

Primjena novih tehnika u proizvodnji biljnih ekstrakata cvijeta trnine (Prunus Spinosa L.)

Lovrić, Vanja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:159:691419>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Vanja Lovrić

**PRIMJENA NOVIH TEHNIKA U
PROIZVODNJI BILJNIH EKSTRAKATA
CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Vanja Lovrić

**PRIMJENA NOVIH TEHNIKA U
PROIZVODNJI BILJNIH EKSTRAKATA
CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa* L.)**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and
Biotechnology

Vanja Lovrić

**APPLICATION OF NEW TECHNIQUES
FOR PRODUCTION OF PLANT
EXTRACTS FROM BLACKTHORN
FLOWERS (*Prunus spinosa* L.)**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

Zagreb, 2020.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana 27. siječnja 2016. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktora znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 8. ožujka 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva, Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća te u Laboratoriju za toksikologiju, u sklopu projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)“ koji je u potpunosti financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Informacije o mentoru

Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac je od 1993. godine pa do danas zaposlena na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a od siječnja 2013. godine izabrana je u nastavno zvanje redoviti profesor. Aktivno se bavi znanstveno-istraživačkim radom, te je objavila je preko 100 znanstvenih radova, od čega je 52 iz kategorije a1, objavljenih u časopisima visokog faktora odjeka koji su citirani 1400 puta. Uz navedene, objavila je također veći broj radova u časopisima indeksiranim u sekundarnim bazama podataka (a2), u knjigama radova s kongresa s međunarodnom recenzijom (a3), te je sudjelovala na velikom broju nacionalnih i međunarodnih kongresa.

Naročito se istakla u vođenju nacionalnih i projekata financiranih sredstvima EU na području prehrambene tehnologije i kemije hrane. Uspješno je provela IPA projekt “Sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) as an ingredient for functional food“, vrijednosti cca 500.000,00 eura, čijim sredstvima je opremila i osnovala Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva. Sudjelovala je kao suradnica na projektu „Processing Raw Materials into Excellent and Sustainable End products while Remaining Fresh“(FP7-KBBE-2009-3), 2010.-2014 vodila je projekt „Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina“ dobiven u okviru poziva RC.2.2.08: Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Regionalna konkurentnost 2007. -2013. (vrijednost projekta 4,2 milijuna HRK). Također je vodila projekt „Application of innovative technologies for production of plant extracts as ingredients for functional food“ (budžet 968.000,00 HRK) te projekta „Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma“ (budžet 1.500.000,00 HRK) financiranih sredstvima Hrvatske zaklade za znanost. Voditeljica je znanstvene faze 2: Identification, Extraction, Optimization, and Purification of biomolecules na projektu osnivanja Znanstvenog centra izvrsnosti- „Center of Excellence for Marine Bioprospecting BioProCro“ i projektu „Bioprospecting Jadranskog mora“ iz područja biotehničkih znanosti (2017.- 2022.; budžet 35.000.000,00 HRK) i suradnica na projektu opremanje poluindustrijskog praktikuma za razvoj novih prehrambenih tehnologija- “Priprema zalihe infrastrukturnih projekta za EFRR 2014.-2020.“ Europski fond za regionalni razvoj (2014.-2020.). Voditeljica je projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ u okviru

Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014. – 2020.“ KK.01.1.1.04.0093 (2019.-2022.) (budžet 7.200.000,00 HRK).

Aktivno sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim i diplomskim studijima te doktorskom studiju, a pod njezinim mentorstvom uspješno je obranjeno 7 doktorskih radova, 3 specijalistička rada te preko 120 diplomskih i završnih radova. Uvela je nove kolegije na studijima Nutricionizam, Prehrambena tehnologija i Prehrambeno inženjerstvo. Usavršavala se na University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Department of Food Science and Technology u Beču, Austrija. Tijekom 2019 i 2020. godine sudjelovala je u izradi izvješće radne skupine SAPEA pod nazivom "Towards a Sustainable Food System" kao predstavnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta te Akademije tehničkih znanosti Hrvatske.

Od 2009. do 2013. godine bila je predstojnica Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, a od 2013. pročelnica je Laboratorija za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva. Bila je predsjednica Izvršnog odbora „8. međunarodnog kongresa prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista“, 2012. -2014. te predsjednica Organizacijskog i Izvršnog odbora „7., 8. i 9. međunarodnog kongresa prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista“, (2011, 2014. i 2018. godine). Dobitnica je brojnih nagrada od kojih su najznačajnije: Godišnja državna nagrada za značajno znanstveno dostignuće, 2015. godine; RegioStars priznanje za najuspješnije proveden projekt iz operativnog programa: Regional Competitiveness 2007-2013. Call: „Strengthening capacities for research, development and innovation“, Brisel, 2016; Nagrada Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za objavljene radove u priznatim međunarodnim časopisima te izniman uspjeh u znanstveno-istraživačkom i nastavnom radu (2014.); Godišnje nagrada za popularizaciju i promidžbu znanosti, (2012.); Certifikat za najuspješniji lokalni EU projekt u RH za razdoblje od 2010. do 2013. godine (IPA projekt – Višnja maraska (*Prunus cerasus* var. Marasca) kao sastojak funkcionalne hrane)), Ministarstvo regionalnog razvoja i fondova EU te Zlatna plaketa ARCA 2015.- za isti IPA projekt, 8. Međunarodni sajam inovacija u poljoprivredi, prehrambenoj industriji i poljoprivrednoj mehanizaciji.

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u izradi ovoga rada, a posebno svojoj mentorici prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na stručnom vodstvu, razumijevanju, strpljenju i mnogobrojnim savjetima, članovima stručnog povjerenstva doc.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić, izv.prof.dr.sc. Ivani Kmetić i prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na velikoj pomoći i svim savjetima koje si mi dali.

Veliko hvala mojoj obitelji, a posebno mom suprugu i mojoj majci na pomoći, podršci i razumijevanju koje je pisanje ovog rada zahtijevalo.

Ovaj rad, kao i sve svoje uspjehe, dosadašnje i buduće posvećujem mojoj Maris i mom Mateju.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij - Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 547.56:582.639.41:615.849.11:66.094.3.097.8(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA NOVIH TEHNIKA U PROIZVODNJI BILJNIH EKSTRAKATA CVIJETA

TRNINE (*Prunus Spinosa* L.)

Vanja Lovrić, dipl. ing.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Zadru, Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća te u Laboratoriju za toksikologiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

Kratki sažetak doktorskog rada: Metodom odzivnih površina (RSM) provedena je optimizacija ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE), ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) i ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE) za dobivanje ekstrakta cvijeta trnina s najvišim udjelom ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Kod sve tri tehnike ispitivan je utjecaj otapala (50 i 70 % vodene otopine etanola i metanola), zatim utjecaj temperature (40, 50 i 60 °C) i vremena ekstrakcije (5, 15 i 25 min) kod MAE, utjecaj temperature (60, 80 i 100 °C) i broja ciklusa ekstrakcije (1,2 i 3) kod ASE, utjecaj temperature (40 i 60 °C), vremena ekstrakcije (5 i 15 min) i tlaka (200 i 500 MPa) kod HPAE. Najviši maseni udjeli ukupnih fenola (69,80 mg GAE/g) određeni su u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE uz vodenu otopinu etanola. Najviši maseni udjeli ukupnih flavonoida (18,22 mg QE/g) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (24,81 mg CAE/g) određeni su u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima ASE uz vodenu otopinu etanola. HPLC analizom je kao najdominantniji spoj određen kamferol-pentozyd (19,87 mg/g u vodenoj otopini metanola, 18,55 mg/g u vodenoj otopini etanola) u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE, odnosno procijandin B1 (26,98 mg/g u vodenoj otopini metanola, 22,9 mg/g u vodenoj otopini etanola) u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima ASE. U svim ekstraktima primjenom DPPH i FRAP metode određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, a najviše su određene u ekstraktima dobivenim pomoću HPAE i ASE. Primjenom *in vitro* metoda *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* utvrđen je antiproliferativan učinak cvijeta trnina na Hep G2 stanice, ovisan o koncentraciji ekstrakta i duljini inkubacije. Pri tretmanu stanica s najnižom koncentracijom ekstrakta cvijeta trnina (10 µg/mL) određen je najveći udio apoptotičkih stanica u kulturi (36,75 %).

Broj stranica: 180

Broj slika: 51

Broj tablica: 32

Broj literaturnih navoda: 204

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: cvijet trnina, fenolni spojevi, MAE, ASE, HPAE, antioksidacijski kapacitet, antiproliferativan učinak

Datum obrane: 9.12.2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetić
3. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Ph. D. Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate university doctoral study Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 547.56:582.639.41:615.849.11:66.094.3.097.8(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Food Technology

APPLICATION OF NEW TECHNIQUES FOR PRODUCTION OF PLANT EXTRACTS FROM BLACKTHORN FLOWERS (*Prunus spinosa* L.)

B.Sc. Vanja Lovrić

Thesis was performed at Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds in Zadar, in Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables and in Laboratory for Toxicology, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb.

Supervisor: Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

Short abstract Response surface methodology (RSM) was used for optimization of microwave assisted extraction (MAE), accelerated solvent extraction (ASE), high pressure-assisted extraction (HPAE) in order to obtain blackthorn flower extract with highest content of total phenols, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids. In all three techniques, the effect of solvents was examined (50 and 70 % aqueous solutions of ethanol and methanol), then the effect of temperature (40, 50 and 60 °C) and time of extraction (5, 15 and 25 min) in MAE, effect of temperature (60, 80 and 100 °C) and number of cycles (1,2 and 3) in ASE, effect of temperature (40 and 60 °C), extraction time (5 and 15 min) and pressure (200 and 500 MPa) in HPAE. The highest content of total phenolic (69,80 mg GAE/g) was determined in extracts obtained under optimal MAE conditions with aqueous ethanol solution. The highest content of total flavonoids (18,22 mg QE/g) and total hydroxycinnamic acids (24,81 mg CAE/g) were determined in extracts obtained under optimal ASE conditions with aqueous ethanol solution. Using HPLC kaempferol pentoside was determined as the most dominant compound (19,87 mg/g in aqueous methanol solution, 18,55 mg/g in aqueous ethanol solution) in extracts obtained under optimal MAE conditions, ie procyanidin B1 (26,98 mg/g in aqueous methanol, 22,9 mg/g in aqueous ethanol) in extracts obtained under optimal ASE conditions. By using DPPH and FRAP methods high values of antioxidant capacity were determined in all extracts, and the highest were determined in extracts obtained by using HPAE and ASE. Using *in vitro* methods *Kenacid Blue*, *Neutral Red* and *Trypan Blue*, the antiproliferative effect of blackthorn flower on Hep G2 cells, depending on the extract concentration and incubation length, was determined. When treating the cells with the lowest concentration of blackthorn flower extract (10 µg/mL), the highest proportion of apoptotic cells in the culture was determined (36,75 %).

Number of pages: 180

Number of figures:51

Number of tables:32

Number of references: 204

Original in: Croatian

Key words: blackthorn flower, phenolic compounds, MAE, ASE, HPAE, antioxidant capacity, antiproliferative effect

Date of the thesis defense: 9th of December 2020

Reviewers:

1. Ph.D. Ivona Elez Garofulić, Assistant professor
2. Ph.D. Ivana Kmetič, Associate professor
3. Ph.D. Sanda Vladimir-Knežević, Full professor

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

SAŽETAK

Trnina (*Prunus spinosa* L.) (Rosaceae) je samonikla biljna vrsta koja zahvaljujući svom sastavu i biološki aktivnim spojevima ima visok biološki potencijal i predstavlja potencijalnu sirovinu za proizvodnju visokovrijednih biljnih ekstrakata. Među ostalim biološki aktivnim spojevima cvijeće trnine sadrži fenolne spojeve. Obzirom da kvaliteta biljnih ekstrakata i količina fenolnih spojeva u njima značajno ovisi o tehnici i postavljenim parametrima ekstrakcije, važno je odabrati parametre ekstrakcije koji će osigurati maksimalne ekstrakcijske prinose. Naspram tradicionalnih tehnika koje su dugotrajne i skupe te često rezultiraju nižim ekstrakcijskim prinosima, u zadnje vrijeme sve je češća upotreba inovativnih ekstrakcijskih tehnika u koje se ubrajaju i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE) te ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. *high pressure-assisted extraction*, HPAE). U sklopu ovog istraživanja korištena je metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) s ciljem optimizacije ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine pomoću MAE, ASE i HPAE. Kod sve tri tehnike ispitivan je utjecaj polarnosti otapala (50 i 70 % vodene otopine etanola i metanola), zatim utjecaj temperature (40, 50 i 60 °C) i vremena ekstrakcije (5, 15 i 25 min) kod MAE, utjecaj temperature (60, 80 i 100 °C) i broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3) kod ASE te utjecaj temperature (40 i 60 °C), vremena ekstrakcije (5 i 15 min) i tlaka (200 i 500 MPa) kod HPAE.

Učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine ovisi o primijenjenoj tehnici ekstrakcije, primijenjenim uvjetima ekstrakcije, kao i o ciljanoj skupini fenolnih spojeva.

Kod MAE optimalni uvjeti pri kojima se ostvaruju veći prinosi istraživanih skupina fenolnih spojeva (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline) su primjena 70 % vodene otopine etanola ili metanola. Za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine etanola optimalni uvjeti ekstrakcije su temperatura 60 °C te vrijeme 25 minuta, a za ekstrakte dobivene primjenom vodenih otopina metanola optimalna je temperatura 54 °C i vrijeme ekstrakcije 16 min.

Kod ASE veće prinose fenolnih spojeva osigurava primjena 68 % vodene otopine etanola odnosno primjena 70 % vodene otopine metanola. Za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine etanola optimalna je temperatura ekstrakcije 100 °C uz provođenje ekstrakcije u 3 ciklusa; a za ekstrakte dobivene primjenom vodenih otopina metanola optimalna je temperatura ekstrakcije 100 °C uz 1 ciklus ekstrakcije.

Kod HPAE optimalnima su se pokazale 70 % vodene otopine etanola ili metanola. Za

ekstrakte dobivene primjenom vodenih otopina etanola optimalni su vrijeme ekstrakcije 5 min, temperatura ekstrakcije 60 °C i tlak 200 MPa, a za ekstrakte dobivene primjenom vodenih otopina metanola optimalno je vrijeme ekstrakcije 5 min, temperatura ekstrakcije 40 °C i tlak 500 MPa.

Prema rezultatima optimizacije ekstrakcije fenolnih spojeva cvijeta trnine, najviši maseni udjeli ukupnih fenola određeni su u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima MAE (69,80 mg GAE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine etanola i 63,42 mg GAE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine metanola).

Najviši maseni udjeli ukupnih flavonoida (18,22 mg QE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine etanola i 17,34 mg QE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine metanola) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (24,81 CAE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine etanola i 24,20 CAE/g u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine metanola) određeni su u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima ASE.

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim pri optimalnim uvjetima ASE i MAE identificirano je 7 flavonol glikozida (kamferol-pentozid, kamferol-ramnozid, kamferol-heksozil ramnozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-rutinozid, kvercetin-pentozid i kvercetin-acetil-rutinozid), 2 flavanola (procijanidin B1 i katehin) te 4 hidroksicimetne kiseline (neoklorogenska kiselina, 3-*p*-kumaroilkinska kiselina, klorogenska kiselina i kafeinska kiselina.). Sastav navedenih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine je bio isti neovisno o primijenjenoj tehnici ekstrakcije s izuzetkom ekstrakata dobivenih primjenom MAE uz upotrebu vodene otopine etanola u kojima kvercetin-pentozid i kvercetin-ramnozid nisu identificirani. Maseni udjeli navedenih spojeva varirali su u ovisnosti o primijenjenoj tehnici ekstrakcije kao i o primijenjenom otapalu za ekstrakciju. Kamferol-pentozid je najzastupljeniji spoj u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom MAE, a procijandin B1 u ekstraktima dobivenima primjenom ASE. Navedeni spojevi zajedno čine oko 50 % svih identificiranih spojeva u ekstraktima dobivenim primjenom MAE i ASE.

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine razlikovao se ovisno o tehnici ekstrakcije, primijenjenim uvjetima ekstrakcije i metodi određivanja a optimalni uvjeti pri kojima se postižu maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta različiti su od uvjeta optimalnih za ekstrakciju fenolnih spojeva. Na osnovu rezultata optimizacije, vidljivo je da je najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine moguće ostvariti primjenom HPAE uz 50 % vodenu otopinu etanola te vrijeme ekstrakcije 5 min, temperaturu

ekstrakcije 40 °C i tlak 500 MPa. U slučaju određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, moguće se ostvariti primjenom ASE uz 70 % vodenu otopinu etanola, temperaturu ekstrakcije 86 °C i provođenjem ekstrakcije u 3 ciklusa.

Citotoksični učinci ekstrakta cvijeta trnine ovisni su o koncentraciji ekstrakta trnine i vremenu inkubacije Hep G2 stanica. Na osnovu IC_{50} vrijednosti ekstraktu cvijeta trnine se može pripisati umjerena toksična aktivnost, neovisno o metodi korištenoj za određivanje antiproliferativnog učinka i dužini izlaganja Hep G2 stanica ekstraktu cvijeta trnine. Pri najnižoj ispitanoj koncentraciji (10 µg/mL) ekstrakta cvijeta trnine- metodom protočne citometrije je zabilježen najveći udio apoptotičkih stanica (36,75 %).

Ključne riječi: cvijet trnine, fenolni spojevi, MAE, ASE, HPAE, antioksidacijski kapacitet, antiproliferativan učinak

SUMMARY

Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) (Rosaceae) is a wild plant specie, which, due to its composition and biologically active compounds, has a high biological potential and represents a potential raw material for the production of high-value plant extracts. Among other biologically active compounds, blackthorn flowers contain phenolic compounds. Since the quality and the amount of phenolic compounds in plant extracts significantly depends on the technique and extraction parameters applied, it is important to choose extraction parameters that ensure maximum extraction yields. In contrast to traditional techniques which are time-consuming, expensive and often result in lower extraction yields, the usage of innovative extraction techniques, which include microwave-assisted extraction (MAE), accelerated solvent extraction (ASE) and high hydrostatic pressure assisted extraction (HPAE), has recently become more common. As part of this study, the Response Surface Methodology (RSM) was used in order to optimize the extraction of phenolic compounds from the blackthorn flower using MAE, ASE and HPAE. In all three techniques, the influence of solvent (50 and 70% aqueous ethanol and methanol solution) was examined, then the influence of temperature (40, 50 and 60 °C) and extraction time (5, 15 and 25 min) in MAE, the influence of temperature (60, 80 and 100 °C) and the number of extraction cycles (1, 2 and 3) in ASE and the influence of temperature (40 and 60 °C), extraction time (5 and 15 min) and pressure (200 and 500 MPa) in HPAE.

The efficiency of extraction of phenolic compounds from the blackthorn flowers depends on the extraction technique and conditions applied, as well as the target group of phenolic compounds.

In MAE, the optimal conditions, under which higher yields of the investigated groups of phenolic compounds (total phenols, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids) are achieved are: 70 % aqueous solution of ethanol or methanol. For extracts obtained using aqueous ethanol solution, the optimal extraction conditions are: temperature of 60 °C and a time of 25 minutes, and for extracts obtained using aqueous solutions of methanol, the optimal temperature is 54 °C and an extraction time of 16 min.

In ASE, higher yields of phenolic compounds are ensured by the usage of 68 % aqueous ethanol solution and the usage of 70 % aqueous methanol solution. For extracts obtained using aqueous ethanol solution, the optimum extraction temperature is 100 °C with 3 cycles of extraction and for extracts obtained using aqueous solutions of methanol, the optimal extraction temperature is 100 °C with 1 extraction cycle.

In HPAE, 70 % aqueous ethanol or methanol solutions proved to be optimal. For extracts obtained using aqueous ethanol solutions, the optimal extraction time is 5 min, extraction temperature 60 °C and pressure 200 MPa and for extracts obtained using aqueous methanol solutions, the optimal extraction time is 5 min, extraction temperature 40 °C and pressure 500 MPa.

According to the results of optimization phenolic compounds extraction from blackthorn flower, the highest content of total phenols was determined in blackthorn flower extracts produced under optimal MAE conditions (69,80 mg GAE/g in extracts obtained with aqueous ethanol solution and 63,42 mg GAE/g in extracts obtained using an aqueous solution of methanol).

The highest content of total flavonoids (18,22 mg QE/g in extracts obtained with aqueous ethanol solution and 17,34 mg QE/g in extracts obtained with aqueous methanol solution) and total hydroxycinnamic acids (24,81 CAE/g in extracts obtained with aqueous ethanol solution and 24,20 CAE/g in extracts obtained with aqueous methanol solution) was determined in blackthorn flower extracts produced under optimal ASE conditions.

In blackthorn flower extracts obtained under optimal conditions of ASE and MAE, 7 flavonol glycosides (kaempferol -pentoside, kaempferol-rhamnoside, kaempferol-hexosyl rhamnoside, quercetin-rhamnoside, quercetin-rutinoside, quercetin-pentoside and quercetin-acetyl rutinoside), 2 flavanols (procyanidin B1 and catechin) and 4 hydroxycinnamic acids (neochlorogenic acid, 3-*p*-coumaroylquinic acid, chlorogenic acid and caffeic acid) were identified. The composition of these compounds in blackthorn flower extracts was the same regardless of the extraction technique used, with the exception of extracts obtained by MAE using an aqueous ethanol solution, in which quercetin-pentoside and quercetin-rhamnoside were not identified. The mass fractions of these compounds varied depending on the extraction technique as well as the extraction solvent used.

Kaempferol pentoside is the most abundant compound in blackthorn flower extracts obtained using MAE, and procyanidin B1 in extracts obtained using ASE. These compounds together make up about 50 % of all identified compounds in extracts obtained using MAE and ASE.

The antioxidant capacity of blackthorn flower extracts differed depending on the extraction technique and conditions applied and also method of determination. Optimal conditions, under which maximum values of antioxidant capacity are achieved, are different from the conditions optimal for extraction of phenolic compounds.

Based on the optimization results, the highest values of antioxidant capacity in blackthorn

flower extracts can be achieved by applying HPAE using 50 % aqueous ethanol solution, extraction time 5 min, extraction temperature 40 °C and pressure 500 MPa. In the case of determining the antioxidant capacity by the FRAP method the highest value of antioxidant capacity is possible to achieve by applying ASE using 70 % aqueous ethanol solution, extraction temperature 86 °C and performing extraction in 3 cycles.

The toxic activity of blackthorn flower extract depends on the concentration of blackthorn extract and the incubation time of Hep G2 cells. Based on the IC₅₀ value, moderate toxic activity can be attributed to blackthorn flower extract, regardless of the method used to determine antiproliferative effect and the length of exposure of Hep G2 cells to blackthorn flower extract. At the lowest tested concentration of blackthorn flower extract (10 µg/mL) - by flow cytometry, the highest proportion of apoptotic cells was recorded (36,75 %).

Keywords: blackthorn flower, phenolic compounds, MAE, ASE, HPAE, antioxidant capacity, antiproliferative effect

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Trnina (<i>Prunus spinosa</i> L.)	3
2.2. Fenolni spojevi trnine	5
2.2.1. Flavonoidi.....	7
2.2.2. Fenolne kiseline.....	9
2.3. Biološka svojstva fenolnih spojeva.....	11
2.3.1. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva	13
2.3.2. Antikancerogena svojstva fenolnih spojeva	17
2.4. Tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva	20
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	22
2.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	26
2.4.3. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom	31
3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1. Materijal.....	37
3.1.1. Biljni materijal.....	37
3.1.2. Biološki materijal	37
3.1.3. Kemikalije i standardi	38
3.1.4. Oprema	40
3.2. Metode rada	41
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	41
3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	43
3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom	45
3.2.4. Određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine	48
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine	52
3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju ...	55

3.2.7.	Određivanje citotoksičnog/antiproliferativnog učinka ekstrakta cvijeta trnine .	57
3.2.7.1.	Uzgoj i održavanje Hep G2 stanica.....	57
3.2.7.2.	Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	57
3.2.7.3.	Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica primjenom <i>Trypan Blue</i> , <i>Kenacid Blue</i> i <i>Neutral Red</i> metoda	58
3.2.7.4.	Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica metodom protočne citometrije.....	60
3.2.8.	Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka	62
4.	REZULTATI	64
4.1.	Rezultati usporednog određivanja utjecaja ekstrakcijske tehnike na prinose fenolnih spojeva.....	64
4.1.1.	Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na prinose fenolnih spojeva	64
4.1.2.	Utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na prinose fenolnih spojeva.....	71
4.1.3.	Utjecaj ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom na prinose fenolnih spojeva	78
4.2.	Rezultati analize pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC)	86
4.3.	Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine	88
4.4.	Rezultati određivanja antiproliferativnog/citotoksičnog učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanične linije	100
4.4.1.	Rezultati određivanja vijabilnosti Hep G2 stanica metodom protočne citometrije nakon tretmana stanica ekstraktom cvijeta trnine	105
5.	RASPRAVA	107
5.1.	Usporedba tehnika ekstrakcije	107
5.1.1.	Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	108
5.1.2.	Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	116
5.1.3.	Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom	124
5.2.	Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske	

kromatografije (HPLC)	134
5.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine	138
5.3.1. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije potpomognute mikrovalovima	138
5.3.2. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku	141
5.3.3. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom.....	145
5.4. Antiproliferativno djelovanje ekstrakata cvijeta trnine	149
5.4.1. Određivanje vijabilnosti Hep G2 stanica metodom protočne citometrije nakon tretmana stanica ekstraktom cvijeta trnine	154
6. ZAKLJUČCI	157
7. LITERATURA	160
8. ŽIVOTOPIS.....	179

1. UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samonikla biljna vrsta koju ima visoki biološki potencijal i uz čiju se upotrebu još od davnih vremena vežu brojni pozitivni utjecaji na zdravlje čovjeka. Visoki biološki potencijal trnina ima zahvaljujući biološki aktivnim sastavnicama, među kojima posebno mjesto zauzimaju fenolni spojevi. Gotovo svi dijelovi biljke, uključujući plod, grane, list i cvijet sadrže različite fenolne spojeve koji, ovisno o strukturnim, fizikalnim i kemijskim svojstvima, pokazuju više ili manje izraženo antioksidacijsko i antiproliferativno djelovanje.

S obzirom da se fenolni spojevi strukturno značajno razlikuju, važno je izabrati adekvatnu tehniku ekstrakcije te za svaku odabranu tehniku optimirati uvjete ekstrakcije pri kojima se dobivaju veći prinosi fenola te osigurava stabilnost tijekom ekstrakcije. Najčešće tehnike ekstrakcije fenolnih spojeva iz prirodnih materijala su različiti konvencionalni postupci kao što su maceracija i Soxlet ekstrakcija. One se zbog svojih nedostataka u posljednje vrijeme sve više zamjenjuju novim, ekološki prihvatljivijim tehnikama u koje se ubrajaju ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HPAE). Prema istraživanjima nekih autora pokazalo se da navedene tehnike pri određenim uvjetima osiguravaju veće prinose fenolnih spojeva. Kao prednosti ovih tehnika važno je također istaknuti skraćivanje vremena ekstrakcije, smanjene potrošnje otapala te veću stabilnost ciljanih skupina fenolnih spojeva, što ih čini pogodnijima za proizvodnju prirodnih biljnih ekstrakata u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije.

Jedan od ključnih koraka u proizvodnji biljnih ekstrakata je odabir učinkovite metode ekstrakcije i definiranje optimalnih ekstrakcijskih parametara za pojedinu biljnu vrstu kako bi se dobili maksimalni prinosi ciljanih skupina bioaktivnih spojeva, te tako ostvarila isplativost i ekonomičnost cjelokupnog procesa proizvodnje.

MAE je tehnika kod koje se ekstrakcija ciljanih spojeva postiže kombinacijom tradicionalne ekstrakcije otapalima i zagrijavanjem mikrovalovima. Upotrebom MAE u proizvodnji biljnih ekstrakata omogućuje se smanjenje količine otapala i biljnog materijala, potrošnje energije i temperature te se skraćuje vrijeme ekstrakcije, uz bolju separaciju bioaktivnih spojeva i općenito veće ekstrakcijske prinose. Uz MAE, ASE je jedna od ekstrakcijskih tehnika koja je također prepoznata kao ekstrakcijska tehnika visokog potencijala zahvaljujući prednostima u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Mogućnost postizanja visokog ekstrakcijskog prinosa, uz potpuno kontrolirane uvjete, čine ovu ekstrakcijsku tehniku jednom od najčešće primjenjivanih tehnika za proizvodnju biljnih ekstrakata u posljednjih nekoliko godina. HPAE je ekstrakcijska tehnika koja podrazumijeva

podvrgavanje uzorka viskom vrijednostima tlaka, s ciljem učinkovitije ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Upotrebom HPAE moguće je izbjeći degradaciju termolabilnih spojeva i povećati ekstrakcijske prinose, uz skraćeno vrijeme ekstrakcije i smanjenu upotrebu otapala. Stoga se toj tehnici u posljednje vrijeme daje prednost u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije.

Navedene tehnike ekstrakcije primjenjivane su za izolaciju fenolnih spojeva iz različitih biljnih vrsta. No, unatoč spomenutom visokom biološkom potencijalu trnine, istraživanja na trnini, a posebno na cvijetu trnine su rijetka te nedostaju rezultati sistematskog istraživanja usmjerenog na ispitivanje fenolnog sastava odnosno mogućnosti primjene novih tehnika ekstrakcije. Stoga je cilj ovog istraživanja usporediti utjecaj novih tehnika ekstrakcije: ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE), ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) i ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (HPAE) na prinose fenolnih spojeva iz cvijeta trnine te definirati optimalne uvjete ekstrakcije za svaku ekstrakcijsku tehniku, definirati sastav i količinu fenolnih spojeva, antioksidacijski kapacitet te antiproliferativni odnosno citotoksični učinak dobivenih ekstrakata.

Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ispitivat će se utjecaj vrste i polarnosti otapala: (50 i 70 %; v/v) vodene otopine etanola i metanola, temperature (40-60 °C), snage mikrovalova (200-300 W) te vremena ekstrakcije (5-25 min).

Kod ubrzane ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku ispitivat će se utjecaj vrste i polarnosti otapala: (50 i 70 %; v/v) vodene otopine etanola i metanola, broja ciklusa (1-3 ciklusa u trajanju 5 min) i temperature (60-100 °C).

Pri primjeni ekstrakcije potpomognute visokim tlakom istražiti će se utjecaj vrste i polarnosti otapala (50 i 70 %; v/v) vodene otopine etanola i metanola), primijenjenog tlaka (200-500 MPa), temperature (40-60 °C) i vremena ekstrakcije (5-15 min).

U svim ekstraktima cvijeta trnine, neovisno o primijenjenoj tehnici ekstrakcije odredit će se sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina kao i antioksidacijski kapacitet primjenom dviju različitih metoda (DPPH i FRAP metode). Definiranje optimalnih uvjeta provest će se za svaku od ekstrakcijskih tehnika i te će se izdvojiti ekstrakti s najvećom količinom fenolnih spojeva. U ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima također će se ispitati antiproliferativni/citotoksični učinci pomoću različitih *in vitro* metoda na kulturama humane Hep G2 stanične linije.

2. OPĆI DIO

2.1. Trnina (*Prunus spinosa* L.)

Trnina (*Prunus spinosa* L., Rosaceae) je samonikla biljna vrsta koja raste u obliku velikog trnovitog grma ili rjeđe u obliku malenog, do 5 metara visokog drva (Grlić, 1990). Rasprostranjena je u jugoistočnoj Europi, izuzev donje polovice Iberijskog poluotoka. Raste od sjevernog do južnog dijela Skandinavskog poluotoka, na istoku dopire do Male Azije, Kavkaza i Kaspijskog jezera, te na području Južnih Alpa (Švicarska). Populacije ove biljne vrste su također pronađene i u Tunisu i Alžiru, a donesena je i uzgojena u Sjevernoj Americi i na Novom Zelandu (Popescu i Caudullo 2016). U Hrvatskoj je trnina vrlo rasprostranjen grm koji raste u svijetlim hrastovim šumama, po brežuljcima, kamenitom i sunčanom tlu, sam ili među drugim grmljem i živicom. Poznata je po nazivima trnjina, trnula, trnavka, trn, crni trn, divlja šljiva, grmulja, kukinja (Grlić, 1990; Pleše, 2002). U *tablici 1* navedena je sistematika trnine.

Tablica 1. Sistematika trnine (*Prunus Spinosa* L.) (USDA Plant database, 2020)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	<i>Plantae</i>
Podcarstvo	<i>Tracheobionta</i>
Odjel	<i>Spermatophyta</i>
Pododjel	<i>Magnoliophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred	<i>Rosidae</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Rosaceae</i>
Rod	<i>Prunus</i> L.
Vrsta	<i>Prunus spinosa</i> L.

Trnina cvijeta od ožujaka do svibnja (Popescu i Caudullo, 2016). Bijeli mirisni cvjetovi trnine (*slika 1*) sastoje se od pet latica i pojavljuju se pojedinačno ili u skupinama od dva do tri cvijeta, prije listanja, tako gusto da se od njih ne vide grane trnine (Pleše, 2002). Samo mali dio cvjetova rodi u plodove koji dozrijevaju u kolovozu a ostaju na stablu tijekom zime čvrsto se držeći grana (Grlić, 1990).



Slika 1. Cvjetovi trnine (Anonymous 1, 2017)

Plodovi trnine (*slika 2*) su plavkasto crne boje, okruglog oblika promjera 1-1,5 cm, iznutra mesnati i zeleni a meso im je trpko i kiselo. Tek nakon mraza su dobri za jelo jer im je tada okus nešto blaži zbog povećanog sadržaja šećera i manjeg udjela kiselina u njima (Grlić, 1990; Pleše, 2002). Kora biljke je, ovisno od starosti, siva do tamnosiva, a kratki izbojci redovno završavaju s crnim jakim trnom (Šilić, 1983). Grm trnine živi oko 40 godina (Grlić, 1990; Pleše, 2002)



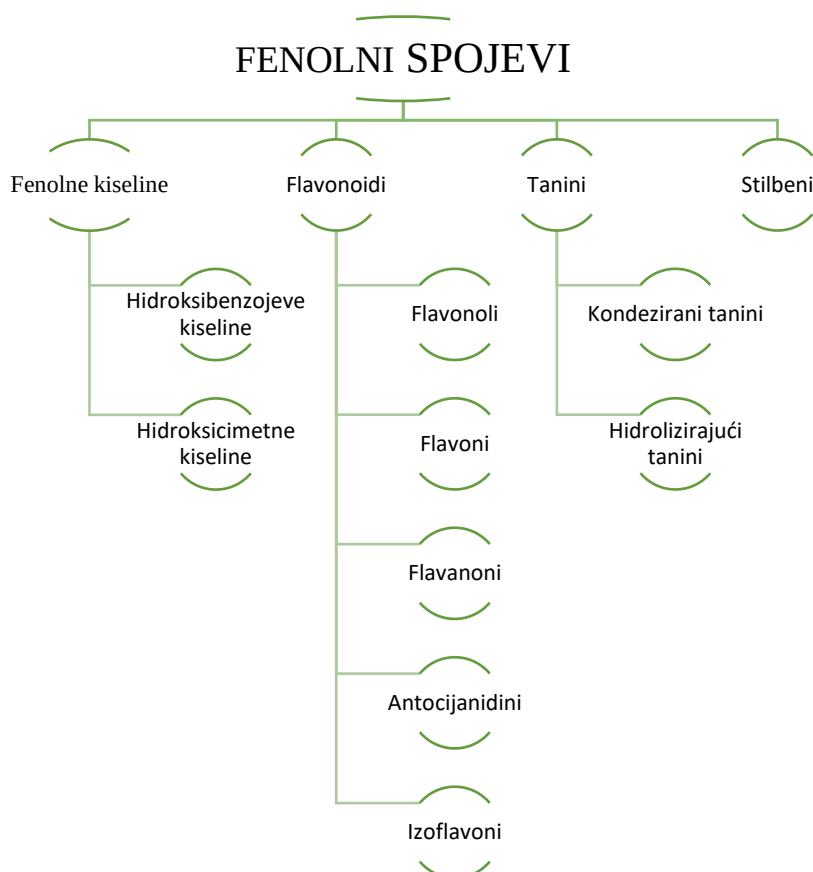
Slika 2. Plodovi trnine (Anonymous 2, 2017)

Gotovo svi dijelovi biljke, uključujući plodove, koru, korijen, lišće i cvjetove korišteni su od antičkih vremena za liječenje različitih bolesti, a od davnina se koristi za prehrambene i ljekovite svrhe (Pleše, 2002; Owczarek i sur., 2017). Cvjetovi trnine tradicionalno se primjenjuju u obliku čaja, sirupa, svježeg soka ili tinkture u prevenciji i ublažavanju proljeva,

anemije i drugih bolesti. Ekstrakti cvjetova trnine poznati su po svojim protuupalnim, diuretičkim, spazmolitičkim i blago laksativnim svojstvima te kao sredstva za ublažavanje bolesti krvožilnog sustava (Olszewska i Wolbiś, 2001). Pronalasci sjemenki iz doba neolita ukazuju na vrlo dugu tradiciju primjene trnine u prehrani. Prema nekim naznakama, stari Rimljani su je jeli kao voće (Grlić, 1990), a još i danas se u nekim zemljama plodovi sakupljaju i koriste za jelo (Pleše, 2002). Proizvode se džemovi, želei, konzervansi, vino, ocat, destilirana alkoholna pića ili se upotrebljavaju u slastičarstvu. Zbog sadržaja bioaktivnih spojeva, poput vitamina C i fenolnih kiselina, trnina je prepoznata kao bogat izvor prirodnih antioksidansa te ujedno kao biljna sirovina visokog biološkog potencijala (Grlić, 1990; Pleše, 2002).

2.2. Fenolni spojevi trnine

Fenolni spojevi su strukturno vrlo raznolika skupina sekundarnih biljnih metabolita, čiju osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998). Različita struktura fenolnih spojeva je povezana s različitim svojstvima, odnosno njihovim specifičnim ulogama u biljkama (Bravo, 1998; Cheynier, 2012). Osnova podjela fenolnih spojeva prikazana je na slici 3.



Slika 3. Glavne skupine fenolnih spojeva (Ozcan i sur., 2014)

Fenolni spojevi, između ostalog, imaju važnu ulogu u rastu i reprodukciji biljaka, pružaju učinkovitu zaštitu od patogena i grabežljivaca te doprinose njihovim senzorskim i prehrambenim svojstvima. Količina fenolnih spojeva u pojedinim biljnim vrstama ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su agroekološki uvjeti, tehnike uzgoja, sorta, proces zrenja te obrada i uvjeti skladištenja (Naczki i Shahidi, 2006).

Poznato je da trnina obiluje bioaktivnih sastavnicama, među kojima se ističu fenolni spojevi. Dosadašnja fitokemijska istraživanja bila su većinom usmjerena na određivanje sastava ploda trnine. Ruiz-Rodríguez i sur. (2014) su određivali vrijednosti fenolnih spojeva u plodovima trnine s različitih lokacija iz Španjolske. U svježim plodovima trnine određen je sadržaj vode, nakon čega su plodovi osušeni i kao takvi korišteni za postupak ekstrakcije. U uzorcima prikupljenim tijekom tri uzastopne godine prosječni maseni udjeli ukupnih flavonola iznosili su 134,01 mg rutina/100 g svježeg ploda trnine, ukupnih fenolnih kiselina 728,81 mg galne kiseline /100 g svježeg ploda trnine, ukupnih antocijanina 1431,75 mg pelargonidina/ 100 g svježeg ploda trnine dok su maseni udjeli ukupnih fenola (izraženi kao suma određivanih fenolnih skupina) iznosili 2294,57 mg/100 g.

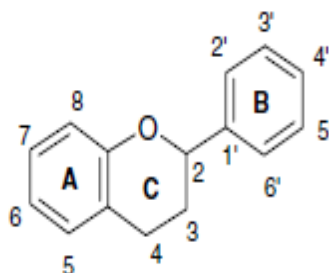
Slično istraživanje provedeno je na svježim plodovima tri različite vrste samoniklog bobičastog voća (trnina, divlja borovnica, europski drijen) s područja Srbije, u sklopu kojeg je provedena kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva te ispitan antioksidacijski kapacitet i antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata. Između ostalog, u dobivenim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih fenola koji je u plodu trnine iznosio 7959,90 mg GAE/kg svježeg ploda (Radovanović i sur., 2013).

U istraživanju koje su proveli Velickovic i sur. (2014) ukupni fenoli u plodu trnine određeni su u masenim udjelima od 15,33 mg do 20,94 mg GAE/g svježeg ploda, u ovisnosti o primijenjenom otapalu za ekstrakciju, što je znatno više od masenih udjela 0,45-0,85 mg GAE/g koje su Dragović-Uzelac i sur. (2007) odredili u ekstraktima plodova dobivenim primjenom 80 %-tnog etanola.

Pinacho i sur. (2015) su određivali masene udjele ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ekstraktima plodova, listova i grana trnine. Ukupni fenoli, određeni su redom, ovisno o primijenjenom ekstrakcijskom otapalu u sljedećim rasponima: u ekstraktima grana 21,30-732,34 mg GAE/g, plodova 184,77-359,11 mg GAE/g i listova trnine 38,57-228,56 mg GAE/g. Vrijednosti ukupnih flavonoida u ekstraktima grana, plodova i listova iznosile su redom kako slijedi: od < 0,01 do 554,83 mg RE/g, 35,51-141,80 mg RE/g te od <0,01 do 196,88 mg RE /g.

2.2.1. Flavonoidi

Zahvaljujući velikoj rasprostranjenosti u biljkama i dobro poznatom blagotvornom djelovanju na zdravlje ljudi, flavonoidi su najviše istražena skupina fenolnih spojeva (Kaleem i Ahmad, 2018). Prema podacima iz literature, poznato je oko 8000 flavonoida (Giada, 2013). Obilježava ih niska molekulska masa, a sastoje se od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u C6-C3-C6 konfiguraciju, odnosno njihovu strukturu čine dva aromatska prstena (A i B), povezana s 3-C mostom, obično u obliku heterocikličkog prstena (*slika 4*).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

Flavonoid	Osnovna struktura
Flavoni	
Flavonoli	
Flavanoni	
Flavanoli	
Antocijanidini	
Izoflavoni	

Slika 5. Kemijska struktura glavnih skupina flavonoida (Giada, 2013)

Prema stupnju hidroksilacije i prisutnosti C2-C3 dvostruke veze u heterocikličkom piranskom prstenu, flavonoidi se mogu podijeliti u 13 skupina, a najvažniji predstavnici flavonoida su flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni (slika 5). Podskupine flavonoida se međusobno razlikuju po stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena (Teixeira i sur., 2014).

Flavonoidi su uglavnom prisutni u vakuaolama u obliku glikozida, najčešće kao O-glikozidi, a rjeđe kao C-glikozidi (Dzialo i sur., 2016). Stoga ih je moguće ekstrahirati polarnim otapalima, za razliku od netopljivih tanina i lignana koji se tijekom ekstrakcije vežu za proteine (Rispaill i sur., 2005). Flavonoidi se u prirodi pojavljuju također kao sulfatirani i metilirani derivati, konjugirani s monosaharidima i disaharidima, pri čemu imaju mogućnost stvaranja kompleksa s oligosaharidima, lipidima, aminima, karboksilnim i organskih kiselinama (Giada, 2013). Veliki broj strukturno različitih flavonoida posljedica su mogućih pozicija za glikozilaciju na osnovnom kosturu flavonoida, stupnja glikozilacije te broja i vrste vezanih šećera (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Od flavonoida prisutnih u obliku aglikona, samo ih je osam široko zastupljeno: antocijanidini, luteolin, katehin, epikatehin, kamferol, kvercetin, rutin i miricetin (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).

Flavonoli su najrasprostranjenija skupina flavonoida (Falcone Ferreyra i sur., 2012), a prisutna u cvjetovima i listovima najmanje 80 % viših biljaka, voća i bobičastog voća. Karakterizira ih blijedo žuta boja i slaba topljivost (Kühnau, 1976) te prisutnost dvostruke veze između ugljikovih atoma C2 i C3 te hidroksilne skupine na C3 atomu. Različiti šećeri mogu biti vezani za flavonole formirajući na taj način glikozide, glukuronide, galaktozide i diglikozide (Teixeira i sur., 2014). Flavonole odlikuje širok spektar fizioloških djelovanja, pa tako sudjeluju u odgovoru biljaka na stres i zaštiti od negativnih posljedica UV zračenja (Falcone Ferreyra i sur., 2012).

Na osnovu provedenih istraživanja, cvijet trnine prepoznat je kao bogat izvor flavonoida. Olszewska i sur. (2001) su iz cvijeta trnine izolirali osam različitih flavonoida: kamferol, kvercetin, kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- β -D-ksilopiranozid, kamferol 3-O- β -D-ksilopiranozid, kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid-7-O- α -L-ramnopiranozid te 3-O-(2"-E-p-kumaroil)- α -L-arabinofuranozid. Zatim su Olszewska i Wolbiś (2002) izolirali još sedam flavonoida: kvercetin 3-O- α -L-arabinopiranozid, kvercetin 3-O- α -L-ramnopiranozid, kamferol 3-O- β -D-ksilopiranozid, kamferol 3-O- β -glukopiranozid, kamferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranozid i kvercetin 3-O-(4"- β -D-glukopiranozil)- α -L-ramnopiranozid.

Kako je već prethodno spomenuto, sadržaj flavonoida može se razlikovati ovisno o

staništu pa su tako Olszewska i sur. (2001) otkrili visoku razinu flavonoida u cvijetu trnine u uzorcima iz Poljske (oko 3,8 % glikozida i 2,7 % aglikona), dok je Tamas (1985) odredio 1,2 % flavonoidnih aglikona u cvjetovima rumunjskog uzorka.

Marchelak i sur. (2017) su u ekstraktima cvijeta trnine spektrofotometrijski određivali masene udjele ukupnih fenola, ukupnih proantocijanidina te ukupnih flavonoida poslije kisele hidrolize te ukupnih fenolnih kiselina pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC). Usitnjeni cvijet trnine je ekstrahiran kloroformom u Soxhlet aparaturi, a ostatak je zatim višekratno refluksiran 80 %-tnim metanolom kako bi se dobio odmašćeni ekstrakt metanola. Odmašćeni ekstrakt metanola je potom suspendiran u vodi i podvrgnut stupnjevitoj ekstrakciji različitim organskim otapalima (dietil-eter, etil acetat, n-butanol i voda). Zaključeno je da su flavonoidi dominantni fenolni spojevi dobivenih frakcija cvijeta trnine (osim vodene frakcije) te da čine 55,7-105,5 % udjela ukupnih fenola. Ovisno o primijenjenom otapalu, sadržaj ukupnih fenola iznosio je 64,6-584,07 mg GAE/g s.tv., dok su ukupni flavonoidi određeni u masenim udjelima 1,88-490,63 mg/g s.tv. Ukupni proantocijanidini bili su u granicama 12,43-109,43 mg /g s.t, dok su uzorci sadržavali 8,76-66,77 mg/g s.tv ukupnih fenolnih kiselina. Primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC) u ekstraktima cvijeta trnine otkriveno je više od 50 fenolnih spojeva, među kojima 45 flavonoida: 38 flavonola i 7 flavan-3-ola (katehini i proantocijanidi) te 12 fenolnih kiselina. Najveći maseni udjeli ukupnih flavonoida određeni su u frakcijama dobivenim ekstrakcijom s dietil eterom (490,63 mg/g s.tv.) i etil acetatom (325,53 mg/g s.tv.). Od pojedinačnih aglikona, kamferol je bio dominantan spoj čineći 64,4-79,7 % ukupnih flavonoidnih aglikona.

Dodatni doprinos u proučavanju fenolnog sastava cvijeta trnine ubranog na području Hrvatske predstavlja istraživanje Elez Garofulic i sur. (2018) u kojem je primjenom UPLC-MS metode identificirano ukupno 28 fenolnih spojeva, a među flavonolima najdominantniji su bili sljedeći spojevi: kamferol-pentozid (494,94 mg/100 g), kamferol-ramnozid (436,62 mg/100 g) te kvercetin-pentozid (226,75 mg/100 g). U istraživanju koje su iste godine proveli Dikic i sur. (2018) UPLC-MS analizom određena su ukupno 32 fenolna spoja. Među najzastupljenijim flavonoidima bilo je najviše kamferol pentozida, kvercetin pentozida i kamferol ramnozida.

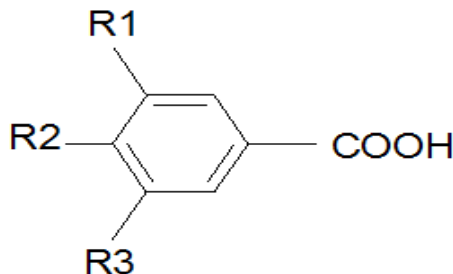
2.2.2. Fenolne kiseline

Uz flavonoide, fenolne kiseline su također najvažniji sekundarni metaboliti i bioaktivne biljne sastavnice (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu ovisi o brojnim čimbenicima, a najveći utjecaj imaju klima, uvjeti uzgoja te

vegetacijsko razdoblje (Arceusz i sur., 2013). Vrlo malo fenolnih kiselina dolazi u slobodnoj formi. Većina je vezana esterskim, eterskim ili acetatnim vezama za strukturne komponente biljke (celuloza, lignin, proteini), veće fenolne spojeve poput flavonoida, manje organske molekule kao što su glukoza ili kinska kiselina ili neke druge prirodne spojeve, primjerice, terpene. Upravo zahvaljujući ovim vezama, postoji veliki broj derivata fenolnih kiselina što svakako uvjete ekstrakcije i analize navedenih spojeva čini kompleksnima (Robbins, 2003).

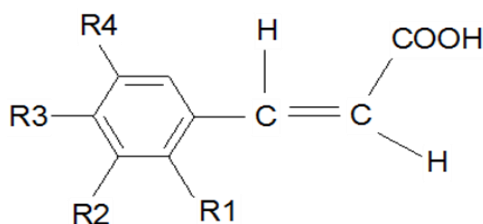
Fenolne kiseline se dijele na dvije glavne skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline i njihove derivati (Bravo, 1998). Razlika u strukturi između hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica je stupanj hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990).

Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline s općom strukturom C₆-C₁ (slika 6). U ovu skupinu fenolnih kiselina spadaju: salicilna kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska kiselina, genistinska kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, galna kiselina, elaginska kiselina i heksahidroksidifenilna kiseline (Tomás-Barberán i Clifford, 2000). Biljne hidroksibenzojeve kiseline u prirodi su prisutne uglavnom u glikozidnom obliku (Dzialo i sur., 2016).



Slika 6. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Belitz i sur., 2004)

U usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama, u jestivim dijelovima biljaka raširenije su hidroksicimetne kiseline kao najraširenije fenolne kiseline u biljnim tkivima (Xu i sur., 2017). Hidroksicimetne kiseline uključuju kafeinsku kiselinu, klorogensku kiselinu, *o*-, *m*- i *p*-kumarinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu i sinapinsku kiselinu (slika 7), među kojima je najraširenija kafeinska kiselina. U biljkama se spomenute kiseline uglavnom nalaze u vezanom obliku kao esteri ili glikozidi, odnosno vezani s karboksilnim kiselinama ili glukozom (Dzialo i sur., 2016).



Ferulinska kiselina	R1=R2=H, R3=OH, R4= OCH3
<i>p</i> -kumarinska kiselina	R1=R2=R4=H, R3=OH
<i>o</i> -kumarinska kiselina	R2=R3=R4=H, R1=OH
Kafeinska kiselina	R1=R2=H, R3=R4=OH
Sinapinska kiselina	R1=H, R3=OH, R2=R4= OCH3

Slika 7. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Belitz i sur., 2004)

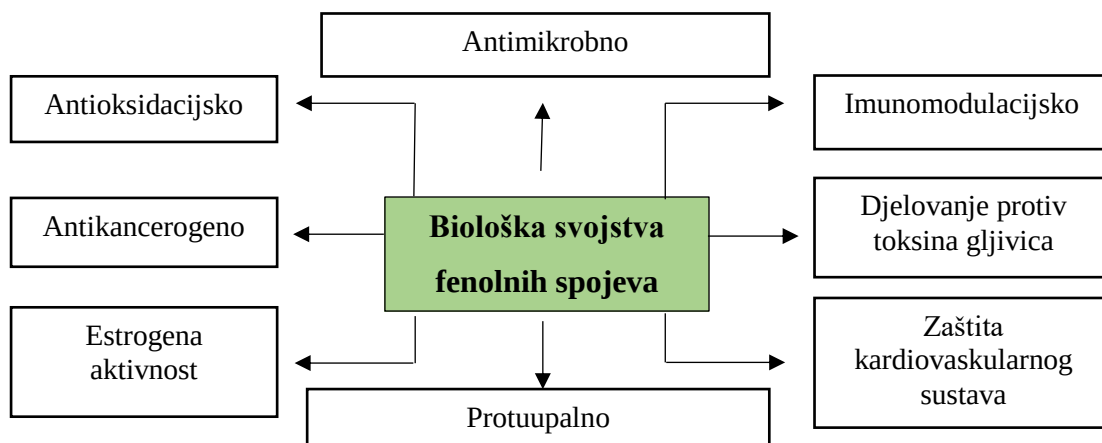
Proučavajući sastav cvijeta i lista trnine (Olszewska i Wolbis, 2000) su izolirali sljedeće fenolne kiseline: *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku, galnu, klorogensku, kafeinsku, *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu. Utvrđeno je da su u listu trnine dominantne kafeinska i ferulinska kiselina dok je u cvijetu dominantna *p*-hidroksibenzojeva kiselina. U istraživanju koje su proveli Elez Garofulic i sur. (2018) iz cvijeta trnine izolirano je osam fenolnih kiselina i to: galna, neoklorogenska, 3-*p*-kumaroilkinska, klorogenska, ferulolkinska kiselina, kafeinska, 4-*p*-kumaroilkinska i ferulinska kiselina. U najvećem masenom udjelu određene su 3-*p*-kumaroilkinska (216,28 mg/100g) i neoklorogenska kiselina (192 mg/100g). Dikic i sur. (2018) izolirali su iz cvijeta trnine deset fenolnih kiselina. Uz osam prethodno navedenih, izolirane su još i 4-*O*-kafeoilkinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina.

2.3. Biološka svojstva fenolnih spojeva

Za fenolne spojeve je poznato da posjeduju razne fiziološke funkcije vezane za rast, razvoj i zaštitu biljaka ali imaju i blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje (Kumar i Goel, 2019). Fenolni spojevi iz različitih biljnih izvora su, zahvaljujući mnogobrojnim biološkim svojstvima (slika 8) i pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje, sve češće predmet brojnih znanstvenih istraživanja (Wong-Paz i sur., 2017). Mnogobrojne *in vivo* i *in vitro* studije, kao i studije provedene na ljudima, naglašavaju različita biološka svojstva fenolnih spojeva i njihovu ulogu u prevenciji i ublažavanju različitih oboljenja kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinom, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, povišene razine triglicerida (Ozcan i sur.,

2014; Quiros i sur., 2017). Pozitivni učinci fenolnih spojeva na ljudsko zdravlje temelje se, između ostalog, na njihovom antioksidacijskom, protuupalnom, antimikrobnom, antimutagenom, antiangiogeničnom i neuroprotektivnom djelovanju. Mnoga od ovih navedenih djelovanja se pak pripisuju njihovoj sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i keliranja iona metala (Quiros i sur., 2017). Biološka svojstva fenolnih spojeva ovise o različitim čimbenicima, kao što su količina fenolnih spojeva koja je konzumirana te njihovoj apsorpciji, biodostupnosti i metabolizmu. S druge strane, apsorpcija fenolnih spojeva je ovisna o matriksu, odnosno hrani u kojoj se nalaze, njihovom izlučivanju u crijevni lumen i kemijskoj strukturi (Ozcan i sur., 2014; Quiros i sur., 2017), pa tako različite skupine fenolnih spojeva pokazuju različita biološka svojstva. Flavonoidi su, primjerice, često predmet istraživanja usmjerenih na potencijalno djelovanje na degenerativne bolesti i procese starenja mozga te se smatraju korisnima kod Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti (Teles i sur., 2018; Maher, 2019), dok su se fenolne kiseline pokazale kao vrlo učinkoviti agensi koji mogu pridonijeti liječenju dijabetesa (Adefegha i sur., 2015; Amalan i sur., 2016; Ohifueme i sur., 2019). Ustanovljeno je da mogu inhibirati α -glukozidaze i α -amilaze, ključne enzime odgovorne za pretvorbu prehrambenih ugljikohidrata u glukozu (Kumar i Goel, 2019). Zahvaljujući antimikrobnim i/ili antioksidacijskim svojstvima, prirodni fenolni spojevi imaju visok potencijal za upotrebu u različitim industrijama, posebice prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zbog antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja mogu se koristiti u prehrambenim proizvodima s ciljem očuvanja odnosno produženja roka trajanja (Ozcan i sur., 2014; Wong-Paz i sur., 2017).

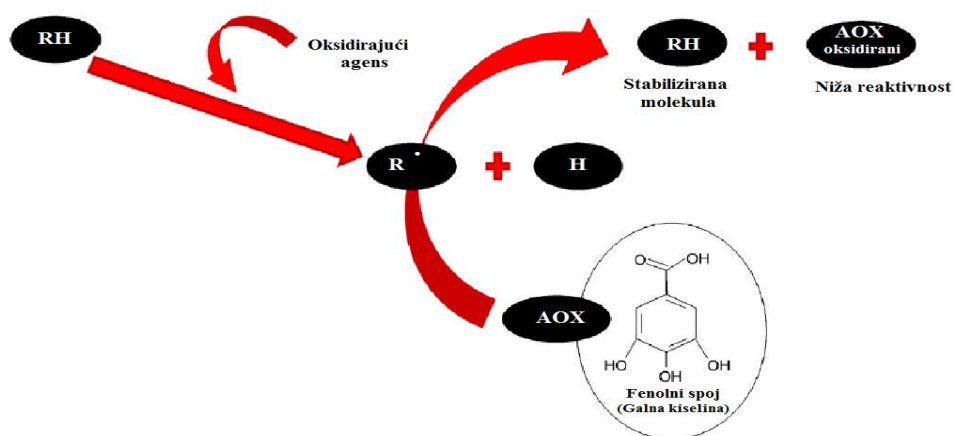
No, unatoč različitim provedenim istraživanjima, mehanizmi pomoću kojih bi fenolni spojevi mogli pridonijeti prevenciji bolesti još nisu detaljno istraženi, zbog čega su potrebna daljnja pretklinička i epidemiološka istraživanja vezana za istraživanja kinetike apsorpcije, metabolizma, akumulacije i eliminacije iz organizma budući da sve navedeno direktno utječe na njihove biološke učinke (Lin i sur., 2016; Quiros i sur., 2017).



Slika 8. Biološka svojstva fenolnih spojeva (Wong-Paz i sur., 2017)

2.3.1. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva

Fenolni spojevi pripadaju najvažnijim prirodnim antioksidansima, odnosno molekulama koje i u vrlo niskim koncentracijama, u usporedbi s oksidirajućim supstratom, značajno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata (Machu i sur., 2015). Neravnoteža između antioksidacijske obrane organizma i stvaranja slobodnih radikala rezultira oksidacijskim poremećajem i stanjem koje se naziva oksidacijski stres, a koje često uključuje reakcije između slobodnih radikala i visokovrijednih bioloških molekula (Lobo i sur., 2010; Galano i sur., 2016). Oksidacijski stres se smatra značajnim u inicijaciji i razvoju mnogih stanja i bolesti uključujući različite neurodegenerativne, autoimune i srčane bolesti, aterosklerozu i karcinom, a utječe i na proces starenja (Dimitrios 2006; Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Upravo zbog navedenog, antioksidacijski učinci spadaju među najčešće istraživana biološka svojstva biljnih ekstrakata (Clarke i sur., 2013). Fenolni spojevi u biljnim ekstraktima imaju sposobnost djelovanja kao učinkoviti „hvatači“ slobodnih radikala, zbog čega inhibiraju oksidacijske procese u organizmu (Katalinic i sur., 2006), odnosno sprečavaju oksidacijsko oštećenje staničnih organela, proteina, lipida, DNA i RNA (Chen i sur., 2017). Mehanizam antioksidacijskog djelovanja fenolnih spojeva prikazan je na slici 9.



Slika 9. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja fenolnih spojeva: AOX – antioksidans; $R^\bullet$ – slobodni radikal, RH – molekula podložna oksidaciji (Wong-Paz i sur., 2017)

Dvije karakteristike fenolnih spojeva predstavljaju osnovu za njihovo antioksidacijsko djelovanje. Prvo, redukcijski potencijali fenolnih (fenoksi) radikala su uobičajeno niži u usporedbi s kisikovim radikalima kao što su superoksid ($O_2^{\bullet-}$), peroksil ($ROO^\bullet$), alkoksil ($RO^\bullet$) i hidroksil ($HO^\bullet$) radikali, što znači da će ove vrste lako oksidirati fenolne spojeve u svoj fenoksil radikal. Drugo, fenoksil radikali su općenito manje reaktivni od radikala kisika, pa se tako izravno uklanjanju štetni reaktivni kisikovi međuprodukti te inaktiviraju, bez promicanja daljnje oksidacije (Grace, 2005).

Prema Dai i Mumper (2010) fenolni spojevi imaju jači antioksidacijski kapacitet od vitamina C i E te karotenoida, a isti se međusobno razlikuju ovisno o molekularnoj strukturi, prvenstveno prema broju i položaju hidroksilnih skupina (Basli i sur., 2017).

U odnosu na druge vrste antioksidansa, osim zbog snažnog djelovanja, fenolni spojevi su cijenjeni zbog svog prirodnog podrijetla (Katalinic i sur., 2006). U odnosu na sintetske antioksidanse koji mogu djelovati genotoksično, prirodni antioksidansi ne izazivaju nuspojave (Stanković, 2011). Sintetski antioksidansi kao što su butilirani hidroksianisol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i terc-butilhidrokinon (TBHQ) naširoko su korišteni kao antioksidansi, ali upitna sigurnost njihove primjene dovela je do porasta interesa za prirodnim antioksidantima (Balasundram i sur., 2006).

Mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije su provedene s ciljem određivanja antioksidacijskih svojstava različitih fenolnih spojeva i biljnih ekstrakata (Wong-Paz i sur., 2017), uključujući i biljne ekstrakte dobivene od različitih dijelova trnine.

U istraživanju koje su proveli Marchelak i sur. (2017) ispitivan je antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine primjenom DPPH, FRAP i TBARS metoda. Neovisno o primijenjenoj metodi ekstrakti cvijeta trnine su pokazali značajna antioksidacijska svojstva.

Ovisno o primijenjenom otapalu, kod DPPH metode određene EC_{50} vrijednosti iznosile su od 1,63 do 51,32 $\mu\text{g/mL}$, odnosno od 1,31 do 36,02 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ kod FRAP metode. Primjenom TBARS metode određene su IC_{50} vrijednosti u rasponu od 1,85 do 49,73 $\mu\text{g/mL}$. Od navedenih metoda rezultati dobiveni FRAP metodom imali su najvišu korelaciju s sadržajem ukupnih fenola i ukupnih flavonoida određenih u ekstraktima cvijeta trnine. Nakon određivanja antioksidacijskog kapaciteta, ispitivan je učinak ekstrakata cvijeta trnine na ljudsku plazmu izloženu peroksinitritom oksidacijskom stresu, te je pokazano da je u plazmi uzoraka inhibiranih s peroksinitritom u prisutnosti ekstrakata cvijeta trnine brzina oksidacijskog/nitrativnog oštećenja značajno smanjena. U provedenom istraživanju korištene koncentracije ekstrakata cvijeta trnine (1–5 $\mu\text{g/mL}$), nisu utjecale na vijabilnost humanih mononuklearnih stanica periferne krvi, zbog čega se, prema autorima, mogu smatrati sigurnima.

Marchelak i sur. (2019) su nastavili i proširili prethodno navedeno istraživanje kako bi dobili jasniji uvid u antioksidacijsku sposobnost ekstrakta cvijeta trnine i njegovih sastojaka prema reaktivnim kisikovim i dušikovima vrstama ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}^{\bullet}$, H_2O_2 , $\text{NO}^{\bullet}$, ONOO^- , HOCl) te ih usporedili s aktivnošću fenolnih spojeva za koje se smatra da su glavni metaboliti fenolnih spojeva u ljudskom tijelu i koji odgovaraju fenolnom profilu ispitivanih ekstrakata. U istraživanju su korišteni frakcionirani suhi ekstrakti (odmašćeni metanolni ekstrakti i njihove frakcije (dietileter, etilacetat, *n*-butanol, voda) pripremljeni u prethodno provedenom istraživanju, a rezultati su prikazani kao ekvivalenti askorbinske kiseline i troloxa. U nastavku istraživanja odobrano je osam fenolnih spojeva i testirana je njihova antioksidacijska aktivnost na ukupno šest kisikovih i dušikovih reaktivnih vrsta kako bi istražili koji su spojevi u najvećem stupnju odgovorni za antioksidacijsko djelovanje ekstrakata cvijeta trnine. Istraživanje je prošireno na spojeve za koje se smatra da su glavni metaboliti fenolnih spojeva u ljudskom organizmu te je odabrano sljedećih pet spojeva: mikvelianin (metabolit kvercetina) te dihidrokafeinska, protokatehinska kiselina, 2-(3'4'-dihidroksifenil) octena i 3-(4'-hidroksifenil) propionska kiselina. Svaki od ispitivanih ekstrakata cvijeta trnine pokazao je značajnu te o koncentraciji ovisnu antioksidacijsku aktivnost prema ROS/RNS. TE_{MR6} i AAE_{MR6} vrijednosti ispitivanih ekstrakata iznosile su 3,8-94,1 $\mu\text{mol TX/mg s.tv}$ i 4,8-29,2 $\mu\text{mol AA/mg s.tv}$, a najveća ukupna antioksidacijska aktivnost određena je u etilacetatnim i dietilacetatnim frakcijama. Antioksidacijska aktivnost snažno je korelirala s vrijednošću ukupnih fenola određenom u prethodnom istraživanju. Ustanovljena je najveća antioksidacijska aktivnost prema sljedećim reaktivnim vrstama: $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$, ONOO^- i HOCl . Među odabranim fenolnim spojevima podvrgnutih testiranju bili su juglanin (kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid) i avikularin (kvercetin 3-O- α -L-arabinofuranozid) kao predstavnici flavonoidnih monoglikozida,

kampferitrin (kamferol 3,7-di-O- α -L-ramnospiranozid) kao diglikozid, zatim proantocijanidin A2 kao predstavnik A-tipa proantocijanidina, te hidroksicimetne kiseline kafeoilkinska i *p*-kumarinska kiselina. Ukupna antioksidacijska aktivnost izražena kao TE_{MR6} i AA_{EMR6} vrijednosti varirala je u rasponu od 22,1 do 145,3 μ mol TX/mg te od 11,8 do 72,5 μ mol AA/mg. Dobiveni rezultati su pokazali da se antioksidacijska aktivnost istraživanih spojeva razlikuje ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su kvercetin, avikularin, proantocijanidin A2 i klorogenska kiselina (44,5-72,5 μ mol AA/mg), dok su za derivate kamferola određene znatno niže vrijednosti (11,8-27,0 μ mol AA/mg). Zabilježeno je također da su neki metaboliti, izolirani iz cvijeta trnine, aktivniji od njihovih roditeljskih fenolnih spojeva.

Velickovic i sur. (2014) su u istraživanju provedenom na svježim plodovima trnine pokazali da istraživani ekstrakti imaju visok antioksidacijski kapacitet ali i antimikrobnu aktivnost, što ih čini visokovrijednim biljnim materijalom.

Slično su istraživani plodovi nekih drugih *Prunus* vrsta. Tako su, primjerice Wani i sur. (2017) ustanovili da su plodovi marelice (*Prunus armeniaca* L.) također bogati fenolnim spojevima te da posjeduju visok antioksidacijski kapacitet. U provedenom istraživanju određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je maseni udio ukupnih fenola iznosio 10,702 mg GAE/g. Primjenom DPPH metode određen je antioksidacijski kapacitet koji je iznosio 91,165 % u odnosu na kontrolni uzorak.

Osim plodova, jestivo cvijeće različitih biljnih vrsta također je prepoznato kao dobar izvor fenolnih spojeva s visokim potencijalom primjene u različitim industrijskim granama. U ispitivanju koje su proveli Chen i sur. (2018) određen je sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u cvjetovima 30 različitih biljnih vrsta koje rastu na području Kine te njihov antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH, FRAP i TEAC metoda. Među ispitivanim vrstama, najviši sadržaj ukupnih fenola određen je u vrsti *Rosa rugosa* Thunb, dok je najveći udio ukupnih flavonoida određen u cvjetovima vrste *Osmanthus fragrans*. Cvjetovi vrsta *Rosa rugosa* Thunb (purpurna) i *Rosa rugosa* Thunb (ružičasta) pokazali su najveći antioksidacijski kapacitet primjenom navedenih metoda. Zaključeno da je su cvjetovi ispitivanih biljnih vrsta bogat izvor bioaktivnih spojeva visokog antioksidacijskog kapaciteta, s potencijalom primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

2.3.2. Antikancerogena svojstva fenolnih spojeva

Antikancerogena svojstva fenolnih spojeva (*slika 10*) i biljnih ekstrakata često se istražuju zajedno s njihovim antioksidacijskim kapacitetom jer se smatra da su oksidacijski stres i kronična upala povezani s nastankom raka (Reuter i sur., 2010; Visconti i Grieco, 2009).

Obzirom da je rak molekularno heterogena bolest i da postoji mnogo tipova raka s različitim kliničkim ishodima, otežano je razumijevanje mehanizama djelovanja sredstava koja se primjenjuju u liječenju raka (Feria i sur., 2013). Nekontrolirana stanična proliferacija je značajno obilježje stanica raka, zbog čega se antikancerogeno djelovanje neke tvari može mjeriti njenom sposobnošću da smanji proliferaciju stanica, smanji vijabilnost stanica, odnosno zaustavi stanice tumora u međufazi rasta (Anantharaju i sur., 2016).

Kako bi se utvrdila toksičnost određene tvari na stanice raka provode se različita toksikološka ispitivanja s ciljem razumijevanja bioloških mehanizama uključenih u nastajanje i progresiju raka, definiranja mogućih molekularnih markera i probira te karakterizacije terapije. Važan korak u istraživanju raka predstavlja odabir odgovarajućeg *in vitro* modela. Stanične linije su se pokazale kao izvrstan model za proučavanje bioloških mehanizama uključenih u nastajanje raka. Neke od prednosti upotrebe staničnih linija u odnosu na *in vivo* sustave određivanja toksičnosti su: lakše razumijevanje molekularnog mehanizma zbog manje eksperimentalnih varijacija, jednostavno postavljanje eksperimenta, niži eksperimentalni troškovi i smanjeno vrijeme ispitivanja (Srivastava i sur., 2018). Jedna od široko korištenih staničnih linija na kojoj se određuju toksični učinci različitih kemikalija, lijekova ali i fenolnih spojeva je stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 (Carney i Settivari, 2013), koja je korištena i u sklopu ovog istraživanja.



Slika 10. Antikancerogena svojstva fenolnih spojeva (Dzialo i sur., 2016)

Iako uloga prirodnih antioksidansa u prevenciji nastajanja raka nije još jednoznačno razjašnjena, smatra se da najčešće sprječavaju nastajanje raka u početnoj fazi budući da inaktiviraju slobodne radikale koji doprinose mutagenezi putem destabilizacije membrana i oštećenja DNA. Isto tako, antioksidansi mogu aktivirati ili inhibirati enzime faze I i faze II metabolizma ksenobiotika. Mogućim mehanizmom citotoksičnosti fenolnih spojeva spram kancerogenih stanica, smatra se njihovo prooksidacijsko djelovanje. Naime, fenolni spojevi mogu djelovati i kao antioksidansi i kao prooksidansi, ovisno o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala te o prisutnosti prijelaznih metala poput bakra koji potiče prooksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva. U tom slučaju dolazi do povećanog nastanka slobodnih radikala u stanicama koji potom djeluju kao regulacijske molekule dovodeći do zastoja staničnog ciklusa i apoptoze u kancerogenim stanicama (Gomes i sur., 2003).

Mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su da fenolni spojevi izolirani iz različitih biljaka inhibiraju proliferaciju stanica raka, odnosno da posjeduju antikancerogena svojstva (Anantharaju i sur., 2016; Fernández-Ochoa i sur., 2017; Singh i sur., 2018).

Tako je za kamferol, dominantni fenolni spoj u cvijetu trnine, dokazan antiproliferativni učinak na različitim staničnim linijama. U istraživanju koje su proveli Londonkar i Basavarajeshwari (2016) ispitivan je citotoksični učinak kamferola izoliranog iz biljne vrste *Vigne unguiculata* na stanične linije raka dojke (MCF-7) i stanične linije raka pluća (A459). Stanične linije su tretirane različitim koncentracijama kamferola (6,25-100 µg/mL), a

citotoksični učinak je određen pomoću MTT metode. Dobivene IC_{50} vrijednosti na staničnim linijama raka dojke MCF-7 i staničnim linijama raka pluća A459 iznosile su $90,28 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$, odnosno $35,80 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$. Dobar citotoksični učinak ukazao je na moguću primjenu kamferola u liječenju raka dojke i pluća. Liao i sur. (2016) su također ispitali antiproliferativne učinke kamferola (50, 75 i 100 mg/mL) na različitim staničnim linijama, uključujući humane stanice raka dojke (MCF-7), pluća (A549), želuca (SGC-7901) i vrata maternice (HeLa) pomoću MTT metode. Postotak preživljavanja kancerogenih stanica značajno se smanjivao s povećanjem koncentracije kamferola. Među upotrijebljenim staničnim linijama, MCF-7 stanična linija pokazala je najveću osjetljivost na kamferol. Stopa preživljavanja MCF-7 stanica iznosila je 47,89 % primjenom 100 mg/mL kamferola, dok su kod HeLa, SGC-7901 i A549 staničnih linija stope preživljavanja iznosile redom 57,53 %, 59,24 % i 60,18 %.

U istraživanju koje su proveli Murati i sur. (2019) ispitana su antineoplastična i citotoksična svojstva etanolnih ekstrakata cvijeta trnine različitih koncentracija ukupnih fenola (5-200 $\mu\text{g/mL}$) na kanceroznim Hepa 1-6 stanicama i normalnim AML 12 stanicama. Antiproliferativna aktivnost određena je pomoću *Trypan Blue* i *Kenacid Blue* metoda nakon inkubacije stanica od 24 i 72 sata. Antiproliferativna aktivnost ekstrakta cvijeta trnine na Hepa 1-6 stanicama određena je pri tretmanu stanica svim primijenjenim koncentracijama, sa statistički značajnom inhibicijom uz upotrebu ekstrakata čija je masena koncentracija bila $\geq 100 \mu\text{g/mL}$, kod obje metode. Citotoksičnost je također paralelno određena i na AML12 stanicama. Statistički značajan inhibicijski učinak ekstrakta cvijeta trnine na proliferaciju AML 12 stanica, uočen je nakon 72 sata pri koncentracijama većim od 10 $\mu\text{g/mL}$. Izračunate IC_{50} vrijednosti nakon 24-satne inkubacije na AML 12 staničnoj liniji iznose: 59,05 $\mu\text{g/mL}$ (*Trypan Blue*) i 72,69 $\mu\text{g/mL}$ (*Kenacid Blue*) u odnosu na IC_{50} vrijednosti izračunate za Hepa 1-6 staničnu liniju: 166,87 $\mu\text{g/mL}$ i 172,93 $\mu\text{g/mL}$, upućuju da je potrebna manja masena koncentracija ekstrakta za inhibiciju staničnog rasta za 50 % kod normalnih nekanceroznih AML 12 stanica što navodi na zaključak da je inhibicijski učinak ekstrakta cvijeta trnine jači kod navedenih stanica nego kod kanceroznih Hepa 1-6 stanica. Nakon 72-satne inkubacije određena je otprilike podjednaka citotoksičnost ekstrakata kod obje stanične linije. Nadalje, na osnovu dobivenih rezultata zaključeno je da ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L., u ispitanim masenim koncentracijama inducira nastajanje kisikovih reaktivnih vrsta na obje korištene stanične linije, što ukazuje na prooksidacijsko djelovanje ekstrakata cvijeta trnine. Proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta zabilježena je u značajno većoj mjeri u kanceroznim Hepa 1-6 stanicama. Iako se prooksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva često povezuje s

proapoptotičkim učinkom, protočnom citometrijom utvrđeno je da ekstrakt cvijeta trnine uzrokuje primarno nekrozu stanica kod obje stanične linije, dok je udio apoptoze kod obje stanične linije određen u niskim vrijednostima (frakcije rane apoptoze iznosile su 0,04-1,65 %, a frakcije kasne apoptoze 0,05-3,25 %, od ukupne populacije stanica).

2.4. Tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva

Prema pretpostavkama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) 80 % svjetske populacije koristi tradicionalnu medicinu kao primarnu zdravstvenu zaštitu, a uslijed velikog povećanja različitih kroničnih bolesti široko se primjenjuju biljni ekstrakti bogati bioaktivnim sastavnicama (Wong-Paz i sur., 2017).

Početni i vrlo važan korak u proizvodnji biljnih ekstrakata, o kojem značajno ovisi ekonomičnost cjelokupne proizvodnje, je proces ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Ekstrakcija sastojaka iz prirodnih izvora koristi se od davnina. Poznato je da su Egipćani i Feničani, Židovi i Arapi, Indijanci i Kinezi, Grci i Rimljani, pa čak i Maje i Azteci koristili postupke ekstrakcije u medicini, proizvodnji hrane i parfema, a danas je gotovo nemoguće pronaći proizvodni proces u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji koji ne koristi ekstrakcijske tehnike. Tako je u posljednje vrijeme sve više prehrambenih proizvoda obogaćenih biljnim ekstraktima koji obiluju visokovrijednim biološki aktivnim sastavnicama, uključujući i fenolne spojeve (Chemat i sur., 2012). Kvaliteta biljnih ekstrakata i količina fenolnih spojeva u njima uvelike ovise o odabranoj tehnici i postavljenim parametrima ekstrakcije. Ne postoji standardna tehnika ekstrakcije koja je primjenjiva za sve biljne vrste, zbog čega je za svaku biljnu vrstu potrebno izabrati prikladnu ekstrakcijsku tehniku i optimizirati uvjete ekstrakcije, s ciljem postizanja maksimalnih ekstrakcijskih prinosa i što bolje ekonomičnosti cjelokupnog procesa proizvodnje ekstrakata. Optimalna tehnika ekstrakcije trebala bi biti sigurna, jednostavna, reproducibilna, jeftina i pogodna za industrijsku primjenu (Liao i sur., 2012; Vongsak i sur., 2013).

Fenolni spojevi iz biljaka tradicionalno su godinama ekstrahirani klasičnim ekstrakcijskim tehnikama kao što su ekstrakcija otapalima, maceracija ili Soxlet ekstrakcija. Tradicionalne tehnike ekstrakcije zahtijevaju upotrebu velikih količina otapala za ekstrakciju, skupe su i dugotrajne te rezultiraju niskim ekstrakcijskim prinosima (Maghsoudlou i sur., 2016; Xu i sur., 2017). Stoga su tijekom zadnjih 50-ak godina razvijene nekonvencionalne, odnosno inovativne i napredne ekstrakcijske tehnike koje omogućuju smanjenu upotrebu sintetičkih i organskih otapala te osiguravaju bolji prinos i kvalitetu ekstrakta (Azmir i sur., 2013).

U tablici 2 navedena je usporedba konvencionalnih i nekonvencionalnih tehnika

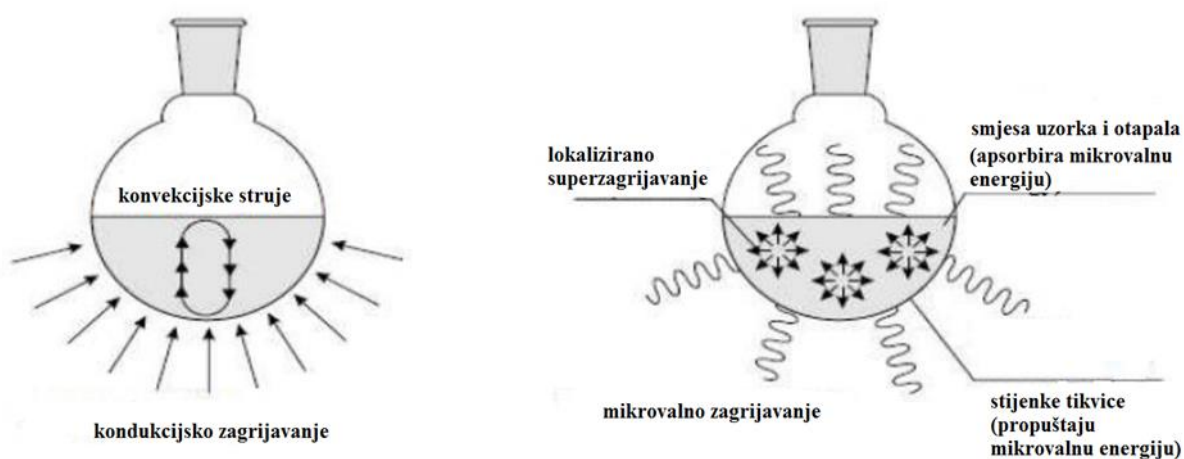
ekstrakcije. U nekonvencionalne tehnike ekstrakcije ubrajaju se ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (eng. *pulsed electric-field extraction*; PEF), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *ultrasound-assisted extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta enzimima (eng. *enzyme-assisted extraction*, EAE), ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. *supercritical-fluid extraction*, SFE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. *high pressure-assisted extraction*, HPAE) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE) (Mandal i sur., 2007; Ignat i sur., 2011; Veggi i sur., 2013; Briones-Labarca i sur., 2015; Radrigán i sur., 2017).

Tablica 2. Usporedba konvencionalnih i nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije (Tsiaka i sur., 2017)

Promatrana razina utjecaja ekstrakcije	Konvencionalna tehnika ekstrakcije	Nekonvencionalna tehnika ekstrakcije
Efikasnost ekstrakcije	Visoka	Visoka
Vrijeme ekstrakcije	Sati do dani	Od μ s do manje od 1 sata
Ekstrakcijski parametri	Vrijeme, sustav otapala, omjer uzorka/otapala, temperatura, veličina čestica, pH	Vrijeme, sustav otapala, omjer uzorak/otapalo, protok otapala, temperatura, tlak, veličina čestica, pH, snaga, sadržaj vlage uzorka, mod ekstrakcije
Zaštita termolabilnih spojeva	Niska	Visoka
Veličina čestica uzorka	Srednja do velika	Srednja do mala
Operativni troškovi	Niski	Srednji do visoki
Razina kompliciranosti izvedbe	Niska	Srednja do visoka
Automatizacija	Niska	Visoka
Potreba za dodatnim koracima tretmana	Visoka	Niska
Utjecaj na okoliš	Velika potrošnja energije i otapala; negativan utjecaj na okoliš	Ekološki prihvatljive tehnike u vidu potrošnje otapala i energije

2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave-assisted extraction*, MAE) je jedna od novih, nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije koja ima visoku učinkovitost u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. Zahvaljujući svojim prednostima u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije u posljednje vrijeme je sve popularnija u prehrambenoj industriji (Carciochi i sur., 2017; Chan i sur., 2017). Glavna razlika u mehanizmu MAE u odnosu na konvencionalne ekstrakcije jest način prijenosa energije (*slika 11*). Naime, kod konvencionalnih ekstrakcija toplina se prenosi od grijaćeg uređaja do materijala procesima konvekcije, kondukcije ili zračenja dok se kod MAE toplina raspršuje izravno na materijale pretvorbom elektromagnetske energije u toplinsku, što rezultira mogućnošću znatno bržeg porasta temperature (Veggi i sur., 2013).



Slika 11. Mehanizam zagrijavanja kod a) konvencionalnih tehnika i b) mikrovalnog zagrijavanja (Surati i sur., 2012)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je ekstrakcijska tehnika koja u svrhu izdvajanja komponenti uzorka u otapalo, za zagrijavanje koristi snagu mikrovalova – neionizirajućih elektromagnetskih valova frekvencije između 300 MHz i 300 GHz, smještenih između rendgenskih i infracrvenih zraka u elektromagnetskom spektru zračenja (Sparr Eskilsson i Björklund 2001; Mandal i sur., 2007) izravnim utjecajem na molekule putem dva mehanizma koji najčešće djeluju simultano: ionske vodljivosti i rotacije dipola.

Rotacija dipola označava pojavu premještanja dipolnih iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja, a njezina jačina ovisi o polarnosti molekula i njihovoj

sposobnosti da slijede brzinu izmjene smjera. Ionska vodljivost se javlja ako su prisutni slobodni ioni ili ionske vrste u mediju na koji djeluje mikrovalno zračenje te dolazi do njihovog kretanja djelovanjem izmjeničnog električnog polja. Otpor medija prema kretanju rezultira trenjem što uzrokuje porast temperature odnosno zagrijavanje (Zrinski i Eckert-Maksic 2005; Veggi i sur., 2013).

Proces zagrijavanja i učinkovitost djelovanja mikrovalova temelje se na faktoru disipacije materijala odnosno tangensu dielektričnog gubitka ($\tan \delta$) (Saha i sur., 2018). Kao takav, tangens dielektričnog gubitka najvažnije je svojstvo za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima jer određuje sposobnost materije (krutina i tekućina) da pretvori elektromagnetsku energiju u toplinsku energiju, zbog čega o njemu uvelike ovisi učinkovitost zagrijavanja putem mikrovalova (Zrinski i Eckert-Maksic 2005; Veggi i sur., 2013). Sposobnost uzorka da apsorbira mikrovalnu energiju i rasprši je u toplinu susjednim molekulama opisana je sljedećom formulom:

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

gdje je ϵ'' dielektrični gubitak koji opisuje količinu mikrovalne energije koja se pretvara u toplinu unutar uzorka a ϵ' dielektrična konstanta koja opisuje sposobnost molekule da se polarizira djelovanjem energije, a što joj je vrijednost veća, veći je i dipolni moment molekule (Veggi i sur., 2013; Saha i sur., 2018).

Razina pretvorbe električne energije u toplinsku unutar materijala opisana je sljedećom formulom:

$$P = K \cdot f \cdot \epsilon' E^2 \tan \delta$$

gdje P označava rasipanje mikrovalne energije po jedinici volumena, f primijenjenu frekvenciju, K konstantu, E snagu električnog polja, ϵ' dielektrična konstanta te $\tan \delta$ tangens dielektričnog gubitka (Saha i sur., 2018).

Kao rezultat navedenog, materijal s visokim dielektričnim gubitkom (ϵ'') i tangensom gubitka ($\tan \delta$) u kombinaciji s umjerenom vrijednošću dielektrične konstante (ϵ'), omogućuje pretvaranje mikrovalne energije u toplinsku energiju (Veggi i sur., 2013).

Prema tome, osim općenitih pravila za odabir prikladnog otapala koja se odnose na sve ekstrakcijske tehnike prilikom odabira ekstrakcijskog otapala, za provođenje MAE, dodatno je potrebno obratiti pozornost na sposobnost otapala da pretvori mikrovalnu energiju u toplinsku odnosno da se zagrije djelovanjem mikrovalova (Mandal i sur., 2007; Afoakwah i sur., 2012).

Općenito, polarne molekule i ionske otopine snažno apsorbiraju mikrovalnu energiju zahvaljujući promjenjivom dipolnom momentu (Veggi i sur., 2013). Najčešće korištena, a ujedno i najučinkovitija otapala kod MAE su etanol, metanol i voda, te vodene otopine metanola

i etanola (Shouqin i sur., 2005; Kala i sur., 2016).

Nadalje, volumen korištenog otapala mora biti optimalan, kako bi se osigurala kompletna uronjenost uzorka u otapalo. S druge strane, ne smije biti prevelik jer uslijed korištenja velikih volumena otapala može doći do smanjena ekstrakcijskih prinosa zbog neravnomjerne izloženosti reakcijske smjese djelovanju mikrovalova (Rao i Rathod, 2017). Volumen otapala ovisi o vrsti otapala i veličini čestica uzorka, ali uobičajeno je volumen otapala korišten prilikom MAE deset puta manji u odnosu na volumene korištene prilikom ekstrakcije konvencionalnim tehnikama (Carciochi i sur., 2017).

Osim vrste i volumena otapala, na efikasnost postupka MAE značajan utjecaj imaju i omjer uzorka i otapala, trajanje ekstrakcije, temperatura, snaga mikrovalova te kontaktna površina između uzorka i otapala (Afoakwah i sur., 2012; Carciochi i sur., 2017).

Temperatura ekstrakcije predstavlja važan faktor prilikom optimizacije MAE. Povišenje temperature dovodi do smanjenja viskoznosti i površinske napetosti, što posljedično povećava sposobnost prodiranja otapala u matriks, odnosno uslijed povećanja temperature dolazi do poboljšanja vlaženja biljnog matriksa. No, povišenjem temperature može doći i do izdvajanja nečistoća u ekstrakt zajedno s ciljanim komponentama kao posljedica brze stanične ruptуре, ali i do već spomenute, degradacije termolabilnih spojeva (Veggi i sur., 2013). Stoga se temperature u rasponu od 60-90 °C najčešće koristi u slučaju MAE pod atmosferskim tlakom (Kala i sur., 2016). Upravo zbog prethodno navedenog, ova metoda se uvelike koristi za ekstrakciju monomernih fenolnih spojeva, poput fenolnih kiselina i flavonoida koje odlikuju kratki lanci, dok se rjeđe koriste za ekstrakciju polimernih fenolnih (dugolančanih) spojeva, kao što su antocijani, obzirom da su oni osjetljivi na više temperature ekstrakcije i mogu se razgraditi u uvjetima MAE (Aires, 2017).

Snaga mikrovalova je usko povezana s temperaturom ekstrakcije, budući da se temperatura tijekom procesa ekstrakcije održava, odnosno kontrolira podešavanjem snage mikrovalova. Naime, podešavanjem snage mikrovalova kontrolira se količina energije koja će se raspršiti unutar biljnog matriksa, a koja se pretvara u toplinsku energiju u dielektričnom materijalu. Snaga mikrovalova osigurava lokalno zagrijavanje u uzorku koje djeluje kao pokretačka sila za MAE, s ciljem uništenja biljne matrice tako da otapalo može difundirati i otapati komponente uzorka u otapalu. Teorijski povećanje snage mikrovalova vodi do povećanja ekstrakcijskih prinosa, ali tijekom MAE snaga mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature koje može dovesti do razgradnje termolabilnih supstanci (Mandal i sur., 2007; Veggi i sur., 2013; Muhamad i sur., 2017).

Vrijeme ekstrakcije obično je obrnuto proporcionalno postavljanoj snazi mikrovalova:

kada se povećava snaga mikrovalova, potrebno je kraće vrijeme ekstrakcije i obrnuto. Za svaku razinu snage mikrovalova postoji optimalno vrijeme ekstrakcije koje daje ravnotežni prinos ekstrakcije (Chan i sur., 2017). Kod polarnih otapala, koja se uobičajeno koriste tijekom MAE, uslijed izlaganja mikrovalnim zračenju kroz duže vrijeme može doći do gubitka termolabilnih spojeva uslijed naglog porasta temperature (Dragović-Uzelac i sur., 2012). U usporedbi s klasičnim ekstrakcijama, trajanje MAE je kraće te obično varira od nekoliko minuta do pola sata (Veggi i sur., 2013), s izuzetkom MAE bez otapala jer je za ekstrakciju eteričnog ulja potrebno duže vrijeme od jednog sata (Chan i sur., 2017).

Osim navedenih faktora, na učinak MAE utječe i priroda biljnog matriksa, uključujući i kontaktu površinu između otapala i matriksa koja je diktirana veličinom čestica. Manje čestice uzorka omogućuju poboljšanje ili mnogo dublje prodiranje mikrovalova, što posljedično vodi do povećavanja ekstrakcijskih prinosa. Stoga postupci pripreme uzorka za provođenje ekstrakcije obično uključuju mljevenje i homogenizaciju da se poveća kontaktna površina. Veličina čestica obično je u rasponu od 100 μm do 2 mm. S druge strane, upravo zbog sitnijih čestica, MAE postupak zahtijeva centrifugiranje, odnosno filtraciju nakon završetka ekstrakcije (Veggi i sur., 2013).

Kako je prethodno navedeno, u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, MAE ima značajne prednosti: rezultira boljim ekstrakcijskim prinosima i poboljšanom kvalitetom ekstrakata (Pinela i sur., 2016), uz skraćeno vrijeme ekstrakcije te smanjenu uporabu organskih otapala (Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011). Kod MAE također nema gubitaka energije u okoliš kao pri primjeni konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika (Mandal i sur., 2007).

Brojne studije su uspoređivale prinose fenolnih spojeva dobivenih pomoću MAE i onih dobivenih pomoću konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika (Dragović-Uzelac i sur., 2012); Dahmoune i sur., 2014; Dahmoune i sur., 2015; Alara i sur., 2019). Zajednički zaključak ovih istraživanja je da je MAE bila bolja, rezultirala sličnim ili boljim ekstrakcijskim prinosom, uz kraće vrijeme ekstrakcije te reduciranu upotrebu otapala.

U istraživanju koje su proveli Zhang i sur. (2008) na cvjetnim pupoljcima vrste *Lonicera japonica* Thunb pokazano je da se primjenom MAE postiže viši ekstrakcijski kapacitet izolacije klorogenske kiseline, uz skraćeno vrijeme ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju uz refluks.

Dahmoune i sur. (2014) istraživali su učinke različitih parametara ekstrakcije na učinkovitost MAE i provedena je optimizacija MAE na listovima tršlje. Ispitivali su sljedeće parametre: polarnost otapala (20-100 %-tni etanol), vrijeme ekstrakcije (30-210 s), gustoću mikrovalne snage (15-45 W/mL), omjer otapala i uzorka (10-40 mL/g). Kao optimalni uvjeti

određeni su: 46 %-tni etanol kao otapalo, vrijeme ekstrakcije 60 s, gustoća mikrovalova 17,86 W/mL. U istom istraživanju je provedena usporedba ekstrakcijskih prinosa dobivenih iz MAE pri optimalnim uvjetima s ekstrakcijskim prinosima dobivenim pomoću konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Na osnovu količine ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i tanina zaključeno je da je MAE učinkovitija od klasične ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.

U istraživanju kojeg su proveli Durmaz i sur. (2015) ispitivan je utjecaj MAE na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta kapara. Među ispitivanim varijablama, vrsta i omjer uzorak/otapalo su se pokazali kao faktori koji imaju statistički značajan utjecaj na ekstrakcijski kapacitet. Najveći sadržaj ukupnih fenola i najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta postignuta je primjenom 50 %-tne vodene otopine etanola, uz omjer uzorak/otapalo 1:30 i snagu mikrovalova od 400 W. Paralelno s MAE provedena je klasična ekstrakcija i nije uočena značajna razlika sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta između ove dvije vrste ekstrakcije. No, optimalno vrijeme za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima je 5 minuta, dok se vrijeme od 4 sata pokazalo kao optimalno vrijeme za klasičnu ekstrakciju.

2.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

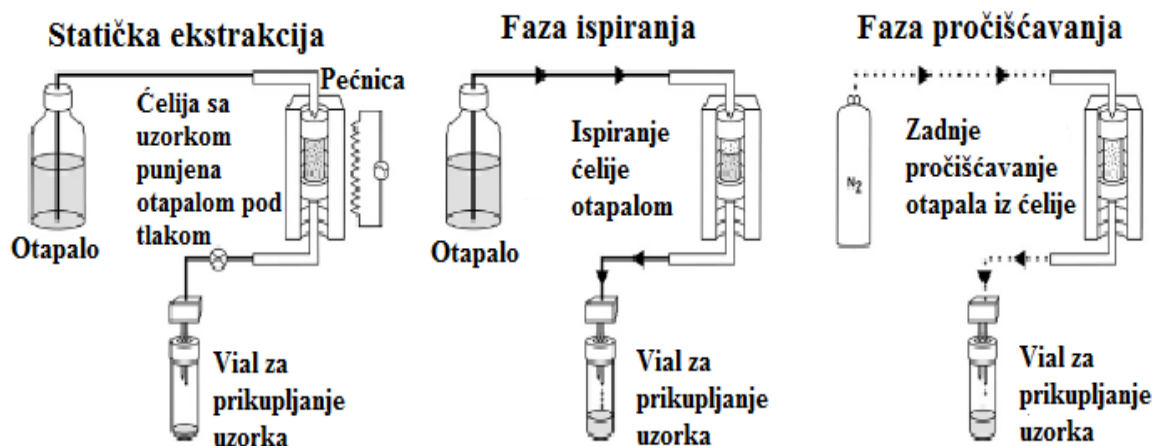
U posljednje vrijeme se za izolaciju bioaktivnih sastavnica iz biljnih materijala sve češće primjenjuje i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE). Termin „ASE“ izveden je od prvog komercijalno dostupnog uređaja za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku - *Accelerated Solvent Extractor*, proizvedenog u tvrtki Dionex, a tehnika je prvi put predstavljena 1995. godine (Wianowska i Gil, 2019).

S vremenom je ova tehnika poprimila i druge nazive, a prema podacima iz literature danas se najčešće korist naziv PLE (*pressurized liquid extraction*), a uz PLE i ASE naziv u literaturi se također može pronaći i pod nazivima PSE (*pressurised solvent extraction*), PFE (*pressurized fluid extraction*), PHSE (*high-pressure solvent extraction*), HPHT (*high-pressure high-temperature solvent extraction*), SSE (*subcritical solvent extraction*). Ukoliko se koristi voda kao ekstrakcijsko otapalom često se primjenjuju i nazivi *pressurized hot water extraction* (PHWE), *superheated water extraction*, *subcritical water extraction* (Thoo i sur.,), *hot-water extraction* (HWE) ili *high-temperature water extraction* (HTWE) (Wianowska i Gil, 2019; Alvarez-Rivera i sur., 2020). Danas se ova tehnika primjenjuje najčešće upravo za izolaciju antioksidansa, uključujući fenolne spojeve i druge bioaktivne biljne sastavnice (Alvarez-Rivera

i sur., 2020).

ASE označava automatiziranu ekstrakcijsku tehniku kod koje je kombiniranim djelovanjem povišenih temperatura (do 200 °C) i tlakova (do 3000 psi) omogućeno postizanje ekstrakcije u vrlo kratkom vremenu (Hossain i sur., 2011). Neki od glavnih razloga sve učestalije upotrebe ASE su: visoki stupanj automatizacije (Radrigán i sur., 2017), smanjena uporaba otapala (do čak 90 %), širok raspon primjene, mogućnost korištenja mase uzorka od 1 do 100 g, bolja reproducibilnost, niži troškovi ekstrakcije te mogućnost filtriranja i čišćenja uzoraka u jednom koraku bez potrebe za naknadnom filtracijom (Mottaleb i Sarker 2012; Toubane i sur., 2017), što je slučaj kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Carabias-Martínez i sur., 2005). ASE povećava učinkovitost ekstrakcije termolabilnih spojeva skraćivanjem vremena ekstrakcije čime su oni manje izloženi visokim temperatura. Izuzetno je korisna tehnika za izolaciju biljnih spojeva prisutnih u tragovima te olakšava izolaciju spojeva iz tvrdih i mehaničkih otpornih biljnih tkiva, kao i onih spojeva koji tvore jake veze s ligninom (Wianowska i Gil, 2019). Osim navedenog, ASE omogućuje zaštitu od djelovanja kisika i svjetla, te se zato primjenjuje za izolaciju širokog spektra bioaktivnih spojeva osjetljivih na djelovanje navedenih čimbenika, uključujući i fenolne spojeve (Mottaleb i Sarker 2012; Benayad i sur., 2014; Gomes i sur., 2017). Zbog principa djelovanja može se koristiti kao brza referentna tehnika (Wianowska i Gil, 2019).

Princip ASE je jednostavan i uključuje tri uzastopna koraka (*slika 12*). Prvi korak, koji se obično naziva statičko vrijeme, označava pomicanje ekstrakcijskog otapala kroz ekstrakcijsku ćeliju s uzorkom, pri čemu kroz određeno vrijeme dolazi do izravnog kontakta uzorka sa zagrijanim otapalom, pod tlakom i odabranom temperaturom. Tijekom druge faze, koja se naziva i faza ispiranja, otapalo se pumpa kroz ekstrakcijsku ćeliju kako bi se dobiveni ekstrakt uklonio, a uzorak isprao svježim otapalom. Treća faza označava pročišćavanje ekstrakcijske ćelije pomoću komprimiranog dušika, a provodi se s ciljem potpunog uklanjanja otapala iz ćelije i ASE sustava. Kad je ekstrakcija završena, komprimirani dušik uklanja otapalo s ekstrahiranim komponentama iz ćelije u prihvatne boce za uzorak. Tako skupljeni ekstrakt iz matriksa uzorka spreman je za analizu, bez potrebe za daljnjim koracima filtracije ili centrifugiranja (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 12. Faze ASE procesa (Prilagođeno iz Wianowska i Gil, 2019)

Na učinkovitost ASE utječu različiti čimbenici. Temperatura je jedan od najvažnijih faktora budući da se povišenjem temperature modificiraju fizikalno - kemijska svojstva otapala, što utječe na efikasnost procesa ekstrakcije (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Stoga, standardnim ASE uvjetima koje preporučuje Dionex, smatraju se temperatura ekstrakcije 100 °C i tlak 60 bara, iako komercijalno dostupni ASE uređaji omogućuju rad u širokom temperaturnom rasponu od sobne temperature do 200 °C (Wianowska i Gil, 2019). Povišena temperatura tijekom ASE djeluje na način da smanjuje viskoznost otapala i matriksa uzrokujući bolju topljivost analita, rezultira slabljenjem veza između otopljene tvari i matriksa te uzrokuje veće brzine difuzije što za posljedicu ima povećanje ekstrakcijskog prinosa (Mustafa i Turner 2011; Mottaleb i Sarker 2012). Nadalje, uslijed primjene povišene temperature kod ASE se značajno smanjuje potrebna količina otapala, kao i vrijeme izolacije bioaktivnih spojeva na nekoliko minuta (Wianowska i Gil, 2019). Jedna od prednosti ASE je upravo skraćivanje vremena ekstrakcije, čime se smanjuje izloženost termolabilnih spojeva visokim temperaturama (Wianowska i Gil, 2019). S druge strane, povišena temperatura tijekom ASE procesa, osim povećanja topljivosti ciljanih bioaktivnih spojeva, može povećati topljivost i drugih neželjenih komponenti, što ovu tehniku čini manje selektivnom (Wianowska i Gil, 2019; Alvarez-Rivera i sur., 2020). Uslijed povišenja temperature mogu se također dogoditi određene kemijske reakcije koje dovode do formiranja toksičnih ili neželjenih spojeva. Kao i kod drugih ekstrakcija koje djeluju na principu povišene temperature, i u ovom slučaju može doći do degradacije termolabilnih spojeva (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

U istraživanju koje su objavili Bursać Kovačević i sur. (2018) ispitan je utjecaj ASE na različite bioaktivne spojeve (ukupni fenoli, kondezirani tanini, klorofil A, klorofil B, karotenoidi i steviol glikozidi) listova stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni), uz vodu kao

ekstrakcijsko sredstvo. U navedenom istraživanju ispitan je utjecaj temperature (100, 130, 160 °C), statičkog vremena (5 i 10 min) i broja ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3). Temperatura ekstrakcije pokazala se kao statistički najznačajniji faktor, a najviši prinosi svih bioaktivnih spojeva (osim karotenoida) ostvareni su primjenom najviše temperature (160 °C). Osim temperature, statistički značajan utjecaj na prinose ukupnih fenola imali su i ostali ispitani faktori ekstrakcije. Uz visoku temperaturu ekstrakcije, za ukupne fenole najpovoljnijim se pokazalo i statičko vrijeme 5 minuta, uz provođenje ekstrakcije u tri ciklusa, odnosno statičko vrijeme od 10 minuta u dva ciklusa ekstrakcije.

Toubane i sur. (2017) su istraživali utjecaj ASE na ekstrakcijski kapacitet fenolnih spojeva korijena šafranike. U navedenom istraživanju ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: vrsta otapala (etanol, metanol, heksan), temperatura (40-50 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (30-50 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1-5). Najbolji učinci ekstrakcije postignuti su primjenom etanola kao otapala, pri nižoj temperaturi ekstrakcije (40 °C), pet ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme od 30 minuta.

Vrijeme ekstrakcije kod ASE se definira kao vrijeme tijekom kojeg je otapalo u kontaktu s matriksom na zadanoj temperaturi, tlaku i protoku (Alvarez-Rivera i sur., 2020). ASE uobičajeno završava unutar 20 minuta, a ukoliko je potrebno duže vrijeme od toga, važno je ispitati različite kombinacije otapala i viših temperatura ekstrakcije da bi se skratilo vrijeme ekstrakcije. Razlog uvođenja više statičkih ciklusa je dovođenje svježeg otapala tijekom procesa ekstrakcije s ciljem održavanja povoljne ekstrakcijske ravnoteže. Korištenjem statičkih ciklusa može se postići skraćivanje vremena ekstrakcije. Primjerice tri statička ciklusa od 3 minute mogu se koristiti umjesto jednog ciklusa od 10 minuta (Mottaleb i Sarker 2012).

Povišena temperatura sama po sebi nije dovoljna za povećanje ekstrakcijskih prinosa jer većina organskih otapala koja se koriste kod ASE ima nisku točku vrelišta (Mustafa i Turner 2011; Mottaleb i Sarker 2012). Visoki tlak omogućuje rad s otapalima u tekućem stanju i iznad njihove točke vrelišta, ali poboljšava i ubrzava cjelokupan postupak ekstrakcije potičući ulazak otapala u matriks. Tlak smanjuje također i površinsku napetost otapala, čime se olakšava prodiranje otapala u pore, a što za posljedicu ima povećan prijenos mase analita iz uzorka u otapalo. Dakle, kombinacija povišene temperatura i tlaka omogućuju djelotvoran, brz i učinkovit postupak ekstrakcije (Mustafa i Turner 2011; Mottaleb i Sarker 2012; Saha i sur., 2015).

Osim tlaka, temperature i vremena ekstrakcije na efikasnost ASE utječe odabir otapala, broj ciklusa ali i fizička svojstva uzorka kao što su veličina čestica uzorka, sadržaj vode u uzorku te omjer uzorka i otapala (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Učinkovita ASE ekstrakcija

zahtijeva minimalnu veličinu čestica uzorka (općenito manju od 1 mm) s obzirom na činjenicu da ekstrakcija otapalom ovisi o površini uzorka. Manje čestice, odnosno veća površina uzorka poboljšavaju ekstrakciju zbog boljeg kontakta analita i otapala (Mottaleb i Sarker, 2012).

Obične ili zakiseljene vodene otopine etanola, obično s udjelom etanola većim od 50 %, su preferirana otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva pomoću ASE (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Kang i sur. (2016) su istraživali utjecaj različitih ekstrakcijskih varijabli na količinu flavonoida luteolina iz listova paprike. Na pet razina su ispitivane sljedeće varijable: temperatura (60-180 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (1-5 min), udio etanola u vodenoj otopini etanola (60-100 %). Ustanovljeni su uvjeti ASE pri kojima je određen maksimalan sadržaj luteolina: temperatura ekstrakcije 93,26 °C, statičko vrijeme 5 minuta i primjena 79,63 %-tne vodene otopine etanola.

U različitim dosadašnjim istraživanjima ASE se pokazala učinkovitijom tehnikom od tradicionalnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva. U istraživanju koje su proveli Jentzer i sur. (2015) ispitivan je utjecaj temperature (40-100 °C), statičkog vremena (1-7 min) i broja ciklusa (1-3) na ekstrakcijski prinos glikozida iz listova stevije (*S. rebaudiana* Bertoni) primjenom Dionex ASE 350 sustava. Sve tri ispitivane varijable značajno su utjecale na ekstrakcijski prinos. Optimalan ekstrakcijski prinos postignut je uz provođenje ekstrakcije na temperaturi 100 °C, uz jedan ciklus i statičko vrijeme ekstrakcije od 4 minute. U navedenom istraživanju zaključeno je da je ASE, u usporedbi s konvencionalnim i nekonvencionalnim ekstrakcijama brža i ekološki prihvatljiva tehnika koja zahtijeva manju potrošnju energije.

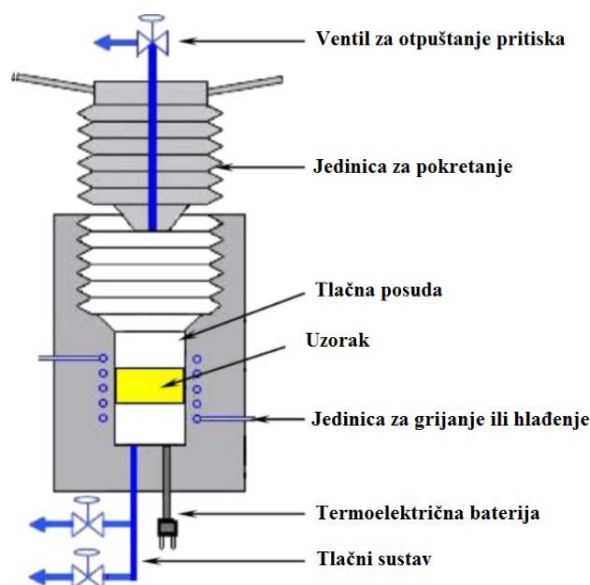
U istraživanju koje su proveli Leyva-Jimenez i sur. (2018) provedena je ASE iz listova limunovca (*Lippia citriodora*), s ciljem optimizacije ekstrakcijskog prinosa polarnih spojeva i izolacije tri različite skupine spojeva (iridoidni glikozidi, flavonoidi i fenilpropanoidi/feniletanoidi). U istraživanju je ispitan utjecaj temperature (40, 110, 180 °C), vremena ekstrakcije (5, 12,5, 20 min) te udjela etanola u vodenoj otopini etanola (15, 50, 85 %). Paralelno s ASE, provedena je i konvencionalna ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 90 minuta kod koje su za ekstrakciju također korištene vodene otopine etanola (25, 50, 75 i 100 %) i voda. Na osnovu statističke obrade rezultata zaključeno je da visoka temperatura ima pozitivan utjecaj na ekstrakcijski prinos i kao optimalni uvjeti postavljeni su temperatura ekstrakcije 200 °C, vrijeme ekstrakcije 17 minuta i 46 %-tna vodena otopina etanola kao ekstrakcijsko sredstvo. U slučaju ekstrakcije flavonoida, visoka temperatura je dovela do razgradnje flavonoida, zbog čega su kao optimalni uvjeti za izolaciju flavonoida postavljeni sljedeći uvjeti: temperatura ekstrakcije 90 °C, 23 %-tna vodena otopina etanola i vrijeme

ekstrakcije 16 minuta. Na osnovu provedenog istraživanja također je zaključeno da se pomoću ASE postižu bolji prinosi u odnosu na konvencionalnu tehniku ekstrakcije.

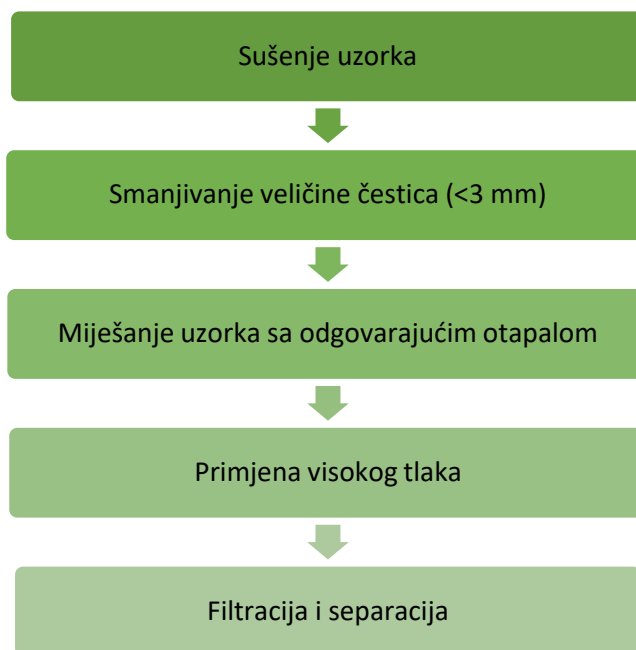
2.4.3. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. *high pressure-assisted extraction*; HPAE) također se ubraja u novije, nekonvencionalne ekstrakcijske tehnike te podrazumijeva podvrgavanje uzorka visokim vrijednostima tlaka (od 100 do 1000 MPa) (Briones-Labarca i sur., 2015).

Na slici 13 shematski je prikazan HPAE uređaj dok su na slici 14 prikazani općeniti koraci uključeni u HPAE. Prije provođenja HPAE potrebno je uzorak osušiti a zatim isti samljeti i prosijati. Sušenje se provodi s ciljem uklanjanja vlage iz uzorka budući da vlaga u uzorku može smanjiti učinkovitost ekstrakcije. Mljevenjem i prosijavanjem uzorka smanjuje se veličina čestica, čime se može značajno povećati difuzija bioaktivnih sastojaka iz matriksa u otapalo, primjerice smanjivanjem veličine čestica ispod 3 mm. Nakon navedene pripreme, uzorci se miješaju s otapalom i stavljaju u sterilnu polietilensku vrećicu, nakon čega se vrećica s uzorkom potapa u otapalo s ciljem eliminacije unutarnjeg zraka. Potom se vrećica s uzorkom postavlja u posudu s visokim hidrostatskim tlakom, uz održavanje vrijednosti postavljenog tlaka kroz zadano vrijeme. Nakon završene ekstrakcije, iz dobivene smjese uklanjaju se krute čestice, a ostatci se ponovo miješaju s otapalom te se postupak HPAE ponavlja (Khan i sur., 2019).



Slika 13. Shematski prikaz sustava za ekstrakciju visokim hidrostatskim tlakom (Huang i sur., 2013; Khan i sur., 2019)



Slika 14. Općenita procedura za HPAE (Khan i sur., 2019)

Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka zasniva se na poboljšanju prijenosa mase, čime se povećava propusnost stanice i difuzija sekundarnih metabolita (Corrales i sur., 2008). Visoki hidrostatski tlak može također uzrokovati deprotoniranje nabijenih skupina te poremećaj elektrolitnih mostova i hidrofobnih veza, što u konačnici rezultira konformacijskim promjenama i denaturacijom proteina. Stanična membrana tako postaje manje selektivna pa je proces ekstrakcije bioaktivnih spojeva olakšan (Prasad i sur., 2009b; Briones-Labarca i sur., 2015). Razlika tlakova koja se stvori na unutrašnjoj i vanjskoj strani membrane kao posljedica djelovanja visokog hidrostatskog tlaka omogućuje prodiranje otapala u uzorak što za rezultat ima povećanje ekstrakcijskog prinosa (Briones-Labarca i sur., 2015).

S ciljem osiguranja maksimalnog ekstrakcijskog prinosa fenolnih spojeva primjenom HPAE, osim već spomenutih svojstva biljnog materijala (veličina čestica i sadržaj vlage), potrebno je obratiti pozornost i na sljedeće parametre: tlak, vrstu i koncentraciju otapala, omjer uzorka i otapala, temperaturu i trajanje ekstrakcije (Kumar i sur., 2006; Xi i sur., 2009; Jun 2013; Xi i sur, 2017). Početni korak optimizacije bilo koje tehnike, pa tako i HPAE, je izbor odgovarajućeg otapala za ekstrakciju (Shirsath i sur., 2012; Jun, 2013). Otapalo mora biti selektivno, odnosno imati sposobnost otapanja ciljanih spojeva, te kompatibilno s koracima koji slijede nakon provedene ekstrakcije, kao što je proces pročišćavanja ekstrakta i određivanje bioaktivnih spojeva (Jun, 2013). Iako je na osnovu dosad provedenih istraživanja teško izdvojiti otapalo koje se smatra najboljim za ekstrakciju fenolnih spojeva, široko je prihvaćeno da veća

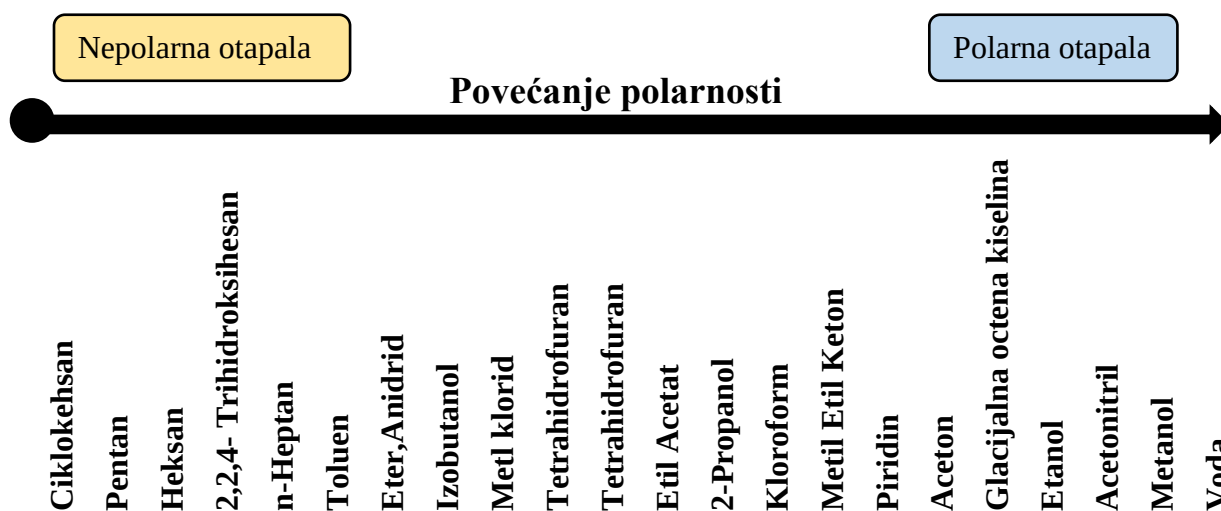
polarnost otapala obično znači bolju topljivost fenolnih spojeva u otapalima. No, razlike u strukturi fenolnih spojeva mogu biti kritične za njihovu topljivost. Tako, primjerice, višestruke hidroksilne skupine, konjugirane ili nekonjugirane sa šećerima, kiselinama ili alkilnim skupinama otežavaju proces ekstrakcije (Aires, 2017). Nadalje, zbog svog potencijalnog antioksidacijskog kapaciteta, fenolni spojevi lako i brzo stupaju u reakciju s drugim komponentama u matriksu (Setyaningsih i sur., 2016), zbog čega je teško odabrati univerzalni sustav otapala za sve vrste fenolnih spojeva, ali većina autora se slaže da je dobar sustav otapala onaj koji omogućuje dobivanje maksimalnih prinosa fenolnih spojeva bez modifikacija njihove kemijske prirode (Aires, 2017).

U tom kontekstu, prilikom odabira specifičnog otapala mora se razmotriti više različitih čimbenika, uključujući sljedeće:

- snagu otapala (selektivnost)
- polarnost
- temperaturu vrelišta (koja bi trebala biti niska da se olakša njegovo uklanjanje)
- reaktivnost (otapalo ne bi trebalo kemijski reagirati s ekstraktom ili ga razgraditi)
- viskoznost (poželjna niska)
- stabilnost (otapala bi trebala stabilna na utjecaj topline, kisike i svjetlosti)
- sigurnost upotrebe (otapalo bi trebalo biti nezapaljivo i netoksično za ljude i okoliš)
- prikladnost za ponovnu uporabu (ukoliko je moguće)
- usklađenost sa zakonodavstvom koje se odnosi na hranu (Aires, 2017).

Polarnost otapala (*slika 15*) jedan je od faktora koji značajno utječe na sposobnost otapala za ekstrakciju bioaktivnih sastavnica. Općenito, za ekstrakciju biljnih fenolnih spojeva uglavnom se primjenjuju polarna otapala i to ponajviše binarne vodene otopine acetona, etanola, metanola i etil-acetata jer su se u različitim istraživanjima pokazala uspješnijima od mono sustava, odnosno 100 %-tnih otapala (Spigno i sur., 2007; Do i sur., 2014).

U istraživanju koje su proveli Xi i sur. (2009) ispitivan je utjecaj otapala (voda, metanol, etanol i aceton te odgovarajućih 50 %-tnih otopina, v/v) na ekstrakcijske prinose fenolnih spojeva iz listova zelenog čaja primjenom HPAE. Binarni sustavi otapala su se ponovo pokazali učinkovitijima od mono sustava, a najveći ekstrakcijski kapacitet postignut je uporabom 50 %-tne vodene otopine etanola, što je u skladu s dosadašnjim spoznajama jer su 20-100 %-tne vodene otopine etanola najčešće korištena otapala kod HPAE (Jun i sur., 2013).



Slika 15. Polarnost najčešće korištenih organskih otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz prirodnih izvora (Aires, 2017)

Osim otapala, odabir tlaka je važan parametar za optimizaciju HPAE. Industrijski procesi koji koriste visoki hidrostatski tlak trenutačno su ograničeni na vrijednost tlaka od 600 MPa (Xu i sur., 2017), a tlak potreban za ekstrakciju bioaktivnih sastojaka iz prirodnih materijala obično se kreće u rasponu od 100 do 600 MPa (Jun i sur., 2013). Kod HPAE tlak ima ključnu ulogu budući se pod utjecajem visokog tlaka povećava topljivost većine bioaktivnih spojeva koji se mogu naći u prirodi. Dakle, povećanje vrijednosti tlaka može poboljšati učinkovitost ekstrakcije, ali doprinosi i smanjenju vremena ekstrakcije. Naime, kako se tlak povećava dolazi do povećanja nekih svojstava otapala, primjerice, snage i topljivosti. Istovremeno se dielektrična konstanta vode smanjuje, što pridonosi povećanju polarnosti medija koja se povezuje s povećanjem bioaktivnih spojeva u dobivenom ekstraktu. S druge strane, povećanje tlaka može značiti i povećanje cijene procesa ekstrakcije (Xu i sur., 2017; Pinela i sur., 2018; Khan i sur., 2019), zbog čega je izrazito bitno provesti optimizacije procesa.

U istraživanju koje su proveli Pinela i sur., (2018) provedeno je optimiranje ekstrakcije fenolnih spojeva pomoću HPAE iz potočarke (*Nasturtium officinale*), uz temperaturu ekstrakcije od 20 °C. Kao nezavisne varijable ispitivani su sljedeći parametri na pet razina: vrijeme (1,5-33,5 min), volumni udio etanola (0-100 % etanola, v/v) i tlaka (0,1-600 MPa). Na osnovu statističke obrade rezultata, kao optimalni uvjeti HPAE određeni su: vrijeme ekstrakcije u trajanju 3,1 min, tlak 600 MPa i 100 % etanol kao otapalo.

Briones-Labarca i sur. (2019) ispitali su utjecaj tlaka i vrste otapala na ekstrakcijske prinose, sadržaj flavonoida i sadržaj likopena iz pulpe rajčice (*Solanum lycopersicum*). U provedenom istraživanju primijenjene su vrijednosti tlaka od 250, 350 i 450 MPa, a kao otapalo

su korištene smjese otapala sastavljene od nepolarnog (heksan) i polarnog otapala (etanol/acetona) u sljedećim volumnim omjerima, T1 = 40:60 (30/30), T2 = 50:50 (25/25) i T3 = 60:40 (20/20). Zaključeno je da su optimalni uvjeti ekstrakcije 60 %-tna otopina heksana te tlak od 450 MPa. HPAE u trajanju 10 minuta pokazala se povoljnijom od konvencionalne ekstrakcije u trajanju 24 sata.

Osim povećanja vrijednosti tlaka, povećanje temperature tijekom ekstrakcije, kako općenito tako i tijekom HPAE, obično utječe na poboljšanje ekstrakcijskog kapaciteta kao rezultat povećane difuzije otapala u unutarnje dijelove matriksa i desorpcije komponenti s aktivnih mjesta matrica. Povećanje temperature vodi smanjenju viskoznosti i površinske napetosti tekućih otapala, međutim, maksimalna temperatura ekstrakcije je ograničena osjetljivošću ciljanog spoja na djelovanje povišene temperature. Prilikom ekstrakcije može doći do degradacije termolabilnih spojeva, kao što su fenoli (Xi i sur., 2015), zbog čega je od iznimne važnosti pravilno postaviti temperaturu ekstrakcije. Kao jedna od glavnih prednosti ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom često se navodi mogućnost provođenja iste na sobnoj odnosno umjerenim temperaturama (Shouqin i sur., 2005; Xi i sur., 2011; Jun, 2013). Tako se temperatura potrebna za ekstrakciju bioaktivnih sastojaka kod HPAE obično kreće u rasponu od 20 do 60 °C (Jun, 2013).

Učinkovitost HPAE procesa ovisi također i o vremenu ekstrakcije, odnosno broju ciklusa ekstrakcije. Duže trajanje ekstrakcije osigurava da su analiti u dužem kontaktu s otapalom, što direktno utječe na povećanje ekstrakcijskog prinosa. Prema Pascalovoj teoriji, prijenos tlaka na cijeli materijal tijekom HPE procesa je ujednačen, zbog čega je najčešće potrebno vrlo kratko vrijeme za postizanje ravnoteže između unutarnjeg i izvanstaničnog tlaka. Stoga su vrijeme od 1-10 min i 1-2 ciklusa dovoljni za ekstrakciju bioaktivnih spojeva pomoću HPAE (Khan i sur., 2019), što ovu tehniku čini dobrom alternativom konvencionalnim tehnikama ekstrakcije za koje je obično potrebno znatno duže vrijeme. Nadalje, primjenom HPAE se smanjuje količina potrebnog otapala i poboljšava učinkovitost ekstrakcije u pogledu prinosa, kvalitete i selektivnosti izoliranih spojeva te je moguće izbjeći degradaciju termolabilnih spojeva (Xi 2017; Pinela i sur., 2018; Briones-Labarca i sur., 2019), što ovoj tehnici također daje prednost u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije.

Briones-Labarca i sur. (2019) su uspoređujući prinose ekstrakcije, sadržaj flavonoida i likopena iz ekstrakata pulpe rajčice dobivenih primjenom HPAE i konvencionalne ekstrakcije, zaključili da je HPAE u trajanju od 10 min znatno učinkovitija od konvencionalne tehnike ekstrakcije u trajanju 24 sata. Slično se pokazalo i u istraživanju koje su proveli Shouqin i sur. (2005) jer su u trajanju od jednu minute postignuti veći ekstrakcijski prinosi flavonoida iz

propolisa u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju pri sobnoj temperaturi i uz refluks u trajanju od 4 sata.

Iako je primjena visokog hidrostatskog tlaka u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala prepoznata kao tehnika ekstrakcije koja ima visoki potencijal, istraživanja utjecaja HPAE na bioaktivne spojeve još su uvijek rijetka i potrebno je više istraživanja usmjerenih na različite spojeve i biljne materijale (Pinela i sur., 2018) da se otkrije i razjasni potpuni potencijal ove ekstrakcijske tehnike.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

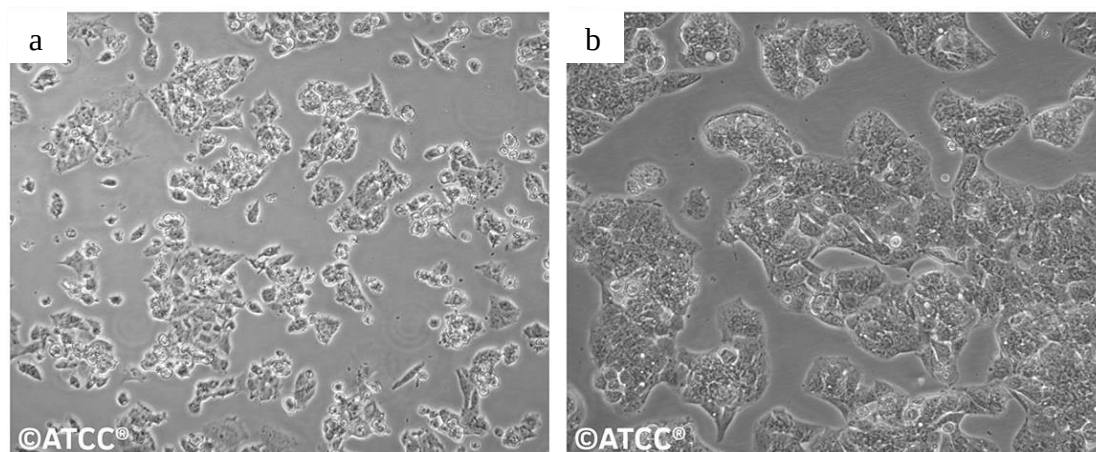
3.1.1. Biljni materijal

Kao biljni materijal za istraživanja provedena u sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sušeni cvjetovi samonikle trnine, nabavljeni od lokalnog proizvođača (Suban d.o.o, Strmec, Hrvatska). Cvijet trnine sakupljen je na području Hrvatske te je nakon branja osušen i zapakiran u papirnatu ambalažu. Do trenutka provođenja ekstrakcija uzorak je čuvan u laboratoriju na tamnom mjestu u originalno zaprimljenoj ambalaži. Prije provođenja ekstrakcija cvjetovi trnine su samljeveni u fini prašak pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevit, Italija). Kako bi se izbjegla degradacija fenolnih spojeva, proces mljevenja je proveden na način da je mljevenje zaustavljano svakih 15 sekundi, u trajanju od 10 sekundi. Raspodjela veličine čestica u uzorku određena je pomoću laserskog analizatora veličine čestica (MASTERSIZER 2000, Malvern Instruments i Worcestershire, UK). Promjer 90 % čestica uzorka bio je manji je od 349 μm , odnosno promjer 50 % čestica manji od 138 μm .

3.1.2. Biološki materijal

Sukladno činjenici da su glavni izvori staničnih linija u svijetu ECACC (*European Collection of Animals Cell Cultures*, Velika Britanija) i ATCC (*American type culture collection*, SAD), za određivanje antiproliferativnog učinka ekstrakta cvijeta trnine korištena je Hep G2- stanična linija humanog hepatocelularnog karcinoma kupljena u ATCC (Manassas, VA, SAD). Njihove certificirane stanične linije imaju potpune pojedinosti o donatoru, kariotipsku analizu, očekivano vrijeme udvostručenja broja stanica i značajke stanica u kulturi (Srivastava i sur., 2018).

Hep G2 stanična linija (*slika 16*) je epitelna, adherentna, stanična linija dobivena iz jetre 15-ogodišnjeg američkog bijelca oboljelog od hepatocelularnog karcinoma (ATCC, 2016), najčešćeg malignog oboljenja primarne jetre i vodećeg uzroka smrti povezanih s rakom u svijetu. Do trenutka provođenja istraživanja Hep G2 stanična linija čuvana je zamrznuta na temperaturi -80 °C u mediju za smrzavanje.



Slika 16. Hep G2 stanična linija: a) niske gustoće stanica i b) visoke gustoće stanica (ATCC, 2016)

3.1.3. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupke ekstrakcije

- Metanol; Macron Fine ChemicalsTM; Norveška
- Etanol; Gram-Mol; Hrvatska
- Destilirana voda
- Dijatomejska zemlja

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta

- Folin-Ciocalteu reagens; Kemika; Hrvatska
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (m/v), Na₂CO₃; T.T.T., Hrvatska
- Galna kiselina; Sigma Aldrich, Njemačka
- 100 % metanol; Macron Fine ChemicalsTM, Norveška
- 96 % etanol; Gram-Mol, Hrvatska
- Aluminijski klorid, 10 %-tni ; Kemika, Hrvatska
- Kalijev acetat, 1 M; VWR Chemicals, SAD
- Kvercetin-3-O-galaktozid; Extrasynthese, Francuska
- Klorovodična kiselina 37 % (m/v), Carlo Erba Reagents s.l.r, Francuska
- Kafeinska kiselina; Sigma-Aldrich, Švicarska
- 0,2 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal); Sigma-Aldrich, Švicarska
- Trolox (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (0,02 M); Sigma-

Aldrich, Švicarska

- TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM ; Sigma-Aldrich, Švicarska
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina; Gram-Mol, Hrvatska
- Glacijalna octena kiselina
- Natrij acetat trihidrat; Kemika, Hrvatska
- FRAP reagens
- Standard askorbinske kiseline (100 mg/L); Gram-Mol (Zagreb, Croatia)
- Destilirana voda

Kemikalije za određivanje antiproliferativnog učinka i uzgoj stanične kulture

- *Dulbecco's MEM/F12*, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS-serum goveđeg fetusa), GIBCO, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- Boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- *Coomassie brilliant blue R-250*, LKB, Bromma, Švedska
- Ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
- Apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje
- DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb
- Kalijev acetat, Kemika, Zagreb
- Destilirana voda
- *Neutralrot*, E.Merck Ag- Darmstadt, Njemačka
- *MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit* (Catalog No. MCH100105)

Kemikalije i standardi za HPLC određivanje

- Voda HPLC čistoće
- Acetonitril HPLC čistoće; BDH Prolabo, VWR (Lutterworth, Engleska).
- Mravlja kiselina, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)
- Kvercetin 3- β -D-glukozid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Kamferol 3-O-rutinozid (Sigma Aldrich, Njemačka)

- Klorogenska kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- *p*-Kumarinska kiselina, (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Ferulinska kiselina, (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Kafeinska kiselina, (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Katehin (Extrasynthese, Francuska)
- Procijandin B1 (Extrasynthese, Francuska)

3.1.4. Oprema

- Analitička vaga, Kern ABT 220-4M
- Mikrovalni reaktor, *Start S Microwave Labstation for Synthesis*, Milestone, S.r.l., Italija
- Vortex miješalica, MS2 Minishaker, IKA, SAD
- Centrifuga, Rotofix 32, Hettich, Njemačka
- Spektrofotometar UV-1600PC, VWR International, Belgija
- Uređaj za vakumiranje *Besser Vacuum*, SRL, Italija
- Uređaj za visoki tlak, *Stansted Fluid Power LTD*, Velika Britanija
- Kupelj od rotavapora, BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska
- Električni mlinac za kavu i začine, DolceVita CG1, Imetec, Italija
- ASE uređaj, *Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350*, Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom, IR 1500, Automatic CO₂, Flow laboratories, Velika Britanija
- Komora za sterilan rad, Twin 30, Gelair Flow Laboratories, Velika Britanija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Spektrofotometar; *Helios- γ*, Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka
- Precizna vaga; Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- Analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- Vibracijska miješalica, Technica Železniki, Slovenija
- MUSE instrument (*Muse® Cell Analyzer*), Milipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Agilent 1260 Infinity HPLC sustav koji se sastoji od: Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu te 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora.

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

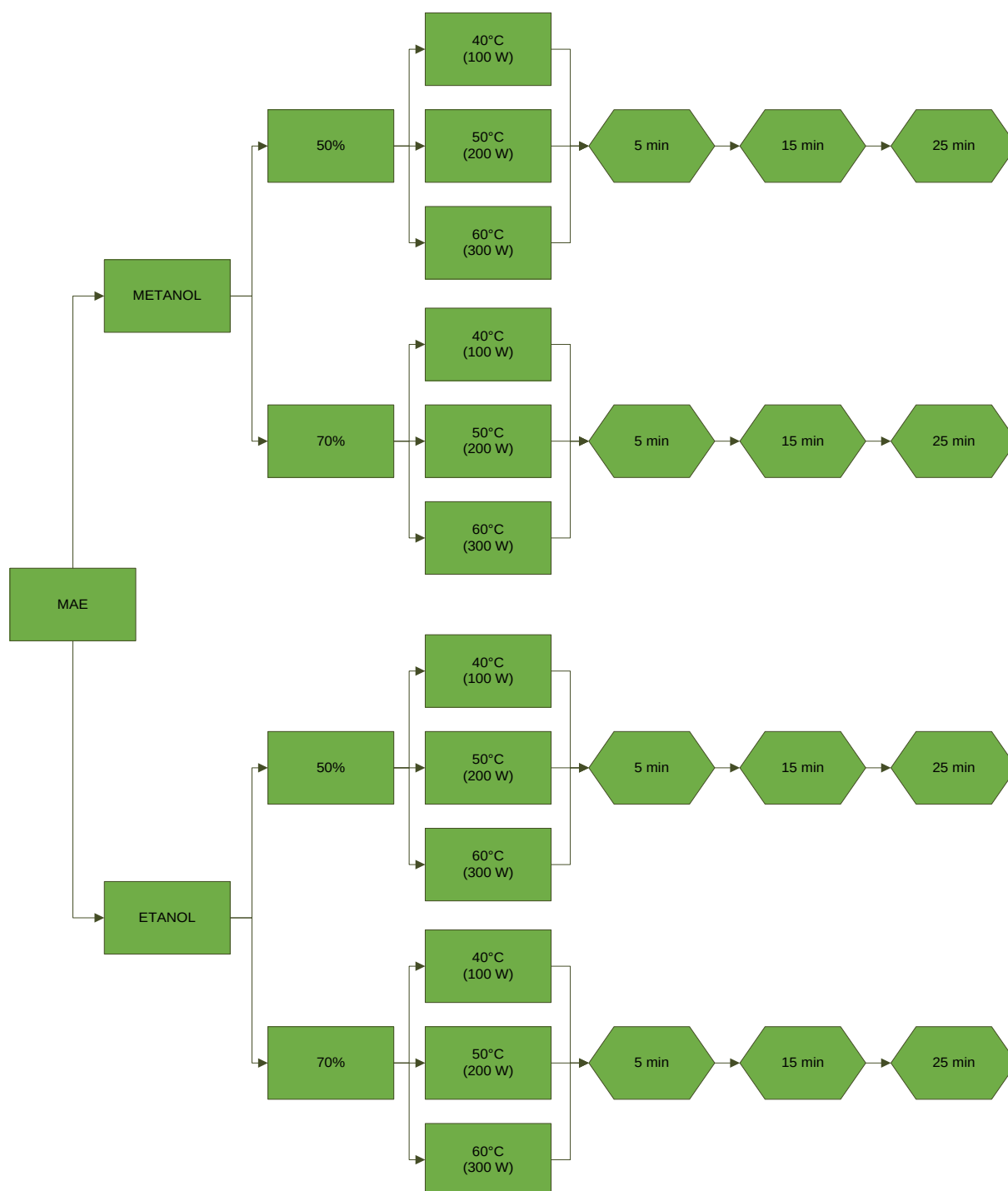
Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave assisted extraction- MAE*) provedena je na mikrovalnom reaktoru *Milestone, Start S Microwave Labstation for Synthesis* (Italija) (slika 17).



Slika 17. Mikrovalni reaktor *Start S Microwave Labstation for Synthesis* (Anonymous 3, 2020)

Kao zavisne varijable kod MAE promatrani su: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata izmjeren pomoću DDPH i FRAP metoda.

Nezavisne varijable u MAE su polarnost etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola (50 % i 70 %), temperatura ekstrakcije (40 °C, 50 °C i 60 °C), uz snagu mikrovalova 100, 200 i 300 W te vrijeme ekstrakcije (5 min, 15 min i 25 min).



Slika 18. Shematski prikaz MAE uz primjenu različitih otapala, vremena ekstrakcije, temperature i snage mikrovalova

Postupak ekstrakcije:

U plastične ladice odvaži se 500 mg (s točnošću $\pm 0,0001$) prethodno usitnjenih i osušenih cvjetova trnine. Izvagani uzorci se prenesu u tikvice s okruglim dnom i homogeniziraju sa 20 mL otapala (50 i 70 %-tne otopine etanola i metanola). Tikvica s uzorkom, u koju je prethodno ubačen magnetski mješač, se postavi na predviđeni prostor na postolju u mikrovalnom reaktoru (*Start S Microwave Labstation for Synthesis*, Italija). Na

tikvicu se spoji hladilo s klor-kalcijevom cijevi. Na mikrovalnom reaktoru postave se opći parametri ekstrakcije: vrijeme za postizanje temperature ekstrakcije 1 minuta, miješanje 80 %, ventilacija nakon ekstrakcije 2 minute, te se provodi ekstrakcija prema zadanim parametrima prikazanim na slici 18.

Tijekom provođenja ekstrakcije snaga mikrovalova varira s ciljem održavanja zadane temperature, a izabere se ovisnosti o zadanoj temperaturi (100 W za temperaturu 40 °C, 200 W za temperaturu 50 °C, 300 W za temperaturu 60 °C). Ekstrakti se miješaju pomoću magnetskog mješača da se osigura homogenost temperature u ekstraktima tijekom ekstrakcije.

Nakon ekstrakcije, uzorci se kvantitativno prebace u odmjerne tikvice od 25 mL koje se nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Zatim se uzorci centrifugiraju na 5500 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem se odvoji od nastaloga taloga dekantiranjem (te profiltrira ukoliko je potrebno) u čiste falkonice od 50 mL. Ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na temperaturi -60 °C do trenutka određivanja fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima. Svi ekstrakti pripremljeni su u dvije paralele te su srednje vrijednosti paralela korištene u prikazu rezultata.

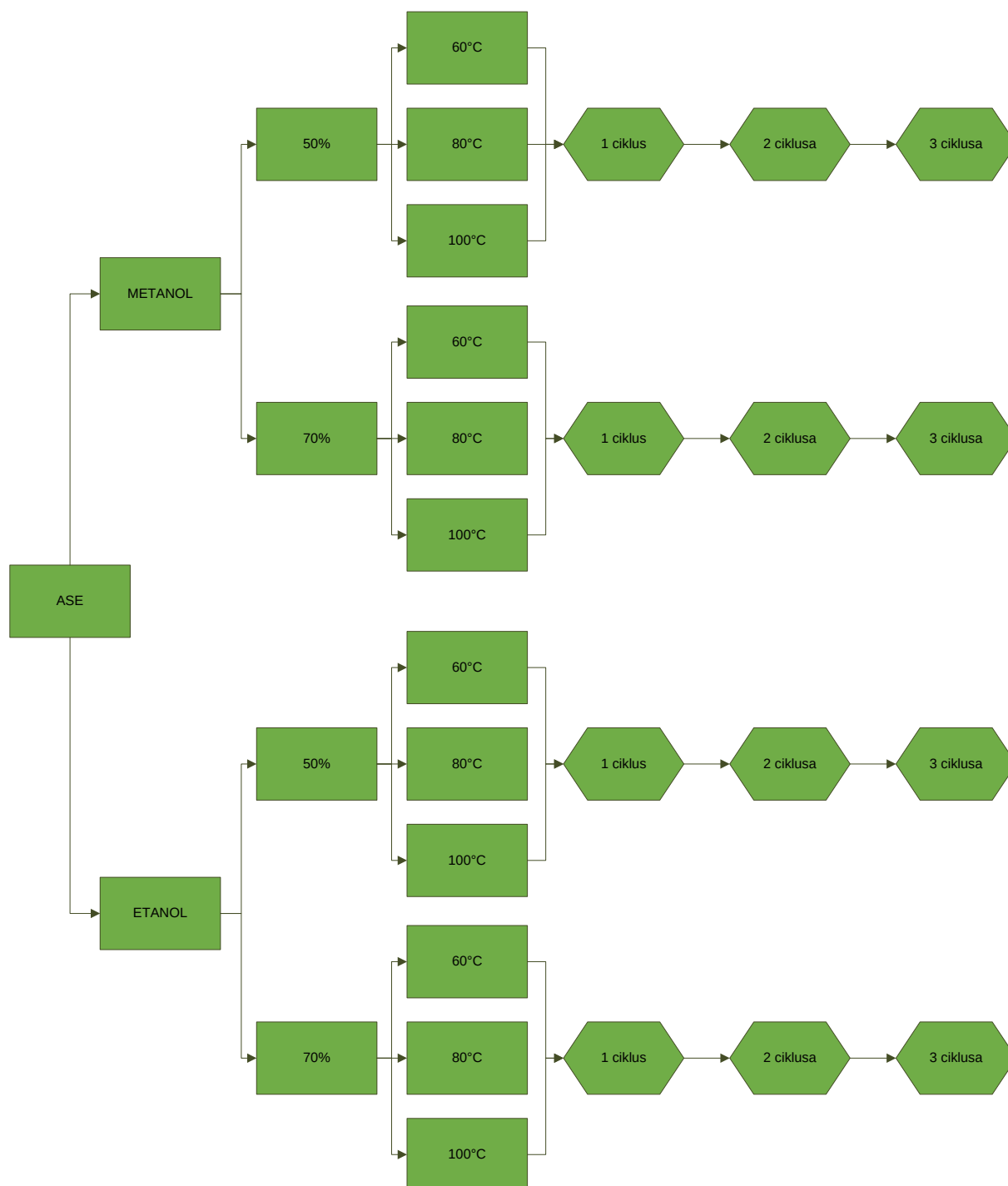
3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction* – ASE) provedena je ASE uređaju *Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350* (Thermo Fisher Scientific, California, SAD) (slika 19).



Slika 19. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku *Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350* (Anonymous 4, 2020)

Kao zavisne varijable kod ASE promatrani su: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata određen pomoću DDPH i FRAP metoda. Nezavisne varijable su udio etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola (50 % i 70 %), temperatura ekstrakcije (60 °C, 80 °C i 100 °C) te broj ciklusa ekstrakcije u trajanju od 5 minuta (1, 2 i 3).



Slika 20. Shematski prikaz ASE uz primjenu različitih otapala, temperature te broja ciklusa ekstrakcije

Postupak ekstrakcije:

U plastične ladice izvaže se 2 g (s točnošću $\pm 0,0001$) prethodno usitnjenih osušenih cvjetova trnine. Na dno ekstrakcijskih ćelija opremljenijih s fritama od nehrđajućeg čelika postave se *Glass Fiber* filter papiri, koji zajedno s fritama sprječavaju nakupljanje suspendiranih čestica u ekstraktu. Jedna mjerica dijatomejske zemlje (DE, P/N 062819) se doda u ekstrakcijske ćelije, te se potom dodaje prethodno izvagani uzorak a zatim opet dijatomejska zemlja do razine 5 mm ispod gornjeg ruba ekstrakcijske ćelije. Tako napunjene ekstrakcijske ćelije se zatvore i postave u ASE uređaj, na pozicije označene brojevima. U donjem dijelu uređaja postavljaju se staklene bočice za sakupljanje ekstrakata.

Prije početka same ekstrakcije, na zaslonu ASE uređaja se ručno postave parametri ekstrakcije prema planu pokusa, uz variranje faktora prikazanih na *slici 20*.

Tijekom ekstrakcije, stlačeno ekstrakcijsko otapalo (50 i 70 %-tna vodena otopina etanola/metanola) napuni ekstrakcijsku ćeliju. Zatim se provodi faza zagrijavanja u trajanju od 5 min, nakon čega kreće ekstrakcija, uz statično vrijeme ekstrakcije (5 min) i zadanu temperaturu (60, 80 i 100 °C). Ovisno o broju ciklusa zadanih planom pokusa (1, 2 ili 3 ciklusa), navedene operacije se ponavljaju. Nakon završene ekstrakcije, ćelije se isperu svježim ekstrakcijskim otapalom (50 % volumena ekstrakcijske ćelije) i propušu dušikom (30 s). Po završetku ekstrakcije, ekstrakti iz bočica se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL te nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju.

Tako pripremljeni ekstrakti prenesu se u prethodno označene plastične kivete volumena 50 mL te se skladište u zamrzivaču na -60 °C do provođenja analize. Svi ekstrakti pripremljeni su u dvije paralele te su srednje vrijednosti paralela korištene u prikazu rezultata.

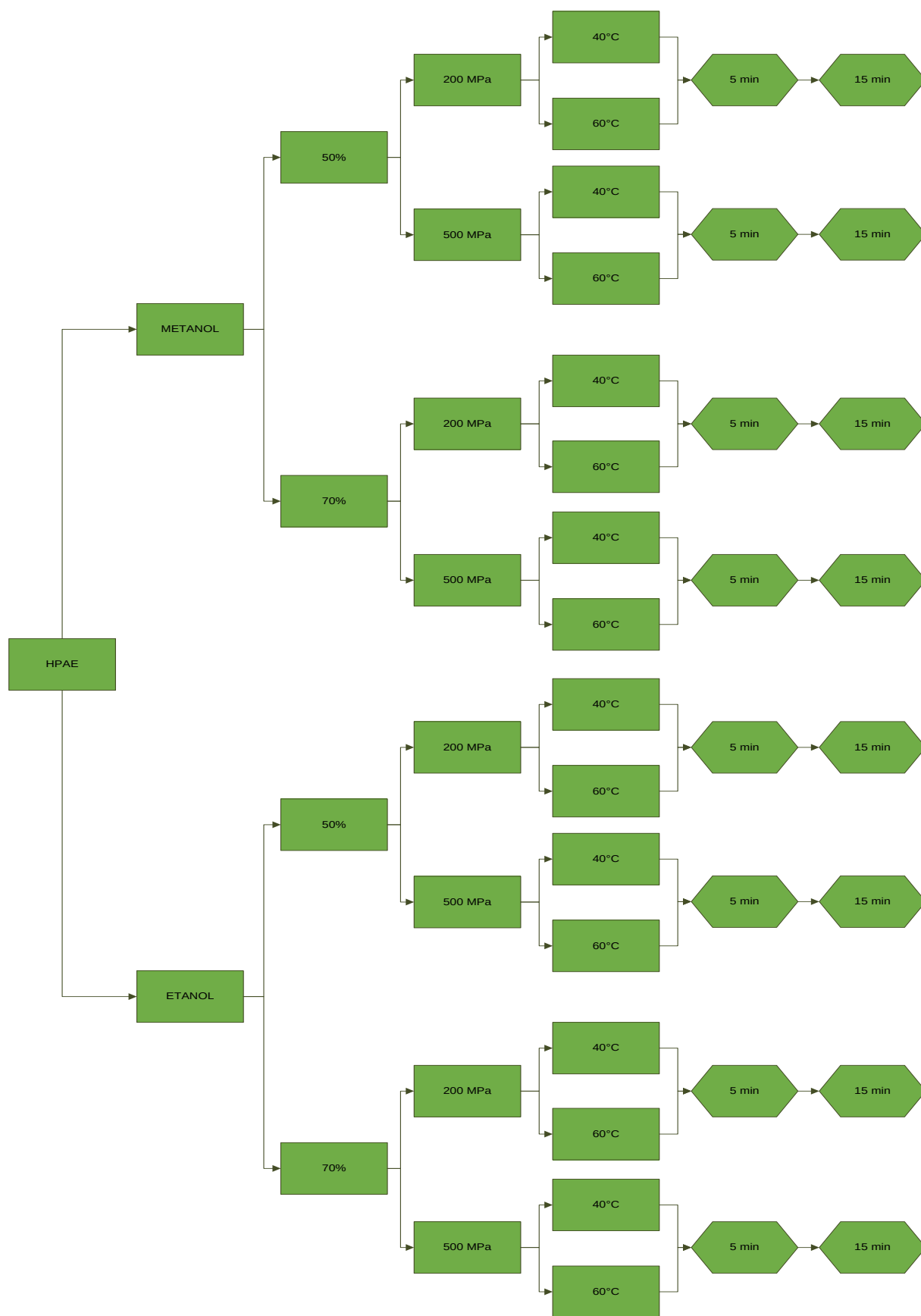
3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. *high hydrostatic pressure assisted extraction*, HPAE) provedena je na uređaju za visoki tlak *Stansted Fluid Power LTD* (Velika Britanija) (*slika 21*).



Slika 21. Uređaj za ekstrakciju potpomognutu visokim hidrostatskim tlakom (Anonymous, 2017)

Kao zavisne varijable kod HPAE promatrani su: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata određen pomoću DDPH i FRAP metoda. Nezavisne varijable su udio etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola (50 % i 70 %), temperatura ekstrakcije (40 °C i 60 °C), vrijeme ekstrakcije (5 min i 15 min) i tlak pri kojem je ekstrakcija provedena (200 MPa i 500 MPa)



Slika 22. Shematski prikaz HPAE uz primjenu različitih otapala, tlaka, temperature i vremena ekstrakcije

Postupak ekstrakcije:

Za provođenje ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom, u plastične boce volumena 50 ml, izvaže se 1 g prethodno usitnjenih osušenih cvjetova trnine s točnošću $\pm 0,0001$ i nadopuni sa 40 mL otapala za ekstrakciju. Plastična bočica se stavi u plastičnu vrećicu i nakon uklanjanja zraka pomoću uređaja za vakumiranje, postavi se u uređaj za provođenje ekstrakcije potpomognute visokim tlakom, te se prema planu pokusa na računalu postave zadani parametri ekstrakcije (temperatura, tlak i vrijeme ekstrakcije) prema *slici 22*. Kao tlačna tekućina tijekom ekstrakcije koristi se otopina glikola.

Nakon provedenog procesa ekstrakcije, ekstrakti se temperiraju na sobnu temperaturu te se prebace u odmjerne tikvice od 50 mL i nadopune otapalom korištenim za ekstrakciju. Zatim se prebace u plastične kivete za centrifugu i centrifugiraju na $5500\times g$ u trajanju od 10 min. Supernatant dobiven centrifugiranjem se odijeli dekantiranjem i čuva u zamrzivaču na -60°C do provođenja analiza. Svi ekstrakti pripremljeni su u dvije paralele te su srednje vrijednosti paralela korištene u prikazu rezultata.

3.2.4. Određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine

U etanolnim i metanolnim ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću različitih tehnika ekstrakcije (MAE, ASE, HPAE) provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

3.2.4.1. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Ukupni fenoli u ekstraktima cvijeta trnine određivani su spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu metode koju su ranije u svom radu opisali Shortle i sur. (2014), uz određene modifikacije. Modifikacija korištene metode u odnosu na originalnu metodu odnosi se na temperaturu i vrijeme inkubiranja prije mjerenja apsorbancije: uzorci su termostetirani na temperaturi 50°C u trajanju 25 minuta, umjesto na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Također, umjesto metanola kao slijepe probe upotrijebljena su otapala korištena za ekstrakciju (50 i 70 % vodena otopina etanola/metanola).

Metoda određivanja fenola temelji se na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu dolazi do nastanka plavog obojenja otopine, čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrijski pri 765 nm (Malta i Liu, 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100 µL ekstrakta (prethodno razrijeđenog otapalom za ekstrakciju u omjeru 1:5 za ekstrakte dobivene pomoću MAE i HPAE, odnosno u omjeru 1:10 za ekstrakte dobivene pomoću ASE), 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute držanja smjese na sobnoj temperaturi, doda se 1 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata i uzorci se dobro homogeniziraju pomoću Vortex miješalice. Slijepe probe pripremi se na isti način ali se umjesto ekstrakta doda 100 µL otapala korištenog za ekstrakciju. Tako pripremljeni uzorci se termostetiraju 25 minuta u vodenoj kupelji, pri $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga mjeri se apsorbancija otopina pri valnoj duljini 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih fenolnih spojeva korištena je alikvotna otopina galne kiseline masene koncentracije $\gamma = 5000\text{ mg/L}$ (500 mg galne kiseline otopi se u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake). Iz alikvotne otopine galne kiseline pripreme se razrijeđene otopine sljedećih koncentracija: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Razrijeđenja se priprema na način da se u odmjerne tikvice od 100 mL otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvotne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine u staklene epruvete te se dalje postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola

Baždarni pravac se nacrtava pomoću računalnog programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.

Račun:

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Microsoft Excel:

$$y = 0,0035x$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je: y - apsorbancija pri 765 nm, x - koncentracija galne kiseline (mg/L), a R^2 - koeficijent determinacije.

Količine ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine izražene su kao miligrami ekvivalenta

galne kiseline po gramu suhog cvijeta trnine.

3.2.4.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip određivanja:

Ukupni flavonoidi u ekstraktima cvijeta trnine određivani su kolorimetrijskom metodom koju su u svom radu prethodno opisali Chang i sur. (2002). Metoda se temelji na reakciji flavona i flavonola s aluminijskim ionima iz reakcijske smjese pri čemu dolazi do formiranja stabilnih kompleksa, uz nastajanje žutog obojenja reakcijske smjese, čija se apsorbancija mjeri pri 415 nm.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se pomiješa 500 μ L ekstrakta cvijeta trnine (prethodno razrijeđenog otapalom za ekstrakciju u omjeru 2:5 za ekstrakte dobivene pomoću MAE i HPAE odnosno u omjeru 1:5 za ekstrakte dobivene pomoću ASE) s 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida (m/V), 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepe probe pripremljene su na isti način ali se umjesto ekstrakta dodano otapalo korišteno za ekstrakciju (50 i 70 % vodena otopina etanola/metanola) te se, umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida (m/V), doda isti volumen destilirane vode (0,1 mL).

Tako pripremljene reakcijske smjese odstoje potom 30 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih flavonoida korištena je alikvotna otopina kvercetina masene koncentracije $\gamma = 100$ mg/L.

Od alikvotne otopine standarda kvercetina pripreme se razrjeđenja otopine kvercetina čije su masene koncentracije: 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 500 μ L otopine u staklene epruvete te se dalje postupa po propisu za određivanje ukupnih flavonoida.

Pomoću računalnog programa Microsoft Excel nacrtava se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračunava se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Račun:

Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću računalnog programa Microsoft Excel:

$$y = 0,0699x + 0,0002$$

$$R^2 = 0,9977$$

gdje je: y - apsorbancija pri 415 nm, x - koncentracija kvercetina (mg/L), a R^2 - koeficijent determinacije.

Količine ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine, izražene su kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog cvijeta crnine.

3.2.4.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselinaPrincip određivanja:

Ukupne hidroksicimetne kiseline u ekstraktima cvijeta trnine određivani su primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se 250 μ L ekstrakta (prethodno razrijeđenog otapalom za ekstrakciju u omjeru 1:2,5 za ekstrakte dobivene pomoću MAE i HPAE, odnosno u omjeru 1:5 za ekstrakte dobivene pomoću ASE), zatim 250 μ L 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripreme i slijepe probe, ali se umjesto ekstrakta koristi otapalo korišteno za ekstrakciju. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina korištena je alikvotna otopina standarda kafeinske kiseline masene koncentracije $\gamma = 369$ mg/L. Iz alikvotne otopine kafeinske kiseline priređena su razrjeđenja čije su masene koncentracije iznosile: 9,23, 23,99, 49,82, 99,63, 147,60 i 228,78 mg/L. Razrjeđenja su pripremljena na način da je u odmjerne tikvice od 10 mL otpipetirano po 0,25, 0,65, 1,35, 2,7, 4, 6,2 mL alikvotne otopine kafeinske kiseline i potom nadopunjeno do oznake s 80 %-tnim metanolom. U staklene epruvete

otpipetira se redom 250 μ L razrijeđene otopine i dalje se postupa prema postupka za određivanje hidroksicimetnih kiselina

Račun:

Koncentracija hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Microsoft Excel.

$$y = 0,0047x + 0,0231$$

$$R^2 = 0,9998$$

gdje je: y - apsorbancija pri 320 nm, x - koncentracija kafeinske kiseline (mg/L), a R^2 - koeficijent determinacije

Količine ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima, izražene su kao miligrami ekvivalenta kafeinske kisline (CAE) po gramu suhog cvijeta trnine.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine

U etanolnim i metanolnim ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću različitih tehnika ekstrakcije (MAE, ASE, HPAE) provedeno je određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH i FRAP metoda.

3.2.5.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja:

Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH metode provodi se prema metodi koju su opisali Shortle i sur. (2014). DPPH metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na sposobnosti antioksidansa da reducira stabilni DPPH radikala. DPPH radikal s nesparenim elektronom ima maksimalnu apsorbanciju na 517 nm i ljubičasto je obojen. Redukcijom DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa dolazi do obezbojenja ljubičasto obojene otopine odnosno do nastanka žutog obojenja, što se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 517 nm (Shekhar i Goyal, 2014).

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 750 μ L ekstrakata cvijeta trnine (prethodno razrijeđenog otapalom za ekstrakciju u omjeru 1:25 za ekstrakte dobivene pomoću MAE i HPAE, odnosno

u omjeru 1:50 za ekstrakte dobivene pomoću ASE) te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se ulije 2,25 mL 100 %-tnog metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 30 minuta u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca za određivanje DPPH antioksidacijskog kapaciteta korištena je alikvotna otopina standarda Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koncentracije $c = 1$ mM. Alikvotna otopina troloxa pripremljena je na način da je 0,025 g Troloxa otopljeno u 100% metanolu i nadopunjeno metanolom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od alikvotne otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μ M. U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine troloxa te se dalje postupa prema postupku za određivanje DPPH, uz metanol kao slijepu probu.

Račun:

DPPH se izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Microsoft Excel.

$$y = -0,008X + 1.347$$

$$R^2 = 0,9948$$

gdje je: y - apsorbancija pri 517 nm, x - koncentracija troloxa (μ M), a R^2 - koeficijent determinacije.

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine dobiveni DPPH metodom, izražen je kao mikromoli ekvivalenta troloxa (TE) po gramu suhog cvijeta trnine.

3.2.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) temelji se na sposobnosti antioksidansa da, pri niskoj pH vrijednosti, reduciraju žuti Fe^{3+} TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin) kompleks u plavo obojeni Fe^{2+} fero-tripiridiltriazin kompleks pri čemu se promjena boje, odnosno redukcija, mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 593 nm (Moharram i Youssef 2014; Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μL ekstrakta (prethodno razrijeđenog otapalom za ekstrakciju u omjeru 1:50 za ekstrakte dobivene pomoću MAE i HPAE, odnosno u omjeru 1:100 za ekstrakte dobivene pomoću ASE) i 2250 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm. Slijepe probe sadržavaju sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo korišteno za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Od alikvotne askorbinske kiseline pripreme se razrjeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0,5, 1, 2, 1 i 5 mL alikvot otopine askorbinske kiseline te do oznake nadopuni destiliranom vodom. U staklene epruvete otpipetira se 300 μL otopine odgovarajućeg razrjeđenja alikvotne otopine askorbinske kiseline i dalje postupa prema prethodno opisanom postupku za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Račun:

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije nacrti se baždarni pravac pomoću računalnog programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbanacije nanesenim na ordinati:

$$y = 0,0353x - 0,1021$$

$$R^2 = 0,9896$$

gdje je: y - apsorbanacija pri 593 nm, x - ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L), a R^2 - koeficijent determinacije.

Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom, te se dobiveni rezultati pomnože s brojem 2. Obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti sa 2 (Fegredo i sur., 2009).

$$\text{FRAP} = \text{Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine dobiven FRAP metodom, izražen je kao

miligrami askorbinske kiseline (AAE) po gramu suhog cvijeta trnine.

3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju

Određivanje sastava i udjela pojedinačnih fenolnih spojeva, flavonoida i fenolnih kiselina, u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pri optimalnim uvjetima MAE i ASE uz upotrebu etanolnih i metanolnih vodenih otopina provedeno je primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) metodom koju su opisati Fecka i Turek (2008), uz određene modifikacije. Modifikacija navedene metode odnosi se na dio kromatografske analize gdje je kao mobilna faza korištena 3 %-tna mravlja kiselina umjesto 0,2 , 1,5 i 5 %-tne mravlje kiseline (Dent i sur., 2013). Metoda za određivanje fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije se temelji na ekstrakciji fenolnih spojeva primjenom otapala različite polarnosti, s ciljem povećanja ekstrakcijskog kapaciteta te razdvajanjem i eluiranjem fenolnih spojeva na kromatografskoj koloni u nizu padajuće polarnosti. 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>	Luna 100-5C18, 5 μ m 250 $\times$ 4,6 mm I.D. (Phenomenex)
<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 <i>tablici 3</i>
<i>Detektor:</i>	UV-Photo Diode Array (valna duljina = 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 3. 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, polarnosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi te skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 380 nm (1). Flavonol glikozidi identificirani su na 340 nm, a fenolne kiseline na 278 nm.

Tablica 4: Jednadžbe baždarnih pravaca s pripadajućim koeficijentima determinacije za flavonol glikozide, fenolne kiseline i flavonole

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent determinacije (R^2)
Kvercetin 3- β -D-glukozid	$Y = 37,386 X$	1,000
Kamferol 3-O-rutinozid	$Y = 41,313 X$	1,000
Klorogenska kiselina	$Y = 63,539 X$	0,9874
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	$Y = 135,81 X$	1,000
Ferulinska kiselina	$Y = 19,291 X$	0,9907
Kafeinska kiselina	$Y = 68,301 X$	0,9998
Katehin	$Y = 12,037 X$	0,9949
Procijandin B1	$Y = 3,57 X$	0,9952

3.2.7. Određivanje citotoksičnog/antiproliferativnog učinka ekstrakta cvijeta trnine

3.2.7.1. Uzgoj i održavanje Hep G2 stanica

Prvi korak u *in vitro* određivanju antiproliferativnih/citotoksičnih svojstava biljnih ekstrakata čini uzgoj i održavanje stanica na kojima se ispitivanje provodi. Stanice Hep G2, korištene u ovom istraživanju, čuvane su zamrznute u koncentraciji od $\sim 3 \times 10^6$ stanica/mL, na temperaturi -80°C u mediju za smrzavanje kojega čine: medij za uzgoj (80 %), FBS (10 %) i DMSO (10 %). Smrznute stanice Hep G2 se najprije naglo odmrzavaju, u inkubatoru pri temperaturi 37°C i sastavu atmosfere od 95 % zraka i 5 % CO_2 . Nakon odmrzavanja, slijedi centrifugiranje pri 1200 okretaja/min u trajanju od 5 minuta, nakon čega se uklanja supernatant. Potom se zaostali talog stanica resuspendira u 10 mL hranjivog medija za uzgoj kojeg čine Dulbecco MEM/F-12 medij (90 %) i FBS (10 %), nakon čega se prenese u tzv. T-bocu na daljnju kultivaciju. Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica (temperatura 37°C , atmosfera od 95 % zraka i 5 % CO_2), stanice se uzgajaju u inkubatoru u kojem su podešeni navedeni optimalni uvjeti. S ciljem osiguranja hranjivih tvari su potrebne za rast i razvoj, stanicama se periodički mijenja medij za uzgoj. Prilikom promjene medija i seruma, monoslojne stanice u T-boci se prvo ispiru (PBS-om ili tripsinom) da se ukloni sav iskorišteni medij i serum, nakon čega se dodaje 1 mL tripsina - proteolitičkog enzima koji omogućuje odvajanje stanica od površine T-boce. Pomoću metode *Trypan Blue* određuje se broj stanica, te se nakon toga stanice razrjeđuju na koncentraciju 1×10^5 stanica/mL medija za uzgoj dodatkom novog medija za uzgoj.

3.2.7.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

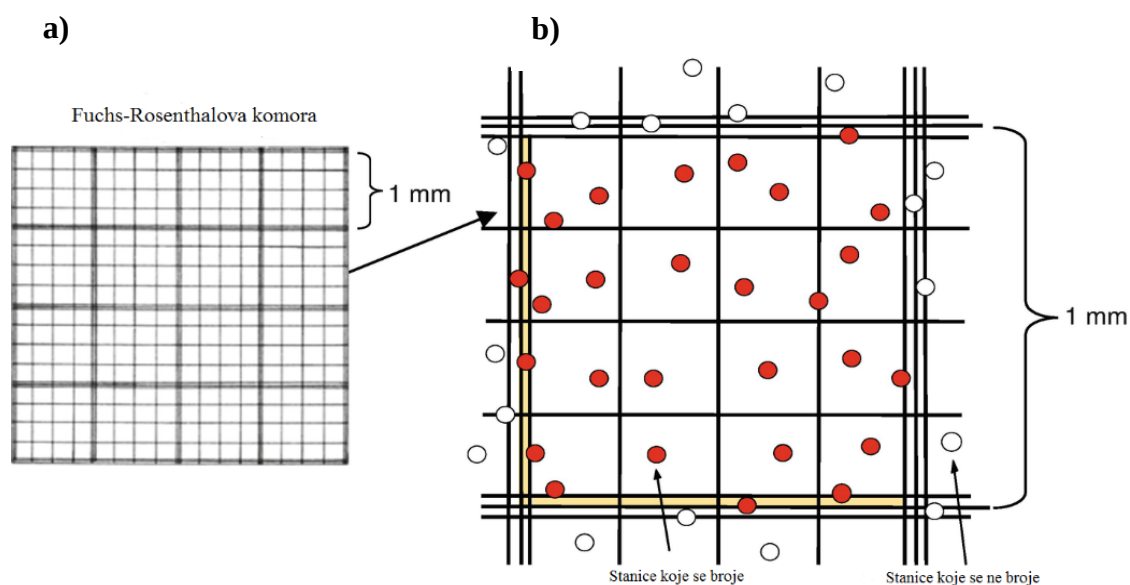
Princip određivanja:

Trypan Blue metoda jedna je od najstarijih i najviše primijenjivanih metoda za mjerenje vijabilnosti stanica. Metoda se zasniva na upotrebi *Trypan Blue* boje koja ulazi samo u stanice s oštećenom membranom, dok je za neoštećenu staničnu membranu nepropusna. Nakon ulaska u stanicu, *Trypan Blue* čini mrtve stanice plavo obojenima, dok žive stanice ostaju neobojene, što je vidljivo pod svjetlosnim mikroskopom. Ovo je najjednostavnija metoda koja daje pouzdane rezultate ukupnog broja stanica, kao i rezultate vijabilnosti stanica. *Trypan Blue* metoda međutim ne razlikuje apoptotičke od nekrotičnih stanica (Louis i Siegel, 2011; Jain i

sur., 2018; Singh i sur., 2018).

Postupak određivanja:

20 μL suspenzije koje se potom resuspendiraju sa dodatkom 20 μL 0,4 %-tne otopine boje *Trypan Blue*. Potom se 20 μL tako priređene suspenzije nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje stanica. Fuchs-Rosenthalova komorica se sastoji od 16 kvadrata, a unutar središnja četiri kvadrata stanice se broje. U svakom od ta četiri kvadrata, pomoću svjetlosnog mikroskopa, broje se stanice koje su unutar kvadrata te one na donjem i desnom rubu, da se izbjegne brojanje istih stanica više puta (slika 23).



Slika 23. a) Fuchs-Rosenthalova komora i b) prikaz stanica koje se broje i onih koje se ne broje (Neuendorf, 2020)

Račun:

Ukupan broj živih stanica u uzorku odredi se prema formuli:

$$\text{Ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} \times 10^4 \text{ (stanica/mL)}$$

3.2.7.3. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnina na vijabilnost Hep G2 stanica primjenom *Trypan Blue*, *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metoda

Po 2 mL priređene suspenzije Hep G2 stanica u koncentraciji 5×10^4 stanica /mL medija za uzgoj se otpipetira u jažice na mikrotitarskoj ploči. Stanice se inkubiraju 24 sata te se zatim

dio jažica na mikrotitarskoj ploči tretira ekstraktima cvijeta trnine u različitim koncentracijama. Jažicu koja služi kao kontrola se tretira s 10 μL etanola. Ostale jažice tretiraju se s 10 μL ekstrakta cvijeta trnine koji je prethodno pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100, 150 i 200 $\mu\text{g/mL}$. Tretirane stanice se inkubiraju ukupno 72 sata, a nakon 24, 48 i 72 sata se ispituje vijabilnost stanica metodama *Kenacid Blue* i *Neutral Red*. Za određivanje vijabilnosti *Trypan Blue* metodom jažice su tretirane s 10 μL ekstrakta cvijeta trnine koji je prethodno pripremljen tako da se u mediju postignu koncentracije od 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$, a vijabilnost je ispitana samo nakon 24 sata.

***Kenacid Blue* metoda**

Princip određivanja:

Kenacid Blue metodom mjeri se ukupna biomasa stanica putem bojanja *Commassie Brilliant Blue* R-250 bojom koja prolazi kroz staničnu membranu i veže se za proteine u stanicama (Bradford, 1976).

Postupak određivanja:

Na početku postupka iz jažica mikrotitarskih ploča se ukloni medij za uzgoj te se stanice dva puta isperu sa po 1 mL PBS pufera kako bi se preostali tragovi medija za uzgoj ukloniti uklonilijer mogu utjecati na rezultate analize. Potom se u svaku od jažica doda 1 mL fiksativa kojim se stanice fiksiraju za dno jažice tijekom 20-minutnog tretmana na tresilici, pri nižim brzinama. Fiksativ se zatim ukloni i u svaku od jažica na ploči se doda 1 mL *Kenacid Blue* boje koja je pripremljena neposredno pred provođenje eksperimenta. Bojanje se provodi na tresilici u trajanju od 20 minuta, nakon čega se uklanja boja. Jažice se ispiru dva puta s po 1 mL otopine za ispiranje te nakon toga ponovno stavljaju na tresilicu. Nakon 20 minuta, otopina za ispiranje se uklanja te u svaku od jažica dodaje po 2 mL otopine za desorpciju. Ploče se potom postave 20 minuta na tresilicu. Intenzitet nastalog obojenja spektrofotometrijski se određuje pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

***Neutral Red* metoda**

Princip određivanja:

Neutral Red metoda, jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje citotoksičnosti. Temelji se na sposobnosti živih stanica da vežu *Neutral Red* boju koja se

akumulira u lizosomima. Promjene boje se mjere spektrofotometrijski (Repetto i sur., 2008; Jain i sur., 2018). Prednost *Neutral Red* metoda, u odnosu na druge *in vitro* metode određivanja toksičnosti, je visoka korelacija s rezultatima dobivenim u *in vivo* ispitivanjima toksičnosti (Srivastava i sur., 2018).

Postupak određivanja:

Za provođenje postupka određivanja vijabilnosti stanica *Neutral Red* metodom potrebno je najprije ukloniti medij za uzgoj iz jažica mikrotitarskih ploča te isprati stanica s 1 mL sterilnog PBS pufera s ciljem uklanjanja tragova medija za uzgoj koji mogu utjecati na rezultate mjerenja. U svaku od jažica zatim se dodaje 1 mL pripremljene otopine *Neutral Red*, nakon čega se provodi inkubacija u sterilnim uvjetima pri temperaturi 37 °C u trajanju 3 h. Nakon toga se iz jažica mikrotitarskih ploča uklanja otopina boje te pomoću PBS pufera ispiru stanice. U jažice se potom dodaje 2 mL otopine koja služi za uklanjanje boje koje se provodi na tresilici u trajanju od 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.7.4. Određivanje učinka ekstrakta cvijeta trnina na vijabilnost Hep G2 stanica metodom protočne citometrije

Princip određivanja:

Prije provođenja protočne citometrijske analize, pojedinačne stanice u suspenziji nužno je pripremiti na način da se fluorescentno obilježe. Tako pripremljene stanice prolaze kroz fokusiranu zraku lasera brzinom do 100 000 stanica u sekundi. Nakon što laserska svjetlost aktivira fluorofor na pobuđujućoj valnoj duljini, detektori obrađuju emitiranu fluorescenciju i svjetlosno raspršivanje svake stanice. Intenzitet emitirane svjetlosti izravno je proporcionalan gustoći antigena ili boje odnosno karakteristikama stanice koja se mjeri (Berny-Lang i sur., 2013; Riley i Idowu, 2017). Svjetlosni i/ili fluorescentni raspršeni signali se detektiraju pomoću serija fotodioda. Električni impulsi dobiveni kao rezultat navedenog se digitaliziraju, a podaci se pohranjuju i analiziraju pomoću računalnog sustava. Budući da se analizira veliki broj stanica u kratkom vremenskom razdoblju (>1.000/s), metoda protočne citometrije omogućava brzo dobivanje statistički valjanih informacija (Riley i Idowu, 2017).

Postupak određivanja:

Nakon 24-satnog tretmana s ekstraktima cvijeta trnine koncentracije 10, 50 i 100 µg/mL, Hep G2 stanice (nacijepnjene u koncentraciji 5×10^4 stanica/mL) analiziraju se metodom protočne citometrije kako bi se odredile žive stanice, rano i kasno apoptotičke te mrtve stanice. Nakon tretmana s ekstraktom cvijeta trnine stanice se sakupljaju, centrifugiraju (600 g/min) i suspendiraju u mediju. Zatim se 100 µL priređene stanične suspenzije inkubira sa 100 µL reagensa iz kita *MuseTM Annexin V & Dead Cell* te inkubiranu pri sobnoj temperaturi u mraku u trajanju od 20 min. Stanice se zatim analiziraju pomoću *Muse Cell Analyzer*-a (slika 24) kako bi se dobio „dot-plot“ dijagram u kojem se na temelju premještanja fosfatidil serina s unutarnje na vanjsku površinu stanične membrane u apoptotičkim stanicama (Annexin V označen fluorescentnim fikoeritrinom) i simultanog bojenja mrtvih stanica s fluorescentnom bojom 7-AAD (7-aminoaktinomicin D), mogu razlikovati četiri populacije stanica:

- (i) žive stanice : Annexin V (–) i 7-AAD (–);
- (ii) rano apoptotičke stanice: Annexin V (+) i 7-AAD (–);
- (iii) kasno apoptotičke stanice: Annexin V (+) i 7-AAD (+);
- (iv) mrtve stanice: Annexin V (–) i 7-AAD (+).



Slika 24. *Muse Cell Analyzer* (Anonymous 6, 2020)

3.2.8. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD).

Kako bi se ispitao utjecaj različitih varijabli na masene udjele fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet, s ciljem optimiranja uvjeta ekstrakcije kod HPAE korišten je potpuni faktorski dizajn pokusa na dvije, odnosno potpuni faktorski dizajn sa miješane dvije i tri razine kod MAE i ASE.

Kao zavisne varijable za sve tehnike ekstrakcije (MAE, ASE i HPAE) promatrani su: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupne hidroksicimetne kiseline te antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata izmjeren pomoću DDPH i FRAP metoda.

Nezavisne varijable u MAE ekstrakcijskoj tehnici su udio etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola, temperatura ekstrakcije i vrijeme ekstrakcije. Promatrane razine udjela etanola/metanola u vodenim otopinama etanola/metanola su: 50 % (-1) i 70 % (1), temperature: 40 °C (-1), 50 °C (0) i 60 °C (1) te vremena ekstrakcije: 5 min (-1), 15 min (0) i 25 min (1).

Nezavisne varijable kod ASE su udio etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola, temperatura ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije u trajanju od 5 minuta. Promatrane razine udjela etanola/metanola u vodenim otopinama etanola i metanola su: 50 % (-1) i 70 % (1), temperature: 60 °C (-1), 80 °C (0) i 100 °C (1) te broj ciklusa ekstrakcije: 1 (-1), 2 (0) i 3 (1).

Nezavisne varijable kod HPAE su udio etanola/metanola u vodenoj otopini etanola i metanola, temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i tlak pri kojem je ekstrakcija provedena. Promatrane razine udjela metanola/etanola u vodenim otopinama metanola/etanola su: 50 % (-1) i 70 % (1), temperature: 40 °C (-1) i 60 °C (1), vremena ekstrakcije: 5 min (-1) i 15 min (1), te tlaka 200 MPa (-1) i 500 MPa (1).

Za statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (*Response Surface Methodology*).

Regresijski model za svaku promatranu ovisnu varijablu izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

gdje:

Y- predstavlja predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

β_0 - predstavlja fiksni koeficijent

β_i , β_{ii} i β_{ij} linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

$X_i...X_j$ - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable.

Da bi se utvrdio statistički značaj utjecaj pojedinih varijabli te utvrdile razlike između provedenih uvjeta ekstrakcije korištena je analiza varijance. Valjanost cijelog kvadratnog empirijskog modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom analize varijance na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti. U radu su prikazane trodimenzionalne površine za ukupne fenole, ukupne flavonoide i ukupne hidroksicimetne kiseline te antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama koje prikazuju utjecaj po dvije nezavisne varijable, za svaku od ekstrakcijskih tehnika.

Definiranje optimalnih uvjeta provedeno je za svaku od ekstrakcijskih tehnika pojedinačno za svaku određivanu vrstu fenolnih spojeva ali i na način da su paralelno promatrani maseni udjeli svih fenolnih spojeva te su na osnovu toga određeni optimalni uvjeti u kojima se preklapaju maksimalni maseni udjeli svih određivanih fenolnih skupina spojeva (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina).

Prilikom optimizacije parametara ekstrakcije postavljene su preferencije za promatrane ovisne varijable: ukupne fenole, ukupne flavonoide i ukupne hidroksicimetne kiseline. Za sve promatrane ovisne varijable postavljena je visoka preferencija (1,0). Slično su određeni i optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima se postižu najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodom.

Ulazni parametri promatrani su ovisno o vrsti tehnike u sljedećem broju koraka: udio etanola/metanola u vodenim otopinama etanola/metanola: 20 koraka; temperatura ekstrakcije: 20 koraka kod MAE i HPAE, 40 koraka kod HPAE; trajanje ekstrakcije kod MAE i HPAE: 20 koraka; broj ciklusa kod ASE: 3 koraka; tlak kod HPAE: 30 koraka.

Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka cvijeta trnine na Hep G2 stanice statistički su obrađeni pomoću Studentovog t -testa izračunavajući t vrijednost prema sljedećem izrazu:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S \frac{2}{\bar{X}_1} + S \frac{2}{\bar{X}_2}}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati usporednog određivanja utjecaja ekstrakcijske tehnike na prinose fenolnih spojeva

4.1.1. Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na prinose fenolnih spojeva

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a rezultati određivanja prikazani su u *tablici 5*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dviju paralela uz standardnu devijaciju ($\pm$).

U *tablici 6* prikazani su rezultati provedene analize varijance odnosno rezultati ispitivanja utjecaja utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperature (X_2) i vremena ekstrakcije (X_3) na masene udjele određivanih skupina fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti. Utjecaj ispitanih faktora ekstrakcije na određivane skupine fenolnih spojeva označen je, prema p vrijednostima regresijskih koeficijenata, kao statistički značajan ($p < 0,05$) ili statistički neznačajan ($p > 0,05$).

Tablica 7 prikazuje jednadžbe regresijskog modela za MAE za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva. Pripadajući koeficijenti determinacije (R^2) opisuju preciznost i prikladnost modela odnosno služe da opišu kolike varijabilnosti odgovora (rezultata) se mogu objasniti korištenim varijablama i interakcijom između varijabli.

Na *slikama 25 - 27* su prikazane trodimenzionalne površine za ukupne fenole (*slika 25a i 25b*), ukupne flavonoide (*slika 26a i slika 26b*) i ukupne hidroksicimetne kiseline (*slika 27a i slika 28b*) koje prikazuju utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na određivane skupine fenolnih spojeva kod MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola.

U *tablici 8* navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature ($^{\circ}\text{C}$) i vremena ekstrakcije (min) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću MAE te pri tom predviđeni masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, dok *tablica 9* prikazuje optimalne vrijednosti navedenih faktora MAE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida i hidroksicimetnih kiselina.

Na *slici 28* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima MAE uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola.

Tablica 5. Maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE

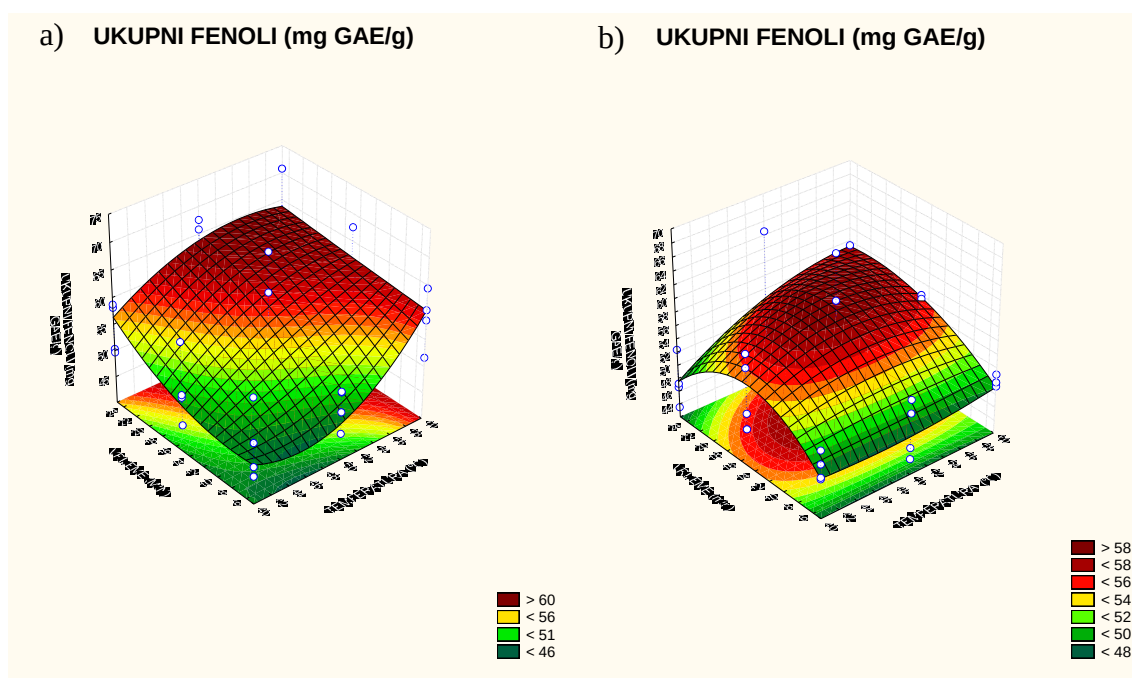
OTAPALO	T [°C]	VRIJEME [min]	UKUPNI FENOLI [mg GAE/g]	UKUPNI FLAVONOIDI [mg QE/g]	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE [mg CAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	40	5	55,51 ± 5,81	14,39 ± 0,76	22,16 ± 1,19
		15	55,34 ± 7,27	13,15 ± 0,32	21,01 ± 0,48
		25	49,98 ± 0,47	13,21 ± 0,24	21,90 ± 0,10
	50	5	52,82 ± 0,05	12,60 ± 1,03	21,87 ± 0,20
		15	63,26 ± 9,10	14,14 ± 0,13	21,91 ± 3,42
		25	58,93 ± 12,22	15,40 ± 1,65	22,60 ± 0,62
	60	5	56,04 ± 6,24	14,34 ± 0,29	22,76 ± 0,53
		15	56,76 ± 2,39	13,43 ± 1,01	23,82 ± 1,31
		25	51,42 ± 0,33	15,28 ± 0,06	22,41 ± 1,00
70 % VODENA OTOPI NA ETANOLA	40	5	46,05 ± 1,28	14,99 ± 0,77	22,92 ± 1,12
		15	47,82 ± 4,05	13,42 ± 0,15	24,15 ± 0,21
		25	58,38 ± 0,41	15,24 ± 0,28	23,06 ± 0,44
	50	5	47,02 ± 2,87	14,74 ± 0,26	21,53 ± 3,57
		15	58,07 ± 5,98	14,10 ± 2,52	24,28 ± 1,55
		25	63,72 ± 2,94	15,61 ± 0,50	23,03 ± 0,01
	60	5	61,55 ± 4,15	15,46 ± 0,95	24,14 ± 1,08
		15	62,90 ± 6,54	14,99 ± 0,33	24,49 ± 1,16
		25	61,7 ± 12,84	15,06 ± 0,68	25,82 ± 0,68
50 % VODENA OTOPI NA METANOLA	40	5	49,03 ± 1,55	12,95 ± 0,14	19,90 ± 0,30
		15	52,17 ± 6,44	12,71 ± 0,99	21,57 ± 0,74
		25	49,51 ± 4,06	11,91 ± 0,08	19,91 ± 1,58
	50	5	52,25 ± 1,45	13,36 ± 0,62	20,64 ± 0,93
		15	55,26 ± 7,85	13,50 ± 0,41	21,20 ± 0,48
		25	50,49 ± 3,09	13,51 ± 0,58	21,39 ± 0,38
	60	5	50,36 ± 0,88	13,16 ± 0,35	21,81 ± 1,30
		15	52,14 ± 3,42	13,51 ± 0,15	20,22 ± 0,28
		25	55,98 ± 0,89	13,71 ± 0,28	21,72 ± 0,99
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	40	5	50,17 ± 2,86	12,40 ± 1,01	25,36 ± 0,39
		15	54,37 ± 6,23	13,30 ± 1,05	24,12 ± 0,45
		25	45,33 ± 2,59	13,29 ± 1,47	22,75 ± 0,08
	50	5	45,19 ± 1,20	13,54 ± 0,33	24,79 ± 0,08
		15	58,42 ± 12,98	13,50 ± 0,62	25,56 ± 1,83
		25	57,23 ± 10,33	11,77 ± 3,36	25,77 ± 0,42
	60	5	49,46 ± 0,45	14,76 ± 0,61	25,74 ± 2,26
		15	55,84 ± 0,40	14,66 ± 0,41	24,67 ± 0,56
		25	56,67 ± 0,85	13,00 ± 0,39	25,10 ± 1,21

Tablica 6. Analiza varijance utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperature (X_2) i vremena ekstrakcije (X_3) na masene udjele fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

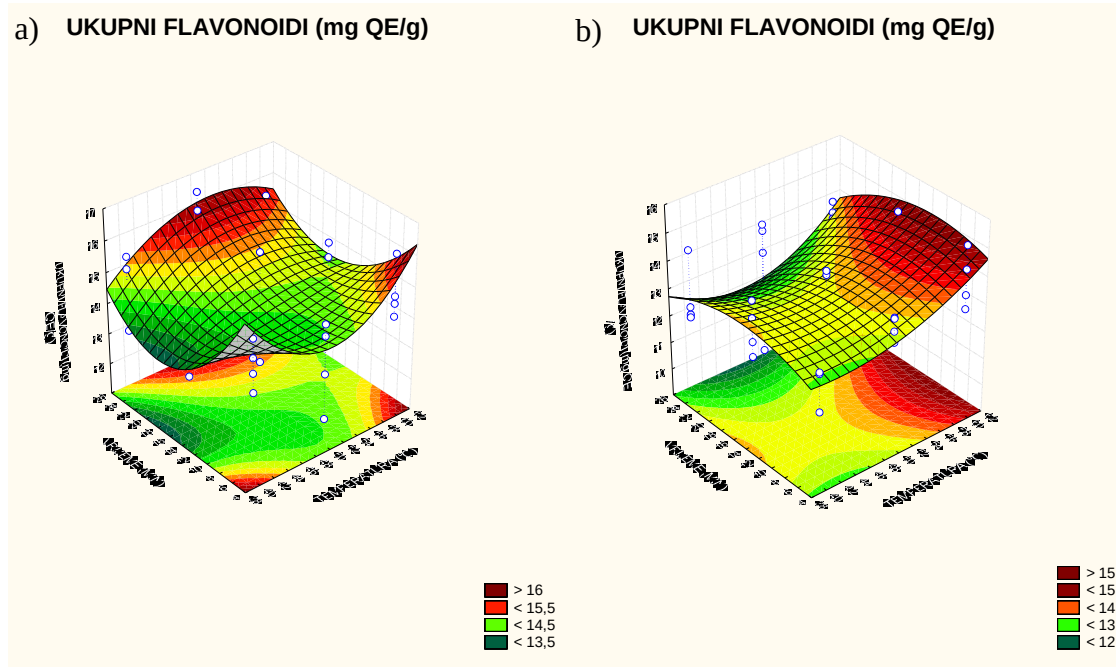
OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	UKUPNI FENOLI		UKUPNI FLAVONOIDI		UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	
		F- omjer	<i>p</i> - vrijednost	F- omjer	<i>p</i> - vrijednost	F-omjer	<i>p</i> -vrijednost
VODENE OTOPIJE ETANOLA	$X_1(L)$	0,176	0,679	7,250	0,013	9,403	0,006
	$X_2(L+Q)$	4,084	0,031	1,603	0,224	3,778	0,039
	$X_3(L+Q)$	2,175	0,137	3,977	0,034	0,860	0,437
	X_1X_2	2,971	0,072	0,034	0,967	0,447	0,645
	X_1X_3	3,464	0,049	0,473	0,629	0,861	0,437
	X_2X_3	1,815	0,162	1,711	0,183	0,273	0,892
VODENE OTOPINE METANOLA	$X_1(L)$	0,129	0,723	0,353	0,558	138,989	0,000
	$X_2(L+Q)$	1,561	0,232	2,944	0,074	3,438	0,050
	$X_3(L+Q)$	3,264	0,057	1,287	0,296	0,236	0,791
	X_1X_2	0,070	0,933	1,104	0,349	0,386	0,684
	X_1X_3	0,827	0,450	0,673	0,521	0,771	0,475
	X_2X_3	1,149	0,360	0,131	0,969	2,632	0,062

Tablica 7. Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za masene udjele određivanih skupina fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola

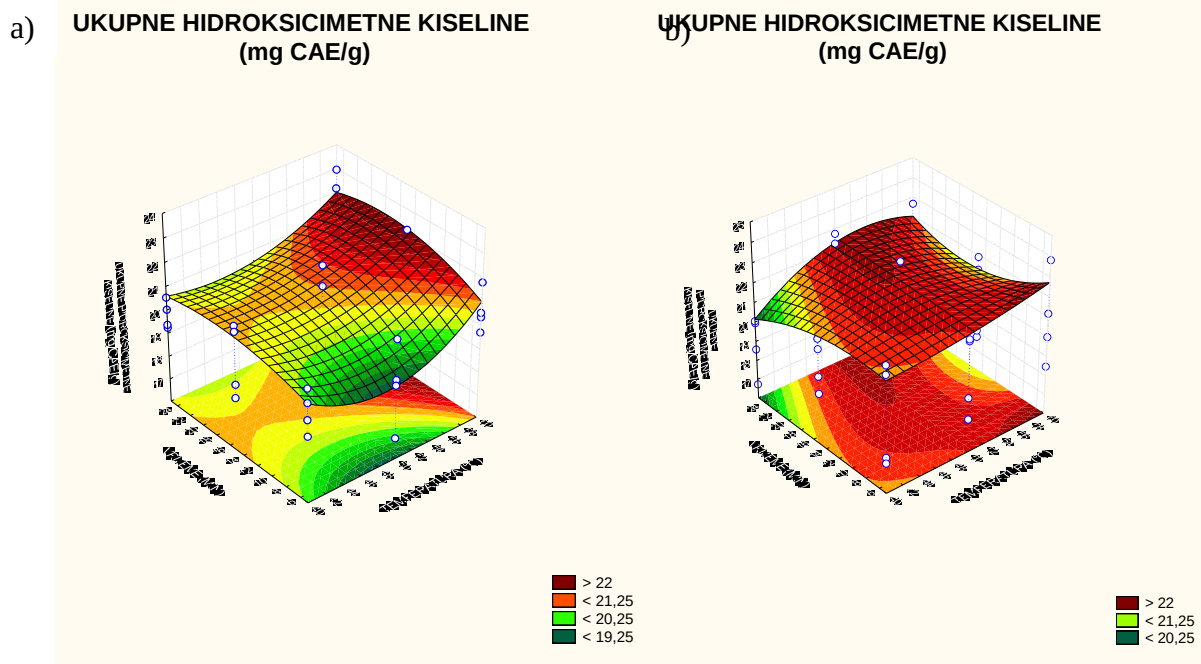
OTAPALO	VARIJABLA	MODEL	R ²
VODENA OTOPINA ETANOLA	UKUPNI FENOLI	$117,9255 + 3,9324X_1 - 1,4460X_2 + 0,0020X_2^2 - 43,7520X_3 + 0,9947X_3^2 - 0,1893X_1X_2 + 0,0021X_1X_2^2 - 0,0394X_1X_3 + 0,0022X_1X_3^2 + 1,8964X_2X_3 - 0,0456X_2X_3^2 - 0,0186X_2^2X_3 + 0,0004X_2^2X_3^2$	0,60
	UKUPNI FLAVONOIDI	$56,00618 + 0,26287X_1 - 1,91019X_2 + 0,01911X_2^2 - 6,39374X_3 + 0,13562X_3^2 - 0,00648X_1X_2 + 0,00006X_1X_2^2 - 0,00727X_1X_3 + 0,00019X_1X_3^2 + 0,26422X_2X_3 - 0,00552X_2X_3^2 - 0,00257X_2^2X_3 + 0,00005X_2^2X_3^2$	0,54
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$10,33556 + 0,90190X_1 + 0,45408X_2 - 0,00455X_2^2 - 5,53168X_3 + 0,15116X_3^2 - 0,03877X_1X_2 + 0,00039X_1X_2^2 + 0,01385X_1X_3 - 0,00039X_1X_3^2 + 0,19303X_2X_3 - 0,00527X_2X_3^2 - 0,00188X_2^2X_3 + 0,00005X_2^2X_3^2$	0,50
VODENA OTOPINA METANOLA	UKUPNI FENOLI	$233,8296 - 1,1800X_1 - 6,7927X_2 + 0,0673X_2^2 - 24,2767X_3 + 0,6395X_3^2 + 0,0290X_1X_2 - 0,0003X_1X_2^2 + 0,0626X_1X_3 - 0,0018X_1X_3^2 + 0,9345X_2X_3 - 0,0254X_2X_3^2 - 0,0097X_2^2X_3 + 0,0003X_2^2X_3^2$	0,42
	UKUPNI FLAVONOIDI	$-72,5585 + 1,2989X_1 + 3,4893X_2 - 0,0345X_2^2 - 0,1141X_3 + 0,0279X_3^2 - 0,0541X_1X_2 + 0,0005X_1X_2^2 + 0,0064X_1X_3 - 0,0003X_1X_3^2 - 0,0066X_2X_3 - 0,0006X_2X_3^2 + 0,0001X_2^2X_3 + 0,0000X_2^2X_3^2$	0,37
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$64,10972 - 0,38055X_1 - 2,42125X_2 + 0,02521X_2^2 - 2,49264X_3 + 0,02584X_3^2 + 0,02352X_1X_2 - 0,00023X_1X_2^2 - 0,00506X_1X_3 + 0,00010X_1X_3^2 + 0,13878X_2X_3 - 0,00219X_2X_3^2 - 0,00162X_2^2X_3 + 0,00003X_2^2X_3^2$	0,88



Slika 25. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola



Slika 26. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola



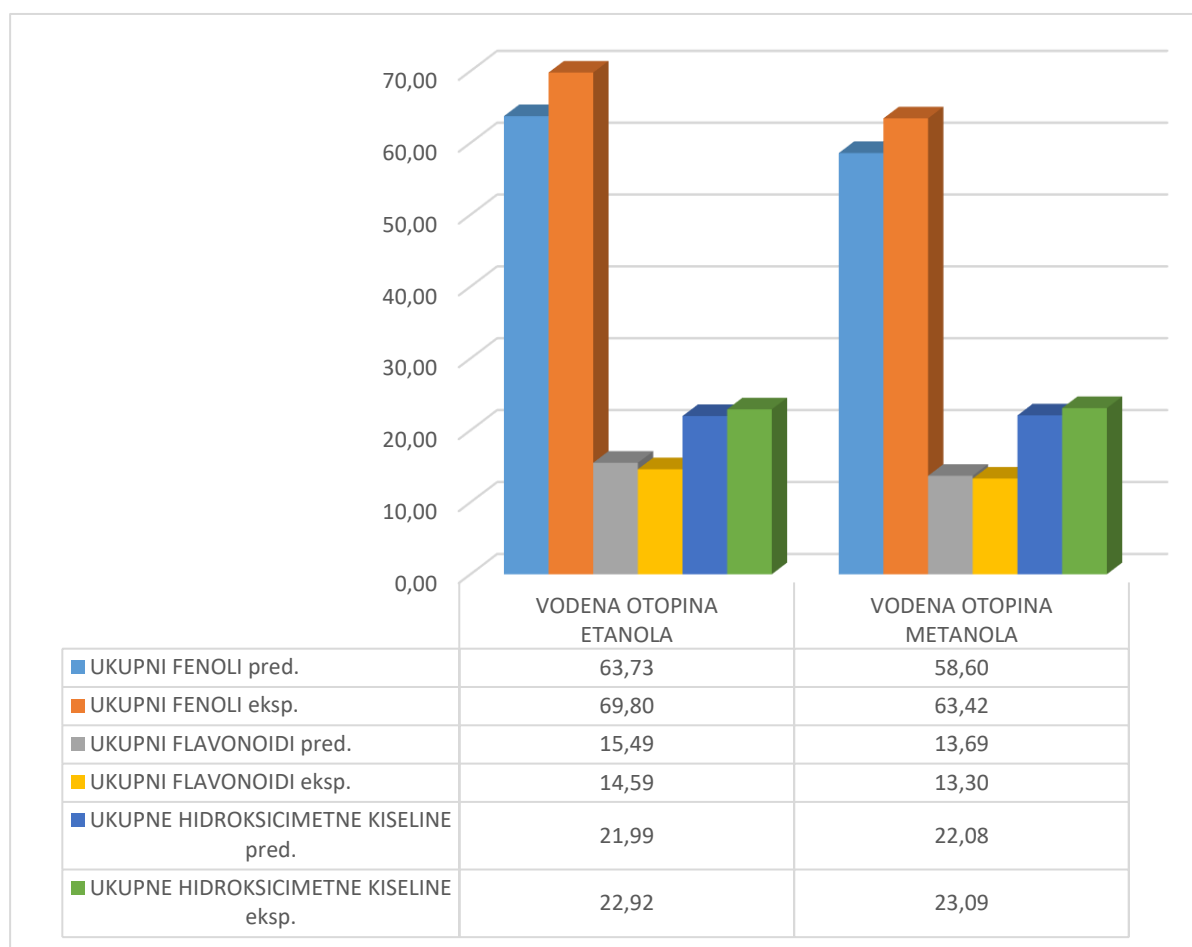
Slika 27. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola

Tablica 8. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i vremena ekstrakcije (min) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću MAE, te pri tom predviđene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

	OTAPALO	FAKTORI	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	Ukupne hidroksicimetne kiseline
MAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70	70	70
		Temperatura (°C)	55	53	60
		Vrijeme (min)	25	25	19
		Predviđena vrijednost	64,72 mg GAE/g	15,87 mg QE/g	22,28 mg CAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70	70	70
		Temperatura (°C)	52	60	60
		Vrijeme (min)	18	11	5
		Predviđena vrijednost	59,04 mg GAE/g	14,70 mg QE/g	22,72 mg CAE/g

Tablica 9. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i vremena ekstrakcije (min) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću MAE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE			
MAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70
		Temperatura (°C)	60
		Vrijeme (min)	25
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	54
		Vrijeme (min)	16



Slika 28. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti fenolnih spojeva (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola, pri optimalnim uvjetima MAE

4.1.2. Utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na prinose fenolnih spojeva

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a rezultati određivanja prikazani su u *tablici 10*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije paralele uz standardnu devijaciju ($\pm$).

U *tablici 11* prikazani su rezultati provedene analize varijance odnosno rezultati ispitivanja utjecaja utjecaja polarnosti otapala (X_1), broja ciklusa (X_2) i temperature (X_3) na masene udjele određivanih skupina fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti. Utjecaj ispitanih faktora ekstrakcije na određivane skupine fenolnih spojeva označen je, prema p vrijednostima regresijskih koeficijenata, kao statistički značajan ($p < 0,05$) ili statistički neznačajan ($p > 0,05$).

Tablica 12 prikazuje jednadžbe regresijskog modela za ASE za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva te pripadajuće koeficijente determinacije (R^2) koji opisuju preciznost i prikladnost modela.

Na *slikama 29 - 31* su trodimenzionalne površine za ukupne fenole (*slika 29a* i *29b*), ukupne flavonoide (*slika 30a* i *slika 31b*) i ukupne hidroksicimetne kiseline (*slika 31a* i *slika 31b*) koje prikazuju utjecaj temperature i broju ciklusa ekstrakcije. Za određivane skupine fenolnih spojeva kod ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola.

U *tablici 13* navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature ($^{\circ}\text{C}$) i broja ciklusa za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću ASE te pri tom predviđene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Tablica 14 prikazuje optimalne vrijednosti navedenih faktora ASE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na *slici 32* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima ASE uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola.

Tablica 10. Maseni udijeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE

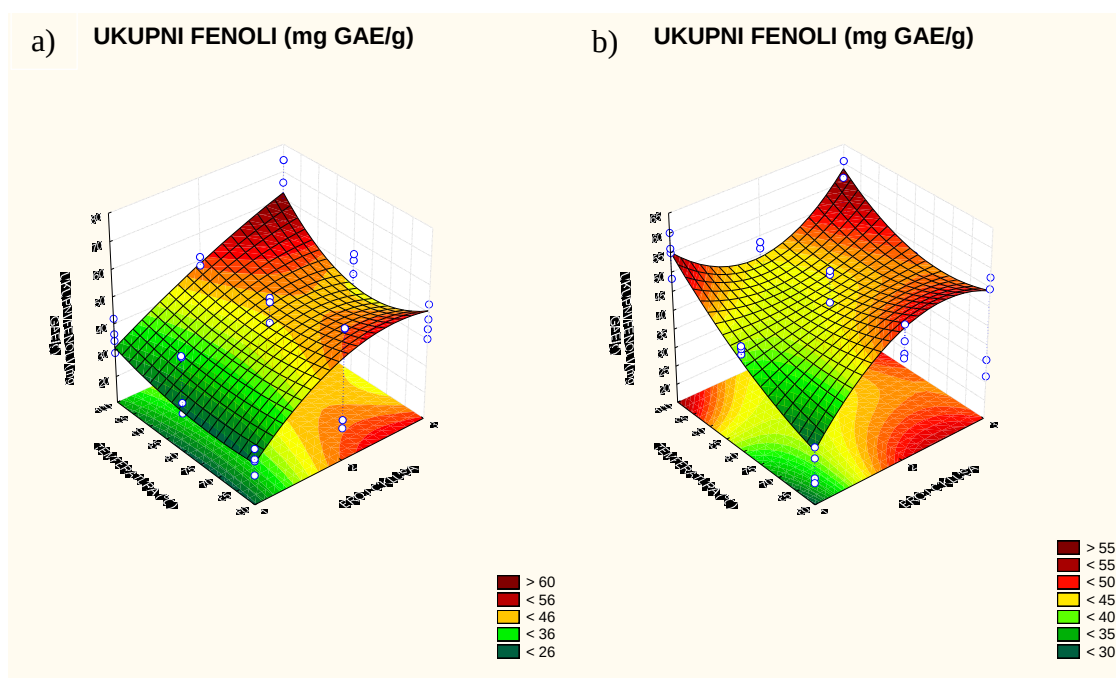
OTAPALO	BROJ CIKLUSA	T [°C]	UKUPNI FENOLI [mg GAE/g]	UKUPNI FLAVONOIDI [mg QE/g]	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE [mg CAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	1	60	23,57 ± 3,77	5,29 ± 0,27	7,11 ± 0,45
		80	26,56 ± 2,77	5,65 ± 0,11	7,77 ± 0,26
		100	31,31 ± 3,18	6,44 ± 0,03	8,67 ± 0,46
	2	60	58,55 ± 0,15	14,19 ± 0,18	20,42 ± 0,54
		80	41,60 ± 2,37	8,16 ± 0,08	11,85 ± 0,06
		100	40,42 ± 0,05	9,28 ± 0,15	13,85 ± 0,28
	3	60	41,97 ± 2,52	9,32 ± 0,05	12,63 ± 0,51
		80	43,89 ± 4,87	13,95 ± 0,38	19,83 ± 0,06
		100	70,02 ± 5,88	15,55 ± 0,35	23,24 ± 0,94
70 % VODENA OTOPINA ETANOLA	1	60	28,87 ± 2,77	9,38 ± 0,24	13,72 ± 0,20
		80	45,53 ± 0,35	14,97 ± 0,54	22,32 ± 0,20
		100	39,00 ± 4,03	11,41 ± 0,23	16,94 ± 0,51
	2	60	23,64 ± 2,16	7,47 ± 0,45	11,28 ± 0,06
		80	51,64 ± 1,16	15,04 ± 0,59	22,27 ± 0,26
		100	49,43 ± 2,26	14,86 ± 0,52	21,76 ± 1,56
	3	60	50,15 ± 3,77	14,80 ± 0,20	22,16 ± 2,07
		80	53,63 ± 1,66	15,83 ± 0,51	23,79 ± 0,68
		100	51,94 ± 0,45	16,26 ± 0,93	23,65 ± 0,26
50 % VODENA OTOPINA METANOLA	1	60	21,44 ± 0,85	6,23 ± 0,01	8,97 ± 0,82
		80	42,03 ± 1,52	11,17 ± 0,24	16,70 ± 0,46
		100	57,53 ± 3,59	15,05 ± 0,23	20,92 ± 0,17
	2	60	42,65 ± 0,76	10,89 ± 0,55	15,97 ± 0,28
		80	51,79 ± 0,70	12,97 ± 0,46	18,43 ± 0,06
		100	40,36 ± 3,84	10,42 ± 0,27	14,82 ± 0,83
	3	60	28,72 ± 3,12	8,46 ± 0,09	12,11 ± 0,74
		80	45,87 ± 0,05	11,92 ± 0,50	16,14 ± 0,69
		100	48,10 ± 0,76	11,15 ± 0,69	15,36 ± 1,03
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	1	60	28,76 ± 2,07	8,58 ± 0,61	13,74 ± 0,31
		80	42,69 ± 0,56	12,48 ± 0,64	18,83 ± 0,57
		100	52,14 ± 5,49	15,30 ± 0,78	22,93 ± 1,59
	2	60	48,59 ± 2,97	14,95 ± 0,74	22,47 ± 0,28
		80	41,73 ± 3,38	11,79 ± 0,83	18,05 ± 1,39
		100	47,45 ± 1,21	12,26 ± 0,50	18,01 ± 0,74
	3	60	51,07 ± 2,13	14,60 ± 0,49	22,53 ± 1,35
		80	45,97 ± 0,97	12,17 ± 0,92	18,72 ± 0,43
		100	58,38 ± 3,17	14,54 ± 0,33	22,78 ± 1,53

Tablica 11. Analiza varijance utjecaja polarnosti otapala (X_1), broja ciklusa (X_2) i temperature (X_3) na masene udjele fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

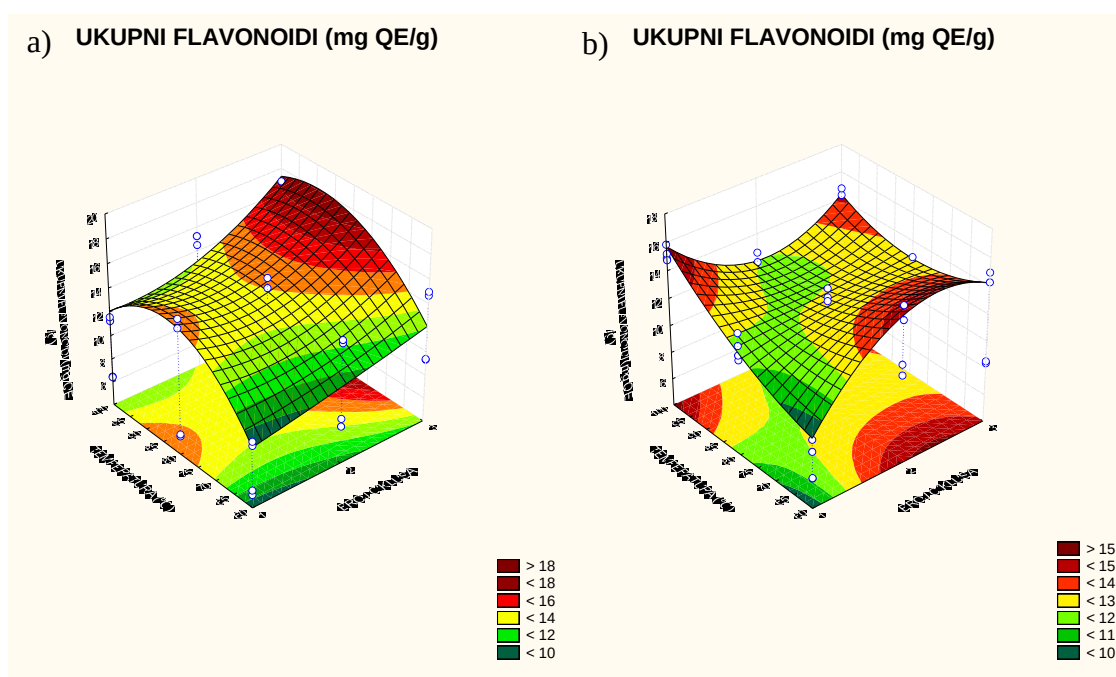
OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	UKUPNI FENOLI		UKUPNI FLAVONOIDI		UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	
		F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
VODENA OTOPINA ETANOLA	$X_1(L)$	0,431	0,518	24,205	0,000	14,822	0,001
	$X_2(L+Q)$	17,597	0,000	18,589	0,000	15,767	0,000
	$X_3(L+Q)$	4,020	0,033	4,103	0,031	1,950	0,166
	X_1X_2	3,023	0,069	3,167	0,062	3,599	0,044
	X_1X_3	4,781	0,019	4,078	0,031	3,668	0,042
	X_2X_3	1,066	0,397	0,714	0,591	0,941	0,459
VODENA OTOPINA METANOLA	$X_1(L)$	12,349	0,002	59,131	0,000	83,059	0,000
	$X_2(L+Q)$	8,158	0,002	3,178	0,061	2,978	0,072
	$X_3(L+Q)$	43,683	0,000	29,784	0,000	31,436	0,000
	X_1X_2	7,555	0,003	5,285	0,013	7,936	0,003
	X_1X_3	12,742	0,000	19,589	0,000	24,816	0,000
	X_2X_3	19,006	0,000	36,178	0,000	44,301	0,000

Tablica 12. Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za maseni polarnost fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola

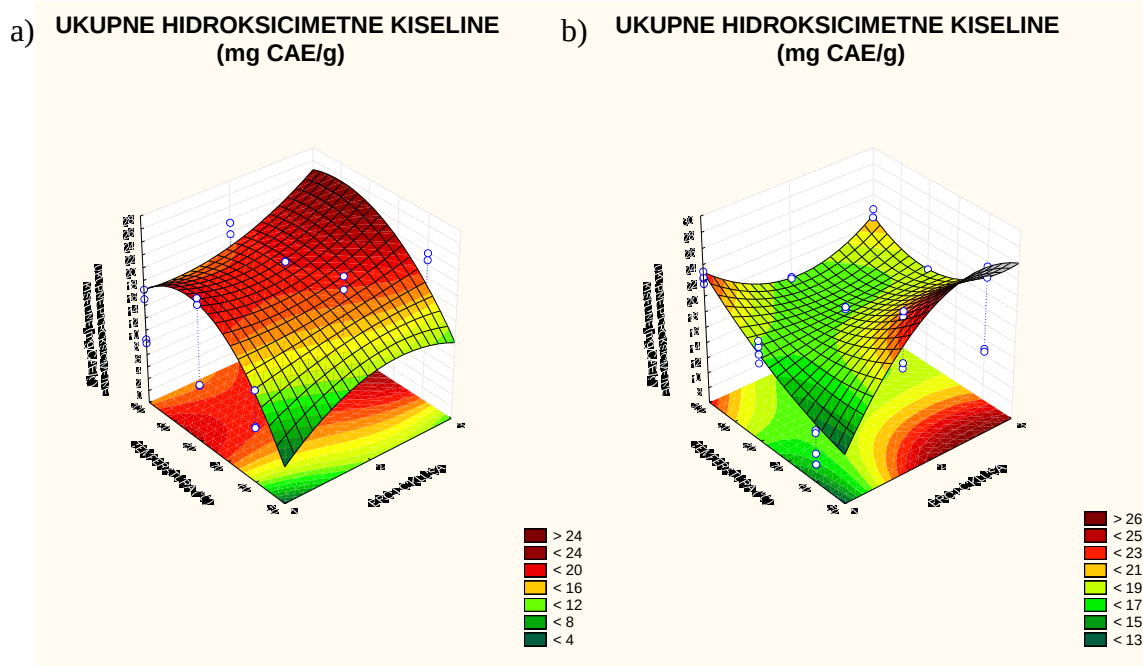
OTAPALO	VARIJABLA	MODEL	R ²
VODENA OTOPINA ETANOLA	UKUPNI FENOLI	$614,5406 - 11,0988X_1 + 94,3839X_2 + 0,7435X_2^2 - 19,6089X_3 + 0,1241X_3^2 - 2,3839X_1X_2 + 0,5290X_1X_2^2 + 0,3427X_1X_3 - 0,0021X_1X_3^2 + 2,5320X_2X_3 - 0,0204X_2X_3^2 - 1,1201X_2^2X_3 + 0,0083X_2^2X_3^2$	0,74
	UKUPNI FLAVONOIDI	$29,0851 - 2,3307X_1 + 142,2815X_2 - 31,7196X_2^2 - 1,6965X_3 + 0,0101X_3^2 - 0,5845X_1X_2 + 0,1247X_1X_2^2 + 0,0770X_1X_3 - 0,0005X_1X_3^2 - 2,6035X_2X_3 + 0,0155X_2X_3^2 + 0,5941X_2^2X_3 - 0,0035X_2^2X_3^2$	0,80
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$16,8866 - 3,5265X_1 + 271,8401X_2 - 61,4194X_2^2 - 2,3280X_3 + 0,0144X_3^2 - 1,1324X_1X_2 + 0,2502X_1X_2^2 + 0,1209X_1X_3 - 0,0007X_1X_3^2 - 4,7968X_2X_3 + 0,0280X_2X_3^2 + 1,0948X_2^2X_3 - 0,0063X_2^2X_3^2$	0,76
VODENA OTOPINA METANOLA	UKUPNI FENOLI	$-777,335 + 9,770X_1 + 210,565X_2 - 45,800X_2^2 + 16,731X_3 - 0,084X_3^2 - 0,728X_1X_2 + 0,245X_1X_2^2 - 0,230X_1X_3 + 0,001X_1X_3^2 - 1,336X_2X_3 - 0,007X_2X_3^2 + 0,131X_2^2X_3 + 0,003X_2^2X_3^2$	0,91
	FLAVONOIDI	$-213,577 + 2,566X_1 + 64,656X_2 - 3,891X_2^2 + 4,648X_3 - 0,023X_3^2 - 0,093X_1X_2 + 0,035X_1X_2^2 - 0,061X_1X_3 + 0,000X_1X_3^2 - 0,738X_2X_3 + 0,000X_2X_3^2 + 0,130X_2^2X_3 + 0,000X_2^2X_3^2$	0,93
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$-333,884 + 3,787X_1 + 111,197X_2 - 22,237X_2^2 + 7,304X_3 - 0,037X_3^2 - 0,160X_1X_2 + 0,060X_1X_2^2 - 0,088X_1X_3 + 0,001X_1X_3^2 - 1,519X_2X_3 + 0,003X_2X_3^2 + 0,241X_2^2X_3 - 0,000X_2^2X_3^2$	0,95



Slika 29. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa ekstrakcije



Slika 30. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa ekstrakcije



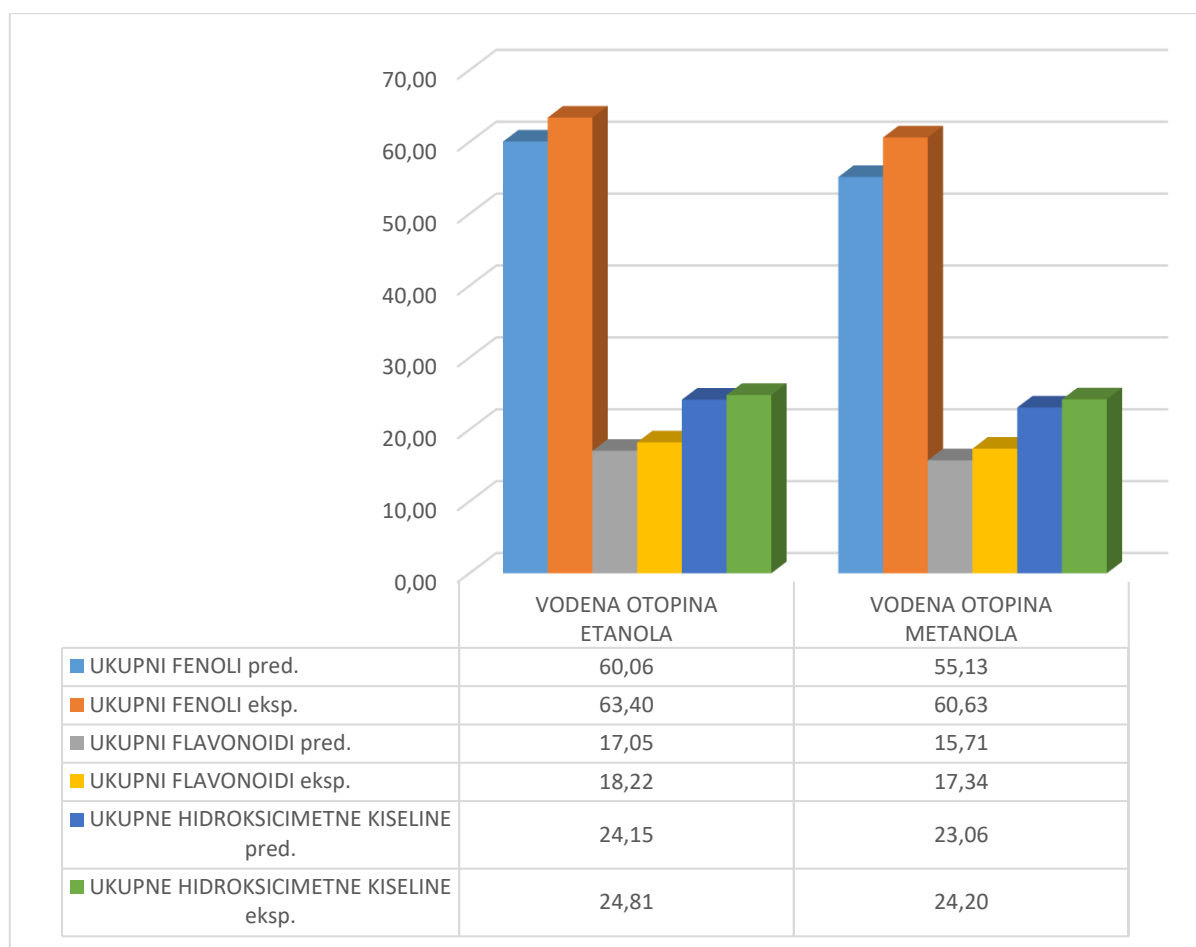
Slika 31. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih ukupnih hidroksicimetnih kiselina dobivenih pomoću ASE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa ekstrakcije

Tablica 13. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i broja ciklusa za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću ASE te pri tom predviđene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

TEHNIKA	OTAPALO	FAKTORI	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	Ukupne hidroksicimetne kiseline
ASE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	50	70	70
		Temperatura (°C)	100	100	100
		Broj ciklusa (N x 5min)	3	3	3
		Predviđena vrijednost	62,12 mg GAE/g	17,33 mg QE/g	24,53 mg CAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70	70	70
		Temperatura (°C)	100	100	100
		Broj ciklusa (N x 5min)	3	1	1
		Predviđena vrijednost	58,57 mg GAE/g	15,71 mg QE/g	23,06 mg CAE/g

Tablica 14. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i broja ciklusa tijekom ASE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

OPTIMALNI UVJETI			
ASE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	68
		Temperatura (°C)	100
		Broj ciklusa (N x 5 min)	3
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	100
		Broj ciklusa (N x 5 min)	1



Slika 32. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti fenolnih spojeva (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola, pri optimalnim uvjetima ASE

4.1.3. Utjecaj ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom na prinose fenolnih spojeva

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a rezultati određivanja prikazani su u *tablici 15*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije paralele uz standardnu devijaciju ($\pm$).

U *tablici 16* prikazani su rezultati provedene analize varijance odnosno rezultati ispitivanja utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperatura (X_2), vremena (X_3) i tlaka (X_4) na masene udjele određivanih skupina fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti. Utjecaj ispitanih faktora ekstrakcije na određivane skupine fenolnih spojeva označen je, prema p vrijednostima regresijskih koeficijenata, kao statistički značajan ($p < 0,05$) ili statistički neznačajan ($p > 0,05$).

Tablica 17 prikazuje jednadžbe regresijskog modela za HPAE za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva te pripadajuće koeficijente determinacije (R^2).

Na *slikama 33 - 35* su trodimenzionalne površine za ukupne fenole (*slika 33a* i *33b*), ukupne flavonoide (*slika 34a* i *slika 34b*) i ukupne hidroksicimetne kiseline (*slika 35a* i *slika 35b*) koje prikazuju utjecaj temperature i tlaka ekstrakcije na određivane skupine fenolnih spojeva kod HPAE.

U *tablici 18* navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature ($^{\circ}\text{C}$), vremena ekstrakcije (min) i tlaka (MPa) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću HPAE te pri tom predviđene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Tablica 19 prikazuje optimalne vrijednosti navedenih faktora HPAE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na *slici 32* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola.

Tablica 15. Maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobiveni pomoću HPAE, primjenom različitih otapala pri različitim temperaturama i vremenu ekstrakcije te različitom tlaku

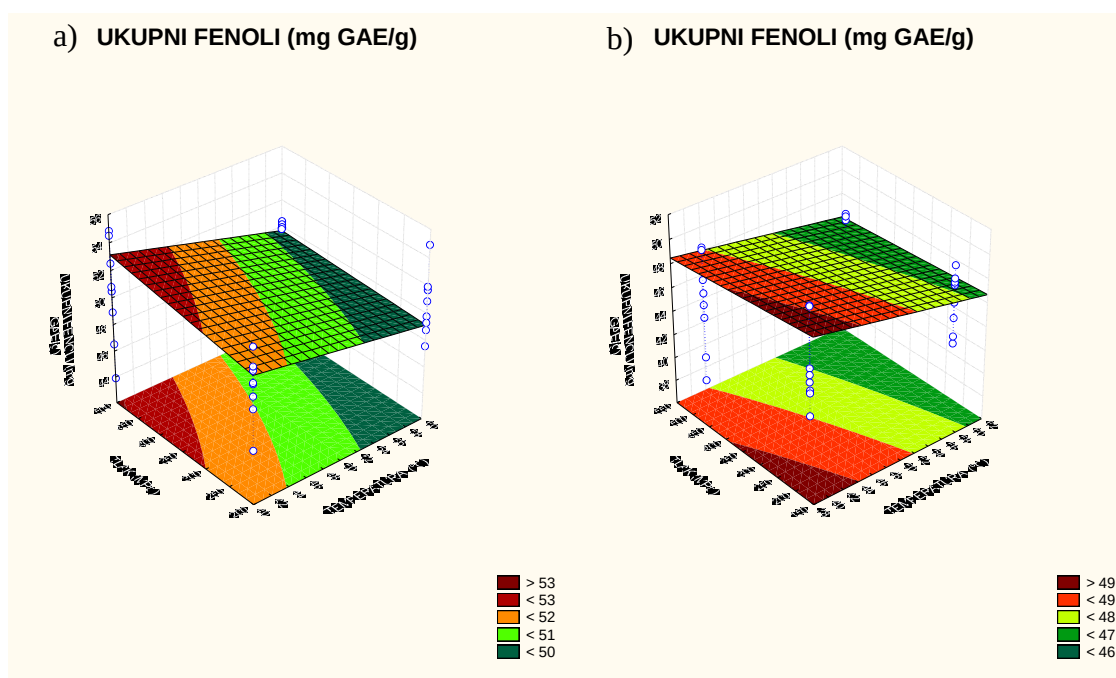
OTAPALO	TLAK [MPa]	VRIJEME [min]	T [°C]	UKUPNI FENOLI [mg GAE/g]	UKUPNI FLAVONOIDI [mg QE/g]	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE [mg CAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	200	5	40	51,91 ± 0,20	13,77 ± 0,26	20,16 ± 0,09
			60	52,66 ± 3,09	14,13 ± 0,11	20,25 ± 0,65
		15	40	52,12 ± 1,85	13,34 ± 0,11	18,70 ± 1,47
			60	53,51 ± 1,41	12,51 ± 0,04	18,74 ± 0,28
	500	5	40	48,66 ± 1,57	13,63 ± 0,26	20,02 ± 0,06
			60	50,14 ± 0,35	12,74 ± 0,64	19,40 ± 0,88
		15	40	51,28 ± 0,55	13,43 ± 0,51	19,10 ± 0,68
			60	49,98 ± 0,20	13,85 ± 0,17	19,25 ± 0,82
70 % VODENA OTOPINA ETANOLA	200	5	40	49,97 ± 1,31	14,84 ± 0,54	23,55 ± 0,54
			60	48,67 ± 3,03	14,66 ± 1,19	20,89 ± 1,79
		15	40	47,98 ± 2,75	14,03 ± 0,64	24,35 ± 0,40
			60	46,41 ± 3,53	14,89 ± 1,09	24,83 ± 1,94
	500	5	40	51,83 ± 4,36	14,80 ± 1,46	24,52 ± 1,02
			60	47,15 ± 1,71	14,64 ± 0,71	26,20 ± 0,03
		15	40	50,62 ± 1,86	14,43 ± 1,25	24,23 ± 1,56
			60	49,86 ± 0,10	14,79 ± 1,10	23,70 ± 0,71
50 % VODENA OTOPINA METANOLA	200	5	40	43,79 ± 0,15	12,59 ± 0,01	17,04 ± 0,40
			60	44,42 ± 0,75	11,89 ± 0,68	17,16 ± 0,09
		15	40	43,18 ± 2,00	12,63 ± 0,32	17,42 ± 1,07
			60	39,47 ± 1,40	11,99 ± 0,00	16,36 ± 0,11
	500	5	40	44,60 ± 3,48	12,84 ± 0,69	17,67 ± 0,85
			60	45,04 ± 2,81	12,07 ± 0,48	17,47 ± 1,33
		15	40	43,53 ± 1,11	12,76 ± 0,23	17,23 ± 0,29
			60	46,45 ± 1,60	12,36 ± 0,72	17,45 ± 0,54
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	200	5	40	48,24 ± 3,57	12,05 ± 1,13	19,81 ± 1,16
			60	48,41 ± 1,91	13,53 ± 0,75	20,58 ± 0,51
		15	40	47,94 ± 3,89	12,95 ± 1,01	19,22 ± 2,91
			60	47,74 ± 2,53	13,20 ± 0,60	20,39 ± 0,37
	500	5	40	47,99 ± 1,01	13,00 ± 0,54	17,57 ± 1,17
			60	46,29 ± 1,51	13,12 ± 0,41	20,77 ± 0,94
		15	40	46,61 ± 1,42	12,09 ± 0,10	21,60 ± 1,17
			60	43,33 ± 1,92	11,58 ± 1,08	20,27 ± 0,23

Tablica 16. Analiza varijance utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperatura (X_2), vremena (X_3) i tlaka (X_4) na maseni udjel fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

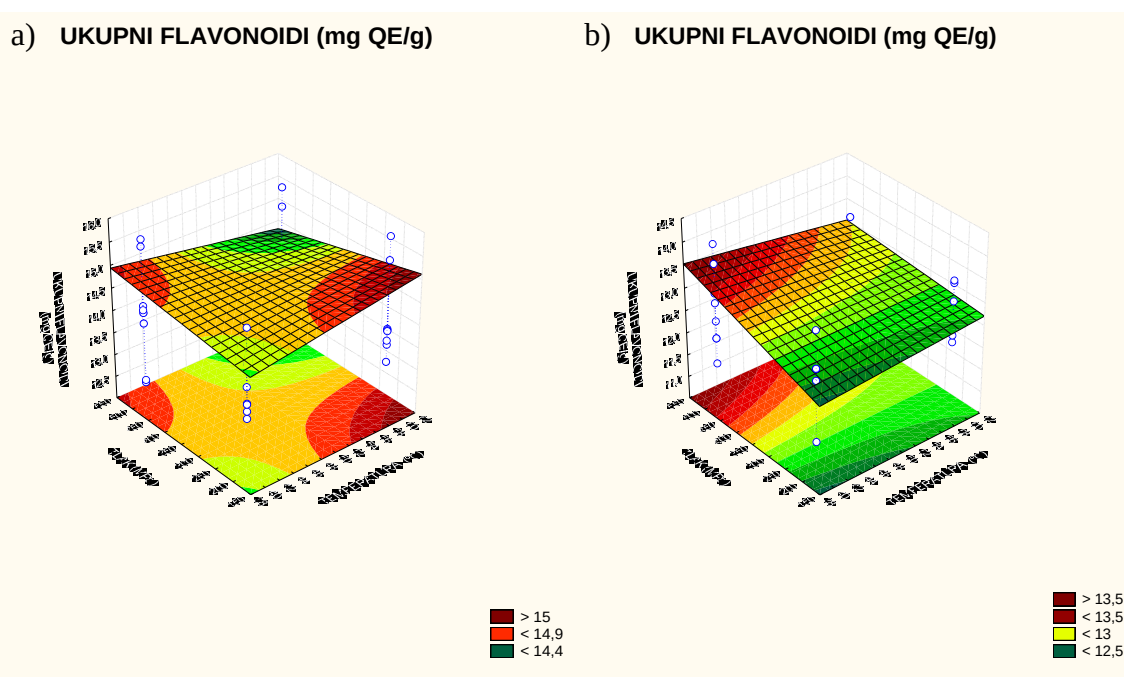
OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	UKUPNI FENOLI		UKUPNI FLAVONOIDI		UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	
		F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
VODENA OTOPINA ETANOLA	X_1	8,225	0,011	18,552	0,000	171,088	0,000
	X_2	0,359	0,557	0,004	0,952	0,058	0,812
	X_3	0,017	0,898	0,749	0,399	2,030	0,172
	X_4	0,932	0,348	0,000	0,986	0,627	0,439
	$X_1 X_2$	7,150	0,016	0,024	0,879	3,041	0,099
	$X_1 X_3$	1,025	0,326	0,024	0,878	2,292	0,148
	$X_1 X_4$	2,949	0,104	0,668	0,425	0,195	0,664
	$X_2 X_3$	1,325	0,266	2,211	0,155	7,024	0,017
	$X_2 X_4$	0,533	0,475	0,044	0,836	5,886	0,027
	$X_3 X_4$	0,059	0,811	0,567	0,462	6,363	0,022
	$X_1 X_2 X_3$	0,488	0,494	1,322	0,266	22,556	0,000
	$X_1 X_2 X_4$	0,010	0,922	0,048	0,829	3,953	0,063
	$X_1 X_3 X_4$	0,875	0,363	0,401	0,535	2,761	0,115
	$X_2 X_3 X_4$	0,016	0,901	0,778	0,390	1,229	0,283
VODENA OTOPINA METANOLA	X_1	16,905	0,001	1,841	0,193	69,303	0,000
	X_2	0,011	0,918	0,315	0,582	0,604	0,448
	X_3	2,753	0,115	0,736	0,403	0,010	0,920
	X_4	0,556	0,466	0,422	0,525	1,997	0,176
	$X_1 X_2$	7,086	0,016	2,599	0,125	1,251	0,279
	$X_1 X_3$	0,000	0,989	1,559	0,229	0,150	0,704
	$X_1 X_4$	0,695	0,416	4,686	0,045	0,006	0,940
	$X_2 X_3$	0,157	0,697	2,748	0,116	0,206	0,656
	$X_2 X_4$	0,055	0,818	1,193	0,290	0,350	0,562
	$X_3 X_4$	0,359	0,557	0,651	0,431	2,127	0,163
	$X_1 X_2 X_3$	2,131	0,163	3,054	0,099	0,679	0,421
	$X_1 X_2 X_4$	3,232	0,090	1,644	0,217	1,311	0,268
	$X_1 X_3 X_4$	0,000	0,991	1,637	0,218	0,538	0,473
	$X_2 X_3 X_4$	0,782	0,389	0,262	0,615	3,649	0,073

Tablica 17. Koeficijenti determinacije i jednadžbe regresijskih modela za maseni udjel fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz upotrebu vodenih otopina metanola i etanola

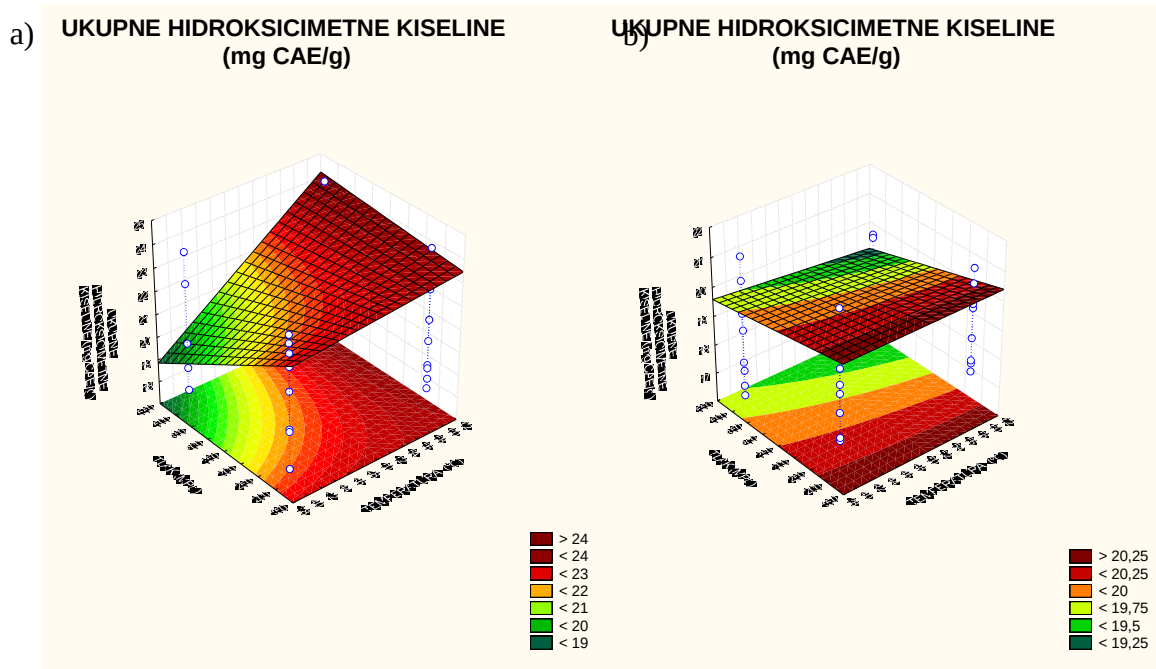
OTAPALO	VARIJABLA	MODEL	R ²
VODENA OTOPINA ETANOLA	UKUPNI FENOLI	$52,61212 - 0,00084X_1 - 0,37438X_2 + 2,74097X_3 + 0,05677X_4 + 0,00585X_1X_2 - 0,05178X_1X_3 - 0,00080X_1X_4 - 0,02581X_2X_3 - 0,00010X_2X_4 - 0,00310X_3X_4 + 0,00054X_1X_2X_3 - 0,00000X_1X_2X_4 + 0,00005X_1X_3X_4 + 0,00001X_2X_3X_4$	0,58
	FLAVONOIDI	$21,82556 - 0,13735X_1 - 0,22601X_2 - 0,73956X_3 + 0,00419X_4 + 0,00416X_1X_2 + 0,01244X_1X_3 + 0,00006X_1X_4 + 0,01777X_2X_3 - 0,00006X_2X_4 - 0,00140X_3X_4 - 0,00032X_1X_2X_3 - 0,00000X_1X_2X_4 + 0,00001X_1X_3X_4 + 0,00002X_2X_3X_4$	0,60
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$39,33439 - 0,21665X_1 - 0,59908X_2 - 3,60924X_3 + 0,04258X_4 + 0,00881X_1X_2 + 0,05705X_1X_3 - 0,00114X_1X_4 + 0,07585X_2X_3 - 0,00065X_2X_4 - 0,00034X_3X_4 - 0,00127X_1X_2X_3 + 0,00002X_1X_2X_4 + 0,00003X_1X_3X_4 - 0,00002X_2X_3X_4$	0,93
VODENA OTOPINA METANOLA	UKUPNI FENOLI	$79,18283 - 0,64297X_1 - 0,94352X_2 - 2,83594X_3 - 0,10813X_4 + 0,01764X_1X_2 + 0,05793X_1X_3 + 0,00216X_1X_4 + 0,05617X_2X_3 + 0,00244X_2X_4 - 0,00261X_3X_4 - 0,00116X_1X_2X_3 - 0,00005X_1X_2X_4 - 0,00000X_1X_3X_4 + 0,00005X_2X_3X_4$	0,67
	FLAVONOIDI	$29,23927 - 0,35053X_1 - 0,23957X_2 - 1,05720X_3 - 0,04094X_4 + 0,00542X_1X_2 + 0,02328X_1X_3 + 0,00082X_1X_4 + 0,01697X_2X_3 + 0,00041X_2X_4 + 0,00064X_3X_4 - 0,00039X_1X_2X_3 - 0,00001X_1X_2X_4 - 0,00002X_1X_3X_4 + 0,00001X_2X_3X_4$	0,58
	UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$19,56221 - 0,16138X_1 - 0,09969X_2 - 0,25515X_3 - 0,01759X_4 + 0,00442X_1X_2 + 0,01715X_1X_3 + 0,00065X_1X_4 + 0,00009X_2X_3 + 0,00023X_2X_4 - 0,00122X_3X_4 - 0,00023X_1X_2X_3 - 0,00001X_1X_2X_4 - 0,00001X_1X_3X_4 + 0,00004X_2X_3X_4$	0,83



Slika 33. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i tlaku uz vrijeme ekstrakcije 5 min



Slika 34. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i tlaku uz vrijeme ekstrakcije 5 min



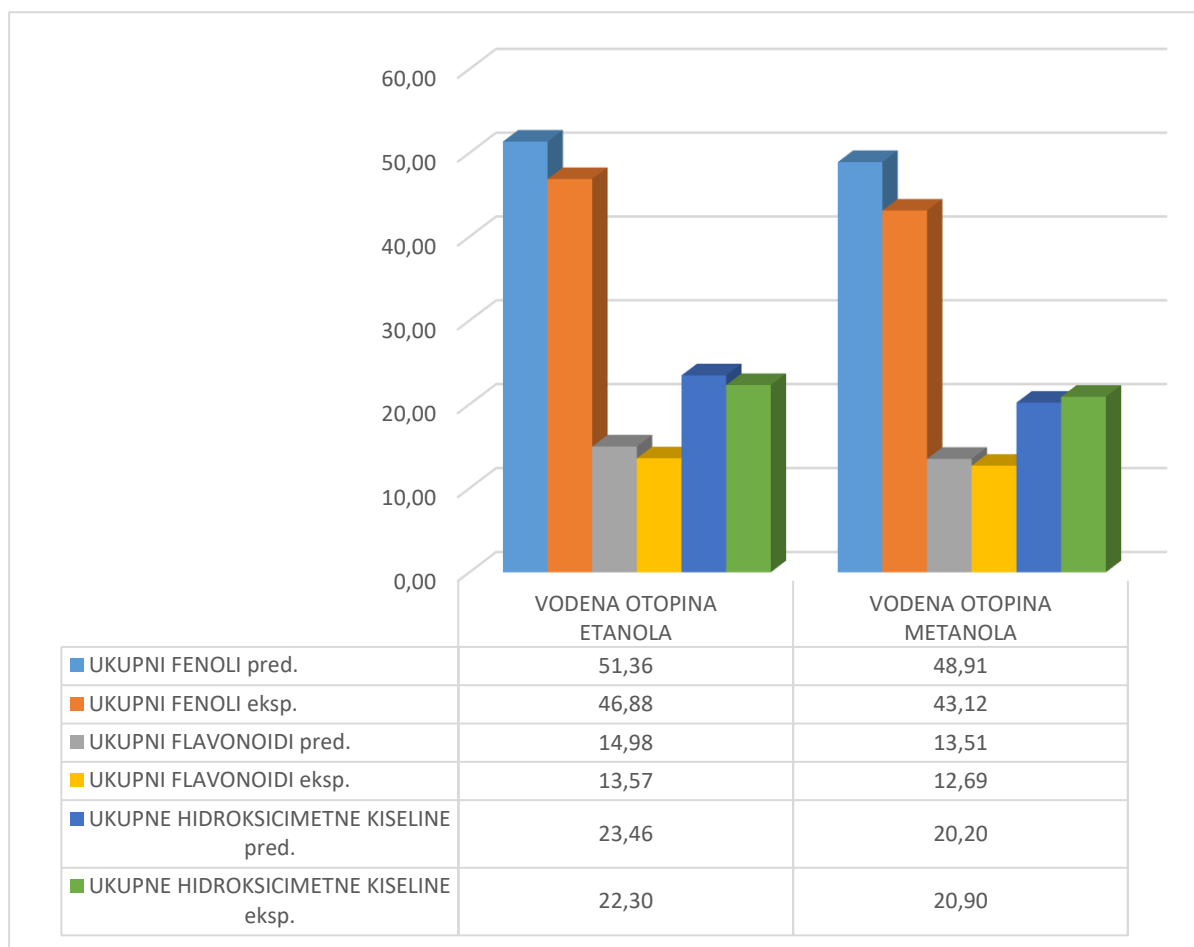
Slika 35. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola i uz vrijeme ekstrakcije 5 min b) 70 % vodenih otopina metanola uz vrijeme ekstrakcije 15 min u ovisnosti o temperaturi i tlaku

Tablica 18. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C), vremena ekstrakcije (min) i tlaka (MPa) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću HPAE te pri tom predviđene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

TEHNIKA	OTAPALO	FAKTORI	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	Ukupne hidroksicimetne kiseline
HPAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	50	70	70
		Temperatura (°C)	40	60	60
		Vrijeme (min)	5	5	5
		Tlak (MPa)	500	200	500
		Predviđena vrijednost	53,13 mg GAE/g	14,99 mg QE/g	23,73 mg CAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70	70	70
		Temperatura (°C)	40	40	40
		Vrijeme (min)	5	5	15
		Tlak (MPa)	500	500	200
		Predviđena vrijednost	48,90 mg GAE/g	13,51 mg QE/g	20,62 mg CAE/g

Tablica 19. Optimalne vrijednosti otapala (%), temperature (°C), vremena ekstrakcije (min) i tlaka (MPa) tijekom HPAE u kojima se preklapaju najviši maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina

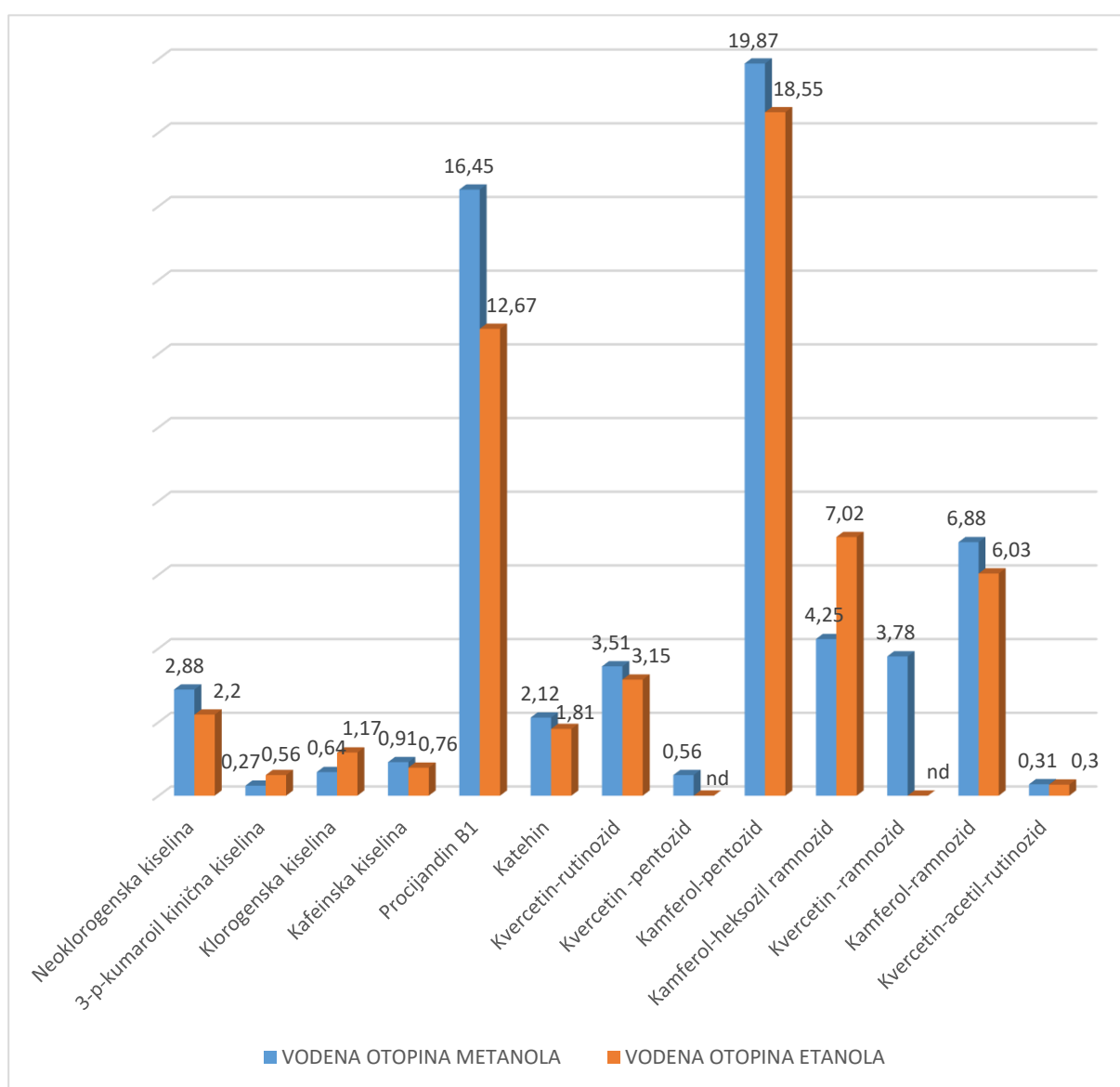
OPTIMALNI UVJETI			
HPAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70
		Temperatura (°C)	60
		Vrijeme (min)	5
		Tlak (MPa)	200
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	40
		Vrijeme (min)	5
		Tlak (MPa)	500



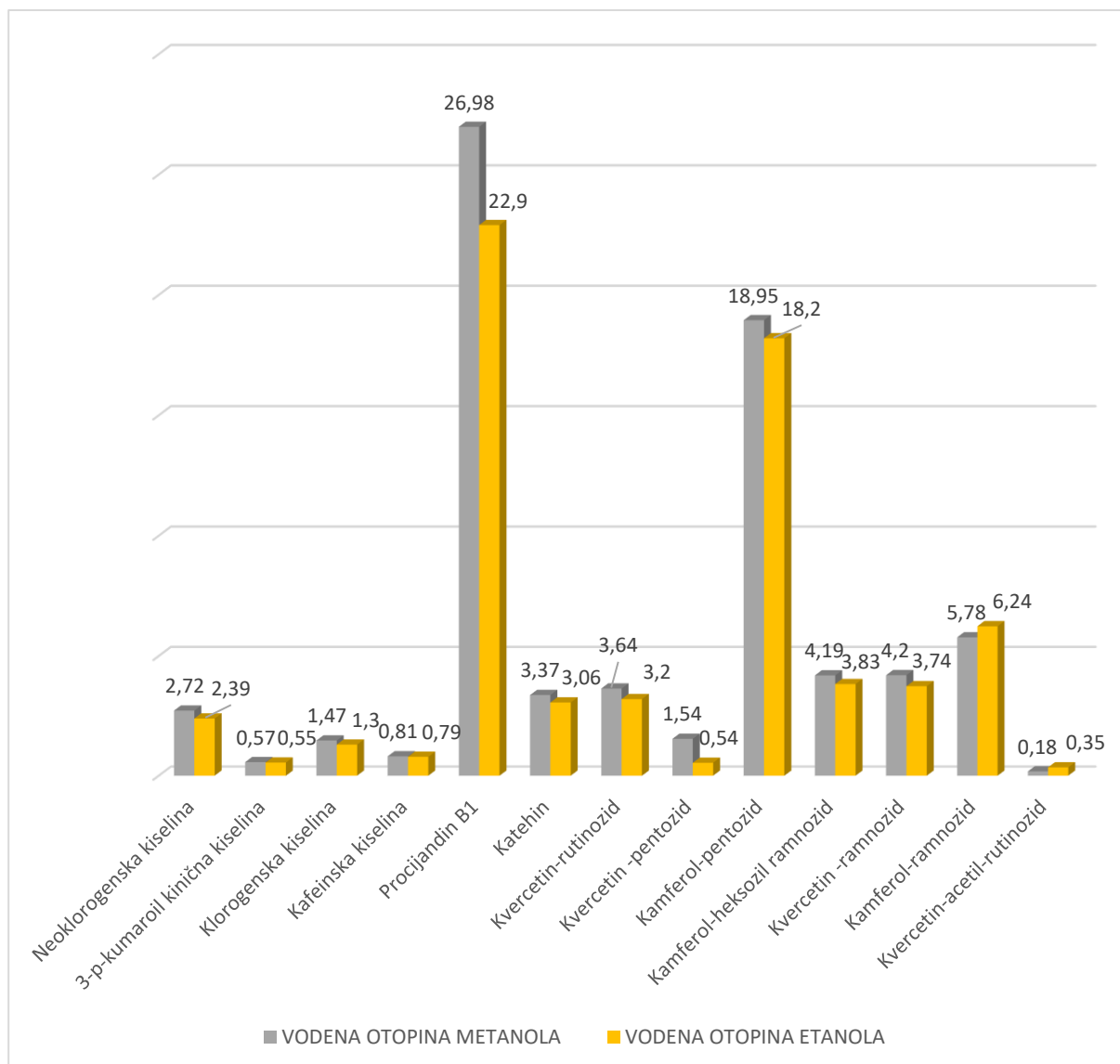
Slika 36. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti fenolnih spojeva (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim uz primjenu vodenih otopina etanola i metanola, pri optimalnim uvjetima HPAE

4.2. Rezultati analize pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC)

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE (slika 37) i optimalnim uvjetima ASE (slika 38) provedeno je određivanje fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV-Vis Photo Diode Array (PDA) detekciju. Pojedinačni spojevi identificirani su usporedbom vremena zadržavanja (R_t) razdvojenih pikova u ispitivanim uzorcima s vremenom zadržavanja dostupnih standarda. Identifikacija flavonol glikozida provedena je na 340 nm, a fenolnih kiselina na 278 nm.



Slika 37. Maseni udjeli fenolnih spojeva (mg/g) određeni primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE, uz primjenu etanolnih i metanolnih vodenih otopina



Slika 38. Maseni udjeli fenolnih spojeva (mg/g) određeni primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pri optimalnim uvjetima ASE, uz primjenu etanolnih i metanolnih vodenih otopina

4.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE, ASE i HPAE određen je antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH i FRAP metoda. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta za ekstrakte dobivene pomoću MAE prikazani su u *tablici 20*, za ekstrakte dobivene pomoću ASE u *tablici 23*, a za ekstrakte dobivene pomoću HPAE u *tablici 26*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije paralele uz standardnu devijaciju ($\pm$).

Provedena je analiza varijance, kako bi se, isto kao i za određivane skupine fenolnih spojeva, te je ispitan utjecaj primijenjenih faktora ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet, koji je prema p vrijednostima regresijskih koeficijenata, označen kao statistički značajan ($p < 0,05$) ili statistički neznačajan ($p > 0,05$).

U *tablici 21* prikazani su rezultati ispitivanja utjecaja utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperature (X_2) i vremena ekstrakcije (X_3) na antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine (određenog DPPH i FRAP metodama) dobivenih pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti.

Tablici 24 prikazuje rezultate ispitivanja utjecaja utjecaja polarnosti otapala (X_1), broja ciklusa (X_2) i temperature (X_3) na antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine (određenog DPPH i FRAP metodama) dobivenih pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti.

U *tablici 27* prikazani su rezultati ispitivanja utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperatura (X_2), vremena (X_3) i tlaka (X_4) na antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine (određenog DPPH i FRAP metodama) dobivenih pomoću HPAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti.

Trodimenzijski prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine dobivenim pomoću MAE uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije određen DPPH metodom nalazi se na *slici 39a i 39b*, odnosno na *slici 40a i slici 40b* određen FRAP metodom.

Trodimenzijski prikaz odzivnih površina antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa određen DPPH metodom nalazi se na *slici 41a i 41b*, *slici 42a i 42b* određen FRAP metodom.

Trodimenzijski prikaz odzivnih površina antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i tlaku ekstrakcije određen DPPH metodom nalazi se na *slici*

43 a i 43b, odnosno na slici 44a i 44b određen FRAP metodom.

Kao i u slučaju određivanja fenolnih spojeva, za svaku od ekstrakcijskih tehnika određene su optimalne vrijednosti faktora ekstrakcije pri kojima se postižu najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (određenog DPPH i FRAP metodama).

U tablici 22 navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i vremena ekstrakcije (min) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću MAE te pri tom predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama.

U tablici 25 navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i broja ciklusa za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću ASE te pri tom predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama.

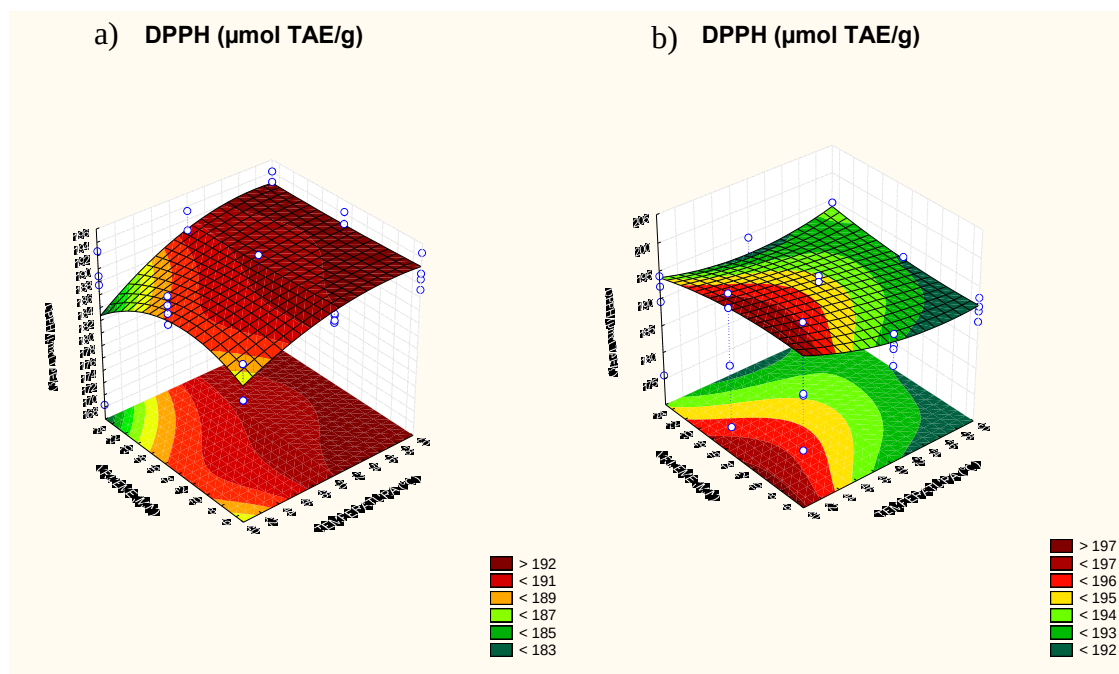
U tablici 28 navedene su optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C), vremena ekstrakcije (min) i tlaka (MPa) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću HPAE i predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama.

Tablica 20. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE primjenom različitih otapala pri različitim temperaturama i vremenu ekstrakcije

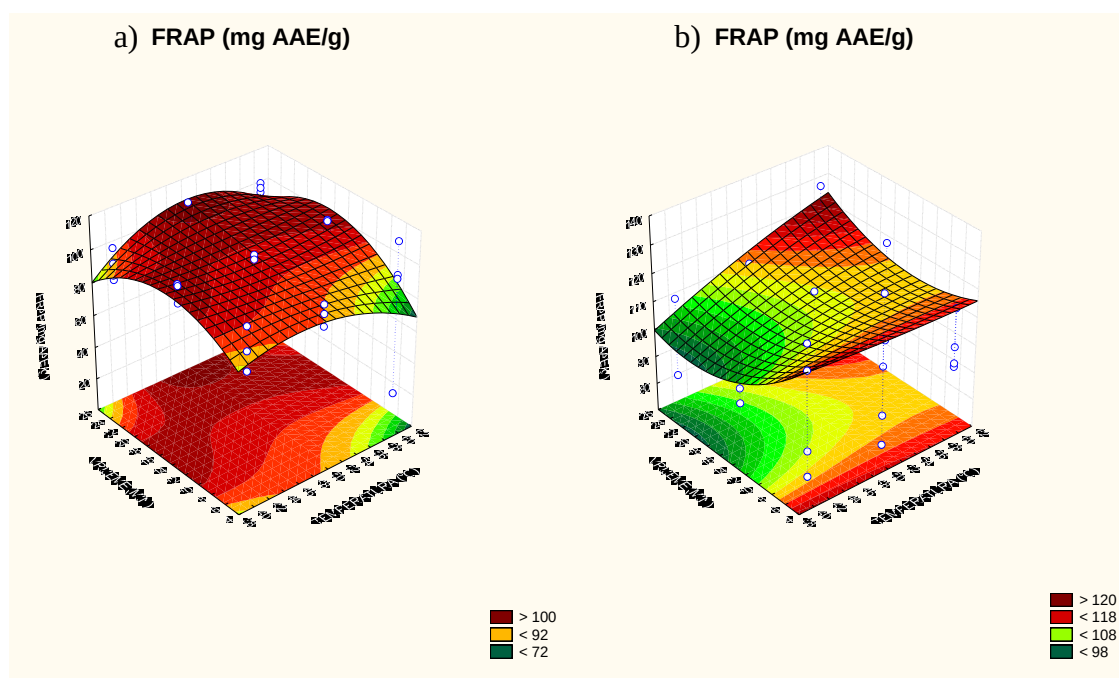
OTAPALO	T [°C]	VRIJEME [min]	DPPH [μmol TAE/g]	FRAP [mg AAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	40	5	187,53 ± 3,81	96,55 ± 13,01
		15	190,91 ± 0,87	103,2 ± 0,78
		25	180,5 ± 17,21	85,49 ± 7,14
	50	5	191,34 ± 0,20	95,28 ± 3,95
		15	190,56 ± 0,62	95,83 ± 8,34
		25	191,80 ± 2,11	106,72 ± 2,67
	60	5	192,70 ± 2,81	69,15 ± 65,56
		15	191,21 ± 0,59	103,6 ± 0,32
		25	193,34 ± 1,14	99,71 ± 3,94
70 % VODENA OTOPINA ETANOLA	40	5	187,58 ± 3,83	85,45 ± 8,44
		15	190,74 ± 2,99	95,13 ± 3,83
		25	188,18 ± 0,98	91,53 ± 11,64
	50	5	190,29 ± 0,23	87,78 ± 3,84
		15	191,95 ± 1,83	95,30 ± 5,08
		25	189,24 ± 0,27	101,44 ± 3,84
	60	5	190,33 ± 1,72	94,44 ± 1,58
		15	193,32 ± 1,30	99,98 ± 4,28
		25	191,25 ± 0,84	94,44 ± 7,27
50 % VODENA OTOPINA METANOLA	40	5	196,65 ± 8,92	121,32 ± 6,53
		15	198,07 ± 1,80	95,66 ± 2,54
		25	193,14 ± 1,31	102,14 ± 11,43
	50	5	192,69 ± 1,39	118,31 ± 17,88
		15	193,03 ± 3,51	108,6 ± 11,06
		25	192,35 ± 2,86	108,98 ± 3,59
	60	5	191,76 ± 1,74	107,17 ± 9,89
		15	191,92 ± 0,38	116,71 ± 8,03
		25	193,49 ± 1,38	122,36 ± 9,22
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	40	5	185,64 ± 7,14	83,84 ± 6,49
		15	180,87 ± 8,06	93,78 ± 7,51
		25	182,53 ± 9,77	87,9 ± 7,98
	50	5	189,48 ± 2,12	82,68 ± 7,61
		15	190,74 ± 5,20	91,84 ± 1,26
		25	188,29 ± 3,18	100,12 ± 2,76
	60	5	189,99 ± 1,95	93,71 ± 0,87
		15	187,81 ± 0,78	90,79 ± 5,76
		25	192,72 ± 0,08	103,71 ± 1,80

Tablica 21. Analiza varijance polarnosti otapala (X_1), temperature (X_2) i vremena (X_3) na antioksidacijski kapacitet (DPPH i FRAP) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	DPPH		FRAP	
		F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
VODENA OTOPINA ETANOLA	$X_1(L)$	0,053	0,821	0,043	0,837
	$X_2(L+Q)$	3,429	0,051	0,233	0,794
	$X_3(L+Q)$	0,941	0,405	1,480	0,249
	X_1X_2	0,577	0,570	0,377	0,690
	X_1X_3	0,256	0,776	0,116	0,891
	X_2X_3	0,692	0,605	0,660	0,626
VODENA OTOPINA METANOLA	$X_1(L)$	18,966	0,000	39,736	0,000
	$X_2(L+Q)$	0,661	0,526	2,476	0,107
	$X_3(L+Q)$	0,088	0,916	0,797	0,463
	X_1X_2	5,944	0,009	0,059	0,943
	X_1X_3	0,390	0,682	2,514	0,104
	X_2X_3	0,644	0,637	1,238	0,324



Slika 39. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću MAE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola b) 50 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije



Slika 40. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću MAE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola b) 50 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije

Tablica 22. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C) i vremena ekstrakcije (min) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću MAE s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama uz prikaz predviđenih DPPH i FRAP vrijednosti pri istim optimalnim uvjetima

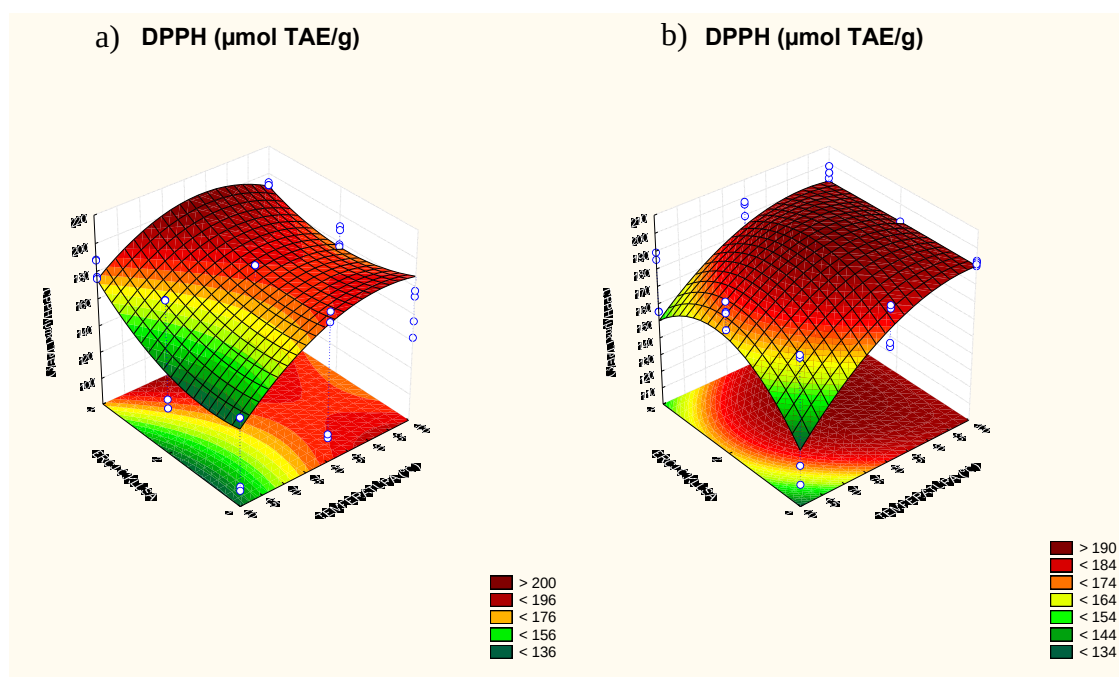
	OTAPALO	FAKTORI	DPPH	FRAP
MAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	50	50
		Temperatura (°C)	57	51
		Vrijeme (min)	5	25
		Predviđena vrijednost	192,79 $\mu\text{mol TAE/g}$	106,50 mg AAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	50	50
		Temperatura (°C)	40	60
		Vrijeme (min)	8	25
		Predviđena vrijednost	197,37 $\mu\text{mol TAE/g}$	120,06 mg AAE/g

Tablica 23. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama u ekstraktima cvijeta trnina dobivenim pomoću ASE primjenom različitih otapala pri različitim temperatura i broju ciklusa

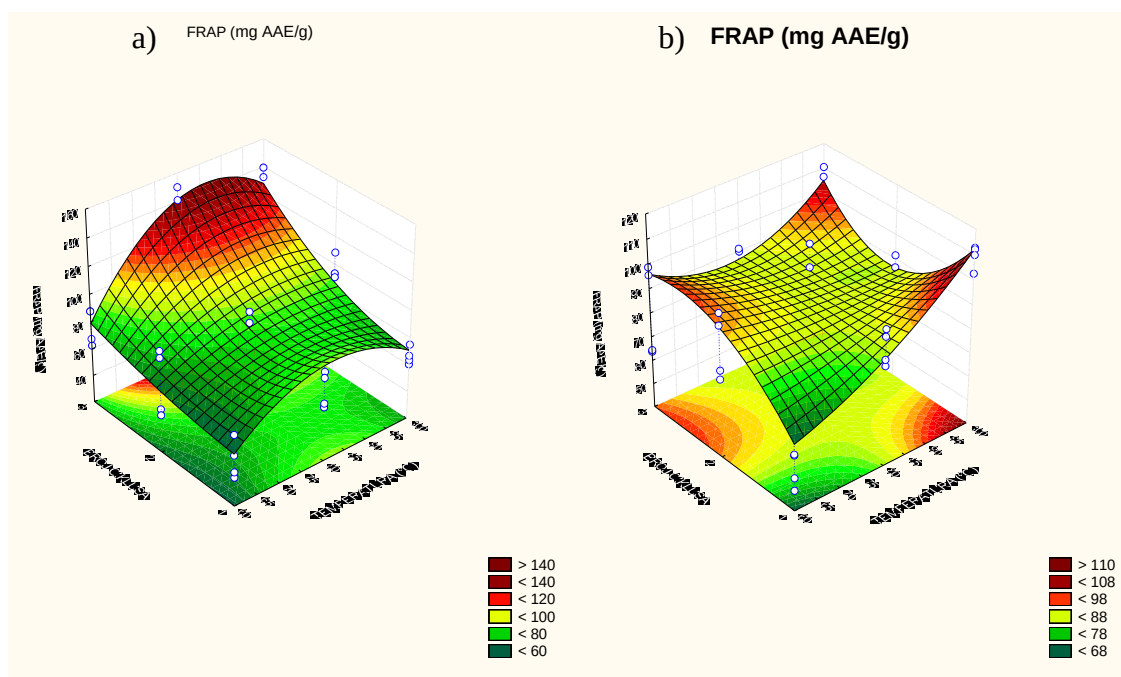
OTAPALO	BROJ CIKLUSA	T [°C]	DPPH [μmol TAE/g]	FRAP [mg AAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	1	60	93,42 ± 2,20	42,81 ± 2,69
		80	99,72 ± 2,09	61,00 ± 1,89
		100	148,71 ± 8,50	62,03 ± 2,20
	2	60	192,73 ± 0,11	91,53 ± 3,50
		80	160,21 ± 5,08	68,62 ± 1,90
		100	177,46 ± 1,21	85,25 ± 11,10
	3	60	175,38 ± 0,99	64,95 ± 3,50
		80	190,96 ± 0,33	105,35 ± 6,27
		100	192,21 ± 1,66	135,87 ± 4,82
70 % VODENA OTOPINA ETANOLA	1	60	145,23 ± 0,22	64,38 ± 10,38
		80	186,65 ± 5,29	83,16 ± 3,00
		100	174,85 ± 2,98	70,92 ± 5,70
	2	60	117,62 ± 4,51	49,72 ± 3,29
		80	189,84 ± 0,22	89,06 ± 5,80
		100	190,04 ± 1,98	99,45 ± 12,87
	3	60	188,26 ± 0,55	87,67 ± 0,00
		80	190,89 ± 0,77	145,31 ± 6,49
		100	189,48 ± 2,64	114,94 ± 5,39
50 % VODENA OTOPINA METANOLA	1	60	118,42 ± 7,81	51,07 ± 3,59
		80	189,28 ± 1,33	82,79 ± 1,80
		100	192,56 ± 0,66	112,39 ± 0,50
	2	60	176,94 ± 7,16	74,49 ± 2,60
		80	190,33 ± 0,11	106,59 ± 6,68
		100	187,53 ± 3,87	82,67 ± 2,30
	3	60	155,42 ± 0,11	64,09 ± 0,50
		80	178,47 ± 15,34	90,48 ± 0,81
		100	190,14 ± 1,88	85,70 ± 7,81
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	1	60	185,18 ± 1,10	63,27 ± 0,30
		80	168,25 ± 1,55	94,86 ± 2,10
		100	190,53 ± 0,77	106,08 ± 5,30
	2	60	184,48 ± 4,62	97,00 ± 3,59
		80	194,68 ± 1,76	81,50 ± 0,90
		100	183,90 ± 0,77	88,81 ± 3,50
	3	60	187,13 ± 2,88	97,09 ± 2,31
		80	196,73 ± 1,00	81,90 ± 4,14
		100	196,60 ± 2,75	108,38 ± 2,79

Tablica 24. Analiza varijance utjecaja polarnosti otapala (X_1), broja ciklusa (X_2) i temperature (X_3) na antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i metanola, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	DPPH		FRAP	
		F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
VODENA OTOPINA ETANOLA	$X_1(L)$	8,576	0,008	5,074	0,035
	$X_2(L+Q)$	25,423	0,000	37,279	0,000
	$X_3(L+Q)$	8,449	0,002	17,090	0,000
	X_1X_2	13,795	0,000	2,032	0,155
	X_1X_3	5,258	0,014	4,297	0,027
	X_2X_3	1,091	0,386	3,619	0,021
VODENA OTOPINA METANOLA	$X_1(L)$	10,940	0,003	9,370	0,006
	$X_2(L+Q)$	4,298	0,027	0,726	0,495
	$X_3(L+Q)$	14,233	0,000	29,029	0,000
	X_1X_2	1,741	0,199	2,936	0,074
	X_1X_3	10,228	0,001	11,900	0,000
	X_2X_3	2,573	0,066	13,458	0,000



Slika 41. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću ASE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola b) 50 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa



Slika 42. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću ASE uz primjenu a) 70 % vodenih otopina etanola b) 70 % vodenih otopina metanola u ovisnosti o temperaturi i broju ciklusa

Tablica 25. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), broja ciklusa, temperature (°C) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću ASE s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama uz prikaz predviđenih DPPH i FRAP vrijednosti pri istim optimalnim uvjetima

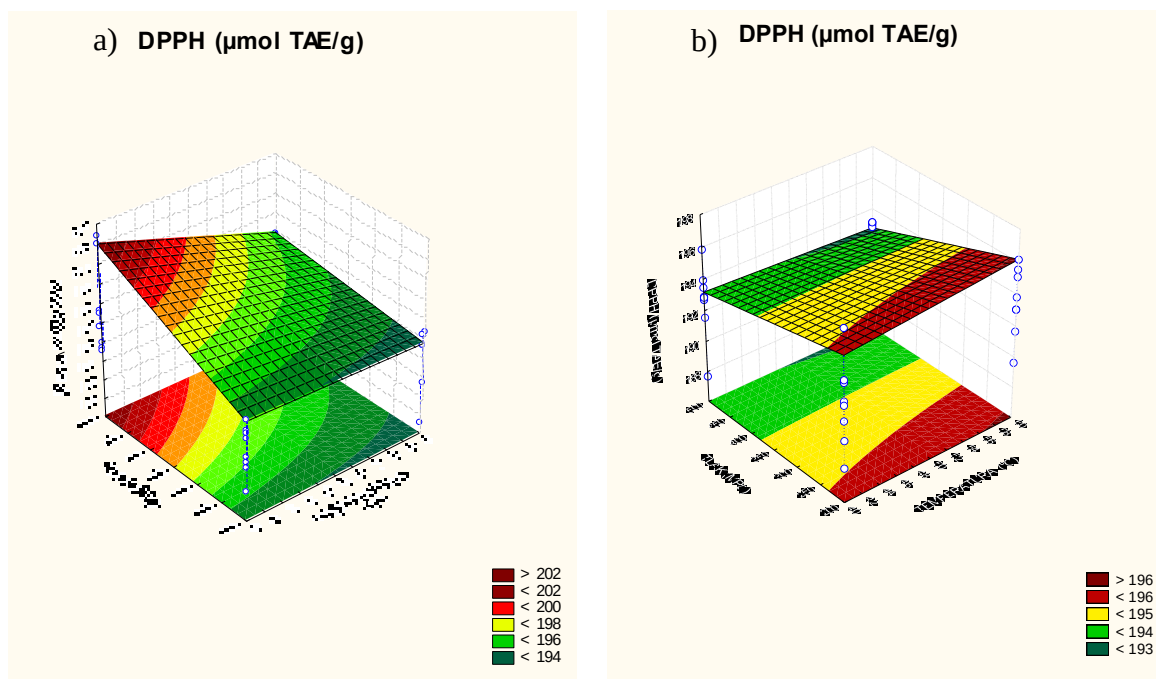
	OTAPALO	FAKTORI	DPPH	FRAP
ASE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70	70
		Broj ciklusa	3	3
		Temperatura (°C)	98	86
		Predviđena vrijednost	193,95 μmol TAE/g	145,15 mg AAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	50	70
		Broj ciklusa	2	1
		Temperatura (°C)	87	100
		Predviđena vrijednost	198,64 μmol TAE/g	112,17 mg AAE/g

Tablica 26. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodama u ekstraktima cvijeta trnine dobiveni pomoću HPAE, primjenom različitih otapala pri različitim temperaturama i vremenu ekstrakcije te različitom tlaku

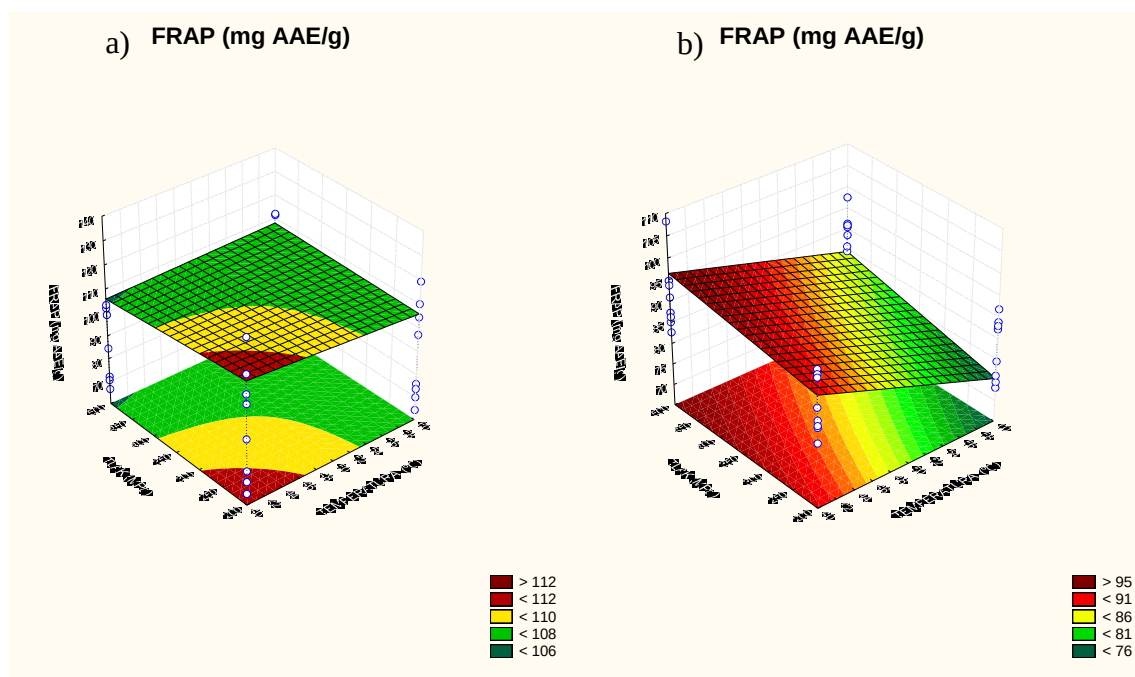
OTAPALO	TLAK [MPa]	VRIJEME [min]	T [°C]	DPPH [$\mu\text{mol TAE/g}$]	FRAP [mg AAE/g]
50 % VODENA OTOPINA ETANOLA	200	5	40	$193,85 \pm 0,66$	$108,73 \pm 8,59$
			60	$202,43 \pm 0,46$	$100,47 \pm 1,97$
		15	40	$191,28 \pm 2,63$	$118,11 \pm 16,18$
			60	$195,07 \pm 0,22$	$101,11 \pm 2,90$
	500	5	40	$193,96 \pm 1,00$	$114,72 \pm 6,62$
			60	$195,41 \pm 0,22$	$94,98 \pm 8,21$
		15	40	$194,59 \pm 0,22$	$100,71 \pm 5,28$
			60	$194,67 \pm 0,88$	$111,54 \pm 0,40$
70 % VODENA OTOPINA ETANOLA	200	5	40	$191,60 \pm 1,44$	$81,33 \pm 9,51$
			60	$192,79 \pm 1,21$	$69,28 \pm 3,90$
		15	40	$188,57 \pm 2,08$	$67,43 \pm 3,58$
			60	$191,21 \pm 0,11$	$77,47 \pm 9,81$
	500	5	40	$189,19 \pm 5,70$	$72,87 \pm 4,07$
			60	$191,36 \pm 0,33$	$76,94 \pm 0,30$
		15	40	$191,32 \pm 2,87$	$68,96 \pm 6,59$
			60	$192,09 \pm 0,77$	$79,36 \pm 6,00$
50 % VODENA OTOPINA METANOLA	200	5	40	$189,71 \pm 2,10$	$96,54 \pm 0,80$
			60	$193,09 \pm 0,55$	$91,05 \pm 5,29$
		15	40	$191,19 \pm 1,75$	$84,66 \pm 1,19$
			60	$189,61 \pm 2,74$	$83,84 \pm 1,69$
	500	5	40	$191,33 \pm 2,43$	$90,30 \pm 2,10$
			60	$192,57 \pm 0,55$	$89,33 \pm 1,39$
		15	40	$192,34 \pm 1,00$	$87,47 \pm 0,60$
			60	$191,53 \pm 0,44$	$87,77 \pm 4,77$
70 % VODENA OTOPINA METANOLA	200	5	40	$192,86 \pm 0,99$	$91,79 \pm 4,79$
			60	$194,38 \pm 2,09$	$97,27 \pm 15,55$
		15	40	$195,29 \pm 2,21$	$82,26 \pm 2,80$
			60	$193,39 \pm 0,78$	$92,28 \pm 2,01$
	500	5	40	$194,45 \pm 0,88$	$76,30 \pm 4,50$
			60	$192,96 \pm 0,22$	$82,07 \pm 4,98$
		15	40	$195,85 \pm 0,44$	$75,31 \pm 1,11$
			60	$192,79 \pm 0,44$	$94,08 \pm 4,70$

Tablica 27. Analiza varijance utjecaja polarnosti otapala (X_1), temperature (X_2), vremena (X_3) i tlaka (X_4) na antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

OTAPALO	IZVOR VARIJACIJE	DPPH		FRAP	
		F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
VODENA OTOPINA ETANOLA	X_1	36,665	0,000	119,030	0,000
	X_2	0,598	0,450	0,027	0,872
	X_3	4,639	0,046	0,052	0,822
	X_4	14,278	0,001	0,851	0,369
	$X_1 X_2$	0,482	0,497	0,149	0,704
	$X_1 X_3$	2,286	0,149	0,706	0,413
	$X_1 X_4$	1,692	0,211	3,930	0,064
	$X_2 X_3$	9,976	0,006	0,019	0,892
	$X_2 X_4$	4,594	0,047	1,949	0,181
	$X_3 X_4$	1,248	0,280	4,560	0,048
	$X_1 X_2 X_3$	0,183	0,674	0,246	0,626
	$X_1 X_2 X_4$	3,319	0,086	0,000	0,995
	$X_1 X_3 X_4$	1,288	0,272	0,079	0,783
	$X_2 X_3 X_4$	0,011	0,917	1,001	0,331
VODENA OTOPINA METANOLA	X_1	25,880	0,000	1,923	0,183
	X_2	1,134	0,302	6,871	0,018
	X_3	0,025	0,875	3,646	0,073
	X_4	0,443	0,515	5,470	0,032
	$X_1 X_2$	0,995	0,332	5,993	0,026
	$X_1 X_3$	1,353	0,261	1,993	0,176
	$X_1 X_4$	3,147	0,094	11,055	0,004
	$X_2 X_3$	0,191	0,668	8,096	0,011
	$X_2 X_4$	1,879	0,188	1,079	0,313
	$X_3 X_4$	8,766	0,009	2,754	0,115
	$X_1 X_2 X_3$	0,289	0,598	0,589	0,453
	$X_1 X_2 X_4$	0,478	0,499	0,058	0,812
	$X_1 X_3 X_4$	0,248	0,625	0,674	0,423
	$X_2 X_3 X_4$	1,386	0,255	0,128	0,724



Slika 43. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću HPAE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola uz vrijeme ekstrakcije 5 min i b) 70 % vodenih otopina metanola uz vrijeme ekstrakcije 15 min u ovisnosti o temperaturi i tlaku



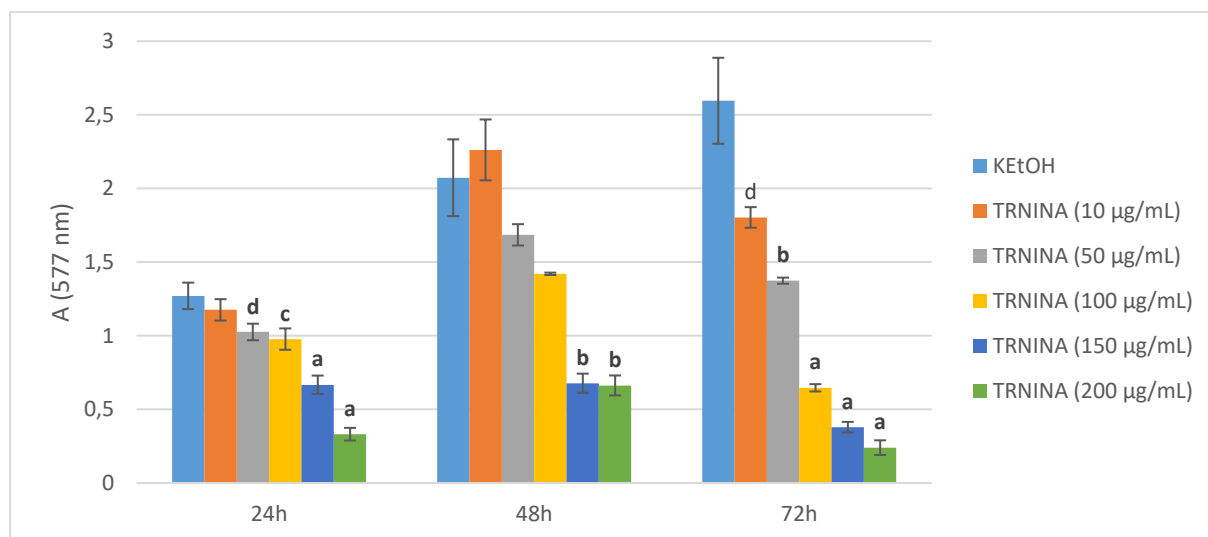
Slika 44. Trodimenzionalni prikaz odzivnih površina za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću HPAE uz primjenu a) 50 % vodenih otopina etanola uz vrijeme ekstrakcije 15 min i b) 70 % vodenih otopina metanola uz vrijeme ekstrakcije 5 min u ovisnosti o temperaturi i tlaku

Tablica 28. Optimalne vrijednosti polarnosti otapala (%), temperature (°C), vremena ekstrakcije (min) i tlaka (MPa) za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću HPAE s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama uz prikaz predviđenih DPPH i FRAP vrijednosti pri istim optimalnim uvjetima

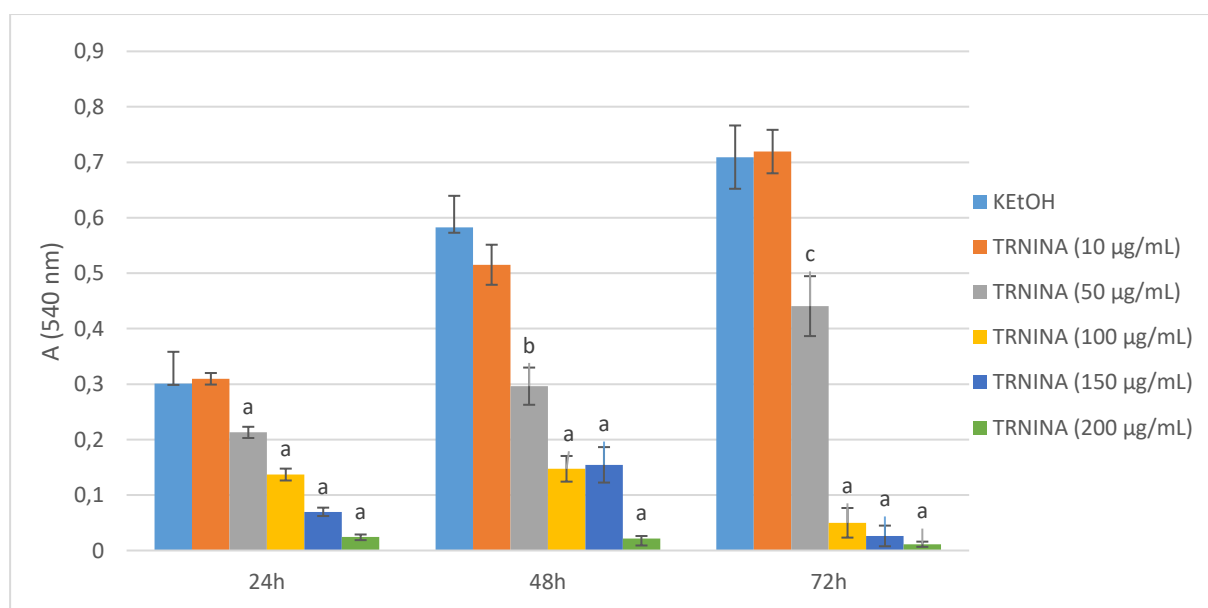
TEHNIKA	OTAPALO	FAKTORI	DPPH	FRAP
HPAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	50	50
		Temperatura (°C)	40	40
		Vrijeme (min)	5	15
		Tlak (MPa)	500	200
		Predviđena vrijednost	202,04 μ mol TAE/g	114,67 mg AAE/g
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70	70
		Temperatura (°C)	60	40
		Vrijeme (min)	15	5
		Tlak (MPa)	200	500
		Predviđena vrijednost	195,79 μ mol TAE/g	96,54 mg AAE/g

4.4. Rezultati određivanja antiproliferativnog/citotoksičnog učinka ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanične linije

Citotoksični učinci ekstrakta cvijeta trnine ispitani su na Hep G2 kulturi stanica tijekom 72 sata metodama *Kenacid Blue* (slika 45) te *Neutral Red* (slika 46) pri čemu se *Neutral Red* metoda pokazala osjetljivijom, a antiproliferativan učinak najizraženiji nakon 72h tretmana.

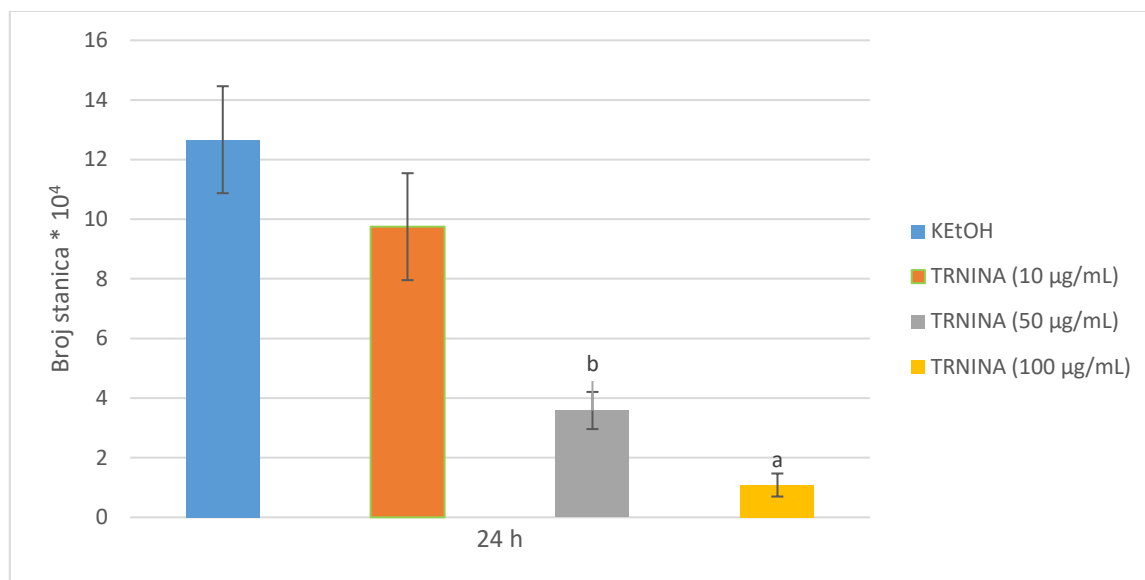


Slika 45. Proliferacija Hep G2 stanica tretiranih s ekstraktom cvijeta trnine (10-200 µg/mL) praćena nakon 24, 48 i 72 sata *Kenacid Blue* metodom. Podaci su određeni iz 3 do 10 uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,025$, ^d $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom (stanice tretirane s 5 µL etanola/mL medija za uzgoj).



Slika 46. Proliferacija Hep G2 stanica tretiranih s ekstraktom cvijeta trnine (10-200 µg/mL) praćena nakon 24, 48 i 72 sata *Neutral Red* metodom. Podaci su određeni iz 3 do 4 uzoraka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,025$ u usporedbi s kontrolom (stanice tretirane s 5 µL etanola/mL medija za uzgoj).

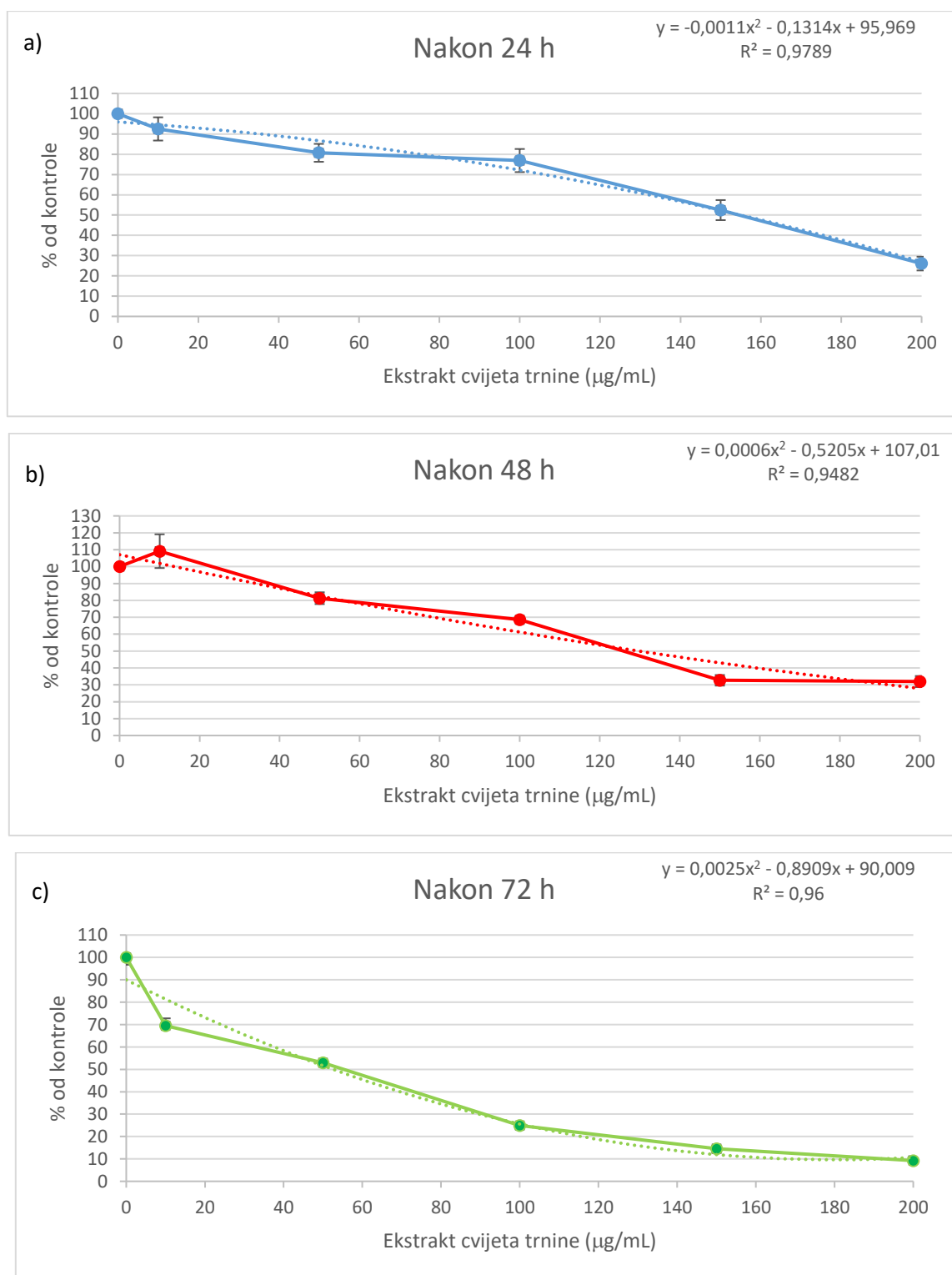
Citotoksični učinak ekstrakta cvijeta trnine dodatno je potvrđen i *Trypan Blue* metodom što je jasno vidljivo iz rezultata prikazanih na slici 47.



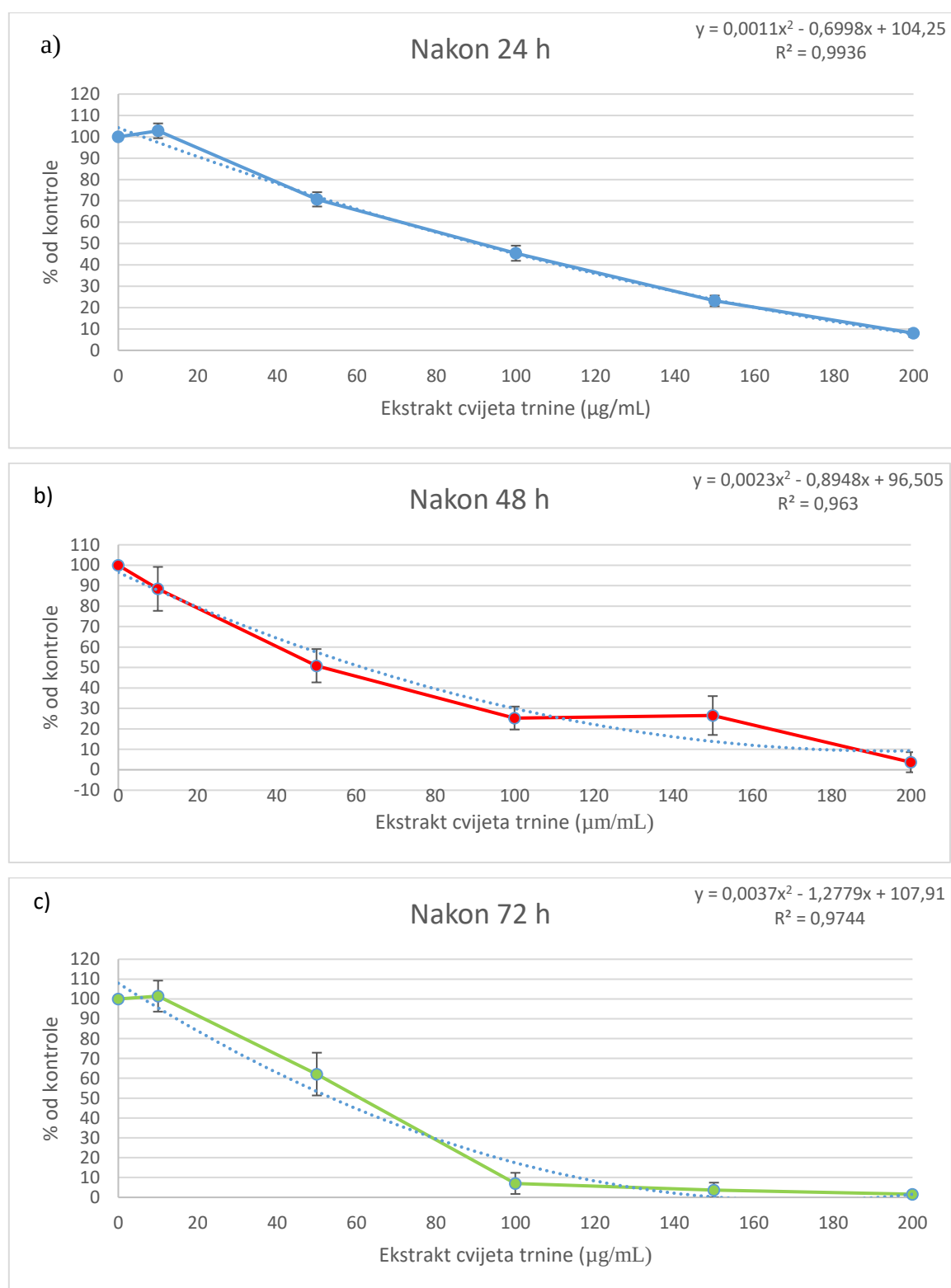
Slika 47. Proliferacija Hep G2 stanica tretiranih s ekstraktom cvijeta (10-100 µg/mL) praćena nakon 24 sata *Trypan Blue* metodom. Podaci su obrađeni iz 3 uzorka. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): ^a $p < 0,005$, ^b $p < 0,01$ u usporedbi s kontrolom (stanice tretirane s 5 µL etanola/mL medija za uzgoj).

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolni uzorak stanica praćena je *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metodom tijekom 72h (slike 48 i 49) te *Trypan Blue* metodom nakon 24h (slika 50). Iz jednadžbi interpoliranih krivulja (*trend line*) izračunate su IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji. Kod odabira interpolirane krivulje, težilo se da njoj pripadajući koeficijent determinacije R^2 bude što bliži 1. Vrijednost pripadajućih koeficijenta determinacije R^2 ukazuju na reprezentativnost regresijskog modela (približavanje R^2 vrijednosti 1).

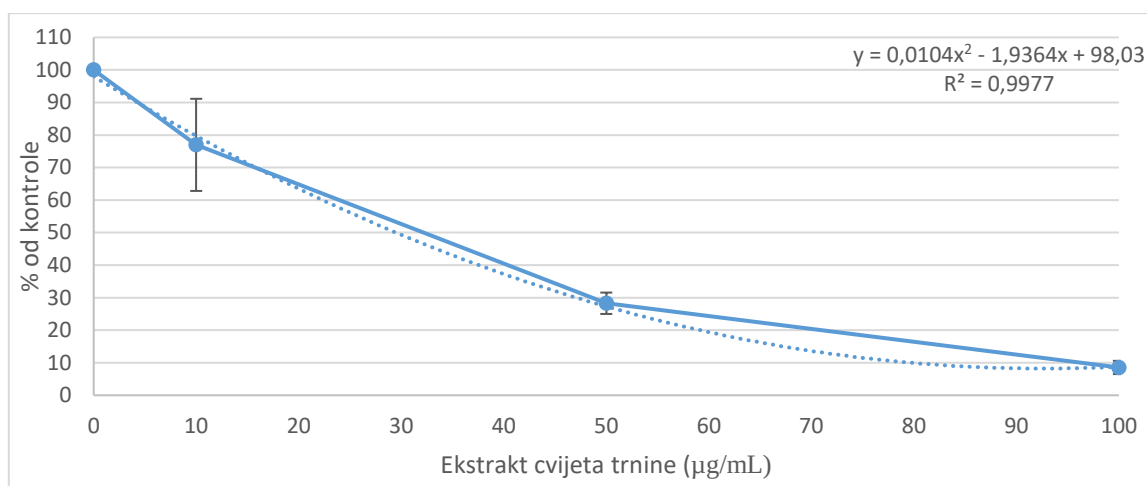
IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti predstavljaju one koncentracije ispitivane tvari koje inhibiraju stanični rast za 20 %, 50 % i 80 %. IC vrijednosti za ekstrakt cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji određene su različitim *in vitro* metodama nakon 24, 48 i 72 sata i prikazane su u *tablicama* 29 (*Kenacid Blue* metoda), 30 (*Neutral Red* metoda) i 31 (*Trypan Blue* metoda).



Slika 48. Vijabilnost Hep G2 stanica nakon 24 (a), 48 (b) i 72 (c) sata uz tretman s 10-200 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Kenacid Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardno odstupanje. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.



Slika 49. Vijabilnost Hep G2 stanica nakon 24 (a), 48 (b) i 72 (c) sata uz tretman s 10-200 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Neutral Red* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardno odstupanje. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.



Slika 50. Vijabilnost Hep G2 stanica nakon 24 sata uz tretman s 10-100 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolne vrijednosti (stanice tretirane etanolom) praćeno *Trypan Blue* metodom. Podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardno odstupanje. Jednadžba se odnosi na interpoliranu polinomnu krivulju s pripadajućom R^2 vrijednosti.

Tablica 29. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata

IC [µg/mL]	Vrijeme/h		
	24	48	72
IC ₂₀	74,75	55,43	11,61
IC ₅₀	153,25	128,59	52,70
IC ₈₀	209,77	x	116,99

Tablica 30. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Neutral Red* nakon 24, 48 i 72 sata

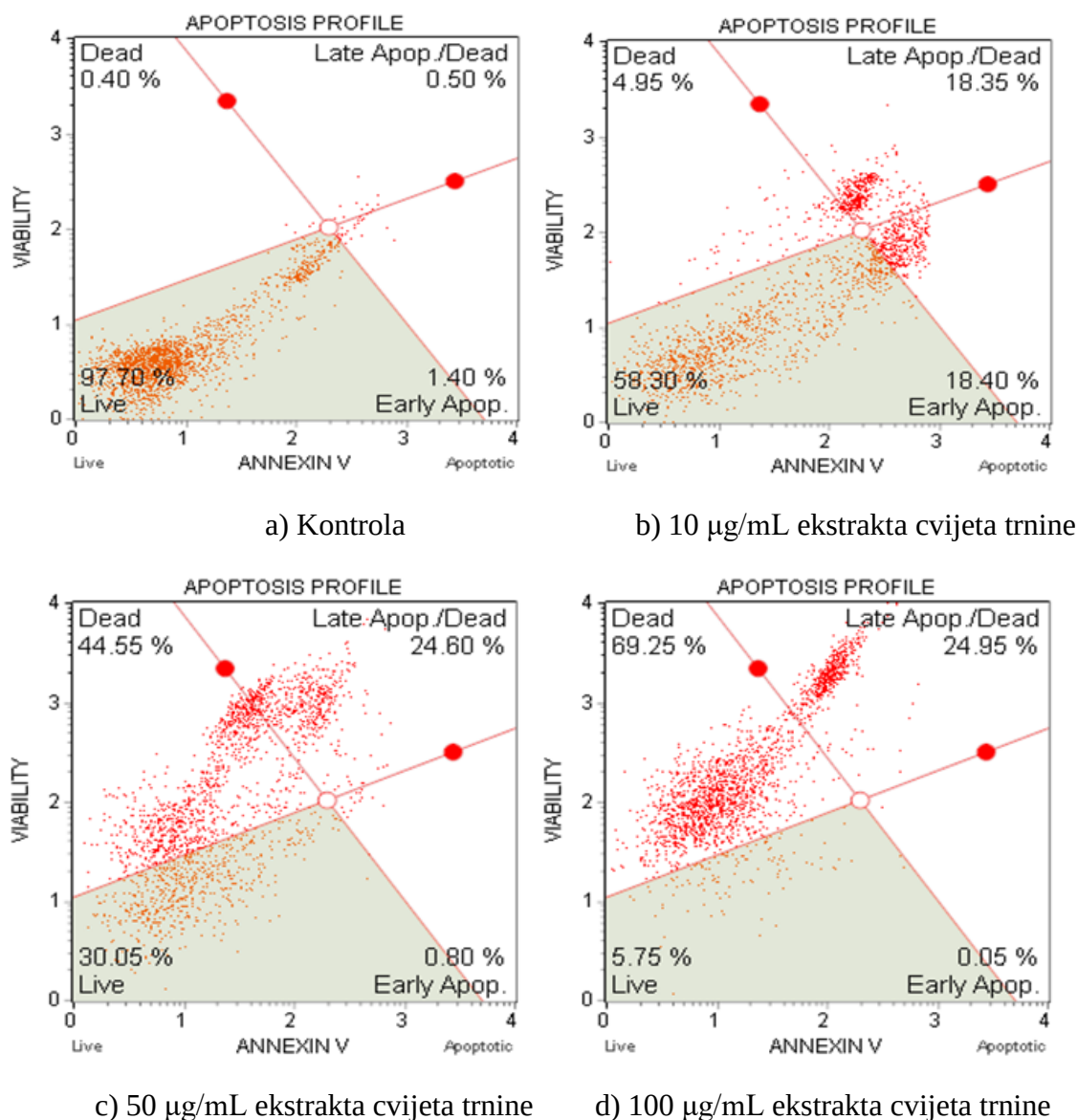
IC [µg/mL]	Vrijeme/h		
	24	48	72
IC ₂₀	36,78	19,41	23,43
IC ₅₀	90,35	61,78	53,65
IC ₈₀	161,28	126,88	94,83

Tablica 31. Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Trypan Blue* metodom nakon 24 sata

IC [µg/mL]	Vrijeme/h
	24
IC ₂₀	9,83
IC ₅₀	29,47
IC ₈₀	58,98

4.4.1. Rezultati određivanja vijabilnosti Hep G2 stanica metodom protočne citometrije nakon tretmana stanica ekstraktom cvijeta trnine

U ovom radu protočna citometrija je provedena *Muse Cell Analyzer*-om. Korišten je kit kat. br. MCH100105 (*Muse annexin V & dead cell assay kit*) koji omogućuje određivanje udjela vijabilnih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i nekrotičnih stanica u ukupnoj staničnoj populaciji. Rezultati dobiveni metodom protočne citometrije prikazani su na *slici 51* te u *tablici 32* - izraženi su u postocima.



Slika 51. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami dobiveni prilikom određivanja tipa stanične smrti primjenom *MuseTM Annexin V & Dead Cell* kit-a nakon 24-satnog tretmana Hep G2 stanica s ekstraktom cvijeta trnine (10-100 µg/mL)

Tablica 32. Postotak živih, ukupno apoptotičkih (rano i kasno apoptotičke) i mrtvih stanica nakon tretmana Hep G2 stanica ekstraktom cvijeta trnine (10-100 µg/mL) određen metodom protočne citometrije

%	Kontrola	Ekstrakt cvijeta trnine (10 µg/mL)	Ekstrakt cvijeta trnine (50 µg/mL)	Ekstrakt cvijeta trnine (100 µg/mL)
Žive stanice	97,70	58,30	30,05	5,75
Ukupne apoptotičke stanice	1,90	36,75	25,40	25,00
Mrtve stanice	0,40	4,95	44,55	69,25

5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja provedena na cvijetu trnine pokazala su da cvijet trnine sadrži strukturno različite skupine fenolnih spojeva, čiji prinosi tijekom ekstrakcije ovise o primijenjenim tehnikama, korištenim otapalima i uvjetima ekstrakcije (Olszewska i sur., 2001; Olszewska i Wolbiś 2002; Marchelak i sur., 2017; Dikic i sur., 2018; Elez Garofulic i sur., 2018; Marchelak i sur., 2019). Upravo zbog toga je važno optimirati proces ekstrakcije s ciljem dobivanja većih prinosa fenolnih spojeva i što veće stabilnosti. Jedna od hipoteza ovog istraživanja bila je optimirati uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine primjenom novih tehnika te je stoga jedan dio istraživanja bio fokusiran na optimiranje MAE, ASE i HPAE s ciljem dobivanja većih prinosa, utvrđivanja sastava i masenih udjela te antioksidacijskog kapaciteta fenolnih spojeva cvijeta trnine.

Za tehnike kojima su dobiveni veći prinosi fenolnih spojeva (MAE, ASE), u ekstraktima koji su dobiveni pri optimalnim uvjetima provedena je karakterizacija fenolnih spojeva HPLC analizom te je ispitan antiproliferativni učinak ekstrakata cvijeta trnine.

5.1. Usporedba tehnika ekstrakcije

Pri optimiranju procesa ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine za svaku od ispitivanih tehnika ispitivani su različiti utjecaji. Kod svih tehnika ispitivan je utjecaj polarosti otapala (50 i 70 % -tne vodene otopine etanola i metanola), a ostali utjecaji kako slijedi:

- (i) MAE - utjecaj temperature (40, 50 i 60 °C) i vremena ekstrakcije (5, 15 i 25 min) na tri razine prema punom faktorijskom dizajnu
- (ii) ASE - utjecaj temperature (60, 80 i 100 °C) i broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3) na tri razine prema punom faktorijskom dizajnu
- (iii) HPAE - utjecaj temperature (40 i 60 °C), vremena ekstrakcije (5 i 15 min) i tlaka (200 i 500 MPa) na dvije razine prema punom faktorijskom dizajnu.

Navedeni uvjeti ispitivanih ekstrakcijskih tehnika izabrani su na osnovu pregleda literature za druge biljne vrste pritom imajući u vidu smanjenje vremena ekstrakcije u odnosu na vrijeme ekstrakcije kod konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika. Temperatura ekstrakcije kod MAE, tako je, primjerice, izabrana obzirom da su se u sličnim temperaturnim rasponima provodila i druga istraživanja (Jokić i sur., 2012; Fang i sur., 2015; Li i sur., 2017). Kod ASE, temperatura ekstrakcije izabrana je također temeljem pregleda literature (Jentzer i sur., 2015;

Machado i sur., 2015; Díaz-de-Cerio i sur., 2018) ali i na osnovu standardnih ASE uvjeta, koje preporučava proizvođač ASE opreme. Obzirom da se, kako je već prethodno spomenuto, kao jedna od glavnih prednosti HPAE navodi provođenje ekstrakcije na umjerenim temperaturama te imajući u vidu i druga istraživanja (Prasad i sur., 2009a; Jun, 2013) za provođenje HPAE odabrane su temperature ekstrakcije kako je navedeno.

5.1.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE prema eksperimentalnom dizajnu (*slika 18, poglavlje 3.2.1.*) spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a rezultati su prikazani u *tablici 5*.

Ukupni fenoli. Viši maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom MAE određeni su uz upotrebu vodenih otopina etanola: 46,05-63,72 mg GAE/g, dok su uz upotrebu vodenih otopina metanola maseni udjeli ukupnih fenola bili nešto niži: 45,19 do 58,42 mg GAE/g (*tablica 5*). Dio istraživanja provedenih na drugim biljnim vrstama također navodi da su binarni sustavi otapala često učinkovitiji u ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog matriksa uz MAE. Stoga su u našem istraživanju vodene otopine etanola i metanola izabrane kao otapala, s ciljem postizanja maksimalnih ekstrakcijskih prinosa uz optimiranje i drugih parametara ekstrakcije.

U istraživanju koje su proveli Hofmann i sur. (2015) ispitivan je utjecaj različitih otapala (voda, 80 %-tna vodena otopina etanola i 80 %-tna vodena otopina metanola) na masene udjele ukupnih fenola iz ekstrakta kore bukve (*Fagus sylvatica* L.). U navedenom istraživanju zaključeno je da je korištena vodena otopina etanola efikasnija za ekstrakciju fenolnih spojeva od vodene otopine metanola. Za binarne sustave otapala kao što su vodene otopine etanola i metanola, se smatra da povećavaju efikasnost ekstrakcije fenolnih spojeva u odnosu na čista organska otapala, obzirom da u binarnim otopinama jedno otapalo može poboljšati topljivost analita, dok drugo može utjecati na poboljšanje desorpcije analita, a voda u takvim otopinama obično pomaže razbijanju veze matriksa i matriksa-analita (Mustafa i Turner 2011; DiNardo i sur., 2019). Zbog navedenih mehanizama djelovanja i u drugim istraživanjima također je pokazano da binarni sustavi otapala povećaju ekstrakcijski kapacitet, kako primjenom MAE tako i primjenom drugih ekstrakcijskih tehnika.

Sultana i sur. (2009) su pokazali da su ekstrakcijski prinosi fenola i antioksidacijski kapacitet u ekstraktima kore različitih biljnih vrsta (*Azadirachta indica*, *Acacia nilotica*,

Eugenia jambolana, *Terminalia arjuna*), listovima i korijenu biljne vrste *Moringa oleifera*, plodovima *Ficus religiosa* i lišću *Aloe barbadensis*, dobivenima primjenom vodenih otopina etanola viši u odnosu na ekstrakte dobivene primjenom čistih organskih otapala (metanola i etanola).

Tijekom MAE, otapala koja posjeduju veću dielektričnu konstantu obično imaju visoku sposobnost apsorbiranja mikrovalne energije, što uzrokuje brže zagrijavanje otapala i čvrstog biljnog matriksa rezultirajući učinkovitim i homogenim zagrijavanjem (Muhamad i sur., 2017c; Wong-Paz i sur., 2017). U istraživanju koje su proveli Singh i sur. (2014) ispitan je utjecaj otopina metanola različite polarnosti na ekstrakcijski kapacitet i prinos fenola iz kore krumpira tijekom MAE. Utvrđeno je da se najveći prinos fenola postiže s 65 %-tnom vodenom otopinom metanola. U istom istraživanju istaknuto je da je temperatura ekstrakta uz primjenu 65 %-tne vodene otopine metanola bilo oko 70 °C, dok je uz primjenu 30 %-tne vodene otopine metanola u istom vremenu ekstrakcije temperatura bila čak 15 °C viša što je rezultiralo manjim prinosom fenola, najvjerojatnije zbog degradacije termolabilnih fenolnih spojeva. Smanjenje udjela fenolnih spojeva uslijed povećanja udjela vode u otapalu, tijekom MAE, može se pripisati većoj dielektričnoj konstanti vode (80,4) u odnosu na metanol (32,6) ili etanol (24,3), ali i najnižem faktoru rasipanja među otapalima. Takve vrijednosti navedenih konstanti vode uzrokuju da voda apsorbira energiju mikrovalova brže nego što je prevodi u toplinu, što za posljedicu može imati pregrijavanje uzorka i razgradnju termolabilnih spojeva (Leonelli i sur., 2013; Al Jitan i sur., 2018), pa viši udio vode u otapalu može utjecati na smanjenje udjela fenolnih spojeva. Dielektrična konstanta metanola (32,6) viša je od dielektrične konstante etanola (24,3), pa je moguće, da je razlog nižeg ekstrakcijskog prinosa ostvarenog uz primjenu vodenih otopina metanola u odnosu na vodene otopine etanola također pregrijavanje uzorka, međutim razlike u vrijednostima navedenih konstanti nisu velike pa je vjerojatno, da su osim dielektričnih svojstava otapala i druga svojstva otapala i uzorka, kao što su hidrofilnost i kiselinsko-bazna svojstva, interakcija između uzorka i otapala, topljivost uzorka u otapalu utjecala na ekstrakcijske prinose tijekom MAE (Lovrić i sur., 2017).

Iz rezultati analize varijance i *p* vrijednosti navedenih u *tablici 6* vidljiv je statistički značajan utjecaj temperature na masene udjele ukupnih fenola u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu vodene otopine etanola. U istim ekstraktima također je utvrđeno, da je statistički značajan utjecaj na masene udjele ukupnih fenola imala i polarnost etanola u kombinaciji sa vremenom ekstrakcije. U ekstraktima koji su dobiveni uz upotrebu vodene otopine metanola, ni jedan od pojedinačnih faktora ekstrakcije kao ni kombinacija primijenjenih faktora nisu imali

statistički značajan utjecaj na masene udjele ukupnih fenola.

Veći maseni udjeli svih skupina fenolnih spojeva kod MAE postignuti su uz upotrebu 70 %-tnih vodenih otopina etanola i metanola, zbog čega su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za sve skupine fenolnih spojeva prikazani samo za ekstrakte cvijeta trnine dobivene uz vodene otopine etanola/metanola uz udjel etanola/metanola 70 %.

Povećanje udjela etanola/metanola sa 50 % na 70 % pridonijelo je povećanju ekstrakcijskog prinosa ukupnih fenola (*slike 25a i 25b*), vjerojatno zato što je viši udio vode u otapalu povećao polarnost otopine do razine koja nije učinkovita u ekstrakciji širokog spektra fenolnih spojeva različite polarnosti (Lovrić i sur., 2017).

Međutim, osim navedenih karakteristika otapala i zagrijavanja pod djelovanjem mikrovalova, može se zaključiti da su utjecaj imala i druga svojstva otapala i uzorka obzirom da su i uz upotrebu drugih tehnika ekstrakcije u našem istraživanju, ali i drugim istraživanjima 70 % vodene otopine pokazale prikladnijima za ekstrakciju fenolnih spojeva u odnosu na 50 % vodene otopine. U istraživanju koje su proveli Elez Garofulic i sur. (2018) veći prinosi fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću UAE ostvareni su uz primjenu 70 %-tne vodene otopine etanola, dok su u ekstraktima s nižim udjelom etanola (50 %) prinosi bili niži.

Na *slici 25 a* je vidljivo da u ekstraktima dobivenima uz vodene otopine etanola, s porastom vremena ekstrakcije dolazi do porasta masenih udjela ukupnih fenola. Pri kraćem vremenu ekstrakcije, također je zabilježen pozitivan utjecaj temperature na masene udjele ukupnih fenola. Međutim, s produženjem vremena ekstrakcije, porast masenog udjela ukupnih fenola je određen samo do nižih vrijednosti primijenjenih temperatura, dok se daljnjim povećanjem maseni udjel ukupnih fenola snižava. Iz oblika krivulje može se zaključiti da su maksimalni maseni udjeli ukupnih fenola određeni uz najduže vrijeme ekstrakcije (25 min) i temperaturu ekstrakcije od oko 55 °C. Tijekom MAE, povećanje temperature utječe na povećanje prinosa fenolnih spojeva uslijed povećanja intermolekularnih interakcija između otapala i uzorka te stvaranja staničnog tlaka koji vodi do pucanja stanica. Uslijed povišene temperature viskoznost otapala se smanjuje, povećavajući na taj način pokretljivost i topljivost ciljanih spojeva. Međutim, visoke temperature mogu rezultirati smanjenjem masenih udjela fenolnih spojeva (DiNardo i sur., 2019) budući da je većina fenolnih spojeva pri višim temperaturama termolabilna (Aires, 2017; Ameer i sur., 2017). U istraživanju koje su proveli Fang i sur., (2015) također je ispitan utjecaj temperature ekstrakcije (50, 60, 70 i 80 °C) na prinose fenolnih spojeva iz *Eclipta prostrata* primjenom MAE, te je zabilježeno da se

povećanjem temperature s 50 °C na 70 °C povećavaju i prinosi fenolnih spojeva.

Uz upotrebu vodene otopine metanola (*slika 25b*), pri kraćem vremenu ekstrakcije nije utvrđeno povećanje masenih udjela ukupnih fenola uslijed povišenja temperature, dok je duže vrijeme ekstrakcije uz povećanje temperature do 52 °C utjecalo na povećanje prinosa fenolnih spojeva. Daljnje povećanje temperature rezultira smanjenjem prinosa ukupnih fenola. Vrijeme ekstrakcije je pozitivno utjecalo na maseni udjel ukupnih fenola, tako da su maksimalni maseni udjeli ukupnih fenola postignuti uz vrijeme ekstrakcije od oko 18 min i temperaturu ekstrakcije oko 52 °C.

U istraživanju koje su proveli Dragović-Uzelac i sur. (2012) ispitan je utjecaj otapala primijenjenog za ekstrakciju (voda, 30 %-tna vodena otopina etanola, 30 %-tna vodena otopina acetona), vremena ekstrakcije (3, 5, 7, 9 i 11 min) te snage mikrovalova (500, 600 i 700 W) na sastav i masene udjele fenolnih spojeva sušene divlje kadulje primjenom MAE uz konstantnu temperaturu ekstrakcije (80 °C). Slični ekstrakcijski prinosi tijekom MAE postignuti su primjenom vodene otopine etanola i vode otopine acetona, dok se voda pokazala kao lošije otapalo. Na osnovi masenih udjela fenolnih spojeva kao optimalni uvjeti ekstrakcije izabrani su snaga mikrovalova 500 W uz vrijeme ekstrakcije 9 min. Pri navedenim optimalnim MAE uvjetima osigurani su veći prinosi ukupnih fenola u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom u trajanju 30 min pri temperaturi 80 °C.

Ukupni flavonoidi

Viši maseni udjeli ukupnih flavonoida određeni su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola: 12,60-15,61 mg QE/g, dok su uz upotrebu vodenih otopina metanola određeni niži maseni udjeli ukupnih flavonoida i to u rasponu od 11,77 do 14,76 mg QE/g (*tablica 5*).

Kod ekstrakata dobivenih uz upotrebu vodenih otopina etanola, na prinose ukupnih flavonoida zabilježen je statistički značajan utjecaj polarosti etanola ($p = 0,013$) i vremena ekstrakcije ($p = 0,034$), dok temperatura ekstrakcije kao ni jedna od kombinacija faktora ekstrakcije nisu imale statistički značajan utjecaj (*tablica 6*). U istraživanju koje su objavili Alara i sur. (2020) ispitan je utjecaj pojedinačnih faktora MAE na prinose ukupnih flavonoida u lišću biljne vrste *Vernonia amygdalina*, a kao otapalo za ekstrakciju korištena je vodena otopina etanola. Spomenuto istraživanje potkrepljuje rezultate našeg istraživanja u kojem je polarnost otapala imala statistički visoko značajan utjecaj na prinose ukupnih flavonoida

Uslijed povećanja udjela etanola sa 40 % na 80 % i smanjenja polarnosti otapala zabilježeno je povećanje masenog udjela ukupnih flavonoida sa 78,21 na 91,12 mg QE/g s.tv. (Alara i sur., (2020)). Međutim, u navedenom istraživanju sličan efekt zabilježen je i sa povećanjem vrijednosti snage mikrovalova, vremena ekstrakcije, omjera otapala i krute tvari, dok temperatura ekstrakcije, kao ni u našem istraživanju nije imala utjecaj na maseni udjel ukupnih flavonoida. Uz upotrebu vodene otopine metanola, isto kao i u slučaju ukupnih fenola, ni jedan od pojedinačnih faktora ekstrakcije kao ni kombinacija faktora ekstrakcije nisu imali statistički značajan utjecaj na maseni udjel ukupnih flavonoida (*tablica 6*).

Na trodimenzionalnom prikazu ovisnosti ukupnih flavonoida o temperaturi i vremenu ekstrakcije uočava se nepravilan oblik odzivne površine u ekstraktima dobivenim uz primjenu 70 %-tne vodene otopine etanola (*slika 26a*). Maksimalni ekstrakcijski prinosi postignuti su uz slične vrijednosti temperature i vremena kao za ukupne fenole (oko 52 °C, 25 min). Na osnovu navedenog, može se zaključiti da je duže vrijeme izlaganja energiji mikrovalova pri proizvodnji ekstrakata uz primjenu vodene otopine etanola, utjecalo na povećanje masenih udjela ukupnih flavonoida. S druge strane uz, upotrebu vodene otopine metanola maksimalni maseni udjeli ukupnih flavonoida postignuti su uz primjenu maksimalne temperature ekstrakcije (60 °C) ali uz znatno niže vrijeme ekstrakcije (oko 11 min) (*slika 26b*). Do ovakvih trendova vjerojatno je došlo zbog toga što prekomjerna izloženost energiji mikrovala može uzrokovati gubitak flavonoida u uvjetima kada se razviju više temperature koje utječu na degradaciju flavonoida. Dio istraživanja potvrđuje da povećanje temperature ima pozitivan utjecaj do određene granice, te je u uskoj vezi i s ostalim uvjetima ekstrakcije (npr. vremenom, otapalom i sl.), dok daljnje povećanje temperature nakon granične vrijednosti ne utječe na povećanje prinosa, a često dolazi i do degradacije i gubitka bioaktivnih spojeva (Pan i sur., 2010). Tako su Jokić i sur. (2012) ispitujući utjecaj temperature ekstrakcije (50-90 °C), snage mikrovalova (100-200 W), koncentracije metanola (50-90 %-tna vodena otopina metanola) i vremena ekstrakcije (1-27 min) tijekom MAE ekstrakcije na ukupne flavonoide iz brokule, utvrdili da do povećanja vrijednosti ukupnih flavonoida dolazi uslijed povišenja temperature do oko 70 °C, nakon čega daljnje povećanje temperature uzrokuje smanjenje udjela ukupnih flavonoida.

Ukupne hidroksicimetne kiseline

Unatoč tome što su hidroksicimetne kiseline strukturno različite od flavonoida najveći prinosi ove skupine fenolnih spojeva određeni su također u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim

uz vodene otopine etanola (21,01-25,82 mg CAE/g). Uz primjenu vodene otopine metanola dobiveni su ekstrakti s neznatno nižim masenim udjelima ukupnih hidroksicimetnih kiselina: 19,90-25,77 mg CAE/g (*tablica 5*).

Rezultati analize varijance (*tablica 6*), pokazali su da na prinose hidroksicimetnih kiselina statistički značajan utjecaj ima polarnost otapala kod svih vrsta ekstrakata, metanolnih i etanolnih. Na prinose hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima dobivenim vodenom otopinom etanola statistički značajan utjecaj imala je temperatura ekstrakcije ($p=0,039$), dok je u metanolnim ekstraktima temperatura ekstrakcije imala granično statistički značajan utjecaj ($p=0,050$). Vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj na prinose ukupnih hidroksicimetnih kiselina, kao ni jedna od kombinacija faktora ekstrakcije.

Na trodimenzionalnom prikazu ovisnosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina o temperaturi i vremenu ekstrakcije (*slika 27a*) vidljivo je da su u ekstraktima dobivenim uz vodene otopine etanola maksimalni ekstrakcijski prinosi ostvareni uz primjenu najviše vrijednosti temperature (60 °C). Međutim, krivulja temperature je nepravilnog oblika pa je početno povećanje temperature (sa 40 na 50 °C) imalo negativan utjecaj na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a s daljnjim porastom temperature zabilježen je pozitivan utjecaj. U ekstraktima dobivenima uz vodene otopine metanola zabilježen je pozitivan utjecaj temperature pri kraćem vremenu ekstrakcije. Maksimalni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvareni na temperaturi od oko 60 °C i uz vrijeme ekstrakcije 5 min (*slika 27b*). Međutim, sličan efekt postignut je i uz primjenu nešto nižih temperatura ekstrakcije (oko 50 °C) uz produženo vrijeme ekstrakcije (25 min). Iz navedenih rezultata može se također zaključiti da pri višim temperaturama ekstrakcije produžavanje vremena ekstrakcije utječe na gubitak dijela hidroksicimetnih kiselina.

U *tablici 7* prikazane su jednadžbe regresijskog modela uz pripadajuće koeficijente determinacije (R^2) za MAE za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva. U praksi, visoke R^2 vrijednosti (> 70 %) su pokazatelji dobre prikladnosti regresijskih modela za opisivanje utjecaja neovisnih varijabli (polarnost otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije kod MAE) na ovisne varijable odnosno masene udjele fenolnih spojeva (Bassani i sur., 2014). Na osnovu izračunatih R^2 vrijednosti može se zaključiti da se prikladnost modela za predviđanje parametara MAE razlikovala značajno ovisno o određivanoj fenolnoj skupini ali i o korištenom otapalu. R^2 vrijednosti u ekstraktima dobivenim s vodenom otopinom metanola iznosile su 0,37 (za ukupne flavonoide) do 0,88 (za ukupne hidroksicimetne kiseline). U ekstraktima dobivenim s vodenom otopinom etanola R^2 vrijednosti iznosile su od 0,50 (ukupne hidroksicimetne

kiseline) do 0,60 (ukupni fenoli).

Nakon što je utvrđeno na koji način utječu parametri MAE na masene udjele određivanih fenolnih skupina, za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva utvrđeni su optimalni uvjeti: polarnost otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije te predviđeni maseni udjeli fenolnih spojeva pri optimalnim uvjetima (*tablica 8*). Na osnovi rezultata optimizacije (*tablica 8*) i prethodno navedenog u raspravi vidljivo je da je kod MAE, neovisno o vrsti primijenjenog otapala (vodena otopina etanola/vodena otopina metanola) za sve određivane fenolne skupine optimalni udio etanola/metanola u vodenoj otopini bio 70 %, dok su se optimalna temperatura i optimalno vrijeme ekstrakcije razlikovali ovisno o vrsti otapala i određivanoj skupini fenolnih spojeva. Uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalna temperatura ekstrakcije varirala je od 53 °C za ukupne flavonoide do 60 °C za ukupne hidroksicimetne kiseline. Optimalno vrijeme ekstrakcije uz upotrebu vodenih otopina etanola je bilo isto za ukupne fenole i ukupne flavonoide (25 min), dok se za ukupne hidroksicimetne kiseline razlikovalo (19 min). Uz primjenu vodenih otopina metanola optimalna temperature ekstrakcije je ista za ukupne flavonoide i ukupne hidroksicimetne kiseline (60 °C), dok je za ukupne fenole optimalna temperatura bila 52 °C. Uz primjenu vodenih otopina metanola optimalno vrijeme ekstrakcije se značajno razlikovalo ovisno o određivanoj skupini fenolnih spojeva. Tako se vrijeme od 5 min pokazalo optimalnim za izolaciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina, dok se za izolaciju ukupnih flavonoida vrijeme ekstrakcije od 11 minuta, odnosno vrijeme ekstrakcije 18 minuta za izolaciju ukupnih fenola pokazalo optimalnim. Uz upotrebu vodenih otopina etanola predviđeni maseni udjeli ukupnih fenola (64,72 mg GAE/g) i ukupnih flavonoida (15,87 mg QE/g) pri optimalnih uvjetima MAE ekstrakcije (koji su određeni za svaku skupinu pojedinačno), viši su u odnosu na predviđene masene udjele dobivene uz primjenu vodene otopine metanola kao otapala. Naime, uz primjenu vodene otopine metanola predviđene vrijednosti ukupnih fenola i ukupnih flavonoida iznose 59,04 mg GAE/g i 14,70 mg QE/g. Jedino su u slučaju hidroksicimetnih kiselina predviđeni maseni udjeli nešto viši uz upotrebu vodenih otopina metanola (22,72 mg CAE/g) u odnosu na predviđene masene udjele uz primjenu vodenih otopina etanola (22,28 mg CAE/g).

Nakon što su određeni optimalni uvjeti za svaku od određivanih fenolnih skupina pojedinačno, metodom odzivnih površina je provedena optimizacija MAE na način da su istovremeno promatrane sve tri skupine fenolnih spojeva te su određeni uvjeti MAE pri kojima se preklapaju poželjne vrijednosti odnosno visoki maseni udjeli određivanih svih određivanih fenolnih skupina. Prema rezultatima optimizacije, optimalni uvjeti za proizvodnju ekstrakata

cvijeta trnine primjenom MAE prikazani su u *tablici 9*. Kod MAE optimalni uvjeti ekstrakcije su udio alkohola 70 %, u slučaju etanolnih i metanolnih vodenih otopina. Uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalna temperatura ekstrakcije je 60 °C uz vrijeme ekstrakcije 25 minuta. Uz potrebu vodenih otopina metanola maksimalne vrijednosti fenolnih spojeva postižu se pak pri nižoj vrijednosti temperature (54 °C) uz kraće vrijeme ekstrakcije (16 min).

Zbog visokih dielektričnih svojstava, brzina zagrijavanja etanola i metanola je visoka, a dodatak vode etanolu i metanolu dodatno povećava brzinu zagrijavanja, pa produženo vrijeme izlaganja može dovesti do degradacije fenolnih spojeva uslijed pregrijavanja ciljane sastavnice i otapala (Routray i Orsat 2012; DiNardo i sur., 2019). Obzirom da su vrijednosti dielektrične konstante i dielektrične konstante gubitka više kod metanola nego kod etanola, može se pretpostaviti da je uz primjenu vodenih otopina metanola došlo do veće brzine zagrijavanja. Posljedično su optimalne vrijednosti temperature i vremena ekstrakcije za postizanje viših prinosa odnosno maksimalnih udjela fenolnih spojeva niže kod vodenih otopina metanola jer je vjerojatno uslijed dužeg izlaganja pri povišenim temperaturama došlo do degradacije fenolnih spojeva.

Metoda odzivnih površina primjenjiva je također i u drugim istraživanjima za optimizaciju procesa MAE. Primjerice, Radojković i sur. (2018) proveli su optimizaciju procesa MAE fenolnih spojeva iz lišća dudu ispitujući pritom utjecaj vremena i temperature ekstrakcije te mase uzorka na masene udjele ukupnih fenola. U navedenom istraživanju, optimalni uvjeti ekstrakcije bili su volumen otapala 20 mL (50 % vodena otopina etanola), temperatura ekstrakcije 120 °C, vrijeme ekstrakcije 28 min, masa uzorka 0,414 g uz srednje vrijeme miješanja. Pri navedenim optimalnim uvjetima, određen je maseni udjel ukupnih fenola: 19,7 mg GAE/ g s.tv. Alara i sur. (2018) su primijenili također metodu odzivnih površina za optimizaciju ekstrakcije fenolnih spojeva pomoću MAE iz lišća biljne vrste *Vernonia amygdalina*. U istraživanju je ispitan utjecaj vremena ekstrakcije (5-15 min), snage mikrovalova (400-600 W), temperature ekstrakcije (90-110 °C) te omjera uzorka i otapala (0,08-0,13 g/mL). Kao optimalni uvjeti ekstrakcije, pri kojima je ostvaren maksimalan maseni udio ukupnih flavonoida (87,05 mg QE/g s.tv) i najveće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (DPPH = 94,05 % i ABTS = 95,93 %) navedeni su vrijeme ekstrakcije 7 min, snaga mikrovalova 416 W, temperatura ekstrakcije 100 °C te omjer uzorka i otapala: 0,10 g/mL. Iz navedenog je vidljivo da se optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva, osim prema određivanoj skupini fenolnih spojeva, razlikuju i ovisno o ispitivanoj biljnoj vrsti što dodatno naglašava važnost optimizacije procesa ekstrakcije za svaku pojedinu biljnu vrstu.

Pri uvjetima MAE koji su određeni kao optimalni (*tablica 9*) provedena je MAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, te su u dobivenim ekstraktima određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Na *slici 28* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno dobiveni maseni udjeli određivanih skupina fenolnih spojeva. U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pomoću MAE, pri optimalnim uvjetima ekstrakcije navedenim u *tablici 9* maseni udjeli fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim s vodenom otopinom etanola iznose redom: ukupni fenoli: 69,80 mg GAE/g, ukupni flavonoidi: 14,59 mg QE/g, ukupne hidroksicimetne kiseline: 22,92 mg CAE/g. U ekstraktima dobivenim s vodenom otopinom metanola određene su sljedeće vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina redom kako je navedeno: 63,42 mg GAE/g, 13,30 mg QE/g i 23,09 mg CAE/g.

Usporedba predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva kod MAE (*slika 28*) ukazuju na visoku točnost modela za predviđanje utjecaja uvjeta MAE. U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE točnost za ukupne hidroksicimetne kiseline je vrlo visoka: eksperimentalno dobiveni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina viši su za 4,24 % u odnosu na predviđene vrijednosti u slučaju kad se ekstrakcija provodi uz upotrebu vodene otopine etanola odnosno 4,58 % uz upotrebu vodene otopine metanola. Točnost za ukupne flavonoide je također visoka ali su eksperimentalno dobivene vrijednosti ukupnih flavonoida niže su od vrijednosti ukupnih flavonoida postavljenih modelom. Eksperimentalno dobiveni maseni udjeli ukupnih flavonoida predstavljaju 94,17 % od predviđenih vrijednosti u slučaju kad se ekstrakcija provodi uz upotrebu vodenih otopina etanola, odnosno 97, 17 % uz upotrebu vodene otopine metanola. Točnost modela za ukupne fenole je nešto niža u odnosu na ostale skupine fenolnih spojeva i eksperimentalno određeni maseni udjeli ukupnih fenola su viši za 9,52 % u usporedbi s predviđenim vrijednostima uz upotrebu vodenu otopinu etanola, odnosno 8,23 % uz upotrebu vodene otopine metanola.

5.1.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim pomoću ASE prema eksperimentalnom dizajnu (*slika 20, poglavlje 3.2.2.*) spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a rezultati su prikazani u *tablici 10*.

Ukupni fenoli

Primjenom vodene otopine etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE maseni udjeli ukupnih fenola iznosili su: 23,57-70,02 mg GAE/g, dok su uz upotrebu vodenih otopina metanola određene niže vrijednosti: 21,44-58,38 mg GAE/g (*tablica 10*).

Iz rezultata analize varijance (*tablica 11*) vidljiv je statistički značajan utjecaj broja ciklusa i temperatura ekstrakcije na masene udjele ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE uz upotrebu vodene otopina etanola. U istim ekstraktima je zabilježen i statistički značajan utjecaj polarnosti etanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije. U ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine metanola na masene udjele ukupnih fenola statistički značajan utjecaj imali su svi pojedinačni faktori (polarnost metanola, broj ciklusa i temperatura), kao i kombinacije svih utjecaja (polarnost metanola u kombinaciji s brojem ciklusa, polarnost metanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije te broj ciklusa u kombinaciji s vremenom ekstrakcije).

Veći maseni udjeli ukupnih fenola kod ASE postignuti su uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine u slučaju primjene vodenih otopina etanola, odnosno uz primjenu 70 %-tne vodene otopina u slučaju primjene vodenih otopina metanola. Veći maseni udjeli ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina kod ASE postignuti su uz upotrebu 70 %-tnih vodenih otopina etanola i metanola, zbog čega su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za sve skupine fenolnih spojeva (osim za ukupne fenole u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine etanola) prikazani samo za ekstrakte cvijeta trnine dobivene uz 70 %-tne vodene otopine etanola/metanola.

Iz trodimenzionalnih prikaza odzivne površine ukupnih fenola o broju ciklusa i temperaturi ekstrakcije vidljivo je da su najviši maseni udjeli ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE određeni pri višoj temperaturi ekstrakcije (100 °C), najvećem broju ciklusa (3) uz primjenu vodenih otopina etanola (*slika 29a*) i vodenih otopina metanola kao otapala (*slika 29b*).

Prema podacima iz literature odabir otapala, temperature i vremena ekstrakcije pokazali su se kao parametri koji značajno utječu na učinkovitost primjene ASE u ekstrakciji ciljanih bioaktivnih molekula, dok je utjecaj tlaka bio slabije izražen (Díaz-de-Cerio i sur., 2018). Dio istraživanja potvrđuje da na učinkovitost ASE najviše utječe primijenjena temperatura ekstrakcije (Alvarez-Rivera i sur., 2020), a upotreba visokih temperatura iznad točke vrelišta otapala, upravo je jedna od glavnih prednosti ASE tehnike (Mukhopadhyay, 2006). Također, utvrđeno je da se u većini istraživanja visoki prinosi ciljanih bioaktivnih molekula dobivaju u

temperaturnom rasponu od 75 do 125 °C uz završetak ekstrakciju unutar 20 minuta (Díaz-de-Cerio i sur., 2018). Porast masenih udjela ukupnih fenola do kojeg je došlo uslijed povišene temperature može se pripisati pucanju kemijskih veza između matriksa i fenolnih spojeva, povećanju topljivosti ali i poboljšanju prijenosa mase i molekularne difuzije. Uslijed povišene temperature smanjuje se također viskoznost i površinska napetost otapala što dovodi do pojačanog vlaženja uzorka otapalom (Mustafa i Turner, 2011). Iako je naširoko poznato da visoke temperature mogu uzrokovati degradaciju fenolnih spojeva ASE nudi jedinstvenu mogućnost upotrebe visokih temperatura pri vrlo visokom tlaku istovremeno sprečavajući razgradnju ekstrahiranih spojeva, zbog toga što visoki tlak povećava stabilnost kovalentnih veza unutar molekula (Hossain i sur., 2011).

Machado i sur. (2015) također su zabilježili povećanje masenih udjela fenolnih spojeva u ekstraktima iz taloga kupina uslijed povećanja temperature tijekom ASE. U navedenom istraživanju ispitan je utjecaj otapala (voda, zakiseljena voda, 100 %-tni etanol i 50 %-tna vodena otopina etanola) i temperature (60, 80 i 100 °C) na ekstrakcijski kapacitet i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata taloga kupine. Na osnovu masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivenih ekstrakata kao optimalni uvjeti ASE izabrani su: 50 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo i temperatura ekstrakcije 100 °C. U drugim, do sada provedenim istraživanjima, također je zabilježeno da porastom temperature pri ASE ekstrakciji dolazi po povećanja ekstrakcijskih prinosa, te su viši prinosi ciljanih spojeva dobiveni pri višim temperaturama (Shang i sur., 2014; Ciulu i sur., 2017; Gomes i sur., 2017).

Međutim, kao i kod drugih tehnika previsoka temperatura ekstrakcije može dovesti do gubitka termolabilnih spojeva i smanjene aktivnosti bioaktivnih spojeva zbog čega je izrazito važno odabrati optimalnu temperaturu koja će omogućiti bolji prijenos mase iz matriksa u ekstrakcijsko otapalo uz što manju degradaciju ciljanih spojeva (Alvarez-Rivera i sur., 2020). U istraživanju koje su proveli Díaz-de-Cerio i sur. (2018) ispitan je utjecaj otapala (50 i 70 %-tna vodena otopina etanola, 100 %-tni etanol), temperature (50, 125 i 200 °C) i vremena ekstrakcije (5, 18 i 30 min) na prinose fenolnih spojeva iz lišća mirte (*Myrtus communis* L.). Kao optimalni uvjeti ekstrakcije određeni su: 71 %-tna vodena otopina etanola, vrijeme ekstrakcije 19 min i temperatura 137 °C, sugerirajući da pri produženom vremenu ekstrakcije i višim temperaturama dolazi do degradacije fenolnih spojeva. Obzirom na navedeno te prirodu fenolnih spojeva, iako je tijekom ASE moguće koristiti znatno više temperature, u našem istraživanju izabran je raspon temperatura od 60 do 100 °C, kako bi se izbjegla moguća degradacija fenolnih spojeva. Kako je prethodno navedeno, osim pozitivnog utjecaja

temperature, zabilježen je i pozitivan utjecaj povećanja broja ciklusa ekstrakcije na masene udjele ukupnih fenola. Prema Mottaleb (2012) razlog uvođenja više statičkih ciklusa je dovodenje svježeg otapala tijekom procesa ekstrakcije sa svrhom održavanja povoljne ekstrakcijske ravnoteže, što je korisno je za uzorke s visokim udjelom analita odnosno one uzorke kod kojih je prodiranje u matricu otežano. Povećanje broja ciklusa također može doprinijeti skraćivanju ukupnog vremena ekstrakcije, što je ključno za smanjenje potrošnje energije i troškova procesa (Bozan i Altinay 2014). Slično kao i u našem istraživanju, Gomes i sur. (2017) su zabilježili porast udjela fenolnih spojeva s povećanjem broja ciklusa (s trajanjem 10 minuta) sa 1 na 5 prilikom istraživanja utjecaja ASE na fenolne spojeve lišća 17 različitih *Passiflora* vrsta uz primjenu vodenih otopina etanola kao otapala.

Ukupni flavonoidi

Ukupni flavonoidi su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE uz primjenu vodenih otopina etanola određeni u rasponu od 5,29 do 16,26 mg QE/g, dok su ekstraktima dobivenim uz upotrebu vodenih otopina metanola maseni udjeli ukupnih flavonoida iznosili od 6,23 do 15,30 mg QE/g (*tablica 10*).

Rezultati analize varijance (*tablica 11*), pokazali su statistički značajan utjecaj svih pojedinačnih faktora (polarnost etanola, broj ciklusa i temperatura) na maseni udjele ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola. U istim ekstraktima zabilježen je još i statistički značajan utjecaj polarnosti etanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije.

Kod ekstrakata dobivenih uz upotrebu vodenih otopina metanola na maseni udjel ukupnih flavonoida statistički značajan utjecaj imala je) (*tablica 11*).

Veći prinosi flavonoida ostvareni su uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine etanola za razliku od ukupnih fenola, čiji su najveći maseni udjeli određeni u 50 %-tnim vodenim otopinama etanola. Do sličnih rezultata u svom radu došli su Shang i sur., (2014) prilikom istraživanja utjecaja ASE na izolaciju fenolnih spojeva iz lišća crnog bambusa. U navedenom istraživanju među ostalim varijablama, ispitan je i utjecaj otapala (voda, 25, 50 i 75 %-tna vodena otopina etanola te 100 %-tni etanol) na prinose fenolnih spojeva. Dok se za ekstrakciju ukupnih fenola 50 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo pokazala optimalnom za ekstrakciju ukupnih flavonoida kao optimalno otapalo izabrana je 75 %-tna vodena otopina etanola.

Trodimenzijski prikazi odzivne površine ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnina dobivenih pomoću ASE u ovisnosti o broju ciklusa i temperaturi ekstrakcije uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine etanola i metanola prikazani su na *slici 30*. Uz upotrebu vodenih otopina etanola, isto kao i u slučaju ukupnih fenola, broj ciklusa ekstrakcije utjecao je pozitivno na maseni udjel ukupnih flavonoida pa su tako najviše vrijednosti ukupnih flavonoida ostvarene uz 3 ciklusa ekstrakcije pri temperaturama ekstrakcije iznad 80 °C (*slika 30a*).

Kod ekstrakata koji su dobiveni primjenom vodenih otopina metanola slični prinosi ukupnih flavonoida dobivaju se pri višim temperaturama ekstrakcije uz provođenje ekstrakcije u jednom ciklusu ili pri nižim temperaturama (oko 60 °C) uz provođenje ekstrakcije u 2 do 3 ciklusa (*slika 30b*). Na osnovu navedenog može se pretpostaviti da istodobna primjena viših temperatura i većeg broja ciklusa vodi do gubitka dijela flavonoida.

U istraživanju koje su proveli Aliaño-González i sur. (2020) ispitan je utjecaj temperature ekstrakcije u rasponu od 50 do 100 °C na prinose ukupnih antocijana i ukupnih fenola iz acaia djelovanjem ASE uz primjenu vodenih otopina metanola kao otapala. U navedenom istraživanju, temperatura ekstrakcije imala je također statistički značajan utjecaj na ukupne fenole i ukupne antocijane. Slično kao i u našem istraživanju, povećanje temperature dovelo je do povećanja udjela ukupnih fenola te je temperatura ekstrakcije 99,6 °C određena kao optimalna za ekstrakciju ukupnih fenola, dok je u slučaju ekstrakcije termolabilnih antocijana niža temperatura ekstrakcije (81 °C) označena kao optimalna, vjerojatno uslijed degradacije navedenih spojeva. U istraživanju, koje su pak proveli Zorić i sur. (2019) ispitan je utjecaj različitih faktora ASE na masene udjele fenolnih spojeva kod sjemenki komorača, uz upotrebu acetona i metanola kao otapala. Uz upotrebu acetona kao otapala, maksimalni maseni udjeli ukupnih fenola ostvareni su pri temperaturi ekstrakcije 100 °C i vremenu ekstrakcije 10 minuta uz provođenje ekstrakcije u 3 ciklusa, dok su uz upotrebu metanola kao otapala maksimalni maseni udjeli ukupnih fenola ostvareni također pri nižim vrijednostima temperature i kraćem vremenu ekstrakcije odnosno pri temperaturi ekstrakcije 75 °C i vremenu ekstrakcije 5 minuta uz provođenje ekstrakcije u jednom ciklusu. Smanjenje udjela fenolnih spojeva uslijed povišenja temperature i broja ciklusa uz primjenu metanola kao otapala može se, prema Zorić i sur. (2019) objasniti degradacijom fenolnih spojeva koja se događa uslijed povećanja hidrolize i oksidacije pri izlaganju termolabilnih spojeva povećanim temperaturama i produženom vremenu ekstrakcije.

Ukupne hidroksicimetne kiseline

Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima vodenih otopina etanola dobivenih pomoću ASE određeni su u rasponu od 7,11 do 23,79 mg CAE/g, a u ekstraktima vodenih otopina metanola u rasponu od 8,97 do 22,93 mg CAE/g (*tablica 10*).

Iz rezultata analize varijance prikazanih u *tablici 11* vidljiv je statistički značajan utjecaj polarnosti etanola i broja ciklusa na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu vodene otopine etanola. U istim ekstraktima također je utvrđeno, da je statistički značajan utjecaj na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina imala polarnost etanola u kombinaciji s brojem ciklusa te polarnost etanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije. U ekstraktima koji su dobiveni uz upotrebu vodene otopine metanola, zabilježen je statistički značajan utjecaj polarnosti metanola i temperature ekstrakcije ali i utjecaj svih kombinacija faktora (polarnost metanola u kombinaciji sa brojem ciklusa, polarnost metanola u kombinaciji s temperaturom te broj ciklusa u kombinaciji s vremenom ekstrakcije).

Sa *slike 31a* vidljivo je da su uz primjenu vodenih otopina etanola, temperatura ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije imali pozitivan utjecaj na maseni udjel hidroksicimetnih kiselina, pa su tako uz vodene otopine etanola najviši maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvareni provođenjem ekstrakcije u 3 ciklusa pri višoj temperaturi ekstrakcije.

Suprotno tome, primjenom vodenih otopina metanola, slično kao i kod ukupnih flavonoida maksimalni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvareni su pri nižim temperaturama ekstrakcije (60 °C) uz provođenje ekstrakcije u 2 ili 3 ciklusa, a sličan efekt postignut je također i provođenjem ekstrakcije pri maksimalnoj temperaturi (100 °C) uz 1 ciklus ekstrakcije (*slike 31b*). Iz navedenog se može pretpostaviti da je uslijed kombinacije viših temperatura i većeg broja ciklusa također, slično kao i kod flavonoida, došlo do degradacije hidroksicimetnih kiselina uslijed povećanja hidrolize i oksidacije pri izlaganju povećanim temperaturama i produženom vremenu ekstrakcije.

Szewczyk i Olech (2017) su također utvrdili smanjenje masenih udjela ukupnih fenolnih kiselina uslijed povećanja temperature prilikom provođenja ASE u lišću cvijeću i korijenu biljne vrste *Impatiens glandulifera*. U navedenom istraživanju primjenom LC–MS analize provedeno je kvantitativno i kvalitativno određivanje fenolnih kiselina, pri temperaturama 80, 100 i 120° C te uz primjenu 80 %-tne vodene otopine metanola i 100 %-tnog metanola. Najviše vrijednost ukupnih fenolnih kiselina (određenih kao suma pojedinačnih fenolnih kiselina)

ostvarene su pri najnižoj od navedenih temperatura i uz upotrebu 80 %-tne vodene otopine metanola.

Prema koeficijentima determinacije za regresijske modele (R^2 vrijednosti) navedenim u *tablici 12*, uočava se visoka preciznost i prikladnost modela za opis i predviđanje masenih udjela određivanih fenolnih skupina, primjenom ASE, i uz i upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, obzirom da su svi koeficijenti determinacije (R^2) > 0,70.

Koeficijenti determinacije su iznosili za etanolne otopine kako slijedi: 0,75 za ukupne fenole, 0,80 za ukupne flavonoide i 0,76 za ukupne hidroksicimetne kiseline. Za metanolne otopine koeficijenti determinacije su iznosili redom: 0,91 za ukupne fenole: 0,94 za ukupne flavonoide i 0,95 za ukupne hidroksicimetne kiseline. Navedene R^2 vrijednosti, osim na zadovoljavajuću prikladnost modela, upućuju na veću prikladnost modela za predviđanje masenih udjela navedenih fenolnih skupina uz primjenu metanolnih vodenih otopina. I uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, najniži koeficijenti determinacije određeni su za ukupne fenole, što se može objasniti najvećom raznolikošću spojeva, odnosno najvećom razlikom u polarnosti spojeva koji su obuhvaćeni pod određivanom skupinom ukupnih fenola.

Nakon što je utvrđeno na koji način utječu parametri ASE na masene udjele određivanih skupina fenolnih spojeva, u ekstraktima cvijeta trnine utvrđeni su optimalni uvjeti za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva kao i predviđeni maseni udjeli određivanih skupina pri tim istim uvjetima (*tablica 13*).

Kod ASE udio etanola/metanola od 70 % je određen kao optimalan za sve određivane skupine fenolnih spojeva, osim za ukupne fenole uz primjenu etanolnih otopina gdje se 50 %-tna vodena otopina etanola pokazala optimalnom. Temperatura ekstrakcije od 100 °C pokazala se optimalnom za sve određivane skupine fenolnih spojeva uz vodene otopine etanola i metanola. Uz vodene otopine etanola optimalan broj ciklusa je također isti za sve skupine fenolnih spojeva (3), dok je uz upotrebu metanolnih otopina isti za ukupne flavonoide i ukupne hidroksicimetne kiseline (1) a razlikuje se za ukupne fenole (3). Uz upotrebu vodenih otopina etanola kao otapala predviđeni maseni udjeli svih određivanih skupina pri optimalnim uvjetima MAE viši su uz upotrebu vodene otopine etanola u odnosu na predviđeni masene udjele uz upotrebu vodenih otopina metanola. Uz upotrebu vodenih otopina etanola kao otapala predviđeni maseni udjeli ukupnih fenola su 62,12 mg GAE/g, a uz upotrebu vodenih otopina metanola 58,57 mg GAE/g. Predviđeni maseni udjeli ukupnih flavonoida uz upotrebu vodenih otopina etanola iznose 17,33 mg QE/g, a 15,71 mg QE/g uz upotrebu vodenih otopina metanola.

Uz primjenu vodenih otopina etanola, predviđeni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina pri optimalnim uvjetima iznose 24,53 mg CAE/g, dok uz primjenu vodenih otopina metanola iznose 23,06 mg CAE/g.

Metoda odzivnih površina primjenjiva je također i u drugim istraživanjima za optimizaciju procesa ASE. Tako su, primjerice He i sur. (2018) optimirali proces ekstrakcije fenolnih spojeva iz crnih goji bobica djelovanjem ASE. Kao optimalne određene su sljedeće vrijednosti ispitanih faktora: temperatura ekstrakcije 89,38 °C, udio etanola u vodenoj otopini etanola 70 % i vrijeme ekstrakcije 13 min. Pri navedenim uvjetima ekstrakcije maseni udjeli ukupnih fenola iznosili su: 17,92 mg GAE/g.

Nakon što su metodom odzivnih površina određeni optimalni uvjeti ekstrakcije za svaku od određivanih fenolnih skupina, metoda odzivnih površina je korištena i kako bi se odredili optimalni uvjeti za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine primjenom ASE u kojima se preklapaju visoki maseni udjeli svih određivanih skupina fenolnih spojeva prikazani su u *tablici 14*. Kod ASE optimalni uvjeti ekstrakcije su udio etanola u otapalu 68 %, u slučaju primjene vodene otopine etanola kao otapala, odnosno 70 % u slučaju vodenih otopina metanola, temperatura ekstrakcije 100 °C neovisno o vrsti otapala, 3 ciklusa ekstrakcije uz primjenu vodene otopine etanola kao otapala, odnosno 1 ciklus ekstrakcije uz primjenu vodene otopine metanola. Pri navedenim optimalnim uvjetima (*tablica 14*) proizvedeni su ekstrakti cvijeta trnine pomoću ASE i u dobivenim ekstraktima su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Na *slici 32* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno potvrđeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina pri optimalnim uvjetima ASE uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenim otopina metanola.

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima ASE maseni udjeli svih određivanih skupina veći su uz upotrebu vodene otopine etanola kao otapala i iznose redom: ukupni fenoli: 63,40 mg GAE/g, ukupni flavonoidi: 18,22 mg QE/g, ukupne hidroksicimetne kiseline: 24,81 mg CAE/g. U vodenim otopinama metanola određeni su sljedeći maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih redom kako je navedeno: 60,63 mg GAE/g, 17,34 mg QE/g i 24,20 mg CAE/g.

Usporedbom eksperimentalno dobivenih vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva kod ASE s modelom predviđenim vrijednostima vidljivo je da se točnost razlikuje među ispitivanim skupinama. Neovisno o određivanim skupinama, međutim sve eksperimentom dobivene vrijednosti su više u odnosu na vrijednosti predviđene modelom, a viša točnost

modela postignuta je za ukupne hidroksicimetne kiseline u odnosu na ukupne fenole i ukupne flavonoide. U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pri optimalnim uvjetima ASE eksperimentalno dobivene vrijednosti ukupnih fenola više su za 5,56 % od vrijednosti postavljenih modelom uz upotrebu vodenih otopina etanola odnosno 9,97 % uz upotrebu vodene otopine metanola kao otapala. Eksperimentalno dobiveni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina viši su 2,72 % uz upotrebu vodene otopine etanola odnosno 4,95 % uz upotrebu vodene otopine metanola u odnosu na modelom predviđene vrijednosti. U slučaju ukupnih flavonoida točnost modela je nešto niža i eksperimentalno dobivene vrijednosti ukupnih flavonoida više su 6,87 % od vrijednosti postavljenih modelom uz upotrebu vodenih otopina etanola odnosno 10,34 % uz upotrebu vodene otopine metanola kao otapala.

5.1.3. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenim pomoću HPAE prema eksperimentalnom dizajnu (*slika 21, poglavlje 3.2.3.*) spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupni fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina a dobiveni rezultati su prikazani u *tablici 15*.

Ukupni fenoli

Slično kao i kod ASE i MAE, primjenom vodene otopine etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE određeni su viši maseni udjeli ukupnih fenola: 46,41-53,51 mg GAE/g, dok su uz upotrebu vodenih otopina metanola određene maseni udjeli ukupnih fenola u rasponu od 39,47-48,41 mg GAE/g (*tablica 15*).

Iz *p* vrijednosti navedenih u *tablici 16*, vidljiv je statistički značajan utjecaj polarnosti otapala na masene udjele ukupnih fenola u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu vodenih otopina etanola ($p = 0,011$) i vodenih otopina metanola ($p = 0,001$). Isto kao i kod ASE, tijekom HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola viši maseni udjeli ukupnih fenola ostvareni su uz primjenu 50 % -tnih vodenih otopina, dok je uz primjenu vodenih otopina metanola povećanje udjela metanola na 70 % doprinijelo povećanju masenih udjela ukupnih fenola.

Vrijeme ekstrakcije ni kao pojedinačni faktor ali ni u kombinaciji s drugim faktorima ekstrakcije, nije statistički značajno utjecalo na masene udjele ukupnih fenola, ni uz primjenu vodenih otopina etanola ni vodenih otopina metanola. S povećanjem vremena ekstrakcije s 5

na 15 minuta nije došlo do povećanja masenih udjela ukupnih fenola. Do sličnih zaključaka došli su i drugi autori u svom istraživanju. Tako su, primjerice Prasad i sur. (2009b) ispitujući utjecaj različitih varijabli uključujući i vrijeme ekstrakcije (2,5, 5, 10, 15 i 30 min) primjenom HPAE na ekstrakcijski kapacitet bioaktivnih spojeva u perikarpu ličija došli do zaključka da vrijeme ekstrakcije nije statistički značajno utjecalo na povećanje ekstrakcijskog prinosa. Xi i sur., (2009) su ispitali utjecaj različitih faktora ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz lišća zelenog čaja. U provedenom istraživanju ispitan je utjecaj otapala (aceton, metanol, etanol, voda), tlaka (100, 200, 300, 400, 500 i 600 MPa), udjela etanola u vodenoj otopini etanola (0-100 %, v/v) i omjera otapala i uzorka (10:1 do 25:1 mL/g) te vremena ekstrakcije (1, 4, 7, 10 min). Optimalni uvjeti ekstrakcije bili su 50 %-tna vodena otopina etanola, omjer otapala i uzorka: 20:1 mL/g, tlak od 500 MPa uz trajanje ekstrakcije 1 min. Naime, prema Pascalovoj teoriji (Chen i sur., 2005), tijekom HPAE, tlak se jednoliko i trenutačno prenosi na cijeli materijal, zbog čega se postizanje ravnoteže tlaka izvan i unutar stanica može dogoditi u vrlo kratkom vremenu. U tim okolnostima, brzina difuzije otapala je velika što omogućuje efikasnu i brzu ekstrakciju analita (Prasad i sur., 2009b; Xi i sur., 2009).

Tlak, kao i vrijeme ekstrakcije, nije imao statistički značajan utjecaj kao pojedinačni faktor, ali ni u kombinaciji s drugim faktorima ekstrakcije na maseni udjel ukupnih fenola uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola. Suprotna, različita istraživanja su utvrdila da se prinosi fenolnih spojeva povećavaju s porastom tlaka (Xi i sur., 2009; Altuner i sur., 2012; Casquete i sur., 2014; Huang i sur., 2019) povezujući to sa raspadom stanične membrane i olakšanim dotok većih količina otapala u unutarne membrane uslijed povećanja razine tlaka (Casquete i sur., 2014). Međutim, postoje i istraživanja u kojima su ostvareni rezultati slični našima. Tako su, primjerice, Moreira i sur. (2020) utvrdili da su u ekstraktima koprive određeni značajno veći maseni udjeli ukupnih fenola prilikom primjene HPAE dobivenima uz upotrebom vode kao otapala pri snazi 200 MPa ($585,26 \pm 26,57$ mg GAE/100 g s.tv.) u usporedbi s ekstraktima koprive dobivenima ekstrakcijom provedenom pri snazi 500 MPa uz 20 %-tnu vodenu otopinu etanola kao otapalo ($285,7 \pm 23,81$ mg GAE/100 g s.tv.).

Nadalje, rezultati *tablice 16* pokazuju da temperatura ekstrakcije nije imala statistički značajan utjecaj na maseni udjel ukupnih fenola ali je zabilježen statistički značajan utjecaj temperature ekstrakcije u kombinaciji s polarnosti otapala kod ekstrakata dobivenih uz primjenu vodenih otopina etanola ($p = 0,016$) i vodenih otopina metanola ($p = 0,016$). Alexandre i sur. (2017) su ispitali utjecaj različitih varijabli HPAE na fenolne spojeve industrijskih nusproizvoda smokve. U provedenom istraživanju ispitan je utjecaj tlaka (0,1, 300

i 600 MPa), vremena ekstrakcije (5, 17,5 i 30 min) i udjela etanola (0, 40 i 80 %) na antioksidacijski kapacitet, ukupne fenole, ukupne tanine i ukupne flavonoide. Na osnovu statističke analize zaključeno je da su sve pojedinačne varijable imale utjecaj na masene udjele ukupnih fenola, dok nije zabilježen utjecaj ni jedne od kombinacija primijenjenih varijabli. Među ispitanim varijablama, polarnost etanola je varijabla s najvišim statističkim značajem i više vrijednosti ukupnih fenola ostvarene su također pri nižim vrijednostima etanola, dok je povećanje vrijednosti tlaka i vremena ekstrakcije utjecalo na povećanje ekstrakcijskog prinosa, stoga su kao optimalni uvjeti označeni tlak 600 MPa, vrijeme ekstrakcije 29 min i 9 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo. Navedene razlike moguće je pripisati razlici u korištenom biljnom materijalu s jedne strane, ali i također i širem rasponu ispitanih varijabli u istraživanju koje su proveli Alexandre i sur. (2017) u odnosu na ovo istraživanje.

Veći maseni udjeli ukupnih fenola kod HPAE postignuti su uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine u slučaju primjene vodenih otopina etanola, odnosno uz primjenu 70 %-tne vodene otopina u slučaju primjene vodenih otopina metanola. Veći maseni udjeli flavonoida i hidroksicimetnih kiselina kod HPAE postignuti uz upotrebu 70 %-tnih vodenih otopina etanola i metanola, zbog čega su trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za sve skupine fenolnih spojeva (osim za ukupne fenole u ekstraktima dobivenim uz primjenu vodene otopine etanola) prikazani samo za ekstrakte cvijeta trnine dobivene uz 70 %-tne vodene otopine etanola/metanola.

Pri kreiranju trodimenzionalnih prikaza odzivnih površina, vrijeme ekstrakcije također je održavano konstantnim, budući da je na trodimenzionalnom prikazu moguće prikazati odnos samo dvije nezavisne varijable, a za sve ispitivane skupine fenolnih spojeva uz vodene otopine etanola vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min se pokazalo optimalnim, kao i za ukupne fenole i ukupne flavonoide uz vodene otopine metanola. Nasuprot tome, uz vodene otopine metanola vrijeme ekstrakcije 15 min se pokazalo optimalnim za ekstrakciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

Sa slike 33a i 33b vidljivo je da je i uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola i uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine metanola temperatura ekstrakcije negativno utjecala na maseni udjel ukupnih fenola, a iz nagiba odzivne krivulje ne uočava se utjecaj tlaka na maseni udjel ukupnih fenola. Iako je poznato da povišenje temperature rezultira povećanim masenim udjelom fenolnih spojeva, svaka od određivanih skupina fenolnih spojeva se degradira pri određenoj temperaturi zbog čega je potrebno pravilno postaviti temperaturu ekstrakcije. Prasad i sur. (2009a) u svom su istraživanju ispitivali utjecaj različitih temperatura (30, 50 i 70 °C) na

ekstrakcijski kapacitet odnosno sadržaj ukupnih fenola tijekom provođenja HPAE na perikarpu longan voća. Prema količini ekstrahiranih fenolnih spojeva zaključeno je da povećanje temperature sa 30 na 50 °C značajno utječe na efikasnost HPAE procesa, dok daljnjim povećanjem temperature nije uočen porast količine fenolnih spojeva.

Ukupni flavonoidi

Primjenom vodene otopine etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE maseni udjeli ukupnih flavonoida iznosili su: 12,51-14,89 mg QE/g, dok su uz upotrebu vodenih otopina metanola određene nešto niže vrijednosti: 11,58-13,53 mg QE/g (*tablica 15*).

Iz *p* vrijednosti navedenih u *tablici 16* vidljiv je statistički značajan utjecaj polarnosti etanola na masene udjele ukupnih flavonoida u ekstraktima koji su dobiveni uz primjenu vodene otopine etanola. U istim ekstraktima ni jedna od kombinacija primijenjenih faktora nije imala statistički značajan utjecaj na masene udjele ukupnih flavonoida. Za razliku od ukupnih fenola, kod kojih su više vrijednosti ostvarene primjenom 50 %-tnih vodenih otopina etanola više vrijednosti ukupnih flavonoida ostvarene su uz primjenu 70 %-tnih vodenih otopina etanola.

Slično su Shouqin i sur. (2005) ispitujući utjecaj HPAE na ukupne flavonoide iz propolisa utvrdili da do povećanja udjela ukupnih flavonoida dolazi s povećanjem udjela etanola u vodenoj otopini etanola sa 35 na 75 % uslijed povećanja topljivosti flavonoida u otapalu, dok je daljnje povećanje udjela etanola u otapalu uzrokovalo pad udjela ukupnih flavonoida.

U prethodno spomenutom istraživanju, koje su proveli Alexandre i sur. (2017) optimalan udio etanola u vodenoj otopini etanola za ekstrakciju ukupnih flavonoida pomoću HPAE iz industrijskih nusproizvoda smokve također viši od optimalnog udjela etanola za ekstrakciju ukupnih fenola. Dok se za ukupne fenole 9 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo pokazala optimalnom za ekstrakciju ukupnih flavonoida optimalna je bila 47 %-tna vodena otopina etanola. U provedenom istraživanju upravo se polarnost etanola pokazala kao varijabla koja je imala najviši statistički značaj na ukupne flavonoide.

U istraživanju koje su proveli Fernandes i sur. (2017) ispitan je utjecaj tlaka (0-500 MPa), vremena ekstrakcije (5-15 min) i polarnosti etanola (0-100 %) na ukupne flavonoide u ekstraktu cvijeta maćuhice djelovanjem HPAE. Na osnovu statističke analize zaključeno je također da ni jedna od kombinacija varijabli nije imala statistički značajan utjecaj na maseni

udjel ukupnih flavonoida, međutim uz statistički značajan utjecaj kvadratne vrijednosti polarnosti otapala zabilježen je statistički značajan utjecaj tlaka kao pojedinačne varijable.

U ekstraktima koji su dobiveni uz upotrebu vodene otopine metanola, ni jedan od pojedinačnih faktora ekstrakcije nije imao statistički značajan utjecaj, ali je zabilježen statistički značajan utjecaj polarnosti metanola u kombinaciji s tlakom na maseni udjel ukupnih flavonoida (*tablica 16*).

Briones-Labarca i sur. (2019) su ispitivani utjecaj HPAE na ukupne flavonoide iz pulpe rajčice uz upotrebu različitih udjela heksana u nepolarnoj smjesi otapala (etanol/acetona) pri konstantnom vremenu ekstrakcije (10 min), na sobnoj temperaturi. U provedenom istraživanju osim udjela heksana u nepolarnoj otopini otapala ispitan je i utjecaj tlaka (250, 350 i 450 MPa). Rezultati statističke analize potvrdili su statistički značajan utjecaj tlaka, otapala, kvadratni utjecaj tlaka ali statistički značajan utjecaj kombinacije ispitanih varijabli. Najviši maseni udjel flavonoida je ostvaren primjenom najviše vrijednosti tlaka i najvišeg udjela heksana u otapali, dok su suprotno, najniži maseni udjeli flavonoida ostvareni pri najnižoj vrijednosti tlaka također uz 60 %-tni heksan.

Trodimenzijski prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih flavonoida u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću HPAE u ovisnosti o temperaturi i tlaku uz vrijeme ekstrakcije 5 min uz primjenu 70 %-tnih vodenih otopina etanola i metanola prikazani su na *slici 34*.

Uz ekstraktima dobivenim uz upotrebu vodene otopine etanola maksimalni maseni udjeli ukupnih flavonoida ostvareni su pri višim temperaturama ekstrakcije i nižim vrijednostima tlaka. Međutim slični rezultati ostvareni su također kombinacijom nižih temperatura i više tlaka (*slika 34a*). Uz upotrebu vodene otopine metanola (*slika 34b*) maksimalni maseni udjeli ukupnih flavonoida ostvareni su kombinacijom nižih temperatura i većeg tlaka. Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da je uslijed kombinacije visoke temperature i većeg tlaka vjerojatno došlo do degradacije flavonoida, što je posljedično uzrokovalo smanjenje masenog udjela ukupnih flavonoida. Pretragom literature nisu utvrđeni slični rezultati, jer je većina provedenih istraživanja koja su ispitivala HPAE (Altuner i sur., 2012; Fernandes i sur., 2017; Moreira i sur., 2020) provedena pri sobnoj temperaturi, vjerojatno upravo kako bi se izbjegla degradacija bioaktivnih spojeva.

Ukupne hidroksicimetne kiseline

Uz primjenu vodene otopine etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE određeni su maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina u rasponu od 18,70 do 26,20 mg CAE/g, a uz upotrebu vodenih otopina metanola su određene niže vrijednosti: 16,36-21,60 mg CAE/g (*tablica 15*).

Na osnovu rezultata analize varijance (*tablica 16*), vidljivo je da je u ekstraktima dobivenim i uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola od pojedinačnih faktora jedino polarnost otapala imala statistički značajan utjecaj na maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Povećanje udjela etanola/metanola u vodenim otopinama etanola/metanola rezultiralo je povećanjem masenih udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

U istraživanju koje su objavili Moreira i sur. (2020) ispitan je utjecaj različite polarnosti etanola (0, 25, 35 i 70 %-tna vodena otopina etanola) na masene udjele fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima lišća koprive dobivenim pomoću HPAE i također je uočeno da povećanjem udjela etanola u vodenoj otopini etanola dolazi do povećanja masenog udjela navedenih fenolnih skupina, pa su tako najviše vrijednosti navedenih fenolnih skupina ostvarane uz upotrebu 35 i 75 %-tne vodene otopine etanola, pri tlaku 200 MPa i vremenu ekstrakcije 10 min.

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz primjenu vodene otopine etanola zabilježen je statistički značajan utjecaj sljedećih kombinacija faktora na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina: temperatura ekstrakcije u kombinaciji s vremenom ekstrakcije, temperatura ekstrakcije u kombinaciji s tlakom, vrijeme ekstrakcije u kombinaciji s tlakom, te kombinacija polarnost etanola, temperature i vremena ekstrakcije. Uz primjenu vodenih otopina metanola, ni jedna od kombinacija faktora nije imala statistički značajan utjecaj na maseni udjel hidroksicimetnih kiselina.

Trodimenzijski prikaz odzivnih površina za maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću HPAE u ovisnosti o temperaturi i tlaku uz vrijeme ekstrakcije 5 min uz primjenu 70 %-tnih vodenih otopina etanola prikazani su na *slici 38a* odnosno uz vrijeme ekstrakcije 15 minuta i primjenu 70 %-tnih vodenih otopina metanola na *slici 38b*.

U ekstraktima dobivenim uz vodenu otopinu etanola, zabilježen je pozitivan utjecaj temperature na maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina a na osnovu oblika odzivne krivulje može se zaključiti da je pri nižim vrijednostima tlaka taj utjecaj manji, dok se sa

povećanjem vrijednosti tlaka povećao i utjecaj temperature (*slika 35a*). Maksimalne vrijednosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvarene su pri višim temperaturama ekstrakcije (60 °C) i većem tlaku, a kombinacija niskih temperatura i visokih vrijednosti tlaka rezultirala je najmanjim masenim udjelima ukupnih hidroksicimetnih kiselina.

U ekstraktima dobivenim uz upotrebu vodenih otopina metanola (*slika 35b*), vidljiv je negativan utjecaj tlaka na maseni udjel hidroksicimetnih kiselina, dok se iz oblika odzivne krivulje može zaključiti da temperatura ekstrakcije nije imala utjecaja na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina, pa su više vrijednosti određene pri nižem tlaku (200 MPa), neovisno o primijenjenoj temperaturi.

Jednadžbe regresijskog modela za određivanje skupine fenolnih spojeva prikazane u *tablici 17* omogućuju predviđanje njihove vrijednosti za svaku vrijednost udjela etanola odnosno metanola u vodenim otopinama navedenih otapala, temperature, tlaka i vremena ekstrakcije. Koeficijentima determinacije (R^2) također su se razlikovali ovisno o određivanoj skupini fenolnih spojeva ali i primijenjenom otapalu, kao kod MAE i ASE, međutim u slučaju HPAE nešto viši koeficijenti determinacije su određeni uz vodenim otopinama etanola: 0,58 za ukupne fenole, 0,60 za ukupne flavonoide i 0,93 za ukupne hidroksicimetne kiseline. Za metanolne otopine koeficijenti determinacije su iznosili redom: 0,67 za ukupne fenole, 0,58 za ukupne flavonoide i 0,83 za ukupne hidroksicimetne kiseline.

Kao i za MAE i ASE, nakon što je utvrđeno na koji način utječu parametri HPAE na određivanje fenolne skupine, metodom odzivnih površina za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine utvrđeni su optimalni uvjeti ekstrakcije kao i predviđeni maseni udjeli određivanih skupina pri tim istim uvjetima (*tablica 18*).

Kod HPAE 70 %-tne vodene otopine etanola/metanola su se pokazale kao optimalno otapalo za sve sve određivane skupine fenolnih spojeva, osim za ukupne fenole određene u ekstraktima trnine dobivenima uz primjenu vodenih otopina etanola, gdje se 50 %-tna vodena otopina pokazala kao optimalna.

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima uz primjenu vodenih otopina etanola za sve određivane skupine fenolnih spojeva isto je i optimalno vrijeme ekstrakcije (5 min), dok se temperatura ekstrakcije određena kao optimalna za ukupne fenole (40 °C) razlikovala od temperature ekstrakcije koja je određena kao optimalna za ukupne flavonoide i ukupne hidroksicimetne kiseline (60 °C). Optimalan tlak je isti za ukupne fenole i ukupne hidroksicimetne kiseline (500 MPa), dok se razlikuje za ukupne flavonoide (200 MPa).

U ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima uz primjenu vodenih otopina metanola

vrijeme ekstrakcije od 5 minuta je postavljeno kao optimalno za ukupne fenole i ukupne flavonoide, dok je vrijeme ekstrakcije 15 minuta postavljeno kao optimalno za ekstrakciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina. U istim ekstraktima za sve skupine spojeva određena je ista temperatura ekstrakcije kao optimalna (40 °C), dok je za ukupne fenole i ukupne flavonoide optimalan tlak bio 500 MPa, a za hidroksicimetne kiseline 200 MPa.

Slično kao i kod MAE i ASE, i kod HPAE predviđeni maseni udjeli određivanih fenolnih skupina, pri optimalnim uvjetima za svaku pojedinu fenolnu skupinu, viši su uz upotrebu vodenih otopina etanola. Tako, uz upotrebu vodenih otopina etanola predviđeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina iznose redom kako je navedeno: 53,13 mg GAE/g, 14,99 mg QE/g i 23,73 mg CAE/g, dok uz upotrebu vodenih otopina metanola predviđeni maseni udjeli iznose: 48,90 mg GAE/g, 13,51 mg QE/g i 20,62 mg CAE/g.

Nakon što su utvrđeni optimalni uvjeti HPAE za svaku od određivanih skupina fenolnih spojeva, određeni su i optimalni uvjeti HPAE za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine, u kojima se preklapaju visoki maseni udjeli svih određivanih fenolnih skupina na način da su istovremeno promatrane sve tri skupine fenolnih spojeva (*tablica 19*). Kod HPAE optimalni uvjeti ekstrakcije su udio etanola/metanola u otapalu 70 % i vrijeme ekstrakcije 5 min, uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, te temperatura ekstrakcije 60 °C i tlak 200 MPa uz primjenu etanolnih otopina odnosno temperatura ekstrakcije 40 °C i tlak 500 MPa uz primjenu metanolnih otopina.

Prema Pinela i sur. (2018) optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz potočarke (*Nasturtium officinale*) pomoću HPAE određeni također metodom odzivnih površina su: vrijeme ekstrakcije 3,1 min, tlak 600 MPa i primjena 100 % -tnog etanola kao otapala. Pri navedenim uvjetima ekstrakcije ostvareni su maseni udjeli ukupnih fenola: $64,68 \pm 2,97$ mg/g.

Pri uvjetima ekstrakcije koji su označeni kao optimalni za HPAE ekstrakciju tehniku, uz vodenu otopinu etanola i metanola proizvedeni su ekstrakti cvijeta trnine u kojima su potom određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina, a potom su uspoređeni predviđeni i eksperimentalno dobiveni podaci kako bi se provjerila sama točnost modela.

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE, pri optimalnim uvjetima ekstrakcije maseni udjeli fenolnih spojeva veći su također uz upotrebu etanolnih otopina, i iznose redom: ukupni fenoli: 46,88 mg GAE/g, ukupni flavonoidi: 13,57 mg QE/g, ukupne hidroksicimetne kiseline: 22,30 mg CAE/g. U metanolnim otopinama određeni su maseni udjeli

ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina redom kako je navedeno: 43,12 mg GAE/g, 12,69 mg QE/g, 20,90 mg CAE/g (*slika 36*).

Na *slici 36* su paralelno prikazani modelom predviđeni i eksperimentalno potvrđeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina pri optimalnim uvjetima HPAE uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola.

Na osnovu usporedbe predviđenih i eksperimentalno dobivenih rezultata pri optimalnim uvjetima HPAE može se zaključiti da je kod HPAE točnost niža nego u slučaju ASE i MAE. Samo u slučaju ukupnih hidroksicimetnih kiselina razlika između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti je manja od 5 %. Eksperimentalno dobiveni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina uz primjenu vodenih otopina etanola iznose 95,05 % od modelom predviđenih vrijednosti. Uz upotrebu vodenih otopina metanola, eksperimentalno dobiveni maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina viši su za 3,44 % u odnosu na modelom predviđene vrijednosti.

Maseni udjeli eksperimentalno dobivenih ukupnih fenola i ukupnih flavonoida niži su od modelom predviđenih vrijednosti. Eksperimentalno dobiveni masenih udjela ukupnih fenola iznose 91,29 % predviđenih vrijednosti uz primjenu etanolnih otopina odnosno 88,17 % uz primjenu vodenih otopina metanola. Eksperimentalno dobiveni masenih udjela ukupnih flavonoida iznose 90,56 % predviđenih vrijednosti uz primjenu etanolnih otopina odnosno 93,94 % uz primjenu vodenih otopina metanola.

Usporedbom masenih udjela fenolnih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pri optimalnim uvjetima MAE, ASE i HPAE uočava se da su najviše vrijednosti ukupnih fenola, neovisno o vrsti primijenjenog otapala dobivene primjenom MAE: 69,80 mg GAE/g uz vodenu otopinu etanola, odnosno 63,42 GAE/g uz vodenu otopinu metanola, zatim ASE: 63,40 mg GAE/g uz etanolnu vodenu otopinu, odnosno 60,63 GAE/g uz metanolnu vodenu otopinu dok su najniže vrijednosti ukupnih fenola ostvarene pomoću HPAE: 46,88 mg GAE/g uz etanolnu vodenu otopinu, odnosno 43,12 GAE/g uz metanolnu vodenu otopinu.

Najviši maseni udjeli ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina određeni su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom ASE, zatim MAE dok su najniže vrijednosti kao i u slučaju ukupnih fenola ostvarene pomoću HPAE.

Uz primjenu vodenih otopina etanola određene su sljedeći maseni udjeli ukupnih flavonoida po tehnikama: ASE: 18,22 mg QE/g, MAE: 14,59 mg QE/g, i HPAE: 13,57 mg QE/g. Uz primjenu vodenih otopina metanola određene su maseni udjeli ukupnih flavonoida redom po tehnikama, kako je prethodno navedeno: 17,34, 13,30 i 12,69 mg QE/g.

Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina uz primjenu vodenih otopina etanola određeni po tehnika su: ASE: 24,81 mg CAE/g, MAE: 22,92 mg CAE/g i HPAE: 22,30 mg CAE/g, dok su uz primjenu vodenih otopina metanola određeni sljedeći maseni udjeli ukupnih flavonoida redom po tehnikama redom kako je prethodno navedeno: 24,20, 23,09 i 20,90 mg CAE/g.

Neovisno o vrsti korištenog otapala, maseni udjeli ukupnih fenola određeni u ovom istraživanju značajno su veći od masenih udjela ukupnih fenola koje su prethodno odredili Elez Garofulic i sur. (2018) u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pomoću UAE uz primjenu 50 i 70 %-tnih vodenih otopina etanola. Tako su, u navedenom istraživanju, UPLC–MS analizom određeni maseni udjeli ukupnih fenola od 1966,65 do 2595,23 mg GAE/100 g, ovisno o primijenjenim faktorima ekstrakcije (polarnost otapala, amplituda ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije). Različite maseni udjeli ukupnih fenola mogu se, međutim, različitoj tehnici ekstrakcije ali i različitim metodama analize fenolnih spojeva, jer su u istraživanju koje su Elez Garofulic i sur. (2018) objavili maseni udjeli ukupnih fenola prikazani kao masa svih fenolnih spojeva određenih UPLC-MS tehnikom, dok su u našem istraživanju ukupni fenoli određeni spektrofotometrijski.

Suprotno, Marchelak i sur. (2017) su spektrofotometrijski, primjenom Folin-Ciocalteu metode odredili više masene udjele ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću Soxlet ekstrakcije. Maseni udjeli ukupnih fenola varirali su ovisno o vrsti primijenjenog otapala i iznosili su: 64,6-584,07 mg GAE/g s.tv., a najviši maseni udjeli određeni su u etil-acetatnoj frakciji.

U istraživanju koje je u sklopu diplomskog rada proveo Fadić (2016) provedena je izolacija fenolnih spojeva iz cvijeta i lista trnine klasičnom ekstrakcijom zagrijavanjem uz refluks, uz 70 %-tnu vodenu otopina etanola i 100 %-tni metanol kao otapalo. Maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima cvijeta i lista trnine uz primjenu 70 %-tnog etanola iznosio je 57,14 mg GAE/g trnine, dok je u ekstraktu dobivenom uz primjenu metanola maseni udio ukupnih fenola iznosio 51,42 mg GAE/g. Osim udjela ukupnih fenola, u navedenom istraživanju, u ekstraktima cvijeta i lista trnine određeni su i maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola. Maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u navedenom istraživanju značajno su manji od masenih udjela određenih u sklopu ovog istraživanja. Uz 70 %-tni etanol kao otapalo maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina iznosio je 2,7922 mg CAE/g dok je u ekstraktu dobivenom uz primjenu metanola određen maseni udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina 3,2528 GAE/g. Navedene razlike mogu se

pripisati različitim tehnikama korištenim za ekstrakciju fenolnim spojeva, ali i vrsti biljnog materijala, obzirom da su u istraživanju koje je proveo Fadić (2016) osim cvijetova trnine korišteni ujedno i listovi trnine.

Pregledom literature, nisu pronađena istraživanja u sklopu kojih je paralelno uspoređen utjecaj MAE, ASE i HPAE tehnike na fenolne spojeve određene biljne vrste, ali postoje istraživanja u kojima su uspoređeni utjecali dvije od korištene tri tehnike u ovom istraživanju. Tako su, primjerice, Nayak i sur. (2015) uspoređivali učinkovitost MAE, UAE, ASE i klasične tehnike otapalima na osnovu masenih udjela ukupnih fenola iz kore slatke naranče. Prethodno je u istom istraživanju provedena optimizacija MAE postupka i kao optimalni određeni su sljedeći uvjeti MAE: 51 %-tna vodena otopina acetona, snaga mikrovalova 500 W, vrijeme ekstrakcije 122 s i omjer otapala i uzorka: 25 mL/g. Rezultati istraživanja pokazali su da se pomoću MAE, provedene pri navedenim optimalnim uvjetima, postižu veći maseni udjeli ukupnih fenola u kori slatke naranče u usporedbi s UAE (uz 75,79 %-tnu vodenu otopinu acetona, amplitudu 65,94 % i vrijeme ekstrakcije 8,33 min), ASE (uz 50 %-tnu vodenu otopinu acetona, pri tlaku 1500 psi i temperaturi 120 °C uz tri ciklusa ekstrakcije po 5 min) i klasičnom ekstrakcijom provedenom uz 50 % vodenu otopinu acetona na temperaturi 60 °C u trajanju od 2 sata.

U istraživanju koje su proveli Zengin i sur. (2019) korištene su ASE, MAE, UAE te konvencionalne tehnike: maceracija i Soxhlet ekstrakcija za usporedbu prinosa ukupnih fenola, flavonoida, antioksidacijske i enzimske aktivnosti ekstrakata lišća biljne vrste *Erica arborea* uz primjenu 96 %-tnog etanola kao otapala. Među promatranim tehnikama ASE se pokazala kao najprikladnije tehnika za dobivanje ekstrakata bogatih fenolnim spojevima i visokom antioksidacijskom aktivnošću. Tako su, uz ASE provedenu na 120 °C i uz tlak 1500 psi u trajanju 6 min, dobivene veće vrijednosti ukupnih fenola nego uz MAE provedenu uz snagu mikrovalova 600 W i 30 minuta odnosno UAE u trajanju 1 h, te maceraciju u trajanju 24 sata odnosno Soxhlet ekstrakciju u trajanju 6 h.

5.2. Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC)

Uzevši u obzir prethodno navedeno u raspravi i činjenicu da su najviše vrijednosti ukupnih fenola određene u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE, a najviše vrijednosti ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina određene u ekstraktima

cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE, karakterizacija fenolnih spojeva primjenom HPLC metode provedena je u ekstraktima cvijeta trnine dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE i ASE uz upotrebu vodene otopine etanola i vodene otopine metanola kao otapala.

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz upotrebu i vodene otopine etanola i vodene otopine metanola pri optimalnim uvjetima ASE identificirano je ukupno 13 fenolnih spojeva iz tri skupine: flavonol glikozidi (7 spojeva), flavanoli (2) i hidroksicimetne kiseline (4). Isti fenolni spojevi identificirani su i u ekstraktu cvijeta trnine dobivenima pri optimalnim uvjetima MAE uz primjenu vodene otopine metanola, dok je uz primjenu vodene otopine etanola identificirano ukupno 11 spojeva, tj. nisu identificirana dva spoja iz skupine flavonol glikozida.

U istraživanju koje su objavili Elez Garofulic i sur. (2018) identificirano je ukupno 28 fenolnih spojeva, dok je u istraživanju koje su proveli Marchelak i sur. (2017) identificirano čak ukupno 57 fenolnih spojeva, što vjerojatno osim o tehnici ekstrakcije također ovisi i o upotrebljavanim metodama identifikacije fenolnih spojeva budući da je u navedenim istraživanjima upotrijebljena ultradjelotvorna tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom (UPLC-MS), koja omogućava identifikaciju uz postizanje bolje rezolucije i veću osjetljivosti u odnosu na HPLC metodu, te detekciju spojeva s nižim masenim udjelima (Taleuzzaman i sur., 2015).

U ekstraktima cvijeta trnine dobivenim primjenom MAE (*slika 37*) u najvećim masenim udjelima, redom kako je navedeno, određeni su sljedeći fenolni spojevi: kamferol-pentozidi (19,87 mg/g u vodenoj otopini metanola i 18,55 mg/g u vodenoj otopini etanola) i procijandin B1 (16,45 mg/g; 12,67 mg/g).

Osim, kamferol-pentozida iz skupine flavonol glikozida, u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima MAE, uz upotrebu vodenih otopina metanola, određeno je još 6 fenolnih spojeva u masenim udjeli redom kako je navedeno: kamferol-ramnozid (6,88 mg/g), kamferol-heksozil ramnozid (4,25 mg/g), kvercetin-ramnozid (3,78 mg/g), kvercetin-rutinozid (3,51 mg/g), kvercetin-pentozid (0,56 mg/g) i kvercetin-acetil-rutinozid (0,31 mg/g), čineći tako najzastupljeniju fenolnu skupinu u ekstraktu cvijeta trnine. U ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pri optimalnim uvjetima MAE, uz upotrebu vodene otopine etanola kao otapala, flavonol glikozidi su također najzastupljenija fenolna grupa ali su uz kamferol-pentozid identificirana još četiri fenolna spoja iz navedene skupine i to redom kako je navedeno: kamferol-heksozil ramnozid (7,02 mg/g), kamferol-ramnozid (6,03 mg/g), kvercetin-rutinozid (3,15 mg/g) i kvercetin-acetil-rutinozid (0,3 mg/g), a kako je prethodno već napisano kvercetin-pentozid i kvercetin-ramnozid nisu identificirani.

Iz skupine hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima MAE, uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, identificirana su 4 spoja a najzastupljeniji među njima je neoklorogenska kiselina (2,88 mg/g u vodenoj otopini metanola i 2,2 mg/g u vodenoj otopini etanola), a u nižim masenim udjelima određene su još i 3-*p*-kumaroilkinska kiselina, klorogenska kiselina i kafeinska kiselina.

Iz skupine flavonola, osim procijanidina B1 identificiran je još i katehin u masenom udjelu 2,12 mg/g u ekstraktima cvijeta trnine proizvedenima pri optimalnim uvjetima MAE pomoću vodene otopine metanola, odnosno u masenom udjelu 1,81 mg/g u ekstraktu cvijeta trnine dobivenom uz upotrebu vodene otopine etanola kao otapala.

Za razliku od MAE gdje je dominantan spoj kamferol-pentozid, u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pri optimalnim uvjetima ASE (*slika 38*) dominantan fenolni spoj je procijandin B1 (26,98 mg/g u vodenoj otopini metanola i 22,9 mg/g u vodenoj otopini etanola), a kamferol-pentozid predstavlja drugi najzastupljeniji spoj (18,95 mg/g; 18,2 mg/g u vodenoj otopini etanola). Međutim, kao i kod MAE flavonol glikozidi čine najzastupljeniju skupinu fenolnih spojeva, a uz kamferol-pentozid, koji je najzastupljeniji među flavonol glikozidima određeno je još ukupno 5 flavonol glikozida: kamferol-ramnozid, kamferol-heksozil ramnozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-acetil-rutinozid. Kromatografski profil fenolnih kiselina određen u ekstraktima dobivenima pri optimalnim uvjetima ASE, sličan je kromatografskom profilu dobivenom pri optimalnim uvjetima MAE, pa je tako iz skupine hidroksicimetnih kiselina, najzastupljeniji spoj neoklorogenska kiselina. Također, kao i kod MAE, iz skupine flavonola određen je još i katehin u masenom udjelu 3,37 mg/g u ekstraktima dobivenim uz vodenu otopinu metanola, odnosno 3,06 mg/g u ekstraktima dobivenim uz vodenu otopinu etanola.

U istraživanju koje su proveli Elez Garofulic i sur. (2018) identificirani su fenolni spojevi iz skupine fenolnih kiselina i flavonoida: flavanoli i flavonol glikozidi, među kojima su najzastupljeniji spojevi derivati kamferola i kvercetina i to kamferol-pentozid (494,94 mg/100 g,) i kamferol ramnozid (436,62 mg/100 g) te kvercetin-pentozid (226,75 mg/100 g). Uz fenolne kiseline koje su određene u našem istraživanju u ekstraktima dobivenima pri optimalnim uvjetima MAE i ASE, Elez i suradnici su identificirali još 4 fenolne kiseline i to: ferulinsku kiselinu, feruloilkinska kiselinu, 4-*p*-kumaroil kinsku kiselinu i galnu kiselinu, a 3-*p*-kumaroil kinska kiselina predstavlja najzastupljeniju fenolnu kiselinu s masenim udjelom 216,28 mg/100 g, zajedno s neoklorogenskom kiselinom koja je određena u masenom udjelu od 192,00 mg/100 g. U istom istraživanju identificirano je ukupno 5 flavanola: katehin, epikatehin, epikatehin

galat, epigalokatehin i procijanidin B1, među kojima je katehin određen u najvišem masenom udjelu (85,67 mg/100 g). Maseni udjel procijanidina B1 određen je u niskom masenom udjelu: 70,21 mg /100 g odnosno 18 do 37 puta niže vrijednosti nego u okviru ovog istraživanja. Osim navedenih spojeva, iz skupne fenolnih kiselina u navedenom istraživanju izolirana su i dva spoja iz skupne flavona i to apigenin-pentozid i luteolin.

U istraživanju koje su proveli Marchelak i sur. (2017) izolirano je preko 50 fenolnih spojeva, među kojima su identificirani spojevi iz grupe flavonola (38 spojeva), 7 derivata flavanola (katehina i procijanidina) te fenolne kiseline (12 spojeva). U navedenom istraživanju vrijednosti ukupnih fenola, određene su u rasponu 64,6-584,07 mg GAE/g s.tv., pomoću Folin-Ciocalteu metode i značajno su se razlikovale ovisno o otapalu korištenom za ekstrakciju. Ukupni flavonoidi su međutim izračunati pomoću HPLC-PDA metode kao zbroj flavonoid aglikona koji se oslobađaju nakon kisele hidrolize prirodnih ekstrakata, i preračunati na dominantne glikozide. Flavonoidi su predstavljali 55,7 – 105,5 % vrijednosti ukupnih fenola, čineći tako dominantne fenolne sastavnice svih ekstrakata, osim u talogu vode, gdje su fenolne kiseline prevladavale. Od pojedinačnih aglikona kamferol je bio dominantan spoj čineći 64,4-79,7% ukupnih aglikona, a sadržaj kvercetina i izorhamnetina bio je mnogo niži i navedeni spojevi predstavljali su 18,8-30,9 % odnosno 1,6-4,7 % određenih aglikona. Uz navedene spojeve u provedenom istraživanju su određeni i ukupni procijanidini kao ekvivalenti cijanidin klorida u rasponu od 12,43 do 109,43 mg CYE/g s.tv, dok je sadržaj fenolnih kiselina varirao od 8,76 do 66,77 mg/g s.tv, u ovisnosti o primijenjenom otapalu.

Usporedbom sume svih fenolnih spojeva određenih HPLC analizom, dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE i ASE vidljivo je da je veći maseni udio fenolnih spojeva ostvaren u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom ASE. Naime, uz upotrebu vodene otopine etanola maseni udjeli fenolnih spojeva, izražen kao suma svih fenolnih spojeva određenih HPLC analizom dobiveni pri optimalnim uvjetima ASE iznose 72,13 mg/g, dok je pri optimalnim uvjetima MAE određene vrijednosti 58,92 mg/g. Uz upotrebu vodene otopine metanola maseni udjeli fenolnih spojeva, izražen kao suma svih fenolnih spojeva određenih HPLC analizom dobiveni pri optimalnim uvjetima ASE iznose 79,98 mg/g, dok je pri optimalnim uvjetima MAE određene vrijednosti 67,11 mg/g.

Nakon što je provedeno spektrofotometrijsko određivanje skupina fenolnih spojeva te HPLC analiza pojedinačnih fenolnih spojeva, u svim ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE, ASE i HPAE provedeno je određivanje antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijski primjenom DPPH i FRAP metoda.

5.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine

5.3.1. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE uz primjenu vodenih otopina etanola iznosio je od 180,5 do 193,34 $\mu\text{mol TAE/g}$, ovisno o primijenjenim uvjetima ekstrakcije, dok su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz upotrebu vodenih otopina metanola određene nešto više vrijednosti: 180,87-198,07 $\mu\text{mol TAE/g}$ (*tablica 20*).

Na osnovu rezultata analize varijance prikazanih u *tablici 21* vidljivo je da kod MAE uz primjenu vodenih otopina etanola za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine ni jedan od pojedinačnih faktora ekstrakcije nije imao statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom.

Uz primjenu vodenih otopina metanola od pojedinačnih faktora ekstrakcije samo je polarnost metanola imala statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet (*tablica 21*). Međutim, za razliku od određivanih skupina fenolnih spojeva, gdje je povećanje udjela metanola u vodenoj otopini metanola doprinijelo povećanju masenog udjela fenolnih spojeva, više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene su uz primjenu nižeg udjela metanola odnosno uz 50 % vodene otopine metanola. Obzirom na navedene rezultate može se zaključiti da osim fenolnih spojeva koji se nalaze u ekstraktu cvijeta trnine, na antioksidacijski kapacitet utječe i prisutnost drugih bioaktivnih spojeva te interakcija između prisutnih spojeva (Lovrić i sur., 2017).

Osim statistički značajnog utjecaja polarnosti vodene otopine metanola kao pojedinačnog faktora, utvrđen je ujedno i statistički značajan utjecaj polarnosti metanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE uz primjenu vodenih otopina metanola. Obzirom na navedeno, ali i rezultate optimizacije (*tablica 22*) iz kojih je vidljivo da su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, određene DPPH i FRAP metodama, ostvarene u ekstraktima proizvedenim primjenom 50 %-tnih vodenih otopina etanola i metanola, trodimenzionalni prikazi odzivnih površina antioksidacijskog kapaciteta prikazani su u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz primjenu 50 %-tnih vodenih otopina

etanola/metanola (*slika 39.*).

Uz upotrebu vodene otopine etanola (*slika 39a*) više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom u ekstraktima cvijeta trnine ostvarene su uz temperature ekstrakcije više od 51 °C. Utjecaj vremena ekstrakcije vidljiv je samo pri nižim temperaturama ekstrakcije. Pri višim temperaturama, vrijeme ekstrakcije nema utjecaja na antioksidacijski kapacitet, pa su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene kombinacijom visokih temperatura i kraćeg vremena ekstrakcije.

Suprotno tome, uz primjenu vodene otopine metanola (*slika 39b*) temperatura ekstrakcije je utjecala negativno na antioksidacijski kapacitet, dok se iz nagiba krivulja može isčitati da vrijeme ekstrakcije nije imalo utjecaja na antioksidacijski kapacitet. Stoga su, uz primjenu vodenih otopina metanola maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom ostvarene uz nižu temperaturu (40 °C) i kraće vrijeme ekstrakcije (od 5 do 10 min).

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću MAE primjenom etanolnih otopina iznosio je 69,15-106,72 mg AAE/g, dok su FRAP metodom uz upotrebu metanolnih otopina, također određene više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta: 82,68-122,36 mg AAE/g (*tablica 20*).

Na osnovu rezultata analize varijance prikazanih u *tablici 21* vidljivo je da uz primjenu etanolnih otopina ni jedan od pojedinačnih faktora ekstrakcije kao ni kombinacija faktora nisu imali statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE. Uz primjenu metanolnih otopina ekstrakcije samo je polarnost metanola imala statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodama (*tablica 21*).

Trodimenzijski prikaz odzivne površine antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenih pomoću MAE u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz upotrebu 50 % vodenih otopina etanola i metanola nalazi se na *slici 40*. Sa *slike 40a* vidljivo je da uz primjenu etanolne vodene otopine maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom postignute pri srednjim temperaturama ekstrakcije (oko 50 °C) i dužem vremenu ekstrakcije (25 min). Uz primjenu vodenih otopina metanola (*slika 40b*) maksimalne vrijednosti ostvarene su uz primjenu viših temperatura ekstrakcije (60 °C) uz vrijeme ekstrakcije 25 min.

Nakon što je utvrđeno na koji način utječu parametri MAE na antioksidacijski kapacitet

ekstrakata cvijeta trnine, određen DPPH i FRAP metodama, metodom odzivne površine utvrđeni su optimalni uvjeti MAE pri kojima je moguće proizvesti ekstrakte cvijeta trnine s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta i predviđene vrijednosti pri tim istim uvjetima ekstrakcije.

Na osnovi rezultata optimizacija (*tablica 22*) i prethodno navedenog u raspravi vidljivo je da je kod MAE, neovisno o vrsti primijenjenog otapala (vodene otopina etanola/vodena otopina metanola) za antioksidacijski kapacitet određen DPPH i FRAP metodom optimalan bio udio etanola/metanola u vodenoj otopini 50 %, dok su se optimalna temperatura i optimalno vrijeme ekstrakcije razlikovali ovisno o metodi primijenjenoj za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, ali i vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju. Uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalna temperatura ekstrakcije za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom bila je 57 °C uz vrijeme ekstrakcije 5 minuta. Uz primjenu metanolnih vodenih otopina optimalna temperatura ekstrakcije je bila nešto niža (40 °C) uz produženo vrijeme ekstrakcije (8 min). Uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalna temperatura za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom bila je 51 °C. Uz primjenu metanolnih vodenih otopina optimalna temperatura ekstrakcije je viša (60 °C), dok se vrijeme ekstrakcije od 25 minuta pokazalo optimalnim i uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola.

Za razliku od određivanih skupina fenolnih spojeva, predviđeni antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pri optimalnim uvjetima MAE niži je uz upotrebu vodenih otopina etanola (192,79 $\mu\text{mol TAE/g}$) kao otapala u odnosu na masene udjele dobivene uz primjenu vodene otopine metanola kao otapala (197,37 $\mu\text{mol TAE/g}$). Slično, predviđeni antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom pri optimalnim uvjetima MAE također je niži uz upotrebu vodenih otopina etanola (106,50 mg AAE/g) kao otapala u odnosu na masene udjele dobivene uz primjenu vodene otopine metanola kao otapala (120,06 mg AAE/g).

Drugih literaturnih podataka o antioksidacijskom kapacitetu trnine dobivene primjenom MAE nema, ali su provedena istraživanja ekstrakcijskog kapaciteta u ekstraktima drugim *Prunus* vrstama proizvedenih pomoću MAE. Tako su, primjerice, Haddadi-Guemghar i sur. (2014) istraživali utjecaj MAE na antioksidacijski kapacitet kod sušene šljive (*Prunus domestica*). U navedenom istraživanju ispitan je utjecaj različitih varijabli MAE (vrijeme, snaga mikrovalova, udio etanola u vodenoj otopini etanola) na antioksidacijskog kapacitet sušene šljive određen DPPH metodom. U navedenom istraživanju pokazano je da od pojedinačnih varijabli na ekstrakcijski kapacitet utjecaj imaju vrijeme ekstrakcije i snaga mikrovalova, a udio etanola u vodenoj otopini etanola nije imao statistički značajan utjecaj kao ni kombinacija

korištenih varijabli. Međutim svakako je potrebno uzeti u obzir da se radi o potpuno drugačijem uzorku, a razlika u navedenim rezultatima dodatno naglašava važnost optimizacije tehnika ekstrakcije za svaki biljni materijal.

5.3.2. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom analize uz primjenu vodenih otopina etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE iznosio je od 91,87 do 193,39 $\mu\text{mol TAE/g}$, ovisno o primijenjenim uvjetima ekstrakcije, dok su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz upotrebu vodenih otopina metanola određene nešto više vrijednosti: 112,90-198,55 $\mu\text{mol TAE/g}$ (*tablica 23*).

Iz rezultata analize varijance prikazanih u *tablici 24* vidljivo je da su kod ASE uz primjenu vodenih otopina etanola za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine svi pojedinačni faktori (polarnost etanola, temperatura i broj ciklusa) imali statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom. Više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, tako su ostvarene uz primjenu 70 %-tnih vodenih otopina etanola, uz maksimalan broj ciklusa ekstrakcije i višu temperaturu ekstrakcije.

Osim statistički značajnog utjecaja pojedinačnih faktora, utvrđen je ujedno i statistički značajan utjecaj kombinacije faktora polarnost etanola u kombinaciji s brojem ciklusa te kombinacije faktora polarnost etanola s temperaturom ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz primjenu vodenih otopina etanola.

Uz primjenu vodenih otopina metanola također je zabilježen statistički značajan utjecaj svih pojedinačnih faktora za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine (polarnost metanola, temperatura i broj ciklusa) međutim više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene su uz udio metanola u otapalu 50 %, a različit je bio i utjecaj broja ciklusa i temperature.

Osim statistički značajnog utjecaja pojedinačnih faktora ekstrakcije, utvrđen je ujedno i statistički značajan utjecaj polarnosti metanola u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću ASE uz primjenu vodenih otopina metanola.

Prema optimalnim vrijednostima udjela etanola/metanola u odgovarajućim vodenim otopinama, trodimenzionalni prikaz odzivne površine antioksidacijskog kapaciteta u

ekstraktima cvijeta trnine proizvedenih pomoću ASE u ovisnosti o temperaturi i vremenu ekstrakcije uz primjenu 70 %-tnih vodenih otopina etanola i 50 %-tnih vodenih otopina metanola nalazi se na *slici 41*.

Sa slike *41a* vidljivo je da su uz upotrebu vodene otopine etanola maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene uz 3 ciklusa ekstrakcije. Pri nižem broju ciklusa (1) s porastom temperature raste antioksidacijski kapacitet. S povećanjem broja ciklusa, antioksidacijski kapacitet raste do određene vrijednosti temperature nakon čega s daljnjim povećanjem vrijednosti temperature dolazi do blagog pada vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

Uz upotrebu vodenih otopina metanola (*slika 41b*) s povećanjem broja ciklusa sa 1 na 2 dolazi do porasta antioksidacijskog kapaciteta, dok daljnje povećanje broja ciklusa na 3 vodi do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta. S povećanjem temperature ovaj odnos je manje izražen, pa se pri višim vrijednostima temperature antioksidacijski kapacitet ne razlikuju ovisno o broju ciklusa. S porastom temperature ekstrakcije (do temperature oko 85 °C) uočeno je povećanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom, nakon čega daljnje povećanje temperature ne vodi po povećanja antioksidacijskog kapaciteta.

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom analize u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ASE uz primjenu vodenih otopina etanola kao otapala iznosio je 40,91-149,90 mg AAE/g, dok su FRAP metodom analize, uz upotrebu vodenih otopina metanola, određene niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta: 48,53-112,75 AAE/g (*tablica 23*).

Na osnovu rezultata analize varijance prikazanih u *tablici 24* može se zaključiti da su kod ASE uz primjenu vodenih otopina etanola za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine svi pojedinačni faktori (polarnost etanola, temperatura i broj ciklusa) imali statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom.

Uz primjenu vodenih otopina metanola, od pojedinačnih faktora ekstrakcije zabilježen je statistički značajan utjecaj temperatura ekstrakcije i polarnosti metanola, ali ne i utjecaj broja ciklusa ekstrakcije.

Osim statistički značajnog utjecaja navedenih pojedinačnih faktora ekstrakcije, utvrđen je ujedno i statistički značajan utjecaj polarnosti otapala u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije te statistički značajan utjecaj broja ciklusa u kombinaciji s temperaturom ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih

pomoću ASE i uz primjenu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola.

Trodimenzijski prikazi odzivne površine za antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnina, određen FRAP metodom analize u ovisnosti o broju ciklusa i temperaturi prikazani su uz udio etanola/metanola 70 % budući da se u slučaju antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom analize, navedeni udio etanola/metanola pokazao optimalnim (*slika 42*).

Sa *slike 42a* vidljivo je da uz primjenu vodene otopine etanola s porastom broja ciklusa dolazi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom. S porastom temperature ekstrakcije dolazi također do porasta antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom, ali samo do temperature od oko 85 °C nakon čega se uočava pad vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom analize.

Uz primjenu vodenih otopina metanola (*slika 42b*) uz manji broj ciklusa povećanje temperature je pozitivno utjecalo na antioksidacijski kapacitet određenog FRAP metodom. S povećanjem broja ciklusa, ovaj se odnos mijenja i krivulja temperature ima nepravilan oblik, pa se iz oblika krivulja može zaključiti da su najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene su uz primjenu najviše temperaturi ekstrakcije i najmanjeg broja ciklusa, iako su slične vrijednosti ostvarene i kombinacijom visoke temperature i najvećeg broja ciklusa.

Nakon što je utvrđeno na koji način utječu parametri ASE na antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnina, određen DPPH i FRAP metodama, metodom odzivne površine utvrđeni su optimalni uvjeti ASE pri kojima je moguće proizvesti ekstrakte cvijeta trnina s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta a rezultati optimizacije prikazani su u *tablici 25*. Na osnovi rezultata optimizacije, i prethodno navedenog u raspravi vidljivo je da je kod ASE, optimalna polarnost otapala, broj ciklusa ekstrakcije i temperatura ekstrakcije razlikovali ovisno o metodi primijenjenoj za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, ali i vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju.

Uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalan udio etanola je 70 %, optimalna temperatura za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom bila je 98 °C uz provođenje ekstrakcije u 3 ciklusa. Uz primjenu vodenih otopina metanola kao otapala, niže vrijednosti ispitivanih varijabli pokazale su se optimalnima, pa je tako optimalan udio metanola 50 %, optimalna temperatura 87 °C uz provođenje ekstrakcije u 2 ciklusa.

Za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom optimalan udio etanola/metanola je 70 % i uz upotrebu vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola. Uz upotrebu vodenih otopina etanola kao optimalna temperatura za antioksidacijski kapacitet određen FRAP određena je temperatura od 86 °C uz provođenje ekstrakcije u 3 ciklusa, dok je uz primjenu

metanolnih vodenih otopina optimalna temperature viša (100 °C) ali se optimalnim pokazalo provođenje ekstrakcije u 1 ciklusu.

Slično kao kod MAE, predviđeni antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom pri optimalnim uvjetima ASE tehnike niži je uz upotrebu vodenih otopina etanola (193,95 $\mu\text{mol TAE/g}$) kao otapala u odnosu na masene udjele dobivene uz primjenu vodene otopine metanola kao otapala (198,64 $\mu\text{mol TAE/g}$). Suprotno, antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom pri optimalnim uvjetima ASE je viši uz upotrebu vodenih otopina etanola (145,15 mg AAE/g) kao otapala u odnosu na masene udjele dobivene uz primjenu vodene otopine metanola kao otapala (112,17 mg AAE/g).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je optimalna temperatura ekstrakcije za postizanje maksimalnih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH u ekstraktima cvijeta trine proizvedenima pomoću ASE, nešto niža od temperature koja se pokazala optimalnom za ekstrakciju fenolnih spojeva (osim u slučaju određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom u vodenim otopinama metanola) što navodi na činjenicu da su antioksidacijskom kapacitetu doprinijeli termolabilniji spojevi odnosno spojevi koji se degradiraju pri višim temperaturama ekstrakcije.

Hossain i sur. (2011) su ispitivali utjecaj ASE na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom analize kod ružmarina, mažurana i origana metodom odzivnih površina (RSM). U provedenom istraživanju ispitan je utjecaj temperature ekstrakcije (66–129 °C) i polarosti metanola (32 – 88 %-tni metanol), te zaključeno da s porastom temperature dolazi do porasta antioksidacijskog kapaciteta kod sve tri ispitane vrste, dok su se optimalne vrijednosti polarosti metanola razlikovale između ispitanih biljnih vrsta. Tako su najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kod ružmarina postignute uz upotrebu 56 %-tnog metanola kao otapala, kod mažurana uz upotrebu 57 %-tnog metanola, a kod origana pak uz značajno nižu koncentraciju metanola (33 %) što autor objašnjava prisustvom više hidrofilnih antioksidacijskih spojeva kod origana u odnosu na ostale dvije biljne vrste.

Herrero i sur. (2005) su ispitivali utjecaj temperature (60, 115 i 175 °C) i vremena (3, 9 i 15 minuta) kod ASE na ekstrakcijske prinose i antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom (vrijednosti izražene kao EC_{50} - koncentracija ekstrakta neophodne za postizanje 50 % smanjenje početne koncentracije DPPH) kod mikroalge *Spirulina platensis* primjenom različitih otapala: heksana, petroleum etera, etanola i vode, pomoću modela višestruke linearne regresije (MLR). U provedenom istraživanju optimalni uvjeti ekstrakcije za proizvodnju ekstrakata s najvišim ekstrakcijskim prinosima i najboljim antioksidacijskim svojstvima

značajno su se razlikovali ovisno o primijenjenim otapalima, a slično kao u našem istraživanju optimalna temperatura za postizanje maksimalnih vrijednosti ekstrakcijskog prinosa bila je viša u odnosu na optimalne vrijednosti temperature potrebne za postizanje najboljih antioksidacijskih svojstava. Tako je, primjerice, uz primjenu etanola kao otapala za postizanje minimalnih vrijednosti EC_{50} optimalna temperatura bila 111 °C uz vrijeme ekstrakcije 15 minuta, a maksimalni ekstrakcijski prinos ostvaren je uz temperaturu 170 °C i vrijeme ekstrakcije 5 min. Uz primjenu heksana kao otapala, za postizanje minimalne vrijednosti EC_{50} optimalna temperatura ekstrakcije bila je 90 °C uz vrijeme ekstrakcije 3 min, dok su se za postizanje maksimalnih ekstrakcijskih prinosa optimalnim pokazali temperatura ekstrakcije 170 °C i vrijeme ekstrakcije 15 min.

5.3.3. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom analize uz primjenu vodenih otopina etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE iznosio je od 188,57 do 202,43 $\mu\text{mol TAE/g}$, dok su u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz upotrebu vodenih otopina metanola određene sljedeće vrijednosti: 189,61-195,85 $\mu\text{mol TAE/g}$ (*tablica 26*).

Prema rezultatima analize varijance (*tablica 27*) vidljivo je da je kod HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola, od pojedinačnih faktora ekstrakcije zabilježen statistički značajan utjecaj polarnosti etanola, tlaka i vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet. Više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom analize ostvarene su uz upotrebu 50 %-tnih vodenih otopina etanola te uz kraće vrijeme ekstrakcije i veći tlak. Osim statistički značajnog utjecaja navedenih pojedinačnih faktora zabilježen je ujedno i statistički značajan utjecaj temperature ekstrakcije u kombinaciji s vremenom ekstrakcije, te temperature ekstrakcije u kombinaciji s tlakom na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola. Uz primjenu vodenih otopina metanola od pojedinačnih faktora ekstrakcije zabilježen je statistički značajan utjecaj polarnosti metanola, međutim više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene su primjenom 70 %-tne vodene otopine metanola. Osim statistički značajnog utjecaja polarnosti metanola kao pojedinačnog faktora, utvrđen je još i statistički značajan utjecaj vremena ekstrakcije u kombinaciji s tlakom na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu vodenih otopina

metanola.

Prema rezultatima optimizacije (*tablica 28*) vidljivo je da su više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodom, ostvarene uz primjenu 50 %-tnih vodenih otopina etanola uz vrijeme ekstrakcije 5 min, odnosno 70 %-tnih vodenih otopina metanola uz vrijeme ekstrakcije 15 min. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina antioksidacijskog kapaciteta prikazani su u ovisnosti o temperaturi i tlaku ekstrakcije uz navedene optimalne vrijednosti vremena ekstrakcije i polarnosti otapala za etanolne i metanolne otopine prikazani su na *slici 43*.

Uz primjenu vodenih otopina etanola (*slika 43a*), zabilježen je negativan utjecaj temperature na antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine određen DPPH metodom. Negativan utjecaj temperature posebno je izražen pri višim temperaturama. Suprotno, tlak je pozitivno utjecala na antioksidacijski kapacitet. Stoga su, uz primjenu vodenih otopina etanola maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom ostvarene uz nižu temperaturu ekstrakcije (40 °C) i viši tlak (500 MPa).

Uz primjenu vodenih otopina metanola (*slika 43b*), zabilježen je pad antioksidacijskog kapaciteta s povećanjem temperature, dok je iz odzivne krivulje vidljivo da temperatura ekstrakcije nije imala utjecaj na antioksidacijski kapacitet. Uz primjenu vodenih otopina metanola maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom analize ostvarene su uz niže vrijednosti tlaka (200 MPa) neovisno o primijenjenoj temperaturi.

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom uz primjenu vodenih otopina etanola u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pomoću HPAE iznosio je: 67,43-118,11 mg AAE/g, a u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima uz upotrebu vodenih otopina metanola određene su sljedeće vrijednosti: 75,31-97,27 mg AAE/g (*tablica 26*).

Prema rezultatima analize varijance (*tablica 27*) vidljivo je da je kod HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola, od pojedinačnih faktora ekstrakcije zabilježen statistički značajan utjecaj utjecaj polarnosti etanola na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom. Više vrijednosti ostvarene su uz upotrebu 50 %-tnih vodenih otopina etanola.

Osim statistički značajnog utjecaja polarnosti etanola kao pojedinačnog faktora ekstrakcije zabilježen je statistički značajan utjecaj polarnosti etanola u kombinaciji s tlakom te statistički značajan utjecaj vremena ekstrakcije u kombinaciji s tlakom na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu vodenih otopina etanola.

Uz primjenu vodenih otopina metanola od pojedinačnih faktora zabilježen je statistički značajan utjecaj temperature ekstrakcije. Osim navedenog, također je zabilježen statistički značajan utjecaj polarnosti metanola u kombinaciji s tlakom, polarnosti metanola u kombinaciji s temperaturom, te temperature ekstrakcije u kombinaciji s vremenom ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom kod ekstrakata cvijeta trnine dobivenih pomoću HPAE uz primjenu vodenih otopina metanola.

Uz upotrebu vodene otopine etanola za proizvodnju ekstrakata cvijeta trnine pomoću HPAE (*slika 44a*), maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom postignute su uz primjenu nižih temperatura ekstrakcije (40 °C) i nižih vrijednosti tlaka (200 MPa).

Uz upotrebu vodene otopine metanola (*slika 44b*), temperatura ekstrakcije također je utjecala negativno na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, a s povećanjem tlaka utvrđeno je blago povećanje antioksidacijskog kapaciteta pa su maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom ostvarene uz niže temperature ekstrakcije (40 °C) i viši tlak (500 MPa).

Na osnovi rezultata optimizacije (*tablica 28*) i prethodno navedenog u raspravi vidljivo je da su se kod HPAE, optimalne vrijednosti polarnosti otapala, temperature i vremena ekstrakcije te tlaka razlikovale, kao i kod MAE i ASE, ovisno o metodi analize primijenjene za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, ali i vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju. Za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom analize, uz upotrebu vodenih otopina etanola optimalan udio etanola je 50 %, optimalna temperatura je 40 °C uz kombinaciju kraćeg vremena ekstrakcije (5 min) i višeg tlaka (500 MPa). Uz primjenu vodenih otopina metanola kao otapala, optimalan udio metanola je 70 %, optimalna temperatura ekstrakcije je 60 °C uz kombinaciju dužeg vremena ekstrakcije (15 min) i nižeg tlaka (200 MPa).

Za antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, isto kao i za antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom uz primjenu vodenih otopina etanola optimalan udio etanola u otapalu je 50 %. Uz primjenu metanolnih vodenih otopina, optimalan udio metanola je 70 %. Niža temperatura ekstrakcije (40 °C) pokazala se optimalnom i u slučaju primjene vodenih otopina etanola i vodenih otopina metanola, međutim vrijeme ekstrakcije i tlak su se razlikovali ovisno o primijenjenoj vrsti otapala, pa se tako u slučaju upotrebe vodenih otopina etanola kombinacija dužeg vremena ekstrakcije (15 min) i nižeg tlaka (200 MPa) pokazala optimalnom, dok se u slučaju vodenih otopina metanola obrnuto - kraće vrijeme ekstrakcije (5 min) uz veći tlak (500 MPa) pokazalo optimalnim.

Usporedbom predviđenih antioksidacijskog kapacitet određen DPPH i FRAP metodom pri optimalnim uvjetima HPAE tehnike vidljive su više predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta uz primjenu vodene otopine etanola kao otapala. Tako, uz upotrebu vodene otopine etanola predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapacitet određenog DPPH metodom iznose 202,04 $\mu\text{mol TAE/g}$, dok predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapacitet određenog FRAP metodom iznose 114,67 mg AAE/g. Uz upotrebu vodenih otopina metanola predviđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH i FRAP su: 195,79 $\mu\text{mol TAE/g}$ i 96,54 mg AAE/g.

U istraživanju koje su proveli Alexandre i sur. (2017) ABTS, DPPH i FRAP metodama analize određivan je antioksidacijski kapacitet u ekstraktima industrijskog otpada od smokava proizvedenima pomoću HPAE. U provedenom istraživanju metodom odzivnih površina (RSM) je ispitan utjecaj polarnosti etanola (0, 40 i 80 %), tlaka (0,1, 300 i 600 MPa) i vremena ekstrakcije (5, 17,5 i 30 min). metodama, dok vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet neovisno o primijenjenom metodi analize određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Od kombiniranih varijabli zabilježen je utjecaj kombinacije faktora tlaka x vrijeme ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom odnosno kombinacije faktora tlaka x polarnost etanola na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, dok su se u slučaju antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom obje navedene kombinacije faktora (tlak x vrijeme ekstrakcije, tlak x polarnost etanola) pokazale kao statistički značajne. U slučaju antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom kao optimalni uvjeti ekstrakcije određeni su tlak 600 MPa, vrijeme ekstrakcije 27 min uz 10 % otopinu etanola kao otapalo. U slučaju antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom optimalni uvjeti su: tlak 600 MPa, vrijeme ekstrakcije 29 min i 15 % otopina etanola kao otapalo. U slučaju FRAP metode maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ostvarene su uz također uz tlak 600 MPa, 13 % otopinu etanola kao otapalo i uz kraće vrijeme ekstrakcije - 22 min. Iz navedenih rezultata je vidljivo da se optimalno vrijeme i optimalna polarnost metanola razlikuju ovisno o primijenjenoj tehnici, međutim za sve tri metode maksimalne vrijednosti tlaka su se pokazale optimalnima. Također, u istraživanju koje su proveli Alexandre i sur. (2017) ekstrakcija je provedena na konstantnoj temperaturi od 25 °C, čime je izbjegnuta degradacija termolabilnih spojeva, uslijed korištenja više vrijednosti tlaka i dužeg vremena ekstrakcije.

U istraživanju koje su proveli Prasad i sur. (2010) također se najviši korišteni tlak (500 MPa) pokazao optimalnim za postizanje maksimalnog antioksidacijskog kapaciteta određenog

DPPH metodom u ekstraktima perikarpa longan voća dobivenima primjenom HPAE. Međutim i u navedenom istraživanju, ekstrakcija je provedena pri konstantnoj temperaturi (30 °C) koja je niža od temperatura korištenih u našem istraživanju.

Pretraživanjem literature nisu utvrđeni rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine dobivenog nekom od novih tehnika ekstrakcije, međutim u već ranije spomenutom istraživanju koje su proveli Marchelak i sur. (2017) ispitan je antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine, dobivenih primjenom Soxhlet ekstrakcije DPPH, FRAP i TBARS metoda analize. Ovisno o otapalu primijenjenom za ekstrakciju kod DPPH metode su određene EC_{50} vrijednosti iznosile su od 1,63 do 51,32 $\mu\text{g/mL}$, odnosno od 1,31 do 36,02 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ kod FRAP metode. Primjenom TBARS metode određene su IC_{50} vrijednosti u rasponu od 1,85 do 49,73 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati nisu direktno usporedivi s rezultatima dobivenim u okviru ovog istraživanja obzirom da su rezultati iskazani na drugačiji način, međutim u navedenom istraživanju pokazano je da su rezultati dobiveni FRAP metodom imali najvišu korelaciju s količinom ukupnih fenola i ukupnih flavonoida određenih u ekstraktima cvijeta trnine.

5.4. Antiproliferativno djelovanje ekstrakata cvijeta trnine

Za mnoge biljne vrste kroz povijest se pokazalo da posjeduju ljekovita svojstva, a određenim bioaktivnim molekulama pripisuje se i antikancerogeno djelovanje. Danas je najviše korištenih lijekova za rak izvedeno upravo iz prirodnih izvora, a zbog njihove niske toksičnosti sve je veći interes za upotrebom prirodnih proizvoda kao izvora antiproliferativnih/citotoksičnih susptanci u tradicionalnoj medicini Azije, sjeverne Amerike i Europe (Bilir i sur., 2018). Pozitivni učinci na zdravlje, pa tako vjerojatno i citotoksični učinci cijele biljke su obično veći od učinka koji imaju određeni biološki aktivni spojevi pojedinačno, zbog mogućeg pojačanog sinergističkog djelovanja različitih spojeva (Caesar i Cech, 2019). Stoga je, u okviru ovog istraživanja ispitano antiproliferativno djelovanje ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 - staničnoj liniji humanog karcinoma jetre primjenom *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metoda.

Učinci etanolnog ekstrakta cvijeta trnine na vijabilnost Hep G2 stanica ispitani su u koncentracijama 10, 50, 100, 150 i 200 $\mu\text{g/mL}$ primjenom *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metoda, odnosno u koncentracijama od 10, 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$ primjenom *Trypan Blue* metode. Kako bi se isključila potencijalna toksičnost etanola paralelno s ispitivanjem citotoksičnosti ekstrakata

cvijeta trnine je ispitan i učinak etanola na Hep G2 stanice. Proliferacija stanica tretiranih s etanolom (kontrola) i stanica tretiranih različitim koncentracijama ekstrakta cvijeta trnine praćena je nakon 24, 48 i 72 sata primjenom *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metoda, odnosno nakon 24 sata primjenom *Trypan Blue* metode.

Određivanje proliferacije stanica primjenom *Kenacid Blue* metode provedeno je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu. Boja apsorbirana od strane Hep G2 stanica je pokazatelj stupnja proliferacije budući da se bojom *Kenacid Blue* boje proteini u živim stanicama.

Određivanje proliferacije stanica primjenom *Neutral Red* metode provedeno je također spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu. Obzirom da se *Neutral Red* boja akumulira u lizosomima živih stanica, smanjenje vijabilnosti Hep G2 stanica očituje se kao smanjenje apsorbancije.

Određivanje proliferacije stanica primjenom *Trypan Blue* metode provedeno je brojanjem živih i mrtvih stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. *Trypan Blue* ulazi samo u stanice s oštećenom membranom, pa su velike tamno plavo obojane stanice označene kao mrtve, dok su nebojane stanice označene kao žive stanice. Rezultati ispitivanja antiproliferativnog učinka cvijeta trnine na Hep G2 stanice statistički su obrađeni pomoću Studentovog *t*-testa, kako bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka stanica koji su tretirani ekstraktima cvijeta trnine odnosno kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između različitih koncentracija ekstrakta cvijeta trnine korištenih u ovom istraživanju.

Učinak ekstrakta cvijeta trnine (10-200 µg/mL) na Hep G2 stanice određen primjenom *Kenacid Blue* metode prikazan je na slici 45. Statistički značajan ($p < 0,05$) citotoksični učinak određen je već uz primjenu 50 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine nakon 24-satnog izlaganja Hep G2 stanica. Nakon 48-satnog tretmana, statistički značajno ($p < 0,01$) smanjenje proliferacije stanica zabilježeno je uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine od 150 µg/mL i 200 µg/mL. Nakon 72-satnog tretmana Hep G2 stanica ekstraktom cvijeta trnine statistički značajan citotoksični učinak zabilježen je već pri najnižoj upotrijebljenoj koncentraciji od 10 µg/mL ($p < 0,05$), ali i pri višim koncentracijama – 50 µg/mL ($p < 0,01$) i 100-200 µg/mL ($p < 0,001$) primjenom *Kenacid Blue* metode.

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine (10-200 µg/mL) u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom praćena je tijekom 24, 48 i 72 sata *Kenacid Blue* metodom te je prikazana na slici 48. Iz pripadajućih jednadžbi interpoliranih polinomnih

krivulja nakon 24 (slika 48a), 48 (slika 48b) i 72 sata (slika 48c) izračunate su IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti koje predstavljaju one koncentracije ekstrakta cvijeta trnine kod kojih dolazi do 20, 50 i 80 %-tne inhibicije staničnog rasta. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine nakon 24 sata iznosi 153,25 $\mu\text{g/mL}$, nakon 48 sata 128,59 $\mu\text{g/mL}$ i nakon 72 sata 52,70 $\mu\text{g/mL}$ određeno metodom *Kenacid Blue* (Tablica 29).

Učinak ekstrakta cvijeta trnine (10-200 $\mu\text{g/mL}$) na Hep G2 stanice određen primjenom *Neutral Red* metode prikazan je na slici 46. Statistički značajan ($p < 0,001$) citotoksični učinak određen je također već uz primjenu 50 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta cvijeta trnine nakon 24-satnog izlaganja Hep G2 stanica. Nakon 48-satnog tretmana, statistički značajno ($p < 0,005$) smanjenje proliferacije stanica zabilježeno je, također, uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine od 50 $\mu\text{g/mL}$, ali i pri upotrebi viših koncentracija - 100-200 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). Nakon 72-satnog tretmana Hep G2 stanica ekstraktom cvijeta trnine statistički značajan citotoksični učinak zabilježen je također pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,025$) te pri višim koncentracijama - 100-200 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) primjenom *Neutral Red* metode.

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine (10-200 $\mu\text{g/mL}$) u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom praćena tijekom 24, 48 i 72 sata *Neutral Red* metodom prikazana je na slici 49. Iz pripadajućih jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja nakon 24 (slika 49a), 48 (slika 49b) i 72 sata (slika 49c) izračunate su IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine nakon 24 sata iznosi 90,35 $\mu\text{g/mL}$, nakon 48 sata 61,78 $\mu\text{g/mL}$ i nakon 72 sata 53,65 $\mu\text{g/mL}$ određeno metodom *Neutral Red* (Tablica 30).

Učinak ekstrakta cvijeta trnine (10-100 $\mu\text{g/mL}$) nakon 24-satnog izlaganja Hep G2 stanica određen primjenom *Trypan Blue* metode prikazan je na slici 47. Statistički značajan ($p < 0,01$) citotoksični učinak određen je također uz primjenu 50 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta cvijeta trnine te uz primjenu ekstrakta cvijeta trnine više koncentracije - 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,005$) primjenom *Trypan Blue* metode.

Ovisnost preživljavanja Hep G2 stanica o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine (10-100 $\mu\text{g/mL}$) u odnosu na kontrolu tretiranu etanolom praćena je tijekom 24 sata *Trypan Blue* metodom te je prikazana na slici 50. Iz pripadajuće jednadžbe interpolirane polinomne krivulje izračunate su IC_{20} , IC_{50} i IC_{80} vrijednosti. IC_{50} vrijednost za ekstrakt cvijeta trnine nakon 24 sata iznosi 29,47 $\mu\text{g/mL}$ određeno metodom *Trypan Blue* (Tablica 31).

Prema Sajjadi i sur. (2015) kriterij prema kojem se neka supstanca može označiti kao toksična je sljedeći: visoko toksične supstance imaju IC_{50} vrijednost $\leq 20 \mu\text{g/mL}$, umjereno

toksične supstance imaju IC_{50} između 21 i 200 $\mu\text{g/mL}$, slabo toksične supstance imaju IC_{50} između 201 i 500 $\mu\text{g/mL}$ dok se supstance čija je IC_{50} vrijednost $> 501 \mu\text{g/mL}$ označavaju kao netoksične.

Na osnovu gore navedenih kriterija, prema IC_{50} vrijednostima dobivenima u ovom istraživanju primjenom *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metoda ekstraktu cvijeta trnine se može pripisati umjerena toksična odnosno antiproliferativna aktivnost, neovisno o metodi korištenoj za određivanje antiproliferativnih svojstva.

IC_{50} vrijednosti dobivene *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metodama ukazuju na činjenicu da se toksična aktivnost ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 stanice povećava s koncentracijom ekstrakta cvijeta trnine, ali i s vremenom, obzirom da je zabilježeno smanjenje IC_{50} vrijednosti s produženjem vremena tretiranja Hep G2 stanica ekstraktom cvijeta trnine. Obzirom da je kod *Trypan Blue* metode inkubacija provedena samo nakon vremenskog razdoblja od 24 h, rezultati *Trypan Blue* metode na ovaj način ne mogu se uspoređivati sa druge dvije metode, ali je i na osnovu rezultata određivanja citotoksičnog učinka *Trypan Blue* metodom vidljivo da se toksični učinak ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 stanice pojačava s povećanjem koncentracije ekstrakta cvijeta trnine. Naime, primjenom ekstrakta cvijeta trnine koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ postignuta je inhibicija rasta Hep G2 stanica oko 22 %, dok je primjenom veće koncentracije (100 $\mu\text{g/mL}$) postignuta inhibicija rasta Hep G2 stanica viša od 90 % u odnosu na kontrolne stanice (slika 50).

Također, usporedba IC_{50} vrijednosti dobivenih primjenom sve tri korištene metode (Tablica 29, 30 i 31), nakon 24-satne inkubacije, upućuje na zaključak da je *Trypan Blue* metoda osjetljivija od druge dvije metode korištene u ovom istraživanju. Navedena razlika u rezultatima može se pripisati razlici u mehanizmu između navedenih metoda. Primjenom metode *Trypan Blue* boja ulazi samo u stanice s oštećenom membranom pa tako mrtve stanice postaju plavo obojene dok žive stanice ostaju neobojene. Međutim činjenica da se kod *Trypan Blue* metode određivanje proliferacije zasniva na brojanju stanica pomoću Fuchs-Rosenthalove komorice nosi sa sobom mogućnost pogreške u brojanju koja je oko 10 %. Pogreška u brojanju stanica može se pripisati lošoj disperziji stanica odnosno gubitku stanica tijekom disperzije stanica, netočnom razrjeđivanju stanica, prisutnosti mjehurića zraka u komori ili nepravilnom punjenju komore. Također, *Trypan Blue* metodom nije moguće razlikovanje zdravih stanica i stanica koje su žive, ali gube stanične funkcije, a također je i zabilježen toksičan učinak *Trypan Blue* boje koja se koristi u ovoj metodi na stanice sisavaca (Aslantürk, 2017).

U različitim do sada objavljenim istraživanjima utvrđeno je da biljni ekstrakti inhibiraju

rast stanica ovisno, ne samo o koncentracijama korištenih ekstrakata, nego i o korištenim staničnim linijama (Al-Oqail i sur., 2016).

U istraživanju koje su proveli Machana i sur. (2012) ispitana je antiproliferativna aktivnost ekstrakata lišća biljne vrste *Polyalthia evecta* dobivenih primjenom 50 % vodenih otopina etanola kao otapala, na Hep G2 liniju nakon 24-satne inkubacije metodom *Neutral Red*. U navedenom istraživanju zabilježena je statistički značajna citotoksičnost ispitnog ekstrakta na Hep G2 liniju ($p < 0,05$), a IC_{50} vrijednosti izračunate nakon 24 satne inkubacije (62,8 $\mu\text{g/mL}$) nešto su niže od IC_{50} vrijednosti dobivenih u okviru našeg istraživanja, izračunatih *Neutral Red* metodom nakon 24 satne inkubacije (90,35 $\mu\text{g/mL}$).

U istraživanju koje su proveli Khazaei i sur. (2017) MTT metodom je ispitana antiproliferativna aktivnost metanolnih ekstrakata cvijeta biljne vrste *Allium Atroviolaceum* na Hep G2 liniju nakon inkubacije od 24, 48 i 72 h. Slično, kao i u našem istraživanju utvrđen je citotoksičan učinak ispitane biljne vrste ovisan o dozi i vremenu inkubacije, pa su izračunate IC_{50} vrijednost nakon 24-satne inkubacije iznosile 57,5 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 44 $\mu\text{g/mL}$ nakon inkubacije od 48 h i 26,67 $\mu\text{g/mL}$ nakon inkubacije u trajanju 72 h. Rezultati su pokazali da ekstrakti nisu uzrokovali citotoksični učinak na normalnim stanicama (3T3 stanična linija mišjih fibroblasta), iz čega se može zaključiti da antikancerogena aktivnost ekstrakata cvijeta *Allium Atroviolaceum* može biti specifična samo za kancerogene Hep G2 stanice.

Drugih literaturnih podataka o učincima cvijeta i ostalih dijelova trnine na Hep G2 staničnu liniju nema, ali postoje rezultati ispitivanja antiproliferativnih svojstava ekstrakta cvijeta trnine na drugim staničnim linijama. U istraživanju koje su proveli Murati i sur. (2019) ispitana je antiproliferativna aktivnost etanolnih ekstrakata cvijeta trnine (5-200 $\mu\text{g/mL}$) na kanceroznim Hepa 1-6 stanicama i paralelno na normalnim nekanceroznim AML 12 jetrenim stanicama pomoću *Trypan Blue* i *Kenacid Blue* metoda, nakon inkubacije od 24 i 72 sata. IC_{50} vrijednosti dobivene primjenom *Trypan Blue* metode na Hepa 1–6 staničnoj liniji više su od IC_{50} vrijednosti dobivenih istom metodom na Hep G2 stanicama u ovom istraživanju te iznose 166,87 $\mu\text{g/mL}$ nakon 24-satne inkubacije, odnosno 43,65 $\mu\text{g/mL}$ nakon 72-satne inkubacije. U istom istraživanju metodom *Kenacid Blue* izračunate IC_{50} vrijednosti iznose: 172,93 $\mu\text{g/mL}$ nakon 24-satne inkubacije, odnosno 85,41 $\mu\text{g/mL}$ nakon 72-satne inkubacije. Izračunate IC_{50} vrijednosti dobivene *Trypan Blue* metodom nakon tretmana AML 12 stanične linije ekstraktom cvijeta trnine iznose 59,05 $\mu\text{g/mL}$ nakon 24-satne inkubacije, odnosno 37,98 $\mu\text{g/mL}$ nakon 72-satne inkubacije. Metodom *Kenacid Blue* dobivene su sljedeće IC_{50} vrijednosti: 72,69 $\mu\text{g/mL}$ nakon 24-satne inkubacije, odnosno 21,07 $\mu\text{g/mL}$ nakon 72-satne inkubacije AML 12 stanične

linije. Rezultati dobiveni u istraživanju koje su proveli Murati i sur. (2019) također ukazuju na pojačan inhibicijski učinak s vremenom izlaganja stanica ekstraktu cvijeta trnine, ali i navode na zaključak da je inhibicijski učinak ekstrakata cvijeta trnine jači kod nekanceroznih AML 12 stanica nego kod kanceroznih Hepa 1-6 stanica.

5.4.1. Određivanje vijabilnosti Hep G2 stanica metodom protočne citometrije nakon tretmana stanica ekstraktom cvijeta trnine

Metodama *Trypan Blue*, *Neutral Red* i *Kenacid Blue* moguće je odrediti antiproliferativna svojstva biljnih ekstrakata, ali ne i tip stanične smrti. Apoptoza predstavlja reguliran i kontroliran proces samouništenja stanica, a nekroza je pasivna stanična smrt koja nastaje kao posljedica poremećaja u okolini i obilježena je nekontroliranim oslobađanjem staničnog sadržaja. Apoptoza je uključena u mnoge normalne biološke procese, a moguće ju je inducirati raznim kemikalijama, uključujući kemoterapijska sredstva koja oštećuju DNK (Fink i Cookson 2005; Ormerod i sur., 1993). Za razliku od nekroze koja ima upalni učinak na okolne stanice, apoptoza ne remeti funkcioniranje okolnih stanica (Machana i sur., 2011). Obzirom da stanice raka potječu iz normalnih stanica, sredstvo koje može selektivno uništiti samo transformirane stanice raka bez da utječe na normalne stanice predstavlja idealno kemoterapijsko sredstvo (Ma i sur., 2020). Stoga je sposobnost selektivnog izazivanja stanične smrti kancerogenih stanica putem apoptoze važna osobina kemoterapijskih sredstava (Kntayya i sur., 2018). Ispitivanje uzročnika koji mogu izazvati apoptozu stanica karcinoma jedan je od ciljeva kliničkog ispitivanja karcinoma (Ma i sur., 2020) te je sve veći broj studija koje istražuju nova antikancerogena sredstva s potencijalnim apoptotičkim efektom (Tan i sur., 2018). Najbolje metode za razlikovanje apoptoze od nekroze su elektronska mikroskopija te protočna citometrija (Ormerod i sur., 1993).

U okviru ovog istraživanja provedena je detekcija apoptoze i nekroze Hep G2 stanica tretiranih etanolnim ekstraktom cvijeta trnine pomoću florescentnih boja *Muse annexin V & dead cell* kita metodom protočne citometrije pomoću *Muse Cell Analyzer*-a.

Slika 51 prikazuje reprezentativne „dot plot“ dijagrame dobivene primjenom protočne citometrije i *Muse annexin V & dead cell assay kit*-a. Na dijagramima su vidljive populacije živih, mrtvih te Hep G2 stanica u (ranoj i kasnoj) fazi apoptoze nakon 24-satnog tretmana stanica etanolnim ekstraktom cvijeta trnine (10, 50 i 100 µg/mL) uz stanice tretirane samo etanolom koje su služile kao kontrola. U donjem lijevom kvadrantu na svakom dijagramu su

žive stanice koje su negativne na PE i 7-AAD. U donjem desnom kvadrantu se nalaze stanice u ranoj apoptozi koje su pozitivne na PE te negativne na 7-AAD. Gornji desni kvadrant zauzimaju stanice koje su u kasnoj apoptozi ili su mrtve te su pozitivne na PE kao i na 7-AAD. U gornjem lijevom kvadrantu nalazi se mrtve stanica (stanice koje nisu umrle procesom apoptoze), a koje su negativne na PE i pozitivne na 7-AAD. Na osnovu postotaka prikazanih u kvadrantima „dot plot“ dijagrama kreirana je *tablica 32* u kojoj su brojčano prikazani postoci živih, ukupno apoptotičkih (suma ranih i kasnih apoptotičkih stanica) i mrtvih stanica nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine različitih koncentracija.

Prema „dot-plot“ dijagramima prikazanim na *slici 51* i rezultatima sumiranim u *tablici 32* vidljivo je da s porastom koncentracije ekstrakta cvijeta trnine dolazi do smanjenja udjela živih Hep G2 stanica. Udio živih stanica u kontrolnom uzorku iznosi 97,70 %, dok pri upotrebi ekstrakta cvijeta trnine u koncentraciji od 10 µg/mL udio živih stanica iznosi 58,30 %, a pri upotrebi ekstrakta cvijeta trnine najvišeg koncentracije (100 µg/mL) udio živih stanica iznosi samo 5,75 %. S porastom koncentracije raste broj mrtvih – nekrotičnih stanica u tretiranim uzorcima. U kontrolnim (netretiranim) uzorcima broj mrtvih stanica iznosi 0,40 %, dok s porastom koncentracije ekstrakta cvijeta trnine raste broj mrtvih stanica i iznosi: 4,95 % uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine koncentracije 10 µg/mL, odnosno 44,55 % uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine koncentracija 50 µg/mL te 69,25 % uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine koncentracije 100 µg/mL.

Pri upotrebi ekstrakta cvijeta trnine najniže koncentracije (10 µg/mL) određena je najveća razina apoptotičkih stanica (36,75 %). Povećanjem koncentracije postotak rano apoptotičkih stanica je smanjen i iznosi 25,40 % uz upotrebu ekstrakta cvijeta trnine od 50 µg/mL, odnosno 25,00 % uz upotrebu ekstrakta cvijeta koncentracije 100 µg/mL.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da ekstrakt cvijeta trnine ima negativan utjecaj na vijabilnost Hep G2 stanica. S povećanjem koncentracije ekstrakta raste i broj mrtvih - nekrotičnih stanica. Neovisno o upotrebnoj koncentraciji, zabilježeno je odumiranje stanica putem oba tipa stanične smrti: nekroze i apoptoze. Međutim, ovisno o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine mijenja se odnos stanica koje su umrle apoptozom u odnosu na stanice koje su umrle nekrozom, pa je tako pri najnižoj koncentraciji najviši udio stanica koje su umrle apoptozom, a s povećanjem koncentracije ovaj se odnos povećava u korist stanica koje su umrle nekrozom.

Suprotno rezultatima našeg istraživanja, Machana i sur. (2012) su utvrdili povećanje udjela apoptotičkih stanica s povećanjem koncentracije ekstrakta lišća biljne vrste *Polyalthia*

evecta dobivenih primjenom 50 % vodenih otopina etanola kao otapala, kojim je tretirana Hep G2 stanična linija. Pri koncentraciji ekstrakta od 140 µg/mL udio stanica koje su umrle apoptozom iznosio je 46,4 %, dok je pri koncentraciji ekstrakta 500 µg/mL udio stanica koje su umrle apoptozom iznosio 92,8 %. Paralelno s ispitivanjem apoptotičkog efekta navedene biljne vrste ispitano je i djelovanje melfalana, lijeka koji se koristi za liječenje određenih vrsta raka i nakon tretmana Hep G2 stanica navedenim lijekom udio apoptotičkih stanica bio je niži (41,6 %) u odnosu na navedene udjele apoptotičkih stanica nakon tretmana Hep G2 stanica ekstraktom lišća biljne vrste *Polyalthia evecta*.

U radu Murati i sur. (2019) također je metodom protočne citometrije provedeno određivanje tipa stanične smrti nakon što su kancerogene Hepa 1–6 i nekancerogene AML12 stanice jetre izložene 24-satnom djelovanju ekstrakta cvijeta trnine koncentracije 10, 50 i 100 µg/mL. U navedenom istraživanju pokazano je da ekstrakt cvijeta trnine ima antiproliferativni učinak na obje vrste stanica, a udio mrtvih stanica povećava se s povećanjem koncentracije korištenog ekstrakta. Tako je, kod Hepa 1-6 udio mrtvih stanica iznosio 2,10 % pri koncentraciji 10 µg/mL odnosno 80,81 % pri koncentraciji 100 µg/mL. Kod AML12 udio mrtvih stanica iznosio je 1,10 % pri koncentraciji 10 µg/mL, a 80,35 % pri koncentraciji 100 µg/mL. Kod obje stanične linije, neovisno o koncentraciji ekstrakta cvijeta trnine detektiran je nizak udjel stanica koje su umrle apoptozom i iznosi od 0,14-0,54 % kod Hepa 1-6 jetrenih stanica te 1,60 - 3,45 % kod AML12 jetrenih stanica, dok je broj stranica koje su umrle nekrozom visok. Prema Murati i sur. (2019) visoku razinu nekroze kod oba tipa stanica moguće je povezati s cijanogenim svojstvima ekstrakta cvijeta trnine. Obzirom da je u našem istraživanju također kao i u istraživanju koje su proveli Murati i sur. (2019) utvrđen porast broja udjela nekrotičnih stanica s porastom koncentracije, može se pretpostaviti da se stanična smrt jednim dijelom događa zbog cijanogenih svojstava cvijeta trnine, ali je u našem istraživanju također zabilježen značajan broj stanica koje su umrle apoptozom što može upućivati na antikancerogeno djelovanje ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 stanice.

Obzirom na navedeno i činjenicu da je najviša razina apoptotičkih stanica utvrđena pri najnižoj koncentraciji, u daljnjem istraživanju potrebno je ispitati citotoksičnost ekstrakta cvijeta trnine na normalnim stanicama te ujedno i citotoksičnost ekstrakta cvijeta trnine niže koncentracije u odnosu na najnižu koncentraciju korištenu u ovom istraživanju.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u okviru ovog istraživanja i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta trnine ovisi o primijenjenim tehnikama ekstrakcije (MAE, ASE i HPAE), primijenjenim uvjetima ekstrakcije, kao i o ciljanoj skupini fenolnih spojeva. Kod MAE i HPAE primjena 70 %-tne vodene otopine etanola ili metanola osigurava u prosjeku veće prinose istraživanih fenolnih spojeva (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi i ukupne hidroksicimetne kiseline). Kod ASE najveće prinose fenolnih spojeva osigurava primjena 68 %-tne vodene otopine etanola odnosno primjena 70 %-tne vodene otopine metanola. Nadalje, optimalni uvjeti pri kojima se ostvaruju veći prinosi istraživanih skupina fenolnih spojeva su kako slijedi:
 - kod MAE: (i) za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine etanola - temperatura 60 °C te vrijeme ekstrakcije 25 minuta; (ii) za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine metanola - temperatura 54 °C te vrijeme ekstrakcije 16 min;
 - kod ASE: (i) za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine etanola – temperatura ekstrakcije 100 °C uz provođenje ekstrakcije u 3 ciklusa; (ii) za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine metanola - temperatura ekstrakcije 100 °C uz provođenje ekstrakcije u 1 ciklusu;
 - kod HPAE: (i) za ekstrakte dobivene primjenom vodene otopine etanola – vrijeme ekstrakcije 5 min, temperatura ekstrakcije 60 °C i tlak 200 MPa; (ii) za ekstrakte dobivene primjenom vodenih otopina metanola - vrijeme ekstrakcije 5 min, temperatura ekstrakcije 40 °C i tlak 500 MPa uz primjenu vodenih otopina metanola.
- Na osnovu usporedbe masenih udjela određivanih fenolnih skupina u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima pri optimalnim uvjetima primijenjenih tehnika, može se zaključiti da je za izolaciju ukupnih fenola najbolja MAE a zatim slijede ASE pa HPAE. Za izolaciju ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimetnih kiselina ASE tehnika se pokazala boljom, dok su MAE i HPAE bile podjednako učinkovite.
- Usporedba modelom predviđenih i eksperimentalnih dobivenih vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva kod MAE i ASE ukazuju na visoku točnost modela za predviđanje utjecaja uvjeta navedenih tehnika obzirom da se sve modelom predviđene vrijednosti razlikuju od eksperimentalno dobivenih unutar 10 %. Nešto lošija točnost modela za predviđanje utjecaja uvjeta ostvarena je kod HPAE tehnike: modelom predviđene vrijednosti ukupnih fenola razlikuju se za više od 10 % u odnosu na eksperimentalno određene vrijednosti.

- Antioksidacijski kapacitet ekstrakata cvijeta trnine razlikuje se ovisno o primijenjenim tehnikama ekstrakcije (MAE, ASE i HPAE), primijenjenim uvjetima ekstrakcije i metodi određivanja. Optimalni uvjeti pri kojima se postižu maksimalne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta različiti su od uvjeta optimalnih za ekstrakciju fenolnih spojeva iz čega se može zaključiti da antioksidacijskom kapacitetu cvijeta trnine, osim fenolnih spojeva, doprinose i drugi bioaktivni spojevi. Na osnovu rezultata optimizacije, vidljivo je da je najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima cvijeta trnine moguće ostvariti primjenom HPAE uz 50 %-tnu vodenu otopinu etanola te vrijeme ekstrakcije 5 min, temperaturu ekstrakcije 40 °C i tlak 500 MPa. U slučaju određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, moguće je ostvariti primjenom ASE uz 70 %-tnu vodenu otopinu etanola, temperaturu ekstrakcije 86 °C i provođenjem ekstrakcije u 3 ciklusa.
- Na temelju provedene HPLC analize, u ekstraktima cvijeta trnine određeni su fenolni spojevi, koji s obzirom na molekulsku strukturu, pripadaju sljedećim fenolnim skupinama: flavonol glikozidi (kamferol-pentozid, kamferol-ramnozid, kamferol-heksozil ramnozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-rutinozid, kvercetin-pentozid i kvercetin-acetil-rutinozid), flavanoli (procijanidina B i katehin) i hidroksicimetne kiseline (neoklorogenska kiselina, 3-*p*-kumaroilkinska kiselina, klorogenska kiselina i kafeinska kiselina). Sastav navedenih spojeva u ekstraktima cvijeta trnine je bio isti neovisno o primijenjenoj tehnici ekstrakcije s izuzetkom ekstrakata dobivenih primjenom MAE uz upotrebu vodene otopine etanola u kojima kvercetin-pentozid i kvercetin-ramnozid nisu identificirani. Maseni udjeli navedenih spojeva varirali su u ovisnosti o primijenjenoj tehnici ekstrakcije kao i o primijenjenom otapalu za ekstrakciju. Kamferol-pentozid je najzastupljeniji spoj u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom MAE, a procijandin B1 u ekstraktima dobivenima primjenom ASE. Navedeni spojevi zajedno čine oko 50 % svih identificiranih spojeva u ekstraktima dobivenim primjenom MAE i ASE. Iz navedenog se može zaključiti da su izbor tehnike ekstrakcije kao i primijenjeni uvjeti ekstrakcije uz identifikaciju i kvantifikaciju iznimno važni za karakterizaciju ekstrakata cvijeta trnine.
- Rezultati određivanja antiproliferativnog učinka ekstrakta cvijeta trnine na Hep G2 staničnoj liniji i izračunate IC₅₀ vrijednosti dobivene *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodama ukazuju na činjenicu da je toksična aktivnost ekstrakta cvijeta trnine ovisna o koncentraciji ekstrakta. Dodatno, rezultati dobiveni *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metodama pokazuju da je toksičnost ekstrakta cvijeta ovisna također i o

vremenu inkubacije, obzirom da je zabilježeno smanjenje IC_{50} vrijednosti s produženjem vremena inkubacije s 24 na 72 h. Na osnovu IC_{50} vrijednosti dobivenih primjenom *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metoda ekstraktu cvijeta trnine se može pripisati umjerena toksična aktivnost, neovisno o metodi korištenoj za određivanje antiproliferativnih svojstva i dužini izlaganja Hep G2 stanica ekstraktu cvijeta trnine.

- Metodom protočne citometrije je zabilježeno smanjenje udjela živih Hep G2 stanica s porastom koncentracije ekstrakta cvijeta trnine, ali je pri upotrebi ekstrakta cvijeta trnine najniže koncentracije određena najveća razina apoptotičkih stanica, što navodi a činjenicu da su potrebna daljnja istraživanja s ciljem ispitivanja citotoksičnosti ekstrakta cvijeta trnine nižih koncentracija u odnosu na najnižu koncentraciju korištenu u okviru ovog istraživanja.

7. LITERATURA

- Adefegha, A., Oboh, G., Ejakpovi, I., Oyeleye, S. (2015) Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: A structure–function perspective. *Comp. Clin. Path.* **24**, 1579–1585.
- Afoakwah, N., Owusu, J., Adomako, C., Teye, E. (2012) Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Bioscience and Biotechnology* **1**, 132-140.
- Aires, A. (2017) Phenolics in Foods: Extraction, Analysis and Measurements. U: Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications (Soto-Hernandez, Palma-Tenango, M., Garcia-Mateos, R., ured.), IntechOpen, London, str. 61-88.
- Al-Oqail, M. M., El-Shaibany, A., Al-Jassas, E., Al-Sheddi, E. S., Al-Massarani, S. M., Farshori, N. N. (2016) In vitro anti-proliferative activities of Aloe perryi flowers extract on human liver, colon, breast, lung, prostate and epithelial cancer cell lines. *Pak. J. Pharm. Sci.* **29**(2), 723-729.
- Al Jitan, S., Alkhoori, S. A., Yousef, L. F. (2018) Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. U: Studies in Natural Products Chemistry. (Rahman, A., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 389-417.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Abdul Mudalip, S. K., Olalere, O. A. (2018) Microwave-assisted extraction of Vernonia amygdalina leaf for optimal recovery of total phenolic content. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **10**, 16-24.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Olalere, O. A. (2020) Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from Vernonia amygdalina leaf using two-level factorial design. *J. King Saud Univ. Sci.* **32**(1), 7-16.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., Kabbashi, N. A. (2019) Extraction and characterization of bioactive compounds in Vernonia amygdalina leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *J. Taibah Univ. Sci.* **13**(1), 414-422.
- Alexandre, E. M. C., Araújo, P., Duarte, M. F., de Freitas, V., Pintado, M., Saraiva, J. A. (2017) High-pressure assisted extraction of bioactive compounds from industrial fermented fig by-product. *J. Food Sci. Technol.* **54**(8), 2519-2531.
- Aliaño-González, M., Ferreiro-González, M., Espada-Bellido, E., Carrera, Palma, Álvarez, Ayuso, Barbero, G. (2020) Extraction of Anthocyanins and Total Phenolic Compounds from Açai (Euterpe oleracea Mart.) Using an Experimental Design

Methodology. Part 1: Pressurized Liquid Extraction. *Agronomy* **10**, 183.

- Altuner, E., Islek, C., Çeter, T., Alpas, H. (2012) High Hydrostatic Pressure Extraction of Phenolic Compounds from *Maclura pomifera* fruits. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 930-937.
- Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., Ibañez, E. (2020) Pressurized Liquid Extraction. In: *Liquid-Phase Extraction*. (Poole, C. F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 375-398.
- Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D., Ramakrishnan, A. (2016) Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 230-236.
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., Kwon, J.-H. (2017) Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**(2), 295-315.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., Madhunapantula, S. V. (2016) An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.* **15**(1), 99.
- Anonymous 1, Cvijetovi trnine, <<http://powo.science.kew.org>>, pristupljeno 5.srpnja 2018.
- Anonymous 2, Plodovi trnine, <<http://powo.science.kew.org>>, pristupljeno 5.srpnja 2018.
- Anonymous 3, Mikrovalni reaktor Start S Microwave Labstation for Synthesis, <<https://www.andbio.com>>, pristupljeno 4. rujna 2020.
- Anonymous 4, Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350, <www.selectscience.net>, pristupljeno 4. rujna 2020.
- Anonymous 5, Uređaj za ekstrakciju potpomognutu visokim hidrostatskim tlakom, <<https://icar.org.in>>, pristupljeno 4. rujna 2019.
- Anonymous 6, Muse Cell Analyzer, <<http://www.merckmillipore.com>>, pristupljeno 10. rujna 2020.
- Arceusz, A., Wesolowski, M., Konieczynski, P. (2013) Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat. Prod. Commun.* **8**(12), 1821-1829.
- ATCC (2016) Hep G2 ATCC HB-8065, American Type Culture Collection, <<https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>>, pristupljeno 1. listopada 2020.

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**(4), 426-436.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**(1), 191-203.
- Basli, A., Belkacem, N., Amrani, I. (2017) Health Benefits of Phenolic Compounds Against Cancers. In: Phenolic Compounds - Biological Activity, (Hernández, M.S, Palma-Tenango, M., García-Mateos, R, ured.), IntechOpen, London, str. 193-210.
- Bassani, D. C., Nunes, D. S., Granato, D. (2014) Optimization of Phenolics and Flavonoids Extraction Conditions and Antioxidant Activity of Roasted Yerba-Mate Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using Response Surface Methodology. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **86**, 923-934.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2004) Food Chemistry. Berlin, Heidelberg, Germany, Springer-Verlag.
- Benayad, Z., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C., Es-Safi, N. E. (2014) Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Ind. Crops Prod.* **62**, 412-420.
- Berny-Lang, M. A., Frelinger, A. L., Barnard, M. R., Michelson, A. D. (2013) Flow Cytometry U: Platelets (Michelson, A. D., ured.), Academic Press, London, str. 581-602.
- Bilir, E., Tutun, H., Sevin, S., Kismali, G., Yarsan, E. (2018) Cytotoxic Effects of *Rhododendron ponticum* L. Extract on Prostate Carcinoma and Adenocarcinoma Cell Line (DU145, PC3). *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **24**, 451-457.
- Bozan, B., Altinay, R. C. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci. Technol. Res.* **20**(2), 409-414.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**(11), 317-333.
- Briones-Labarca, V., Giovagnoli-Vicuna, C., Canas-Sarazua, R. (2019) Optimization of

- extraction yield, flavonoids and lycopene from tomato pulp by high hydrostatic pressure-assisted extraction. *Food Chem.* **278**, 751-759.
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuña, C., Jamett, F. (2015) High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**(1), 525-534.
 - Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., Putnik, P. (2018) Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **254**, 150-157.
 - Caesar, L. K., Cech, N. B. (2019) Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat. Prod. Rep.* **36**(6), 869-888.
 - Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J. (2005) Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J Chromatogr. A* **1089**(1-2), 1-17.
 - Carciochi, R. A., D'Alessandro, L. G., Vauchel, P., Rodriguez, M. M., Nolasco, S. M., Dimitrov, K. (2017) Valorization of Agrifood By-Products by Extracting Valuable Bioactive Compounds Using Green Processes. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food.* (Grumezescui, A. M., Holban, A. M.,ured.), Academic Press, London, str. 191-228.
 - Carney, E. W., Settivari, R. (2013) Predictive Toxicology: Biological Assay Platforms.U: *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development.* (Faqi, A. S.,ured.), Academic Press, London, str. 777-806.
 - Casquete, R., Castro, S. M., Villalobos, M. C., Serradilla, M. J., Queirós, R. P., Saraiva, J. A., Córdoba, M. G., Teixeira, P. (2014) High pressure extraction of phenolic compounds from citrus peels. *High Press. Res.* **34**(4), 447-451.
 - Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G. C. (2017) An Energy-Based Approach to Scale Up Microwave-Assisted Extraction of Plant Bioactives. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food.* (Grumezescui,A. M, Holban, A. M.,ured.) Academic Press, London, str. 561-597.
 - Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* **10**(3), 178-182.

- Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Inter. J. Mol. Sci.* **13**(7), 8615-8627.
- Chen, C., Wang, L., Wang, R., Luo, X., Li, Y., Li, J., Li, Y., Chen, Z. (2017) Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food Chem.* **239**, 260-267.
- Chen, G.-L., Chen, S.-G., Xiao, Y., Fu, N.-L. (2018) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 30 flowers. *Ind. Crops Prod.* **111**, 430-445.
- Cheynier, V. (2012) Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* **11**(2-3), 153-177.
- Ciulu, M., Quirantes-Piné, R., Spano, N., Sanna, G., Borrás-Linares, I., Segura-Carretero, A. (2017) Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Ind. Crops Prod.* **108**, 106-112.
- Clarke, G., Ting, K., Wiart, C., Fry, J. (2013) High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants* **2**(1), 1-10.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **9**(1): 85-91.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.* **166**, 585-595.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014) *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* **61**, 31-40.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**(10), 7313-7352.
- Dent, M., Dragović Uzelac V., Penić, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food*

Technol. Biotechnol. **51**, 84-91.

- Díaz-de-Cerio, E., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Ferranti, P., Nicoletti, R., Perrotta, G. M., Gómez-Caravaca, A. M. (2018) Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Anal. Bioanal. Chem.* **10**(15), 3547-3557.
- Dikic, D., Balta, V., Kmetec, I., Murati, T., Orsolic, N., Dragovic Uzelac, V., Landeka, I. (2018) UPLC/MS analysis of plasma bioavailability of 32 polyphenols in C57BL/6 mice treated with single acute dose (24 h) of flower extract of the blackthorn *Prunus Spinosa* L. *Mol. Exp. Biol. Med.* **2**, 23-31.
- Dimitrios, B. (2006) Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**(9), 505-512.
- DiNardo, A., Brar, H. S., Subramanian, J., Singh, A. (2019) Optimization of microwave-assisted extraction parameters and characterization of phenolic compounds in Yellow European Plums. *Can. J. Chem. Eng.* **97**(1), 256-267.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* **22**(3), 296-302.
- Dragović-Uzelac, V., Garofulić, I. E., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012) The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.) Polyphenols. *Food Technol. Biotechnol.* **50**(3), 377-383.
- Dragović-Uzelac, V., Levaj, B., Bursać, D., Pedisić, S., Radojčić, I., Biško, A. (2007) Total Phenolics and Antioxidant Capacity Assays of Selected Fruits. *Agric. Conspec.Sci.* **72**(4), 279-284.
- Durmaz, E., Sumnu, G., Sahin, S. (2015) Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper. *Sep. Sci. Technol.* **50**(13), 1986-1992
- Dzialo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A. (2016) The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(2), 160.
- Elez Garofulic, I., Zoric, Z., Pedisic, S., Brncic, M., Dragovic-Uzelac, V. (2018) UPLC-MS(2) Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Food Sci.* **83**(11), 2782-2789.

- Fadić, K. (2016) Izolacija bioaktivnih komponenti iz cvijeta i lista trnine, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., Casati, P. (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* **3**, 222.
- Fang, X., Wang, J., Hao, J., Li, X., Guo, N. (2015) Simultaneous extraction, identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave-assisted extraction combined with HPLC–DAD–ESI–MS/MS. *Food Chem.* **188**, 527-536.
- Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**(3), 1039-1053.
- Fegredo, J. A., Wong, M. C. Y., Wiseman, H., Preedy, V. R. (2009) Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers. U: *Beer in Health and Disease Prevention.* (Preedy, V. R.,ured.), Academic Press, San Diego, str. 991-1002.
- Fernandes, L., Casal, S. I. P., Pereira, J. A., Ramalhosa, E., Saraiva, J. A. (2017) Optimization of high pressure bioactive compounds extraction from pansies (*Viola × wittrockiana*) by response surface methodology. *High Press. Res.* **37**(3), 415-429.
- Fernández-Ochoa, Á., Borrás-Linares, I., Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., González-Álvarez, I., Arráez-Román, D., Micol, V., Segura-Carretero, A. (2017) Phenolic compounds in rosemary as potential source of bioactive compounds against colorectal cancer: In situ absorption and metabolism study. *J. Funct. Foods* **33**, 202-210.
- Fink, S. L., Cookson, B. T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**(4), 1907-1916.
- Galano, A., Mazzone, G., Alvarez Diduk, R., Marino, T., Alvarez-Idaboy, J., Russo, N. (2016) Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **7**, 335-352.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* **5**(31), 6697-6703.
- Giada, M. d. L. R. (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases. A Role for*

- Antioxidants. (Morales-Gonzalez, J. A.,ured), IntechOpen., London, str. 87-112.
- Gomes, C. A., Girão da Cruz, T., Andrade, J. L., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M. (2003) Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure–Activity Study. *J. Med.Chem.* **46**(25), 5395-5401.
 - Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., David, J. M. (2017) Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem. J.* **132**, 28-35.
 - Grlić, L. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec Zagreb.
 - Haddadi-Guemghar, H., Janel, N., Dairou, J., Remini, H., Madani, K. (2014) Optimisation of microwave-assisted extraction of prune (*Prunus domestica*) antioxidants by response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**(10), 2158-2166.
 - Herrero, M., Martín-Álvarez, P., Señoráns, F., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2005) Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.* **93**, 417-423.
 - Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**(1), 339-346.
 - Howard, L. R., Clark, J. R., Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci .Food Agric.* **83**(12), 1238-1247.
 - Huang, H.-W., Cheng, M.-C., Chen, B.-Y., Wang, C.-Y. (2019) Effects of high pressure extraction on the extraction yield, phenolic compounds, antioxidant and anti-tyrosinase activity of *Djulis hull*. *J. Food Sci. Technol.* **56**(9), 4016-4024.
 - Huang, H.-W., Hsu, C.-P., Yang, B. B., Wang, C.-Y. (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends Food Sci. Technol.* **33**(1), 54-62.
 - Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**(4), 1821-1835.
 - Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A. K. (2018) Models

- and Methods for In Vitro Toxicity. U: In Vitro Toxicology. (Dhawani, A., Kwon, S., ured.), Academic Press, London, str. 45-65.
- Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2015) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561-567.
 - Jokić, S., Cvjetko, M., Božić, Đ., Fabek, S., Toth, N., Vorkapić-Furač, J., Redovniković, I. R. (2012) Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *Int. J. Food Sci. Technol.* **47**(12), 2613-2619.
 - Jun, X. (2013) High-pressure processing as emergent technology for the extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **53**(8), 837-852.
 - Kala, H. K., Mehta, R., Sen, K. K., Tandey, R., Mandal, V. (2016) Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: Have we really done enough. *Trends Anal. Chem.* **85**, 140-152.
 - Kaleem, M., Ahmad, A. (2018) Flavonoids as Nutraceuticals. U: Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods. (Grumezescui, A. M. Holban, A. M., ured.) Academic Press, United States, str. 137-155.
 - Kang, J. H., Kim, S., Moon, B. (2016) Optimization by response surface methodology of lutein recovery from paprika leaves using accelerated solvent extraction. *Food Chem.* **205**, 140-145.
 - Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94**(4), 550-557.
 - Khan, S. A., Aslam, R., Makroo, H. A. (2019) High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J. Food Proc. Eng.* **42**(1), e12896.
 - Khazaei, S., Abdul Hamid, R., Mohd Esa, N., Ramachandran, V., Aalam, G. T., Etemad, A., Ismail, P. (2017) Promotion of HepG2 cell apoptosis by flower of *Allium atrovioleaceum* and the mechanism of action. *BMC Complement. Altern. Med.* **17**(1), 104.
 - Kntayya, S. B., Ibrahim, M. D., Mohd Ain, N., Iori, R., Ioannides, C., Abdull Razis, A. F. (2018) Induction of Apoptosis and Cytotoxicity by Isothiocyanate Sulforaphene in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Nutrients* **10**(6), 718.
 - Kühnau, J. (1976) The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **24**, 117-191.

- Kumar, N., Goel, N. (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep. (Amst)* **24**, e00370.
- Kumar, P., Chu, C., Krishnaiah, D., Bono, A. (2006) High hydrostatic pressure extraction of antioxidants from Morinda Citrifolia fruit-process parameters optimization. *J. Eng. Sci. Technol.* **1**(1), 41-49.
- Leonelli, C., Veronesi, P., Cravotto, G. (2013) Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice. (Chemati, F., Cravotto, G., ured.), Springer, Boston, MA, str. 1-14.
- Leyva-Jimenez, F. J., Lozano-Sanchez, J., Borrás-Linares, I., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. (2018) Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from Lippia citriodora leaves. *Food Res. Int.* **109**, 213-222.
- Li, Y., Li, S., Lin, S.-J., Zhang, J.-J., Zhao, C.-N., Li, H.-B. (2017) Microwave-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Exotic Gordonia axillaris Fruit: Optimization and Identification of Phenolic Compounds. *Molecules* **22**, 1481.
- Liao, G., Liu, J., He, S., Chen, J., Zhang, Z. (2012) Optimization for ultrahigh pressure extraction of berberine from Cortex Phellodendri by central composite design-response surface methodology. *J. Med. Plants Res.* **6**(23), 3963-3970.
- Liao, W., Chen, L., Ma, X., Jiao, R., Li, X., Wang, Y. (2016) Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **114**, 24-32.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., Chen, S. (2016) An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules* **21**(10), 1374.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**(8), 118-126.
- Londonkar, R. L., Basavarajeshwari, S. A. (2016) In Vitro Cytotoxicity Effect of Kaempferol in Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and Lung Cancer Cell Lines A459. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **5**(8), 414-421.
- Louis, K. S., Siegel, A. C. (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol. Biol.* **740**, 7-12.

- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technol. Biotechnol.* **55**(2), 243–250.
- Ma, L., Xu, G. B., Tang, X., Zhang, C., Zhao, W., Wang, J., Chen, H. (2020) Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from hawthorn (*Crataegus*.) on human colon cancer cell line HCT116 via cell cycle arrest and apoptosis. *J. Func. Foods* **64**, 103677.
- Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., Martínez, J. (2015) Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Res. Int.* **77**, 675-683.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T. (2011) Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chin. Med.* **6**(1), 39.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Thumanu, K., Tanthanuch, W. (2012) Synergistic anticancer effect of the extracts from *Polyalthia evecta* caused apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**(8), 589–596.
- Macheix, J. J., Fleurient, A., Billot, J. (1990) Phenolics compounds in fruit processing. U: Fruit phenolic. (Mitra, S.ured.), CRC Press, Florida,
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. (2015) Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules (Basel, Switzerland)* **20**(1), 1118-1133.
- Maghsoudlou, E., Esmailzade Kenar, R., Raftani Amiri, Z. (2016) The effects of extraction technique on phenolic compounds extracted from fig (*Ficus carica*) pulp and skin. *Iranian Food Science and Technology* **11**(6), 758-769.
- Maher, P. (2019) The Potential of Flavonoids for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(12), 3056.
- Malta, L. G., Liu, R. H. (2014) Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. U: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems (Van Alfen, N. K.,ured.), Academic Press, Oxford, str: 305-314.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn. Rev.* **1**(1), 7-18.

- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M. A. (2017) Bioactivity Potential of *Prunus spinosa* L. Flower Extracts: Phytochemical Profiling, Cellular Safety, Pro-inflammatory Enzymes Inhibition and Protective Effects Against Oxidative Stress In Vitro. *Front. Pharmacol.* **8**, 680.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Rutkowska, M., Michel, P., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M. A. (2019) New insights into antioxidant activity of *Prunus spinosa* flowers: Extracts, model polyphenols and their phenolic metabolites in plasma towards multiple in vivo-relevant oxidants. *Phytochem. Lett.* **30**, 288-295.
- Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T. i sur. (2015) Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **35**, 78-103.
- Moharram, A. H., Youssef, M. (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology* **11** (1), 31-42.
- Moreira, S., Silva, S., Costa, E., Saraiva, J., Pintado, M. (2020) Effect of high hydrostatic pressure extraction on biological activities of stinging nettle extracts. *Food Funct.* **11**, 921-931.
- Mottaleb, M. A., Sarker, S. D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. *Methods Mol. Biol.* **864**, 75-87.
- Muhamad, I. I., Hassan, N. D., Mamat, S. N. H., Nawi, N. M., Rashid, W. A., Tan, N. A. (2017) Extraction Technologies and Solvents of Phytocompounds From Plant Materials: Physicochemical Characterization and Identification of Ingredients and Bioactive Compounds From Plant Extract Using Various Instrumentations. U: Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. (Grumezescui, A. M. Holban, A. M.,ured.) Academic Press, London, str. 523-560.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D. L., Robbins, R. J. (2006) Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *J. Sci. Food Agric.* **86**(1), 156-162.
- Murati, T., Miletić, M., Štefanko, A., Landeka Jurčević, I., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Kmetič, I. (2019) Comparative assessment of *Prunus spinosa* L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *S. Afr. J. Bot.* **123**, 36-42.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **703** (1), 8-18.

- Naczek, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(5), 1523-1542.
- Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* **187**, 507-516.
- Neuendorf J. (2020) Cell Counting in the Fuchs-Rosenthal Counting Chamber. U: Urine Sediment, Springer, Cham, str. 49-52.
- Ohifueme, A., Teralı, K., Kolawole, O., Surgun, S., Ogbaga, C., Ajiboye, T. (2019) Antidiabetic activity-guided isolation of gallic and protocatechuic acids from *Hibiscus sabdariffa* calyces. *J. Food Biochem.* **43**, e12927.
- Olszewska, M., Głowacki, R., Wolbiś, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**(3), 199-203.
- Olszewska, M., Wolbiś, M. (2000) Phenolic acids in flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Herba Pol.* **46**(4), 249-254.
- Olszewska, M., Wolbiś, M. (2002) Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **59**(2), 133-137.
- Ormerod, M. G., Sun, X.-M., Brown, D., Snowden, R. T., Cohen, G. M. (1993) Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry. *Acta Oncol.* **32**(4), 417-424.
- Owczarek, A., Magiera, A., Matczak, M., Piotrowska, D. G., Olszewska, M. A., Marchelak, A. (2017) Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochem Lett.* **20**, 415-424.
- Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B. (2014) Phenolics in Human Health. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **5**(5), 393-396.
- Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K., Liu, P. (2010) Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chem.* **121**(2), 497-502.
- Pérez-Serradilla, J. A., Luque de Castro, M. D. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chem.* **124**(4), 1652-1659.

- Pinacho, R., Cavero, 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. *J. Func. Foods* **19**, 49-62.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Barros, L., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P. P., Saraiva, J. A., Ferreira, I. C. F. R. (2018) Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. *Sep. Purif. Technol.* **192**, 501-512.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. (2016) Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Sep. Purif. Technol.* **164**, 114-124.
- Pleše, V. (2002) Trnina, crni trn (*Prunus spinosa* L.). *Hrvatske šume* **65**, 24.
- 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) Publication Office of the European Union, Luxembourg, str. 145.
- Prasad, K. N., Hao, J., Shi, J., Liu, T., Li, J., Wei, X., Qiu, S., Xue, S., Jiang, Y. (2009a) Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Innov. Food Sci. Emerg Technol.* **10**(4), 413-419.
- Prasad, K. N., Yang, B., Shi, J., Yu, C., Zhao, M., Xue, S., Jiang, Y. (2010) Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**(2), 471-477.
- Prasad, N. K., Yang, B., Zhao, M., Wang, B. S., Chen, F., Jiang, Y. (2009b) Effects of high-pressure treatment on the extraction yield, phenolic content and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**(5), 960-966.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* **49**(11), 1603–1616.
- Quiros, A., Sayago-Ayerdi, S., Ayala-Zavala, J. F., Wall, A., De la Rosa, L., Aguilar, G., Álvarez-Parrilla, E. (2017) Biological Actions of Phenolic Compounds: Chemistry and Human Health, U: Fruit and Vegetable Phytochemicals (Yahia, E. M., ured.), John

Wiley & Sons, Ltd., New York, str. 125-138.

- Radojković, M., Moreira, M. M., Soares, C., Fátima Barroso, M., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Morais, S., Delerue-Matos, C. (2018) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Morus nigra* leaves: optimization and characterization of the antioxidant activity and phenolic composition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **93**(6), 1684-1693.
- Radovanović, B. C., Anđelković, S. M., Radovanović, A. B., Anđelković, M. Z. (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Trop.J. Pharm. Res.* **12**(5), 813-819.
- Radrigán, R., Aqueveque, P., Ocampo, M. (2017) Extraction and Use of Functional Plant Ingredients for the Development of Functional Foods. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. (Grumezescui, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, London, str. 275-306.
- Rao, P., Rathod, V. (2017) Phytochemicals: An Insight to Modern Extraction Technologies and Their Applications. U: *Handbook of Food Bioengineering* (Grumezescu A. M. Holban A. M., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 495-521.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131.
- Riley, R. S., Idowu, M. (2017) Principles and Applications of Flow Cytometry. Medical College of Virginia/VCU Health Systems Virginia Commonwealth University. <http://www.flowlab-childrens.harvard.com/yahoo_site_admin/assets/docs/PRINCIPLESANDAPPLICATION.29464931.pdf>, pristupljeno 16. travnja 2018.
- Risipail, N., Morris, P., Judith, W. K. (2005) Phenolic compounds: extraction and analysis. U: *Lotus japonicus Handbook*. (Márquez, A.J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., Webb, J., Chiurazzi, M., Márquez, A.J., ured.), Springer, Nizozemska, str. 349-355.
- Robbins, R. (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866-2887.
- Routray, W., Orsat, V. (2012) Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology* **5**(2), 409-424.
- Ruiz-Rodríguez, M. B., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., Tardío, J. (2014) Wild blackthorn (*Prunus*

spinosaL.) and hawthorn (*Crataegus monogyna*Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **69**(1), 61-73.

- Saha, S., Singh, A. K., Keshari, A. K., Raj, V., Rai, A., Maity, S. (2018) Modern Extraction Techniques for Drugs and Medicinal Agents. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. (Grumezescui, A. M. Holban, A. M.,ured.), Academic Press, London, str. 65-106.
- Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R. K. (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **177**, 369-375.
- Sajjadi, S. E., Ghanadian, M., Haghighi, M., Mouhebat, L. (2015) Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *J Herbmed. Pharmacol.* **4**(1), 15-19.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., Barroso, C. G. (2016) Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. *Food Chem.* **192**, 452-459.
- Shang, Y. F., Kim, S. M., Um, B.-H. (2014) Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. *Food Chem.* **154**, 164-170.
- Shekhar, T., Goyal, A. (2014) Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine* **1**, 244-249.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., Gogate, P. R. (2012) Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem. Eng. Process.* **3**, 10-23.
- Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**(4), 828-34.
- Shouqin, Z., Jun, X., Changzheng, W. (2005) High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**(1), 50-54.
- Singh, A., Nair, G. R., Liplap, P., Gariepy, Y., Orsat, V., Raghavan, V. (2014) Effect of Dielectric Properties of a Solvent-Water Mixture Used in Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Potato Peels. *Antioxidants (Basel)* **3**(1), 99-113.
- Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B. (2018) Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story. U: *In Vitro Toxicology*. (Dhawani A., Kwon, S.,ured.), Academic Press,

London, str. 1-19.

- Sparr Eskilsson, C., Björklund, E. (2001) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **902**(1), 227-250.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**(1), 200-208.
- Srivastava, S., Mishra, S., Dewangan, J., Divakar, A., Pandey, P. K., Rath, S. K. (2018) Principles for In Vitro Toxicology. U: In Vitro Toxicology. (Dhawani, A., Kwon, S., ured.), Academic Press, London, str. 21-43.
- Stanković, M. S. (2011) Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J. Sci.* **33**, 63-72.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. (2009) Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)* **14**, 2167-2180.
- Surati, M. A., Jauhari, S., Desai, K. R. (2012) A brief review: Microwave assisted organic reaction. *Arch. Appl. Sci. Res.* **4**, 645-661.
- Szewczyk, K., Olech, M. (2017) Optimization of extraction method for LC–MS based determination of phenolic acid profiles in different *Impatiens* species. *Phytochem. Lett.* **20**, 322-330.
- Šilić, Č. (1983) Atlas drveća i grmlja. Sarajevo, Beograd, Svjetlost, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Tamas, M. (1985) Study of flavones *Prunus spinosa* L. flowers. *Farmacia* **33**, 181-186.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Chan, L. C. (2018) Manilkara zapota (L.) P. Royen Leaf Water Extract Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells via ERK1/2/Akt1/JNK1 Signaling Pathways. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2018**, 7826576.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**(9), 15638-15678.
- Teles, R. A., Diniz, T. C., Pinto, T. C., de Oliveira Junior, R. G., Gama, E. S. M., De Lavor, É. M. i sur. (2018) Flavonoids as Therapeutic Agents in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A systematic review of preclinical evidences. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 7043213.

- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., Tan, C. P. (2010) Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem.* **120**(1), 290-295.
- Tomás-Barberán, F. A., Clifford, M. N. (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**(7), 1024-1032.
- Toubane, A., Rezzoug, S. A., Besombes, C., Daoud, K. (2017) Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus Caeruleus* L. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Ind. Crops Prod.* **97**, 620-631.
- Tsiaka, T., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P. (2017) Extracting Bioactive Compounds From Natural Sources Using Green High-Energy Approaches: Trends and Opportunities in Lab- and Large-Scale Applications. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food.* (Grumezescui, A. M. Holban, A. M., ured.), Academic Press, London, str. 307-365.
- USDA,NRCS. (2020) The PLANT database, < <http://plants.usda.gov>>, pristupljeno 5. srpnja 2020.
- Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A. A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction. U: *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice.* (Chemati, F. Cravotto, G., ured.), Springer, Boston, MA, str. 15-52.
- Velickovic, J., Kostic, D., Stojanovic, G., Mitic, S., Mitic, M., Randjelovic, S., Djordjevic, A. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijaska industrija* **68**(3), 297-303.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. (2013) Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crops Prod.* **44**, 566-571.
- Wani, S. M., Jan, N., Wani, T. A., Ahmad, M., Masoodi, F. A., Gani, A. (2017) Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **16**(2), 119-126.
- Wianowska, D., Gil, M. (2019) Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants. *Trends Analyt. Chem.* **114**, 314-325.
- Visconti R, Grieco D. (2009) New insights on oxidative stress in cancer. *Curr. Opin.*

Drug Discov. Devel. **12**(2), 240-245.

- Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., Aguilar-Zárate, P., Ascacio-Valdés, J. A., Cruz, K., Reyes-Luna, C., Rodríguez, R., Aguilar, C. N. (2017) Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies. U: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food.* (Grumezescui, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, London, str. 229-252.
- Xi, J. (2017) Ultrahigh pressure extraction of bioactive compounds from plants-A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **57**(6), 1097-1106.
- Xi, J., Shen, D., Li, Y., Zhang, R. (2011) Ultrahigh pressure extraction as a tool to improve the antioxidant activities of green tea extracts. *Food Res. Int.* **44** (9), 2783-2787.
- Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., Zhang, R. (2009) Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *Int. J. Pharm.* **382**(1), 139-143.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., Li, H. B. (2017) Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* **18**(1), 96.
- Zhang, B., Yang, R., Liu, C.-Z. (2008) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep. Purif. Technol.* **62**(2): 480-483.
- Zorić, Z., Repajić, M., Kruk, V., Levaj, B., Bursać Kovačević, D., Landeka Jurčević, I., Dragović Uzelac, V. (2019) UPLC-MS/MS characterization of phenolic constituents in fennel seed extracts (*Foeniculum vulgare* Mill.) *Proceedings of the Nutrition Society, 13th European Nutrition Conference, FENS 2019*, Dublin, str. 15–18.
- Zrinski, I., Eckert-Maksic, M. (2005) Primjena mikrovalnog zracenja u organskoj sintezi. *Kem. Ind.* **54** (11), 469-476

8. ŽIVOTOPIS

Vanja Lovrić rođena je 1988. godine u Splitu. Osnovnu školu završila je u Dugopolju, a srednjoškolsko obrazovanje jezičnog usmjerenja u Prvoj gimnaziji Split.

2010. godine završila je preddiplomski studij Prehrambena tehnologija na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Nakon završenog preddiplomskog studija, upisala je diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je 2012. godine diplomirala i stekla zvanje magistra inženjerka prehrambenog inženjerstva. Za vrijeme diplomskog studija sudjelovala je u istraživanju izolacije biološki aktivnih spojeva iz taloga vina te je za aktivno sudjelovanje u navedenom istraživanju dobila Dekanovu nagradu za akademsku godinu 2011./2012. Dodatna istraživanja na tu temu provela je u okviru diplomskog rada (Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na izolaciju antocijana iz taloga vina).

Po završetku studija zaposlila se u Adris grupi, preko jedinstvenog programa zapošljavanja „Budućnost u Adrisu“ (lipanj 2013. - lipanj 2014.) gdje je odradila jednogodišnji pripravnički staž. Nakon uspješno završenog pripravničkog staža zaposlila se na mjestu tehnologa u preradi u Cromarisu d.d. (lipanj 2014. - studeni 2014.), koji posluje u sustavu Adris grupe.

Od siječnja 2015. godine radila je kao stručni suradnik, odnosno asistent (od siječnja 2017. do lipnja 2017.g) na projektu „Application of innovative technologies for production of plant extracts as ingredients for functional food“ koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost. 2015. godine upisala je Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij - Biotehnologija i bioprosesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Radila je u Plivi d.o.o. u odjelu Koordinacija puštanja gotovog lijeka u promet, od lipnja 2017. kao stručnjak, odnosno kao viši stručnjak za istraživanje neusklađenosti od travnja 2019.godine do svibnja 2020. godine.

Rezultati njenih istraživanja objavljeni su u dva rada a1 kategorije. Sudjelovala je na tri domaća i međunarodna znanstvena skupa.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

A1

- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technol. Biotechnol.* **55**(2), 243–250, IF = 1,517
- Murati, T., Miletić, M., Kolarić, J., Lovrić, V., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Dragović-Uzelac, V., Kmetič, I. (2019) Toxic activity of *Prunus spinosa* L. flower extract in hepatocarcinoma cells. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **70**(4), 303-309, IF= 1,606