

Izolacija bioaktivnih komponenti iz cvijeta i lista trnine

Fadić, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:700706>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

KARLO FADIĆ
638/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ CVIJETA I
LISTA TRNINE**

ZAHVALA

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasmini Lapić na strpljenju, pristupačnosti i izdvojenom vremenu.

Ovaj diplomski rad sastavni je dio istraživanja na području bioaktivnih komponenata u biljnim ekstraktima, koja se provode u okviru HRZZ projekta: Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF), koji se izvode i u Laboratoriju za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Rad je izrađen u Laboratoriju za Organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Lapić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ CVIJETA I LISTA TRNINE

Karlo Fadić, 638/PI

Sažetak: Trnina (*Prunus spinosa* L.) pripada rodu *Prunus*, podporodici *Prunoideae*, porodici *Rosaceae*. Cvijet i list trnine sadrže značajan udio bioaktivnih spojeva među kojima značajno mjesto zauzimaju fenoli. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio iz uzoraka cvijeta i lista trnine izolirati bioaktivne komponente klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat uz 70%-tni etanol, odnosno metanol kao otapalo. Dominantne komponente karakterizirane su pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) i FTIR–spektroskopije, pri čemu je dokazana prisutnost fenolnih spojeva, osobito derivata hidroksicimetnih kiselina i flavonol glikozida. Spektrofotometrijskom metodom u biljnim ekstraktima određena je koncentracije ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola, a kvatifikacija je provedena visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom pri čemu je dokazana najveća koncentracija flavonol glikozida, zatim proantocijanidina, a najmanja derivata hidroksicimetnih kiselina.

Ključne riječi: trnina, bioaktivne komponente, ekstrakcija, ukupni fenoli

Rad sadrži: 48 stranica, 13 slika, 9 tablica, 38 literaturnih navoda, 0 priloga

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. Jasmina Lapić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof .dr. sc. Senka Djaković
2. Doc. dr. sc. Jasmina Lapić
3. Prof. dr. sc. Verica Dragović–Uzelac
4. Doc. dr .sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

Datum obrane: 14. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM BLACKTHORN FLOWERS AND LEAF

Karlo Fadić, 638/PI

Abstract: Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) is a species of *Prunus*, genus of *Prunoideae*, family of *Rosaceae*. Flower and leaf of blackthorn contain a significant proportion of bioactive compounds, among them significant place have phenols. The purpose of this study was isolation of bioactive components from flower and leaf samples of blackthorn refluxed with 70% ethanol and methanol. Main components were identified by thin layer chromatography (TLC) and FTIR-spectroscopy and the presence of the phenolic compounds was shown, particularly hydroxycinnamic acid and flavonol glycosides derivatives. Extracts obtained by classical methods of extraction were used for spectrophotometric determination of the concentration of total phenolics, hydroxycinnamic acids and flavonols. High performance liquid chromatography is performed for both methods and showed a higher concentration of flavonol glycosides, then proanthocyanidins, and a lower of phenolic acid from which the most common were hydroxycinnamic acid, chlorogenic and *p*-coumaric acid derivatives.

Keywords: *blackthorn, bioactive components, isolation, total phenolics*

Thesis contains: 48 pages, 13 figures, 9 tables, 38 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Jasmina Lapić, Assistant Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Senka Djaković*, Associate Professor
2. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor
3. Ph.D. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Assistant professor

Thesis defended: 14th of July 2016

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TRNINA.....	2
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke.....	2
2.1.2. Kemijski sastav	3
2.1.3. Ljekovito djelovanje i primjena	3
2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE HRANE.....	4
2.2.1. Fenolne kiseline.....	5
2.2.2. Flavonoidi.....	6
2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	8
2.3.1. KLASIČNA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA	8
2.3.2. IR-spektroskopija	9
2.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali	11
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata	13
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	19
3.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	22
3.2.4. Određivanje fenolnih spojeva HPLC-om	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Uvod.....	29
4.2. Izolacija bioaktivnih komponenti.....	30
4.2.1. Metoda A: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo.....	30
4.2.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat u etanol kao otapalo.....	31
4.3. Određivanje ukupnih fenola	32
4.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	33
4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	36
4.5. IR spektroskopija.....	38
4.5.1. IR-spektri biljnih ekstrakata dobiveni metodom A	38
4.5.2. IR-spektri biljnih ekstrakata dobiveni metodom B	41
5. ZAKLJUČAK	44

6. LITERATURA.....	45
--------------------	----

1. UVOD

Koristeći bilje u svakodnevnoj prehrani, čovjek je postupno uočavao njihov ljekoviti učinak. Zbog takvih empirijskih spoznaja, koje su s vremenom i znanstveno potvrđene, biljke imaju vrlo široku primjenu u svim aspektima ljudskog života.

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samo jedna od tisuću različitih vrsta samoniklog bilja koje su široko rasprostranjene u Republici Hrvatskoj, te se koristi u prehrambene svrhe. Prednost uporabe trnine i ostalog samoniklog bilja u prehrambene svrhe je u tome što raste u prirodnim i optimalnim uvjetima bez neposredne ljudske intervencije. Plodovi trnine sadrže značajnu količinu biološki aktivnih spojeva, posebno vitamina, fenolnih spojeva te minerala. Uz tanine, koji su nosioci trpkog okusa i predstavljaju značajnu količinu fenolnih spojeva, u trnini su prisutne i hidroksicimetne kiseline, flavan-3-oli i flavon glikozidi [1]. Cvijet i list trnine sadrže značajne koncentracije flavonoida, od kojih su najzastupljeniji flavonoli: kamferol, kvercetin i njihovi glikozidi, te fenolnih kiselina, dok su u cvijetu prisutni i proantocijanidini tipa A [2].

Cilj ovog istraživanja je bio izolirati i karakterizirati bioaktivne komponente iz osušenog cvijeta i lista trnine primjenom klasične metode ekstrakcije grijanjem u povrat uz 70 %-tni etanol odnosno metanol kao otapalo, odrediti koncentraciju ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetne kiseline spektrofotometrijskom metodom u dobivenim biljnim ekstraktima, te odrediti sastav i udio pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom sofisticirane metode, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA

Trnina (*Prunus spinosa* L.) pripada rodu *Prunus*, podporodica *Prunoideae*, te porodici *Rosaceae* [3]. Botanički gledano, postoji samo jedna vrsta biljke *Prunus spinosa*, no pojedini grmovi pokazuju znakove hibridizacije s ostalim vrstama divljih šljiva [4].

2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

Sinonimi za trninu su crna trnina, crni trn, divlje šljivice, trnavka, trnula, trnjina, trnjula, mrki trn, kukinj. Biljka je grm, visok od 1 do 3 metra kojem su mladi izdanci baršunasto dlakavi, a prostrane grane završavaju oštrim trnjem. Kora je crno-smeđe boje. Listovi su s peteljkom ovalnog oblika i nazubljeni, s donje strane u početku razvoja oskudno dlakavi, a kasnije goli. Bijeli cvjetovi pojavljuju se neposredno prije listanja tako da se jedva zamjećuju grane, imaju po pet bijelih latica, a pojavljuju se pojedinačno ili po dva-tri zajedno. Plodovi su koštunice okrugla oblika veličine do 1,5 cm, tamnoplave boje [5]. Vrlo se čvrsto drže grana pa na njima ostaju do proljeća. Meso im je zelenkasto, trpko i kiselo, te se teško odvaja od koštice, a okus kiseo i trpak, te steže. Miris i okus najbližnji su gorkom bademu. Trnina cvjeta od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasno ljeto i jesen te se ponekad mogu naći na biljci i tijekom zimskog razdoblja. Cvjeta najranije među domaćim grmljem.



Slika 1. Cvijet i plod trnine [6].

U Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena, većinom uz rubove šuma, na neplodnom tlu i pašnjacima, najčešće na vapnenačkom tlu. Raste u većini dijelova južno-srednje Europe, osim na donjoj polovici Pirinejskog poluotoka, a širi se sjeverno sve do južnog dijela Skandinavskog poluotoka. Istočno doseže Malu Aziju, Kavkaz i Kaspijsko jezero. Može se pronaći i na izoliranim područjima u Tunisu i Alžiru, a uvezena je i lokalno uzgajana i u Sjevernoj Americi te na Novom Zelandu [6].

2.1.2. Kemijski sastav

Cvijet i list trnine sadrži značajne koncentracije flavonoida, od kojih koji su najzastupljeniji derivati flavonola (kamferol, kvercetin, te njihovi glikozidi sa arabinozom, ramnozom i ksilozom). Cvijet sadrži i proantocijanidine tipa A, a u listovima se mogu pronaći karotenoidi i norizoprenoidi, dok oba dijela biljke sadrže fenolne kiseline [7].

Osim flavonoida i fenolnih kiselina cvjetovi i listovi sadrže sterole i triterpene. U cvjetovima su prisutni i terpenoidni alkoholi α - i β -amirini, od kojih je više zastupljen β -amirin. Iz smjese triterpenskih kiselina identificirane su oleinska i ursolična. Od sterola, u najvećoj koncentraciji identificiran je β -sitosterol, a u malim količinama potvrđena je i prisutnost γ -sitosterola, stigmasterola i sterol glikozida.

Kod plodova trnine, prisutne su značajne količine fenolnih antioksidansa, od kojih se po koncentraciji najviše ističu flavonol glikozidi (kvercetin, kamferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiselina), derivati kumarina, antocijani te proantocijanidini tipa A [8].

2.1.3. Ljekovito djelovanje i primjena

Premda je trnina samonikla i nekultivirana biljka, gotovo svi njeni dijelovi (plod, list, cvijet i kora) imaju primjenu u medicini i prehrambenoj tehnologiji. Zreli plodovi većinom se koriste za izradu džemova, želea, vina, octa i destiliranih alkoholnih pića zbog specifičnog astringentnog svojstva. Plodovi se mogu koristiti kao vrijedan izvor prirodnih antioksidansa zbog visoke koncentracije askorbinske i fenolnih kiselina. Cvjetovi, latice i listovi uglavnom se primjenjuju u medicinske svrhe za pripremu čajeva, sirupa, svježih sokova ili tinktura koje smanjuju simptome anemije i dijareje, te drugih gastrointestinalnih tegoba [6].

Antiseptičko djelovanje plodova biljke se temelji na prisutnosti tanina (polihidroksiflavan-3-ola) pa se može koristiti i kod upala sluznice probavnog trakta [9]. Biljne infuzije moguće je koristiti kao blagi laksativ u liječenju opstipacije i konstipacije. Zbog stimulirajućeg učinka na metabolizam, plodovi se mogu koristiti za uklanjanje tegoba u liječenju dermatitisa, herpesa, alergije, prehlade, bubrežnih kamenaca i poremećaja mokraćnog mjehura [10].

Kemoprotektivan učinak bioaktivnih komponenata trnine povezuje se sa njihovom antioksidativnom aktivnošću. Klorogenska kiselina, te kvercetin i njegovi derivati, kao i proantocijanidini tipa A vrlo su učinkoviti antioksidansi. Flavan-3-oli su zastupljeni u jako niskim koncentracijama u trnini, ali također imaju niz pozitivnih učinaka na zdravlje [11]. Antocijani, spojevi koji pridonose boji plodova trnine, također imaju pozitivne terapijske učinke uglavnom zbog njihovih jakih antioksidativnih svojstava.

2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE

Bioaktivne komponente su esencijalni ili neesencijalni spojevi (npr. vitamini, fenoli) koji se pojavljuju u prirodi, dio su prehrambenog lanca, a pokazuju potencijalno pozitivnog djelovanje na zdravlje čovjeka [19]. Esencijalne bioaktivne komponente potrebno je unositi hranom, za razliku od sekundarnih biljnih metabolita za koje ne postoje preporuke jer ne može doći do njihovog nedostatka u organizmu čovjeka. Najveća skupina bioaktivnih komponenti prisutnih u cvijetu i listu trnine su upravo fenolni spojevi.

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama, poznato ih je oko 8000 te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi [20]. Međusobno se razlikuju po strukturi jer osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina [17]. U biljnom tkivu se obično pojavljuju vezani na druge molekule, glikozidnom vezom s ugljikohidratima, ali i sa sulfatnim ili acetilnim skupinama [21]. Iako su fenoli prisutni u biljnom tkivu, većina njih ipak nastaje biosintetskim putem iz aminokiselina fenilalanina ili tirozina. Ključni korak u tom biosintetskom putu je uvođenje jedne ili više hidroksilnih skupina u fenilni prsten te nastaje cijeli niz fenolnih spojeva: cimetne kiseline (C6-C3), benzojeve (C6-C1), flavonoidi (C6-C3-C6), proantocijanidi [(C6-C3-C6)_n], kumarini (C6-C3), stilbeni (C6-C2-C6), lignani (C6-C3-C3-C6) i lignini [(C6-C3)_n] [22].

Zahvaljujući specifičnoj strukturi molekule, fenolni spojevi pokazuju snažan potencijal interakcije s proteinima uslijed čega mogu inhibirati neke enzime (lipoksigenaze, ciklooksigenaze i ksantin oksidaze i dr.) te djelovati kao antioksidansi [23].

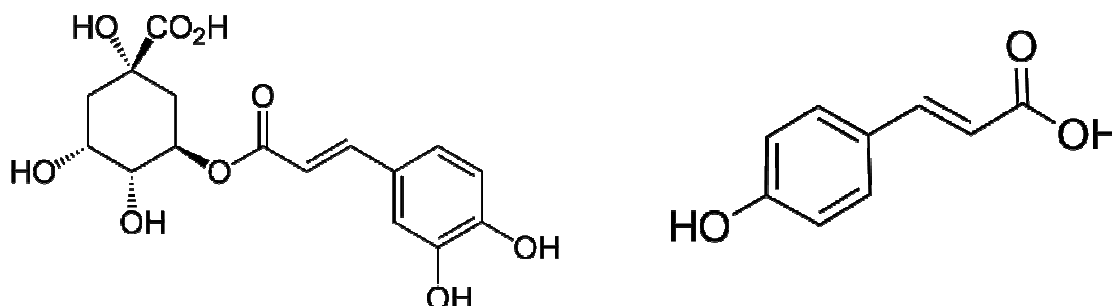
Zbog brojnih razloga, uključujući strukturne raznolikosti, nedostatak standardiziranih metoda i varijacije sadržaja u određenoj namirnici, vrlo je teško procijeniti dnevni unos fenola, a iznosi u prosjeku 1000 mg/dan. Glavni prehrambeni izvor fenola su voće i pića (voćni sokovi, vino, čaj, kava, pivo, itd.), dok povrće, mahunarke i žitarice također mogu doprinijeti dnevnom unosu, ali u manjoj mjeri [24]. U cvijetu i listu trnine uglavnom se nalaze više koncentracije flavonol glikozida, proantocijanidina, te manje koncentracije hidroksicimetnih kiselina.

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine oko trećinu fenolnih spojeva prisutnih u biljkama, a prisutne su u slobodnom ili vezanom obliku. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri [12].

Spadaju u neflavonoidne polifenolne spojeve koji se s obzirom na strukturu mogu podijeliti na dva glavna razreda: derivate hidroksibenzojeve (C1-C6) i hidroksicimetne (C3-C6) kiseline [13]. U derivate hidroksibenzojeve kiseline pripada galna, *p*-hidroksibenzojeva, siriginska i vanilinska kiselina, a u derivate hidroksicimetne *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina.

U cvijetu trnine u većim koncentracijama mogu se naći klorogenska i *p*-kumarinska kiselina (ester kafeinske i kininske kiseline) (Slika 2).

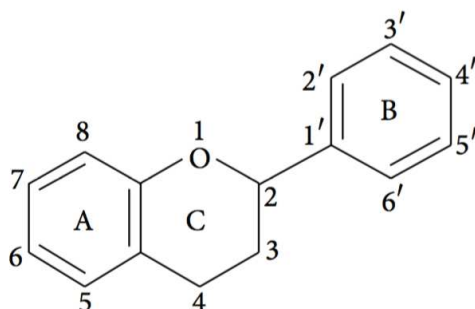


Slika 2. Struktura klorogenske i *p*-kumarinske kiseline.

2.2.2. Flavonoidi

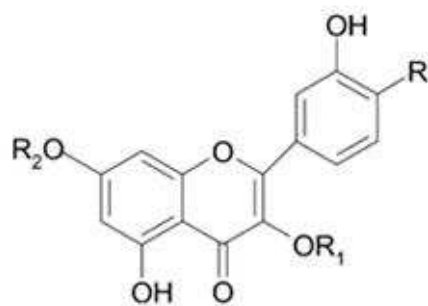
Flavonoidi su spojevi čiju osnovnu strukturu čini difenilpropanski kostur $C_{15}(C_6-C_3-C_6)$ u kojem su dva benzenska prstena (**A** i **B**) povezana piranskim prstenom **C** koji sadrži kisik. Različiti razredi flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i supstituciji **C** prstena, dok se pojedinačni spojevi u razredu razlikuju prema supstituciji prstenova **A** i **B** [14].

Prema nomenklaturi, osnova strukture flavonoida je kemijski spoj difenilpropan iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem **C** prstena nastaje flavan, a iz njega se izvodi određeni broj osnovnih struktura flavonoida: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni. Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana. Navedeni spojevi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela. Kod flavonoida također postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini) [15].



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida [15].

Flavonoli su najzastupljenija podgrupa flavonoidnih spojeva, prisutni su u voću, naročito citrusima (nobiletin, tangeretin). Najčešći flavonoli su miricetin, izomiricetin, kvercetin i kamferol, uglavnom su prisutni u obliku O-glikozida, te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom [16]. Listovi i cvjetovi trnine sadrže značajne koncentracije kamferola, kvercetina te njihovih glikozida. Cvjetovi sadržavaju flavonoide najviše u formi monosaharida vezanih na aglikon, uglavnom kamferol i kvercetin 3-O-arabinozide [7]. Također, potvrđena je prisutnost kamferola i kvercetina u obliku kamferol- i kvercetin 3-O-arabinofuranozida te kamferol 3-O-ramnopiranozida [2]. Listovi su bogati disaharidima vezanim na aglikon, uglavnom kamferol 3,7-diramnozidom [7] (Slika 4, tablica 1).

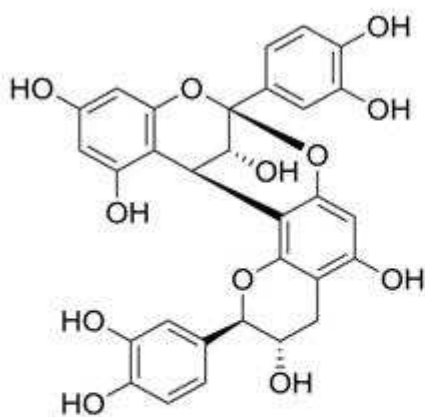


Flavonol	R	R1	R2
Kampferol	H	H	H
Kvercetin	OH	H	H
Kampferol 3- <i>O</i> -arabinozid	H	Arabinoza	H
Kvercetin 3- <i>O</i> -arabinozid	OH	Arabinoza	H
Kampferol 3,7-diramnozid	H	Ramnoza	Ramnoza

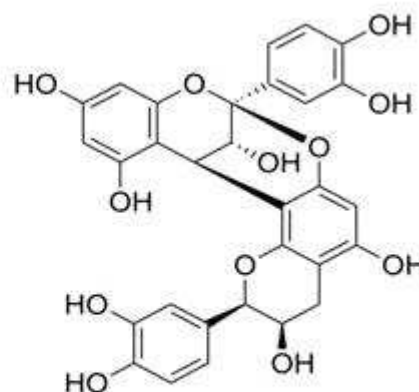
Slika 4./Tablica 1. Struktura nekih flavonol glikozida prisutnih u trnini [7].

Flavanoli koje nazivamo i flavan-3-oli, poznati su kao katehini. Kompleksna su podgrupa flavonoida prisutnih od jednostavnih monomera ((+)-katehin) i njihovih izomera ((-)-epikatehin), do oligomera i polimera kao što su proantocijanidin, poznatiji kao kondenzirani tanini. Flavanole u prirodi vrlo rijetko srećemo slobodne, najčešće se nalaze u glikozidnom ili esterificiranom obliku [17].

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su skupina flavonoida koji se sastoje od flavanolskih podjedinica povezanih u dimere, trimere ili oligomere s (-)-epikatehinom i (+)-katehinom kao glavnim podjedinicama [18].



Proantocijanidin A1
epikatehin-(2 β →7,4 β →8)-katehin
dimer



Proantocijanidin A2
epikatehin-(2 β →7,4 β →8)-epikatehin

Slika 5. Strukture glavnih proantocijanidina u trnini [18].

Monomeri oligomernih proantocijanidina tipa A povezani su C2-O-C7 ili C2-O-C5 interflavanskom vezom, za razliku od procijanidina tipa B gdje je riječ o C4-C6 ili C4-C8 vezi [14]. Cvjetovi trnine u većim koncentracijama sadržavaju uglavnom procijanidine tipa A1 i A2 (Slika 5) [2].

2.3. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je prvi važan korak izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala prije daljnje upotrebe ili analize, a za svaku biljnu vrstu potrebno je optimizirati uvjete ekstrakcije. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Fenolni spojevi se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli, ali najčešće u stanju u kojem se koristi za upotrebu. Odabirom prikladne metode ekstrakcije fenolnih spojeva treba voditi računa o topljivosti spojeva koje želimo ekstrahirati, te odabrati najpogodnije otapalo. Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija super kritičnim plinovima su najčešće upotrebljavane tehnike izolacije fenolnih spojeva. U literaturi je opisan cijeli niz istraživanja izolacije i analize fenolnih spojeva iz različitih biljnih vrsta [25].

2.3.1. Klasična ekstrakcija otapalima

Ekstrakcija različitim vrstama otapala je najčešće upotrebljavana tehnika pripreme ekstrakta iz biljnog materijala zbog njezine efikasnosti i široke primjenjivosti. Udio ekstrahiranih fenolnih spojeva ovisi o kemijskoj strukturi spojeva koji se ekstrahiraju iz biljnog materijala, polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, te o fizikalno-kemijskim karakteristikama ekstrahiranog uzorka [25].

U klasičnoj ekstrakciji otapalima najčešće upotrebljavana otapala su metanol i etanol s različitim udjelom vode. Prisutnost i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Primjenom metanola kao otapala moguće je ekstrahirati oko 20% više fenolnih spojeva nego etanolom [27], a metanol je učinkovitiji i za ekstrakciju fenolnih spojeva nižih molekularnih masa. Fenolne kiseline koje su prisutne u netopljivom obliku, vezane kao esteri ili glikozidni kompleksi, te se njihova ekstrakcija vrlo često osim primjenom organskih otapala provodi i u kombinaciji s kiselim ili baznim hidrolizom. Dodatkom baze ovisi o kemijskoj strukturi

spojeva koji se ekstrahiraju iz biljnog materijala i/ili kiseline dovodi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina [28]. U industrijskim razmjerima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, zbog manje toksičnosti [26]. Prema US Food and Drug Administration za proizvodnju biljnih ekstrakata preporuča se upotreba ekološki prihvatljivih i manje toksičnih organskih otapala kao što su etanol, *n*-butanol i izopropanol [28].

Klasični postupci ekstrakcije (maceracija, Soxhlet) zahtijevaju duže vrijeme ekstrakcije uz veće utroške otapala pa se sve više koriste novije metode ekstrakcije kao što je ekstrakcija super kritičnim plinovima, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, te ekstrakcija primjenom visokog tlaka kod kojih je vrijeme znatno skraćeno [27].

2.3.2. IR-spektroskopija

Zračenje u infracrvenom području odgovara energiji koja izaziva molekulske vibracije. Uzorak izložen infracrvenom zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine (λ), apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama. Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 4000 i 1200 cm^{-1} . Taj dio spektra vrlo je koristan za određivanje funkcionalnih skupina organskih spojeva te se često naziva područje funkcionalnih skupina, zbog toga što su položaj i karakteristike apsorpcijskih vrpce većine funkcionalnih organskih spojeva pri tim valnim duljinama razmjerno nepromjenjive.

Područje frekvencije u IR-spekttru ispod 1600 cm^{-1} sadrži velik broj vrpce. Uz malo karakterističnih rasteznih vibracija pojedinih veza, tu se nalaze brojne vrpce koje odgovaraju deformacijskim vibracijama molekule kao i nekim složenim vibracijama i vibracijama gornjeg tona. Oblik koji ocrtavaju sve vrpce zajedno karakterističan je za određeni spoj, pa se taj dio spektra zove područje “otiska prsta”.

Karakteristične vrpce za organske molekule javljaju se u području od 3300 do 2800 cm^{-1} što se pripisuje rasteznim frekvencijama C–H veza. Vrpce koje se javljaju u području od 3600 do 3200 cm^{-1} karakteristične su za hidroksilne skupine alkohola, a ukoliko je hidroksilna skupina dio karboksilne kiseline javlja se kao vrlo široka vrpca u području od 3600 do 2500 cm^{-1} . Ta vrpca zajedno s rasteznom frekvencijom karbonila pri 1710 cm^{-1} karakterizira

karboksilne kiseline. Aromatski spojevi obično daju niz vrpce između 1600 i 1400 cm^{-1} , a vrpce u području od 900 do 700 cm^{-1} se često primjenjuju za utvrđivanje načina supstitucije na aromatskom prstenu [29].

2.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je tip kromatografije koji se često koristi i u kemiji i biokemiji hrane za identifikaciju i kvantifikaciju biološki aktivnih komponenata. Kolona HPLC uređaja sadrži stacionarnu fazu kroz koju prolazi mobilna faza, a detektor na kraju kolone pokazuje retencijsko vrijeme frakcija (vrijeme u kojem se određeni analit eluira). Uzorak koji se analizira injektira se u malom volumenu te pri prolasku kroz kolonu usporava zbog specifičnih fizikalno-kemijskih interakcija koje ovise o prirodi analita i kemijskom sastavu mobilne i stacionarne faze. Često se sastav mobilne faze mijenja tijekom elucije kako bi se postiglo bolje razdjeljivanje komponenata smjese (gradijentna elucija), iako je moguće sve sastojke eluirati istim otapalom iste koncentracije (izokratska elucija).

Ovisno o polarnosti mobilne i stacionarne faze te o načinu razdjeljivanja, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti možemo podijeliti na: kromatografiju normalnih faza, obrnutih faza, gel filtraciju, kromatografiju ionske izmjene i afinitetnu kromatografiju. Razdjeljivanje kod kromatografija normalnih i obrnutih faza temelji se na različitoj polarnosti mobilne i stacionarne faze. Kod kromatografije normalnih faza, stacionarna faza je polarna, a mobilna nepolarna, zbog čega će se polarniji spoj duže zadržavati u koloni te će imati najduže retencijsko vrijeme (odnosno zadnji će napustiti kolonu). Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna, a mobilna polarna pa će onaj spoj najmanje polarnosti zadnji napustiti kolonu. Gel filtracija razdvaja komponente smjese ovisno o molekulskoj masi zbog čega će molekule manje molekulske mase ulaziti u pore gela, prelaziti će veći put te će imati duže retencijsko vrijeme. Kromatografija ionske izmjene u interakciju dovodi ione i naboj stacionarne faze, pri čemu dolazi do međusobnog privlačenja iona suprotnog naboja. Afinitetna kromatografija se temelji na specifičnim reverzibilnim interakcijama proteina i liganda, a elucija se vrši ili uvođenjem novog liganda ili promjenom pH vrijednosti [30].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

S ciljem izolacije bioaktivnih komponenata prisutnih u cvijetu i listu trnine (*Prunus spinosa L.*) (Slika 6), kao polazni materijal koristio se osušeni cvijet i list nabavljen u suradnji sa Suban d.o.o., koji je neposredno prije izolacije usitnjeni u prah.



Slika 6. Osušeni usitnjeni cvijet i list trnine.

Tehnički etanol (EtOH) i metanol (MetOH) svježe su predestilirani prije korištenja. Ostali kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja.

3.2. METODE RADA

Uzorci praha sušenog cvijeta i lista trnine podvrgnuti su klasičnoj ekstrakciji kruto-tekuće grijanjem u povrat uz 70%-tni etanol odnosno metanol kao otapalo.

Metoda A: Klasična ekstrakcija kruto-tekuće grijanjem u povrat ili refluks uz 70%-tni etanol kao otapalo, nakon čega slijedi ekstrakcija tekuće-tekuće uz etil-acetat kao otapalo.

Metoda B: Klasična ekstrakcija kruto-tekuće grijanjem u povrat ili refluks uz metanol kao otapalo, nakon čega slijedi ekstrakcija tekuće-tekuće uz etil-acetat kao otapalo.

Tablica 2. Oznake uzoraka ekstrakta cvijeta trnine

Metoda ekstrakcije	Otapalo	Uzorak
Metoda A	70%-tni etanol	KEEt
	Etil-acetat	KEEtEtAc
	Voda	KEEtH ₂ O
Metoda B	Metanol	KEMe
	Etil-acetat	KEMeEtAc
	Voda	KEMeH ₂ O

Za utvrđivanje sastojaka smjese biljnih ekstrakata korištena je metoda tankoslojne kromatografije presvučenim slojem silika gela (60F–254) Merck u odgovarajućem sustavu otapala.

Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-lampa pri valnoj duljini od 254 nm. Biljni ekstrakti su pročišćeni preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom etil-acetata kao eluensa.

Koncentracija ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina određena je na spektrofotometru UV UNICAM Helios β.

Određivanje sastava i udjela pojedinačnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i flavonoida u dobivenim ekstraktima provedeno je na Agilent 1260 Infinity HPLC sustavu.

FTIR spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u kalijevu bromidu ili kao dikolormetanske otopine na Bomem MB 100 Mid FTIR–spektrofotometru.

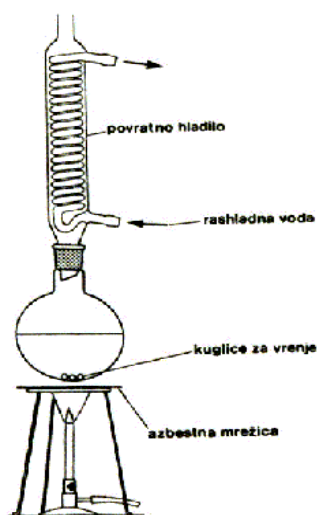
Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR spektri: ν = rastezanje (stretching), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, š. = široka vrpca, sl. = slaba vrpca.

3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata

3.2.1.1. METODA A: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo

Sastavi se aparatura za refluks (Slika 7.). U tikvicu se stavi odvagana masa od 3 g praha sušenog cvijeta i lista trnine i 70%-tni etanol volumena 150 mL, te se zagrije do temperature vrelišta otapala. Kada sadržaj tikvice počne refluksirati, odnosno otapalo kondenzira te počne kapati natrag u tikvicu, mjeri se vrijeme refluksa. Nakon sat vremena ekstrakcije rastavi se aparatura, a dobivena se smjesa ohladi, te filtrira preko Büchnerova lijevka pri čemu je dobiven filtrat tamnosmeđe boje ugodnog mirisa. Nakon izuzimanja 10 mL ekstrakta za određivanje ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina, zaostali filtrat se upari na rotacijskom otparivaču do suha, pri čemu je dobiveno 1.06 g biljnog ekstrakta **KEEt** tamnosmeđe boje i karameliziranog mirisa.



Slika 7. Grijanje u povrat.

Upareni biljni ekstrakt **KEEt** se otopi u vodi te se provede ekstrakcija tekuće-tekuće, odnosno izmućkivanje u lijevku za odijeljivanje, uz etil-acetat kao otapalo. Postupak izmućkivanja ponavlja se 3 puta pri čemu su izdvojeni vodeni i organski slojevi. Vodeni sloj upari se na rotacijskom otparivaču i osuši u eksikatoru pri čemu je dobiveno 832 mg uzorka

KEEtH₂O, smeđe boje i intenzivnog, neugodnog mirisa, dok se etil-acetatni slojevi spoje, osuše bezvodnim Na₂SO₄ i upare do suha pri čemu je dobiveno 254 mg tamno zelene krutine **KEEtEtAc**. Dobivenim ekstraktima snimljeni su IR spektri s ciljem karakterizacije izoliranih spojeva u pojedinom sloju.

IR-spektar KEEtH₂O: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3417 (š. j., O-H), 3018 (sl., C-H, aromatski), 2914, (sr., C-H), 2850 (sr., C=C), 1722 (j., C=O), 1608 (j., C=C), 1392 (sl., CH₂), 1056 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KEEtEtAc: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3396 (š. j., O-H), 3068 (sl., C-H, aromatski), 2914, (sr., C-H), 2844 (sr., C=C), 1701 (j., C=O), 1629, 1698 (sl., C=C), 1438, 1384 (sl., CH₂), 1270 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

Kako bi se ustvrdio sastav dobivene smjese etil-acetatnog ekstrakta i odredio pogodan eluens za odjeljivanje pojedinih komponenata smjese, provedena je tankoslojna kromatografija. Kao najbolji sustav za razdvajanje uzorka na pločici, pokazao se silikagel (SiO₂) kao stacionarna faza, a etil-acetat kao mobilna faza. Za navedeni sustav izračunate su R_f vrijednosti najdominantnijih komponenti smjese (Tablica 3).

Smjesa spojeva iz uzorka **KEEtEtAc** pročišćena je preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagel pločama uporabom etil-acetata kao eluensa pri čemu je iz 50 mg uzorka izolirano 5 dominantnih komponenti (Slika 8).



Slika 8. Razdvojene komponente ekstrakta **KEEtEtAc** preparativnom tankoslojnom Kromatografijom.

Tablica 3. Dominantne komponente izolirane preparativnom tankoslojnom kromatografijom iz ekstrakata **KEEtEtAc**

Komponenta	Masa (mg)	R _f	Boja
KFA1	4,0	0,9	Zelena
KFA2	5,9	0,43	Žuta
KFA3	6,4	0,41	fluorescentno zeleno-žuto
KFA4	2,5	0,33	žuto-zelena
KFA5	3,8	0,11	Tamnozelena

Dobivenim frakcijama **KFA1**, **KFA2** i **KFA3** snimljeni su IR spektri s ciljem karakterizacije izoliranih spojeva.

IR-spektar KFA1: $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3304 (š. sl., O-H), 3018 (sl., C-H, aromatski), 2959, 2932 (sr., C-H), 2873 (sr., C=C), 1700 (j., C=O), 1586 (sl., C=C), 1450, 1384 (sl., CH_2), 1297 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KFA2: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3304 (š. sl., O-H), 3068 (sl., C-H, aromatski), 2960, 2929 (sr., C-H), 2873 (sr., C=C), 1700 (sl., C=O), 1608 (sl., C=C), 1450, 1384 (sl., CH_2), 1297 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KFA3: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3373 (š. sl., O-H), 3015 (sl., C-H, aromatski), 2958, 2932 (sr., C-H), 2874 (sr., C=C), 1700 (sl., C=O), 1580 (j., C=C), 1450, 1384 (sl., CH_2), 1299 (sr., C-OH), 1126, 1075 (sr., C-O, C-C).

3.2.1.2. METODA B: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat uz metanol kao otapalo

Na isti način kao i kod metode A, provedena je ekstrakcija s metanolom kao otapalom pri čemu je dobiven filtrat tamnosmeđe boje neugodnog mirisa iz kojeg je izdvojeno 10 mL ekstrakta za određivanje koncentracije ukupnih fenola, flavonola i derivata hidroksicimetnih kiselina. Ostatak ekstrakta uparen je na rotacijskom otparivaču do suha pri čemu je dobiveno 857,2 mg uzorak **KEMe** tamnosmeđe boje i karameliziranog mirisa. Nakon provedene ekstrakcije tog uzorka s etil-acetatom izdvojen je vodeni sloj koji se upari do suha pri čemu je dobiveno 578,2 mg smeđe viskozne tvari uzorak **KEMeH₂O**. Organski slojevi se spoje, upare pri čemu je dobiven uzorak **KEMeEtAc** mase 193,5 mg u obliku krutine maslinaste boje i ugodna mirisa.

Ekstraktima **KEMeH₂O** i **KEMeEtAc** snimljeni su IR spektri s ciljem karakterizacije izoliranih spojeva u pojedinom sloju.

IR-spektar KEMeH₂O: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3417 (š. j., O-H), 3018 (sl., C-H, aromatski), 2914, (sr., C-H), 2850 (sr., C=C), 1722 (j., C=O), 1608 (j., C=C), 1392 (sl., CH_2), 1056 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KEMeEtAc: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3396 (š. j., O-H), 3068 (sl., C-H, aromatski), 2914, (sr., C-H), 2844 (sr., C=C), 1701 (j., C=O), 1629, 1698 (sl., C=C), 1438, 1384 (sl., CH_2), 1270 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

Prije postupka pročišćavanja preparativnom tankoslojnom kromatografijom, TLC-om je postavljen sustav za razdvajanje komponenata smjese koji uključuje etil-acetat kao eluens, te su izračunate R_f vrijednosti (Tablica 4). Preparativnom tankoslojnom kromatografijom 60 mg uzorka **KEMeEtAc**, izolirano je 6 dominantnih komponenti (Slika 9).



Slika 9. Razdvojene komponente ekstrakta **KEMeEtAc** preparativnom tankoslojnom kromatografijom.

Tablica 4. Dominantne komponente izolirane preparativnom tankoslojnom kromatografijom iz ekstrakata **KEMeEtAc**

Komponenta	Masa (g)	R _f	Boja
KFB1	10,2	0,90	zelena
KFB2	3,9	0,73	žuto-zelena
KFB3	4,1	0,64	žuto-zelena
KFB4	3,0	0,40	zelena
KFB5	3,6	0,30	žuto-zelena
KFB6	7,0	0,11	tamnozelen

Dobivenim frakcijama **KFB1**, **KFB2**, **KFB3** i **KFB6** snimljeni su IR spektri s ciljem karakterizacije izoliranih spojeva.

IR-spektar KFB1: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3460 (š. sl., O-H), 3014 (sl., C-H, aromatski), 2929 (sr., C-H), 2873 (sr., C=C), 1726 (j., C=O), 1601 (sl., C=C), 1465, (sl., CH_2), 1379 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

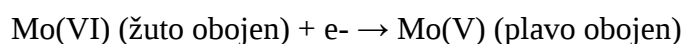
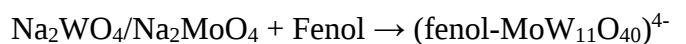
IR-spektar KFB2: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3358 (š. sl., O-H), 3018 (sl., C-H, aromatski), 2960, 2929 (sr., C-H), 2873 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1608 (sr., C=C), 1465, 1384 (sl., CH_2), 1297 (sr., C-OH), 1127, 1075 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KFB3: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3373 (š. sl., O-H), 3015 (sl., C-H, aromatski), 2932 (sr., C-H), 2874 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1603 (sl., C=C), 1465, 1384 (sl., CH_2), 1299 (sr., C-OH), 1126, 1075 (sr., C-O, C-C).

IR-spektar KFB6: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CH_2Cl_2): 3368 (š. sl., O-H), 3017 (sl., C-H, aromatski), 2958, 2932 (sr., C-H), 2874 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1608 (j., C=C), 1465, 1384 (sl., CH_2), 1299 (sr., C-OH), 1126, 1075 (sr., C-O, C-C).

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforvolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni.



Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima.

Reagensi u postupku određivanja ukupnih fenola su:

1. Folin-Ciocalteu reagens
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata: 20%-tna otopina koja se priprema tako da se 200 g bezvodnog natrijeva karbonata otopi u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
3. Standard galne kiseline: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema uzoraka:

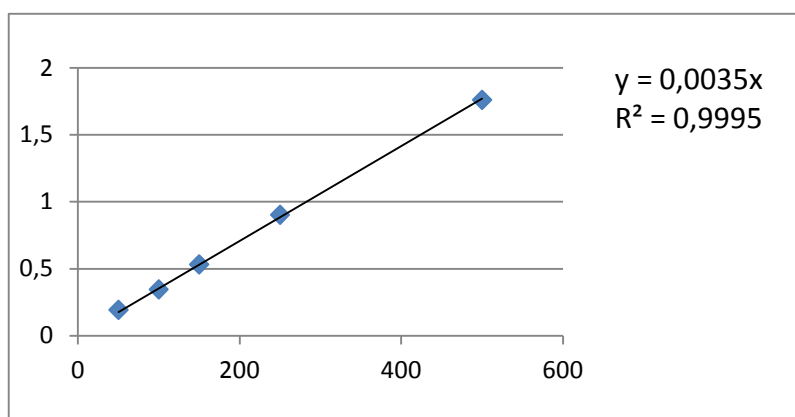
Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakta je potrebno razrijediti. Etanolni i metanolni ekstrakti dobiveni klasičnom ekstrakcijom i ekstrakti dobiveni iz vodenog sloja razrijeđeni su 5x, a etil-acetatni ekstrakti razrijeđeni su 10x.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca, odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mgdm^{-3} . Iz svake tikvice otpipetira se po 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta u kupelji od rotavapora, pri 50 $^{\circ}\text{C}$, nakon čega im se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mgdm^{-3}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. GAE je ekvivalent galne kiseline (engl. gallic acid equivalent) [31].



Mg/L	A 765 nm
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca i izražena je u mg GAE/100 g trnine.

$$Y = a X$$

Y = apsorbancija pri 765 nm,

X = koncentracija galne kiseline (mg/L).

Mjerenje apsorbancije ekstrakata za **ukupne fenole** provedeno je u dvije paralele.

Uzorci METODE A:

Apsorbancija ekstrakta **KEEt** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,776$$

$$A_{765\text{nm}} = 0,824$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije $A_{\text{sr}} = 0,8 \text{ nm}$.

Apsorbancija ekstrakta **KEEtH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,501$$

$$A_{765 \text{ nm}} = 0,587$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije $A_{\text{sr}} = 0,544 \text{ nm}$.

Apsorbancija ekstrakta **KEEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:10 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,608$$

$$A_{765 \text{ nm}} = 0,646$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije $A_{\text{sr}} = 0,627 \text{ nm}$.

Uzorci METODE B:

Apsorbancija ekstrakta **KEMe** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,708$$

$$A_{765\text{nm}} = 0,732$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,72 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEMeH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,262$$

$$A_{765\text{nm}} = 0,269$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,265 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEMeEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:10 iznosila:

$$A_{765\text{nm}} = 0,463$$

$$A_{765\text{nm}} = 0,568$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,515 nm.**

3.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje se provodi u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm [32].

Reagensi u postupku određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

1. Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
2. Etanol, 96%
3. Klorovodična otopina masene koncentracije 1g/L HCl (u 96%-tnom etanolu)
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.
4. Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
5. Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaje se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje

te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

6. Standard kvercetina (100 mg/L)

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

7. Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)

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

Priprema uzoraka ekstrakta

Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno razrijediti. Etanolni i metanolni ekstrakti dobiveni klasičnom ekstrakcijom i ekstrakti dobiveni iz vodenog sloja razrijeđeni su 2,5x, a etil-acetatni ekstrakti razrijeđeni su 5x.

Postupak određivanja

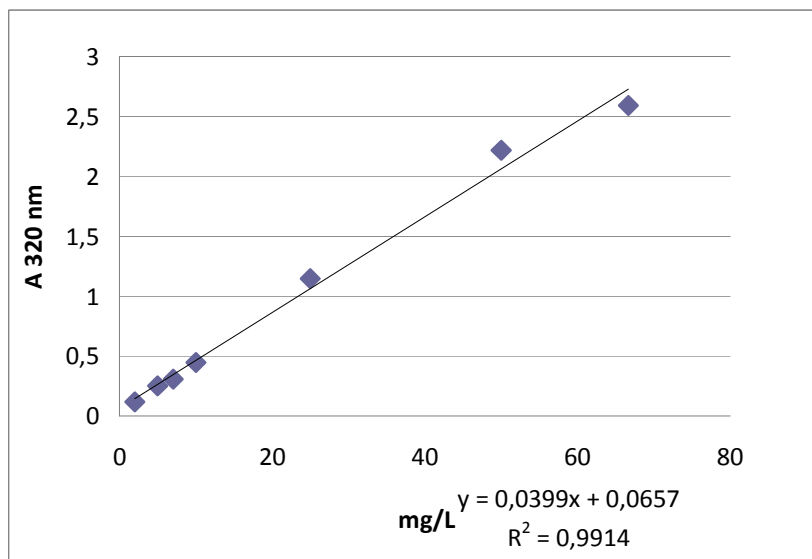
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo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

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

a) Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1 g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.



γ (mg/L)	A 320 nm
2	0,118
5	0,252
7	0,306
10	0,446
25	1,146
50	2,217
66,7	2,59

Koncentracija hidroksicimetne kiseline izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

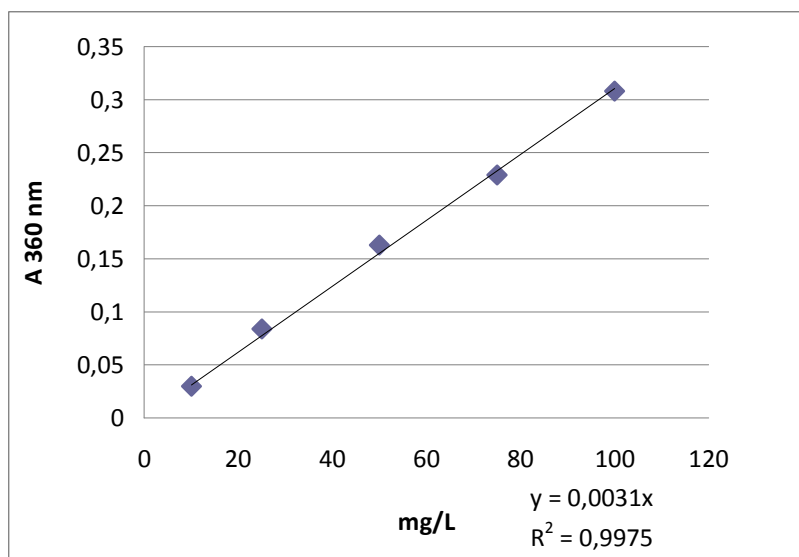
$$Y = 0,0399X + 0,0657$$

Y = apsorbancija pri 320 nm,

X = koncentracija kafeinske kiseline (mg/L).

b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2.5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1 g/L HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.



γ (mg/L)	$A_{360 \text{ nm}}$
10	0,03
25	0,084
50	0,163
75	0,229
100	0,308

Koncentracija ukupnih flavonola izračuna se preko dobivene jednadžbe pravca:

$$Y = 0,0031 X$$

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

odnosno,

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

Mjerenje apsorbancije ekstrakata za **ukupne hidroksicimetne kiseline** provedeno je u dvije paralele.

Uzorci METODE A:

Apsorbancija ekstrakta **KEEt** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{320 \text{ nm}} = 0,906$$

$$A_{320 \text{ nm}} = 1,008$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije $A_{\text{sr}} = 0,957 \text{ nm}$.

Apsorbancija ekstrakta **KEEtH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{320 \text{ nm}} = 0,562$$

$$A_{320 \text{ nm}} = 0,673$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije $A_{\text{sr}} = 0,617 \text{ nm}$.

Apsorbancija ekstrakta **KEEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{320\text{nm}} = 0,822$$

$$A_{320\text{nm}} = 0,871$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 0,846 nm.**

Uzorci METODE B:

Apsorbancija ekstrakta **KEMe** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{320\text{nm}} = 1,163$$

$$A_{320\text{nm}} = 1,045$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 1,104 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEMeH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{320\text{nm}} = 0,546$$

$$A_{320\text{nm}} = 0,48$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 0,513 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEMeEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{320\text{nm}} = 0,728$$

$$A_{320\text{nm}} = 0,764$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 0,746 nm.**

Mjerenje apsorbcije ekstrakata za **ukupne flavonole** provedeno je u dvije paralele.

Uzorci METODE A:

Apsorbancija ekstrakta **KEEt** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,646$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,69$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 0,668 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEEtH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,305$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,273$$

Što daje srednju vrijednost apsorbcije **A_{sr} = 0,289 nm.**

Apsorbancija ekstrakta **KEEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,511$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,459$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,485 nm**.

Uzorci METODE B:

Apsorbancija ekstrakta **KEMe** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,799$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,752$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,775 nm**.

Apsorbancija ekstrakta **KEMeH₂O** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2,5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,222$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,209$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,431 nm**.

Apsorbancija ekstrakta **KEMeEtAc** je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila:

$$A_{360\text{nm}} = 0,517$$

$$A_{360\text{nm}} = 0,522$$

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **A_{sr} = 0,519 nm**.

3.2.4. Određivanje fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz UV Photo Diode Array detekciju (HPLC UV/PDA)

Određivanje sastava i udjela u uzorcima **KEEtEtAc** i **KEMeEtAc**, pojedinačnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i flavonoida provedeno je primjenom HPLC-a metode u Centru za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru, metodom koju su opisali Fecka i Turek, uz određene modifikacije. Modifikacija navedene metode provedena je u dijelu kromatografske analize gdje je kao mobilna faza korištena 3%-tna mravlja kiselina umjesto 0,2%, 1,5% i 5%-tne mravlje kiseline.

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na Agilent 1260 Infinity HPLC sustavu koji se sastoji od: Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu te 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora.

Parametri kromatografske analize:

<i>Kolona:</i>	Nucleosil 100-5C18, 5 μ m (250 $\times$ 4,6 mm I.D.)
<i>Mobilne faze:</i>	Otapalo A-3%-tna mravlja kiselina u acetonitrilu (v/v) Otapalo B-3%-tna mravlja kiselina u vodi (v/v)
<i>Eluiranje:</i>	gradijentno
<i>Gradijent:</i>	prikazan u tablici (Tablica 5)
<i>Detektor:</i>	UV-Photo Diode Array (valna duljina je 278 nm za identifikaciju fenolnih kiselina i 340 do 360 nm za identifikaciju flavonoida)
<i>Temperatura:</i>	sobna
<i>Vrijeme trajanja:</i>	35 minuta
<i>Injektirani volumen:</i>	20 μ L
<i>Ekvilibracija:</i>	2 minute

Tablica 5. Gradijent za HPLC analizu fenolnih spojeva

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL/min)
0	10	90	0,9
25	40	60	0,9
30	70	30	0,9
35	10	90	0,9

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 380 nm. Flavonol glikozidi identificirani su na 340 nm, a fenolne kiseline na 278 nm.

Prema baždarnom pravcu kamferola-3-O-rutinozida izražen je apigenin pentozid; kvercetin-3-glukozida izražen je derivat miricetina; procijanidini A1 i A2 preko procijanidina B1 i B2.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

Cilj ovog diplomskog rada je izolirati i ispitati sastav bioaktivnih komponenti iz ekstrakta osušenog cvijeta i lista trnine dobivenog primjenom klasične metode ekstrakcije, pročistiti i karakterizirati dobivene frakcije, te odrediti koncentraciju ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u dobivenim ekstraktima. Kada se govori o izolaciji fenolnih spojeva ekstrakcija je jedna od najvažnijih metoda, no ne postoji jedinstven, standardni postupak ekstrakcije. Ekstrakcija je ujedno i prvi važan korak u izolaciji fenolnih spojeva i najčešće primjenjivani postupak upravo je klasična ekstrakcija uz primjenu organskih otapala i uz zagrijavanje kroz određeno vrijeme. Međutim, sve se više se istražuju moderniji i ekološki prihvatljiviji postupci ekstrakcije (ultrazvuk, mikrovalovi, superkritični plinovi) [33]. Sam tip ekstrakcije utječe na koncentraciju i udio bioaktivnih spojeva u ekstraktu, budući da uvjeti ekstrakcije, npr. temperatura, vrijeme ekstrakcije, mikrovalovi ili ultrazvuk, utječu na degradaciju tih spojeva [34].

Cvjetovi i listovi trnine sadrže značajne koncentracije flavonoida, od kojih koji su najzastupljeniji derivati flavonola (kemferol, kvercetin te njihovi glikozidi sa arabinozom, ramnozom i ksilozom: kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- β -D-ksilopiranozid, kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid-7-O- α -L-ramnopiranozid). Flavonoidi su u cvijetu prisutni većinom u obliku monoglikozida a u listu su uglavnom u obliku diglikozida. Također, cvijet sadrži i proantocijanidine tipa A, dok se u listu mogu naći koncentracije karotenoida i norizoprenoida, tanina, sterola i triterpena [8]. Oba dijela biljke sadrže i fenolne kiseline (galna, dihidroksibenzojeva, *p*-hidroksibenzojeva, klorogenska, vanilinska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina). Dominantna frakcija fenolnih kiselina u cvijetu je *p*-hidroksibenzojeva kiselina, a u listu su to kafeinska i ferulinska kiselina [3].

Prvi dio ovog rada posvećen je izolaciji fenolnih spojeva iz cvijeta i lista trnine klasičnom ekstrakcijom zagrijavanjem u povrat uporabom 70%-tnog etanola kao otapala (metoda A) te uporabom metanola kao otapala (metoda B).

Drugi dio se odnosi na pročišćavanje dobivenih ekstrakta, ekstrakcijom tekuće-tekuće i preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens, te karakterizacijom pojedinih frakcija IR spektroskopijom.

U trećem dijelu, spektrofotometrijskim metodama određena je koncentracija ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u dobivenim ekstraktima, te sastav i udio pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

4.2. IZOLACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI

Biljni ekstrakt je vrlo komplicirana smjesa nekoliko spojeva različitih kemijskih i fizikalnih svojstava, a razdvajanje tih spojeva temelji se upravo na tim svojstvima. Prirodni spojevi iz biljaka obično se ekstrahiraju nepolarnim otapalima npr. *n*-heksanom, dietileterom, kloroformom, a zatim slijede mnogo polarnija otapala npr. metanol, etanol, voda, ovisno o fizikalnim i kemijskim svojstvima ciljanih komponenti [35]. Izbor otapala koji se koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva uvelike ovisi o polarnosti flavonoida koje se želi proučavati. Manje polarna otapala koriste se za ekstrakciju flavonoidnih aglikona, dok se polarnija otapala koriste za ekstrakciju flavonoidnih glikozida. Iz toga proizlazi da se izoflavoni, flavanoni i dihidroflavanoli, ili flavoni i flavanoli sa više metoksi grupa, obično ekstrahiraju benzenom, kloroformom, diklormetanom ili etil-acetatom [36].

Za izolaciju bioaktivnih spojeva, u ovom radu, korišten je osušeni list i cvijet trnine. Postupak izolacije proveden je klasičnom ekstrakcijom s 70%-tnim etanolom, odnosno metanolom kao otapalom, a temelji se na korištenju nekog organskog otapala i grijanja u povrat (refluks) otopine.

4.2.1. Metoda A: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo

Klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat uz 70%-tnog etanola dobiven je filtrat tamnosmeđe boje ugodnog mirisa. Nakon izuzimanja 10 mL ekstrakta za određivanje ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina, zaostali filtrat je uparen na rotacijskom otparivaču do suha, pri čemu je dobiveno 1,06 g uzorak biljnog ekstrakta **KEEt** tamnosmeđe boje i karameliziranog mirisa. Nakon provedene ekstrakcije tog uzorka **KEEt** s etil-acetatom kao otapalo dobivena su dva sloja: 832 mg uzorka **KEEtH₂O**, smeđe boje i intenzivnog, neugodnog mirisa, i 254 mg tamno zelene krutine **KEEtEtA**.

Kako bi se karakterizirale komponente smjese dobivenog etil-acetatnog ekstrakta, smjesa spojeva iz uzorka **KEEtEtAc** pročišćena je preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silikagel pločama uporabom etil-acetata kao eluensa (Slika 7) pri čemu je iz 50 mg uzorka izolirano 5 dominantnih komponenti: **KFA1**, zelene boje, mase 4,0 mg, $R_f = 0,9$; **KFA2**, žute boje, mase 5,9 mg, $R_f = 0,43$, **KFA3**, fluorescentno zeleno-žute boje, mase 6,4 mg, $R_f = 0,41$, **KFA4**, žuto-zelene boje, mase 2,5 mg, $R_f = 0,33$, i **KFA5**, tamnozelene, mase 3,8 mg, $R_f = 0,11$; te je vidljivo više mrlja bliskih R_f vrijednosti koje nisu izolirane.

4.2.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija grijanjem u povrat u etanol kao otapalo

Na isti način, klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat s metanolom dobiven je filtrat tamnosmeđe boje neugodnog mirisa iz kojeg je izdvojeno 10 mL ekstrakta za određivanje koncentracije ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina, dok se ostatak upario do suha pri čemu je dobiven uzorak **KEMe** tamnosmeđe boje i karameliziranog mirisa, mase 857,2 mg. Nakon provedene ekstrakcije tog uzorka s etil-acetatom izdvojen je vodeni sloj i uparen do suha pri čemu je dobiveo 578,2 mg uzorka **KEMeH₂O** kao smeđa viskozna tvar, te organski sloj koji je uparen do suha pri čemu je dobiveno 193,5 mg krutg uzorka **KEMeEtAc** maslinaste boje i ugodna mirisa.

Prije postupka pročišćavanja preparativnom tankoslojnom kromatografijom određeno je da je najbolji sustav za razdvajanje uzorka na TLC-u etil-acetat kao mobilna faza te su za navedeni sustav izračunate su R_f vrijednosti (Tablica 4). Preparativnom tankoslojnom kromatografijom uzorka **KEMeEtAc**, mase 60 mg, uporabom etil-acetata kao eluensa izolirano je 6 dominantnih komponenti (Slika 8): **KFB1**, zelene boje, mase 10,2 mg, $R_f = 0,90$; **KFB2**, žuto-zelene boje, mase 3,9 mg, $R_f = 0,73$, **KFB3**, žuto-zelene boje, mase 4,1 mg, $R_f = 0,64$; **KFB4**, zelene boje, mase 3,0 mg, $R_f = 0,40$; **KFB5**, žuto-zelene boje, mase 3,6 mg, $R_f = 0,30$; **KFB6**, tamnozelene boje, mase 7,0 mg, $R_f = 0,11$; te je vidljivo više mrlja bliskih R_f vrijednosti koje nisu izolirane.

Na osnovi usporedbe masa izoliranih bioaktivnih komponenata metodom A i metodom B, vidljivo je da se upotrebom polarnijeg otapala, tj. smjese etanola i vode, izoliralo više bioaktivnih komponenata, što je u suglasnosti s literaturnim podacima koji ukazuju da se binarnim sustavom otapala postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva nego u monosustavima (voda ili čisti etanol) [37].

Na temelju R_f vrijednosti i boje izoliranih najdominantnijih komponenata dobivenih biljnih ekstrakata **KEMeEtAc** i **KEEtEtAc** može se predvidjeti i razlika u kemijskoj strukturi izoliranih komponenata uporabom otapala različite polarnosti. Izoliranim frakcijama primjenom ove metode ekstrakcije struktura je karakterizirana IR spektroskopijom.

4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Ukupni fenoli određeni su primjenom spektrofotometrijske metode koja se bazira na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenju nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm.

Postupak pripreme uzoraka proveden je prema protokolu za određivanja fenola (odjeljak 3.2.2.).

Kao usporedbu uspješnosti primijenjenih metoda ekstrakcije odnosno upotrebe različitih otapala (metoda A i B) provedeno je i određivanje ukupnih fenola u uzorcima **KEEt** i **KEMe**. Također određena je koncentracija ukupnih fenola i nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće u uzorcima iz vodenog sloja: **KEEtH₂O** i **KEMeH₂O**; i etil-acetatnog sloja: **KEEtEtAc** i **KEMeEtAc**.

Tablica 6. Koncentracija ukupnih fenola

	UZORCI	UKUPNI FENOLI mg GAE/g
Metoda A	KEEt	57,1429
	KEEtH ₂ O	38,8571
	KEEtEtAc	89,5714
Metoda B	KEMe	51,4286
	KEMeH ₂ O	18,9643
	KEMeEtAc	73,6429

Masena koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema jednadžbi pravaca i izražena je u mg GAE/g trnine, a rezultati za sve uzorke dani su u tablici (Tablica 6). Za ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom uz 70%-tni etanol kao otapalo masena koncentracija ukupnih fenola iznosila je 57,14 mg GAE/g trnine, dok je za ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom uz metanol kao otapalo iznosila nešto manje, odnosno 51,42 mg GAE/g trnine.

Nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće u ekstraktima dobivenim metodom A, u vodenom sloju **KEEtH₂O** masena koncentracija ukupnih fenola iznosila je 38,85 mg GAE/g trnine što je 30% ukupne masene koncentracije fenolnih spojeva, a u etil-acetatnom sloju **KEEtEtAc** 89,57 mg GAE/g trnine odnosno 70%.

Masena koncentracija ukupnih fenola u etil-acetatnom sloju **KEMeEtAc** iznosila je 73,64 mg GAE/g trnine, dok je u vodenom sloju **KEMeH₂O** 18,96 mg GAE/g trnine odnosno 20% ukupnih fenolnih spojeva.

Dobiveni rezultati masenih koncentracija ukupnih fenola uzoraka **KEEt** i **KEMe** slažu se s prethodnim rezultatima koji ukazuju da je masa ukupno izoliranih bioaktivnih komponenti primjenom klasične ekstrakcije uz 70%-tni etanol kao otapalo veća (u ovom slučaju za 23%) nego kod ekstrakcije koja je provedena uporabom metanola kao otapala. To ukazuje da bipolarni sustav otapala utječe na koncentraciju izoliranih bioaktivnih komponenata odnosno fenolnih spojeva u tim biljnim ekstraktima, što je u suglasju s literaturnim navodima. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u etil-acetatnom sloju kod metode A i B u usporedbi s vodom je znatno veća što se moglo i očekivati budući da se izoflavoni, flavanoni i dihidroflavanoli, ili flavoni i flavanoli sa više metoksi grupa, obično ekstrahiraju benzenom, kloroformom, diklormetanom ili etil-acetatom u manje polarnim otapalima.

4.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA

Ukupne hidroksicimetne kiseline određene su primjenom spektrofotometrijske metode u etanolnom, odnosno metanolnom ekstraktu uzorka pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjerio pri 320 nm.

Postupak pripreme uzoraka proveden je prema protokolu za određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina (odjeljak 3.2.2.).

Masena koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračunata je pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu.

Tablica 7. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina

	UZORCI	UKUPNE HCK mg CAE/g
Metoda A	KEEt	2,7922
	KEEtH ₂ O	1,7286
	KEEtEtAc	4,8922
Metoda B	KEMe	3,2528
	KEMeH ₂ O	1,4013
	KEMeEtAc	4,2625

Za ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom uz etanol kao otapalo **KEEt** masena koncentracija ukupnih HCK iznosi 2,79 mg CAE/g trnine, dok za ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom uz metanol kao otapalo **KEMe** iznosi nešto više, odnosno 3,25 mg CAE/g trnine.

U vodenom sloju masena koncentracija ukupnih HCK u uzorku **KEEtH₂O** kod metode A iznosi 1,72 mg CAE/g trnine, dok je kod uzorka **KEMeH₂O** metode B oko 19% manja, odnosno 1,40 mg CAE/g trnine.

Masena koncentracija ukupnih HCK u etil-acetatnom sloju u uzorku **KEEtEtAc** kod metode A iznosi 4,89 mg CAE/g trnine, dok je u uzorku **KEMeEtAc** metode B oko 13% manja, odnosno 4,26 mg CAE/g trnine.

Koncentracija HCK u uzorku **KEMe** veća je nego u ekstraktu dobivenom uporabom etanola, što ukazuje da je metanol bolje otapalo za ekstrakciju HCK od etanola. S tim je suglasju, i udio HCK u koncentraciji ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu **KEEt** iznosi 5% u odnosno 6% u metanolnom ekstraktu.

Ukupni flavonoli određeni su primjenom spektrofotometrijske metode u etanolnom, odnosno metanolnom ekstraktu uzorka pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjerio pri 360 nm.

Postupak pripreme uzoraka proveden je prema protokolu za određivanja ukupnih flavonola (odjeljak 3.2.2.).

Masena koncentracija ukupnih flavonola izračunata je pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

Tablica 8. Koncentracija ukupnih flavonola

	UZORCI	UKUPNI FLAVONOLI
		mg QE/g
Metoda A	KEEt	26,9354
	KEEtH ₂ O	11,6532
	KEEtEtAc	39,1129
Metoda B	KEMe	31,2701
	KEMeH ₂ O	8,6895
	KEMeEtAc	41,8951

U ekstraktu **KEEt** dobivenom klasičnom ekstrakcijom uz etanol kao otapalo masena koncentracija ukupnih flavonola iznosi 26,93 mg QE/g trnine, dok je za ekstrakt **KEMe** dobiven klasičnom ekstrakcijom uz metanol kao otapalo veća, odnosno 31,27 mg QE/g trnine. Masena koncentracija ukupnih flavonola u ekstraktu **KEEtH₂O** koji je dobiven nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće etanolnog ekstrakta, iznosila je 11,65 mg QE/g trnine što je 23% ukupnih flavanola, dok je u ekstraktu **KEMeH₂O** dobivenog iz metanolnog ekstrakta iznosila 8,68 mg QE/g trnine što je 17% ukupnih flavanola. U etil-acetatnom sloju masena koncentracija ukupnih flavonola kod metode A iznosi 39,11 mg QE/g trnine, dok je kod metode B oko 7% veća, odnosno 41,89 mg QE/g trnine, što je u suglasju i s gore navedenim rezultatima.

Koncentracija i udio pojedinih fenolnih spojeva kod klasične ekstrakcije grijanjem u povrat ovisi o otapalu koje je korišteno za ekstrakciju. Koncentracija flavonola u uzorku **KEMe** veća je nego u ekstraktu **KEEt** dobivenom uporabom 70%-tnog etanola (za oko 14%) što ukazuje da je metanol bolje otapalo za ekstrakciju flavonola od etanola. S time je u suglasju i udio flavonolnih spojeva u koncentraciji ukupnih fenola koji u etanolnom ekstraktu iznosi oko 41%, odnosno 56% u metanolnom ekstraktu. Upravo ti rezultati potvrđuju da su flavonoli glavna skupina fenolnih spojeva u cvijetu i listu trnine što je u suglasju s literaturnim navodima.

4.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Nakon provedene tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti potvrđeni su literaturni navodi: od fenolnih kiselina najzastupljeniji su derivati hidroksicimetne kiseline (klorogenska i *p*-kumarinska kiselina), od proantocijanidina se ističu visoke koncentracije proantocijanidina tipa A1 i A2, a najveća koncentracija fenolnih spojeva pripada flavonol glikozidima (Tablica 9) što je u skladu s rezultatima provedenih mjerenja ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina (odjeljak 4.3. i 4.4.).

Tablica 9. Rezultati HPLC analize

UZORAK	KEEtEtAc	KEMeEtAc
SPOJ	mg/L	mg/L
Klorogenska kiselina	8,48	8,39
3- <i>p</i> -kumaroilkininska kiselina	5,84	4,83
Katehin	8,89	9,68
Apigenin pentozid	2,66	1,83
procijanidin A1	128,40	29,38
<i>p</i> -kumarinska kiselina	10,70	14,52
procijanidin A2	28,09	34,75
Kvercetin-pentozilheksozid	3,51	14,61
Kvercetin rutinozid	14,30	116,57
Kamferol-pentozilheksozid	102,96	63,33
Kamferol-3-glukozid	61,86	4,35
Kamferol heksozid	5,47	10,54
Kamferol-heksozilramnozid	14,04	19,70
Kamferol-pentozid	15,36	50,61
Kamferol ramnozid	66,06	70,53
Kamferol-heksozid	92,67	5,82
Kamferol-acetilrutinozid	7,50	16,64
Miricetin (der.)	24,19	5,35

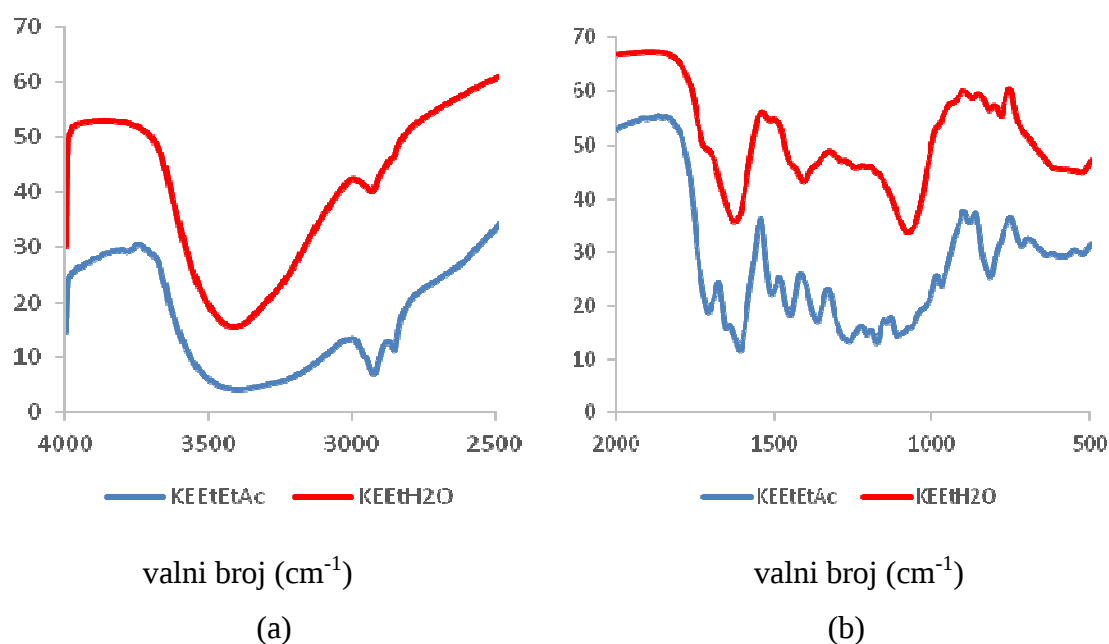
Usporedbom sastava i udjela pojedinih komponenti u ekstraktima **KEEtEtAc** i **KEMeEtAc** može se zaključiti da je u metanolnom ekstraktu prisutan veći udio derivata hidroksicimetne kiseline i flavanola, dok su u etanolnom ekstraktu u većoj koncentraciji prisutni procijanidini A1 i A2, što je u suglasju s rezultatima masene koncentracije ukupnih flavanola i hidroksicimetnih kiselina koja je također veća u metanolnom ekstraktu.

4.5. IR SPEKTROSKOPIJA

4.5.1. IR-spektri biljnih ekstrakata dobiveni metodom A

Snimljeni su IR spektri biljnih ekstrakata dobivenih nakon provedene ekstrakcije kruto-tekuće u KBr pastilama, a u spektrima su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce funkcijske skupine svih komponenata smjese.

Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području 3200 do 3600 cm^{-1} . Slobodna hidroksilna skupina registrira se kao uska vrpca pri 3600 cm^{-1} , a obično se uočava širok signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. U IR spektru **KEEtH₂O** prisutna je široka apsorpcijska vrpca oko 3400 cm^{-1} koja se pripisuje hidroksilnoj skupini koja je uključena u vodikove veze, a intenzitet te apsorpcijske vrpce je izrazito jak što ukazuje na prisutnost velikog udjela hidroksilnih skupina u spojevima prisutnim u smjesi. U dijelu spektra koji karakterizira vibracije istezanja C-H kod zasićenih, nezasićenih veza i aromatskih spojeva ($2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$), assignirana je apsorpcijska vrpca pri 3057 cm^{-1} koja se može pripisati rasteznoj vibraciji etenske veze $=\text{C-H}$, dok se vrpca pri 2914 i 2844 cm^{-1} pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C-H (Slika 10, a). Navedene apsorpcijske vrpce su srednjeg inteziteta. Prisutnost C=C veze u svim snimljenim IR spektrima dodatno je potvrđena apsorpcijskom vrpcom u području $1620\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$. U području od 1650 do 1850 cm^{-1} , koje se pripisuje frekvenciji rastezanja svih karbonilnih skupina, assignirana je apsorpcijska vrpca pri 1722 cm^{-1} koja ukazuje na prisutnost karbonilne skupine flavonskih derivata (Slika 10, b), dok assignirane apsorpcijske vrpce pri 1092 i 1031 cm^{-1} odgovaraju istezanjima C-O i C-C veze etera koja potvrđuje prisutnost metoksi skupine prstena B flavonoida. Na osnovu assigniranih apsorpcijskih vrpca, može se potvrditi prisutnost hidroksilne i karbonilne skupine koje su karakteristične upravo za fenolne spojeve.



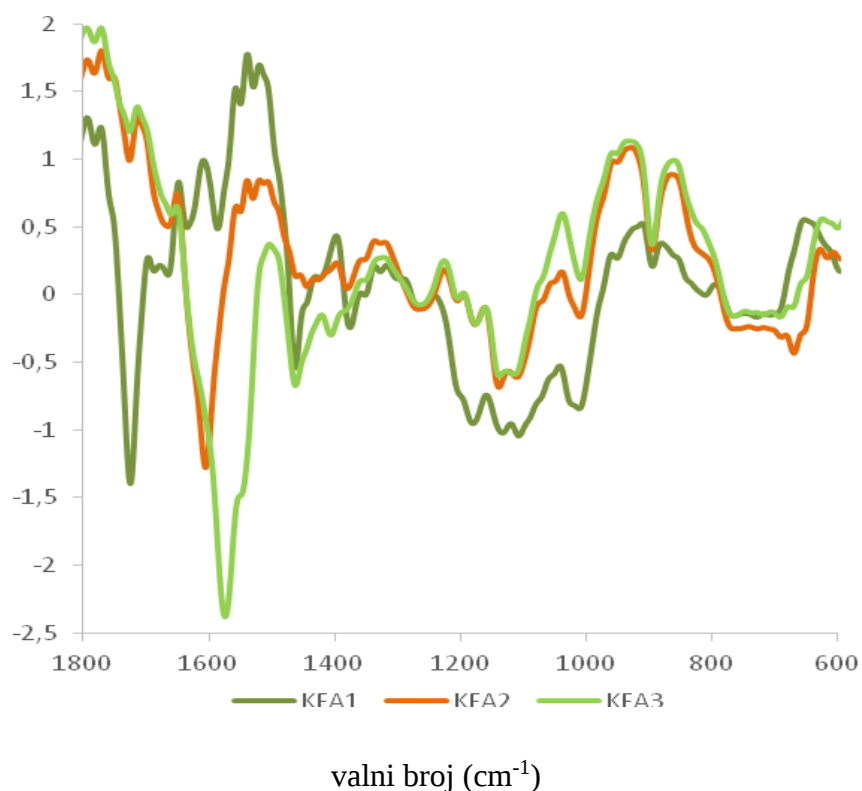
Slika 10. IR-spektri **KEEtEtAc** i **KEEtH₂O** u području od 4000-2700 cm⁻¹ (a) i 2000-500 cm⁻¹ (b).

U IR spektru **KEEtEtAc** vidljive su apsorpcijske vrpce u području koje ukazuju na spojeve s nezasićenom i zasićenom vezom. Karbonilna skupina identificirana je na temelju vrpce pri 1701 cm⁻¹ te ukazuje na prisutnost karbonilne skupine ketona, koja je prisutna u piranskom prstenu koji povezuje dva benzenska prstena flavonskog kostura, a također potvrđuje estersku vezu budući da su flavanoidi u trnini najčešće priutmi u obliku glikozida. U spektirma su prisutne apsorpcijske vrpce pri 3400 cm⁻¹ koje potvrđuju prisutnost hidroksilne skupine, te apsorpcijske vrpce pri 1407, 1375 cm⁻¹ koje potvrđuju prisutnost metilskih skupina i vrpce pri 1097 i 1015 cm⁻¹ koje ukazuju na vibracije istezanja C-O veze etera. Na osnovi asigniranih apsorpcijskih vrpca potvrđena je prisutnost fenolnih spojeva odnosno flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu što je u suglasju s literaturnim podacima, koji govore da su najdominantniji fenolni spojevi, flavanoidi izolirani iz cvijeta i lista trnine derivati flavonola (kamferol, kvercetin, te njihovi glikozidi s arabinozom, ramnozom i ksilozom). U cvijeću su ti fenolni spojevi prisutni uglavnom u obliku monoglikozida, 3-O-arabinoze, dok su u listu prisutni u obliku diglikozida kempferol 3,7-O-diramopiranoze [38].

Usporedbom apsorpcijskih vrpca asigniranih u IR spektru uzorka **KEEtH₂O** i **KEEtEtAc** (Slika 10, b), vidljivo je da se razlikuju u području apsorpcijskih vrpca koje

karakteriziraju karbonilnu skupinu i područje od 1700 do 1000 cm^{-1} što ukazuje da je prilikom ekstrakcije kruto-tekuće s etil-acetatom došlo do raspodjele fenolnih spojeva s obzirom na njihovu polarnost odnosno polarnost otapala, vode i etil-acetata. Ovi rezultati su u suglasju s dobivenim rezultatima koncentracije ukupnih fenola, flavanola i derivata hidroksicimetnih kiselina koja je znatno veća u etil-acetatnom ekstraktu **KEEtEtAc**, a i s literaturnim podacima koji govore da se izoflavoni, flavanoni i dihidroflavanoli i flavanoli s više metoksi grupa, obično ekstrahiraju u manje polarnim otapalima.

Snimljeni su IR-spektri izoliranih najdominantnijih frakcija nakon provedene preparativne tankoslojne kromatografije kao dikormetanske otopine, a u spektrima su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce funkcijske skupine svih komponenata frakcije.



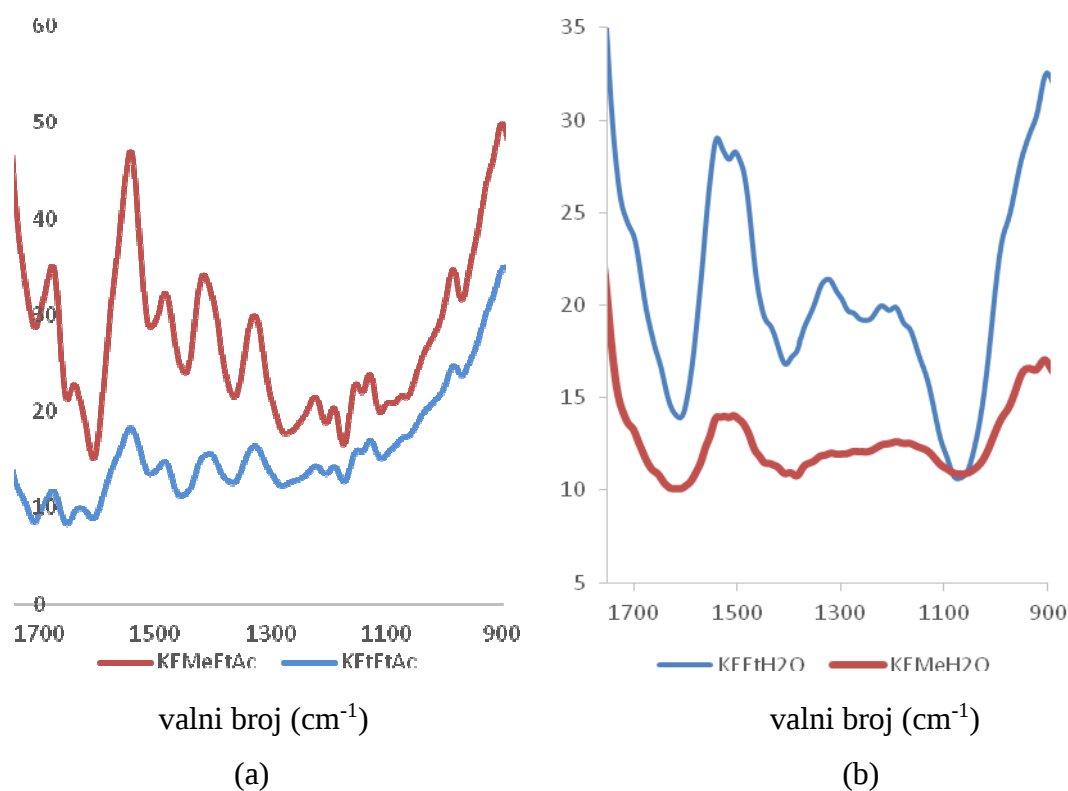
Slika 11. Dio IR-spektra tri frakcije **KFA1**, **KFA2** i **KFA3** od 600 do 1800 cm^{-1} .

Apsorpcijske vrpce u području od 2800-3100 cm^{-1} koje potvrđuju prisutnost jednostrukih i dvostrukih veza vidljive su u spektrima sve tri frakcije, također je vidljiva uska apsorpcijska vrpca oko 3600 cm^{-1} što ukazuje na slobodnu hidroksilnu skupinu i široka apsorpcijska vrpca oko 3400 cm^{-1} koji ukazuje na odražavanju vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. Najveća razlika u intezitetu apsorpcijskih vrpce

vidljiva je u području 1750 do 1000 cm^{-1} (Slika 11) što se moglo i očekivati budući da su preparativnom tankoslojnom kromatografijom izdvojene frakcije fenolnih spojeva različite polarnosti odnosno različite kemijske strukture.

4.5.2. IR-spektri biljnih ekstrakata dobiveni metodom B

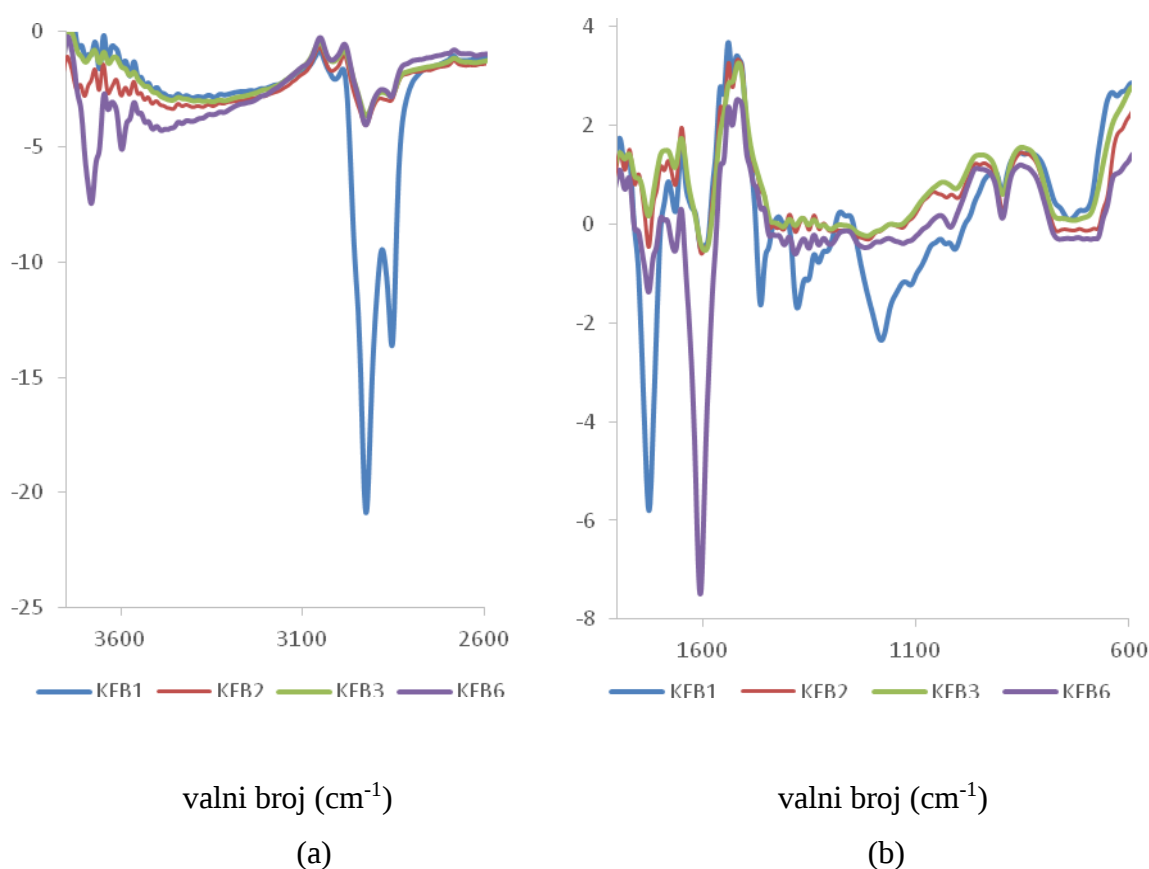
U IR-spektrima **KEMeH₂O** i **KEMeEtAc** asignirane su karakteristične apsorpcijske vrpce kao i kod IR spektara **KEEtH₂O** i **KEEtEtAc** koje potvrđuju prisutnost svih funkcijskih skupina karakterističnih za fenolne spojeve odnosno flavonoide, flavanole i derivate hidroksicimetne kiseline čija je prisutnost potvrđena na osnovi određivanja njihove koncentracije (odjeljak 4.3. i 4.4.), ali i primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (odjeljak 4.5.).



Slika 12. IR-spektri **KEEtEtAc** i **KEMeEtAc** (a), **KEEtH₂O** i **KEMeH₂O** (b) u području 1750-600 cm^{-1} .

Razlika u intezitetu asigniranih apsorpcijski vrpce u spektrima **KEEtEtAc** i **KEMeEtAc** (Slika 12, a) i **KEEtH₂O** i **KEMeH₂O** (Slika 12, b) ukazuje da se radi o sličnim kemijskim strukturama fenolnih spojeva, međutim njihov udio u pojedinom ekstraktu je

različit što je u suglasnosti s rezultatima sastava i udjelom pojedinačni fenolni spojevi dobivenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja također ukazuje da su u ekstraktu **KEMeEtAc** zastupljeniji flavonoli dok je u etanolnom ekstraktu **KEEtEtAc** prisutna veća količina procijanidina A. Također vidljive razlike su u skladu s literaturnim podacima koji ukazuju da se upotrebom polarnijih otapala polarniji flavonoidi lakše ekstrahiraju iz biljnog materijala. Dodatkom vode u etanol (30%), povećala se polarnost otapala te je ekstrahirano više fenolnih spojeva iz biljnog materijala nego primjenom čistog metanola.



Slika 13. Dio IR-spektra frakcija **KFB1**, **KFB2**, **KFB3** i **KFB6** u području 3700-2600 cm^{-1} (a) i 1800-600 cm^{-1} .

Apsorpcijske vrpce u području od 2800-3100 cm^{-1} koje potvrđuju prisutnost jednostrukih i dvostrukih veza vidljive su u spektrima sve četiri frakcije, odnosno potvrđuju fenolne spojeve koje karakterizira aromatski prsten. Široka apsorpcijska vrpca oko 3400 i 3300 cm^{-1} koje se pripisuju vezanoj hidroksilnoj skupini i uska apsorpcijska vrpca oko 3600 cm^{-1} koja se prepisuje slobodnoj hidroksilnoj skupini. U području karbonilnih skupina vidljive

su i apsorpcijske vrpce pri nižim i višim vrijednostima od 1704 cm^{-1} što može ukazivati i na prisutnost karbonilne skupine ketona ili aldehida ili estera, dok apsorpcijska vrpca pri 1648 cm^{-1} potvrđuje prisutnost karbonilne skupine koja je prisutna u piranskom prstenu koji povezuje dva benzenska prstena flavonskog kostura. Apsorpcijske vrpce pri 1075 cm^{-1} ukazuju na vibracije istezanja C-O veze etera koja potvrđuje prisutnost metoksi skupine. Neznatna razlika u intezitetu assigniranih vrpca u spektrima **KFB2** i **KFB3** frakcije ukazuje da se radi o sličnim kemijskim strukturama flavanoida i to najdominantnijim flavanoidima izoliranim iz cvijeta trnine, odnosno glikozidima kamferolu i kvercetin.

Da bi se potvrdio sastav fenolni spojeva u pojedinim frakcijama bilo bi potrebno karakterizirati spojeve uporabom 1D i 2D NMR spektroskopije.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Izolacija fenolnih spojeva provedena je klasična ekstrakcija grijanjem u povrat uz 70%-tni etanol kao otapalo (metoda A), odnosno metanol kao otapalo (metoda B). Izolirane bioaktivne komponente karakterizirane su pomoću IR-spektroskopije. U snimljenim spektrima vidljive su apsorpcijske vrpce koje se pripisuju hidroksilnoj, esterskoj i karbonilnoj skupini što je karakteristično za fenolne spojeve, osobito za derivate hidroksicimetne kiseline, dok apsorpcijska vrpca pri 640 cm^{-1} koja odgovara glikozidnoj vezi dokazuje prisutnost flavonol glikozida.
2. Masene koncentracija ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u biljnim ekstraktima slažu se s rezultatima koji ukazuju da je primjenom klasične ekstrakcije uz 70%-tni etanol izolirano ukupno više bioaktivnih komponenti, odnosno fenolnih spojeva, dok je uporabom metanola izolirano manje fenolnih spojeva, ali s većim udjelom flavonola i derivata hidroksicimetnih kiselina. Udio flavonolnih spojeva u koncentraciji ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu iznosi 41%, odnosno 56% u metanolnom ekstraktu, što potvrđuje da su flavonoli glavna skupina fenolnih spojeva u cvijetu i listu trnine.
3. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija je u korelaciji s masenom koncentracijom fenolnih spojeva te je potvrdila da najveći udio fenolnih spojeva pripada kvercitin i kamferol glikozidima, potom proantocijanidima tipa A1 i A2, te fenolnim kiselinama pri čemu su najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline, odnosno klorogenska i p-kumarinska kiselina.

6. LITERATURA

1. Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wines, 2.izd., John Wiley & sons, New York, ChiChester, Brisbane, Toronto, Singapore.
2. Olszewska, M., Wolbís, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica* **58** (5), 367-372.
3. Gursky, Z. (1999) Zlatna knjiga ljekovitog bilja, 5. izd., Nakladni Zavod Matice Hrvatske, Zagreb.
4. Marakoğlu, T., Arslan, D., Özcan, M., Hacisefoğulları, H. (2005) Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L. Subsp. *Dasyphylla*) fruits, *Journal of Food Engineering* **68**, 137-142.
5. Özbek, S. (1978) Special Fruits, Cukurova. *Univ. Agric. Fac. Publ.* **128**, 223-252.
6. Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), Luxembourg, str. 145.
7. Olszewska, M., Głowacki, R., Wolbís, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica* **58** (3), 199-203.
8. Pinacho, R., Cervero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods* **19**, 49-62.
9. Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijska Industrija* **68**, 297-303.
10. Radovanović, B. C., Milenković Anđelković, A. S., Radovanović, A. B., Anđelković, M. Z. (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **12** (5), 813-819.
11. Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013) Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry* **141** (4), 3721-3730.

12. Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
13. Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2** (12), 1231-1246.
14. Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013, 1-16.
15. Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290.
16. Veberič, R. (2010) Bioactive compounds in fruit plants, El. Knjiga, Ljubljana.
17. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review* **56**, 317-333.
18. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
19. Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**, 1201-1205.
20. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1992) Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1478-1487.
21. Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) The Handbook of Natural Flavonoids. (John Wiley, ured.), Chichester.
22. Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006) In Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms; Fingerman, M., Nagabhushanam, R. Eds.; Science Publishers: Enfield, NH, USA, 115-174.
23. Parr, A.J., Bolwell, J.P. (2002) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 985-1012.
24. Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition* **130**, 2073-2085.
25. Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing* **89**, 67-72.

26. Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.
27. Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., Gordon, M.H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4016-4021.
28. Bartnick, DD, Mohlerm C.M., Houlihan, M. (2006) Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application, 20060088627.
29. Pine, S. H. (1994) *Organska kemija*, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb.
30. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., Sharma, P. K. (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology* **2** (5), 22-26.
31. Shortle, E., O'Grady, M.N., 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 Science* **98**, 828 – 834.
32. Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**(12), 1238-1247.
33. Dent, M.: Utjecaj postupka ekstrakcije na sastav i količinu fenolnih spojeva kadulje. Doktorski rad. Prehrambeno – biotehnološki fakultet (2013)
34. Galić, A., Dragović – Uzelac, V., Levaj, B., Bursać Kovačević, D., Pliestić, S., Arnautović, S. (2009) The Polyphenols Stability, Enzyme Activity and Physico – Chemical Parameters During Producing Wild Elderberry Concentrated Juice. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **74**
35. Craig, L. C. (1944) Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution. *The Journal of Biological Chemistry* **155**, 519-534.
36. Kachlicki, P., Marczak, L., Kerhoas, L., Einhorn, J., Stobiecki, M.: Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *Journal of Mass Spectrometry* **40** (2003) 1088-103.
37. Zhang, Z. S., Li, D. , Wang, L. J., Ozkan, N., Chen, X. D., Mao, Z. H. (2007) Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology* **57**. 17–24.
38. L. Horhammer, L. Endres, H.Wagner, F. Richthammer (1957) Isolation and identification of a flavones dipentoside from the leaves of *Prunus spinosa*., *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **290**, 342–348.