metanol	75	70	6
30	Metanol	75	70	9
31	Metanol	100	50	3
32	Metanol	100	50	6
33	Metanol	100	50	9
34	Metanol	100	70	3
35	Metanol	100	70	6
36	Metanol	100	70	9

3.2.1 Ekstrakcija polifenola iz mješavine lista i cvijeta gloga

Aparatura i pribor

1. Analitička vaga (METTLER)
2. Ultrazvučni procesor UP 400 S, promjer sonde 7 mm, Hielscher, Njemačka
3. Zaštitne naočale
4. Zaštitne slušalice
5. Centrifuga (HETTICH, Rotofix 32)
6. Kivete (50mL)
7. Staklene čaše (100mL)
8. Menzure, volumena 100mL i 1L
9. Stakleni štapić
10. Pipete (20 i 25 mL)
11. Odmjerne tikvice volumena 50 mL
12. Erlenmeyer-ove tikvice volumena 50 mL
13. Stalak za epruvete
14. Epruvete

Kemikalije i otapala

- Etanol, 96 %-tni
- Etanol, 50 %-tni

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L doda se 520,8 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.

- Etanol, 70 %-tni

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L doda se 729,1 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.

- Metanol, 100 %-tni
- Metanol, 50 %-tni

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L doda se 500 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.

- Metanol, 70 %-tni

Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L doda se 700 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.

Postupak ekstrakcije

1 g samljevenog uzorka homogenizira se s 50 mL otapala (50 %, 70 % metanol i 50 %,70 % etanol) u staklenoj čaši. Čaša s uzorkom i otapalom, postavlja se na predviđeni prostor na postolju u ultrazvučnom procesoru s uronjenom sondom od 7 mm do polovice čaše. Postave se amplituda i puni ciklus na procesoru, te se mjeri vrijeme.

Nakon ekstrakcije uzorci se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL koje se do oznake nadopune otapalom koje je korišteno za ekstrakciju, te se prenesu u kivete od 50 mL. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem se odvoji od nastalog taloga u čiste kivete od 50 mL. Ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na temperaturi -18 °C do trenutka određivanja fenolnih spojeva.

3.2.2 Određivanje ukupnih flavonoida spektrofotometrijskom metodom

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm.

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 aluminijevog klorida (aluminj-klorid–heksahidrat,p.a.) otopi se sa 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 kalijevog 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 datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1}.

Razrijeđenja:

Ekstrakti gloga dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 5 puta sa otapalom koje je korišteno za ekstrakciju.

Postupak određivanja ukupnih flavonoida

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.

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 7.1) 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:

$Y = 0{,}0069X + 0{,}0002$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

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

$X\ (mg\ g^{-1}) = X(mgL^{-1}) \times V(L) \times razrjeđenje/m(g)$

Maseni udjeli flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mgQE g^{-1}.

3.2.3 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.

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 % etanolu)

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 2g L^{-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 datom 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 datom 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.

Razrijeđenja:

Ekstrakti gloga dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom razrjeđeni su 2,5 puta otapalom koje se koristilo za ekstrakciju.

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.

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu (prilog 7.2), dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin (prilog 7.3).

a) *hidroksicimetne kiseline*

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:

$Y = 0,0047X + 0,0231$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

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

X (mg g^{-1})= X(mg L^{-1})×V(L)×razrjeđenje/m(g)

Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izražavaju se kao ekvivalent kafeinske kiseline (mgCAE g^{-1}).

b) *flavonoli*

Iz alikvotne otopine standarda 100 mgL^{-1} potrebno je prirediti razrjeđenja: 2.5, 5, 10, 25, i 50 mg/L 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:

$$Y = 0,0031\ X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

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

X (mg g^{-1})= X(mg L^{-1})×V(L)×razrjeđenje/m(g)

Maseni udjeli flavonola izraženi se kao ekvivalent kvercetina mgQE g^{-1}.

3.2.4 Statistička analiza

Eksperimentalno dobiveni podaci te njihova ovisnost o udjelu etanola/metanola u otapalu za ekstrakciju, vremenu trajanja ekstrakcije, te amplitudi ultrazvuka obrađeni su pomoću statističke analize ANOVA.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonola, ukupnih flavonoida iz mješavine lista i cvijeta gloga. Ekstrakcija navedenih skupina fenolnih spojeva provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri zadanim uvjetima kako je opisano u poglavlju 3.2 Metode.

Na slici 6. prikazane su vrijednosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina tj. utjecaj volumnih udjela etanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju , trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na slici 7. prikazane su vrijednosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina tj. utjecaj volumnih udjela metanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju, trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na slici 8. prikazane su vrijednosti ukupnih flavonola tj. utjecaj volumnih udjela etanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju, trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te utjecaj amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih flavonola.

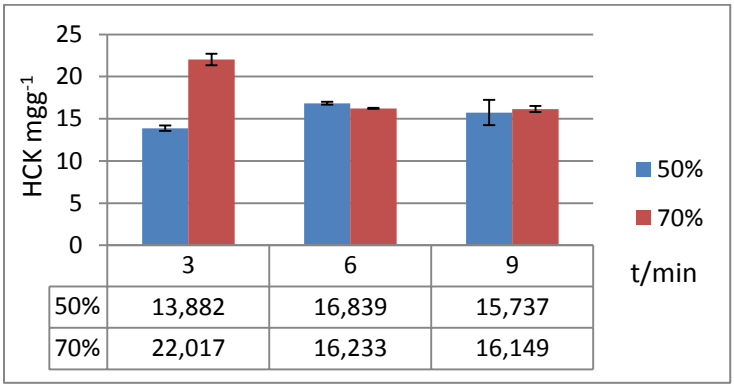
Na slici 9. prikazane su vrijednosti ukupnih flavonola tj. utjecaj volumnih udjela metanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju, trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih flavonola.

Na slici 10. prikazane su vrijednosti ukupnih flavonoida tj. utjecaj volumnih udjela etanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju, trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih flavonoida.

Na slici 11. prikazane su vrijednosti ukupnih flavonoida tj. utjecaj volumnih udjela metanola (50 %, 70 %) u otapalu za ekstrakciju, trajanja vremena ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta te amplitude ultrazvuka (50 %, 75 %, 100 %) na izolaciju ukupnih flavonoida.

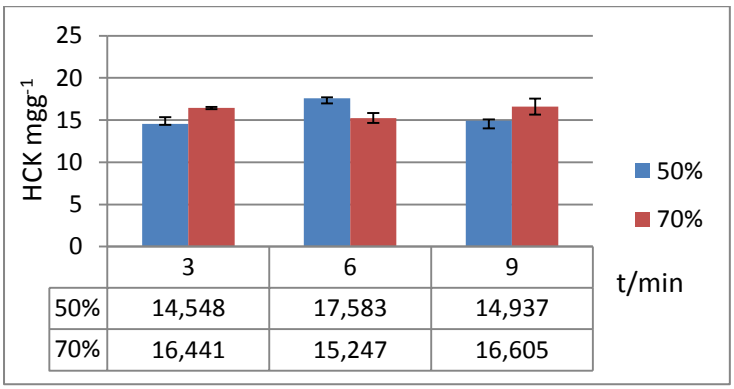
4.1 UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE

a)



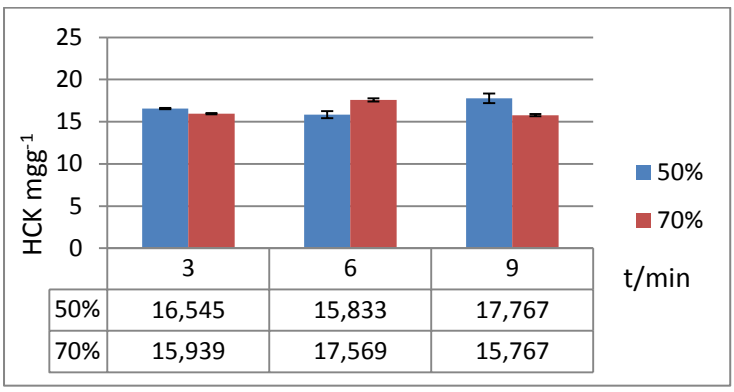
	3	6	9
50%	13,882	16,839	15,737
70%	22,017	16,233	16,149

b)



	3	6	9
50%	14,548	17,583	14,937
70%	16,441	15,247	16,605

c)



	3	6	9
50%	16,545	15,833	17,767
70%	15,939	17,569	15,767

Slika 6. Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgCAE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) etanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

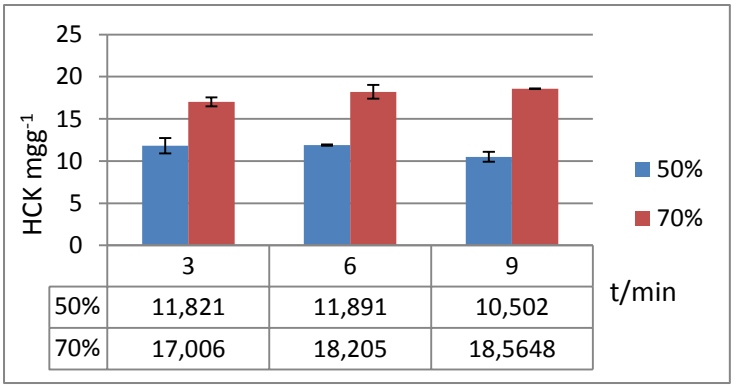
b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % najveći prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) dobiven je uz upotrebu 70 % etanola. Uz navedeno otapalo kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta vrijednost UHCK se smanjivala kako se vrijeme povećavalo, te je tijekom 3 minute ostvaren najveći prinos UHCK te iznosi 22,01 mgCAE g^{-1}. Uz primjenu ekstrakcijskog otapala s manjim udjelom etanola (50 % otopina etanola), dobiveni prinosi UHCK su manji, s tim da vrijeme ekstrakcije nije bitno utjecalo na prinos UHCK.
b) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 75 % najveći prinos UHCK dobiven je uz upotrebu 50 %-tne otopine etanola. Uz navedeno otapalo tijekom 6 minuta trajanja ekstrakcije ostvaren je najveći prinos UHCK, te se smanjio tijekom 9 minuta trajanja ekstrakcije. Kada je korištena vodena otopina 70 % etanola prinosi su bili podjednaki, te vrijeme nije značajno utjecalo na ekstrakciju.
c) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 100 % najveći prinos UHCK dobiven je s 50 %-tnom otopinom etanola tijekom 9 minuta ekstrakcije. 70 %-tna vodena otopina etanola imala je podjednako djelovanje kao i 50 %-tna otopina etanola tijekom 6 minuta ekstrakcije.

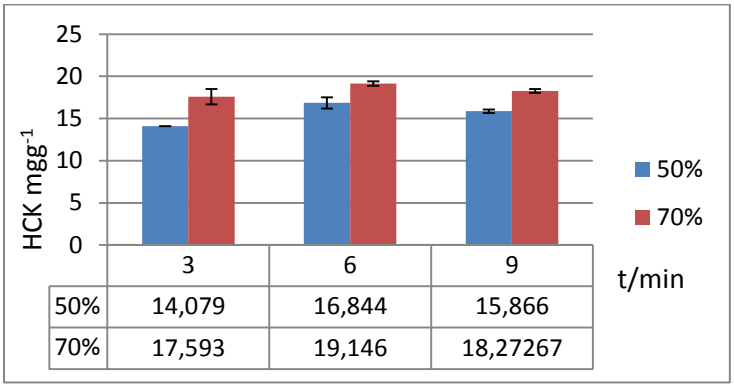
Pri amplitudi 50 % ostvaren je najveći prinos UHCK uz 70 %-tnu vodenu otopinu etanola, te se može vidjeti da povećanjem amplitude ultrazvuka ne dolazi do značajne promjene u prinosu UHCK. Pri višim amplitudama 75 % i 100 % kao bolje otapalo pokazala se 50 %-tna otopina etanola. S obzirom da je 70 %-tna otopina dala najveću vrijednost UHCK, pokazala se se kao bolje otapalo. S povećanjem vremena ekstrakcije ne vide se značajne razlike među prinosima, te se može reći da povećanje vremena ne utječe na ekstrakciju.

a)



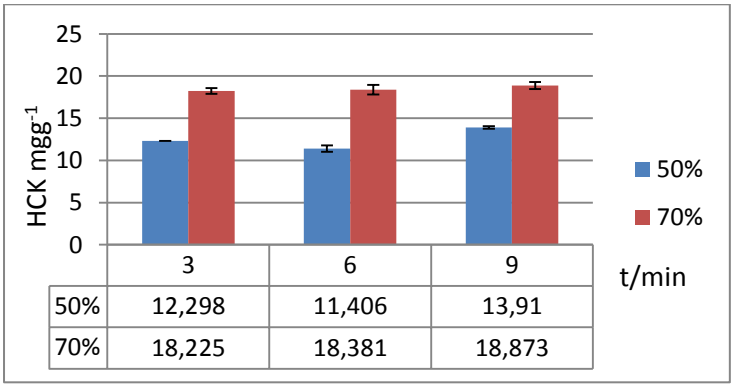
	3	6	9
50%	11,821	11,891	10,502
70%	17,006	18,205	18,5648

b)



	3	6	9
50%	14,079	16,844	15,866
70%	17,593	19,146	18,27267

c)



	3	6	9
50%	12,298	11,406	13,91
70%	18,225	18,381	18,873

Slika 7. Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgCAE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) metanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % najveći prinos ostvaren je sa 70 %-tnim metanolom u trajanju ekstrakcije od 9 minuta. Prinos se povećavao što se vrijeme ekstrakcije povećavalo, ali nema značajnih razlika između prinosa (17,00-18,56 mgCAE g^{-1}). 50 %-tna otopina metanola imala je manje prinose UHCK od 70 %-tne vodene otopine metanola, te nema značajnog utjecaja vremena na ekstrakciju.
b) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 75 % najveći prinos UHCK ostvaren je uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine metanola u vremenu trajanja ekstrakcije od 6 minuta (19,14 mgCAE g^{-1}). Vrijeme trajanja ekstrakcije neznatno je utjecalo na prinos UHCK. Koristeći 50 %-tnu vodenu otopinu metanola dobiveni su znatno manji prinosi UHCK, a vrijeme također nije utjecalo na ekstrakciju.
c) Najveći prinos UHCK pri amplitudi 100 % ostvaren je sa 70 %-tnim metanolom (18,87 mgCAE g^{-1}) pri trajanju ekstrakcije od 9 minuta. Prinosi UHCK dobiveni sa 50 %-tnom otopinom metanola su znatno manji. Vrijeme ekstrakcije nije znatno utjecalo na ekstrakciju.

Pri amplitudi 75 % ostvaren je najveći prinos UHCK (19,14 mgCAE g^{-1}) uz 70 %-tnu vodenu otopinu metanola. Povećanjem polarnosti otapala na 70 %, prinosi su bili veći. Povećanje amplitude nije znatno utjecalo na prinos kao ni vrijeme ekstrakcije.

Uspoređujući otapala koja su se koristila za ekstrakciju, vidi se da su se bolje pokazali 70 %-tni metanol i etanol, od 50 %-tnog metanola i etanola za ekstrakciju UHCK. Prinosi su bili veći pri višim koncentracijama alkohola u vodenoj otopini. Kao najbolje otapalo pokazala se 70 %-tna vodena otopina etanola, kojom su postignuti najveći prinosi UHCK. Kako se amplituda povećavala, ne vidi se značajno povećanje ukupnih prinosa. Vrijeme također nije značajno utjecalo, te povećanje vremena ne mora nužno značiti i veće prinose, jer je već u 3 minuti ekstrakcije ostvarena najveća vrijednosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Liu i sur. (2015) su ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom iz biljke *Cimicifugae rhizoma* utvrdili parametre ekstrakcije za klorogensku, ferulinsku i izoferulinsku kiselinu, pri čemu su kao otapalo koristili etanol (40 %, 60 %, 80 %). Povećanjem udjela alkohola u otopini prinos navedenih kiselina se povećavao, te je statističkom analizom utvrđena najbolja koncentracija etanola, a to je 65,39 %. Navedeni podaci slažu se sa našim dobivenim rezultatima gdje se najbolje pokazala vodena otopina etanola koncentracije 70 %.

Carrera i sur. (2012) su proveli istraživanje ukupnih fenolnih spojeva iz grejpa ultrazvukom potpomognutom ekstrakcije. Njihovo istraživanje potvrđuje da povećanje amplitude na 100 % ne mora nužno značiti i povećanje prinosa ukupnih polifenolnih spojeva, te da nema značajnih razlika između 50 % i 100 % amplitude. Također su potvrdili i da vrijeme ekstrakcije bitno ne utječe na ekstrakciju, jer je 6 minuta optimalno vrijeme, te povećanje vremena ne pridonosi znatno povećanju prinosa ukupnih polifenolnih spojeva.

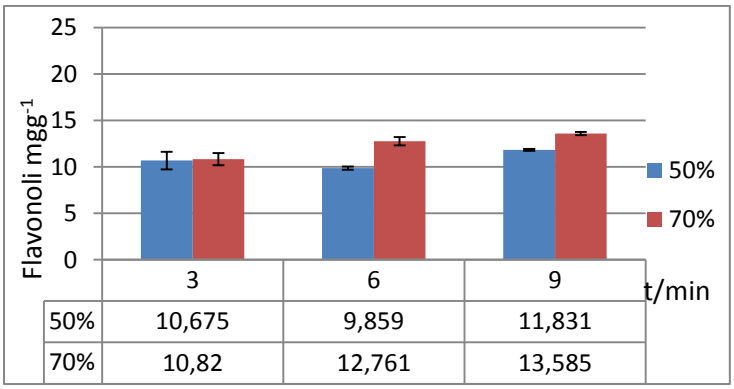
Tablica 3. statistička analiza ANOVA za ukupne hidroksicimetne kiseline

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,025066
Amplituda	0,191851
Polarnost	0,000000
Vrijeme	0,573219

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) odabir otapala ima značajan utjecaj kao i polarnost otapala odnosno udio vodene faze u otapalu na maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Vrijeme i amplituda nemaju značajan utjecaj na maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

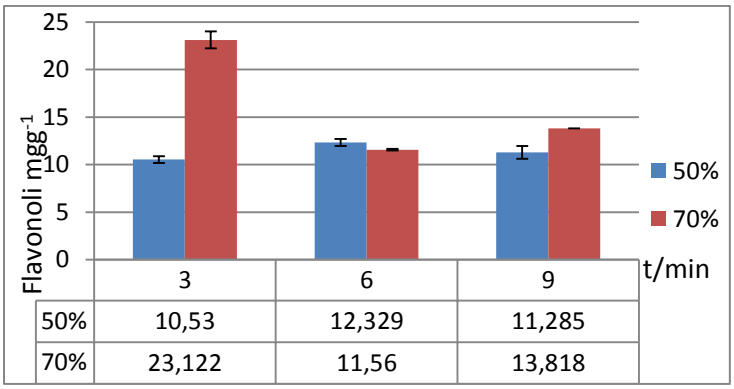
4.2 UKUPNI FLAVONOLI

a)



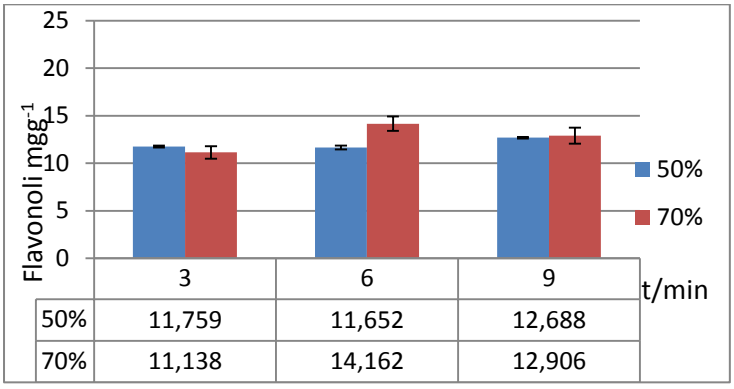
	3	6	9
50%	10,675	9,859	11,831
70%	10,82	12,761	13,585

b)



	3	6	9
50%	10,53	12,329	11,285
70%	23,122	11,56	13,818

c)



	3	6	9
50%	11,759	11,652	12,688
70%	11,138	14,162	12,906

Slika 8. Maseni udjeli ukupnih flavonola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgQE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) etanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

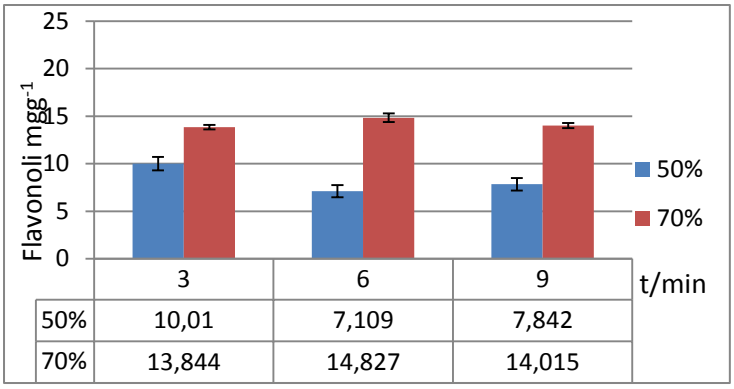
b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % najveći prinos ukupnih flavonola (UF) dobiven je uz upotrebu 70 %-tnog etanola u trajanju vremena ekstrakcije 9 min i iznosio je 13,58 mgQE g^{-1}. Upotrebom 50 % etanola, vrijednosti su konstantne, vrijeme ne pokazuje utjecaj na njih i kreću se u rasponu od 9,85-11,85 mgQE g^{-1}. Budući da se smanjila polarnost otapala, nema većih razlika između ova dva otapala.
b) Pri amplitudi 75 % najveći prinos (23,12 mgQE $g^{-1)}$ ostvaren je uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine etanola u 3 minuti ekstrakcije. Uspoređujući prinose UF uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola ne vide se velika odstupanja od prinosa uz 70 %-tnu vodenu otopinu etanola u vremenu trajanja ekstrakcije 6 i 9 minuta, dok je u 3 minuti ekstrakcije prinos UF bio duplo veći uz upotrebu 70 % etanola.
c) Ukupni prinos flavonola pri amplitudi 100 % nastavlja trend prinosa kao i kod 50 % i 70 % amplitude. Najveći prinos (14,16 mgQE g^{-1}) ostvaren je uz upotrebu 70 %-tnog etanola. Kada se smanji polarnost etanola na 50 % , ne vide se značajne razlike između prinosa UF između ova dva otapala.

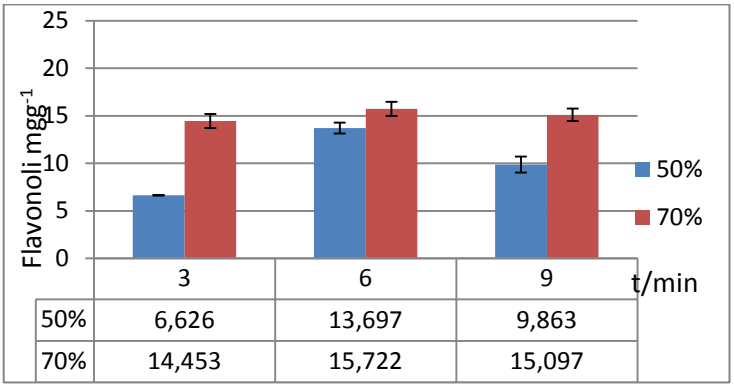
Smanjenjem polarnosti otapala ne vide se značajne razlike između 50 % i 70 %-tne vodene otopine. S obzirom da je najveći prinos ostvaren uz 70 %-tni etanol pri amplitudi 75 %, može se zaključiti da se on pokazao kao bolje otapalo. Povećanjem amplitude, ne uočava se značajno povećanje prinosa UF. Također povećanje vremena nije značajno utjecalo, jer se vidi da je već u 3 minuti ostvaren najveći prinos flavonola.

a)



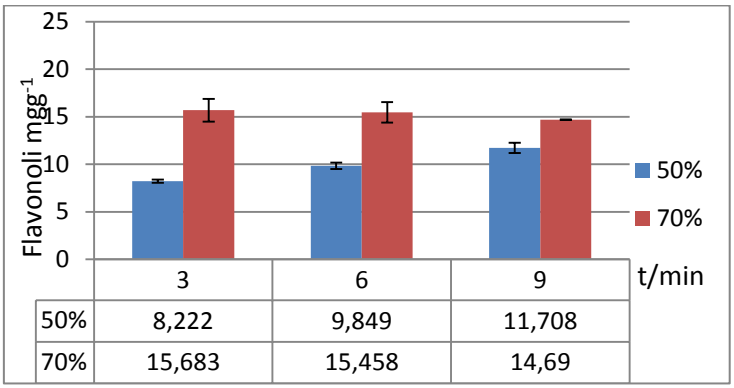
	3	6	9
50%	10,01	7,109	7,842
70%	13,844	14,827	14,015

b)



	3	6	9
50%	6,626	13,697	9,863
70%	14,453	15,722	15,097

c)



	3	6	9
50%	8,222	9,849	11,708
70%	15,683	15,458	14,69

Slika 9. Maseni udjeli ukupnih flavonola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgQE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) metanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % prinos dobiven uz upotrebu 70 %-tnog metanola neznatno varira bez obzira na vrijeme trajanja ekstrakcije (13,84-14,82 mgQE g^{-1}). Maseni udjeli manji su u ekstraktima dobivenim uz primjenu 50 %-tne otopine metanola, te se smanjuju što se vrijeme povećava.
b) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 75 % prinosi UF uz upotrebu 50 % metanola znantno variraju tijekom vremena ekstrakcije. U 3 minuti ekstrakcije zabilježena je najniža vrijednost UF 6,62 mgQE g^{-1}, dok je u 6 minuti ta vrijednost duplo narasla (13,69 mgQE g^{-1}), te se opet smanjila povećanjem vremena na 9 minuta. Ipak, maseni udjeli dobiveni uz 70 % otopinu metanola, veći su u odnosu na 50 %-tnu otopinu metanola, te njihova količina neznatno varira u odnosu na vrijeme (14,45-15,72mgQE g^{-1}).
c) Povećanjem amplitude nastavlja se trend ukupnih prinosa flavonola. Uz upotrebu 50 % metanola vrijednosti znatno ne variraju u odnosu na vrijeme, ali su vrijednosti manje nego što su dobivene uz upotrebu 70 % metanola. Povećanjem polarnosti otapala povećale su se vrijednosti UF, te je u 3 minuti postignuta najveća koncentracija 15,68 mgQE g^{-1}. Povećanjem amplitude ne vidi se značajan porast vrijednosti ukupnih flavonola.

S obzirom da su dobiveni veći prinosi UF primjenom 70 % metanola, može se zaključiti da je ono bolje otapalo od 50 %. Povećanjem amplitude ne uočava se značajno povećanje prinosa, te također povećanje vremena nije značajno utjecalo na vrijednosti ukupnih flavonola.

Uspoređujući dva otapala etanol i metanol, odnosno njihove 50 % i 70 %-tne vodene otopine vidi se da su se bolje pokazale 70 %-tne vodene otopine, jer povećanjem udjela alkohola u otopini dobiveni su veći prinosi ukupnih flavonola. S obzirom da je sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola postignuta najveća vrijednost UF 23,12 mgQE g^{-1}, može se zaključiti da se etanol pokazao kao učinkovitije otapalo od metanola. Povećanje amplitude i vremena nije jako utjecalo na vrijednosti ukupnih flavonola.

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 hiperozida, viteksina i vitexin-2″-O-ramnozida, HPLC-UV/PAD metodom. Ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima daju bolje prinose gore navedenih 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 %-tni etanol u trajanju ekstrakcije do 30 minuta (Martino i sur., 2008).

Na uzorcima biljke *Euonymus alatus* provedeno je istraživanje utjecaja ekstrakcijskih parametara na ekstrakciju rutina i kvercetina u ultrazvučnoj kupelji. Kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se 70 %-tni etanol u trajanju ekstrakcije 3 puta po 30 minuta. Rezultati su uspoređeni s klasičnom metodom ekstrakcije, maceracijom te se ultrazvuk pokazao kao bolji način ekstrakcije jer se smanjila upotreba otapala i skratilo se vrijeme trajanja ekstrakcije (Yang i Zhang, 2008).

Jovanović i sur. (2015) su proveli istraživanje na biljci *Thymus serpyllum*, te su odredili optimalne uvijete ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Njihovo istraživanje potvrđuje da vrijeme ekstrakcije ne utječe bitno na ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva. Optimalno vrijeme ekstrakcije je 3 min, te povećanje vremena ekstrakcije na 15 minuta nije doprinjelo većim vrijednostima ukupnih polifenolnih spojeva

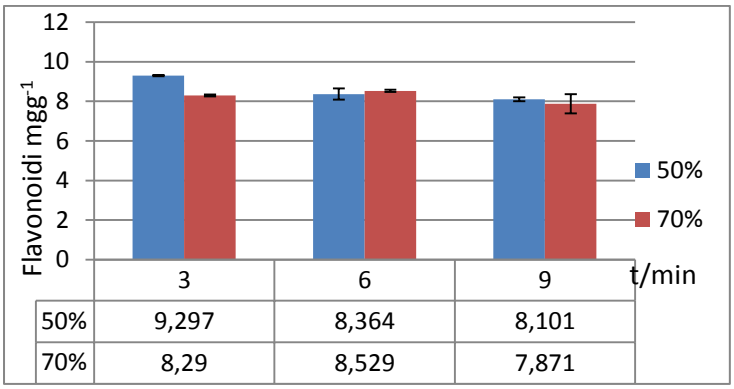
Tablica 4. statistička analiza (ANOVA) za ukupne flavonole

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,393065
Amplituda	0,022214
Polarnost	0,000000
Vrijeme	0,937426

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) odabir ekstrakcijskog otapala nema značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonola, dok udio vodene faze u ekstrakcijskom otapalu odnosno polarnost ima značajan utjecaj na udio ukupnih flavonola. Amplituda je pokazala značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonola, dok vrijeme nije pokazalo značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonola.

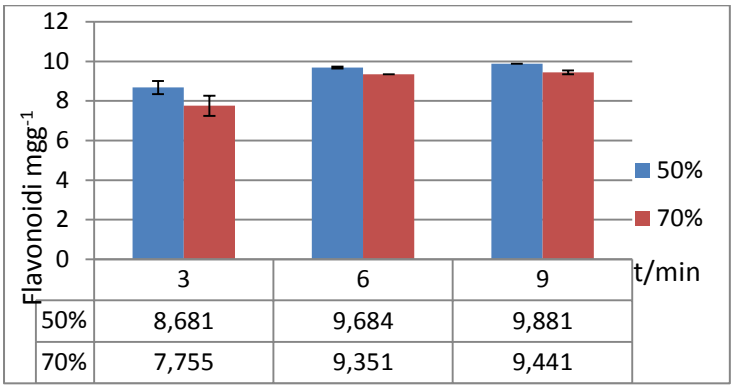
4.3 UKUPNI FLAVONOIDI

a)



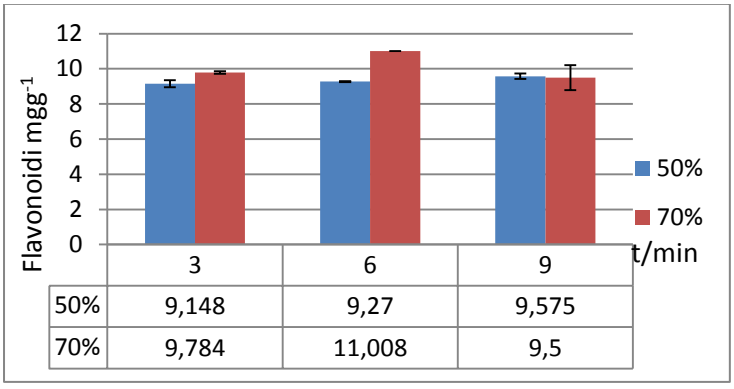
	3	6	9
50%	9,297	8,364	8,101
70%	8,29	8,529	7,871

b)



	3	6	9
50%	8,681	9,684	9,881
70%	7,755	9,351	9,441

c)



	3	6	9
50%	9,148	9,27	9,575
70%	9,784	11,008	9,5

Slika 10. Maseni udjeli ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga ($mgQEg^{-1}$) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) etanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo pri amplitudi 50 % nisu se značajno razlikovale vrijednosti ukupnih flavonoida (UFL) u ovisnosti o udjelima etanola (50 % i 70 %). Maseni udjeli UFL: uz 50 % vodenu otopinu etanola u rasponu su od 8,10-9,29 $mgQEg^{-1}$, te uz 70 % vodenu otopinu etanola 7,87-8,52 $mgQEg^{-1}$. Vrijeme ekstrakcije također nije značajno utjecalo, a najveći prinos ostvaren je uz primjenu 50 % vodene otopine etanola u 9-oj minuti ekstrakcije.
b) Pri amplitudi 75 % upotrebom 50 %-tnog etanola prinosi UFL su bili podjednaki, te je najveći prinos (9,88 $mgQEg^{-1}$) ostvaren uz upotrebu navedenog otapala u 9 minuti ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na ekstrakciju, kao ni povećanje amplitude. Upotrebom 70 %-tnog etanola dobivene su manje vrijednosti UFL.
c) U ekstraktima dobivenim uz 50 % etanola kao ekstrakcijsko otapalo pri amplitudi 100 % vrijednost UFL gotovo su podjednake u rasponu 9,14-9,57 mgQE/g. Povećanjem udjela otapala postignuta je najveća vrijednost UFL 11,00 mgQE g^{-1} u 6 minuti ekstrakcije, dok se ostale vrijednosti dobivene uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine etanola ne razlikuju od vrijednosti dobivenih uz upotrebu 50 %-tnog etanola. Vrijeme nije znatno utjecalo na ekstrakciju, dok se povećanjem amplitude na 100 % dobila najveća vrijednost ukupnih flavonoida.

S obzirom da su s 50 % i 70 %-tnom vodenom otopinom etanola dobivene podjednake vrijednosti ukupnih flavonoida može se reći da su obje otopine prikladne za ekstrakciju flavonoida. Sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola dobivena je najviša vrijednost UFL, pa je 70 %-tna vodena otopina malo bolja od 50 %-tne otopine etanola.

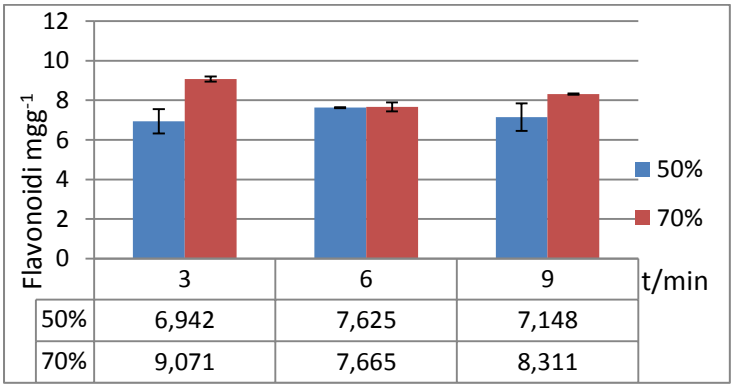
LV Bang-yu i sur. (2008) su istraživali optimalne uvijete ultrazvučne ekstrakcije iz lišća gloga te su ih usporedili s tradicionalnim uvijetima ekstrakcije. Prirast flavonoida bio je veći kad je temperatura bila između 50 °C i 60 °C, a smanjivao se kad je temperatura bila veća od 60 °C. Otapalo uz koje su dobivene najveće vrijednosti ukupnih flavonoida je 70 % vodena otopina etanola u trajanju ekstrakcije od 50 minuta.

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. 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}.

Istraživanja ukupnih flavonoida Wanga i sur. iz korijena biljke *I. Helenium* ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, dobiveni su optimalni procesi ekstrakcije. Za ukupne flavonoide optimalni procesi ekstrakcije za 1 g uzorka bili su 20 ml 60 % etanola i trajanje ekstrakcije 20 minuta. Pod tim optimalnim uvjetima, prinos ukupnih flavonoida bio je 17,36 ± 0,94 mg g^{-1} (Wang i sur., 2012).

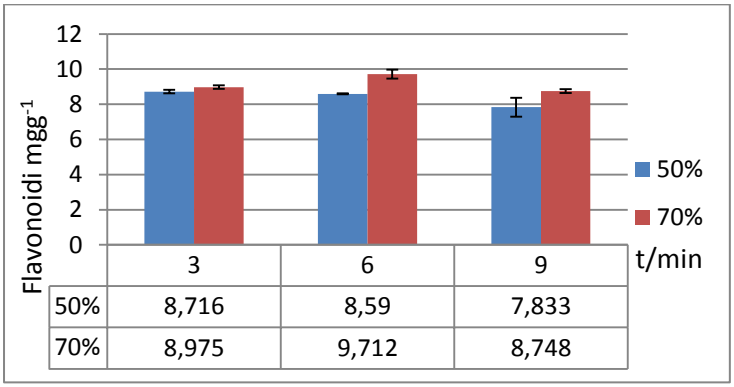
Ho i sur. (2014) su dobili optimalne uvijete ultrazvučne esktrakcije za flavonoide iz biljke *Orthosiphon stamineus*. Optimalni uvijeti ekstrakcije bili su 50 % etanol, trajanje ekstrakcije 10 minuta i amplituda 100 %. Utvrdili su da najviše na ekstrakciju djeluje polarnost otapala, dok amplituda i vrijeme manje utječu, ali povećanje amplitude do 100 % dalo je najveći prinos ukupnih flavonoida.

a)



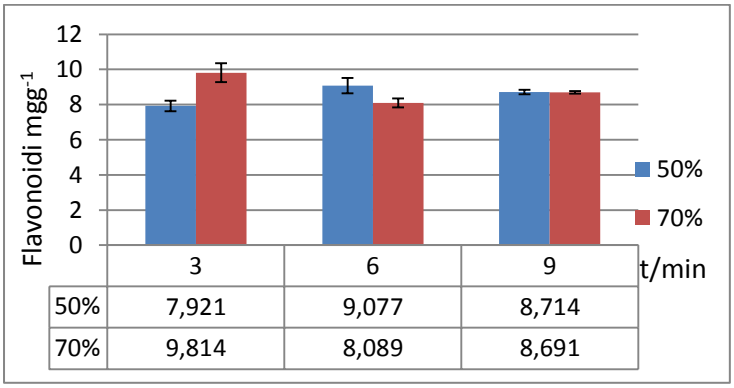
	3	6	9	t/min
50%	6,942	7,625	7,148	
70%	9,071	7,665	8,311	

b)



	3	6	9	t/min
50%	8,716	8,59	7,833	
70%	8,975	9,712	8,748	

c)



	3	6	9	t/min
50%	7,921	9,077	8,714	
70%	9,814	8,089	8,691	

Slika 11. Maseni udjeli ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgCAE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz upotrebu vodenih otopina (50 % i 70 %) metanola, u trajanju ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

a) U ekstraktima dobivenim primjenom metanola kao otapala pri amplitudi ekstrakcije 50 % prinosi ukupnih flavonoida nisu se značajno razlikovali u ovisnosti o udjelu metanola u otapalu za ekstrakciju. Uz 50 %-tni metanol vrijednosti UFL kretale su se između 6,94-7,62 mgQE g^{-1}, a sa 70 %-tnim metanolom vrijednosti su bile 7,66-9,07 mgQE g^{-1}. Najveći prinos ostvaren je uz 70 %-tnu vodenu otopinu metanola u 3 minuti ekstrakcije 9,07 mgQE g^{-1}. Povećanje trajanja vremena ekstrakcije nema značajan utjecaj na prinos UFL.
b) Povećanjem amplitude na 75 % nastavlja se trend kao i kod amplitude 50 %. Nema značajnih razlika u ovisnosti o udjelu metanola u otapalu za ekstrakciju. Najveći prinos ostvaren je uz upotrebu 70 %-tnog metanola 9,71 mgQE g^{-1} u 6 minuti ekstrakcije.
c) Uz upotrebu 50 % metanola pri amplitudi 100 % nema značajnih razlika između vrijednosti UFL kao i pri amplitudi 50 % i 75 %. Vrijednosti su se kretale od 7,92-9,07 mgQE g^{-1}. Povećanjem udjela metanola ostvaren je najveći prinos 9,81 mgQE g^{-1}.

S obzirom da su se dobile podjednake vrijednosti ukupnih flavonoida uz 50 %-tnu i 70 %-tnu otopinu metanola, može se reći da su obje otopine pogodne za ekstrakciju ukupnih flavonoida. Povećanje vremena nema značajan utjecaj na prinos flavonoida. Povećanje amplitude također ne utječe na masene udjele.

Tahirović i sur. su uspoređivali fenolne spojeve dvije vrste gloga *C. monogyna* i *C. Rhipidophylla* ekstrahirane ultrazvučnom ekstrakcijom. Kao otapalo se koristio 80 %-tni metanol i 80 %-tni zakiseljeni metanol, a ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Sadržaj ukupnih flavonoida u *C. Monogyna* je bio 0.21-0.93 mgQE g^{-1}. *C. Rhipidophylla* ima manji sadržaj ukupnih flavonoida od *C. monogyna,* te iznosi 0.13-0.56 mgQE g^{-1}. 80 %-tni metanol se pokazao kao bolje otapalo, jer je imao bolju učinkovitost ekstrakcije flavonoida izraženo kao ekvivalent kvercetina iz obje vrste gloga (Tahirović i sur. 2015).

Drugo istraživanje su proveli Tahirović i Bašić na plodovima gloga *C. monogyna*. ultrazvučnom ekstrakcijom u vodenoj kupelji u trajanju od 30 minuta, uz upotrebu čistog metanola, čistog etanola, 80 %-tnog etanola i metanola, 50 %-tnog etanola i metanola te vode

kao otapala, ekstrahirani su ukupni flavonoidi. Najveća količina ukupnih flavonoida dobivena je sa 80 % metanolom, a najniža količina flavonoida dobivena je sa čistim etanolom i vodom. Metanol se pokazao kao bolje otapalo od etanola, zbog polarnosti, a otopina alkohol/voda pokazala se bolja od čistog otapala. Najveća količina ukupnih flavonoida iznosila je 0.254 - 0.595 mg RUE g^{-1} (Tahirović i Bašić, 2014).

Uspoređujući dva otapla, 70 % i 50 %-tnu vodenu otopinu metanola i etanola, 70 %-tna vodena otopina etanola se pokazala boljom, jer je sa etanolom ostvarena najveća koncentracija flavonoida u listu i cvijetu gloga 11,00 mgQE g^{-1}.

Tablica 5. statistička analiza (ANOVA) za ukupne flavonoide

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,000034
Amplituda	0,000000
Polarnost	0,025293
Vrijeme	0,301548

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) udio vodene faze u ekstrakcijskom otapalu ima značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonoida. Odabir ekstrakcijskog otapala ima značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonoida dok povećanje vremena ne utječe na izolaciju flavonoida. Povećanje amplitude također ima značajan utjecaj na maseni udio ukupnih flavonoida.

5. ZAKLJUČAK

1. Pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom istražujući utjecaj vrste otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz biljne mješavine cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*), kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se etanol. U svim ekstraktima dobivenim s etanolom, određene su veće koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u odnosu na ekstrakte dobivene s metanolom.

2. Povećanje volumnog udjela etanola i metanola s 50 % na 70 %, utječe na povećanje masenih udjela ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.

3. Vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) nije značajno utjecalo na koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.

4. Povećanje amplitude (50 %, 75 % i 100 %) nije značajno utjecalo na koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.

5. Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz mješavine cvijeta i lista gloga te najviši prinosi ostvaruju se uz 70 % etanol pri sljedećim uvjetima:

- flavonoidi (11,00 mg QE g^{-1}) pri amplitudi 100 % i trajanju ekstrakcije 6 minuta

- hidroksicimetne kiseline (22,017 mg CAE g^{-1}) pri amplitudi 50 % i trajanju ekstrakcije 3 minute

- flavonoli (23,12 mg QE g^{-1}) pri amplitudi 75 % i trajanju ekstrakcije 3 minute.

6. LITERATURA

- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J.(2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry, *Ultrason Sonochem.* **11**, 261–265.
- Anonymus (2016) < http://www.plantea.com.hr/glog/> Pristupljeno 20.4.2016
- Anonymus (2016) Područje ultrazvuka < http://energonova-zagreb.eu/ultrazvucno-ispitivanje> Pristupljeno 26.4.2016
- Ashokkumar M., Sunartio D., Kentish S., Mawson R.,Simons L., Vilkhu K., Versteeg C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system, Innovat. *Food. Sci. Emerg. Tech*. **9**, 155–160.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Kennan, A.J., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M. (2003) Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: Flavonoid conversions by cellfree protein extracts of Centaurea maculosa (spotted knapweed) roots. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 897- 901.
- Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., Aruoma, O.I. (2003) Phenolic constituents and antioxidant capacities of Crataegus monogyna (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung.* **47**, 191–198.
- 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.
- Brnčić, M., Herceg Ljubić, I., Šubarić, D., Badanjak, M., Rimac Brnčić, S., Tripalo, B., Ježek, D., Cerovec, P., Herceg, Z. (2009b) Influnce of power ultrasound on texturel properities of corn starch gels. Proceedings of the 5 th ISFRS- International Syposium on Food Rheology and Structure, June 15-18, Zürich, Switzerland
- Brnčić, M., Markučič, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009a) Use of low-intensitiy ultrasound for foreigin bodies determination in food system. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr*. **4**, 18-22.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D. (2009c) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr*. **4** (1-2), 32-37.

- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2010) Applicatons of ultrasound in food tachnology: Processing, preservation and extraction, *Ultrason. Sonochem.* **18,** 813-835.
- Cui, T. Li, J.Z.; Kayahara, H.; Ma, L.; Wu, L.X.; Nakamura, K. (2006) Quantification of the polyphenols and triterpene acids in Chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem*. **54**, 4574–4581.
- Dai, J., Mumper J.R. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352
- De Castro, L.M.D., Capote, P.F. (2007) Analytical applications of ultrasound. *Elsevier Science.* Langford Lane, Oxford, Great Britain.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid. Redox. Sign.* **18**, 1819-1834.
- Dornenburg, H., Knoor, D. (1993) Cellular permeabilization of cultured plant-tissues by high electric-field pulses or ultra high-pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnol.* **7**, 35-48.
- Drmić, H., Režek-Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33
- Edwards, E. J., Brown, N. P., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R. (2012) A review of the chemistry of the genus Crataegus. *Phytochemistry* **79,** 5-26.
- Ercisli, S. (2004) A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. Gen. *Res. Crop. Evol*. **51**, 419–435.
- Franjić, J., Škvorc, Ž., Žarni, A. (2006) Rasprostranjenost panonskoga crnog gloga (Crataegus nigra Waldst. et Kit.) u Hrvatskoj i njegov značaj u formiranju vegetacije šumskih rubova. *Šumarski list broj 1-2*, CXXX, 3-8.
- Gao, P., Li, L., Peng, Y., Li, F., Niu, C., Huang, X., Ming, M. and Song, S. (2010). Monoterpene and lignan glycosides in the leaves of Crataegus pinnatifida. *Biochem. Syst. Eco.* **38(5**), 988–992.
- Garcia-Mateos, R., Aguilar-Santelises, L., Soto-Hernandez, M., Nieto-Angel, R. (2013) Flavonoids and antioxidant activity of flowers of Mexican *Crataegus* spp. *Nat. Prod. Res.* **27**, 834-836.

- Gundogdau, M., Ozrenk, K., Ercisli, S., Kan, T., Kodad, O., Hegedus, A. (2014) Organic acids, sugars, vitamin C content and some pomological characteristics of eleven hawthorn species (*Crataegus* spp.) from Turkey. *Biol. Res.* **47**, 1-5
- Herrmann, K. (1988) On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables. Z. Lebensm. *Unters. Forsch.* **186**, 1–5.
- Ho, K.S., Tan, P.C., Thoo, Y.Y., Abas, F., Ho, W.C. (2014) Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants in Misai Kucing (Orthosiphon stamineus). *Molecules* , **19**, 12640-12659.
- Jurikova, T., Sochor, J., Rop, O., Mlcek, J., Balla, S., Szekeres, L.,Adam, V., Kizek, R. (2012) Polyphenolic Profile and Biological Activity of Chinese Hawthorn (Crataegus pinnatifida BUNGE) Fruits. *Molecules*, **17**, 14490-14509.
- Kazazić S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol,* **55**, 279-290.
- Kumar, D., Arya, V., Ali Bhat, Z., Khan, A.N., Prasad, N.D. (2012) The genus Crataegus: chemical and pharmacological perspectives. *Rev. bras. farmacogn*. **22.**
- Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo*, **56** (4), 311-330.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem.* **15**, 731-737.
- Liu, L., Shen, B-J., Xie1, 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. *Pharmacogn mag.* **11** (44), 682-689.
- Liu, P. (2012) Composition of hawthorn (Crataegus spp.) fruits and leaves and emblic leafflower (Phyllanthus emblica) fruits. Department of Biochemistry and Food Chemistry and Functional Foods Forum , University of Turku.
- Liu, T., Cao, Y., Zhao, M. (2010) Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (C. Pinnatifida Bge. Var. major) fruits. *Food. Chem.* **119**, 1656-1662.
- Liu, W.M.; Chen, G.H.; Cui, T. (2013) Determination of flavones in Crataegus pinnatifida by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. Sci*. , **41**, 87–91.
- LV Bang-yu i (College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000) (2008) Study on the Ultrasonic Extraction Technology on Total Flavonoids from Hawthorn Leaf. *J. Anhui. Agri. Sci*. **3**.

- 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 *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn). *Phytochem. Anal.* **19**, 534–540.
- Melikoğlu, G., Bitiş. L., MeriÇli, H.A. (2004) Flavonoids of Crataegus Microphylla. *Nat Prod Res.* **18:3**, 211-213.
- Nabavi, F.S., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S.M. (2015*)* Polyphenolic Composition of Crataegus monogyna Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients, **7:9,*** 7708-7728.
- Naczk, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 95-111.
- Navas-Lopez, J.F., Ostos-Garrido F.J., Castillo, A., Martín, A., Gimenez, M.J., Pistón F. (2014) : Phenolic content variability and its chromosome location in tritordeum. *Front Plant Sci* **5:10**.
- 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 Chem*, 198, 93-100.
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. (2012) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem.* **19**, 486-490.
- Patist, A., Bates, D. (2008) Ultrasonics inovations in the food industry : From the laboratory to commercial production. *Innov Food Sci Emerg*, **9**, 147-154.
- Peschel, W., Bohr, C. and Plescher, A. (2008) Variability of total flavonoids in *Crataegus*--factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia* **79**, 6–20.
- Raso, J., Manas, P., Pagan, R., Sala, F.J. (1999): Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* **5**, 157–162.
- Rehwald, A., Meier, B., Sticher, O. (1994) Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Crataegus leaves and flowers. J. Chromatogr. A. **677**, 25–33
- Ringl, A., Prinz, S., Huefner, A., Kurzmann, M., Kopp, B. (2007) Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis

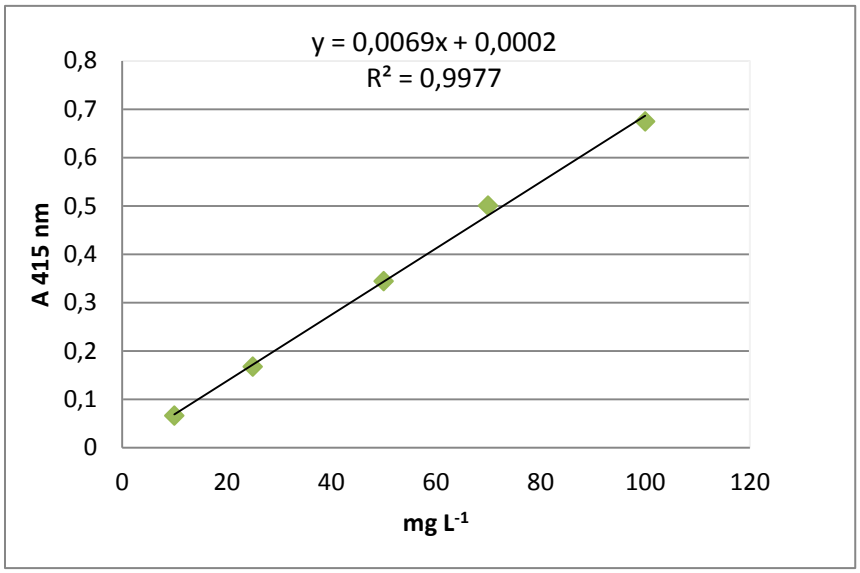
on (R)- and (S)-eriodictyol-7-*O*-glucuronide and luteolin-7- *O*-glucuronide. *Chemistry & Biodiversity*. **4**, 154–162.

- Robbins, J.R., Kwik-Uribe, C., Hammerstone, F.J., Scmitz, H.H. (2006) Analysis of flavanols in Foods: What methods are Required to Enable Meaningful Health Recommendations. *J. Cardiovasc Pharmaco.* **47,** 110-118.
- Rodrigues, S., Calhelha, C.R., Barreira, C.M.J., Dueñasc, M., Carvalho, A.M., Abreu, M.V.R., Santos-Buelgac, C., Ferreira, C.F.R.I. (2012) Crataegus monogyna buds and fruits phenolic extracts: growth inhibitory activity on human tumour cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Res Int* **49,** 516-523.
- 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 food Sci tech*. 42, 134-149.
- Stalikas, C.D. (2007) Extraction, separation, and detection methods forphenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sc*. **30**, 3268 – 3295.
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostiainen, R., Laakso, I., Hiltunen, R. (2006) Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatogr*. *A* **1112**, 103–111.
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostiainen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J.P., Laakso, I., Hiltunen, R. (2002) Isolation and identification of oligomeric procyanidins from Crataegus leaves and flowers. *Phytochemistry* **60**, 821–825.
- 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.
- Tahirović, A., Bašić, N. (2014) Phenolic content and antioxidant activity of crataegus monogyna l. Fruit extracts. *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo No.2,* 29-40.
- Tahirović, A., Bašić, N., Hubijar, I., Šito, S., Čabaravdić, A. (2015) Comparison of polyphenol content and antioxidant activity of extracts from fruits of two crataegus species. *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo No. 1,* 38-51.

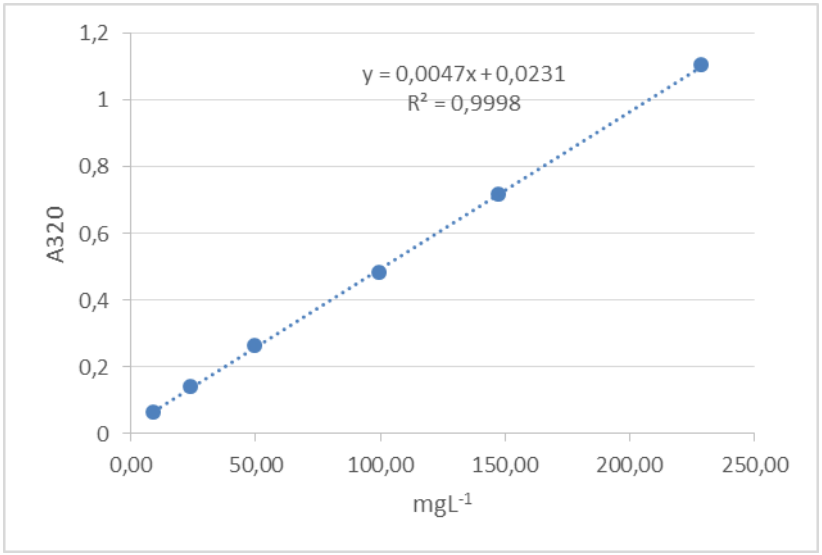
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* **2**, 1231-1246.
- Urbonavičiūtėa, A., Jakštasb, V., Kornyšovaa, O., Janulisb, V., Maruškaa, A. (2006) Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (Crataegus monogyna Jacq.) ethanolic extracts. *J chromatogr A.* **1112** (1:2), 339-344.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7143-7172.
- Vinatoru, M. (2001) An overwiev of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem.* **8**, 303-313.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006) Reecent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends.Food.Sci.Tech* **17**, 300-312.
- Waterhouse A: Folin-Ciocalteau Micro Method for Total Phenol in Wine. UC Davis, 2012.
- Weinges, K., Piretti, M.V. (1971) Isolation of procyanidin B1 from grapes. *Justus Liebig Ann. Chem.* **748**, 218-224.
- Wu, J., Peng, W., Qin, R., Zhou, H. (2014) Crataegus pinnatifida: Chemical Constituents, Pharmacology, and Potential Applications. *Molecules* **19**, 1685-1712.
- Yang, B., Liu, P. (2012) Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (Crataegus spp.) of different origins. J. Sci. Food Agric. 92, 1578–1590
- Yang, Y., Zhang, F. (2008) Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from Euonymus alatus (Thunb.) Sieb. *Ultrason Sonochem.* **15**, 308-313.
- Žilić, I. (2014) Udžbenik za sakupljanje samoniklog bilja, Tiskara Domigraf, Sisak

7. PRILOZI

7.1 BAŽDARNI PRAVAC ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA



7.2 BAŽDARNI PRAVAC ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA



7.3 BAŽDARNI PRAVAC ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOLA

