

Izolacija bioaktivnih spojeva ploda pasjeg trna primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Rnjak, Viktorija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:112615>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Viktorija Rnjak

1352/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA PLODA PASJEG TRNA
PRIMJENOM EKSTRAKCIJE
POTPOMOGNUTE
MIKROVALOVIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Ivone Elez Garofulić.

Ovo istraživanje provedeno je u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093) koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.

ZAHVALA

Zahvaljujem se dragoj mentorici doc.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić na pomoći, savjetima pri izvedbi eksperimenta i pisanju rada, no i karizmi i pristupačnosti koje su ovo iskustvo učinile još ugodnijim.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su zajedno sa mnom proživljavali sve fakultetske avanture, uspone i padove i zbog kojih je studentsko razdoblje bilo ljepše i lakše. S Vama je svaki trenutak bio čarobniji.

Najveće hvala mojoj obitelji bez koje sve ovo ne bi bilo moguće i koja je neprestano vjerovala u mene, bodrila me na svakom koraku i poticala da pređem sve prepreke koje su bile na putu. Hvala Vam na svom strpljenju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA PLODA PASJEG TRNA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA

Viktorija Rnjak 1352/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je optimirati parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za izolaciju fenolnih spojeva i biljnih pigmentata iz ploda pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) Ekstrakcija je provedena uz pomoć 70 %-tnog etanola kao otapala i pritom je ispitan utjecaj temperature (40, 60 i 80 °C), snage mikrovalova (300, 500 i 700 W) i vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) na masene udjele izoliranih spojeva. Maseni udjeli bioaktivnih spojeva određeni su spektrofotometrijski s prosječnim vrijednostima: ukupni fenoli (322,87 mg GAE 100 g⁻¹), klorofil *a* (2,53 mg 100 g⁻¹), klorofil *b* (6,27 mg 100 g⁻¹) i ukupni klorofili (8,80 mg 100 g⁻¹). Također, određena je antioksidacijska aktivnost FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 2011,42 μmol TE 100 g⁻¹. Statističkom analizom utvrđeno je kako sva tri varirana parametra imaju statistički značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj na masene udjele bioaktivnih spojeva dok parametar snage jedini ima statistički značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Najveći prinos ukupnih fenola određen je u ekstraktu dobivenom pri 80 °C/300 W/10 min, ukupnih klorofila u ekstraktu dobivenom pri 80 °C/300 W/5min, dok je najviša antioksidacijska aktivnost određena u ekstraktu dobivenom pri 80 °C/500 W/10 min.

Ključne riječi: *antioksidacijska aktivnost, biljni pigmenti, MAE, plod pasjeg trna, ukupni fenoli*

Rad sadrži: 51 stranica, 9 slika, 8 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc. dr.sc. Ivona Elez Garofulić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Doc.dr.sc. *Ivona Elez Garofulić*
3. Doc.dr.sc. *Maja Repajić*
4. Prof.dr.sc. *Sandra Albino* (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SEA BUCKTHORN FRUIT USING MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION

Viktorija Rnjak 1352/PI

Abstract: The aim of this thesis was to optimize conditions for the isolation of phenolic compounds and plant pigments from sea buckthorn fruit (*Hippophae rhamnoides* L.) using microwave assisted extraction (MAE). The extraction was performed with a solvent of 70 % ethanol and the influence of temperature (40, 60 and 80 °C), microwave power (300, 500 and 700 W) and extraction time (5, 10 and 15 min) on the mass fractions of isolated compounds was examined. Mass fractions of bioactive compounds were determined spectrophotometrically with average values: total phenols (322,87 mg GAE 100 g⁻¹), chlorophyll *a* (2,53 mg 100 g⁻¹), chlorophyll *b* (6,27 mg 100 g⁻¹) and total chlorophyll (8,80 mg 100 g⁻¹). In addition, the antioxidant activity was determined by FRAP assay with an average value of 2011,42 μmol TE 100 g⁻¹. Statistical analysis showed that all three varied parameters have a statistically significant ($p \leq 0,05$) effect on mass fractions of bioactive compounds, while the power parameter alone has a statistically significant ($p \leq 0,05$) effect on antioxidant activity. The highest yield of total phenols was obtained at 80 °C/300 W/10 min, total chlorophyll at 80 °C/300 W/5min, while the highest antioxidant activity was obtained at 80 °C/500 W/10 min.

Key words: *antioxidant activity, MAE, plant pigments, total phenols, sea buckthorn fruit*

Thesis contains: 51 pages, 9 pictures, 8 tables, 58 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Ivona Elez Garofulić, Assistant professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: September 23th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PASJI TRN (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA	3
2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U PLODU PASJEG TRNA	4
2.3.1. Fenolni spojevi	4
2.3.2. Biljni pigmenti	8
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA	10
2.5. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA	13
2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA	14
2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost MAE	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI	20
3.1.1. Uzorak	20
3.1.2. Laboratorijski uređaji i pribor:	20
3.2. METODE RADA	22
3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz ploda pasjeg trna primjenom MAE	22
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	24
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila	26
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	27
3.2.5. Obrada rezultata	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U PLODU PASJEG TRNA	31
4.2. UTJECAJ MAE NA UDIO KLOOROFILA U PLODU PASJEG TRNA	36
4.2.1. Utjecaj parametara MAE na udio klorofila <i>a</i>	38
4.2.2. Utjecaj parametara MAE na udio klorofila <i>b</i>	39
4.2.3. Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih klorofila	39
4.2. UTJECAJ MAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST SPOJEVA U PLODU PASJEG TRNA	41
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Pasji trn (lat. *Hippophae rhamnoides* L.) je biljna vrsta koja u posljednje vrijeme dolazi sve više do izražaja zbog svojih izuzetnih karakteristika. Pripada porodici Elaeagnaceae i prirodno je rasprostranjena na europskom i azijskom tlu. Odlikuje ju dobra izdržljivost i otpornost na ekstremne klimatske uvjete.

Povijesni dokumenti svjedoče kako se pasji trn od davnina koristio kao hrana, lijek i gorivo, a dokazano je da posjeduje antioksidacijska, imunomodulatorska, antiaterogena hepatoprotektivna te brojna druga svojstva. Ta svojstva proizlaze iz kemijskog sastava biljke koji čine brojni polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline), vitamini (A, C i E) pigmenti (karotenoidi, klorofili), organske kiseline, aminokiseline, masne kiseline, fitosteroli, polisaharidi i dr.

Izolacija bioaktivnih spojeva iz biljaka danas se provodi konvencionalnim i nekonvencionalnim metodama pri čemu nekonvencionalne metode pokazuju brojne prednosti pred konvencionalnim i odlikuju se svojom brzinom, jednostavnošću te ekonomskom i ekološkom prihvatljivošću. U ovom istraživanju izolacija bioaktivnih spojeva (fenolnih spojeva i biljnih pigmenata) provedena je ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima koja je jedna od nekonvencionalnih metoda ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima temelji se na djelovanju elektromagnetskog polja prilikom čega se energija uz pomoć mikrovalova prenosi na materijal kroz molekulske interakcije. Pritom dolazi do razaranja biljne stanice i izdvajanja staničnog sadržaja u otapalo.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati učinak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na izolaciju bioaktivnih spojeva (fenola i pigmenata) iz ploda pasjeg trna kao i odrediti antioksidacijsku aktivnost istih uz korištenje 70 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Kako bi se pritom dobili što veći ekstrakcijski prinosi, potrebno je bilo razmotriti i odrediti optimalne parametre ekstrakcije – temperaturu ekstrakcije, snagu mikrovalova i vrijeme trajanja ekstrakcije. Ekstrakcija se provodila pri temperaturama 40, 60 i 80 °C, snazi mikrovalova 300, 500 i 700 W te vremenu trajanja 5, 10 i 15 min. Maseni udjeli bioaktivnih spojeva u ekstraktima određeni su spektrofotometrijski dok je antioksidacijska aktivnost ekstrakata utvrđena korištenjem FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides* L.)

Pasji trn je samonikli listopadni grm iz porodice Elaeagnaceae, prirodno rasprostranjen na području Europe i Azije. Samoniklo raste u planinskim regijama i može dosegnuti visinu 2–4 m (Cossuta i sur., 2007). Naziv “*Hippophae*” izveden je iz latinske riječi ‘Hippo’ što znači konj te ‘Phaos’ što znači sjaj (Suryakumar i Gupta, 2011).

To je biljka sa snažnim korijenskim sustavom, izvrsnom izdržljivošću te otpornošću na sušu i niske temperature (Suryakumar i Gupta, 2011). Stabiljka pasjeg trna ima stršeće, gole i crveno-smeđe grane. Prostrani ogranci se razvijaju u trnove, listovi su izmjenični, srebrnasto-sive boje sa zvjezdastim dlakama. Cvjetovi se razvijaju na prošlogodišnjim ograncima prije listanja ili istodobno, u razdoblju od ožujka do svibnja. Dvodomna je biljna vrsta s četiri prašnika i jednim tučkom i oprašuje se uz pomoć kukaca. Plodovi su narančasto-crvene i sočne bobice (Franjić i sur., 2016) (slika 1).



Slika 1. Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) (Plantagea, 2021)

U Hrvatskoj je pasji trn bio prirodno rasprostranjen u Međimurju i Podravini, no danas je uzgoj vrlo rijedak i zabilježen tek na pojedinim područjima. Godine 2015. otkrivena su ili potvrđena nova nalazišta pasjeg trna, sjeverno od podravskih sela Veliki i Mali Bukovec pri čemu je utvrđeno da se radi o muškim biljkama različite starosne dobi i veličine (Franjić i sur., 2016).

Pasji trn se koristio još u tradicionalnoj kineskoj medicini, a povijesni dokumenti i zabilješke svjedoče o korištenju ove biljke i u azijskim, nordijskim te baltičkim zemljama u obliku hrane, goriva, veterinarskih lijekova i slično. Također, u orijentalnoj medicini ova biljka se koristi za liječenje astme, kožnih bolesti, čira na želucu i plućnih bolesti. Pasji trn se u brojnim istraživanjima pokazao kao dobar antioksidans i imunomodulator te posjeduje antiaterogena, hepatoprotektivna i brojna druga svojstva (Suryakumar i Gupta, 2011).

Zeb (2004) u svom radu spominje eksperimentalno istraživanje djelovanja pasjeg trna na oboljele od kardiovaskularnih bolesti pri čemu je ispitivano 128 pacijenata s ishemijskom bolesti srca kojima su se tri puta dnevno kroz šest tjedana davali ekstrakti ukupnih flavonoida izoliranih iz pasjeg trna u koncentraciji od 10 mg. Rezultati su pokazali kako su ispitanici nakon terapije flavonoidima imali smanjen kolesterol i poboljšane srčane funkcije, a pritom nije zabilježen negativan utjecaj na rad ostalih organa. Također, neka klinička testiranja pokazala su pozitivan učinak pojedinih ekstrakata izoliranih iz pasjeg trna na razinu jetrenih enzima, markere imunološkog sustava i serumske žučne kiseline uključene u upalne bolesti jetre i degeneraciju. Ulje pasjeg trna ima pozitivan učinak na liječenje kožnih bolesti kao i na čir na želucu.

2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA

Svi dijelovi biljke obiluju brojnim bioaktivnim tvarima poput vitamina, karotenoida, fitosterola, organskih kiselina, polinezasićenih masnih kiselina i nekih esencijalnih aminokiselina (Suryakumar i Gupta, 2011).

Bobice pasjeg trna imaju specifičan kemijski sastav koji varira ovisno o vrsti, zemljopisnom podrijetlu i klimatskim uvjetima te zrelosti ploda, veličini bobica kao i metodama ekstrakcije. Bobice su izvor vitamina poput C i E, karotenoida (β -karoten, likopen, lutein i zeaksantin), flavonoida (kvercetin, kamferol i dr.), organskih kiselina, aminokiselina te mikro- i makronutrijenata (Suryakumar i Gupta, 2011).

Šećeri poput glukoze, fruktoze i ksiloze također su važan sastojak bobica pasjeg trna, a količina šećera varira ovisno o godini berbe bobica kao i o vremenskim uvjetima (Bal i sur., 2011). Masne kiseline prisutne su kao zasićene (13,7 %) i nezasićene (86,3 %), a uključuju palmitinsku, oleinsku, palmitoleinsku, linolnu, linolensku kiselinu te fitosterole (Suryakumar i Gupta, 2011). Bobice imaju jedinstvenu aromu neusporedivu s aromama drugog sličnog voća, a spojevi koji ju čine su najčešće kratkolančani esteri, razgranate n-masne kiseline te alkoholi. Hlapljivost ovisi o vremenu berbe bobica (Bal i sur., 2011).

Od organskih kiselina, u pasjem trnu su pretežito zastupljene jabučna kiselina te kvininska kiselina. Od aminokiselina njih 18 od 22 detektirano je u pasjem trnu pri čemu je polovica njih esencijalno i imaju izuzetno važnu ulogu u ljudskom organizmu (Bal i sur., 2011).

Fitosteroli kao biljni steroli su prisutni u ulju pasjeg trna, a glavni fitosterol je β -fitosterol (sitosterol). Količine fitosterola u različitim varijetetima kreću se od 1,3 do 2 % (Bal i sur., 2011).

Najmanje 24 kemijska elementa prisutna su u pasjem trnu kao što su dušik, fosfor, željezo, mangan, bor, aluminij, kalcij i dr. Najzastupljeniji u bobicama i soku bobica je kalij (Bal i sur., 2011).

Lišće pasjeg trna također obiluje bioaktivnim komponentama poput flavonoida, karotenoida, slobodnih i esterificiranih sterola, triterpenola i izoprenola. Antioksidacijska svojstva listova potječu od β -karotena, vitamina E, katehina, elaginske i ferulinske kiseline kao i značajnijih količina kalcija, magnezija i kalija (Suryakumar i Gupta, 2011).

2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U PLODU PASJEG TRNA

2.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su skupina organskih spojeva koji su sekundarni biljni metaboliti i nalaze se u svim biljkama u različitim koncentracijama (Tsimogiannis i Oreopoulou, 2019). Uloga sekundarnih biljnih metabolita u biološkom sustavu uključuje opstanak i preživljavanje te borbe s lokalnim izazovima u interakciji s okolinom (Azmir, 2013).

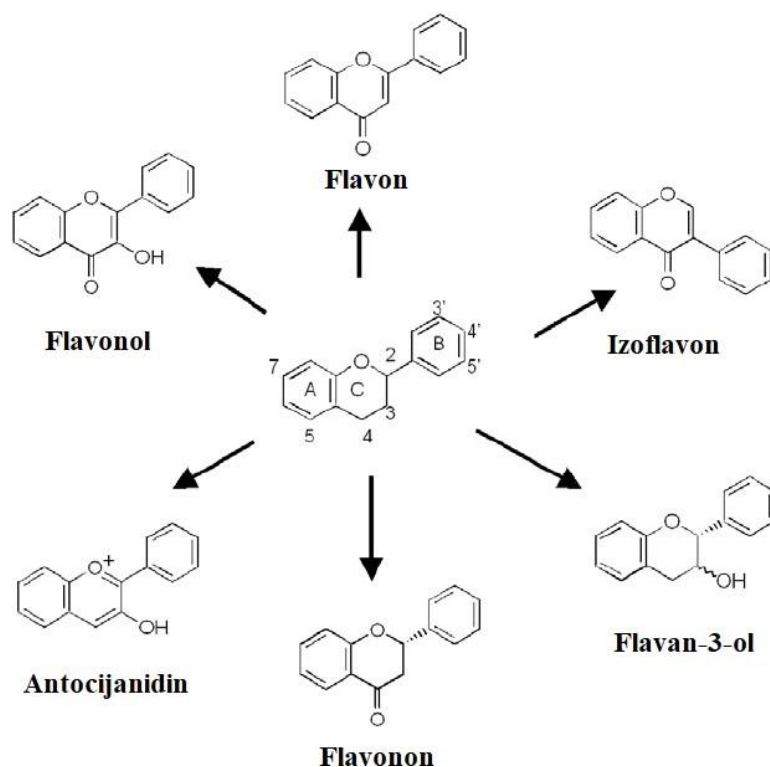
Prema kemijskoj strukturi fenolni spojevi imaju aromatski prsten na kojeg je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Fenolni spojevi mogu biti jednostavne fenolne molekule no i složeni polimeri velike molekulske mase. Većina fenolnih spojeva u prirodi su prisutni kao konjugati monosaharida i polisaharida vezanih s jednom ili više fenolnih skupina, a mogu se pojaviti i u formi funkcionalnih derivata poput estera (Balasundram i sur., 2006). U tablici 1 je prikazana podjela fenolnih spojeva ovisno o njihovoj strukturi.

Tablica 1. Podjela fenolnih spojeva iz biljaka (Balasundram i sur., 2006)

VRSTA SPOJA	STRUKTURA
Jednostavni fenoli, benzokinoni	C_6
Hidroksibenzojeve kiseline	$C_6 - C_1$
Acetofenoni, feniloctene kiseline	$C_6 - C_2$
Hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi	$C_6 - C_3$
Naftokinoni	$C_6 - C_4$
Ksantoni	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6 - C_3)_2$
Bioflavonoidi	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Lignini	$(C_6 - C_3)_n$
Kondenzirani tanini	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Trenutno je poznato 8 000 fenolnih spojeva od kojih flavonoidi čine najveću skupinu s 4 000 poznatih spojeva. Osim flavonoida, fenolne kiseline te tanini su najčešće zastupljeni fenolni spojevi u prehrani danas (Balasundram i su, 2016). Fenolne kiseline se dijele na hidroksicimetne kiseline od kojih su najčešće kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska te sinapinska kiselina i hidroksibenzojeve kiseline među kojima su najčešće galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska te protokatehinska kiselina (Balasundram i sur., 2016).

Flavonoidi su niskomolekularni spojevi čiju strukturu čine dva aromatska prstena A i B spojena putem 3 ugljikova mosta u heterociklički prsten. Moguće supstitucije na A i B prstenu rezultiraju različitim spojevima unutar skupine flavonoida (Balasundram i sur., 2016). Osnovna podjela flavonoida prikazana je na slici 2.



Slika 2. Osnovna podjela flavonoida (Nishiumi i sur., 2011)

Tanini su visokomolekularni spojevi koji se dijele na kondenzirane i hidrolizirajuće tanine. Kondenzirani tanini se još nazivaju proantocijanidinima i polimeri su nastali od polihidroksiflavan-3-ol monomera dok su hidrolizirajući tanini esteri galne kiseline (galotanini i elagitanini) (Balasundram i sur., 2016). Imaju raznoliki učinak na biološki sustav jer mogu djelovati kao biološki antioksidansi, agensi za taloženje proteina kao i kelatori metalnih iona (Ignat i sur., 2011).

Genetski i okolišni čimbenici uvelike utječu na sadržaj fenolnih spojeva u voću i povrću kao i oksidacijske reakcije koje se odvijaju prilikom obrade i skladištenja. Pritom se pozornost posvećuje antioksidacijskoj aktivnosti i enzimskom posmeđivanju. Fenolni spojevi kao antioksidansi djeluju u niskim koncentracijama dok u visokim koncentracijama mogu djelovati kao prooksidansi za oksidacijske reakcije. Uloga fenola u enzimskom posmeđivanju u hrani može imati utjecaj na oblikovanje karaktera samog proizvoda (Robards i sur., 1999).

Fenolni spojevi imaju izraziti morfološki i fiziološki značaj na biljke pri čemu se ističe njihova važna uloga u rastu i razmnožavanju te borbi protiv patogena i grabežljivaca. Također, imaju široko biološko djelovanje pri čemu se ističu kao antioksidansi, zaštitna sredstva protiv UV

svjetla, atraktanti za oprašivače i dr. Osim što pridonose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća, služe i kao konzervansi. Zastupljeni su i u kozmetičkoj industriji kao i industriji bojila i papira (Ignat i sur., 2011).

Fenolni spojevi pasjeg trna su uglavnom flavonoidi i fenolne kiseline. U istraživanju koje su proveli Ji i sur. (2020), detektiran je ukupni udio fenola u plodu pasjeg trna od 29,8 do 38,8 mg GAE g⁻¹ što je više od udjela detektiranog u dudu (4,44 mg GAE g⁻¹), šipku (3,90 mg GAE g⁻¹), malinama (3,00 mg GAE g⁻¹), borovnicama (8,40 mg GAE g⁻¹) i kupinama (7,40 mg GAE g⁻¹). Sadržaj samih fenolnih spojeva uvelike ovisi o vrsti, zemljopisnom podrijetlu i stupnju fiziološke zrelosti (Ji i sur., 2020). Ukupni flavonoidi najzastupljeniji su u listovima pasjeg trna s određenih 2,24 % dok je u pulpi detektirano 0,95 %, u perikarpu 0,51 % i u sjemenkama 0,31 %. Sadržaj fenolnih kiselina najviše je zastupljen u sjemenkama, a galna kiselina prevladava u plodu i listovima pasjeg trna (Ji i sur., 2020).

Li i sur. (2009) su napravili usporedbu udjela fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti kod bobičastog voća, aronije i pasjeg trna. Udjel fenolnih spojeva određen je TPC metodom (eng. *Total Phenolic Content*) i rezultati su izraženi kao ekvivalenti ferulinske kiseline pri čemu je pasji trn sadržavao 22,83 g kg⁻¹.

Teleszko i sur. (2015) analizirali su lipofilne i hidrofilne bioaktivne spojeve u različitim sortama pasjeg trna te su primjenom metode UPLC kromatografije (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) u kombinaciji s masenom spektrometrijom odredili visoke koncentracije flavonola u bobicama pasjeg trna pri čemu su se vrijednosti kretale od 212,89 do 417,48 mg 100 g⁻¹. Pritom je detektirano 11 flavonola koji su primarno derivati izoramnetina, kvercetina i kamferola. Osim flavonola, detektirani su i polimerni proantocijanidini, mono-, di- i oligomeri flavan-3-ola te fenolne kiseline pri čemu je sorta „Avgustinka“ sadržavala 88,04 mg 100 g⁻¹ flavan-3-ola i 5,81 mg 100 g⁻¹ fenolnih kiselina.

Zadernowski i sur. (2005) istraživali su sastav fenolnih kiselina u 6 različitim sorti bobica pasjeg trna s područja Poljske i Bjelorusije. Ekstrakciju fenolnih kiselina vršili su u vodenoj otopini 80 %-tnog metanola kroz 1 h u orbitalnom tresaću na 250 okretaja/min, a sastav fenolnih kiselina analiziran je GC-MS metodom (eng. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*). Prilikom analize utvrđen je sastav slobodnih fenolnih kiselina pri čemu je u bobicama dominirala salicilna kiselina s 55,0 do 74,3 % ukupnog sastava fenolnih kiselina, a utvrđene su i određene količine *p*-hidroksifenil-laktične kiseline, *p*-kumarinske kiseline, galne kiseline, kafeinske kiseline i dr.

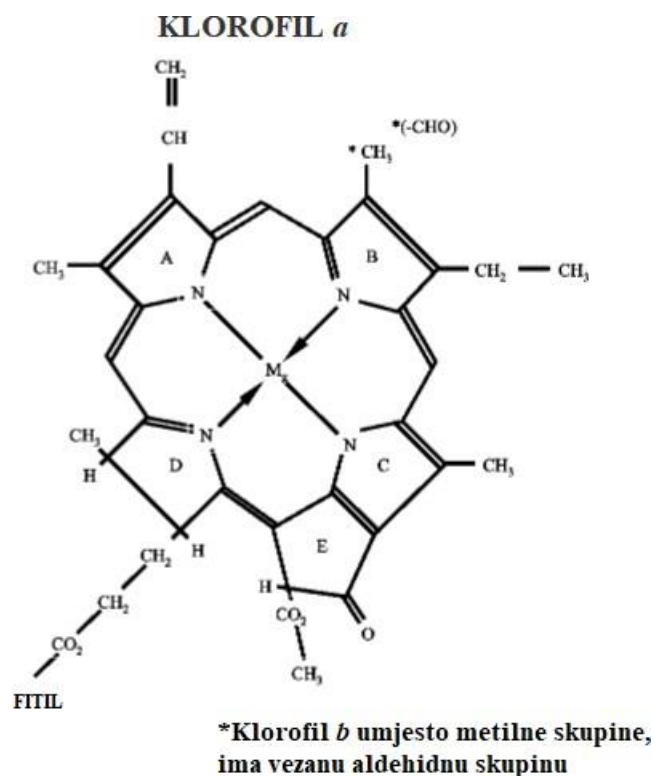
2.3.2. Biljni pigmenti

Klorofil je pigment koji se nalazi u gotovo svim biljkama, a osobito u lišću. Ima važnu funkciju u fotosintezi međutim njegova biosinteza i djelovanje još uvijek nisu u potpunosti poznati. Klorofil dolazi u dva oblika kao klorofil *a* i klorofil *b* te oni zajedno koegzistiraju u omjeru 3:1 (Humphrey, 2006). Klorofil *a* se nalazi u svim fotosintetskim organizmima kao što su više biljke, zelene, crvene, smeđe alge i dr., dok klorofil *b* nije zastupljen u crvenim i smeđim algama, a ima ga u svim višim kopnenim biljkama (Smith i Benitez, 1955).

Struktura klorofila je ciklički porfirin s koordiniranim središtem kojeg čini magnezij (Mortensen, 2006). Svaki pirolni prsten ima četiri ugljikova atoma te jedan dušikov atom. Dušikovi atomi orijentirani su prema unutrašnjosti pa time stvaraju središnju rupu u kojoj je smješten magnezijev ion (Mg^{2+}). Klorofil *a* i klorofil *b* razlikuju se u skupini koja je vezana na drugi prsten pri čemu klorofil *a* ima vezanu metilnu ($-CH_3$) skupinu, a klorofil *b* aldehidnu ($-CHO$) skupinu što rezultira i različitim bojom pigmenta (slika 3). Klorofil *a* pritom daje plavo/zeleno obojenje pri apsorpcijskom maksimumu od 660 do 665 nm, a klorofil *b* zeleno/žuto obojenje s apsorpcijskim maksimumom od 642 do 652 nm (Hosikian i sur., 2010).

U biljkama se klorofil nalazi u kloroplastu te je često dio kompleksa s polipeptidima i fosfolipidima, a zaštitu mu pruža hidrofobna membrana (Hosikian i sur., 2010).

Topljiv je u lipidima, stoga se ekstrahira upotrebom organskih otapala. Ekstrakcijom i preradom može doći do gubitka središnjeg magnezija, a prilikom kontakta s kiselinama, klorofil prelazi u pigment žuto-smeđe boje feofitin (Mortensen, 2006). Slika 3 prikazuje strukturu klorofila *a* koja uključuje modifikaciju kojom nastaje klorofil *b*.



Slika 3. Struktura klorofila *a* i klorofila *b* (*) (Humphrey, 2006)

Klorofil selektivno apsorbira crveno i plavo svjetlo što rezultira emitiranjem zelenog obojenja. U procesu fotosinteze, energija apsorbirana putem svjetla zajedno s vodom i ugljikom koristi se za proizvodnju kisika i ugljikohidrata. U oceanima kao i na kopnu svakodnevno se proizvode i razgrađuju velike količine klorofila (Hosikian i sur., 2010).

Klorofil je ujedno i prirodno bojilo za hranu međutim izrazito je nestabilan pri različitim pH uvjetima kojima se izlaže hrana. Kako bi postao stabilan, podliježe kemijskim reakcijama u kojima se središnji magnezij zamjenjuje bakrom da bi se dobio stabilni kompleks. Kompleks s bakrom dozvoljen je u većini zemalja za korištenje jer se ne akumulira u tijelu već se u potpunosti uklanja (Hosikian i sur., 2010). Također, neke studije su pokazale da klorofil može ubrzati proces zacjeljivanja rana, poticati na rast tkiva i spriječiti rast bakterija (Hosikian i sur., 2010).

Brojna povoljna svojstva prepoznata su kod klorofila i njegovih derivata pri čemu se ističe antioksidacijska aktivnost njegovih derivata feoforbida *b* i feofitina *b*.

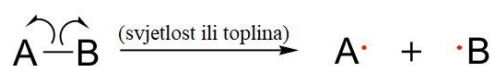
Andersson i sur. (2009) u svom istraživanju utvrdili su kako zrenjem plodova pasjeg trna dolazi do smanjenja sadržaja feofitina *a*, derivata klorofila *a*. Pritom se ustanovilo kako je feofitin *a* zapravo pokazatelj stupnja sazrijevanja plodova pasjeg trna što pomaže određivanju vremena berbe plodova pasjeg trna.

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA

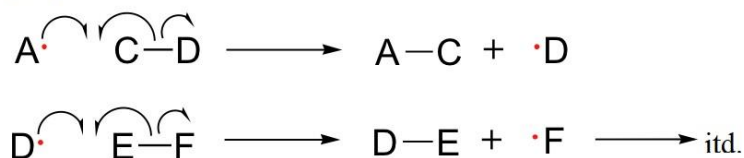
Fenolni spojevi su ubikvitarni u biljkama i ima ih u velikim količinama, stoga igraju važnu ulogu u određivanju antioksidacijskog potencijala brojnih namirnica (Parr i Bolwell, 2000). Pojam antioksidans odnosi se na bilo koju tvar koja u niskim koncentracijama može značajno odgoditi ili spriječiti oksidacijske promjene u supstratu (Halliwell i sur., 1995). Interakcija hidroksilnih skupina fenolnih spojeva s Π -elektronima benzenskog prstena rezultira posebnim svojstvima ovih molekula (Parr i Bolwell, 2000).

Slobodni radikali definiraju se kao atomi ili molekule koje posjeduju jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci koji su sposobni za samostalno postojanje. Slobodni radikali su izrazito nestabilne vrste, kratkotrajne te visokoreaktivne. Jednom kad molekula postane slobodni radikal, započinje kaskadu lančanih reakcija koje dovode do oštećenja žive stanice (Phaniendra i sur., 2014). Molekule koje djeluju kao slobodni radikali najčešće uključuju reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive Oxygen Species* – ROS) i reaktivne dušikove vrste (eng. *Reactive Nitrogen Species* – RNS). Te vrste dovode do nastanka oksidacijskog i nitrozativnog stresa u odsutnosti tvari s antioksidacijskim učinkom. Obje vrste mogu biti radikalne i neradikalne molekule pri čemu u radikalne molekule pripadaju i sljedeće vrste: radikalni kisik, superoksidni radikal, hidroksilni radikal, alkoksilni radikal, peroksilni radikal, radikal dušikovog monoksida i radikal dušikovog dioksida. Neradikalne molekule su molekule poput vodikova peroksida, ozona, hipokloridne kiseline, nitratne kiseline, organskih peroksida i dr. (Phaniendra i sur., 2014). Oksidacijske reakcije koje se odvijaju uz prisutnost slobodnih radikala uključuju tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju te se mogu odvijati uz posredstvo topline, svjetlosti ili ionizirajućeg zračenja ili uz prisutnost iona metala i metaloproteina (Antolovich i sur., 2001). Faze reakcija prikazane su na slici 4.

Inicijacija



Propagacija



Terminacija



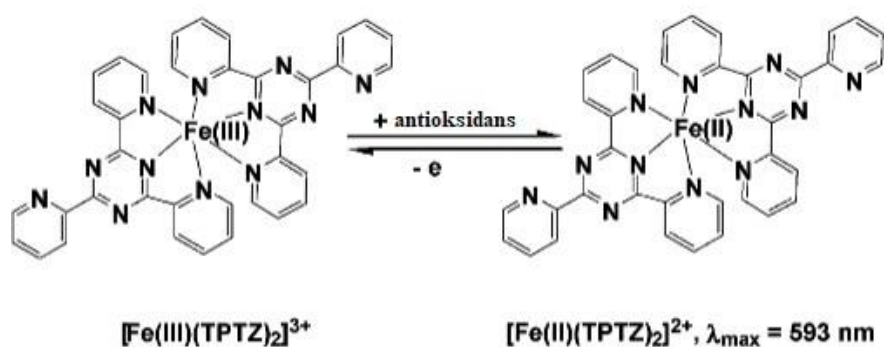
Slika 4. Lančane reakcije nastanka slobodnog radikala (CL, 2021)

Antioksidansi se prema aktivnosti dijele na enzimске te neenzimске pri čemu enzimski antioksidansi pretvaraju oksidacijske produkte do vodikovog peroksida i zatim do vode uz prisutnost raznih kofaktora, dok neenzimski antioksidansi prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. Polifenoli pripadaju u neenzimске antioksidanse. Osim navedene podjele, antioksidansi se dijele na one topljive u lipidima i one topljive u vodi te na male antioksidacijske molekule i velike antioksidacijske molekule (Nimse i Pal, 2015). Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva očituju se u sposobnosti keliranja metalnih iona, potencijalu za delokalizaciju nesparenih elektrona i sposobnosti doniranja vodika u stvaranju vodikovih veza (ovo svojstvo potječe od hidroksilnih skupina fenola) (Parr i Bolwell, 2000).

Metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti se dijele na metode koje se zasnivaju prijenosu vodikovog atoma i metode koje se zasnivaju na prijenosu elektrona. Neke od metoda zasnovanih na prijenosu vodikovog atoma su ORAC metoda (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i TRAP metoda (eng. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), a neke od metoda zasnovanih na prijenosu elektrona uključuju metodu određivanja ukupnih fenola Folin – Ciocalteu reagensom (FCR), TEAC metodu (eng. *Trolox Equivalence Antioxidant Capacity*), FRAP metodu (eng. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*) i DPPH metodu (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Huang i sur., 2005).

U ovom radu antioksidacijska aktivnost bioaktivnih spojeva ploda pasjeg trna određena je FRAP metodom.

FRAP metoda se temelji na reakciji redukcije kompleksa Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin) do Fe^{2+} -TPTZ kompleksa koji pokazuje plavo obojenje pri 593 nm (slika 5). Reakcija je prikazana u kemijskoj jednadžbi [1] (Ou i sur., 2002).



Slika 5. Oksidirani i reducirani oblik Fe – TPTZ kompleksa (Huang i sur., 2005)

Korekar i sur. (2011) određivali su antioksidacijsku aktivnost različitih dijelova biljke pasjeg trna koristeći FRAP metodu. Pritom su utvrdili kako sjemenke i kora biljke imaju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na pulpu i listove. Na antioksidacijsku aktivnost je pritom utjecaj imao izbor otapala za ekstrakciju te dio biljke na kojem se ispitivala antioksidacijska aktivnost.

Michel i sur. (2012) su pak FRAP metodom određivanja antioksidacijske aktivnosti različitih dijelova biljke pasjeg trna. Visoke vrijednosti dobili su za korijen i sjemenke (311 ± 31 i $454 \pm 82 \text{ mg TE g}^{-1}$) u odnosu na stabljiku i listove (137 ± 9 i $171 \pm 19 \text{ mg TE g}^{-1}$).

Rösch i sur. (2003) ispitivali su antioksidacijsku aktivnost spojeva iz soka pasjeg trna pri čemu su dokazali kako spojevi s kateholnom strukturom poput katehina, hidroksibenzojeve kiseline, kvercetin-3-*O*-glikozida čine svega 5 % ukupne antioksidacijske aktivnosti spojeva soka pasjeg trna, dok se najvećim antioksidansom u soku pokazala askorbinska kiselina koja doprinosi ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti sa 75 %.

2.5. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Ekstrakcija predstavlja važan korak u izolaciji ciljnih spojeva iz raznih materijala, a ujedno omogućuje separaciju ljekovitih dijelova biljaka uz pomoć selektivnih otapala. Cilj ekstrakcije je izdvojiti topljive metabolite iz materijala (Azwanida, 2015). Učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz različitih izvora ovisi o primjenjenoj metodi ekstrakcije i njenoj učinkovitosti. Ciljevi svih metoda ekstrakcije su izolacija ciljnih bioaktivnih spojeva kao i njihova pretvorba u oblike prikladne za daljnju separaciju i detekciju, povećanje selektivnosti analitičkih metoda, povećanje osjetljivosti bioloških testova povećanjem koncentracije ciljnih spojeva te osigurati snažnu i ponovljivu metodu (Azmir i sur., 2013).

Metode ekstrakcije uglavnom se dijele na konvencionalne i nekonvencionalne metode. Konvencionalne metode ekstrakcije koje se najčešće koriste su Soxhlet ekstrakcija, maceracija te hidrodestilacija. Učinkovitost ovih metoda uvelike ovisi o izboru otapala koje se bira prema polarnosti spojeva koje se želi ekstrahirati, a osim tog pozornost treba obratiti i na prijenos mase, afinitet otapala prema otopljenoj tvari i obrnuto kao i sigurnost za okoliš i cijenu samog otapala (Azmir i sur., 2013). Nekonvencionalne metode ekstrakcije uključuju ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE), ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MAE), ekstrakciju potpomognutu enzimima (EAE), ekstrakciju pulsirajućim električnim poljem (PEF), ekstrakciju superkričnim fluidom (SFE), ekstrakciju pri povišenom tlaku (PLE) te ubrzanu ekstrakciju pri povišenom tlaku (ASE) (Azmir i sur., 2013; Azwanida, 2015). Ove metode razvijene su da prevladaju neke od izazova konvencionalne ekstrakcije koji uključuju dulje vrijeme ekstrakcije, potrebe za skupim otapalima visoke čistoće te isparavanje otapala, nisku selektivnost ekstrakcije i toplinsku razgradnju termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013).

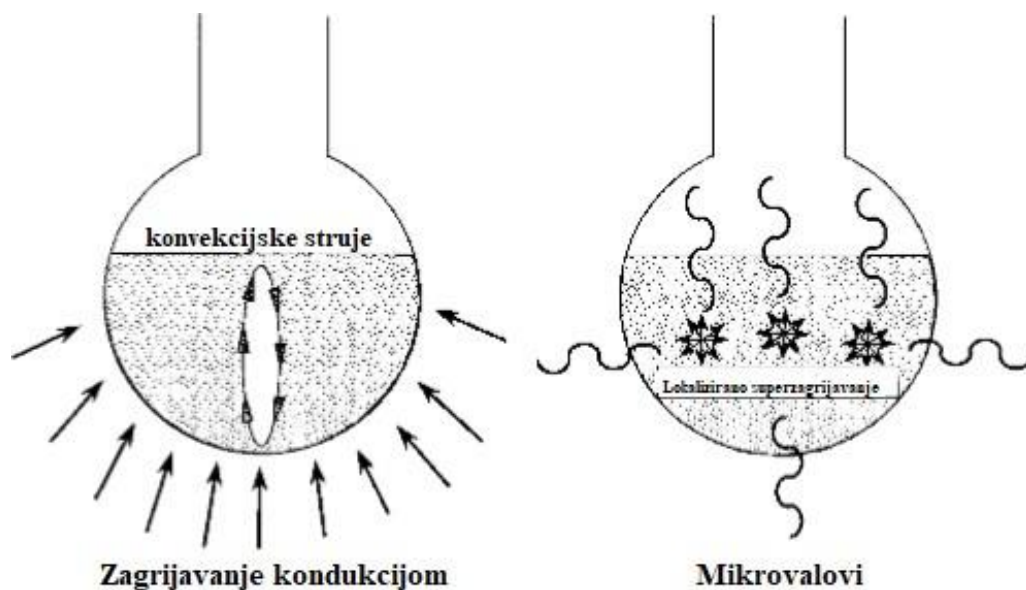
Nekonvencionalne metode ekstrakcije koriste se zbog kraćeg vremena trajanja, boljeg prinosa i kvalitete te smanjene uporabe sintetskih i organskih kemikalija (Azmir i sur., 2013).

2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA MIKROVALOVIMA

U posljednjih desetak godina, naglasak se uvelike stavlja na tehnologiju mikrovalova. Mikrovalovi prvotno su služili za mikrovalne pećnice korištene u kućanstvima, a 70-ih godina prošlog stoljeća, počeli su se primjenjivati u analitičkim laboratorijima kao izvor grijanja (Kaufmann i Christen, 2002).

Mikrovalovi su neionizirani elektromagnetski valovi frekvencije u rasponu od 300 MHz do 300 GHz. U elektromagnetskom spektru nalaze se između X-zraka i infracrvenih zraka. S obzirom da pripadaju elektromagnetskom spektru, mikrovalovi se sastoje od dva oscilirajuća polja – električnog i magnetskog polja, a električno polje odgovorno je za zagrijavanje (Mandal i sur., 2007).

Načelo zagrijavanja pomoću mikrovalova zasniva se na dva fenomena: ionskoj vodljivosti i dipolnoj rotaciji čije djelovanje je često istovremeno. Ionska vodljivost očituje se u migraciji iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja pri čemu otopina stvara otpor što rezultira trenjem koje pak zagrijava otopinu. Dipolna rotacija podrazumijeva promjenu mjesta dipolnih molekula koja prati brze promjene električnog polja pri čemu se zagrijavanje događa pri frekvenciji od 2450 MHz. Dipolne molekule nastoje se poravnati s električnim poljem, no ako se električno polje mijenja prebrzo, molekule ne uspijevaju u toj težnji što rezultira njihovom vibracijom, dolazi do trenja i nastajanja topline. Pri frekvencijama manjim od 2450 MHz, molekule se uspijevaju poravnati s električnim poljem jer se promjena električnog polja odvija pri manjim brzinama, stoga ne dolazi do vibriranja molekula i zagrijavanja. Kod frekvencija većih od 2450 MHz, molekule pak nemaju dovoljno vremena za poravnanje s električnim poljem zbog većih brzina kretanja električnog polja, stoga ponovno ne dolazi do zagrijavanja. Električno polje mijenja se $4,9 \times 10^4$ puta/s (Mandal i sur., 2007). Jedno od bitnih svojstava mikrovalova je faktor rasipanja ($\tan \delta$) koji predstavlja mjeru sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i u obliku topline ju prenosi na molekule u okolini (Mandal i sur., 2007). Usporedba djelovanja konvencionalne ekstrakcije i MAE nalazi se na slici 6.



Slika 6. Usporedba principa zagrijavanja kondukcijom kod klasične ekstrakcije i mikrovalnog zračenja kod MAE (Kaufmann i Christen, 2002)

Prednost korištenja mikrovalova u ekstrakciji očituje se u ometanju slabih vodikovih veza rotacijom dipolnih molekula. Migracija iona otopljenih u otopini povećava prodiranje otapala do matriksa čime se olakšava otapanje analita (Kaufmann i Christen, 2002).

MAE se izvodi s dva sustava: otvorenim i zatvorenim. Zatvoreni sustav uključuje ekstrakciju koja se odvija u zatvorenoj posudi u kontroliranim uvjetima tlaka i temperature i najčešći je postupak izvođenja ekstrakcije, a otvoreni uključuje otvorenu posudu pod utjecajem atmosferskog tlaka (Kaufmann i Christen, 2002). Zatvoreni MAE sustav sastoji se od ćelija koje se slažu na rotirajući valjak. Ovakav tip sustava koristi se kod ekstrakcija koje se odvijaju pri ekstremnim uvjetima poput digestijskih reakcija ili kisele mineralizacije budući da se otapalo mora zagrijati na temperature iznad njegove atmosferske točke vrelišta, a odabir otapala utječe na tlak u zatvorenim posudama. Maksimalna snaga mikrovalova u zatvorenim sustavima kreće se od 600 do 1000 W (Kaufmann i Christen, 2002). Prednosti zatvorenog MAE sustava očituju se u primjeni viših temperatura u odnosu na otvorene sustave pri čemu se smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije, potrebne su manje količine otapala jer ne dolazi do njegovog isparavanja, veoma je nizak rizik od kontaminacije, nema gubitka hlapljivih tvari te zatvorenost sustava sprječava potencijalno opasna isparavanja (Mandal i sur., 2007).

U usporedbi sa zatvorenim MAE sustavom, otvoreni MAE sustav smatra se sigurnijim prilikom rukovanja uzorcima, a uključuje kvarcne, staklene ili polimerne posude s kondenzatorom pare na vrhu (Kaufmann i Christen, 2002; Mandal i sur., 2007). U ovom sustavu je omogućeno homogeno zagrijavanje, sustav radi pri atmosferskom tlaku, a maksimalna temperatura određena je vrelištem otapala koje se koristi (Kaufmann i Christen, 2002). Još neke prednosti otvorenog MAE sustava odnose se na izbor materijala od kojeg su načinjene posude (kvarc, staklo, polimerni materijali), sposobnost obrade velikih uzoraka, lako uklanjanje viška otapala, odsustvo potrebe za hlađenjem ili snižavanjem tlaka, automatizirani rad, niske troškove opreme i dr. (Mandal i sur., 2007).

Svaki mikrovalni uređaj sastoji se od generatora energije mikrovalova, valnog vodiča koji omogućuje širenje mikrovala od izvora prema mikrovalnoj šupljini, aplikatora – mjesta gdje se stavlja uzorak i cirkulatora koji omogućuje širenje mikrovalova prema naprijed (Mandal i sur., 2007).

2.6.1. Parametri koji utječu na učinkovitost MAE

Učinkovitost MAE ovisi o parametrima samog procesa pri čemu pažnju treba posvetiti pravilnom odabiru otapala, temperaturi procesa, snazi mikrovalova, vremenu trajanja procesa i drugim potencijalno važnim utjecajnim parametrima procesa te njihovom međusobnom odnosu. Upravo parametri procesa igraju važnu ulogu u određivanju procesnih koraka i organizaciji samog izvođenja metode (Veggi i sur., 2012).

Otapalo

Pravilan odabir otapala najvažniji je parametar koji utječe na učinkovitost MAE pri čemu njegov odabir ovisi o topljivosti spojeva koje želimo ekstrahirati, dielektričnoj konstanti otapala, interakciji s matricom uzorka, kinetici prijenosa mase te o moći prodiranja otapala (Veggi i sur., 2012). Odabrano otapalo mora biti sposobno apsorbirati mikrovalnu energiju i pretvoriti ju u toplinu, a to također ovisi o dielektričnim svojstvima otapala (Simić i sur., 2016). Otapala koja se koriste u MAE mogu biti polarna i nepolarna pri čemu je moguće kombinirati otapala kako bi se svojstva istih mogla prilagoditi selektivnosti različitih komponenata koje se žele ekstrahirati. Neka istraživanja pokazala su kako manja količina vode u otapalu dovodi do boljeg zagrijavanja i migracije spojeva u otapalo jer voda difuzijom dopijeva do dijelova matriksa otopine (Veggi i sur., 2012).

Ekstrakcija se najčešće izvodi uz korištenje polarnih organskih otapala poput etanola koja uzrokuju degradaciju stanične membrane te otapaju polifenole. Etanol se kao otapalo koristi zbog svoje niske cijene, visoke čistoće te biorazgradivosti (Asofiei i sur. 2016). Prilikom svog istraživanja Asofiei i sur. (2016) su provodili MAE sa smjesama ekstrakcijskih otapala pri čemu se pokazalo kako povećanje koncentracije etanola u smjesama, rezultira većim prinosom fenolnih spojeva.

Lovrić i sur. (2017) ističu kako je odabir otapala od izuzetne važnosti za izolaciju fenolnih spojeva jer se prinos fenolnih spojeva direktno povezuje s topljivosti fenolnih spojeva u otapalu. Korištenjem vodene otopine etanola i vodene otopine metanola, izolirali su fenolne spojeve iz biljke trine (*Prunus spinosa* L.) pri čemu su bolje prinose fenolnih spojeva dobili koristeći vodenu otopinu etanola u odnosu na vodenu otopinu metanola.

Proestos i Komaitis (2008) uspoređivali su konvencionalnu ekstrakciju s MAE pri čemu su u obzir uzimali i utjecaj različitih otapala koristeći vodu, metanol, aceton te etil acetat. Voda se kao otapalo korišteno za MAE pokazala najmanje učinkovitom jer ima najveću dielektričnu konstantu, ali i nizak faktor rasipanja od svih korištenih otapala te upija energiju mikrovalova znatno brže nego što joj sustav može dovesti toplinu. Pritom dolazi to takozvanog „efekta pregrijavanja“ koji može rezultirati uništenjem analita pa se preporučuje koristiti otapalo koje ima visoku dielektričnu konstantu, no i visok faktor rasipanja.

Utjecaj temperature

Parametar temperature izravno je povezan s parametrom snage mikrovalova jer jači intenzitet snage mikrovalova može dovesti do povišenja temperature sustava što onda rezultira i većim ekstrakcijskim prinosom. Pri visokim temperaturama povećava se moć prodiranja otapala i otapanja komponenata sustava jer dolazi do povećanih međumolekulskih interakcija u otapalu što rezultira većom topljivosti, a dolazi i do pada viskoznosti i površinske napetosti (Routray i Vrsat, 2011; Veggi i sur., 2012). Povišenje temperature dovodi i do pucanja stanice jer se povećava stanični tlak, a time dolazi do povećane raspoloživosti staničnog sadržaja za ekstrakciju. U zatvorenom MAE sustavu, temperatura može porasti i do iznad točke vrelišta otapala što može dovesti do veće učinkovitosti ekstrakcije (Veggi i sur., 2012). Međutim, povišenje temperature rezultirati će većim ekstrakcijskim prinosom dok se ne postigne optimalna temperatura. Nakon tog, dolazi do pada vrijednosti ekstrakcijskog prinosa na što uvelike utječe kemijska struktura komponenata koje se ekstrahiraju te njihova termička stabilnost pri različitim temperaturama (Veggi i sur., 2012).

Liazid i sur. (2007) istraživali su utjecaj visokih temperatura na stabilnost fenolnih spojeva. Analizirana su 22 fenolna spojeva s različitom kemijskom strukturom. U trajanju tretmana 20 min, svi spojevi su bili stabilni do 100 °C no povišenjem temperature na 120 °C, došlo je do degradacije pojedinih spojeva poput epikatehina, resveratrola i miricetina. Važno je istaknuti kako degradacija ovisi o broju hidroksilnih skupina pa su tako spojevi s više hidroksilnih skupina podložni degradaciji.

Utjecaj snage mikrovalova

Snaga mikrovalova direktno je povezana s vremenom potrebnim za ekstrakciju kao i količinom uzorka. Povećanje snage mikrovalova dovodi do povećanja ekstrakcijskog prinosa jer uzrokuje zagrijavanje u uzorku što dovodi do puknuća biljne stanice i dovodi otapalo u izravan kontakt sa staničnim sadržajem. Međutim, tu treba uzeti u obzir i stabilnost spojeva pri visokim temperaturama koja je opisana u odlomku gore (Veggi i sur., 2012). Količina energije koja se putem mikrovalova isporučuje uzorku i pretvara u toplinsku energiju kontrolirana je putem intenziteta snage mikrovalova. Pritom treba obratiti pozornost na intenzitet snage mikrovalova jer velika snaga mikrovalova može uzrokovati preveliko povišenje temperature što pritom može dovesti do uništenja stanice i smanjenja ekstrakcijskog prinosa (Routray i Orsat, 2011). Bitno je na pravilan način odabrati intenzitet snage mikrovalova pri čemu se predlaže primjena niske do umjerene snage mikrovalova u kombinaciji s duljim trajanjem tretmana (Mandal i sur., 2011).

Utjecaj vremena

Vrijeme trajanja MAE je u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije znatno kraće i obično iznosi nekoliko minuta pri čemu je bitno izbjeći degradacijske procese. Dulje vrijeme trajanja ekstrakcije može povećati prinos ekstrakcije no taj porast nije značajan kod dugog trajanja ekstrakcije. Dielektrična svojstva otapala također utječu na vrijeme trajanja zračenja jer se neka otapala prilikom dužeg izlaganja zračenju mogu zagrijati, a pritom može doći do degradacije termolabilnih sastojaka (Veggi i sur., 2012).

Xiao i sur. (2008) izolirali su flavonoide iz kineskog bilja *Radix Astragali* pri čemu su najveće ekstrakcijske prinose dobili zračenjem koje je trajalo 25 min nakon čega je primjećen pad ekstrakcijskog prinosa kako se vrijeme trajanja zračenja produljivalo.

Ukoliko se ekstrakcija provodi u više ciklusa, koristi se veći volumen otapala i dulje je vrijeme izlaganja mikrovalnom zračenju pa se tada svježe otapalo dodaje u ostatak uzorka i postupak se ponavlja čime se dobivaju veći ekstrakcijski prinosi, a pritom je izostavljeno dugo zagrijavanje (Veggi i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Kao materijal za istraživanje korišten je plod pasjeg trna (lat. *Hippophae rhamnoides* L.) ubran na području Hrvatskog zagorja u srpnju 2020. godine. Uzorci su nakon branja očišćeni od mehaničkih nečistoća, lagano nagnječeni, liofilizirani, pakirani u vrećice te skladišteni na suhom i tamnom mjestu. Neposredno prije provođenja analiza, uzorak je usitnjen u električnom mlinu.

3.1.2. Laboratorijski uređaji i pribor:

Uređaji:

- Liofilizator (Alpha 1-4 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumily, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&SohnGmbH, Balingen, Njemačka)
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE, Ethos Easy, Sorisole (BG), Italija)
- Tehnička vaga (AXIS BTA2100D, Gdansk, Poljska)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- Vortex mješač (MS2 Minishaker, IKA, SAD)

Pribor:

- Filter papir
- Magnetski mješači
- Menzure volumena od 50, 100 te 200 mL
- Lađice za vaganje uzoraka
- Odmjerne tikvice volumena od 50, 100 te 1000 mL
- Pipete od 5 i 10 mL

- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL
- Propipete
- Stakleni lijevci
- Staklene čaše volumena 50, 100 te 500 mL
- Stakleni štapić
- Staklene kivete
- Stalak za epruvete i staklene epruvete

Kemikalije:

- 70 %-tni etanol, (v/v)
- 96 %-tni etanol, CARLO ERBA Reagents, Francuska, (T.T.T. Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Destilirana voda
- Folin Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3), 20 %-tna otopina
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL te nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline
Priprema: 500 mg galne kiseline odvaži se u plastičnu lađicu za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- 37 % klorovodična kiselina (CARLO ERBA Reagents, Rouen, Francuska)
- 40 mM klorovodična kiselina
Priprema: Otpipetira se 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.
- 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)
Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnu lađicu za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- 20 mM otopina željezo (III)-klorid heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
Priprema: Odvaži se 0,0541 g željezo (III)-klorid heksahidrata u plastičnu lađicu za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.
- 99 – 100 %-tna glacijalna octena kiselina

- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6

Priprema: odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) u plastičnu lađicu za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III) – klorida u omjeru 10:1:1.

- 2 mM 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (Trolox)

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

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz ploda pasjeg trna primjenom MAE

Izolacija fenolnih spojeva te pigmenata klorofila *a* i klorofila *b* provedena je primjenom MAE uz pomoć ekstrakcijskog otapala 70 %-tnog etanola. Da bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije, ona je provedena uz varijaciju parametara temperature (40, 60 i 80 °C), snage (300, 500 i 700 W) te vremena (5, 10 i 15 min).

Tablica 2 prikazuje plan provedbe eksperimenta dizajniranog kao puni faktorijski dizajn na tri razine.

Tablica 2. Prikaz plana optimiranja uvjeta procesa MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)
1	40	300	5
2			10
3			15
4		500	5
5			10
6			15
7		700	5
8			10
9			15
10	60	300	5
11			10
12			15
13		500	5
14			10
15			15
16		700	5
17			10
18			15
19	80	300	5
20			10
21			15
22		500	5
23			10
24			15
25		700	5
26			10
27			15

Postupak rada:

1 g uzorka odvagano je u ćeliju ekstraktora i homogenizirano s 40 mL 70 %-tnog etanola. U ćeliju se pritom dodao magnetni mješač te se ćelija postavila na rotor mikrovalnog ekstraktora. Potrebno je bilo podesiti parametre procesa pri čemu je snaga miješanja bila postavljena na 50 %, vrijeme zagrijavanja do željene temperature na 4 min, ventilacija i hlađenje nakon ekstrakcije na 2 min dok se temperatura procesa održavala konstantnom. Nakon završenog postupka ekstrakcije, uzorci su se profiltrirali kroz filter papir u odmjernu tikvicu od 50 mL, a zatim se iz tikvice prebacili u plastične epruvete od 50 mL (Falcon). Mikrovalni ekstraktor korišten u ovom istraživanju prikazan je na slici 7.



Slika 7. Mikrovalni ekstraktor MILESTONE Ethos Easy (vlastita fotografija)

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja ukupnih fenola:

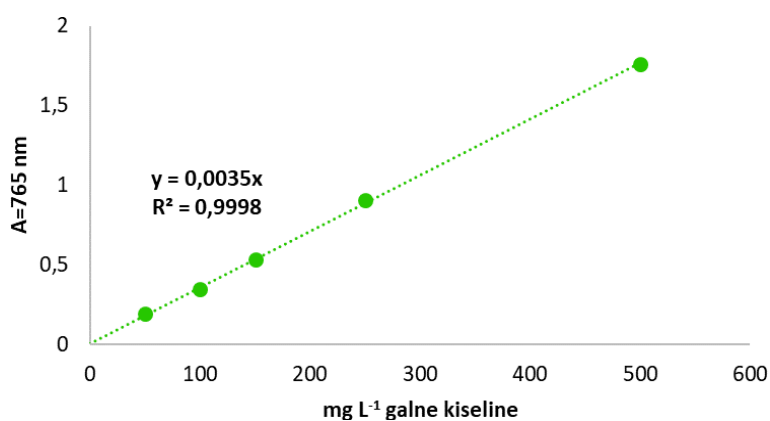
Ukupna koncentracija fenola određuje se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin – Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Nastali plavo obojeni kompleks intenzivnijeg je obojenja što je veći broj hidroksilnih ili oksidirajućih skupina u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja ukupnih fenola:

U staklenu epruvetu redom se otpipetiralo 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Zasićena otopina natrijeva karbonata (1 mL) dodaje se nakon 3 min. Nakon tog je slijedilo miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pripremljenih uzoraka 25 min pri $T=50$ °C. Apsorbancija se mjerila pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremila slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzimalo ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca, odvagano je 0,5 g galne kiseline te otopljeno u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline napravljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetiralo redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunilo do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznosile su 50, 100, 150, 200, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetirano je 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodalo 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodalo se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješalo (pomoću Vortexa), a uzorci su se potom termostatirali 25 min pri T=50 °C. Za slijepu probu uzimalo se 100 μL destilirane vode. Nakon tog se mjerila apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija crtao se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su se na apscisu nanosile koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 8). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2 = 0,9998) \quad [2]$$

gdje je:

Y - apsorbancija pri 765 nm

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

R^2 - koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ suhog ploda kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila

Princip određivanja klorofila:

Određivanje biljnih pigmenata (klorofila *a* i klorofila *b*) temelji se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u etanolnom ekstraktu pri valnim duljinama 649 i 664 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom) (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Postupak određivanja klorofila:

Kvantitativno određivanje biljnih pigmenata provodi se spektrofotometrijski pri sljedećim valnim duljinama: 648.6 i 664.1 nm za klorofil *a* i *b* (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom, etanolom). Mjerenja se provode najmanje u paraleli. Kao slijepa proba koristi se otapalo korišteno i za ekstrakciju (70 %-tni etanol). Apsorbancija slijepa probe oduzima se od apsorbancije uzorka te se pritom dobivena vrijednost koristi za izračun konačnog rezultata. Udjeli klorofila *a* te klorofila *b* računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschman, 2001).

Etanol:

$$c_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664.1} - 5,19 A_{648.6} \quad [3]$$

$$c_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{648.6} - 8,12 A_{664.1} \quad [4]$$

gdje je:

A = apsorbancija

c_a = koncentracija klorofila *a*

c_b = koncentracija klorofila *b*

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih klorofila izražene su u mg 100 g⁻¹ suhog ploda kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom:

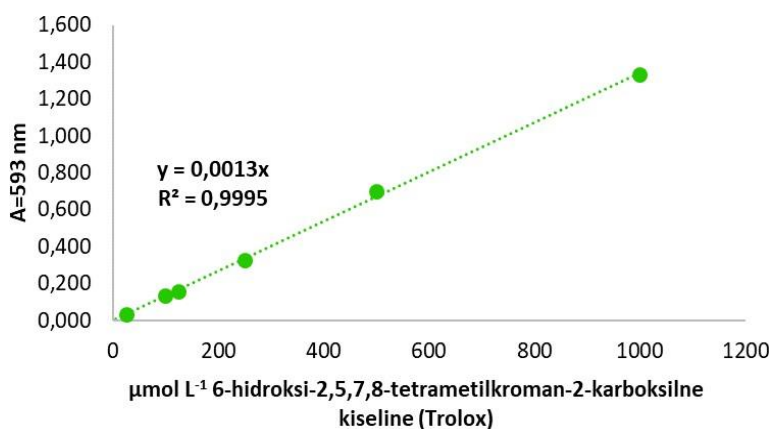
FRAP metoda temelji se na reakciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom:

U staklene epruvete redom je otpipetirano 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro je promiješano (pomoću Vortexa) te se 5 min termostatiralo pri T=37 °C. Nakon tog se mjerila apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržavala je sve reagense osim uzorka, a umjesto njega se dodalo ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremila se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiseline) tako da se odvagalo 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvalitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopunila do oznake 96 %-tnim etanolom. Od pripremljene otopine Troloxa radila su se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da je redom optipetirano: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom su nadopunjene do oznake 96 %-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznosile su 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon tog je u staklene epruvete redom otpipetirano 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmjernih tikvica te 2080 μL FRAP reagensa. Potom je uslijedilo miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pri $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apsorbancija se mjerila pri 593 nm. Slijepa proba sadržavala je sve osim uzorka umjesto kojeg je dodan 96 %-tni etanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija crtao se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su se na apscisu nanosile koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 9) Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom uzorka računa se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2 = 0,9995) \quad [5]$$

gdje je:

Y - apsorbancija

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

R^2 - koeficijent determinacije

Antioksidacijska aktivnost izražena je u mmol TE 100 g^{-1} suhog ploda kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Obrada rezultata

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn na tri razine. S ciljem optimiranja parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za izolaciju bioaktivnih spojeva ploda pasjeg trna ispitan je utjecaj temperature ekstrakcije, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na udio ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila i antioksidacijsku aktivnost. Za usporedbu uzoraka korištena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA), statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

4. REZULATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je izolacija ukupnih fenolnih spojeva i biljnih pigmenata (klorofil *a* i klorofil *b*) te određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom iz ploda pasjeg trna (lat. *Hippophae rhamnoides* L.) primjenom MAE.

Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 70 %-tni etanol. S ciljem optimiranja procesa, ekstrakcija je provedena uz varijaciju parametara kako bi se uz što manji utrošak energije dobio što veći prinos fenolnih spojeva. Varirani parametri su bili temperatura (40, 60 i 80 °C), snaga mikrovalova (300, 500 i 700 W), te vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Nakon tretmana mikrovalovima, ekstrakti su podvrgnuti spektrofotometrijskom određivanju ukupnih fenola, biljnih pigmenata (klorofila *a* i klorofila *b*) te određivanju antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.

Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu i prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija. Statistička obrada podataka provedena je u programskom sustavu Statistica 8.0. (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

4.1. UTJECAJ MAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U PLODU PASJEG TRNA

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela fenolnih spojeva izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom MAE prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Udjeli ukupnih fenolnih spojeva (u mg GAE 100 g⁻¹) izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g ⁻¹)
1	40	300	5	278,28 ± 4,84
2			10	270,82 ± 9,23
3			15	305,89 ± 2,14
4		500	5	309,38 ± 1,32
5			10	331,63 ± 22,21
6			15	246,45 ± 0,85
7		700	5	270,37 ± 12,69
8			10	327,93 ± 9,39
9			15	317,77 ± 15,83
10	60	300	5	372,77 ± 0,44
11			10	332,88 ± 4,44
12			15	327,54 ± 12,88
13		500	5	320,20 ± 16,55
14			10	328,80 ± 9,33
15			15	355,08 ± 21,11
16		700	5	318,83 ± 0,62
17			10	344,51 ± 16,71
18			15	253,10 ± 7,04
19	80	300	5	357,57 ± 12,31
20			10	377,16 ± 12,63
21			15	359,89 ± 7,99
22		500	5	310,62 ± 3,96
23			10	406,05 ± 19,99
24			15	371,61 ± 7,40
25		700	5	332,57 ± 4,89
26			10	307,27 ± 14,80
27			15	282,64 ± 7,11

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Udjeli ukupnih fenolnih spojeva u plodu pasjeg trna određeni su u rasponu od $246,45 \pm 0,85$ do $406,05 \pm 19,99$ mg GAE 100 g^{-1} (tablica 3) s prosječnom vrijednošću $322,87 \pm 5,39$ mg GAE 100 g^{-1} (tablica 4). Najveći udio ukupnih fenola određen je u uzorku 23 ($406,05 \pm 19,99$ mg GAE 100 g^{-1}) koji se ekstrahirao 10 min pri temperaturi $80 \text{ }^\circ\text{C}$ te snazi mikrovalova 500 W. Najmanji udio ukupnih fenola određen je kod uzorka 6 ($246,45 \pm 0,85$ mg GAE 100 g^{-1}) koji se ekstrahirao 15 min pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$ i snazi mikrovalova 500 W.

Ispoencu i sur. (2018) u svom istraživanju utvrdili su kako se ekstrakcijom u metanolu pri temperaturi između 75 i $100 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 20 min, izdvaja najveći udio fenolnih spojeva što otprilike odgovara dobivenom najvećem udjelu ukupnih fenolnih spojeva u ovom eksperimentu. Korekar i sur. (2011) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva iz pulpe i sjemena pasjeg trna pri čemu su koristili više različitih otapala. Udio ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu pulpe pasjeg trna iznosio je $4056 \pm 70,12$ mg GAE 100 g^{-1} dok je u sjemenu pasjeg trna detektiran udio ukupnih fenola od $12440 \pm 215,02$ mg GAE 100 g^{-1} .

Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih fenolnih spojeva ploda pasjeg trna prikazani su u tablici 3.

Tablica 4. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih fenolnih spojeva ploda pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g^{-1})
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	p < 0,05*
40	$295,39 \pm 2,71\text{a}$
60	$328,19 \pm 2,71\text{b}$
80	$345,04 \pm 2,71\text{c}$
Snaga (W)	p < 0,05*
300	$331,42 \pm 2,71\text{b}$
500	$331,09 \pm 2,71\text{b}$
700	$306,11 \pm 2,71\text{a}$
Vrijeme (min)	p < 0,05*
5	$318,95 \pm 2,71\text{a}$
10	$336,34 \pm 2,71\text{b}$
15	$313,33 \pm 2,71\text{a}$
Prosječna vrijednost	$322,87 \pm 5,39$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Utjecaj temperature na udio ukupnih fenola:

Iz prikazanih prosječnih vrijednosti za udjele ukupnih fenola u ovisnosti o primjenjenoj temperaturi u tablici 3, vidljiv je porast udjela s porastom temperature pri čemu se rezultati statistički značajno ($p < 0,05$) razlikuju te je najveći sadržaj ukupnih fenola od $345,04 \pm 2,71$ mg GAE 100 g^{-1} određen pri najvišoj temperaturi od $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Naime, temperatura utječe na omekšanje biljnog tkiva i oslabljuje interakcije između polifenola i proteina te polifenola i polisaharida što rezultira većom migracijom polifenola u otapalo (Mokrani i Madani, 2016).

Kako je odabir temperature ekstrakcije uvelike ovisan o samoj prirodi materijala te strukturi prisutnih fenolnih spojeva, tako su neka istraživanja kao optimalne temperature potvrdili vrijednosti slične dobivenima u ovom radu. Dragović–Uzelac i sur. (2012) temeljem prethodnih istraživanja odredili su optimalnu temperaturu MAE od $80 \text{ }^\circ\text{C}$ pri kojoj se izdvojilo najviše polifenola iz kadulje. Asofiei i sur. (2016) su proveli MAE na uzorku lista pasjeg trna pri temperaturama od $60, 90$ i $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Maksimalni udio ukupnih fenolnih spojeva postignut je pri $120 \text{ }^\circ\text{C}$, no nakon postizanja maksimuma, došlo je do ubrzanog pada koji je najvjerojatnije posljedica degradacije fenola pri visokim temperaturama, stoga je $90 \text{ }^\circ\text{C}$ utvrđeno kao optimalna temperatura za postizanje najvećeg udjela ukupnih fenolnih spojeva bez degradacije.

U nekim istraživanjima optimalne temperature bile su niže od $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Tako su Sharma i sur. (2008) su proveli MAE na različitim dijelovima biljke pasjeg trna pri čemu su utvrdili optimalnu temperaturu $60 \text{ }^\circ\text{C}$ za izdvajanje najvećeg udjela ukupnih fenolnih spojeva. Zhang i sur (2008) su odabrali temperaturu od $60 \text{ }^\circ\text{C}$ kao optimalnu za izolaciju klorogenske kiseline iz pupova cvjetova biljke *Lonicera japonica* Thunb. uz primjenu MAE.

Utjecaj snage na udio ukupnih fenola:

Kod primjene različite snage mikrovalova, uočeno je kako se kod primjene snage mikrovalova 300 i 500 W rezultati statistički značajno ne razlikuju i prosječne vrijednosti udjela fenola iznose $331,42 \pm 2,71$ mg GAE 100 g^{-1} pri 300 W i $331,09 \pm 2,71$ mg GAE 100 g^{-1} pri 500 W dok povišenjem snage na 700 W dolazi do smanjenja vrijednosti na $306,11 \pm 2,71$ mg GAE 100 g^{-1} . Iz tog razloga je najniža primjenjena snaga (300 W) odabrana kao optimalna za izolaciju fenolnih spojeva iz ploda pasjeg trna.

Wang i sur. (2010) izolirali su primjenom MAE flavonoide iz kineske biljke *Radix puerariae* (*Ge Gen*) pri čemu su proveli optimizaciju samog procesa i ustanovili optimalne uvjete

ekstrakcije koji su uključivali snagu mikrovalova od 255 W. Daljnje povećanje snage mikrovalova nije rezultiralo većim prirastom flavonoida. Simić i sur. (2016) proveli su optimizaciju MAE za izolaciju ukupnih fenolnih spojeva iz aronije pri čemu se snaga mikrovalova od 300 W pokazala optimalnom za dobivanje najvećeg mogućeg prinosa ukupnih fenolnih spojeva.

Song i sur. (2011) izolirali su pomoću MAE ukupne fenole iz listova slatkog krumpira (*Ipomea batatas*) i najbolje rezultate dobili primjenom snage mikrovalova od 302 W. Dragović-Uzelac i sur. (2012) su istraživali utjecaj MAE na izolaciju polifenola iz kadulje i zaključili kako optimalni uvjeti za izdvajanje najvećeg udjela polifenola uključuju snagu mikrovalova 500 W koja je ujedno i najmanja primjenjena snaga u njihovom istraživanju. Veća vrijednost snage mikrovalova uzrokovala je smanjenje udjela izoliranih fenolnih spojeva.

Zhao i sur. (2018) proveli su MAE na plodovima biljke *Melastoma sanguineum* i utvrdili kako su se najveći udjeli fenolnih spojeva ($38,08 \pm 0,20$ mg GAE 100 g⁻¹) izdvojili pri snazi mikrovalova 500 W dok su povišenjem snage mikrovalova vrijednosti počele padati, što može biti posljedica prekomjerne snage mikrovalova koji mogu uzrokovati razgradnju fenolnih spojeva. Također, Liažid i sur. (2011) izolirali su antocijane iz kože grožđa primjenom MAE i pritom odredili optimalne uvjete koji su također uključivali snagu mikrovalova 500 W.

Utjecaj vremena na udio ukupnih fenola:

Vrijeme u kojem je došlo do najvećeg izdvajanja udjela ukupnih fenola je 10 min s prosječnom vrijednošću od $336,34 \pm 2,71$ mg GAE 100 g⁻¹. Prilikom trajanja ekstrakcije 5 min prosječna vrijednost za udio fenola je iznosila $318,95 \pm 2,71$ mg GAE 100 g⁻¹ s.t.v pri čemu je vidljivo kako se rezultati statistički značajno ($p < 0,05$) razlikuju kad se uzorci tretiraju 5 te 10 min. Produljenjem tretmana s 10 min na 15 min dolazi do smanjenja udjela ukupnih fenola koji pritom iznosi $313,33 \pm 2,71$ mg GAE 100 g⁻¹ i statistički značajno ($p < 0,05$) se razlikuje od vrijednosti za udio ukupnih fenola dobivene ekstrakcijom 10 min, no nema statistički značajne razlike od ekstrakcije koja je trajala 5 min.

Vrijeme ekstrakcije varira ovisno o analitu koji se ekstrahira, biljnom materijalu i otapalu. Polarna otapala poput vode, etanola, metanola i acetona imaju visoku dielektričnu konstantu te tijekom duljeg vremena ekstrakcije to može dovesti do degradacije analita jer mikrovalno zračenje uzrokuje brzi porast temperature navedenih otapala (Dragović-Uzelac i sur., 2012).

Stoga je ovo mogući razlog za smanjenje udjela ukupnih fenola produljenjem tretmana na 15 min.

Hayat i sur. (2010) istraživali su utjecaj MAE na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost istih u komini mandarine pri čemu su najveći udio fenolnih spojeva dobili trajanjem ekstrakcije 10 min. Elez Garofulić i sur. (2013) izolirali su fenolne kiseline i antocijane iz višnje maraske (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) pomoću MAE pri čemu su najveće prinose fenolnih kiselina i antocijana dobili u vremenu trajanja ekstrakcije od 9 do 10 min. Dragović-Uzelac i sur. (2012) su odredili optimalne uvjete za ekstrakciju polifenola iz kadulje uz primjenu mikrovalova pri čemu je kao optimalno trajanje ekstrakcije određeno 9 min.

Statistička analiza rezultata pokazuje da su optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih fenola iz ploda pasjeg trna: temperatura 80 °C, snaga 300 W i vrijeme ekstrakcije 10 min.

MAE se pokazala učinkovitom i brzom tehnikom za izolaciju fenolnih spojeva jer dolazi do brzog prijenosa energije materijalu putem mikrovalova kroz molekulske interakcije i djelovanjem elektromagnetskog polja. Također, izravna interakcija mikrovalova i otapala rezultira pukncem biljne stanice i brzim izdvajanjem staničnog sadržaja u otapalo (Proestos i Komaitis, 2008).

Zhao i sur. (2018) usporedili su MAE sa Soxhlet ekstrakcijom i maceracijom i pritom veće prinose fenolnih spojeva iz plodova biljke *Melastoma sanguineum* u kraćem vremenu dobili primjenom MAE u odnosu na Soxhlet ekstrakciju i maceraciju.

4.2. UTJECAJ MAE NA UDIO KLOROFILA U PLODU PASJEG TRNA

Tablica 4 prikazuje rezultate spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih klorofila izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom MAE

Tablica 5. Maseni udjeli klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih klorofila (mg 100 g⁻¹) izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Klorofil <i>a</i> (mg 100 g ⁻¹)	Klorofil <i>b</i> (mg 100 g ⁻¹)	Ukupni klorofili (mg 100 g ⁻¹)
1	40	300	5	4,35 ± 0,03	10,75 ± 0,02	15,10 ± 0,05
2			10	2,30 ± 0,02	5,82 ± 0,10	8,11 ± 0,12
3			15	2,99 ± 0,10	7,14 ± 0,24	10,12 ± 0,04
4		500	5	1,12 ± 0,02	1,86 ± 0,08	2,97 ± 0,07
5			10	0,64 ± 0,05	1,56 ± 0,07	2,20 ± 0,02
6			15	1,81 ± 0,12	3,53 ± 0,07	5,33 ± 0,05
7		700	5	0,56 ± 0,03	1,16 ± 0,05	1,72 ± 0,03
8			10	0,83 ± 0,02	1,09 ± 0,01	1,92 ± 0,01
9			15	0,56 ± 0,02	1,03 ± 0,01	1,59 ± 0,01
10	60	300	5	1,87 ± 0,08	6,12 ± 0,12	7,99 ± 0,04
11			10	2,32 ± 0,04	4,86 ± 0,09	7,18 ± 0,13
12			15	1,48 ± 0,08	4,54 ± 0,05	6,02 ± 0,03
13		500	5	3,74 ± 0,07	10,18 ± 0,10	13,92 ± 0,06
14			10	2,71 ± 0,09	7,24 ± 0,09	9,95 ± 0,00
15			15	2,51 ± 0,06	6,61 ± 0,11	9,12 ± 0,05
16		700	5	1,62 ± 0,09	4,91 ± 0,09	6,53 ± 0,00
17			10	2,62 ± 0,06	6,46 ± 0,22	9,09 ± 0,16
18			15	1,59 ± 0,07	3,81 ± 0,15	5,41 ± 0,09
19	80	300	5	7,67 ± 0,02	19,12 ± 0,01	26,78 ± 0,01
20			10	2,45 ± 0,01	6,65 ± 0,03	9,10 ± 0,04
21			15	3,18 ± 0,05	8,26 ± 0,05	11,44 ± 0,09
22		500	5	2,65 ± 0,03	7,90 ± 0,06	10,55 ± 0,08
23			10	2,45 ± 0,01	6,27 ± 0,04	8,73 ± 0,03
24			15	3,56 ± 0,04	8,25 ± 0,02	11,81 ± 0,02
25		700	5	3,53 ± 0,00	8,77 ± 0,12	12,30 ± 0,11
26			10	4,35 ± 0,05	8,35 ± 0,05	12,69 ± 0,09
27			15	2,76 ± 0,02	7,13 ± 0,09	9,89 ± 0,07

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Udjeli klorofila *a* nakon provedene MAE određeni su u rasponu od $0,56 \pm 0,02$ do $4,35 \pm 0,05$ mg 100 g⁻¹, a udjeli klorofila *b* u rasponu od $1,03 \pm 0,01$ do $19,12 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹. Najveći udio klorofila *a* određen je u uzorku 19 ($7,67 \pm 0,02$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 80 °C, snazi mikrovalova 300 W te vremenu 5 min. Najmanji udio klorofila *a* određen je u uzorku 7 ($0,56 \pm 0,03$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 40 °C, snazi mikrovalova 700 W te vremenu 5 min i u uzorku 9 ($0,56 \pm 0,02$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri istim uvjetima temperature i snage mikrovalova kao i uzorak 7, ali u vremenu od 15 min. Prosječna vrijednost udjela klorofila *a* iznosi $2,53 \pm 0,20$ mg 100 g⁻¹.

Najveći udio klorofila *b* određen je u uzorku 19 ($19,12 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 80 °C, snazi mikrovalova 300 W te vremenu 5 min. Najmanji udio klorofila *b* određen je u uzorku 9 ($1,03 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 40 °C, snazi mikrovalova 700 W i vremenu 15 min. Prosječna vrijednost udjela klorofila *b* iznosi $6,27 \pm 0,51$ mg 100 g⁻¹.

Po rezultatima može se uočiti kako su udjeli klorofila *b* izolirani iz ploda pasjeg trna znatno veći od udjela klorofila *a*. Udjeli ukupnih klorofila određeni su u rasponu od $1,59 \pm 0,01$ do $15,10 \pm 0,05$ mg 100 g⁻¹. Najveći udio ukupnih klorofila određen je u uzorku 19 ($26,78 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 80 °C, snazi mikrovalova 300 W te vremenu 5 min. Najmanji udio ukupnih klorofila određen je u uzorku 9 ($1,59 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹) koji se ekstrahirao pri temperaturi 40 °C, snazi mikrovalova 700 W i vremenu 15 min. Prosječna vrijednost udjela ukupnih klorofila iznosi $8,80 \pm 0,70$ mg 100 g⁻¹.

Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila ploda pasjeg trna prikazani su u tablici 5.

Tablica 6. Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila u uzorcima ploda pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Klorofil <i>a</i> (mg 100 g ⁻¹)	Klorofil <i>b</i> (mg 100 g ⁻¹)	Ukupni klorofili (mg 100 g ⁻¹)
Temperatura (° C)	p < 0,05*	p < 0,05*	p < 0,05*
40	1,68 ± 0,01a	3,77 ± 0,02a	5,45 ± 0,02a
60	2,27 ± 0,01b	6,08 ± 0,02b	8,36 ± 0,02b
80	3,62 ± 0,01c	8,97 ± 0,02c	12,59 ± 0,02c
Snaga (W)	p < 0,05*	p < 0,05*	p < 0,05*
300	3,18 ± 0,01c	8,14 ± 0,02c	11,32 ± 0,02c
500	2,35 ± 0,01b	5,93 ± 0,02b	8,29 ± 0,02b
700	2,05 ± 0,01a	4,74 ± 0,02a	6,79 ± 0,02a
Vrijeme (min)	p < 0,05*	p < 0,05*	p < 0,05*
5	3,01 ± 0,01b	7,86 ± 0,02c	10,87 ± 0,02c
10	2,30 ± 0,01a	5,37 ± 0,02a	7,66 ± 0,02a
15	2,27 ± 0,01a	5,59 ± 0,02b	7,86 ± 0,02b
Prosječna vrijednost	2,53 ± 0,20	6,27 ± 0,51	8,80 ± 0,70

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

4.2.1. Utjecaj parametara MAE na udio klorofila *a*

Iz rezultata dobivenih statističkom obradom podataka, uočava se kako sva tri promatrana parametra statistički značajno ($p < 0,05$) utječu na udio klorofila *a* u plodu pasjeg trna. Iz dobivenih prosječnih vrijednosti, vidljiv je porast povišenjem temperature pri čemu je najveća prosječna vrijednost udjela klorofila *a* dobivena pri temperaturi 80 °C i iznosi $3,62 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹.

Što se tiče snage mikrovalova kojoj se podvrgava uzorak, uočava se kako je najveća prosječna vrijednost udjela klorofila *a* dobivena ekstrakcijom primjenom snage mikrovalova 300 W ($3,18 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹) te da se primjenom viših vrijednosti snage mikrovalova 500 i 700 W, vrijednost udjela klorofila *a* postupno smanjuje ($2,35 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹ pri 500 W i $2,05 \pm 0,01$ mg 100 g⁻¹ pri 700 W).

Trajanjem ekstrakcije 5 min, dobivena je najveća prosječna vrijednost za udio klorofila *a* koja iznosi $3,01 \pm 0,01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ dok se produljenjem tretmana na 10 i 15 min, vrijednost smanjila. Međutim rezultati dobiveni ekstrakcijom 10 i 15 min se statistički značajno ne razlikuju što znači da ukoliko se ekstrakcija provodi dulje od 10 min, ne dolazi do znatnije promjene u udjelu ekstrahiranog pigmenta klorofila *a*. Upravo zato se optimalnim trajanjem ekstrakcije pokazalo vrijeme od 5 min kada se ujedno izdvaja i najveći udio klorofila *a*.

4.2.2. Utjecaj parametara MAE na udio klorofila *b*

Rezultati udjela klorofila *b* dobiveni analizom pokazuju kako i ovdje sva tri parametra statistički značajno ($p < 0,05$) utječu na udio klorofila *b* u ekstraktu ploda pasjeg trna. Može se primjetiti kako su vrijednosti veće od udjela klorofila *a*. Također je primjećen porast prosječne vrijednosti udjela povišenjem temperature pri čemu je ona najveća pri temperaturi $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te iznosi $8,97 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ u odnosu na vrijednost pri temperaturi $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3,77 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) i vrijednost pri temperaturi $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($6,08 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Primjenom snage mikrovalova 300 W dobivena je najveća prosječna vrijednost za udio klorofila *b* od $8,14 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ dok se primjenom većih vrijednosti snage mikrovalova udio klorofila *b* smanjio pa je tako kod 500 W dobivena vrijednost od $5,93 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, a pri 700 W $4,74 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Također, najveća prosječna vrijednost za udio klorofila *b* dobivena je ekstrakcijom u trajanju od 5 min i iznosi $7,86 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Produljenjem ekstrakcije na 10 min dolazi do smanjenja udjela izoliranog klorofila *b* pri čemu dobiven udio klorofila *b* od $5,37 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Ekstrakcijom koja je trajala 15 min, dolazi do porasta udjela u odnosu na udio dobiven ekstrakcijom 10 min i on iznosi $5,59 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

4.2.3. Utjecaj parametara MAE na udio ukupnih klorofila

Rezultati statističke analize za ukupne klorofile (klorofil *a* + klorofil *b*) pokazuju kako sva tri parametra statistički značajno ($p < 0,05$) utječu na udio ukupnih klorofila.

Ekstrakcijom pri temperaturi $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ koja je primjenjena za uzorke 19-27, dobivena je najveća prosječna vrijednost za udio ukupnih klorofila koja iznosi $12,59 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ dok dobivene vrijednosti pri temperaturi $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (uzorci 1-9) i $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (uzorci 10-18) iznose $5,45 \pm 0,02$ i $8,36 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Primjenom snage mikrovalova 300 W dobivena je najveća prosječna vrijednost od $11,32 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} dok se primjenom većih vrijednosti snaga mikrovalova 500 i 700 W, vrijednost smanjila te ona kod 500 W iznosi $8,29 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} , a kod 700 W $6,79 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} .

Pri ekstrakciji koja je trajala 5 min dobivena je prosječna vrijednost za udio ukupnih klorofila $10,87 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} dok je produljenjem ekstrakcije na 10 i 15 min došlo do smanjenja vrijednosti te ona kod 10 min iznosi $7,66 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} , a pri 15 min $7,86 \pm 0,02$ mg 100 g^{-1} .

Michalak i sur. (2015) izolirali su primjenom MAE klorofile iz kultiviranih biljaka pri čemu su promatrali utjecaj tri različite temperature (25, 40 i 60 °C) na prinos klorofila. Najveći prinos klorofila ostvaren je pri najvišoj primjenjenoj temperaturi 60 °C gdje su uvidjeli korelaciju između nižih temperatura ekstrakcije i niže koncentracije mikro- i makroelemenata u konačnom ekstraktu.

Fabrowska i sur. (2017) su izolirali klorofile iz tri vrste slatkovodnih algi (*Cladophora glomerata*, *Cladophora rivularis* i *Ulva flexuosa*) pritom koristeći različite tehnike ekstrakcije. Pomoću MAE pri temperaturi 40 °C, snazi 800 W i vremenu 60 min dobili su sa statističkom razlikom $p < 0,0001$ najveće količine klorofila *a* i klorofila *b* u odnosu na ostale ekstrakcijske metode.

4.2. UTJECAJ MAE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST SPOJEVA U PLODU PASJEG TRNA

Rezultati određivanja vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za uzorke ploda pasjeg trna primjenom FRAP metode prikazani su u tablici 6.

Tablica 7. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$) određene za uzorke ploda pasjeg trna primjenom FRAP metode

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$)
1	40	300	5	1699,36 ± 11,84
2			10	2377,43 ± 59,19
3			15	2186,90 ± 45,99
4		500	5	2080,25 ± 65,11
5			10	2122,19 ± 167,40
6			15	2464,01 ± 91,10
7		700	5	2005,03 ± 159,43
8			10	1719,44 ± 120,72
9			15	1276,61 ± 29,60
10	60	300	5	1492,30 ± 113,59
11			10	1847,41 ± 29,89
12			15	2405,43 ± 65,76
13		500	5	1976,96 ± 76,20
14			10	2244,79 ± 209,25
15			15	2143,04 ± 35,52
16		700	5	2423,47 ± 159,82
17			10	1929,57 ± 124,31
18			15	1523,56 ± 82,87
19	80	300	5	2000,72 ± 35,52
20			10	1686,84 ± 64,47
21			15	2033,41 ± 101,64
22		500	5	1933,55 ± 153,90
23			10	2405,43 ± 53,81
24			15	2005,98 ± 58,61
25		700	5	2109,51 ± 125,55
26			10	2109,59 ± 111,37
27			15	2105,28 ± 59,79

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Primjenom FRAP metode određena je antioksidacijska aktivnost na uzorcima ploda pasjeg trna u rasponu vrijednosti od $1276,61 \pm 29,60$ do $2464,01 \pm 91,10$ $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ s prosječnom vrijednošću $2011,42 \pm 41,67$ $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$. Uzorak s najvećom antioksidacijskom aktivnošću je uzorak 6 koji je podvrgnut ekstrakciji pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi mikrovalova 500 W te vremenu 15 min . Najmanju antioksidacijsku aktivnost ima uzorak 9 koji se ekstrahirao pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi mikrovalova od 700 W te vremenu od 15 min .

Rezultati statističke analize utjecaja parametara na antioksidacijsku aktivnost uzoraka ploda pasjeg trna prikazani su u tablici 7.

Tablica 8. Rezultati statističke analize utjecaja parametara na antioksidacijsku aktivnost uzoraka ploda pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$)
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	$p > 0,05$
40	$1992,36 \pm 24,07\text{a}$
60	$1998,50 \pm 24,07\text{a}$
80	$2043,39 \pm 24,07\text{a}$
Snaga (W)	$p < 0,05^*$
300	$1969,98 \pm 24,07\text{a}$
500	$2152,93 \pm 24,07\text{b}$
700	$1911,34 \pm 24,07\text{a}$
Vrijeme (min)	$p > 0,05$
5	$1969,04 \pm 24,07\text{a}$
10	$2049,19 \pm 24,07\text{a}$
15	$2016,03 \pm 24,07\text{a}$
Prosječna vrijednost	$2011,42 \pm 41,67$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Na uzorke 1-9 primjenjena je temperatura $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pri čemu je dobivena prosječna vrijednost od $1992,36 \pm 24,07$ $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$. Na uzorke 10-18 primjenjena je temperatura $60 \text{ }^\circ\text{C}$ i dobivena je prosječna vrijednost od $1998,50 \pm 24,07$ $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, a na uzorke 19-27 primjenjena je temperatura $80 \text{ }^\circ\text{C}$ i dobivena je prosječna vrijednost od $2043,39 \pm 24,07$ $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$. Vidljivo je kako povišenje temperature ne utječe statistički značajno na rezultate, no najveća prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti dobivena je pri temperaturi $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Primjenom snage mikrovalova od 500 W dobivena je najveća prosječna vrijednost od $2152,93 \pm 24,07 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ koja se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikuje od vrijednosti dobivenih pri snazi mikrovalova 300 i 700 W. Pri 300 W dobivena prosječna vrijednost iznosi $1969,98 \pm 24,07 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, a pri 700 W $1911,34 \pm 24,07 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ te pritom nema statistički značajne razlike između ove dvije dobivene vrijednosti. S obzirom na rezultate, vidljivo je da parametar snage mikrovalova ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost pri čemu se snaga mikrovalova 500 W smatra optimalnom jer se pritom postiže najveća antioksidacijska aktivnost dok kod rezultata dobivenih primjenom snage mikrovalova 300 i 700 W, nije uočen značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.

Hayat i sur. (2010) istraživanjem utjecaja MAE na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost u komini mandarine, utvrdili su povišenje antioksidacijske aktivnosti utvrđene DPPH metodom, primjenom snage mikrovalova 500 W i to s 18,4 na 29,1 % te s 8,5 na 16,2 %.

Što se tiče vremena ekstrakcije, ono kao promatrani parametar ne utječe statistički značajno na antioksidacijsku aktivnost, no najveća antioksidacijska aktivnost primjećena je kod ekstrakcije koja je trajala 10 min ($2049,19 \pm 24,07 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$). Dobivene vrijednosti za ekstrakciju koja je trajala 5 te 15 min su $1969,04 \pm 24,07$ i $2011,42 \pm 41,67 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$.

Lovrić i sur. (2017) istraživali su utjecaj MAE na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost spojeva biljke trnine (lat. *Prunus spinosa* L.). Antioksidacijsku aktivnost određivali su DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FRAP metodom pri čemu su utvrdili kako temperatura ekstrakcije nema značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene FRAP metodom.

Sharma i sur. (2008) određivali su antioksidacijsku aktivnost u različitim dijelovima biljke pasjeg trna primjenjujući različite metode ekstrakcije i to maceraciju, UAE, MAE te Soxhlet ekstrakciju. Antioksidacijska aktivnost određena je ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] metodom te DPPH metodom. Primjenom MAE dobivene su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u odnosu na ostale metode pri čemu vrijednosti za plod pasjeg trna iznose $18,81 \pm 0,19 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (ABTS) te $28,40 \pm 0,19 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (DPPH) dok su kod UAE dobivene vrijednosti od $6,13 \pm 0,30 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (ABTS) te $16,72 \pm 0,70 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$, kod maceracije $2,13 \pm 0,50 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (ABTS) i $14,28 \pm 0,31 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (DPPH) i kod Soxhlet ekstrakcije $8,33 \pm 0,28 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (ABTS) te $21,37 \pm 0,24 \text{ mg TE } \text{g}^{-1}$ (DPPH). Pritom su ustanovili kako MAE pokazuje veću učinkovitost na izolaciju bioaktivnih spojeva iz različitih dijelova biljke pasjeg trna jer je djelovanje mikrovalova dovelo do povišenja antioksidacijske aktivnosti, a metoda se odlikuje jednostavnom i brzom izvedbom te niskom potrošnjom otapala.

S obzirom na dobivene rezultate u ovom radu, vidljivo je kako uzorak s najmanjim udjelom fenolnih spojeva (uzorak 6: $246,45 \pm 0,85$ mg GAE 100 g^{-1}) je ujedno i uzorak s najvećom antioksidacijskom aktivnošću (uzorak 6: $2464,01 \pm 91,10$ mg TE g^{-1}) što se može objasniti činjenicom da na antioksidacijsku aktivnost osim samih fenolnih spojeva utječu i drugi bioaktivni spojevi prisutni u biljci.

Sulaiman i sur. (2011) istraživali su korelaciju između udjela fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u osam uzoraka malezijskih banana (*Musa* sp.) pri čemu su utvrdili kako na antioksidacijsku aktivnost banana uz fenolne spojeve vjerojatno utječu i vitamin C, vitamin E i β -karoten.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata te provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom MAE iz ploda pasjeg trna izolirani su sljedeći bioaktivni spojevi s prosječnim vrijednostima: ukupni fenoli (322,87 mg GAE 100 g⁻¹), klorofil *a* (2,53 mg 100 g⁻¹), klorofil *b* (6,27 mg 100 g⁻¹) i ukupni klorofili (8,80 mg 100 g⁻¹). Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP metodom s prosječnom vrijednošću 2011,42 μmol TE 100 g⁻¹.
2. Ispitivani parametri ekstrakcije (temperatura, snaga te vrijeme) imaju statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj na masene udjele ukupnih fenola, klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih klorofila dok samo parametar snage ima statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.
3. Prema statističkoj analizi, najveći ekstrakcijski prinosi analiziranih spojeva ostvareni su pri temperaturi 80 °C, primjenom snage mikrovalova 300 i/ili 500 W te trajanjem ekstrakcije 5 i/ili 10 min. Najmanji ekstrakcijski prinosi ostvareni su pri temperaturi 40 °C, snazi mikrovalova 700 W te vremenu 15 min.
4. Optimalni parametri za ekstrakciju ukupnih fenola su temperatura 80 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije 10 min. Iako parametri temperature i vremena nisu imali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost, najveća antioksidacijska aktivnost ostvarena je pri temperaturi 80 °C, snazi mikrovalova 500 W i vremenu ekstrakcije 10 min.
5. Optimalni parametri za ekstrakciju pojedinačnih i ukupnih klorofila (klorofil *a* + klorofil *b*) su: temperatura 80 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije 5 min.
6. Prema svemu navedenom, MAE se pokazala učinkovitom metodom izolacije fenolnih spojeva, biljnih pigmenata te detekcije antioksidacijske aktivnosti ploda pasjeg trna. Praćenje i optimizacija parametara MAE doprinijela je dobivanju većih ekstrakcijskih prinosa izoliranih bioaktivnih spojeva.

6. LITERATURA

- Andersson, S. C., Olsson, M. E., Johansson, E., Rumpunen, K. (2009) Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin *a* as a Maturity Marker. *J. Agri. Food Chem.* **57(1)**, 250–258.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2001) Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, **127(1)**, 183–198.
- Asofiei, I., Calinescu, I., Trifan, A., David, I. G., Gavrilă, A. I. (2016) Microwave-Assisted Batch Extraction of Polyphenols from Sea Buckthorn Leaves. *Chem. Eng. Comm.* **203(12)**, 1547–1553.
- Azmir, J., Zaidul, I.S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K. Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426–436.
- Azwanida, N. N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med. Aromat. Plants.* **4(3)**, 196.
- Bal, L. M., Meda, V., Naik, S. N., Satya, S. (2011) Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Res. Int.* **44(7)**, 1718–1727.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99(1)**, 191–203.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- CL (2021) Chemistry Libretexts
<[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Smith\)/Chapter_15%3A_Radical_Reactions/15.02_General_Features_of_Radical_Reactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Smith)/Chapter_15%3A_Radical_Reactions/15.02_General_Features_of_Radical_Reactions)>
> Pristupljeno 28. srpnja 2021.
- Cossuta, D., Simándi, B., Hohmann, J., Doleschall, F., Keve, T. (2007) Supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pomace. *J. Sci. Food Agr.* **87(13)**, 2472–2481.

- Dragović-Uzelac V., Elez Garofulić I., Jukić M., Penić M., Dent M. (2012) Microwave-Assisted Extraction of Sage Polyphenols. *Food Technol. Biotechnol.* **50(3)**, 377–383.
- Fabrowska, J., Messyasz, B., Szyling, J., Walkowiak, J., Łęska, B. (2017) Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycol. Res.* **66(1)**, 52-57.
- Franjić J., Horvat G., Krstonošić D. (2016) Novo nalazište i sintaksonomske značajke pasjega trna (*Hippophae rhamnoides L., Elaeagnaceae*) u Hrvatskoj. *Šumarski list*, **140(3-4)**, 111-116.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliker, J., Aruoma, O. I. (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33(7)**, 601–617.
- Hayat, K., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, S., Xia, S., Jia, C., Zhong F., Zhang, J. (2010) Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chem.* **123(2)**, 423–429.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M. K. (2010) Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *Int. J. Chem. Eng.*, **2010**, 1–11.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agr. Food Chem.* **53(6)**, 1841–1856.
- Humphrey, A. M. (2006) Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.* **69(5)**, 422-425.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126(4)**, 1821–1835.
- Isopencu, G., Stroescu, M., Brosteanu, A., Chira, N., Pârvulescu, O. C., Busuioc, C., Stoica-Guzun, A. (2018) Optimization of ultrasound and microwave assisted oil extraction from sea buckthorn seeds by response surface methodology. *J. Food Process Eng.* **42**, 1-12. doi:10.1111/jfpe.12947.
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., Li, M. (2020) Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species - A Review. *Molecules* **25(4)**, 917.
- Kumar, S., Sharma, S., Vasudeva, N. (2017) Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chin. J. Integr. Med.* 1-12.

- Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Analysis*, **13**(2), 105–113.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A*. **1140**(1-2), 29–34.
- Liazid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C. G. (2011) Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem.* **124**(3), 1238–1243.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1–F4.3.8.
- Li, T. S. C., Schroeder, W. R. (1996) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*): A multipurpose plant. *Hort. Technol.* **6**(4), 370-380.
- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technol. Biotechnol.* **55**(2), 243–250.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews* **1**, 7-18.
- Michalak, I., Tuhy, Ł., Chojnacka, K. (2015) Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chem.* **13**(1), 1183-1195.
- Mokrani, A., Madani, K. (2016) Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica L.*) fruit. *Sep. Purif. Technol.* **162**, 68–76.
- Mortensen, A. (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* **78**(8), 1477–1491.
- Nimse, S. B., Pal, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **5**(35), 27986–28006.

Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., Terao, J. (2011) Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front. Biosci.* **3**, 1332-1362.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **50(11)**, 3122–3128.

Paech, K., Tracey, M. V. (1955) Chlorophylls: Analysis in Plant Materials. U: Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse, (Smith, J. H. C., Benitez, A., ured.), Springer, Berlin/Heidelberg, str. 142–196.

Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agr.* **80(7)**, 985–1012.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2014) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30(1)**, 11-26.

Plantagea.hr (2021)

<<https://www.plantagea.hr/prirodna-kozmetika/pasji-trn-sjemenke/>> Pristupljeno 22. srpnja 2021.

Proestos, C., Komaitis, M. (2008) Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* **41(4)**, 652–659.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66(4)**, 401–436.

Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D., Kroh, L. W. (2003) Structure–Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Juice. *J. Agr. Food Chem.* **51(15)**, 4233–4239.

Routray, W., Orsat, V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Tech.* **5(2)**, 409–424.

- Sharma, U. K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H. P., Sinha, A. K. (2008) Microwave-Assisted Efficient Extraction of Different Parts of *Hippophae rhamnoides* for Comparative Evaluation of Antioxidant Activity and Quantification of Its Phenolic Constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *J. Agr. Food Chem.* **56(2)**, 374–379.
- Shortle, E., O’Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98(4)**, 828-834.
- Simić, V. M., Rajković, K. M., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L., Karabegović, I. T. (2016) Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep. Purif. Technol.* **160**, 89–97.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011) Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg.* **12(3)**, 282–287.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, Ooi, K. L. (2011) Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp.*) *J. Food Compos. Anal.* **24(1)**, 1–10.
- Teleszko, M., Wojdyło, A., Rudzińska, M., Oszmiański, J., Golis, T. (2015) Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *J. Agr. Food Chem.* **63(16)**: 4120-4129.
- Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. (2019) Classification of Phenolic Compounds in Plants. U: Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and Extract Preparation, 2.izd. (Watson, R. R., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 263–284.
- Veggi, P., C., Martinez, J., Meireles, M. A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds, (Chemat, F., Cravotto, G., ured.), Springer, New York, str. 15-53.
- Wang, Y., Xi, G. S., Zheng, Y. C., Miao, F. S. (2010) Microwave-assisted extraction of flavonoids from Chinese herb *Radix puerariae* (*Ge Gen*). *J. Med. Plants Res.* **4(4)**, 304-308.

Xiao, W., Han, L., Shi, B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. *Sep. Purif. Technol.* **62(3)**, 614–618.

Zadernowski, R., Naczek, M., Czaplicki, S., Rubinskiene, M., Szalkiewicz, M. (2005) Composition of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82(3)**, 175–179.

Zeb A. (2004) Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (Hippophae): A Review. *J. Biol. Sci.* **4(5)**, 687-693.

Zhang, B., Yang, R., Liu C. Z. (2008) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep. Purif. Technol.* **62(2)**, 480–483.

Zhao, C. N., Zhang, J. J., Li, Y., Meng, X., Li, H. B. (2018) Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma sanguineum* Fruit: Optimization and Identification. *Molecules* **23(10)**, 2498.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Viktorija Rnjak
Ime i prezime studenta