Antioksidacijska aktivnost izolata hlapljivih spojeva brokule i kineske brokule pripravljenih primjenom mikrovalne ekstrakcije

Jolić, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:318083

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZOLATA HLAPLJIVIH SPOJEVA BROKULE I KINESKE BROKULE PRIPRAVLJENIH PRIMJENOM MIKROVALNE EKSTRAKCIJE

ZAVRŠNI RAD

NINA JOLIĆ
Matični broj: 1253

Split, lipanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZOLATA HLAPLJIVIH SPOJEVA BROKULE I KINESKE BROKULE PRIPRAVLJENIH PRIMJENOM MIKROVALNE EKSTRAKCIJE

ZAVRŠNI RAD

NINA JOLIĆ
Matični broj: 1253

Split, lipanj 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY CHEMICAL ENGINEERING

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VOLATILE ISOLATES FROM BROCCOLI AND BROCCOFLOWER OBTAINED BY MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION

BACHELOR THESIS

NINA JOLIĆ

Parent number: 1253

Split, June 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemijske tehnologije, smjer Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Tema rada	je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor:	Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Pomoć pri izradi:	Mag. chem. Azra Đulović

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZOLATA HLAPLJIVIH SPOJEVA BROKULE I KINESKE BROKULE PRIPRAVLJENIH PRIMJENOM MIKROVALNE EKSTRAKCIJE

Nina Jolić, 1253

Sažetak:
Povrće iz porodice kupusnjača (Brassicaceae) karakterizira prisutnost glukozinolata, skupine sekundarnih biljnih metabolita, čiji razgradni produkti pokazuju izrazito dobru biološku aktivnost. Cilj ovo rada bila izolacija hlapljivih sastojaka iz brokule (*Calabrese broccoli*) i kineske brokule (*Romanesco broccoli*). Frakcije su izolirane iz svježeg biljnog materijala korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju (400 W, 98°C, 35 min), a analizirane primjenom tehnike plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Frakcijama je testirana antioksidacijska aktivnost korištenjem različitih metoda: sposobnost *hvatanja* molekula slobodnog radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom i metodom određivanja redukcijske aktivnosti FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*). GC-MS tehnika je pokazala da je dominantan sumporov spoj koji je produkt degradacije u svim izolatima bio dimetil trisulfid (nastaje raspadom S-metilcistein sulfoksida). Najveća koncentracija ovog spoja određena je u frakciji brokule (0,74%) koja je ujedno pokazala i najbolju antioksidacijsku aktivnost primjenom svih korištenih metoda.

Ključne riječi: *Brassica oleracea*, glukozinolati, mikrovalna ekstrakcija, GC-MS, antioksidacijska aktivnost.

Rad sadrži: 28 stranica, 13 slika, 5 tablica, 26 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Sandra Svilović - predsjednik
2 Doc. dr. sc. Danijela Skroza - član
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - mentor

Datum obrane: 27.06.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate Study of Chemical Technology

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food Technology
Thesis subject	was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3.
Mentor:	Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić, Ph. D.
Technical assistance:	Mag. chem. Azra Đulović

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VOLATILE ISOLATES FROM BROCCOLI AND BROCCOFLOWER OBTAINED BY MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION

Nina Jolić, 1253

Abstract:
The vegetable from the Brassicaceae plant family is characterized by the presence of glucosinolates, a group of secondary plant metabolites, whose degradation products show significant biological activity. The aim of this study was the isolation of the volatiles from two *Brassica oleracea* species: broccoli (*Calabrese broccoli*) and broccoflower (*Romanesco broccoli*). The flavour and fragrance fractions were collected from fresh plant material using microwave-assisted extraction (400 W, 98°C, 35 min) and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The fractions were tested for antioxidant activity by multiple method approach using free DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil) scavenging activity, Briggs-Rauscher oscillating reaction and reducing activity determination by FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power). The dominant sulfur-containing degradation product in all isolates was dimethyl trisulfide (from degradation of S-methylcysteine sulfoxide). This compound was detected in flavour fraction of broccoli (0.74%) in highest concentration, and that fraction also provided the best antioxidant activity using all applied methods.

Keywords: *Brassica oleracea*, glucosinolates, microwave extraction, GC-MS, antioxidant activity.

Thesis contains: 28 pages, 13 figures, 5 tables, 26 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph.D. Sandra Svilović, Associate Prof. – chair person
2. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Prof. - member
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Prof. - supervisor

Defence date: 27.06.2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić i neposrednim vodstvom mag. chem. Azre Đulović, u razdoblju od travnja do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-06-2016-1316.

ZAHVALA

Posebne zahvale idu mojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na predanoj pomoći tijekom izrade i pisanja završnog rada. Također, zahvaljujem se i mag. chem. Azri Đulović na pomoći pri pripremi izolata, savjetima i posvećenom vremenu tijekom izrade ovog završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji koja je uvijek vjerovala u mene i moj uspjeh, te na koncu hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene tijekom mog studiranja, hvala im na iskazanoj pomoći, potpori i razumijevanju.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je iz brokule i kineske brokule (šenona) izolirati hlapive komponente koristeći metodu mikrovalne ekstrakcije (400 W, 98°C, 35 min). Potrebno je dobivene hlapljive frakcije testirati na antioksidacijsku aktivnost primjenom triju metoda, a kemijski sastav uzoraka biti će ispitan primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom.

SAŽETAK

Povrće iz porodice kupusnjača (Brassicaceae) karakterizira prisutnost glukozinolata, skupine sekundarnih biljnih metabolita, čiji razgradni produkti pokazuju izrazito dobru biološku aktivnost. Cilj ovo rada bila je izolacija hlapljivih sastojaka iz brokule (*Calabrese broccoli*) i kineske brokule (*Romanesco broccoli*). Frakcije su izolirane iz svježeg biljnog materijala korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju (400 W, 98°C, 35 min), a analizirane primjenom tehnike plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Frakcijama je testirana antioksidacijska aktivnost korištenjem različitih metoda: sposobnost hvatanja molekula slobodnog radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom i metodom određivanja redukcijske aktivnosti FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*). GC-MS tehnika je pokazala da je dominantan sumporov spoj koji je produkt degradacije u svim izolatima bio dimetil trisulfid (nastaje raspadom S-metilcistein sulfoksida). Najveća koncentracija ovog spoja određena je u frakciji brokule (0,74%) koja je ujedno pokazala i najbolju antioksidacijsku aktivnost primjenom svih korištenih metoda.

Ključne riječi: *Brassica oleracea,* glukozinolati, mikrovalna ekstrakcija, GC-MS, antioksidacijska aktivnost.

ABSTRACT

The vegetable from the Brassicaceae plant family is characterized by the presence of glucosinolates, a group of secondary plant metabolites, whose degradation products show significant biological activity. The aim of this study was the isolation of the volatiles from two *Brassica oleracea* species: broccoli (*Calabrese broccoli*) and broccoflower (*Romanesco broccoli*). The flavour and fragrance fractions were collected from fresh plant material using microwave-assisted extraction (400 W, 98°C, 35 min) and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The fractions were tested for antioxidant activity by multiple method approach using free DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil) scavenging activity, Briggs-Rauscher oscillating reaction and reducing activity determination by FRAP assay (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). The dominant sulfur-containing degradation product in all isolates was dimethyl trisulfide (from degradation of S-methylcysteine sulfoxide). This compound was detected in flavour fraction of broccoli (0,74%) in highest concentration, and that fraction also provided the best antioxidant activity using all applied methods.

Keywords: *Brassica oleracea*, glucosinolates, microwave extraction, GC-MS, antioxidant activity.

SADRŽAJ

UVOD……...1

1. OPĆI DIO……...2

1.1. Brokula…….....2

1.2. Kineska brokula – šenon……....4

1.3. Mikrovalna ekstrakcija…….....5

1.3.1. Parametri mikrovalne ekstrakcije……....7

1.3.2. Usporedba ekstrakcije u otvorenoj i zatvorenoj posudi…….....9

1.3.3. Prednosti korištenja mikrovalne ekstrakcije…….....10

1.3.4. Tehnike mikrovalne ekstrakcije…….....11

2. EKSPERIMENTALNI DIO…….....13

2.1. Materijal……...13

2.2. Metoda mikrovalne ekstrakcije……....15

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata…….....17

2.3.1. DPPH metoda……....17

2.3.2. Briggs-Rauscher oscilacijska metoda……19

2.3.3. FRAP metoda…….....20

3. REZULTATI I RASPRAVA……22

4. ZAKLJUČAK……26

5. LITERATURA…….....…27

UVOD

Posljednjih godina metoda mikrovalne ekstrakcije je u znanstvenim istraživanjima postala jedna od najkorištenijih metoda izolacije različitih sastojaka iz biljnog materijala. Konvencionalne tehnike ekstrakcije najčešće izlažu materijal različitim termičkim tretmanima kojima se isti degradira, zahtijevaju više vremena te najčešće uključuju uporabu različitih otapala. Suprotno tome, korištenje mikrovalova u svrhu ekstrakcije omogućuje brzu ekstrakciju spojeva, veliku učinkovitost ekstrakcije te malu ili gotovo nikakvu potrošnju organskih otapala (1).

U ovom radu su istraživane hlapljive komponente dviju povrtnica, biljaka iz porodice kupusnjača, brokule i kineske brokule (šenon). Dok je klasična brokula poznata svima, posljednjih godine se javlja sve veće zanimanje za kineskom brokulom, ponajviše zbog njenog neobičnog izgleda koji je rezultat križanja brokule i cvjetače. Osim toga ovu vrstu kupusnjače, kao i samu brokulu, karakterizira bogatstvo vitamina, minerala, te različitih biološki aktivnih sastojaka čija svojstva pozitivno utječu na ljudsko zdravlje (2). Upravo je bogat i nutritivno vrijedan kemijski sastav ovog povrća jedan od osnovnih razloga klasificiranja ovih namirnica kao funkcionalne hrane (3).

1. OPĆI DIO

1.1. Brokula

Brokula (slika 1) potječe iz Male Azije odakle je još u rimsko doba stigla u Italiju. U Hrvatskoj je brokula bila poznata pod sinonimom kaulin, te se u početku uzgajala samo na području Dubrovnika da bi se početkom 20. stoljeća njen uzgoj proširio i u ostale krajeve Hrvatske (4).

Brokula je povrće iz porodice *Brassicaceae,* a ime je dobila po izgledu svojih izdanaka, odnosno od latinske riječi *bracchium* što u prijevodu znači jaka ruka ili grana (5). Morfološkim, ali i biološkim svojstvima lako je uočiti sličnost između brokule i cvjetače, a najuočljivija razlika je što su kod brokule internodiji izduženi pa cvjetna stabljika naraste 50 do 90 centimetara. Na samim vrhovima stabljike formira se zbijeni cvat bijele, zelene ili ljubičaste boje (4).

Zbog visokih udjela različitih bioloških aktivnih spojeva i njihovoga pozitivnog utjecaja na ljudski organizam, brokula se smatra funkcionalnom hranom. Aktivni sastojci brokule nalaze se i u nadzemnim i u podzemnim dijelovima biljke. Brojna istraživanja ukazuju na korisne učinke brokule koji se povezuju s njenim sastojcima. Brokula sadrži visoke koncentracije vitamina i minerala. Vitamini koji su prisutni u brokuli su: A, C, E, K1 i vitamini B skupine, a među najistaknutijim mineralima u brokuli ističu se Na, K, Mg, Ca, Fe i Zn (5). Osim vitamina i minerala u brokuli se nalazi i posebna skupina fitokemikalija –glukozinolati (3). Sadržaj glukozinolata u brokuli se kreće od 19,3 do 127,5 mg/100 mg (6). Glukozinolati su važna skupina biljnih metabolita koja je prisutna u različitim vrstama, a za ljudsku prehranu posebice su važne one iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) u koje spadaju kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica, itd (6). Brokula se izdvaja kao značajan izvor glukozinolata, a posebice zbog toga što njihovom enzimskom hidrolizom nastaje sulforafan, vrlo važan inicijator enzima za kojeg je dokazano da efikasno inhibira razvoj različitih tumora (4). Osim što je dokazano antikancerogeno djelovanje sastojaka

brokule, dokazana su i razna druga pozitivna djelovanja od kojih se posebno ističe protuupalni, imuno-stimulirajući, antigljivični, antibakterijski i antivirusni učinak (5).



Slika 1. Brokula (7)

Među bio aktivnim sastojcima brokule važno je spomenuti i fenolne spojeve, odnosno spektar spojeva iz podgrupa fenolnih kiselina i flavonoida. Poznato je i da antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva pridonose zaštiti i sprječavanju pojave brojnih kroničnih bolesti kao što su razne vrste karcinoma, kardio- i cerebrovaskularne te neurološke bolesti (8).

Naravno, udio i sastav biološki aktivnih spojeva u brokuli ovisi o različitim čimbenicima od kojih se posebno ističu genotip, okolišni uvjeti, kakvoća zemlje, uvjeti uzgoja itd., a važno je znati da se termičkom obradom brokule (kuhanjem) također umanjuje ili u potpunosti uništava biološka aktivnost ovih spojeva (8,9).

Gore navedeni spojevi uglavnom se analiziraju iz cvata i mladica brokule, dok jako mali broj studija istražuje njihovu prisutnost u ostalim dijelovima biljke (listovi, stabljika) (5).

1.2. Kineska brokula - Šenon

Danas se na tržištu najčešće susrećemo sa zelenom brokulom, iako postoje različite sorte koje odlikuje drugačija boja cvata. Kineska brokula, brokula *Romanesco* ili tzv. šenon jest hibrid između brokule i cvjetače (slika 2). Izgledom je slična cvjetači, ali je žuto-zelene boje i miješanog okusa (5). Ipak brojni znanstvenim studijama potvrđeno je da je šenon zapravo vrsta cvjetače, a ne brokule (9).



Slika 2. Šenon (kineska brokula) (10)

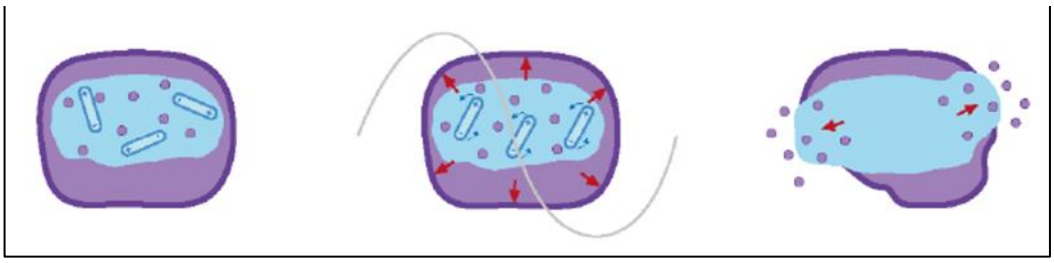
Tablica 1. Usporedba nutritivne vrijednosti cvjetače i šenona (11)

	Mjerna jedinica	Cvjetača	Šenon
Voda	g/100 g svježe tvari	91,9	89,8
Bjelančevine		2	3
Ugljikohidrati		5,3	6,2
Vlakna		2,5	3,2
Vitamin C	mg/100 g svježe tvari	46,4	88,2
Vitamin K		16	20,2
Folna kiselina		57	57
Kalij	mg/100 g svježe tvari	303	300
Fosfor		44	62
Kalcij		22	33
Magnezij		15	20

Cvat šenona je za razliku od cvata cvjetače nešto veći, iako se kao i kod cvjetače, razvija na kratkoj stabljici. U usporedbi sa cvjetačom šenon je bogatiji vitaminom C, karotenoidima, polifenolima te ga odlikuju bolja antioksidacijska svojstva. Također, šenon (kao i brokulu) odlikuje visok sadržaj glukozinolata (11).

1.3. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi koje odlikuju valne duljine od 0,1 mm do 30 cm, te koji zauzimaju područje frekvencija od 1 GHz. Prefiks mikro ukazuje nam na malu valnu duljinu u usporedbi primjerice s radiovalovima (12). Neke od najvažnijih karakteristika ove vrste valova su odbijanje od metala, prolazak kroz papir, staklo i plastiku te zagrijavanje hrane (13). Elektromagnetsko zračenje koje karakterizira mikrovalove teoretski označava gibanje energije jer mikrovalovi imaju sposobnost pretvoriti dio apsorbiranog magnetskog zračenja u toplinsku energiju, a to su zapravo titraji međusobno povezanog električnog i magnetskog polja koji se šire prostorom (12,14). Kod konvencionalnih metoda energija se na materijal prenosi zračenjem iz vanjskog materijala, dok kod mikrovalne ekstrakcije (MAE) energija mikrovalova ukazuje izravno na interakciju s elektromagnetskim poljem i tako uzrokuje zagrijavanje materije. Sam proces mikrovalne ekstrakcije nastaje kao posljedica promjene stanične strukture uzrokovane elektromagnetskim valovima (15).



Slika 3. Selektivno djelovanje mikrovalova (15)

Proces grijanja odvija se unutar ozračenog medija, dok se u konvencionalnoj ekstrakciji toplina prenosi iz medija za zagrijavanje u unutrašnjost uzorka. Glavni koraci koji karakteriziraju postupak mikrovalne ekstrakcije koja se provodi s otapalom su (15):

- Prodor otapala u krutu maticu,
- Razgradnja komponenti,
- Transport otapala čvrste materije unutarnjom difuzijom,
- Migracija ekstrahirane topline iz vanjske površine krutine u rasutu otopinu vanjskom difuzijom,
- Kretanje ekstrakta u odnosu na krutu tvar,
- Odvajanje i ispuštanje ekstrakta i čvrste tvari.

U suvremenoj znanosti mikrovalovi se koriste u komunikaciji, radarskoj tehnici, mobilnoj telefoniji, kod satelita, mikrovalnih pećnica, u astronomiji, itd. U laboratorijske svrhe mikrovalovi su se prvenstveno koristili za sintezu organskih spojeva i ekstrakciju bioloških uzoraka (1,12,13). Primjenom mikrovalova u prehrambenoj industriji smanjuje se vrijeme trajanja pojedinih tehnoloških postupaka pri čemu se štedi energija i povećava iskorištenje, a moguće je postići i poboljšanje kvalitete pojedinih proizvoda (16).

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja homogenih smjesa tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima koja se ne miješaju. Smjesa koja se odijelili obično se potom obrađuje s otapalom kako bi iz nje izdvojile komponente od interesa (17,18). Za ekstrakciju se obično koriste različite konvencionalne metode kao što su destilacija, ekstrakcija otapalima, prešanje, itd., ali sve češće i brojne nekonvencionalne tehnike kao što su tzv. turbo ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima, pulsirajućim magnetskim poljem, super kritična fluidna ekstrakcija, ekstrakcija pod tlakom, itd (1,13).

Kod ekstrakcije razlikujemo tri glavna procesa (15):

- Desorpcija pri konstantnoj brzini supstrata s vanjske površine čestice (ravnoteža faza),
- Prijenos mase unutarfaznom difuzijom,
- Otopljena tekućina mora difundirati u ekstrahirajuće otapalo (međufazna difuzija).

1.3.1. Parametri mikrovalne ekstrakcije

Princip zagrijavanja pomoću mikrovalova temelji se na izravnom odnosu s otapalom koji je okarakteriziran ionskom vodljivošću i rotacijom dipolova (1). Kod mnogih primjena ova dva mehanizma se odvijaju istovremeno (19). Ionska vodljivost odnosi se na migraciju iona pod utjecajem promjene električnog polja, a otpor koji nastaje pri tome uzrokuje trenje. S druge strane, dipol rotacija odnosi se na poravnavanje polova molekule s električnim poljem koje se brzo mijenja. Svaki put kada se molekule otapala pokušavaju zadržati u električnoj fazi dolazi do stvaranja vibracija što rezultira nastankom topline odnosno zagrijavanjem (1).

Ukoliko se biljni materijal koristi kao uzorak koji se podvrgava mikrovalnoj ekstrakciji dolazi do isparavanja vlage koja je sadržana u biljci pod utjecajem djelovanja mikrovalova. Pri tom isparavanju dolazi do pojave pritiska na staničnu stjenku koji djeluje iz unutrašnjosti stanice, a u konačnici uzrokuje njeno istezanje i pucanje koje dovodi do izlučivanje sastojaka. Viša temperatura može uzrokovati dehidrataciju celuloze što smanjuje njenu mehaničku čvrstoću te se tako olakšava pristup spojevima unutra biljne stanice (1).

Volumen ekstrakcijskog otapala kod mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama mora biti dovoljan da osigura uronjenost biljnog materijala u cijelosti u otapalo tijekom trajanja čitavog procesa ekstrakcije. Ipak, s količinom otapala ne treba pretjerati obzirom da puno veći volumen otapala uzrokuje manju učinkovitost procesa (1).

Na sam ishod procesa ima utjecaja i veličina čestica (1). Što je veća kontaktna površina to je veća učinkovitost ekstrakcije, budući da sitnije čestice propuštaju dublje prodiranje mikrovalova, te se zbog toga uzorak prethodno homogenizira (15). Korištenje finog praha pospješuje ekstrakciju jer je omogućen bolji kontakt između materijala i otapala. Jedini nedostatak korištenja čestica sitnih dimenzija su poteškoće prilikom odvajanja biljnog materijala i otapala nakon ekstrakcije (1). Vrijeme je još jedan važan parametar, a općenito vrijedi da se povećanjem vremena ekstrakcije povećava i količina analita, iako postoji rizik od degradacije i oksidacije određenih spojeva (1,15). Najčešće ekstrakcija traje 15 do 20 minuta, ali to ovisi naravno o vrsti uzorka. Vrijeme ekstrakcije

može varirati i ovisno o dijelu biljke koji se analizira, a veliki utjecaj imaju i svojstva korištenog otapala (1).

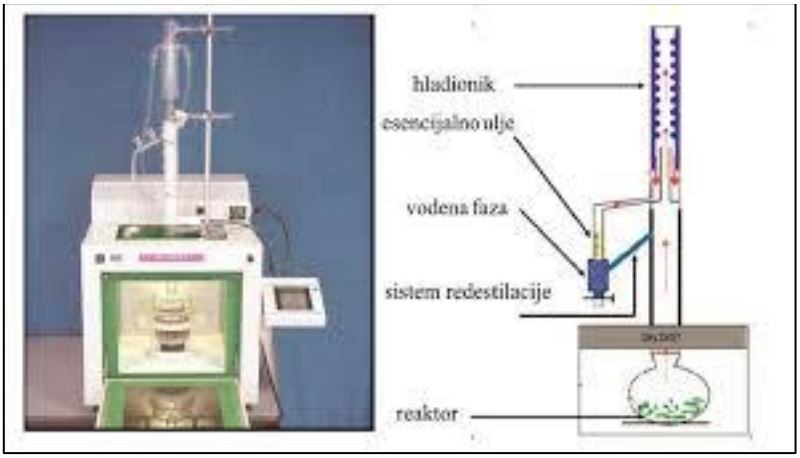
Osim veličine čestice, bitan je i izbor otapala koje bi trebalo imati visoku selektivnost prema analitu, odnosu između otapala i uzorka te o svojstvima otapala koja su određene dielektričnom konstantom. Polarna otapala poput metanola, etanola i vode su pogodan medij za zagrijavanje djelovanjem mikrovalne energije. Otapalo dakle treba biti takvo da selektivno izlučuje željeni ekstrakt (1,13,19). Povišena temperatura tijekom ekstrakcije rezultira boljim učinkom, dok kod termolabilnih spojeva je nepoželjna jer uzrokuje njihovu razgradnju. Stoga je vrlo bitno voditi računa o primijenjenoj snazi mikrovalova, jer u slučaju da je ona prevelika može doći do gubitka termolabilnih i hlapljivih spojeva (13).

Osim trajanja ekstrakcije, vrlo je važna i primijenjena snaga mikrovalova. Učinkovitost ekstrakcije je veća uslijed podizanja snage sa 30 do 150 W. Korištenje visoke snage uzrokuje rizik od toplinske razgradnje te mogućnost pojave nečistoća jer dolazi do pucanja staničnog zida pa nečistoće ulaze u otapalo (1,19).

Postoje dvije vrste sustava za mikrovalnu ekstrakciju, a to su (1,13):

- ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te
- ekstrakcija u mikrovalnim pećima pri atmosferskom tlaku.

Ekstrakcija u zatvorenim posudama koristi se kod primjene visoke ili niske temperature ekstrakcije, a tlak u posudi ovisiti o količini i vrelištu korištenog otapala. Primjerice, eterična ulja se mogu izdvojit iz biljnog materijala primjenom ove metode bez obzira na temperaturnu osjetljivost spojeva koje sadrže, ali je dokazano da će sam postupak ekstrakcije biti neučinkovit ukoliko se izolacija izvodi iz potpuno suhog ili svježeg materijala uz heksan kao ekstrakcijsko otapalo (13).



Slika 4. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (20)

1.3.2. Usporedba ekstrakcije u otvorenoj i zatvorenoj posudi

Prednosti ekstrakcije u zatvorenoj posudi su (1):

- moguć razvoj viših temperatura zbog povećanja tlaka unutar posude (viša temperatura smanjuje vrijeme trajanja procesa),
- izbjegnut je gubitak hlapljivih tvari,
- potrebne su manje količine otapala,
- izbjegnuta je opasnost od kontaminacije,
- hlapljivi spojevi koji nastaju tijekom ekstrakcije nalaze se unutar posude.

Nedostatci ekstrakcije u zatvorenoj posudi su (1):

- opasnost od visokih tlakova koji mogu izazvati eksploziju,
- ograničena količina uzorka,
- uobičajeni konstrukcijski materijali posude ne podržavaju previsoke temperature,
- nemogućnost dodatka reagensa tijekom procesa,
- posuda mora biti ohlađena prije otvaranja.

Prednosti ekstrakcije u otvorenoj posudi su (1):

- povećana sigurnost zbog rada bez tlaka,
- mogućnost dodatka reagensa tijekom procesa,
- mogućnost korištenja posuda izrađenih od različitih materijala,
- mogućnost lakog uklanjanje viška otapala,

- mogućnost obrade većih količina uzorka,
- nema potrebe za hlađenjem ili smanjenjem tlaka kod otvaranja posuda,
- niža cijena opreme,
- potpuno automatiziran rad,
- prikladniji postupak za termolabilne komponente.

Nedostatci ekstrakcije u otvorenoj posudi su (1):

- manje precizan postupak zbog potencijalnih gubitaka,
- ne može se obrađivati više uzoraka istovremeno,
- dulje vrijeme trajanja procesa.

1.3.3. Prednosti korištenja mikrovalne ekstrakcije

Jedni od osnovnih čimbenika koji mikrovalnu ekstrakciju čine pouzdanijom i boljom tehnikom od ostalih koje se koriste za ekstrakciju aktivnih sastojaka su svakako kraće vrijeme ekstrakcije, puno manji rizik od termičke degradacije prisutnih spojeva u matriksu, potreba za manjom količinom otapala, te naposljetku ekološki značaj ovog postupka kojeg odlikuje povećana prevencija od onečišćenja (1). Ova tehnika ima niz prednosti ukoliko je usporedimo s popularnom Soxhlet ekstrakcijom koja se posljednjih desetljeća znatno koristi u svrhu izolacije različitih fitokemikalija. Sam postupak ekstrakcije ovom metodom zahtjeva izrazito dugo vrijeme (8-24 h ili čak više) što u konačnici rezultira i velikim utroškom toplinske energije (1). Kod mikrovalne ekstrakcije zagrijavanje se događa na ciljani i selektivan način kod kojeg ne dolazi do gubitka energije jer se zagrijavanje događa u zatvorenom sustavu. Ovakav mehanizam značajno skraćuje vrijeme ekstrakcije (obično 30 minuta) (1).

Važno je napomenuti da kod provođena mikrovalne ekstrakcije nije ograničen odabir otapala, tako da se mogu koristit i polarna i nepolarna otapala (13).

Također, mikrovalnom ekstrakcijom moguće je izdvojiti izuzetno male količine nekih sastojaka koji su u matriksu prisutni u tragovima, primjerice pesticide ili teške metale, u uzorku od samo nekoliko miligrama (1).

1.3.4. Tehnike mikrovalne ekstrakcije

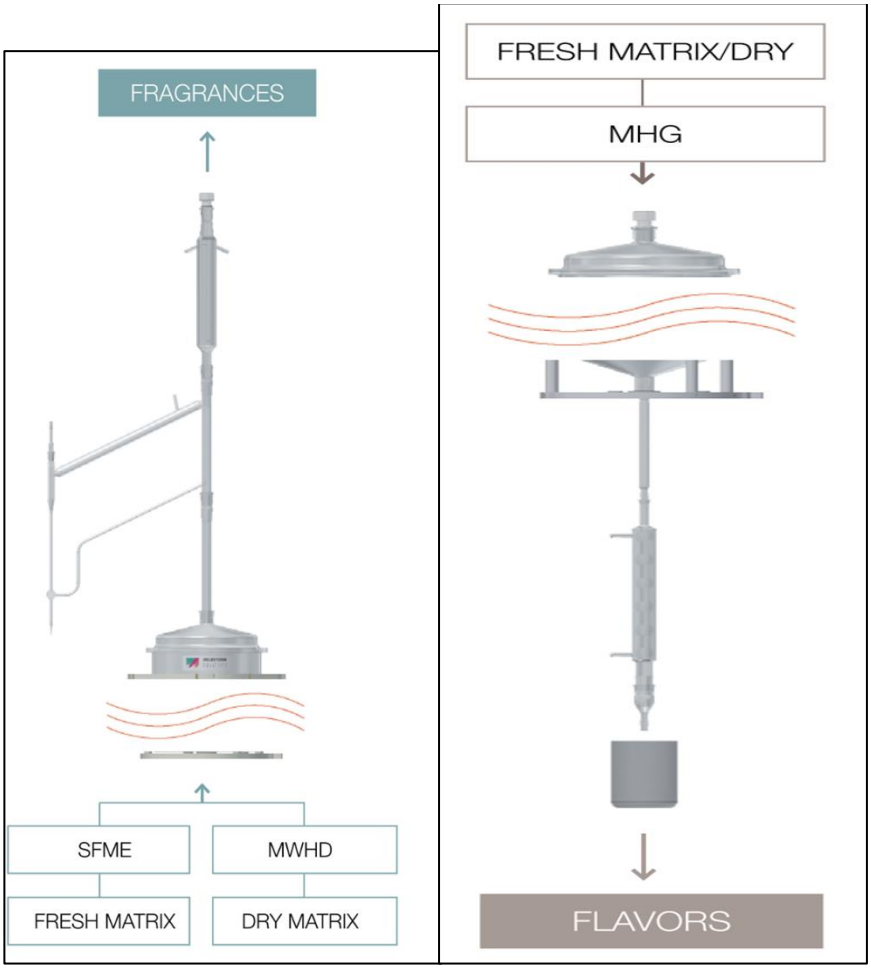
Razlikuju se tri tehnike mikrovalne ekstrakcije (slika 5), a to su (15):

- Hidrodestilacija (MWHD),
- Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (MGH),
- Ekstrakcija bez mikrovalova i otapala (SFME- solvent-free microwave-assisted extraction)

Kod MWHD koristi se klasičan princip hidrodestilacije, naime uzorak se uvodi u reaktor koji je već postavljen unutar mikrovalne peći, a rashladni sustav se nalazi izvan peći. Ova tehnika se primjenjuje za ekstrakciju hlapivih eteričnih ulja pri atmosferskom tlaku. Tijekom destilacije, uzorak je izložen kipućoj vodi te isparavanjem oslobađa svoja eterična ulja.
Nakon što se vodena para i eterična ulja kondenziraju, sakupljaju se u tikvici gdje ulje pluta po vrhu, a voda ide prema dnu tikvice te se tako može lako odvojiti (15).

MGH je kombinacija mikrovalnog grijanja i gravitacije koja se odvija pri atmosferskom tlaku. Ovo je relativno jednostavna metoda jer se biljni materijal izravno nalazi u mikrovalnom reaktoru bez dodanog otapala ili vode. Odvija se proces hidrodifuzije, odnosno ekstrakt se difundira izvan biljnog materijala i djelovanjem gravitacije ispada iz mikrovalnog reaktora kroz disk. Metoda omogućava izdvajanje prirodne supstance bez destilacije ili ekstrakcije otapalom.

SFME odvija se postavljanjem svježeg uzorka u mikrovalni reaktor bez dodanog otapala ili vode. Zagrijavanje unutar peći dovodi do oslobađanja bitnih eteričnih ulja koje isparavaju iz biljnog materijala, a rashladni sustav izvan reaktora kontinuirano kondenzira destilate, dok se eterična ulja mogu sakupljati sa vrha uređaja (15).

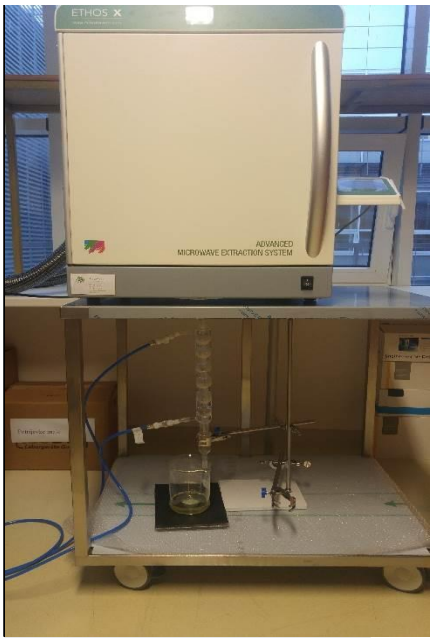


Slika 5. Prikaz tehnika mikrovalne ekstrakcije (15)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U ovom radu korišteni su komercijalno dostupni biljni uzorci-brokula i kineska brokula. Uzorci brokula su bili usitnjeni i postupku MAE podvrgnuto je 150 g od oba uzorka u uređaju prikazanom na slici 6.



a) **b)**

Slika 6. Korišteni uređaj za mikrovalnu ekstrakciju Ethos X (Milestone Srl, Italy); a) dio aparature za izolaciju eteričnih ulja, b) dio aparature za hvatanje aroma



a) b)

Slika 7. Uzorci usitnjene kineske brokule (a) i brokule (b) prije mikrovalne ekstrakcije

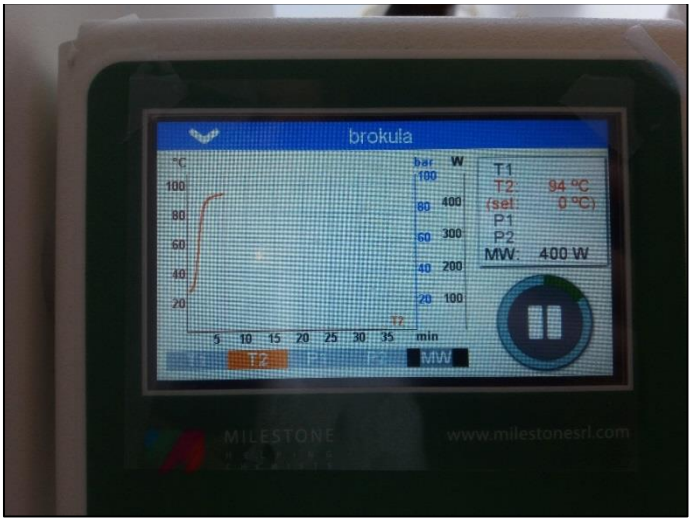


Slika 8. Uzorak brokule nakon mikrovalne ekstrakcije

2.2. Metoda mikrovalne ekstrakcije

U svrhu izolacije eteričnog ulja iz biljnog materijala korištene su dvije metode destilacija i ekstrakcija pod utjecajem mikrovalova. Gornji dio aparature prikazan na slici 6. predstavlja sustav za destilaciju (engl. *fragrance*) kojim se prikuplja eterično ulje. Kada se aparatura sastavi s donje strane mikrovalne pećnice, riječ je o metodi mikrovalne ekstrakcije čiji konačni izolat se naziva aromom (engl. *flavour*).

Prilikom izolacije eteričnog ulja, postavljeni su sljedeći parametri, snaga mikrovalova 400 W i vrijeme trajanja 35 minuta. Usitnjeni biljni materijal je stavljen u stakleni reaktor koji se nalazi u mikrovalnoj pećnici, a potom se sastavlja ostatak gornjeg sustava, prvotno sustav za refluks i potom hladilo. Kada je pod utjecajem mikrovalnog zračenja postignuta temperatura od 94°C, hlapljive komponente isparavaju te se dolaskom u hladilo kondenziraju, a dobiveno eterično ulje se skuplja u bočnoj okomitoj cijevi ispunjenoj destiliranom vodom. Kada su prinosi eteričnog ulja niski, dodaje se pentan u kojem se otapaju komponente eteričnog ulja kako bi se povećalo iskorištenje i iste koncentrirale. Naposljetku, odvojeni izolat se suši dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata i prebacuje u prethodno izvaganu bočicu kako bi mu se odredila masa. Uzorci se čuvaju u zamrzivaču na -19°C do analize.



Slika 9. Prikaz postavljenih parametara ekstrakcije na uređaju za mikrovalnu ekstrakciju

Isti biljni materijal korišten je i u svrhu mikrovalne ekstrakcije. U ovom slučaju je riječ o sastavljanju aparature s donje strane mikrovalne pećnice, a postavljeni su isti uvjeti kao i kod mikrovalne destilacije. Biljni materijal je stavljen u stakleni reaktor s otvorom na dnu posude na koji se spaja vodeno hladilo. Mikrovalno zračenje zagrijava vodu prisutnu u biljnim stanicama te pod utjecajem gravitacijske sile, na dnu u staklenoj posudi se skuplja ekstrakt. Kako bi se izolirali hlapljivi spojevi, nakon mikrovalne ekstrakcije pristupa se ekstrakciji tekuće-tekuće s diklormetanom u kojem su spojevi od značaja topljivi.

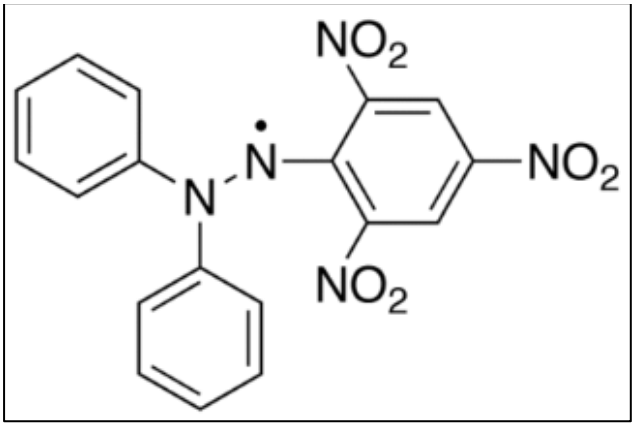
Ekstrakcija se vrši u lijevku za odijeljivanje, dva puta po 10 mL diklormetana te se organski slojevi združe, a zaostala voda se ukloni dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata. Sadržaj se ponovno prenose u prethodno izvaganu bočicu i čuva u zamrzivaču na -19°C do analize.

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata

2.3.1. DPPH metoda

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH) je stabilni slobodni radikal, koji zbog svog nesparenog elektrona apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm (21). To je jedna od najkorištenijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti, a sam mehanizam temelji se na doniranju atoma vodika radikalu, koji će se pri tome reducirati te će doći do nastajanja DPPHH i radikal antioksidansa (22).

DPPH• + AH DPPH-H + A•



Slika 10. DPPH radikal (23)

Reagensi:

- *OTOPINA DPPH RADIKALA*: u 50 ml etanola otopi se mala količina DPPH te se dobije ljubičasto obojenje. Vrši se razrjeđivanje otopine DPPH etanolom dok se ne postigne absorbancija 1,2

Postupak određivanja:

U kivetu se doda 1 mL otopine DPPH reagensa te se u nju doda i 25 µL uzorka i očita početna apsorbancija reagensa ($A_{C(0)}$). Zatim mjerimo absorbanciju pri 517 nm u različitim vremenskim intervalima te je uspoređujemo s početnom otopinom reagensa ($A_{C(0)}$).

Postupak se radi u tri ponavljanja.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema sljedećem izrazu:

$$\textbf{Inhibicija (\%)} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

$\mathbf{A_{C(0)}}$ - absorbancija otopine DPPH radikala kod vremena t=0 minuta

$\mathbf{A_{A(t)}}$ - absorbancija reakcijske smjese nakon određenog vremena t

2.3.2. Briggs-Rauscher oscilacijska metoda

Temelji se na praćenju vremena inhibicije oscilacija u reakciji nakon dodatka antioksidansa (uzorka) (22). Miješenjem tri bezbojne otopine pokreće se oscilirajuća reakcija koja se očituje promjenom boje iz bezbojne preko žute boje, te naposljetku do plave (24).

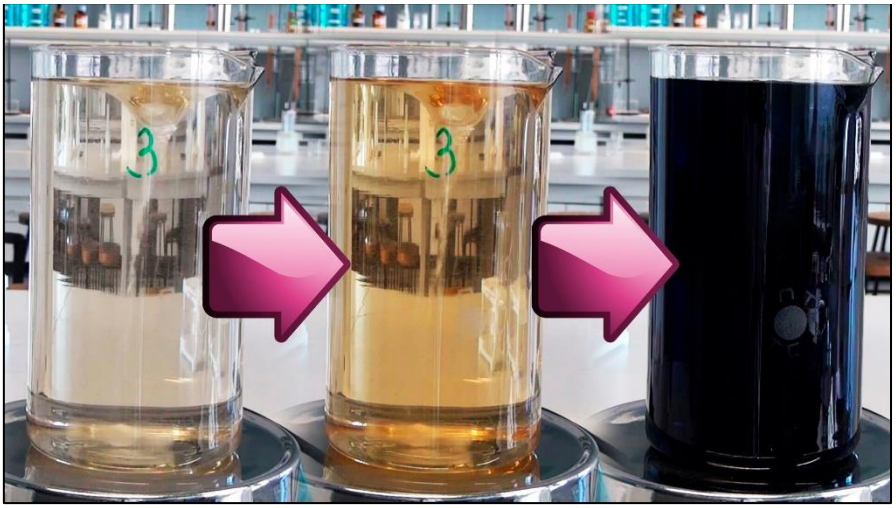
Oscilacije se prekidaju prilikom reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom ($HOO^{\bullet}$). Vrijeme inhibicije je u linearnoj ovisnosti s koncentracijom dodanog uzorka, kao i njegovoj antioksidacijskoj učinkovitosti (22).

Reagensi:

- *OTOPINA A*: 8,56 g kalijevog jodata otopi se u 100 mL destilirane vode i 0,90 ml H_2SO_4 (96%). Otopina se nadopuni destiliranom vodom do oznake 200 mL.
- *OTOPINA C*: U 100 mL destilirane vode otopi se 3,122 g malonske kiseline i 0,676 g manganova sulfata. U vodi se otopi 0,06 g škroba uz kuhanje zatim se prelije u tikvicu s otopinom kiseline i sulfata te nadopuni do konačnog volumena od 200 mL dodatkom destilirane vode.
- *OTOPINA VODIKOVOG PEROKSIDA, w (H_2O_2)= 15%* : vodikov peroksid (30%) pomiješa se s vodom u omjeru 1:1
- *GALNA KISELINA, c (galne kiseline)= 2000 mg/l:* 100 mg galne kiseline otopi se u 50 mL destilirane vode

Postupak određivanja:

1 mL otopine A i 1 mL otopine C otpipetira se u čašu te se doda 1 mL otopine peroksida kako bi se reakcije oscilacije pokrenule (slika 10). Zatim se u smjesu dodaje 10 μL uzorka što zaustavlja reakcije oscilacije i uzrokuje obezbojenje otopine. Vrijeme inhibicije je vrijeme zaustavljanja oscilacija, a razmjerno je koncentraciji dodanog antioksidansa (22).



Slika 11. Prikaz promjene boja u Briggs-Rauscher oscilacijskom sustavu (25)

2.3.3. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda predstavlja sposobnost antioksidansa da donira elektron pri čemu se sol željeza Fe(III)$(TPTZ)_2Cl_3$ koristi kao oksidans. Dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa Fe^{III}–TPTZ u plavi Fe^{II} oblik, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intezitet nastale plave boje pri 593 nm (22,26). Ovu metodu karakterizira jednostavnost, brzina i niska cijena jer sam test nije skup i ne zahtijeva nikakvu specijalnu opremu, a jedini nedostatak je što će kod uzoraka koji imaju niži standardni potencijal od redoks para (Fe^{III}-TPTZ)/(Fe^{II}-TPTZ) doći do redukcije kompleksa i tako će se povećati FRAP vrijednost uzorka (26).

Reagensi:

- *ACETATNI PUFER*: 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL glacijalne octene kiseline se otopi u vodi do volumena od 1 L.
- *OTOPINA KLOROVODIČNE KISELINE (HCl):* 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline ulije se u odmjernu tikvicu od 1 L i razrijedi destiliranom vodom do oznake.
- *OTOPINA 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ) U 40 mmol/L HCl*: 159,4 mg TPTZ otopi se u 50 mL 40 mmol/L otopine klorovodične kiseline.
- *OTOPINA $FeCl_3$*: 551,6 mg željezova (III) klorida otopi se u 100 mL destilirane vode.
- *FRAP REAGENS*: pomiješa se 10 mL acetatnog pufera, 1 mL otopine TPTZ reagensa i 1 mL otopine $FeCl_3$.

Postupak određivanja:

1 mL otopine FRAP reagensa otpipetira se u kivetu, te se očita vrijednost A_o (početna vrijednost absorbancije pri 593 nm). Zatim se u reagens doda 33 µL uzorka koji uzrokuje obojenje otopine u plavo. Nakon 4 minute otopini se ponovno izmjeri apsorbancija (A_4). Razlika između konačne vrijednosti absorbancije (A_4) i vrijednosti absorbancije očitane prije dodatka uzorka (A_0) predstavljaju vrijednost promjene apsorbancije iz koje se računa FRAP vrijednost uzorka.

Rezultati FRAP vrijednosti su izraženi preko standarda- Fe (II) i izračunati preko jednadžbe baždarnog pravca (y=0,0007x+0,0037) koja je dobivena testiranjem otopina Fe(II) različitih koncentracija (25-1000 µM).

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana je antioksidacijska aktivnost hlapljivih spojeva iz komercijalno dostupnih biljnih materijala, brokule i kineske brokule (šenona). Testirani izolati dobiveni su metodom mikrovalne ekstrakcije.

U ovom postupku izolirana su po dva izolata od svakog biljnog materijala: gornju frakciju činilo je eterično ulje (engl. *flavour*) dok su se hlapljive komponente (engl. *fragrance*) kondenzirale na dnu aparature.

A – frakcija eteričnog ulja (engl. *flavour*) kineske brokule

B – frakcija hlapljivih komponenata (engl. *fragrance*) kineske brokule

C – frakcija eteričnog ulja (engl. *flavour*) brokule

D – frakcija hlapljivih (engl. *fragrance*) komponenata brokule

Tablica 2. Masa izolata dobivena postupkom mikrovalne ekstrakcije

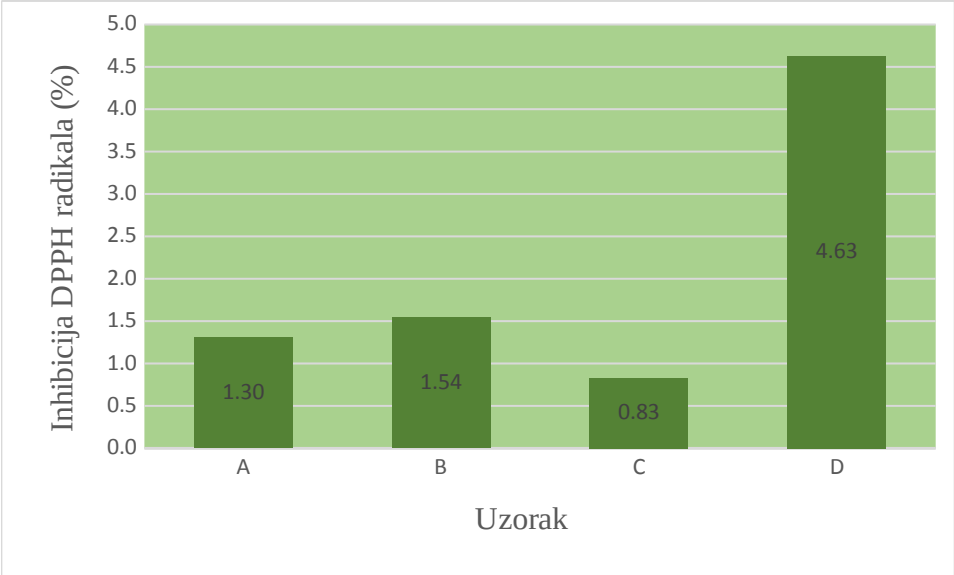
KINESKA BROKULA	BROKULA
m (A) = 2 mg	m (C) = 0,4 mg
m (B)= 2,2 mg	m (D) = 1,9 mg

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti u ovom radu korištene su tri metode: DPPH, Briggs-Rauscher metoda i FRAP metoda.

Rezultati koji su prikazani u tablicama 3-5 i na slikama 11-13 kod ispitivanja antioksidacijske aktivnosti pokazuju da ispitivani uzorci ne pokazuju značajnu antioksidacijksu aktivnost.

Tablica 3. Prikaz rezultata određivanja DPPH vrijednosti uzoraka

Uzorak	Inhibicija DPPH radikala (%)
A	1,30 ± 0,19
B	1,54 ± 0,43
C	0,83 ± 2,10
D	4,63 ± 0,36



Slika 12. Grafički prikaz rezultata određivanja DPPH vrijednosti uzoraka

Kao što je vidljivo iz tablice 3 i sa slike 12, testirani uzorci nisu pokazali značajnu sposobnost hvatanja molekula slobodnog DPPH radikala i vrijednosti inhibicije su bile između 0,82 i 4,63 %, s tim da je najbolju aktivnost pokazao uzorak D, a najlošiju uzorak C. Također se može uočiti da je i kod brokule i kod kineske broukele bolja antiradikalna aktivnost dokazana za hlapljive izolate (engl. *fragrance*), dok su uzorci eteričnih ulja (engl. *flavour*) pokazali slabije djelovanje.

Kod testiranja uzoraka Briggs-Rauscher metodom antioksidacijsku aktivnost odnosno inhibiciju oscilacijskih reakcija je pokazao samo uzorak D te se zaustavljanje oscilacija i obezbojenje otopine kod tog uzorka zabilježilo u trajanju od 1,05 minuta.

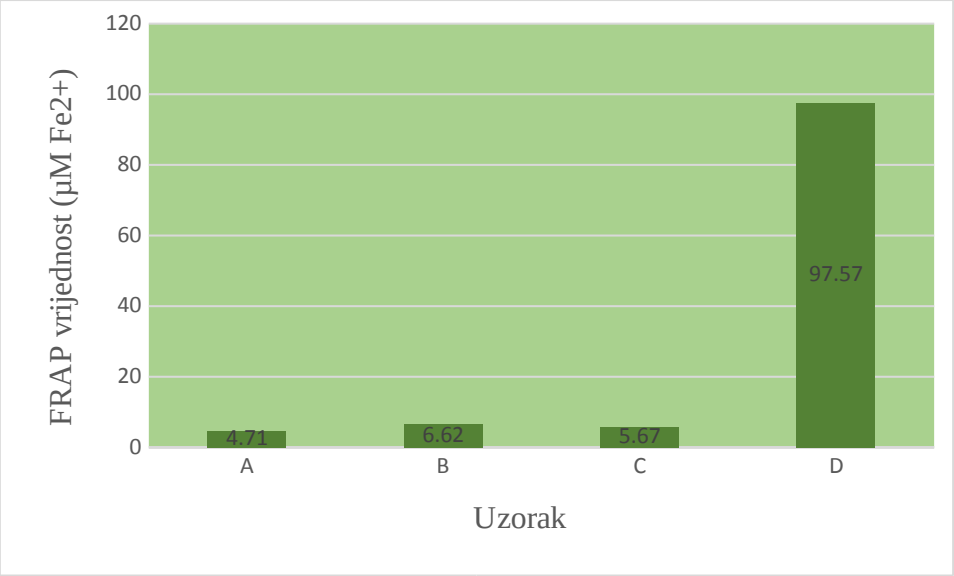
Tablica 4. Prikaz rezultata određivanja inhibicije Briggs-Rauscher oscilacijskih reakcija

Uzorak	Vrijeme inhibicije oscilacija (min)
A	-
B	-
C	-
D	1,05

Redukcijska aktivnost uzoraka je testirana metodom FRAP i rezultati su prikazani u tablici 5 i na slici 12. Iz navedenih rezultata je vidljivo da uzorci A, B i C imaju slabu redukcijsku aktivnost dok je značajnu pokazao uzorak D (97 µM Fe^{2+}). Opet se može uočiti jača aktivnost hlapljivog izolata nego li eteričnih ulja kod oba biljna materijala.

Tablica 5. Prikaz rezultata određivanja FRAP vrijednosti uzoraka

Uzorak	FRAP vrijednost (µM Fe^{2+})
A	4,71 ± 0,00
B	6,62 ± 3,60
C	5,67 ± 1,65
D	97,57 ± 2,47



Slika 13. Grafički prikaz rezultata dobivenih FRAP metodom

Uzorcima je u konačnici analiziran kemijski sastav primjenom metode plinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS), te je analizom dobiveno da je dominantni produkt razgradnje koji sadrži sumpor u svim izolatima bio dimetil trisulfid. Njegov najveći sadržaj je zabilježen u uzorku D (0,74%) koji je pokazao najbolju antioksidacijsku aktivnost primjenom korištenih metoda, pa se prisutnost ovog spoja može smatrati ključnom za antioksidacijsku aktivnost uzorka.

4. ZAKLJUČAK

- Rezultati ovog rada ukazuju na slabu antioksidacijsku aktivnost uzorka brokule i šenona što je potvrđeno primjenom svih korištenih metoda
- Najbolju aktivnost kod svih antioksidacijskih metoda je pokazao uzorak frakcije hlapljivih komponenata (engl. *fragrance)* brokule
- Kod DPPH i FRAP metode dokazana je bolja aktivnost hlapljivih izolata (engl. *fragrance*) nego li izolata eteričnog ulja (engl. *flavour*).

5. LITERATURA

1. Vivekananda M, Yogesh, Hemalath S. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. Pharmacogn Rev. 2007;1(1),7-18.
2. URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Brokula, Pristupljeno: 06.08.2018.
3. Fabek S. The Effect of Nitrogen Fertilization on Nitrate Accumulation, and the Content of Minerals and Glucosinolates in Broccoli Cultivars. Food Technol Biotechnol. 2012;50(2)183-191.
4. Fabke S. Uzgoj brokule. Glasnik zaštite bilja. 2008;3:32-37.
5. Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević M. Biološki aktivni spojevi glukozinolati i polifenoli u cvatu, listu i stabljici brokule. Glasnik zaštite bilja. 2016;5,24-29.
6. Kopjar M, Šubarić D, Piližota V. Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 2012;1(1),22-35.
7. URL: https://cdn.agroklub.com/upload/images/plant-specie/thumb/brokula1-300x300.jpg, Pristupljeno 07.08.2018.
8. Hollman P, Arts I. Flavonols, flavones and flavanols- nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric. 2002;80(7),1081-1093.
9. Toivonen PMA, Forney C. Broccoli in The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Stock. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2016.
10. URL:https://adriaticmedianethr.files.wordpress.com/2018/03/senon.jpg?quality=100&strip=all, Pristupljeno 12.08.2018.
11. URL: https://www.agroklub.com/povrcarstvo/senon-neobicna-cvjetaca/4082/, Pristupljeno: 07.08.2018.
12. Puharić I. Mikrovalovi i njihove primjene. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2016.
13. Blekić M, Ražek Jambrak A, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croat J Food Sci Technol. 2011;3(1),32-47.

14. Chemat S, Lagha A, Ait Amar H, Chemat F. Ultrasound assisted microwave digestion. Ultrason Sonochem. 2004;11(1):5-8.

15. Ethos X application reports. Microwave Green Extraction of Natural Products, 2017. str.1-4.

16. Taboršak N, Anić N, Anić K. Primjena toplinske energije mikrovalova u prehrambenoj industriji. Mljekarstvo. 33(6)174-177.

17. URL:http://www.pbf.unizg.hr/content/download/2617/25108/version/1/file/EKSTRAKCIJA.pdf, Pristupljeno 08.08.2018.

18. Generalić, E. "Ekstrakcija." Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. 29 Aug. 2017. KTF-Split. 25 Sep. 2018. <https://glossary.periodni.com>.

19. Thomas M, Destandau E, Elfakir C. Microwave-Assisted Extration, Chapter in RSC Green Chemistry. 2013.

20. URL:http://esava.info/wpcontent/uploads/2017/02/Greti%C4%87_Ultrazvu%C4%8Dna_Mikrovalna_Tla%C4%8Dna-ekstrakcija-otapalom.pdf, Pristupljeno 12.08.2018.

21. Živko T. Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2012.

22. Generalić I. Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2011.

23. URL:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/53/D492045.png/440px-D492045.png, Pristupljeno 15.08.2018.

24. URL:https://projects.ncsu.edu/project/chemistrydemos/Kinetics/BriggsRauscher.pdf, Pristupljeno 15.08.2018.

25. URL: https://i.ytimg.com/vi/WpBwlSn1XPQ/maxresdefault.jpg, Pristupljeno 15.08.2018.

26. Mandić V. Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2017.