Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz bijelog gloga (Crataegus monogyna)

Gaberšek, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:290406

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Gaberšek

6337/BT

MIKROVALNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ BIJELOG GLOGA (*CRATAEGUS MONOGYNA*)

ZAVRŠNI RAD

Modul: Zelena kemija

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Jukić

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

MIKROVALNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ BIJELOG GLOGA (*CRATAEGUS MONOGYNA*)

Petra Gaberšek,6337/BT

Sažetak: U ovom radu opisana je ekstrakcija polifenola iz lista i cvijeta bijelog gloga (*Crataegus monogyna*) metodom mikrovalne ekstrakcije. Ispitane su 30% i 50%-tna vodena otopina metanola, temperature 50° C i 65° C, te je mijenjano vrijeme ekstrakcije 3 min, 6 min, 9 min, 12 min i 15 min. Usporedbom svih rezultata najviše polifenola ekstrahirano je u 50%-tnoj vodenoj otopini metanola, pri temperaturi 50° C u trajanju od 9 minuta.

Ključne riječi: bijeli glog, polifenoli, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 21 stranica, 8 slika, 3 tablice, 17 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Jukić

Rad predan: rujan 2015.

DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Final work**

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM COMMON HAWTHORN (*CRATAEGUS MONOGYNA*)

Petra Gaberšek,6337/BT

Abstract: This study describes the extraction of polyphenols from the leaves and flowers of white hawthorn (Crataegus monogyna) with method of microwave extraction. Used as 30% strength and 50% aqueous methanol, the temperature of 50° C and 65° C, and the extraction time was 3 min, 6 min, 9 min, 12 min and 15 min. By comparing the results, the most polyphenols were extracted in 50% aqueous methanol at a temperature of 50° C for 9 minutes.

Keywords: Common hawthorn, polyphenols, microwave extraction

Thesis contains: 21 pages, 8 figures, 3 tables, 17 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

Mentor: PhD. **Marijana Jukić**

Thesis defended: September 2015.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 1
2. 1. Polifenoli 1
2. 1. 1. Biološka aktivnost polifenola 6
2. 1. 2. Polifenoli i ljudsko zdravlje 7
2. 2. Bijeli glog 7
2. 3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima 9
3. EKPERIMENTALNI DIO 11
3. 1. MATERIJAL 11
3. 1. 1. Kemikalije 11
3. 1. 2. Oprema 11
3. 2. Metode rada 12
3. 2. 1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola 12
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
5. ZAKLJUČAK 19
6. LITERATURA : 20

1. UVOD

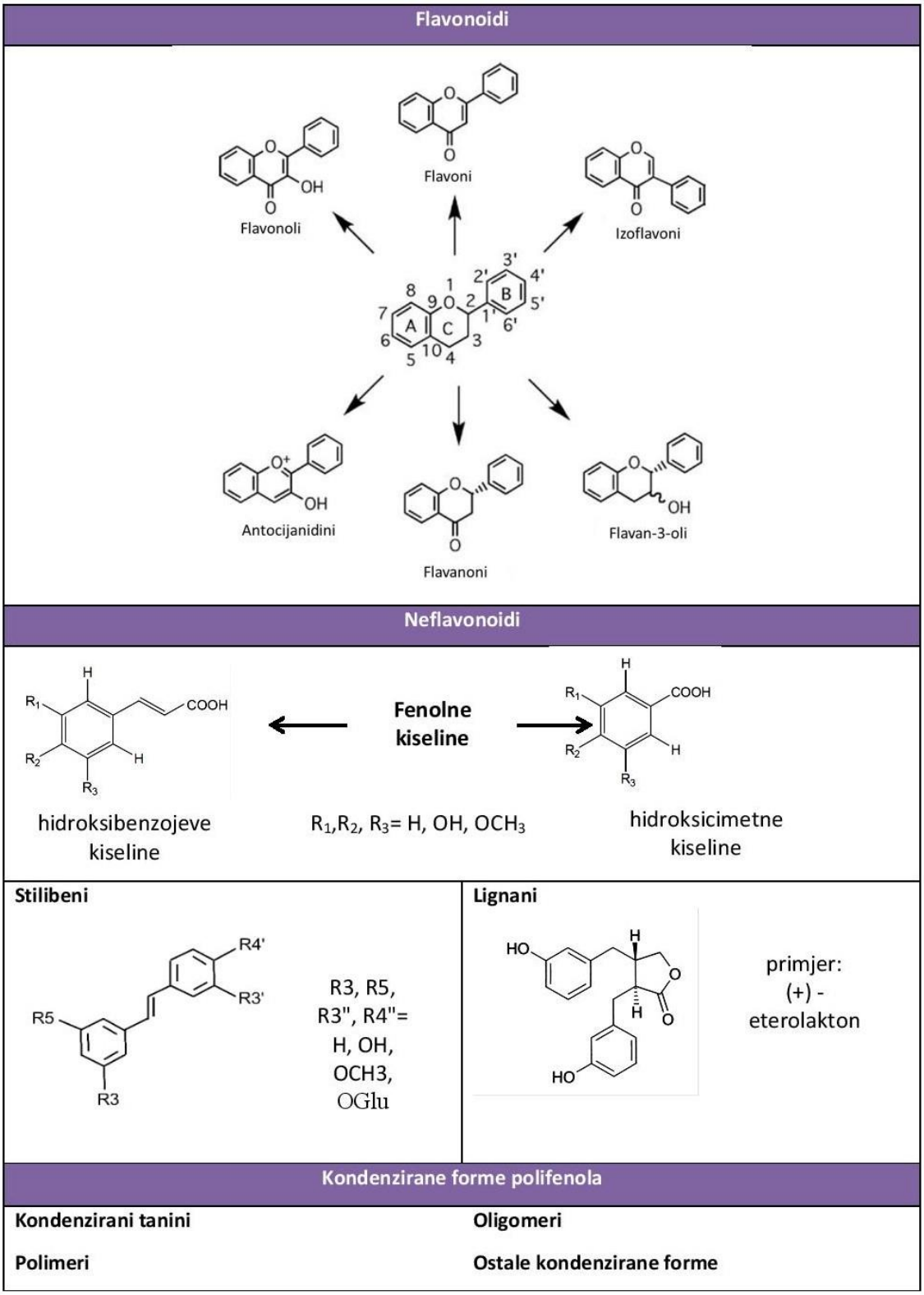
U traganju za alternativnim izvorima antioksidanta u ovom radu ispitano je dobivanje antioksidantnih ekstrakata iz cvijeta i lista bijelog gloga (*Crataegus monogyna*). Polifenoli su esencijalne molekule za fiziologiju biljaka, uključene su u različite funkcije poput rasta, pigmentacije i rezistencije na patogene. Metodom mikrovalne ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnog materijala provelo se uspješno ispitivanje. Glavna prednost mikrovalne ekstrakcije je sniženo vrijeme ekstrakcije te ušteda otapala i energije.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj ekstrakcijskog otapala (30%-tna i 50%-tna vodena otopina metanola), temperature i vremena na ekstrakciju polifenola aktiviranu mikrovalnim zračenjem. Istraživanjem je obuhvaćeno određivanje ukupnih polifenola spektrometrijski.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. Polifenoli

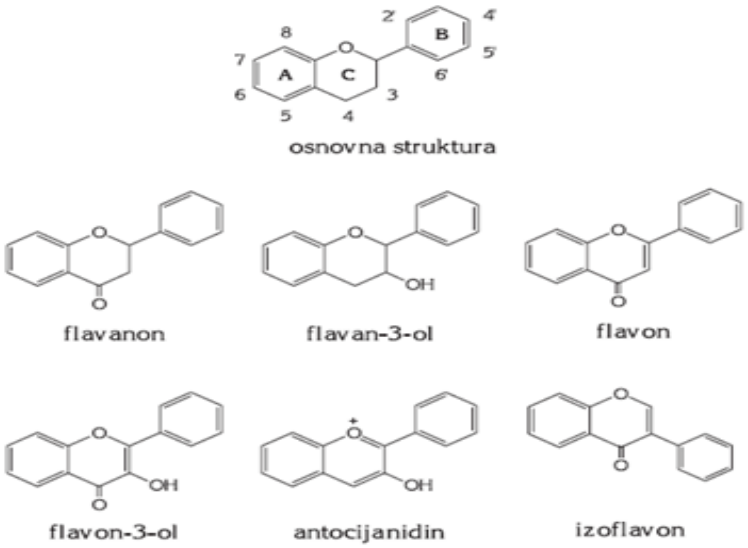
Polifenoli čine najrašireniju skupinu prirodnih spojeva u biljnom svijetu, s trenutno poznatih više od 8 000 struktura. Osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost benzenskog prstena sa jednom ili više hidroksilnih grupa. U literaturi možemo pronaći razne klasifikacije: prema strukturi, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010).



Slika 1. Podjela polifenola (Fuss i sur., 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010).

Flavonoidi

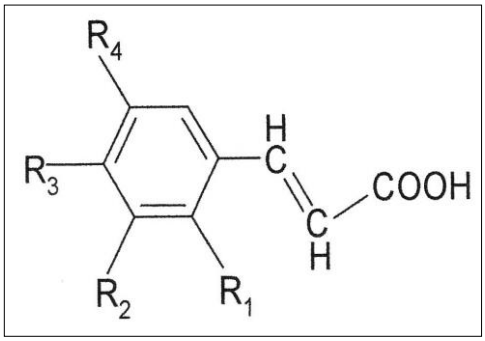
Flavonoidi su najproučavanija i najraznovrsnija skupina polifenola, otkriveno ih je više od 4000. Velika raznovrsnost flavonoida je usko povezana sa genima biljaka, klimom i načinom uzgoja. Osnovnu kemijsku strukturu čine dva aromatska prstena(A i B) povezana trima ugljikovim atomima koji tvore oksigenirani heterocikl (C). Na temelju varijacija tog heterocikla flavonoidi se dalje dijele na šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavononi, flavanoli, antocijani i izoflavoni (Pandey i dr., 2009; Manach i dr., 2004). U prirodi su prisutni u obliku glikozida i najčešće se vežu sa glukozom i ramnozom, ali mogu isto tako i sa ksilozom, galaktozom te arabinozom. Osim šećera supstitucijska skupina na osnovnoj jezgri može biti hidroksilna i metoksi skupina, što pridonosi velikoj raznolikosti spojeva. Općenito, flavnonoidi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i/ili glikolizirani derivati, a od toga glikolizacija ima veliki utjecaj na kemijska, fizikalna te biološka svojstva flavonoida ali i na njihovu apsorpciju u tankom crijevu. Flavonoidi se ubrajaju u sekundarne metabolite malih molekulskih masa, a široko su rasprostranjeni u sjemenju, lišću, kori i cvjetovima bilja. Zbog svoje strukture flavonoidi imaju izuzetno dobar učinak na ljudsko zdravlje, djeluju kao antioksidansi. Najviše ih nalazimo u voću, povrću, zelenom i crnom čaju, čokoladi, crnom vinu te bobičastom voću (Balasundram i sur, 2006).



Slika 2. Osnovna struktura i skupine flavonoida.

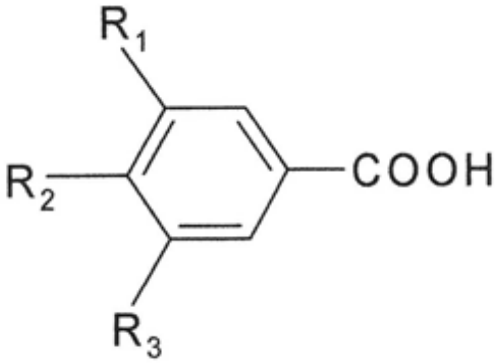
Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su po strukturi jednostavni fenoli a dijele se u derivate benzojeve i derivate cimetne kiseline. Hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi strukture C6-C3 i najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri. Najpoznatiji ester je klorogenska kiselina (5' kafeoilkina kiselina), a zatim slijede p - kumaroilkina kiselina, 3' - kafeoilkina kiselina (klorogenska kiselina) te 4' - kafeoilkina kiselina (izoklorogenska kiselina) (Balasundram i sur., 2006). Mnogo su češće od hidroksibenzojevih kiselina a sastoje se od pkumarinske, kafeinske, ferulične i sinapinske kiseline.



Slika 3. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)

S druge strane, hidroksibenzojeve kiseline imaju zajedničku C6-C1 strukturu a uključuju galnu, p-hidroksibenzojevu, vanilinsku, siriginsku te prokatehinsku kiselinu. U hrani su prisutni u slobodnom i vezanom obliku, s time da su rijeđe prisutne u slobodnom obliku (osim u procesiranoj hrani), a u vezanom su obliku glikozilirani oblici ili esteri kviniske, šikiminske i tartarne kiseline (Pandey i dr., 2009; Manach i dr., 2004). Navedene razlike u strukturi između hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990).



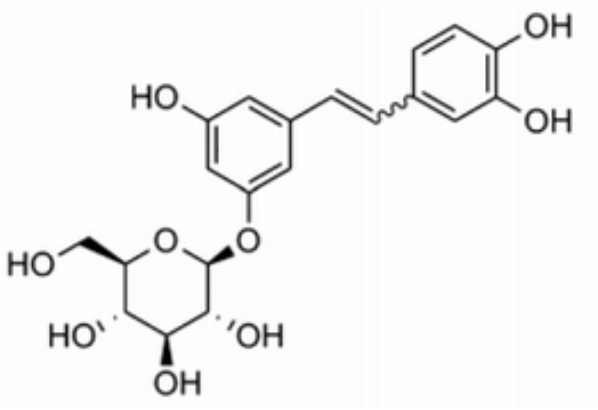
Slika 4. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Macheix i sur., 1990).

Lignani

Lignani su difenolni spojevi koji sadrže 2,3-dibenzilbutansku strukturu nastalu dimerizacijom dviju cimetnih kiselina. Vrlo su rasprostranjeni u biljnom svijetu a najviše ih nalazimo u sezamu, lanenim sjemenkama, raži, artičokama, brokulama itd. Hrana koja je najbogatija ligninima su upravo uljane sjemenke, poglavito lanene, koje sadrže približno tisuću puta veću koncentraciju nego u ostalim izvorima hrane. Lignani iz sjemena lana djeluju antiestrogeno i na taj način smanjuju rizik od raka dojke (Manach i dr., 2004).

Stilbeni

Stilbeni sadrže dva fenilna dijela spojena metilenskim mostom od dva ugljikova atoma. Njihova je prisutnost u ljudskoj prehrani prilično niska. Većina njih u biljkama funkcioniraju kao antifungalni fitoaleksini, odnosno molekule koje se sintetiziraju samo u odgovoru na ozljede ili infekcije. Snažni su antioksidansi te imaju izrazito antikancirogeno djelovanje. Jedan od najpoznatijih predstavnika je astringin koji je najčešće zastupljen u drvenastim biljkama (Pandey i dr., 2009).



Slika 5. Kemijska struktura astringina (Anonymous 1, 2011).

2. 1. 1. Biološka aktivnost polifenola

Polifenoli u biljkama djeluju kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače kukce i insekte, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti.

Antioksidativna aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala u stanicama. Radikalska oštećenja stanica uzrokuju promjene neto naboja, što modificira njihov osmotski tlak te im inducira nateknuće i smrt. Produkti lipidne peroksidacije potekli od umrlih stanica također mogu promovirati karcinogenezu (Ren i dr., 2003). Flavonoidi se oksidiraju radikalima (R•) dovodeći do stabilnijeg i manje reaktivnog oblika prema sljedećem mehanizmu (Irina i dr., 2012):

$$\text{flavonoid (OH)} + R\bullet \rightarrow \text{flavonoid (O}\bullet\text{)} + RH$$

Flavonoid (O •) stabilizira se rezonancijom i nema dovoljno energije da bi pokrenuo lančanu reakciju koja bi naštetila stanici.

Flavonoidi imaju sposobnost helirati metalne ione i to pridonosi njihovoj antioksidativnoj aktivnosti. Smatra se da je kapacitet flavonoida za vezanje metalnih iona uzrok inhibicije mnogih enzima čije aktivno mjesto sadrži metale (Irina i dr., 2012).

2. 1. 2. Polifenoli i ljudsko zdravlje

Sve je više znanstvenih studija koje podupiru hipotezu da prehrana bogata polifenolima ima preventivnu ulogu u nastajanju kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma, dijabetesa tipa 2, bolesti probavnog trakta i sl. Polifenoli u prehrani su u visokim koncentracijama zastupljeni u voću i povrću te njihovim prerađevinama, ali i u biljnim napitcima (Piljac-Žegarac i Šamec, 2010).

U ljudskom organizmu antioksidansi djeluju na tri načina (Noorhajati i sur., 2012):

- spriječavaju ili inhibiraju nastanak lipidnih peroksida
- neutraliziraju slobodne radikale
- popravljaju štetu izazvanu djelovanjem slobodnih radikala

2. 2. Bijeli glog



Slika 6. Cvijet i grmlje bijelog gloga (Anonymous 2, 2015).

Glog (*Crataegus*) je rod grmova ili niskih stablašica iz porodice ruža (*Rosaceae*), skupine *Pomoideae*. Glog raste samoniklo uz rubove šuma i polja, u ravnici i po planinama, među drugim grmljem i šikarom. Listovi ovih biljaka su jednostavni, obično nazubljeni ili perasto razdijeljeni, a palistići su često snažno razvijeni. Cvijetovi su sakupljeni u velikom broju u cvatove, te imaju bijele ili ružičaste latice (rjeđe žute), sadrže do 20 prašnika i 2-5 međusobno spojenih plodničkih listova koje obavija vrčasto cvjetište, sa kojem su ujedno i srasli. Plod je zbirni, jezgričast i u obliku podrasle koštuničaste crvene, crne ili žute bobe. Postoji jako puno vrsta, za liječenje se najčešće koriste dvije vrste gloga - bijeli (*Crataegus monogyna*) i crveni glog (*Crataegus oxyacantha*) (Enciklopedija leksikografskog zavoda, 1958.).

Bijeli glog (*Crataegus monogyna*) je trnovit grm ili do 8 metara visoko drvo. Dlakavi dršci cvjetova te dublje razdvojeni režnjevi na listovima razlikuju ga od crvenog gloga. Listovi variraju po obliku, odozgo su većinom manje sjajni od listova crvenog gloga. Bijeli cvjetovi sa crvenim prašnicima manji su od cvjetova crvenog gloga te se razvijaju 15 dana kasnije. Plodovi su manji, do 8 milimetara promjera, sa po jednom sjemenkom. Cvijet i list imaju ljekovita svojstva, sadrže flavonoide, oligomerne procijanidine, C-glikozide, triterpene i biogene amine. Navedeni spojevi pridonose jačanju rada srca i zdravlju krvožilnog sustava. Glog je jedna od biljka s najjačim smirujućim učinkom, pomaže kod umora, teškog disanja, vrtoglavica i nervoze.

Primjenjuju se gotovi pripravci (dražeje, kapsule, tablete, kapi) s alkoholnim ekstraktima koji su standardizirani na određeni sadržaj flavonoida ili procijanidina.

2. 3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja u frekvencijskom rasponu od 1 GHz do 300 GHz, valne duljine od 1 mm do 1 m,a koriste se za prijenos radijiskih i televizijskih signala (Wnag i Weller, 2006). Radiovalovi u rasponu frekvencija od oko 2,5 GHz imaju zanimljivo svojstvo, a to je da ih voda, masti i šećeri konvertiraju u gibanje koje se pretvara u toplinu (Gedye i sur., 1986; Giuerre i sur.,1986). Karakteristike mikrovalova su te da se obijaju od metala, prolaze kroz papir, staklo i plastiku te u hrani zagrijavaju vodu. Imaju ograničen energetski potencijal pa ne uzrokuju promjene u strukturi tvari (Gedye i sur., 1986; Giuerre i sur., 1986).

Ekstrakcija mikrovalovima je postupak koji koristi energiju mikrovalova za izolaciju komponenta uzorka u otapalo a provodi se u posebnim uređajima za mikrovalnu ekstrakciju. Na proces mikrovalne ekstrakcije osim volumena i karakteristika otapala utječu i vrijeme ekstrakcije, snaga mikrovalnog zračenja, svojstva materijala iz kojeg se vrši ekstrakcija i temperatura. Izbor otapala utječe na topljivost ispitivanog analita i sposobnost otapala da apsorbira mikrovalno zračenje. Temperatura je važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju iz razloga što povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. Izuzetak su termolabilni spojevi koji se razgrađuju uslijed visoke temperature. Snaga mikrovalova tijekom mikrovalne ekstrakcije mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature (Font i sur., 1998). Što je veća vrijednost dielektrične konstante otapala, veća je i apsorpcija mikrovalne energije. Produži li se vrijeme ekstrakcije, poveća se i količina ekstrahiranog analita (iako postoji mogućnost razgradnje). Na rezultate ekstrakcije utječe i veličina biljnih čestica na način da sitnije čestice sa svojom većom graničnom površinom omogućuju dublji prodor mikrovalnog zračenja (Kormin i sur., 2010). Kod ove metode se koriste dva pristupa: primjena otapala koje apsorbira mikrovalove i otapala koje ne apsorbira mikrovalove. Kod primjene otapala koje apsorbira mikrovalove uzorak i otapalo su u zatvorenoj posudi. Otapalo se zagrije preko točke vrenja i omogućuje se brza ekstrakcija analita pod umjerenim tlakom. S druge strane, kod primjene otapala koje ne apsorbira mikrovalove te se zato i ne zagrijava, uzorak i otapalo se nalaze u otvorenoj posudi. Uzorci često sadrže vodu ili neke druge spojeve koji imaju veliku konstantu dielektričnosti, oni apsorbiraju mikrovalno zračenje i otpuštaju zagrijane analite u hladno otapalo u kojem su topivi. Provodi se pod atmosferskim ili niskim tlakovima. Koristi se za analite koji su termički labilni npr. eterična ulja iz biljnih materijala.

Upravo zbog sposobnosti brzog zagrijavanja uzorka, mikrovalno zračenje poboljšava ekstrakciju polifenola. Do pojave zagrijavanja dolazi zbog dipolarne rotacije otapala u mikrovalnom polju. Povišenjem temperature otapala povećava se i topljivost polifenola u otopini. Naglim povišenjem temperature i povećanjem unutarnjeg tlaka u stanici ubrzava se pucanje stanica, a to posljedično dovodi do razaranja površine uzorka te ekstrakcije polifenola iz stanice u okolinu (Kormin i sur., 2010; Sutivisedsak i sur., 2010; Hayat i sur., 2009).

3. EKPERIMENTALNI DIO

3. 1. MATERIJAL

Određivali smo ukupne polifenole iz 40 uzoraka osušenih i zdrobljenih listova i cvjetova bijeloga gloga (*Crataegus monogyna)*.

3. 1. 1. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Destilirana voda, PBF Zagreb
- 30% otopina metanola
- 50% otopina metanola
- Folin-Ciocalteu reagens
- 20% - tna otopina Na_2CO_3
- 96%-tni etanol

Standardi

- Galna kiselina

Priprema standarda galne kiseline: u odmjernu tikvicu od 100 ml se otopi 500 mg galne kiseline u 10 ml 96%-tnog etanola, te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3. 1. 2. Oprema

- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- Mikrovalni reaktor
- Laboratorijsko posuđe

3. 2. Metode rada

U ovom istraživanju pripravilo se ukupno 40 uzoraka tako što se odvagalo 500 mg osušenog lišća i cvijeća bijelog gloga te otopilo u 20 ml otopine metanola. Od toga je 20 uzoraka tretirano s 30%-tnim metanolom, a preostalih 20 s 50%-tnim metanolom. Prije same ekstrakcije, na mikrovalnom ekstraktoru su se postavili sljedeći parametri: vrijeme postizanja temperature (4,5 min), temperature ekstrakcije (2 min) i hlađenja (3 min). Uzorci su filtrirani preko naboranog filtar papira u odmjerne tikvice od 25 ml. Metanolni ekstrakti se nadopune do 25 ml s odgovarajućim otapalom i ohlade na sobnu temperaturu. Uzorci su ekstrahirani u 30%-tnom i 50%-tnom metanolu pri temperaturi 50° C i 65° C, u vremenu od 3-15 minuta. Dobiveni ekstrakti čuvaju se u hladnjaku na + 4 °C.

3. 2. 1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrometrijskom metodom koja je utemeljena na kolornoj reakciji polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. U blago alkalnim uvjetima pri oksidaciji polifenola te kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji daju plavo obojenje. Zatim se mjeri nastali intenzitet plavog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm.

<u>Izrada baždarnog pravca:</u>

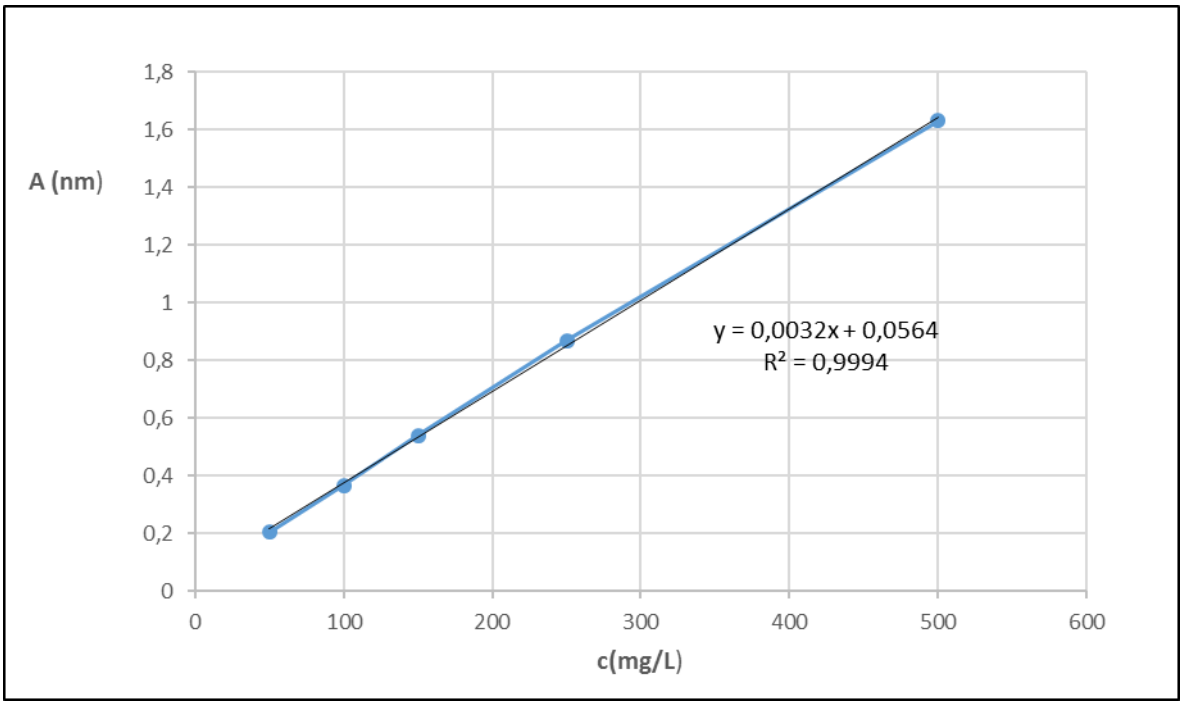
500 mg pripremljene galne kiseline se otopi u 100 ml destilirane vode. Volumetrijski se prirede koncentracije standardnih otopina 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L i 500 mg/L. Iz svake otopine se odpipetira 100 μL u epruvetu te doda 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL otopine Na_2CO_3. Svi uzorci su termostatirani 25 minuta pri 50° C . Zatim smo spektrofotometrijski izmjerili apsorbanciju otopina pri 765 nm.

Dobivene vrijednosti izmjerenih apsorbancija su se kretale u rasponu između 0,204 – 1,632.

Tablica 1.

c (mg/L)	A (765nm)
50	0,204
100	0,366
150	0,541
200	0,868
500	1,632

Zatim se nacrta baždarni pravac pomoću računala u programu Excel pri čemu se na apscisu nanesu koncentracije galne kiseline (c; mg/L), a na ordinatu vrijednosti apsorbancije (A; 765 nm).



Slika 7. Baždarni dijagram galne kiseline.

Račun :

Koncentraciju galne kiseline izraženu u mg L^{-1} izračunamo u programu Excel prema jednadžbi pravca .

U ovom radu, izračunata jednadžba pravca ima oblik :

$$y = 0{,}0032x + 0{,}0564$$
$$R^2 = 0{,}9994$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

- **Određivanje ukupnih polifenola u uzorcima:**

Metanolni ekstrakti su razrijeđeni 5 puta. Iz svakog razrijeđenog uzorka otpipetirano je 100 μL te dodano 200 μL Folin – Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i 1 mL otopine Na_2CO_3. Tako pripremljeni uzorci termostatirani su 25 minuta pri 50°C zatim ohlađeni pod mlazom hladne vode te im je izmjerena apsorbancija pri 765nm. Ukupni fenoli se određuju kao ekvivalent galne kiseline u mg/100g bijelog gloga.

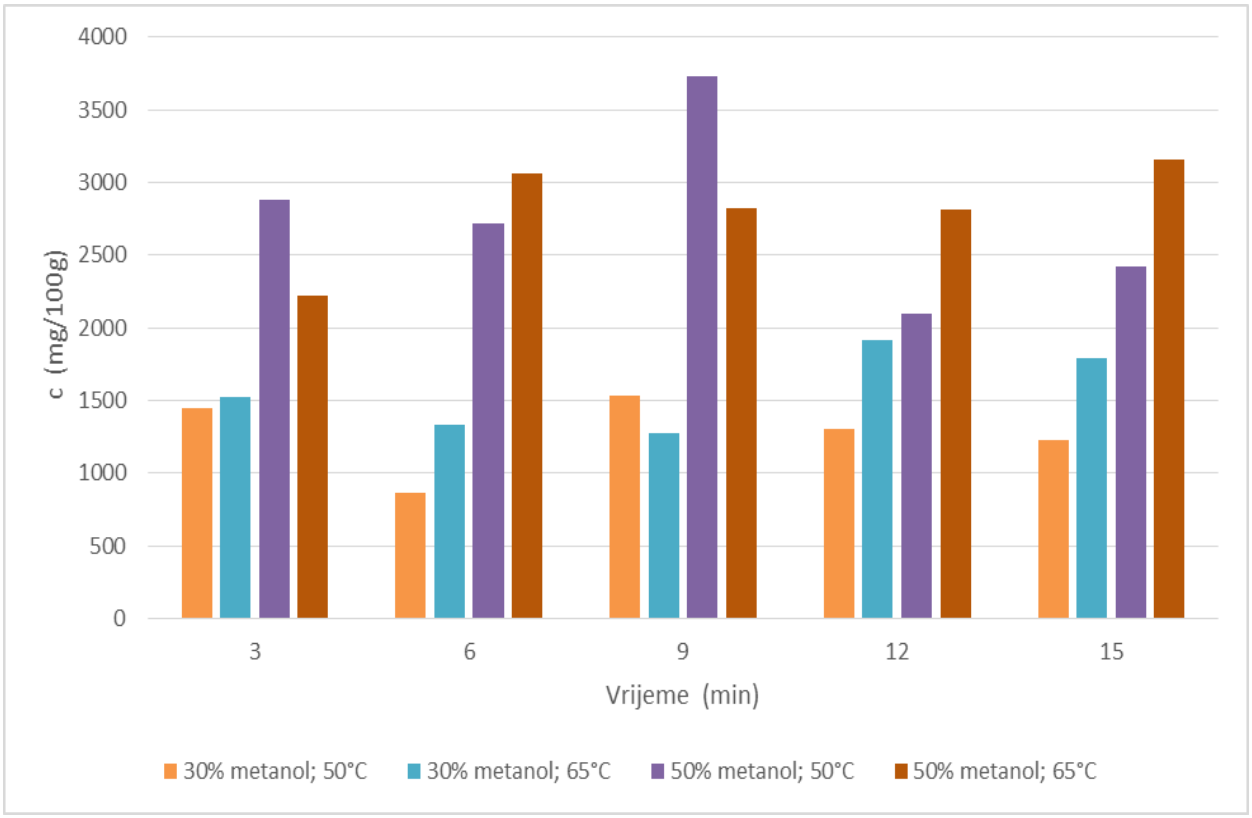
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 2. Rezultati određivanja polarnosti (%), temperature(°C), vremena (min), mase uzorka (g) i apsorbancije za otapalo metanol.

	Vrijeme (min)	Masa uzorka (g)	Apsorbancija (nm)
MeOH(30%) Temperatura(50° C)	3	0,5069	0,227
	3	0,5057	0,262
	6	0,5002	0,214
	6	0,5023	0,120
	9	0,5054	0,275
	9	0,5009	0,234
	12	0,5000	0,189
	12	0,5017	0,258
	15	0,5051	0,253
	15	0,5066	0,178
MeOH(50%) Temperatura(50° C)	3	0,5084	0,433
	3	0,5077	0,429
	6	0,5070	0,422
	6	0,5045	0,394
	9	0,5056	0,421
	9	0,5037	0,656
	12	0,5016	0,316
	12	0,5008	0,336
	15	0,5033	0,382
	15	0,5058	0,357
MeOH(30%) Temperatura(65° C)	3	0,5031	0,253
	3	0,5005	0,251
	6	0,5078	0,167
	6	0,5017	0,289
	9	0,5088	0,249
	9	0,5062	0,195
	12	0,5091	0,309
	12	0,5031	0,300
	15	0,5060	0,336
	15	0,5029	0,239
MeOH(50%) Temperatura(65° C)	3	0,5035	0,272
	3	0,5088	0,417
	6	0,5018	0,504
	6	0,5010	0,396
	9	0,5045	0,458
	9	0,5093	0,388
	12	0,5023	0,293
	12	0,5056	0,547
	15	0,5056	0,489
	15	0,5040	0,439

Tablica 3.

	Vrijeme (min)	Baždarna krivulja (mg/L)	Koncentracija (mg/L) * razrijeđenje	Koncentracija (mg/g)	mg/100g
MeOH(30%) Temperatura (50° C)	3	53,31	266,56	525,87	52586,80
	3	64,25	321,25	635,25	63525,81
	6	49,25	246,25	492,30	49230,31
	6	19,87	99,37	197,84	19783,99
	9	68,31	341,56	675,83	**67582,61**
	9	55,50	277,50	554,00	55400,28
	12	41,44	207,19	414,37	41437,50
	12	63,00	315,00	627,86	62786,52
	15	61,44	307,19	608,17	60817,16
	15	38,00	190,00	375,05	37504,93
MeOH(50%) Temperatura (50° C)	3	117,69	588,44	1157,43	115743,01
	3	116,44	582,19	1146,72	114671,55
	6	114,25	571,25	1126,72	112672,58
	6	105,50	527,50	1045,59	104558,99
	9	113,94	569,69	1126,75	112675,53
	9	187,37	936,87	1859,99	**185998,61**
	12	81,12	405,62	808,66	80866,23
	12	87,37	436,87	872,35	87235,42
	15	101,75	508,75	1010,82	101082,85
	15	93,94	469,69	928,60	92860,32
MeOH(30%) Temperatura (65° C)	3	61,44	307,19	610,59	61058,93
	3	60,81	304,06	607,51	60751,74
	6	34,56	172,81	340,32	34031,61
	6	72,69	363,44	724,41	72441,20
	9	60,19	300,94	591,46	59146,52
	9	43,31	216,56	427,82	42782,00
	12	78,94	394,69	775,26	77526,52
	12	76,12	380,62	756,56	75655,93
	15	87,37	436,87	863,39	**86338,93**
	15	57,06	285,31	567,33	56733,45
MeOH(50%) Temperatura (65° C)	3	67,37	336,87	669,07	66906,65
	3	112,69	563,44	1107,38	110738,50
	6	139,87	699,37	1393,73	139373,26
	6	106,12	530,62	1059,13	105913,17
	9	125,50	627,50	1243,81	124380,57
	9	103,62	518,12	1017,33	101732,77
	12	73,94	369,69	736,00	73598,94
	12	153,31	766,56	1516,14	**151614,42**
	15	135,19	675,93	1336,92	133690,17
	15	119,56	597,81	1186,16	118613,59



Slika 8. Grafički prikaz rezultata

Na osnovi rezultata dobivenih spektrofotomoetrijskim određivanjem koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lišća i cvijeta bijelog gloga (*Crataegus monogyna*) mg GAE/100g dobivenim primjenom MAE (tablica 2, tablica 3 i slika 8) vidljivo je:

- u 30 %-tnom metanolu pri temperaturi od 50° C, u vremenu trajanja 9 min ekstrahirano je najviše polifenola koncentracije 67582,61 mg/100 g gloga

- u 50 %-tnom metanolu pri temperaturi od 50° C, u vremenu trajanja 9 min ekstrahirano je najviše polifenola koncentracije 185998,61 mg/100 g gloga

- u 30 %-tnom metanolu pri temperaturi od 65° C, u vremenu trajanja 15 min ekstrahirano je najviše polifenola koncentracije 86338,93 mg/100 g gloga

- u 50 %-tnom metanolu pri temperaturi od 65° C, u vremenu trajanja 12 min ekstrahirano je najviše polifenola koncentracije 151614,42 mg/100 g gloga

- usporedba 30%-tne i 50%-tne vodene otopine metanola pri temperaturi 50° C:
    - rezultati su pokazali da se u 50%-tnoj otopini ekstrahiralo najviše polifenola koncentracije 185998,61 mg/100 g gloga, a u 30%-tnoj otopini najviša koncentracija polifenola iznosi 63525,81 mg/100 g gloga

- usporedba 30%-tne i 50%-tne vodene otopine metanola pri temperaturi 65° C:
    - rezultati su pokazali da se u 50%-tnoj otopini ekstrahiralo najviše polifenola koncentracije 86338,93 mg/100 g gloga, a u 30%-tnoj otopini najviša koncentracija polifenola iznosi 151614,42 mg/100 g gloga

5. ZAKLJUČAK

1. Primjenom oba ekstrakcijska otapala već nakon 6 minuta ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih polifenola bio je visok.

2. Najveća koncentracija ukupnih polifenola ekstrahirana je iz uzorka bijelog gloga sa 50%-tnim metanolom pri 50° C u vremenu od 9 minuta i ona iznosi 185998,61 mg/100 g gloga.

3. Ispitivanja su pokazala da su optimalna vremena svih ekstrakcija postignuta u trajanju od 9-12 minuta.

4. Daljnjim produžavanjem vremena ekstrakcije do 15 minuta nije došlo do povećanja ekstrakcijskog kapaciteta odnosno došlo je do manjeg pada što se može pripisati degradaciji polifenolnih spojeva.

5. Ukupna koncentracija polifenola iz lista i cvijeta gloga (*Crataegus monogyna*) pokazuje da je ekstrakcija aktivirana mikrovalovima uspješna metoda.

6. LITERATURA :

- Anonymous 2 (2015)< http://www.plantea.com.hr/glog>. Pristupljeno 20. Kolovoza 2015.
- Anonymous 1 (2011) < https://agroekonomija.wordpress.com/2011/05/11/stilbeni/>. Pristupljeno 20. Kolovoza 2015.
- Abert, V. M., Fernandez, X.,Visinoni, F., Chemat F. (2008): Microwave hydrodiffusion and gravity,a new technique for extraction of essential oils, J. Chrom. A, 1190, 14-17.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191-203.
- Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Science, 177, 143–155.
- Enciklopedija leksikografskog zavoda (1958)
- Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. Phytochemistry Reviews.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W. (2009) Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separ. Purif. Tech.* **70**, 63-70.
- HD Belitz, W Grosch: "Food Chemistry", Springer, Berlin, 3.izd. , 2004
- Kormin, F., Ahmed, I., Yunus, R. M., Yusof, Z. A. M. (2010) The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *Inter. J. Eng. Technol.* 10, 7-21.
- Manach C, Scalbert A, et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition79, 727-47.
- Pandey KB, Rizvi SI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2, 270-278.
- Piljac-Žegarac, J., Šamec, D. (2010). Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures.

- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. **2**, 152-159

- Stalikas, C.D. (2010). Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods.
- **S**utivisedsak, N., Cheng, H. N., Willett, J. L., Lesch, W. C., Tangsrud, R. R., Biswas, A. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Res. Int.* 43, 516-519.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients. 2, 12311246.