

Fenolni sastav i antioksidacijska aktivnost ekstrakata motra (*Crithum maritimum* L.) dobivenih korištenjem različitih metoda ekstrakcije

Kovačić, Rea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:141841>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST
EKSTRAKATA MOTRA (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) DOBIVENIH
KORIŠTENJEM RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE**

ZAVRŠNI RAD

**REA KOVAČIĆ
MATIČNI BROJ: 154**

Split, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST
EKSTRAKATA MOTRA (*CRITHMUM MARITIMUM* L.)
DOBIVENIH KORIŠTENJEM RAZLIČITIH METODA
EKSTRAKCIJE

ZAVRŠNI RAD

REA KOVAČIĆ
MATIČNI BROJ: 154

Split, srpanj 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
SEA FENNEL (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) EXTRACTS
OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS**

BACHELOR THESIS

**REA KOVAČIĆ
Parent number: 154**

Split, July 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA MOTRA (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) DOBIVENIH KORIŠTENJEM RAZLIČITIH METODAMA EKSTRAKCIJE

Rea Kovačić, 154

Sažetak:

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je poznati mediteranski samonikli halofit za kojim interes u posljednje vrijeme neprestano raste zbog njegovih brojnih bioaktivnih spojeva, među kojima su najistraživaniji fenolni spojevi. Cilj ovog rada bio ispitati sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina i individualnih fenolnih kiselina u ekstraktima motra pripremljenim različitim metodama ekstrakcije pri različitim uvjetima, kao i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. U svrhu usporedbe konvencionalne ekstrakcije i nekonvencionalnih metoda korištena su tri postupka s različitim čimbenicima ekstrakcije, i to kako slijedi: mikrovalna ekstrakcija (MAE) sa snagom mikrovalova od 300 W, 500 W, 700 W, ultrazvučna ekstrakcija (UAE) pri sobnoj temperaturi, 40°C i 60°C, te konvencionalna metoda ekstrakcije maceracijom uz miješanje pri sobnoj temperaturi, 40°C i 60°C. Najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola i flavonoida zabilježen je kod MAE pri snazi mikrovalova 300 W. Za izolaciju ukupnih tanina najboljom se pokazala UAE pri sobnoj temperaturi, dok je MAE s 700 W postignut približno jednak sadržaj ovih spojeva. Koncentracije individualnih fenolnih kiselina u ekstraktima određene su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti pri čemu su klorogenska kiselina i njeni derivati detektirani kao najzastupljeniji. Neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina su u najvišem udjelu bile prisutne u MAE pripremljenim s 700 W, dok je najviši udio klorogenske kiseline zabilježen u ekstraktima dobivenim MAE s 500 W. Antioksidacijska aktivnost uzoraka je testirana DPPH i FRAP metodom pri čemu su uzorci ekstrahirani s MAE očekivano pokazali najbolja svojstva. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da metode ekstrakcije i uvjeti provedbe istih imaju utjecaj na izolaciju fenolnih spojeva te je potvrđeno da sadržaj fenolnih spojeva ima direktni utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka.

Ključne riječi: motar, ekstrakcija, fenolni spojevi, HPLC, DPPH, FRAP

Rad sadrži: 45 stranica, 17 slika, 2 tablice, 80 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. red. prof. dr. sc. Sandra Svilović - predsjednik
2. dr. sc. Sanja Radman - član
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate studies

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Supervisor: Ivana Generalić Mekinić, Ph. D., Assoc. Prof.

PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SEA FENNEL (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

Rea Kovačić, 154

Abstract:

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a well-known Mediterranean wild halophyte, for which there has been a growing interest recently due to its richness in bioactive compounds, of which phenolic compounds are the most studied. The aim of this research was to investigate the content of total phenolics, flavonoids, tannins and individual phenolic acids, as well as their antioxidant activity in extracts obtained by different extraction methods performed under different conditions. Conventional and unconventional methods were compared as follows: microwave extraction (MAE) with microwave powers of 300 W, 500 W, 700 W, ultrasonic extraction (UAE) at room temperature, 40°C, 60°C and the conventional method with stirring at room temperature, 40°C, 60°C. The highest extraction yield of total phenols and flavonoids was obtained with MAE at 300 W. For the isolation of total tannins, UAE at room temperature proved to be the best method, with MAE at 700 W achieving approximately the same value. Phenolic acids concentrations were determined by high-performance liquid chromatography, with chlorogenic acid and its derivatives shown to be the most representative. Neochlorogenic and cryptochlorogenic acids were most represented in the extracts obtained with MAE at 700 W, while the highest concentration of chlorogenic acid was recorded in the extracts obtained with MAE at 500 W. The antioxidant activity of the samples was tested by the DPPH and FRAP methods, and as expected, the samples extracted with MAE showed the best antioxidant properties. The results suggest that the extraction method and conditions have an influence on the isolation of phenolic compounds and that the phenolic compound content affects the antioxidant activity of the samples.

Keywords: sea fennel, extraction, phenolic compounds, HPLC, DPPH, FRAP

Thesis contains: 45 pages, 17 figures, 2 tables, 80 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Sandra Svilović, Ph. D., Full Prof. | chair person |
| 2. Sanja Radman, Ph. D. | member |
| 3. Ivana Generalić Mekinić, Ph. D., Assoc. Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić u razdoblju od veljače do srpnja 2023. godine.

Ovaj rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta SEAFENNEL4MED (PRIMA 2021, Section 2) (<https://seafennel4med.com/>).

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, uloženom trudu, savjetima i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mariu Nikoli Mužeku na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci, razumijevanju i pomoći tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je bio ispitati utjecaj različitih metoda ekstrakcije i uvjeta provođenja istih na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih tanina te individualnih fenolnih kiselina u ekstraktima motra, kao i ispitati antioksidacijsku aktivnost uzoraka FRAP i DPPH metodom.

SAŽETAK

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je poznati mediteranski samonikli halofit za kojim interes u posljednje vrijeme neprestano raste zbog njegovih bogatstva bioaktivnih spojeva, među kojima su najistraživaniji fenolni spojevi. Cilj ovog rada bio ispitati sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina i individualnih fenolnih kiselina u ekstraktima motra pripremljenim različitim metodama ekstrakcije pri različitim uvjetima, kao i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata. U svrhu usporedbe konvencionalne ekstrakcije i nekonvencionalnih metoda korištena su tri postupka s različitim čimbenicima ekstrakcije, i to kako slijedi: mikrovalna ekstrakcija (MAE) sa snagom mikrovalova od 300 W, 500 W, 700 W, ultrazvučna ekstrakcija (UAE) pri sobnoj temperaturi, 40°C i 60°C, te konvencionalna metoda ekstrakcije maceracijom uz miješanje pri sobnoj temperaturi, 40°C i 60°C. Najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola i flavonoida zabilježen je kod MAE pri snazi mikrovalova 300 W. Za izolaciju ukupnih tanina najboljom se pokazala UAE pri sobnoj temperaturi, dok je MAE s 700 W postignut približno jednak sadržaj ovih spojeva. Koncentracije individualnih fenolnih kiselina u ekstraktima određene su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti pri čemu su klorogenska kiselina i njeni derivati detektirani kao najzastupljeniji. Neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina su u najvišem udjelu bile prisutne u MAE pripremljenim s 700 W, dok je najviši udio klorogenske kiseline zabilježen u ekstraktima dobivenim MAE s 500 W. Antioksidacijska aktivnost uzoraka je testirana DPPH i FRAP metodom pri čemu su uzorci ekstrahirani s MAE očekivano pokazali najbolja svojstva. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da metode ekstrakcije i uvjeti provedbe istih imaju utjecaj na izolaciju fenolnih spojeva te je potvrđeno da sadržaj fenolnih spojeva ima direktan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka.

Ključne riječi: motar, ekstrakcija, fenolni spojevi, HPLC, DPPH, FRAP

ABSTRACT

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a well-known Mediterranean wild halophyte, for which there has been a growing interest recently due to its richness in bioactive compounds, of which phenolic compounds are the most studied. The aim of this research was to investigate the content of total phenolics, flavonoids, tannins and individual phenolic acids, as well as their antioxidant activity in extracts obtained by different extraction methods performed under different conditions. Conventional and unconventional methods were compared as follows: microwave extraction (MAE) with microwave powers of 300 W, 500 W, 700 W, ultrasonic extraction (UAE) at room temperature, 40°C, 60°C and the conventional method with stirring at room temperature, 40°C, 60°C. The highest extraction yield of total phenols and flavonoids was obtained with MAE at 300 W. For the isolation of total tannins, UAE at room temperature proved to be the best method, with MAE at 700 W achieving approximately the same value. Phenolic acids concentrations were determined by high-performance liquid chromatography, with chlorogenic acid and its derivatives shown to be the most representative. Neochlorogenic and cryptochlorogenic acids were most represented in the extracts obtained with MAE at 700 W, while the highest concentration of chlorogenic acid was recorded in the extracts obtained with MAE at 500 W. The antioxidant activity of the samples was tested by the DPPH and FRAP methods, and as expected, the samples extracted with MAE showed the best antioxidant properties. The results suggest that the extraction method and conditions have an influence on the isolation of phenolic compounds and that the phenolic compound content affect the antioxidant activity of the samples.

Keywords: sea fennel, extraction, phenolic compounds, HPLC, DPPH, FRAP

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Ekstrakcija	2
1.1.1. Klasične metode ekstrakcije.....	3
1.1.2. Nove metode ekstrakcije	4
1.1.1.1. <i>Mikrovalna ekstrakcija (MAE)</i>	4
1.1.1.2. <i>Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)</i>	5
1.2. Fenolni spojevi	6
1.3. Motar	7
1.3.1. Fenolni spojevi u motru	9
1.3.2. Znanstvena istraživanja fenolnih spojeva motra	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO	14
2.1. Biljni materijal	14
2.2. Postupak ekstrakcije	14
2.3. Određivanje fenolnih spojeva	17
2.3.1. Određivanja ukupnih fenola.....	17
2.3.2. Određivanja ukupnih flavonoida.....	17
2.3.3. Određivanje ukupnih tanina	18
2.3.4. HPLC analiza	19
2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	20
2.4.1. FRAP metoda	20
2.4.2. DPPH metoda.....	21
2.5. Statistička analiza	21
3. REZULTATI I RASPRAVA	22
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola	22
3.3. Rezultati određivanja ukupnih tanina	26
3.4. Rezultati HPLC analize	29
3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti	32
3.4.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	32
3.4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	33
4. ZAKLJUČAK	36
5. LITERATURA	37

UVOD

Biljke proizvode razne sekundarne metabolite, koji imaju brojna pozitivna biološka svojstva zbog kojih se smatraju jako vrijednim i upotrebljavaju u raznim granama industrije. Stoga se sve više istražuje i ulaže u identifikaciju i izolaciju različitih spojeva biljnog podrijetla. Kao prvi korak u izolaciji bioaktivnih sastojaka iz biljnog materijala potrebno je odabrati odgovarajuće optimalne uvjete ekstrakcije kako bi izolacija ciljanih spojeva bila što uspješnija. Razlikujemo dvije skupine ekstrakcijskih metoda, konvencionalne ili klasične metode te nekonvencionalne metode koje se još nazivaju i „zelenim tehnikama“. Zelene tehnike zbog svojih prednosti u novije vrijeme sve češće zamjenjuju konvencionalne metode, a odlikuje ih smanjena upotreba otapala, niži troškovi izolacije, brži postupak obrade i bolji prinos.

Posljednjih godina sve veća pažnja se pridaje istraživanju samoniklog halofita, motra (*Crithmum maritimum* L.), poznatog pod nazivom morski koromač ili petrovac. Motar je aromatična i jestiva biljka iz porodice štitarki (*Apiaceae*), koja raste duž mediteranske, pacifičke i atlantske obale, a u Hrvatskoj se može pronaći diljem cijele jadranske obale. Zbog izvrsnog kemijskog sastava kojeg odlikuje bogatstvo raznih bioaktivnih spojeva od kojih su najpoznatiji fenolni spojevi, motar se osim u prehrambenoj industriji, koristi u medicini, kozmetičkoj industriji, industriji parfema, farmakologiji, itd. Zbog snažne antioksidativne aktivnosti i brojnih drugih bioloških svojstava poput antikancerogenih, antimutagenih, antimikrobnih i protuupalnih, i interes za fenolnim spojevima i njihovom primjenom neprestano raste.

U ovom završnom radu pozornost je posvećena ispitivanju fenolnih spojeva motra i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pripremljenih različitim metodama: konvencionalnim postupkom te korištenjem dviju novih tehnika ekstrakcije, ekstrakcijom primjenom ultrazvuka te ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

1. OPĆI DIO

1.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija se definira kao proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili kapljevite smjese korištenjem pogodnog otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od topljivosti preostalih sastojaka smjese. Ovisno o agregatnom stanju dviju faza, razlikujemo dva tipa ekstrakcije: kapljeito-kapljevito i čvrsto-kapljevito.¹

Ekstrakcija čvrsto-kapljevito je difuzijska operacija u kojoj jedna ili više komponenti, na temelju različite topljivosti, prelazi iz čvrstog materijala u kapljevito otapalo.² Postupak se odvija u nekoliko faza. U prvoj fazi otapalo prodire u kruti materijal i u njemu se topiva tvar otapa. Potom otopljenjena tvar difundira iz krute matrice u okolni kapljeviti medij.^{3,4} Dakle, ekstrakcija biljnog materijala otapalom rezultira prijenosom topljive tvari u otapalo, a postupak se odvija u koncentracijskom gradijentu, odnosno sve dok se ne uspostavi ravnoteža tj. dok koncentracija tvari u krutom materijalu i otapalu ne bude jednaka.⁵ Ekstrakcija uz pomoć otapala je najčešće korišten postupak za pripremu biljnih ekstrakata zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti i široke primjenjivosti.⁶

Kako bi postupak ekstrakcije bio što učinkovitiji potrebno je odrediti i uspostaviti odgovarajuće optimalne čimbenike i uvjete ekstrakcije. Glavni čimbenici koji utječu na učinkovitost ekstrakcije su svojstva biljnog materijala, odabir otapala, temperatura, tlak i vrijeme ekstrakcije.⁷ Učinkovitost ekstrakcije bit će poboljšana ukoliko je biljni materijal usitnjen, a veličina njegovih čestica što manja jer u tom slučaju dolazi do boljeg prodiranja otapala te lakše i brže difuzije otopljenih tvari. Odabir otapala je također ključan te prilikom toga treba uzeti u obzir selektivnost, polarnost, cijenu i sigurnost korištenog otapala za uporabu. U istraživanjima koja uključuju ekstrakciju različitih fitokemikalija iz biljnih materijala kao otapala najčešće se koriste alkoholi.⁸ Pogodno je također provoditi ekstrakciju pri višim temperaturama zbog povećanja brzine otapanja i difuzije, ali previsoke temperature mogu uzrokovati oštećenje ciljanih spojeva ili ekstrakciju nepoželjnih tvari.⁹ Produljenjem vremena trajanja ekstrakcije, obično raste i učinkovitost ekstrakcijskog postupka.⁸

Sve metode ekstrakcije imaju zajednički cilj, a to je ekstrahirati ciljane bioaktivne spojeve iz uzorka i pretvoriti ih u oblik prikladan za detekciju, kao i osigurati ponovljivost metode i što veću iscrpnost.¹⁰ Kao prvi koraku u proučavanju biljnog materijala, ekstrakcija ima značajan utjecaj na uspješnost daljnjih postupaka i testiranja, a time i konačne rezultate istraživanja.

Metode ekstrakcije se dijele na klasične (konvencionalne) i nove (nekonvencionalne).¹¹

1.1.1.1. Klasične metode ekstrakcije

Klasične ili konvencionalne metode ekstrakcije kao što su Soxhlet metoda, hidrodestilacija, perkolacija, digestija, maceracija i druge, temelje se na uporabi otapala za izolaciju ciljanih spojeva iz uzorka uz primjenu topline i/ili miješanja.^{8,11,12} Maceracija je jednostavna metoda ekstrakcije koja uključuje natapanje grubo usitnjenog ili praškastog biljnog materijala u otapalu pri sobnim uvjetima, obično nekoliko dana te uz povremeno miješanje. Metoda slična maceraciji je digestija kod koje se sadržaj lagano zagrijava tijekom procesa ekstrakcije.⁵ Kod perkolacije pak otapalo, uglavnom etilni alkohol, kontinuirano prolazi kroz biljni materijal pri čemu izdvaja (ispire) komponente iz biljnog materijala.¹³

Učinkovitost klasičnih metoda ovisi najviše o izboru otapala, pri čemu je polarost ciljanog spoja, a time i odabranog otapala, ključan faktor.¹⁴ Glavni nedostaci klasičnih metoda su dugotrajnost procesa koji obično zahtjeva i veliku potrošnju energije, a uslijed toga često dolazi do gubitka i degradacije bioaktivnih spojeva djelovanjem topline. Kod klasičnih metoda ekstrakcije često se primjenjuju i organska otapala koja mogu biti štetna za okoliš i zdravlje.¹⁵ Zbog navedenih nedostataka klasične metode se sve više zamjenjuje novim tehnikama ekstrakcije, odnosno nekonvencionalnim metodama koje se još nazivaju i „zelene metode“ ekstrakcije.¹⁶

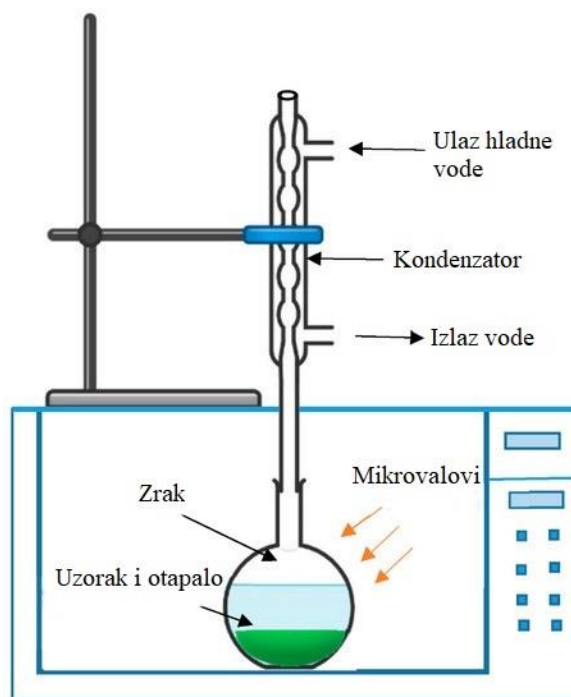
1.1.2. Nove metode ekstrakcije

Prednost nekonvencionalnih ili novih metoda ekstrakcije u odnosu na konvencionalne je brži proces ekstrakcije i veća sigurnost za okoliš uporabom sigurnijih kemikalija i obnovljivih sirovina, kao i sprječavanje degradacije i nastanka štetnih produkata, niža energetska potrošnja, itd. Navedene značajke ispunjavaju navedene zahtjeve koje klasične metode ne mogu zadovoljiti. Nove tehnike ekstrakcije uključuju mikrovalnu ekstrakciju (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE), ultrazvučnu ekstrakciju (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE), superkrićnu tekućinsku ekstrakciju (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), pulsirajuće elektrićno polje (engl. *Pulsed Electric Field Extraction*, PEF), ekstrakciju pod visokim tlakom (engl. *Pressurized liquid extraction*, PLE), ekstrakciju uz pomoć enzima (engl. *Enzyme-Assisted Extraction*, EAE) i brojne druge.^{16,17}

1.1.1.1. Mikrovalna ekstrakcija (MAE)

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zraćenja u frekvencijskom području od 300 MHz do 300 GHz. Sastoje se od dva oscilirajuća polja, elektrićnog polja i magnetskog polja koji su postavljeni okomito jedno na drugo.¹⁶

MAE je nova tehnika ekstrakcije kod koje je klasićna ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Kod ove metode mikrovalna energija zagrijava otapalo koje je u kontaktu s uzorkom što dovodi do otpuštanja ciljanih spojeva iz matrice uzorka. Princip zagrijavanja mikrovalovima temelji se na njihovom izravnom utjecaju na molekule otapala putem mehanizma ionske kondukcije i rotacije dipola koja se najćešće odvijaju istovremeno. Primjenom elektromagnetskog polja tijekom ionske kondukcije otopina stvara otpor prolasku iona što rezultira trenjem pri ćemu se otopina zagrijava. Rotacija dipola odnosi se na preusmjeravanje dipola djelovanjem elektrićnog polja što dovodi do prisilnog kretanja molekula, a za rezultat ima nastanak topline.¹⁸⁻²⁰ Sposobnost otapala da apsorbira toplinu mikrovalne energije i da je preda drugim molekulama u obliku topline ovisi o njegovom ćimbeniku vodljivosti.²¹ MAE se moće smatrati selektivnom metodom koja favorizira polarne molekule i otapala s visokom dielektrićnom konstantom.¹³



Slika 1. Mikrovalovima potpomognuta izolacija²²

Učinkovitost MAE ovisi o odabiru otapala, volumenu, temperaturi ekstrakcije, primijenjenoj snazi mikrovalova, vremenu ekstrakcije i samom biljnom materijalu.²¹ Osnovna prednost mikrovalne ekstrakcije je kraće vrijeme ekstrakcije, povećana učinkovitost, niža potrošnja energije i upotreba manjih količina otapala.²³

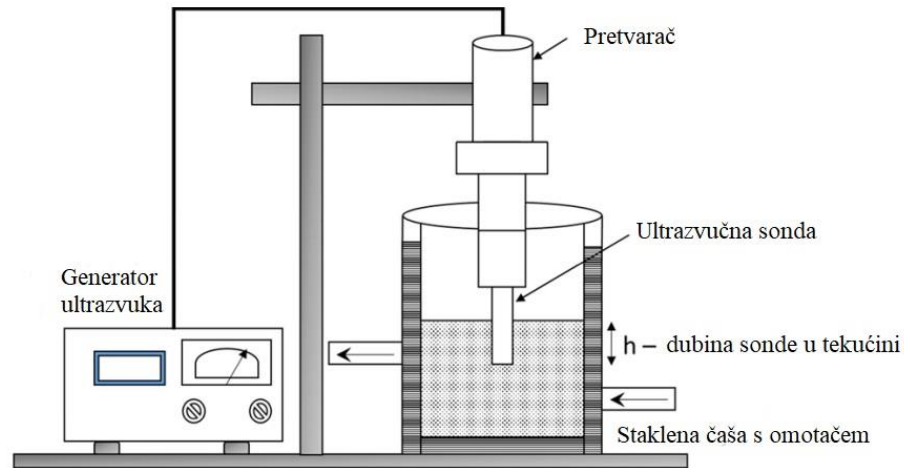
Dvije su vrste sustava za MAE komercijalno dostupne, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija u pri atmosferskom tlaku.²⁴

1.1.1.2. *Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)*

UAE odnosno ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, jedna je od novijih metoda koja omogućuje jednostavnije rukovanje, korištenje nižih temperatura i upotrebu manjih količina otapala.²⁵

Ultrazvučni valovi su zvučni valovi frekvencije iznad 20 kHz, a karakterizira ih prolaz kroz čvrste, plinovite i tekuće medije pri čemu dolazi do nastanka longitudinalnih valova što dovodi do stvaranja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka.²⁶ Izmjenom kompresije i ekspanzije dolazi do kavitacije, odnosno proizvodnje, rasta i kolapsa

mjehurića pare koji pri velikim brzinama uzrokuju međučestične sudare kojima se olakšava oslobađanje spojeva iz matrice zbog erozije čestica.^{16,17}



Slika 2. UAE¹⁷

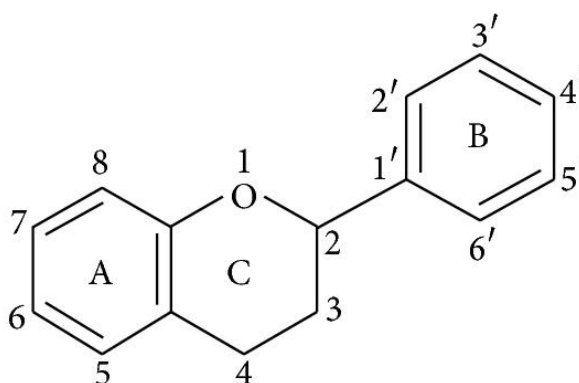
Mehanizam ekstrakcije ultrazvukom stoga uključuje dvije fizikalne pojave. To su difuzija preko stanične stijenke i ispiranje sadržaja stanice nakon razbijanja stijenki.²⁷ Kako bi prinos UAE bio što viši potrebno je optimizirati procesne uvjete kao što su temperatura, snaga ultrazvuka i izbor otapala.¹²

1.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti široko rasprostranjeni u biljkama. Obzirom da su prisutni u svim biljnim organima sastavni su dio i ljudske prehrane. Njihova uloga u biljkama je da im pružaju zaštitu od UV zračenja, patogena, parazita i grabežljivaca. Spadaju u jednu od glavnih skupina fitokemikalija te doprinose osjetljivim i funkcionalnim karakteristikama biljne hrane obzirom da su i jedni od najčešćih biljnih pigmenta. Zbog antioksidativnih svojstava i brojnih drugih pozitivnih utjecaja na zdravlje, fenoli privlače sve veću pozornost i postaju od interesa u područjima istraživanja prehrambene industrije, farmacije i medicine.^{6,28}

Fenolni spojevi u svojoj strukturi sadrže jedan ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina (-OH). Prema kemijskoj strukturi se dijele na fenolne kiseline, flavonoide, tanine i druge polifenole poput stilbena i lignana. Dosada je poznato više od 8000 fenolnih struktura, od jednostavnih fenolnih molekula kao što su fenolne kiseline do visoko polimeriziranih spojeva kao što su tanini.^{6,29}

Osnovnu strukturu flavonoida čini jezgra koja sadrži 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena C6-C3-C6 (A, B i C). Istraživanja su pokazala da više od polovice istraživanih fenolnih spojeva čine flavonoidi.³¹ Ovisno o oksidacijskom broju centralnog (C) prstena, flavonoidi se dijele u šest podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijanini.²⁹



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida³¹

Fenolne kiseline se dijele na derivate benzojeve kiseline i derivate cimetine kiseline. Derivati benzojeve kiseline uključuju *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, salicilnu kiselinu, galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i druge, dok u derivate cimetine kiseline ubrajamo *p*-kumarinsku kiselinu, kaveinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu i druge.³²

1.3. Motar

Motar (*Crithmum maritimum* L.), poznat kao morski koromač ili petrovac, jestiva je i samonikla mediteranska biljka iz porodice štitarki (Apiaceae). Prirodno je otporna na visoke koncentracije soli i spada u fakultativne halofite. Halofiti su biljke tolerantne na sol, a motar je jedna od najrasprostranjenijih i najistraživanijih jestivih halofita. Motar

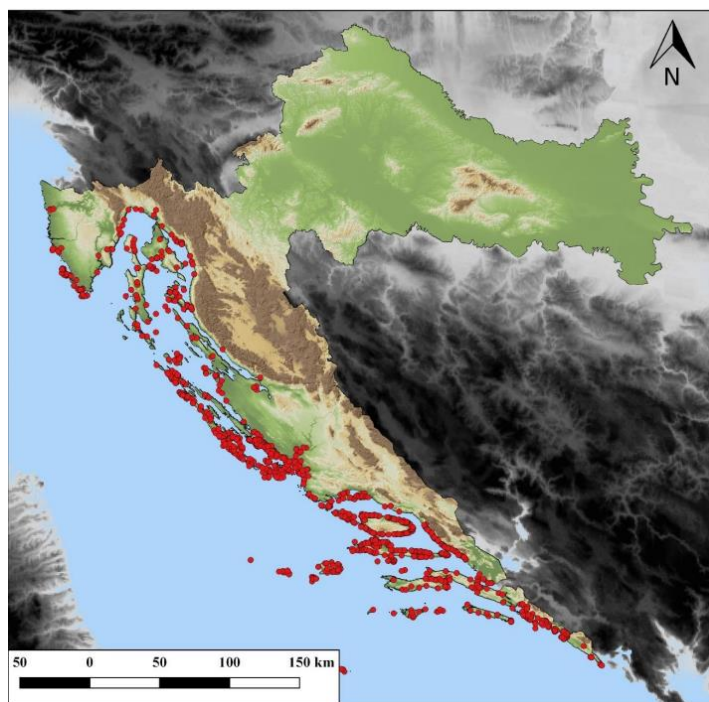
možemo pronaći duž mediteranske, crnomorske i atlantske obale na morskim stijenama, liticama, grebenima, šljunčanim i pješčanim plažama. Uglavnom raste u većim populacijama neposredno u blizini mora, a katkad i nešto dalje od obale. Pogoduju mu sunčana staništa s oskudnim tlom. U Hrvatskoj je motar široko rasprostranjen uzduž cijele jadranske obale, od Istre do Crnogorskog primorja.³³⁻³⁵

Motar je trajna, zeljasta biljka s debelom, okruglastom i glatkom stabljikom žućkaste boje koja može narasti do 50 cm visine. Gornji dio biljke je razgranat. Listovi motra su mesnati i aromatični, plavo-zelene boje, do 5 cm dugi i oko 6 mm široki. Cvate u razdoblju od srpnja do rujna malim, okruglim žuto-zelenim cvjetovima složenim u štitaste cvatove. Plodovi motra su žućkasti, dugi oko 6 mm i oblikom nalik na ječam.^{35,36}

Motar se tradicionalno koristi u domaćinstvu. Iako je cijela biljka jestiva, najčešće se konzumiraju listovi; kao začim ili dodatak salatama zbog svog slanog i aromatičnog okusa. Osim u kulinarske svrhe, koristi se u medicini i kozmetici zbog bogatstva biološki aktivnim spojevima kao što su vitamin C, omega-3 i omega-6 masne kiseline, minerali, organske kiseline i fenoli.³⁷⁻³⁹



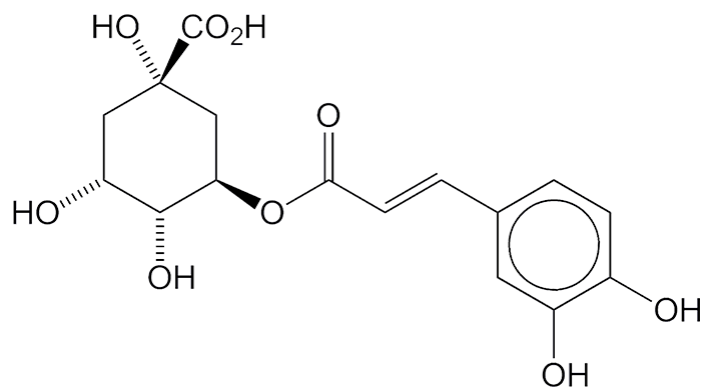
Slika 4. Motar (*Crithmum maritimum* L.)⁴⁰



Slika 5. Rasprostranjenost motra duž Hrvatske obale⁴¹

1.3.1. Fenolni spojevi u motru

Motar je bogat biološki aktivnim spojevima od kojih su najpoznatiji i najistraživaniji fenolni spojevi.³⁷ Od fenolnih spojeva sadrži fenolne kiseline, flavonoide i tanine koji se u različitim udjelima nalaze u svim dijelovima biljke.^{42,34} Na temelju rezultata brojnih istraživanja, klorogenska kiselina je potvrđena kao dominantni fenolni spoj u motru.^{33,43} Također, istraživanja su pokazala značajan udio njenih derivata kao što su kriptoklorogenska kiselina i neoklorogenska kiselina.^{34,43,44} Od ostalih fenolnih kiselina u motru je dokazano prisustvo kaveinske, galne, ružmarinske, kumarinske, vanilinske i cimetine kiseline.^{43,45,46} Najzastupljeniji flavonoidi u motru su rutin i kvercetin.^{34,47,48} Sadržaj fenola u motru ovisi o dijelu biljke koji se analizira, vegetacijskom razdoblju, te primijenjenoj metodi i uvjetima ekstrakcije fenolnih spojeva, kao i načinu njihove detekcije.^{34,43,49-51}



Slika 6. Struktura klorogenske kiseline⁵²

1.3.2. Znanstvena istraživanja fenolnih spojeva motra

Maleš i sur.⁵³ su ispitivali sadržaj flavonoida, tanina i ukupnih fenola u nadzemnim dijelovima motra, prikupljenim na tri geografski odvojena položaja uzduž Jadranske obale i u različitim periodima rasta. Sadržaj flavonoida se kretao između 0,08-0,42%, tanina 0,10-2,65% dok je sadržaj ukupnih fenola bio 4,72-9,48%. Najviši sadržaj flavonoida pronađen je u uzorcima prikupljenim prije cvatnje, dok je najviši sadržaj tanina i ukupnih polifenola potvrđen u uzorcima prikupljenim prije i na početku cvatnje.

Meot-Duros i sur.³³ su istraživali fenolne spojeve lišća motra, kod dvije populacije sa različitih staništa (pješčani brežuljci i litice). Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski, a klorogenska kiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Od fenolnih spojeva u uzorcima je u najvišoj koncentraciji detektirana klorogenska kiselina. Sadržaj ukupnih fenola i klorogenske kiseline praćen je tijekom jedne godine, a rezultati su ukazali na razliku u sadržaju istraživanih spojeva između populacija sa različitih staništa. Biljke koje rastu na pješčanom području imale su više klorogenske kiseline (18,8–27,9 mg/g) od onih koje rastu na liticama (3-10 mg/g).

Siracusa i sur.⁵⁴ su istraživali fenolni sastav vodene infuzije samoniklog motra sa područja Dalmacije (Hrvatska) prije i poslije podvrgavanja *in vitro* procesu probave. U ovom istraživanju je identificirana klorogenska kiselina, njeni izomeri i viši derivati kao gotovo jedina klasa fenolnih spojeva u uzorcima.

Houta i sur.⁵⁰ su ispitivali fenolni sastav različitih dijelova kultiviranog motra (lišće, cvijeće, sjemenke i stabljike) sa jugoistoka Tunisa. Analizirani metanolni ekstrakti

pokazali su razlike u sadržaju ukupnih fenola (17,11-9,42 mg ekvivalenata galne kiseline (engl. *Galic Acid Equivalents*; GAE/g), flavonoida (7,06-3,71 mg ekvivalenata epikatehina (engl. *Epicatechin Equivalents*, EC/g) i tanina (5,24-1,06 mg ekvivalenata katehina (engl. *Catechin Equivalents*, CE/g).

Jallali i sur.⁵⁵ su istraživali fenolne spojeve motra, ubranog na području različitih regija Tunisa. Ekstrakcija fenolnih spojeva je provedena maceracijom pri sobnoj temperaturi miješanjem homogeniziranog uzorka s 80% vodenom otopinom acetona. Sadržaj ukupnih fenola (4,1-7,9 mg GAE/g), ukupnih flavonoida (2,9-6,1 mg CE/g) i ukupnih tanina (0,34-0,63 mg CE/g) je određen kolorimetrijski.

Nabet i sur.⁵⁶ su istraživali sastav sekundarnih spojeva, odnosno sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i kondenziranih tanina u nadzemnom dijelu motra, prikupljenom na području Alžira. Za pripremu ekstrakta korištena je 80%-tni metanol. Individualni fenolni spojevi su razdvojeni i identificirani primjenom tekućinske kromatografije. U fenolnim frakcijama je identificirano deset hidroksicimetnih kiselina te su rezultati istraživanja pokazali visok sadržaj ukupnih fenola ($47,1 \pm 0,1$ mg GAE/g), ukupnih flavonoida ($17 \pm 0,7$ mg CE/g) i kondenziranih tanina ($0,04 \pm 0,01$ mg CE/g) u uzorku.

Generalić Mekinić i sur.⁴⁹ su ispitivali kemijski sastav etanolnog ekstrakta nadzemnog dijela motra (cvijet, list, stabljika) sakupljenog na području Srednje Dalmacije (Hrvatska) u fazi cvatnje. Ekstrakti su pripremljeni korištenjem 80%-tnog etanola uz primjenu ultrazvučne ekstrakcije (35 kHz, 1 h, 50°C, s povratom). Sadržaj ukupnih fenola je određen Folin–Ciocalteu metodom, a klorogenska kiselina HPLC tehnikom. Ekstrakti lišća i cvjetova su sadržavali relativno visoku koncentraciju ukupnih fenola (35,1 i 32,6 mg GAE/g), dok je sadržaj fenola u stabljici bio znatno niži. Koncentracija klorogenske kiseline kao dominantnog fenolnog spoja u uzorcima se kretala od 0,7 do 8,1 mg/g s najvećim vrijednostima pronađenim u lišću i cvjetovima.

Također, Generalić Mekinić i sur.⁴³ su ispitivali kemijski sastav (sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida i pojedinačne fenolne kiseline) uzoraka motra prikupljenog na istoj lokaciji u Središnjoj Dalmaciji (Hrvatska) tijekom jednogodišnjeg vegetacijskog razdoblja. Suhi i usitnjeni listovi biljke ekstrahirani su 80%-tnim etanolom pri 50 °C u ultrazvučnoj kupelji tijekom 1 sata. Na temelju dobivenih rezultata dokazano je da ekstrakt iz travnja sadrži najveći udio fenola i da je najbogatiji klorogenskom kiselinom (16,28 mg/g), dok su ostali ekstrakti sadržavali više od 2 puta nižu

koncentraciju klorogenske kiseline (5,65-7,48 mg/g). Ostale slobodne fenolne kiseline bile su prisutne u značajno nižim koncentracijama. Najvišu koncentraciju neflavonoida (20,92 mg GAE/g) i flavonoida (1,23 mg GAE/g) također je sadržavao ekstrakt biljke ubrane u travnju.

Özcan i sur.⁵⁷ su istraživali utjecaj fermentacije na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida motra u usporedbi sa svježim uzorcima motra sakupljenim na području Turske. U tretiranim uzorcima sadržaj ukupnih fenola i flavonoida se smanjio s 89,79 na 63,13%. Od fenolnih spojeva dominirali su (+)-katehin, galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina te *p*-kumarinska kiselina. Istraživanje je pokazalo da proces fermentacije uzrokuje degradaciju ključnih fenolnih spojeva motra.

Piatti i sur.⁴⁷ su kvalitativno i kvantitativno ispitivali ekstrakte nadzemnih dijelova motra. Uzorci su ekstrahirani perkolacijom 70%-tnim etanolom pri 60 °C, pri čemu je jedan uzorak bio pročišćen, a drugi ne. Dobiveni rezultati su pokazali da je pročišćeni ekstrakt bogatiji od nepročišćenog. Spojevi koji su prevladavali u uzorcima bile su hidroksicimetne kiseline i flavonoidi. Najzastupljenija je bila klorogenska kiselina (10,5-22,36 mg/g), dok je među flavonoidima dominirao rutin (1,60-4,33 mg/g).

Souid i sur.⁴⁴ su istraživali fenolni profil motra, te je u njihovom istraživanju analizom hidroetanolnih ekstrakata pronađeno osamnaest fenolnih spojeva, a sadržaj ukupnih fenola prelazio je 3% suhe mase. Lišće motra sadržavalo je 31,7 mg GAE/g fenola i 25,6 mg CE/g flavonoida, uključujući 17,3 mg kvercetin ekvivalenta (engl. *Quercetine Equivalents*, QE)/g flavonola. Od fenolnih kiselina najzastupljenije su bile klorogenska (7,25 mg/g), neoklorogenska (2,03 mg/g), *trans*-ferulinska (1,41 mg/g) i kriptoklorogenska (1,17 mg/g) kiselina. U podgrupi flavona, dominirali su rutin (1,75 mg/g) i cirsiliol (1,31 mg/g).

Politeo i sur.³⁴ su ispitivali kemijski profil nusproizvoda hidrodestilacije različitih dijelova motra (cvijeta, lista i stabljike) u fazi punog cvjetanja, sakupljenog na području središnje Dalmacije. Fenolni profil zaostale vode nakon izolacije eteričnog ulja analiziran je tekućinskom kromatografijom i spektrofotometrijskim metodama. Analizom je detektirano 12 fenolnih spojeva među kojima je u najvišoj koncentraciji pronađena klorogenska kiselina (4,48-17,69 mg/g) i njeni izomeri, kriptoklorogenska (3,10-11,04 mg/g) i neoklorogenska kiselina (3,27-11,47 mg/g). Najviša koncentracija ukupnih

fenola, flavonoida i tanina pronađena je u uzorcima cvijeta, zatim listu, a najniža u stabljici.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada kao biljni materijal korišteni su nadzemni dijelovi biljke motar (lat. *Crithmum maritimum* L.) prikupljeni u svibnju 2022. godine na području otoka Čiova (Srednja Dalmacija, Hrvatska). Za istraživanje su odabrani mladi, zdravi zeleni listovi i izbojci, dok su drvenasti dijelovi biljke odvojeni i odbačeni. Biljni materijal je smrznut i potom osušen postupkom liofilizacije.



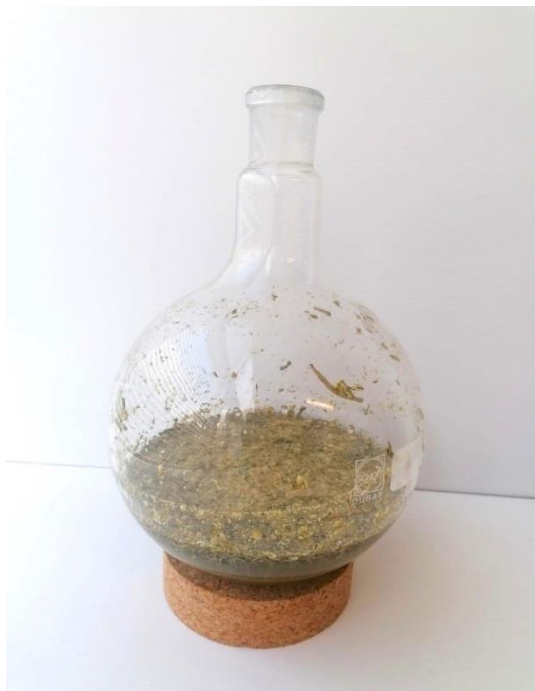
Slika 7. Liofilizirani uzorak motra

2.2. Postupak ekstrakcije

Prije postupka ekstrakcije prethodno liofilizirani biljni materijal je homogeniziran u ručnom mlincu i prosijan kroz sito promjera otvora 1 mm tijekom 20 minuta. Za ekstrakciju je na analitičkoj vagi odvagano po 5 g pripremljenog biljnog materijala u Falcon epruvetu te dodano 50 mL otapala. Kao otapalo je korištena otopina etanola (etanol:voda=1:1, v/v).

Svi uzorci pripremljeni su na isti način, nakon čega su po tri uzorka korištena za različite metode ekstrakcije; mikrovalnu ekstrakciju, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i konvencionalnu metodu ekstrakcije uz miješanje.

Kod MAE, ekstrakcije su provedene korištenjem različite snage mikrovalova, i to 300 W, 500 W i 700 W. Kod pripreve ekstrakata UAE, postupak ekstrakcije provodio se pri sobnoj temperaturi, 30°C i 60°C te pri konstantnoj frekvenciji od 50 Hz, dok su kod konvencionalne metode ekstrakcije uz miješanje također testirane različite temperature (sobna temperatura, 30°C i 60°C).

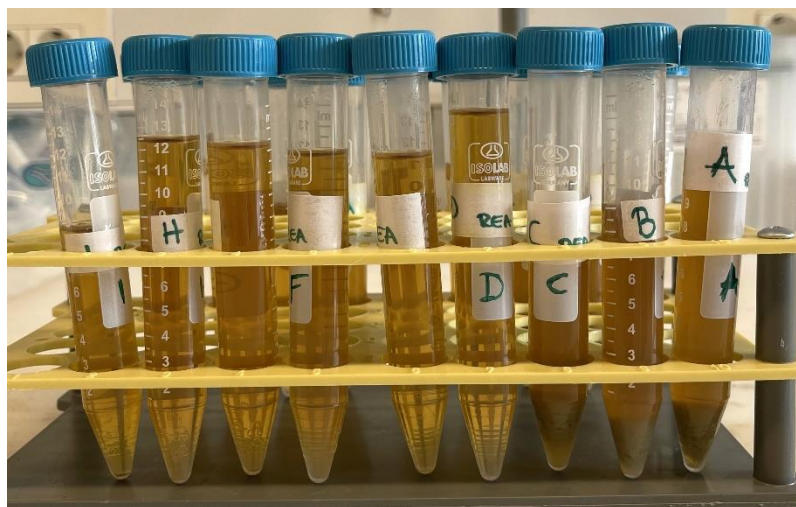


Slika 8. Uzorak motra nakon mikrovalne ekstrakcije

Vrijeme trajanja ekstrakcije kod svih uzoraka bilo je 30 minuta. Nakon ekstrakcije, suspenzije su profiltrirane kroz naborani filter papir, dobiveni filtrati su skladišteni pri temperaturi +4 °C tijekom 24 h nakon čega su ponovno filtrirani.

Tablica 1. Uzorci i primijenjeni postupci ekstrakcije

Oznaka uzorka	Uvjeti ekstrakcije
A	Mikrovalna ekstrakcija pri 300 W.
B	Mikrovalna ekstrakcija pri 500 W.
C	Mikrovalna ekstrakcija pri 700 W.
D	Ultrazvučna ekstrakcija pri sobnoj temperaturi.
E	Ultrazvučna ekstrakcija pri 40°C.
F	Ultrazvučna ekstrakcija pri 60°C.
G	Ekstrakcija uz miješanje pri sobnoj temperaturi.
H	Ekstrakcija uz miješanje pri 40°C.
I	Ekstrakcija uz miješanje pri 60°C.



Slika 9. Pripremljeni ekstrakti motra

2.3. Određivanje fenolnih spojeva

2.3.1. Određivanja ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom koja se zasniva na oksidaciji fenolnih spojeva reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu nastaje plavo obojenje, čiji intenzitet je direktno proporcionalan sadržaju fenolnih spojeva u uzorku. Intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini 765 nm.⁵⁸

Reagensi:

- Otopina natrijeva karbonata, $w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$ (w/v)
- Folin Ciocalteu reagens

Postupak:

U kivetu se otpipetira 25 μL uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125 μL Folin-Ciocalteu reagensa te se nakon 5 min doda i 375 μL otopine natrijevog karbonata. Pripremljeni uzorci se ostave tijekom 2 h u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega im se očita absorbancija pri 765 nm.

Kao referentni standard se koristi galna kiselina, a sadržaj ukupnih fenola izračuna se preko jednadžbe baždarnog pravca dobivenog za otopine galne kiseline različite koncentracije. Dobiveni rezultati za sadržaj ukupnih fenola se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline po 1 L ekstrakta (mg GAE/L).

2.3.2. Određivanja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u biljnim ekstraktima određen je primjenom kolorimetrijske metode kod koje su kao reagensi korišteni aluminijev klorid i natrijev nitrit. Dodatkom uzorka u otopinu koja sadrži reagense dolazi do pojave žutog obojenja čiji intenzitet se mjeri pri valnoj duljini 510 nm.⁵⁹

Reagensi:

- otopina natrijeva nitrita, $w(\text{NaNO}_3) = 5\%$ (w/v)

- otopina aluminijeva klorida, $w(\text{AlCl}_3) = 10\%$ (w/v)
- otopina natrijevog hidroksida, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$

Postupak:

U kivetu se otpipetira 250 μL uzorka, 1,525 mL vode i 75 μL otopine natrijevog nitrita te se otopina ostavi da odstoji 6 minuta nakon čega se doda 150 μL otopine aluminijeva klorida. Otopina se ponovno ostavi da odstoji 5 minuta, nakon čega se doda 500 μL otopine NaOH i 775 μL destilirane vode. Tako pripremljenim uzorcima, odmah se izmjeri absorbancija pri 510 nm. Udio ukupnih flavonoida u biljnim ekstraktima se izračuna preko jednadžbe baždarnog pravca dobivene testiranjem otopina rutina koji se koristi kao referentni standard, a dobiveni rezultati se izražavaju kao mg rutin ekvivalenata po 1 L ekstrakta (mg RE/L).

2.3.3. Određivanje ukupnih tanina

Ukupni tanini određuju se također kolorimetrijskom metodom kod koje se uzorcima dodaje otopina vanilina pri čemu nastaje crveno obojenje čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini 500 nm.⁶⁰

Reagensi:

- Otopina vanilina, $w(\text{vanilina}) = 4\%$ (w/v)
- Klorovodična kiselina, $w(\text{HCl}) = 37\%$ (v/v)

Postupak:

U kivetu se otpipetira 50 μL uzorka, 1,5 mL otopine vanilina i 750 μL koncentrirane klorovodične kiseline te se otopina dobro promiješa i ostavi 20 minuta u tami. Nakon toga, otopini se izmjeri absorbancija pri 500 nm, a u konačnici se udio ukupnih tanina izražava preko jednadžbe baždarnog pravca dobivene za referentni standard testiran u različitim koncentracijama, tj. u miligramima ekvivalenata katehina po 1 L ekstrakta (mg KE/L).

2.3.4. HPLC analiza

Kvantifikacija i identifikacija fenolnih spojeva provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Za analizu je korišten Shimadzu Nexera sustav LC-40 opremljen UV/VIS detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan), a fenolni spojevi su odvojeni na koloni Phenomenex C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm, Torrance, Kalifornija, SAD).

Reagensi:

- otapalo A - 0,2 % fosfatna kiselina, (v/v)
- otapalo B - metanol/acetonitril, 1:1, (v/v)

Postupak:

Kao mobilna faza A korištena je 0,2% fosfatna kiselina, a kao mobilna faza B metanol-acetonitril u omjeru 1:1 (v/v). Brzina protoka bila je 1,0 mL/min, a temperatura 35°C. Nakon početka elucije postavio se program kako slijedi: 0-16 min (linearni gradijent do 15% B), 16-50 min (linearni gradijent do 35% B), 50-62 min, (linearni gradijent do 4% B), 62-65 min (4% B). Nakon uspostave početnih uvjeta isti su održavani tijekom 10 min kako bi se kolona uravnotežila. Dobiveni pikovi su identificirani usporedbom vremena zadržavanja spojeva i spektra pri 220 i 320 nm s onima dobivenim za fenolne standarde testirane pri istim uvjetima. Kvantifikacija se provela korištenjem vanjske standardne kalibracijske krivulje, a rezultati su izraženi kao mg spoja po L ekstrakta (mg/L).

2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

2.4.1. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metodom određuje se sposobnosti antioksidansa da pri niskoj pH vrijednosti (3,6), reakcijom izmjene jednog elektrona reducira žuto obojeni kompleks $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ u plavo obojeni kompleks $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. Intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini 593 nm.^{61,62}

Reagensi:

- Acetatni pufer, c ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$)=300 mM, pH= 3,6
- Otopina klorovodične kiseline, c (HCl)=40 mM
- Otopina 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), c ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$)=10 mM
- Otopina FeCl_3 , c (Fe^{3+})=20 mM
- FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ-a i 2,5 mL otopine FeCl_3 -a

Postupak:

U kivetu se otpipetira 3 mL FRAP reagensa te se očita vrijednost absorbancije otopine pri 593 nm (A_0). Zatim se u reagens doda 100 μL uzorka te se otopini mjeri absorbancija nakon točno 4 minute (A_4). Promjena absorbancije se izračuna kao razlika konačne i početne vrijednosti absorbancije, dok se FRAP vrijednosti uzorka računa preko jednadžbe baždarnog pravca dobivene za otopine željeza i izražava u μM ekvivalenata Fe (II).

2.4.2. DPPH metoda

Metoda gašenja slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka, a temelji se na sposobnosti antioksidansa, tj. elektron donora, da stabilizira DPPH radikal pri čemu intenzivno ljubičasto obojena otopina radikala u reakciji s antioksidansom blijedi. Navedene promjene prate se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 517 nm.⁶³

Reagensi:

- Etanolna otopina DPPH radikala (apsorbancija $1,2 \pm 0,05$)

Postupak:

U kivetu se otpipetira 2 mL otopine DPPH reagensa i očita mu se apsorbancija pri 517 nm (A_0). Zatim se u otopinu doda 50 μ L uzorka. Smjesa se ostavi u tami na sobnoj temperaturi tijekom 1 h nakon čega joj se ponovno izmjeri apsorbancija pri istoj valnoj duljini (A_{1h}). Antioksidativna aktivnost uzoraka, odnosno postotak inhibicije DPPH radikala, izračuna se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\text{Inhibicija DPPH radikala (\%)} = [(A_0 - A_{1h}) / A_0] \times 100$$

gdje je:

A_0 - apsorbancija otopine DPPH (kontrolne otopine), $t = 0$ minuta,

A_{1h} - apsorbancija reakcijske smjese nakon 1 h od dodatka uzorka, $t = 1$ h

2.5. Statistička analiza

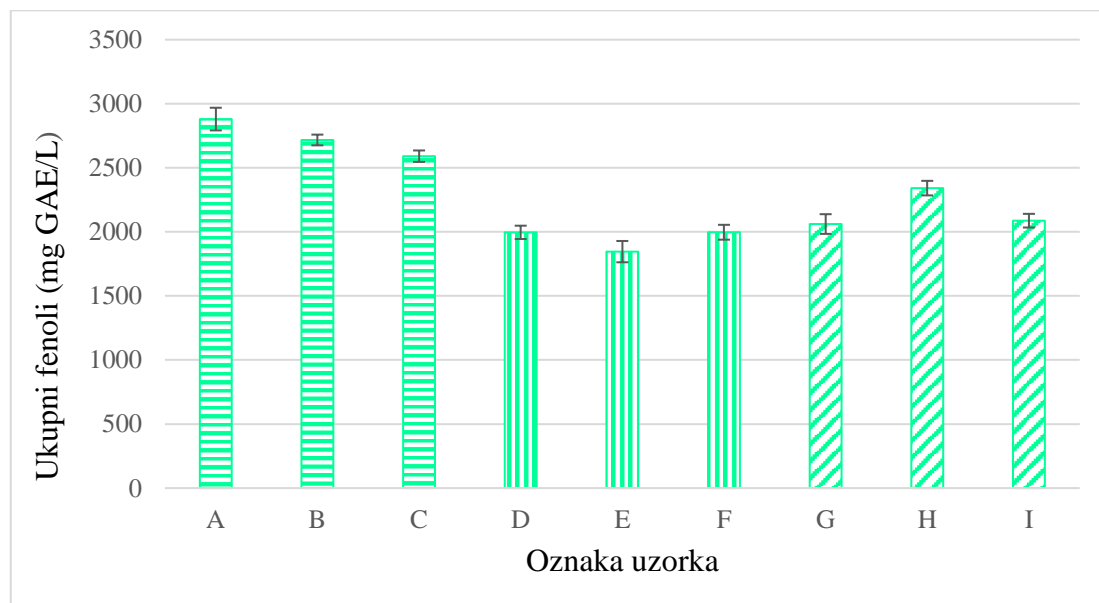
Statistička analiza podataka provedena je korištenjem statističkog programa GraphPad InStat3 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD) pri čemu je odnos između testiranih varijabli opisan Pearsonovim koeficijentom korelacije „r“, kod čega se $p < 0,05$ smatrala statistički značajnom pogreškom.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je istražiti utjecaj različitih metoda ekstrakcije i uvjeta provođenja istih na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih tanina te na sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina određenim primjenom HPLC u ekstraktima motra, kao i na antioksidativnu aktivnost ekstrakata koja je ispitana korištenjem DPPH i FRAP metoda.

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Rezultati određivanja ukupnih fenola korištenjem Folin-Ciocalteu metode, izraženi u mg GAE/L, prikazani su na slici 10 iz koje se može uočiti da je primjena različitih metoda i uvjeta ekstrakcije rezultirala ekstraktijom različitih sadržaja fenolnih spojeva u testiranim uzorcima.



Slika 10. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima motra pri različitim uvjetima i metodama ekstrakcije

Vidljivo je da je udio izoliranih fenolnih spojeva najviši kod uzorka podvrgnutih mikrovalnoj ekstrakciji (2591-2880 mg GAE/L), a najniži kod uzoraka za čiju ekstrakciju je primijenjen ultrazvuk (1846-1997 mg GAE/L). Kod uzoraka kod kojih je korištena konvencionalna metoda ekstrakcije uz miješanje, sadržaj ukupnih fenolnih spojeva se kretao između prethodno navedenih vrijednosti. Usporedbu ukupnog sadržaja fenola u ekstraktima listova čajote, pripremljenih maceracijom, MAE (300 W) i UAE, koristeći isto vrijeme i temperaturne uvjete optimizirane korištenjem UAE (55 °C, 30 minuta, 60% amplituda), proveli su Vieira i sur.⁶⁴ te su zabilježili najviši sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima pripremljenim korištenjem UAE, zatim MAE, dok se najlošijom pokazala maceracija. Također, Cheng i sur.⁶⁵ su na ekstraktima nangka ispitivali utjecaj MAE (550 W), UAE (ultrazvučne snage 250 W) i konvencionalne metode ekstrakcije (maceracija u tami tijekom 1 h) na sadržaj ukupnih fenola pri čemu je MAE rezultirala ekstraktom s najvišim sadržajem ukupnih fenola. Različite tehnike ekstrakcije u svrhu postizanja visoke ekstrakcije fenolnih spojeva iz propolisa istraživali su Oroian i sur.⁶⁶ upotrebom dvostruke maceracije (24 h na sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje), dvostruke MAE (1 min pri 140 W) i dvostruke UAE (15 min pri 20 kHz) te je u njihovom istraživanju UAE imala najveći prinos.

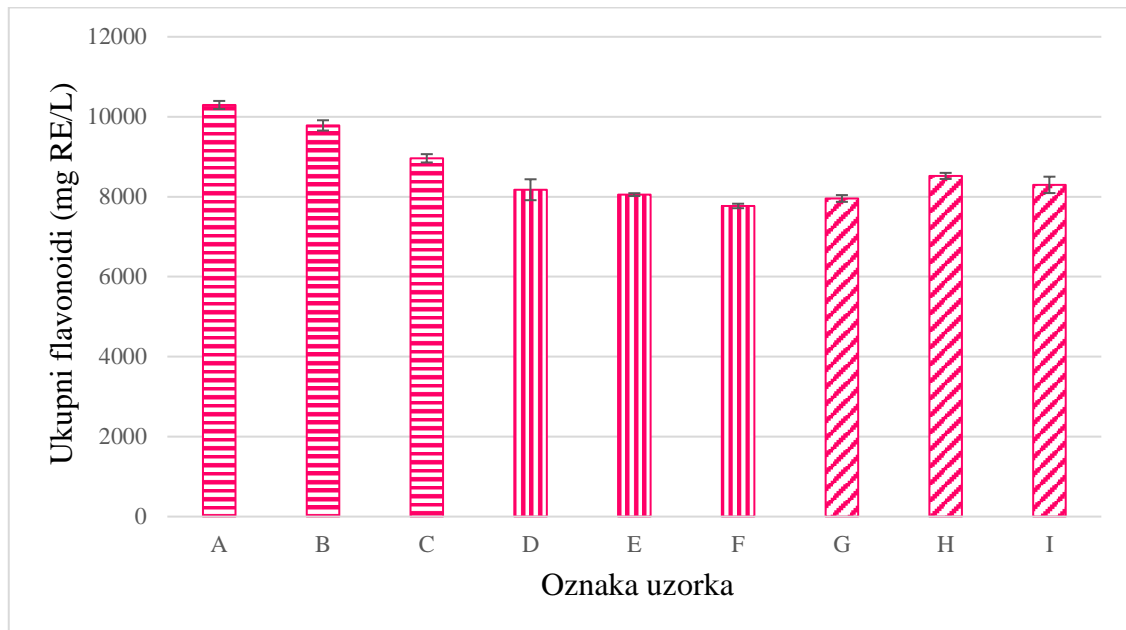
U ovom istraživanju kod uzorka A kod kojeg je korištena najniža snaga mikrovalova (300 W) sadržaj fenolnih spojeva bio je najviši (2880 mg GAE/L), dok je kod uzorka C kod kojeg je korištena najviša snaga mikrovalova (700 W) udio fenolnih spojeva bio najniži. Iz navedenog se može zaključiti da s povećanjem primijenjene snage mikrovalova, koncentracija fenolnih spojeva u ekstraktima motra opada. Istraživanje Alara i sur.⁶⁷, koji su na listovima *Cacaria papaje* testirali utjecaj snage mikrovalova (300-600 W) na udio fenola pri konstantnoj temperaturi (50 °C) tijekom 4 min, te dokazali najviši sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu pripremljenom primjenom mikrovalne snage od 400 W. U ovom istraživanju, povećanjem mikrovalne snage iznad 400 W, zabilježen je niži udio fenolnih spojeva u ekstraktima. Slično je pokazalo istraživanje Gunalana i sur.⁶⁸ u kojem je ispitivan utjecaj mikrovalne snage (500-700 W), temperature (30-50 °C) i vremena ekstrakcije (20-40 min) na sadržaj ukupnih fenola iz listova moringe pri čemu je ekstrakcijom pri 600 W, 40 °C i tijekom 30 min izolirana maksimalna količina fenolnih spojeva. U ovom istraživanju porast temperature i snage mikrovalova rezultirao je smanjenjem sadržaja ukupnih fenola vjerojatno zbog njihove degradacije.

Kod uzoraka analiziranih u ovom radu može se primijetiti neznatna razlika u sadržaju ukupnih fenola kod uzorka F koji je pripremljen pri 60 °C uz djelovanje ultrazvuka i uzorka D koji je pripremljen pri sobnoj temperaturi uz djelovanje ultrazvuka. Nešto niža koncentracija fenola pronađena je u uzorku E koji je također pripremljen djelovanjem ultrazvuka, ali pri 40 °C. Generalić Mekinić i sur.⁴⁹ su u etanolnim ekstraktima motra, dobivenim primjenom UAE pri 50 °C, imali sadržaj ukupnih fenola od 35,1 mg GAE/L. Costa i sur.⁶⁹ su ispitali karakteristike ekstrakata motra pripremljenih UAE i ekstrakcijom superkritičnim fluidom (SFE). U navedenom istraživanju najbolji uvjeti za UAE utvrđeni su pri 50 °C, u trajanju od 20 min i uz 40% (v/v) koncentraciju etanola kao ekstrakcijskog otapala. Sadržaj ukupnih fenola je kod navedenog ekstrakta iznosio 23,44 mg GAE/g (u UAE ekstraktima u ovom istraživanju se udio fenola kretao između 18,5-20 mg GAE/L). Iako je bilo očekivano da porast temperature uz djelovanje ultrazvuka pospješuje izolaciju fenola, dobiveni rezultati pokazuju blago odstupanje od navedenog. Haslina i sur.⁷⁰ su primjenom UAE ispitali utjecaj temperature (30, 35 i 40 °C) i trajanja ekstrakcije (15, 20 i 25 min) na udio ukupnih fenola u plodu crne mangrove. Najviši sadržaj ukupnih fenola je postignut pri 30 °C i 15 min (najniža temperatura, najkraće vrijeme ekstrakcije), a najniži pri 40 °C i 25 min (najviša temperatura, najdulje vrijeme ekstrakcije).

Najvišu koncentracija fenola kod ekstrakata pripremljenih korištenjem konvencionalne ekstrakcije ima uzorak H (2341 mg GAE/L) pripremljen miješanjem pri 40 °C, slijedi uzorak I pripremljen miješanjem pri 60 °C. Nešto nižu vrijednost od uzorka ima je uzorak G pripremljen pri sobnoj temperaturi. Dobiveni rezultati ukazuju na to da primjenom konvencionalne metode ekstrakcije, ekstrakcija pri 40 °C ima najbolji učinak na izolaciju ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakata. Konvencionalnom metodom su Houta i sur.⁵⁰ odredili sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktima različitih dijelova motra u rasponu od 9,42 do 17,11 mg GAE/g (u ovom istraživanju je isti bio dvostruko viši, od 20,6 do 23,4 mg GAE/L). Isto tako su Nabet i sur.⁵⁶ metanolnim ekstraktima iz nadzemnih dijelova motra istražili udio fenola koji je iznosio 47,1 mg GAE/g, što je dvostruko više od u ovom radu izmjerenih vrijednosti. Temperatura 70°C i trajanje ekstrakcije 40 min pokazali su se kao najučinkovitijim uvjetima kod ispitivanja utjecaj temperature (30-70 °C) i vremena (20-60 min) na ekstrakciju ukupnih fenola iz listova koprive maceracijom u studiji koju su proveli Tarasevičiene i sur.⁷¹

3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida

Na slici 11 prikazani su rezultati određivanja ukupnih flavonoida izraženi u mg RE/L, te su u ovom slučaju kao i kod ukupnih fenola vidljivi utjecaji primijenjene metode ekstrakcije na udio ove skupine spojeva.



Slika 11. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima motra pri različitim uvjetima i metodama ekstrakcije

Isto kao i kod određivanja ukupnih fenola, najviši udio ukupnih flavonoida je ekstrahiran u uzorke kod kojih je primijenjena mikrovalna ekstrakcija (8961-10295 mg RE/L), dok je udio ukupnih flavonoida za uzorke kod kojih su primijenjen ultrazvuk i konvencionalna ekstrakcija uz miješanje rezultirali relativno sličnim vrijednostima.

Flavonoide u uzorcima motra istraživali su Generalić Mekinić i sur.⁴³, Jallali i sur.⁵⁵, Maleš i sur.⁵³

Uspoređujući MAE (100 W, 4 min), UAE (pri amplitudi od 50%, 5 minuta) i maceraciju (60 °C, 2 h) za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida iz *Cassia alata*, Ling i sur.⁷² su zabilježili najviši udio fenola i flavonoida u ekstraktima dobivenim MAE u odnosu na ekstrakte dobivene UAE i maceracijom s tim da su vrijednosti dobivene

korištenjem UAE i MAE bile značajno više (24 do 93% više) nego li iste dobivene maceracijom.

U ovom istraživanju kod testiranih MAE uzoraka, može se uočiti da je najviša koncentracija flavonoida ekstrahirana u uzorku A kod kojeg je primijenjena najniža snaga mikrovalova (300 W), a najniža kod uzorka C (8961 mg RE/L) kod kojeg je primijenjena najviša snaga mikrovalova. Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da povećanjem snage mikrovalova učinkovitost izolacije flavonoida opada, kao što je bio slučaj kod sadržaja ukupnih fenola.

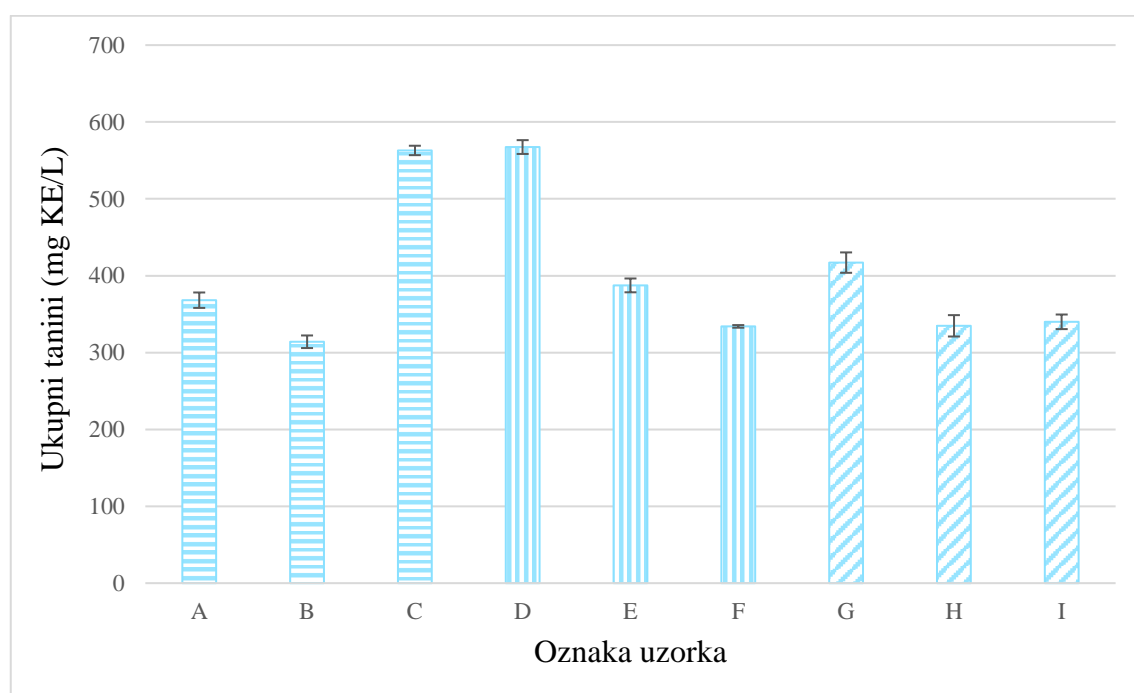
Udio ukupnih flavonoida opada povišenjem temperature uz djelovanje ultrazvuka, najviši udio ima uzorak D (8175 mg RE/L) ekstrahiran pri sobnoj temperaturi, zatim uzorak E ekstrahiran pri 40°C, a najniži udio zabilježen je u uzorku F ekstrahiranom pri 60 °C. Ultrazvučnu ekstrakciju flavonoida, pri različitim temperaturama (40, 50, 60, 70 i 80 °C), vremenu (30, 50, 70 i 90 min), omjeru otapala i biljnog materijala (10, 20, 30 i 40 mL/g) i koncentracije etanola (50, 60, 70, 80 i 90 %) iz stabljike i listova *Astragalus membranaceus* proveli su Cui i sur.⁷³ pri čemu je najniži sadržaj flavonoida dobiven pri temperaturi od 40 °C, a najviši pri 50 °C s tim da je pri višim temperaturama sadržaj opadao s malim odstupanjem pri 70 °C. Najbolji rezultati u navedenom istraživanju postignuti su pri 50 °C tijekom 50 min, omjer otapala i krutine biljnog materijala 30 mL/g i koncentracija etanola od 80%.

Među ekstraktima koji su dobiveni konvencionalnom metodom ekstrakcije, najviša koncentracija flavonoida zabilježena je kod uzorka H (8520 mg RE/L), zatim uzorka I, a najniža kod uzorka G. Isto kao kod određivanja ukupnih fenola, konvencionalna metoda ekstrakcije pri 40 °C se pokazala najučinkovitijim za navedenu skupinu spojeva.

3.3. Rezultati određivanja ukupnih tanina

Na slici 12 prikazani su rezultati određivanja ukupnih tanina vanilin metodom izraženi u mg KE/L. Za razliku od rezultata određivanja ukupnih fenola i flavonoida, vidljivo je da je ova skupina spojeva znatno manje zastupljena u svim uzorcima.

Ekstrakciju fenolnih spojeva iz motra maceracijom s 80%-tnim etanolom proveli su Jallali i sur.⁵⁵, a sadržaj ukupnih tanina se kretao od 0,34 do 0,63 mg KE/g, dok su Houta i sur.⁵⁰ u metanolnim ekstraktima različitih dijelova motra zabilježili udio tanina između 0,43 mg i 5,24 mg KE/g. Kod nas su se vrijednosti sadržaja tanina, preračunate po gramu suhog uzorka kretale između 3,14 i 5,67 mg KE/g. Također, u istraživanju Maleš i sur.⁵³, udio ukupnih tanina je bio u rasponu od 0,10 do 2,65%, dok su Nabeta i sur.⁵⁶ detektirali znatno nižu koncentraciju tanina u odnosu na ostala istraživanja (0,04 mg KE/g).



Slika 12. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih tanina u ekstraktima motra pri različitim uvjetima i metodama ekstrakcije

U ovom radu najviša koncentracija ukupnih tanina zabilježena je kod ekstrakta D pripremljenog korištenjem ultrazvuka pri sobnoj temperaturi (567 mg KE/L), dok ekstrakti E i F, pripremljeni pri 40 i 60 °C imali nižu koncentraciju tanina.

Uočljivo je da uzorak C, kod kojeg je korištena najviša snaga mikrovalova (700 W), imao približno jednaku vrijednost kao i uzorak D, dok je najniži udio tanina među svim uzorcima zabilježen kod uzorka B (314 mg KE/L) ekstrahiranim korištenjem

mikrovalova snage 500 W. Huma i sur.⁷⁴ su ispitivali utjecaj mikrovalne snage (170, 340, 900 W), koncentracija etanola (30-90%) i omjera otapala i uzorka (10-30 mL/g) na učinkovitost MAE u ekstrakciji tanina i ukupnih fenola iz *Ceratonia siliqua* te su određene optimalne uvjete MAE (340 W, 45%, 30 mL/g, 4,5 min) uspoređivali s UAE (30 min, 20 kHz, 25 °C, 45%, 30 mL/g) i maceracijom (50 °C, 2 h, 45%, 30 mL/g). Ovo istraživanje nije pokazalo značajan utjecaj snage mikrovalova na ekstrakciju budući da su postignute približno jednake vrijednosti sadržaja tanina pri 170 W i 900 W korištenjem 30% etanola (v/v) i odnosa biljnog materijala i otapala 10 mg/L, a najbolji prinos tanina postignut je maceracijom u usporedbi s MAE i UAE.

Kod ekstrakata pripremljenim konvencionalnom ekstrakcijom uz miješanje pri različitim temperaturama, najviša koncentracija tanina pronađena je kod uzorka G (417 mg KE/L) koji je pripremljen pri sobnoj temperaturi, a najniža kod uzorka H (335 mg KE/L) pri 40 °C.

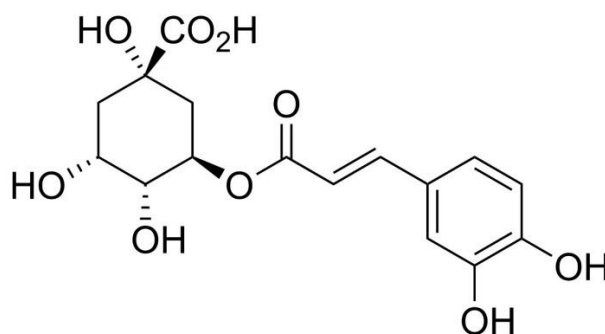
3.4. Rezultati HPLC analize

U tablici 2 prikazani su rezultati određivanja sadržaja fenolnih kiselina u ekstraktima pomoću HPLC-UV/VIS analize, a rezultati su izraženi u mg/L.

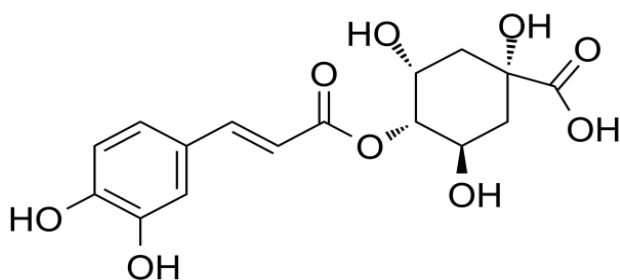
Tablica 2. Rezultati određivanja sadržaja fenolnih kiselina (mg/L) u ekstraktima motra primjenom HPLC analize

Uzorci	Neoklorogenska kiselina	Klorogenska kiselina	Kriptoklorogenska kiselina
A	16,39 ± 0,17	1049,91 ± 0,02	36,93 ± 0,34
B	16,72 ± 0,17	1067,03 ± 0,28	38,42 ± 0,28
C	17,01 ± 0,03	1009,69 ± 0,84	38,98 ± 0,03
D	9,41 ± 0,02	867,83 ± 0,15	22,16 ± 0,03
E	9,06 ± 0,08	837,95 ± 0,04	21,25 ± 0,18
F	9,25 ± 0,15	832,66 ± 0,54	21,15 ± 0,37
G	8,89 ± 0,00	890,79 ± 0,28	21,52 ± 0,01
H	10,39 ± 0,26	978,49 ± 1,25	24,19 ± 0,46
I	9,05 ± 0,10	865,89 ± 0,46	20,80 ± 0,09

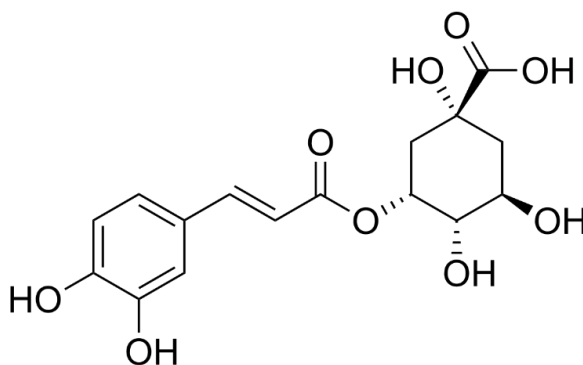
Primjenom HPLC analize identificirane su tri najvažnije fenolne kiseline u uzorcima motra, a to su klorogenska, kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina.



Slika 13. Struktura klorogenske kiseline⁷⁶



Slika 14. Struktura kriptoklorogenske kiseline⁷⁷



Slika 15. Struktura neoklorogenske kiseline⁷⁸

Navedeno je u skladu s istraživanjima Siracusa i sur.⁵⁴ prema kojima je klorogenska kiselina, zajedno sa svojim izomerima i višim derivatima, te ostalim fenolnim kiselinama gotovo jedina klasa fenola u motru. Brojna istraživanja su također pokazala da je klorogenska kiselina najzastupljeniji fenolni spoj u motru^{33,34,42,43,47,49,53,56,78}. Generalić Mekinić i sur.⁴⁹ su ispitivali sastav ekstrakata različitih dijelova motra (cvijet, list, stabljika) pripremljenih pomoću UAE pri 50°C, najviša koncentracija klorogenske kiseline otkrivena je u listovima (8,1 mg/g), dok je u cvjetovima koncentracija bila nešto niža, a značajno niže koncentracije zabilježene su u stabljici. Preračunate vrijednosti klorogenske kiseline po 1 gramu uzorka u ovom istraživanju su se kretale između 8,33 i 10,67 mg/g. Također, Piatti i sur.⁴⁷ su ispitivali ekstrakte nadzemnih dijelova motra ekstrahiranih perkolacijom 70%-tnim etanolom pri 60°C te je klorogenska kiselina bila spoj zastupljen u najvišoj koncentraciji (10,5-22,36 mg/g). Isto tako, analizom fenolnog profila zaostale vode nakon hidrodestilacije različitih dijelova

motra, Politeo i sur.³⁴ su detektirali 12 fenolnih spojeva od kojih su klorogenska kiselina i njeni izomeri (kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina) pronađeni u najvišim koncentracijama.

Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju uočljivo je da je klorogenska kiselina dominantna fenolna kiselina u svim ekstraktima, a najviša koncentracija je zabilježena kod uzoraka podvrgnutih MAE (1010-1067 mg/L) među kojima se ističe uzorak B s najvišom vrijednosti. Nešto niže koncentracije detektirane su kod uzoraka podvrgnutih konvencionalnoj metodi zatim kod uzoraka kod kojih je primijenjena UAE. Routray i Orsat⁷⁹ uspoređivali su prinos klorogenske kiseline u listovima borovnice dobiven tijekom 1 h UAE (40 kHz) i 24 h ekstrakcije pri sobnoj temperaturi s MAE (4, 14 i 24 min) pri različitim snagama mikrovalova (10%, 15% i 20% od 710,5 W). MAE ekstrakcija bila je učinkovitija od ostalih metoda bez obzira na uvjete.

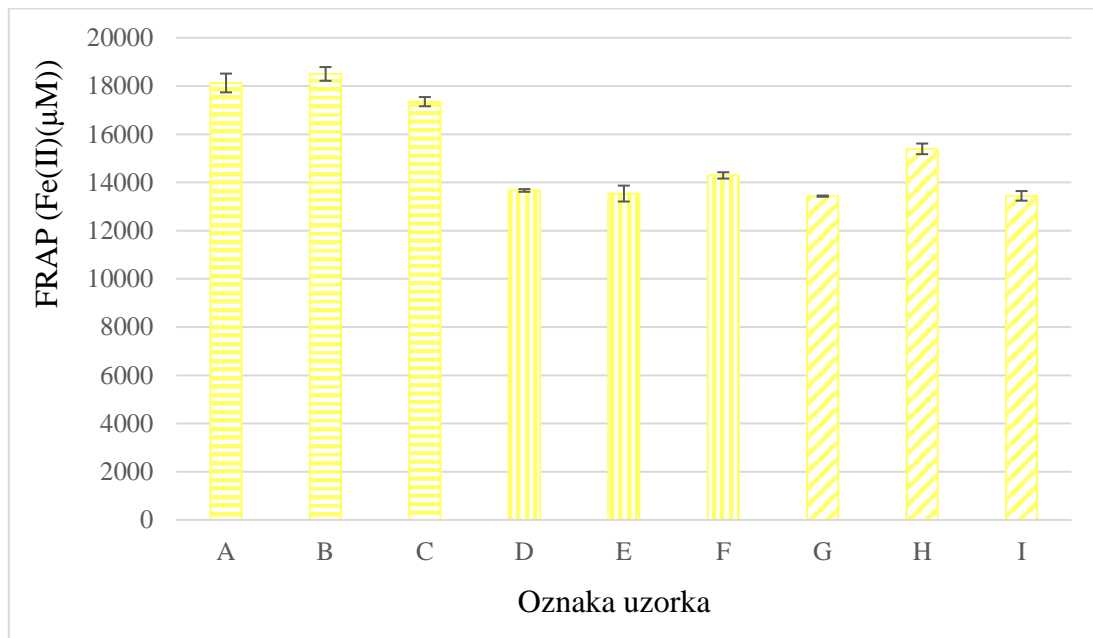
Niže koncentracije u odnosu na sadržaj klorogenske kiseline su zabilježene za njene derivate, odnosno neoklorogensku i kriptoklorogensku kiselinu. Navedeni spojevi su također najbolje ekstrahirani mikrovalnom ekstrakcijom. Kod uzorka C, primjenom snage mikrovalova od 300 W, zabilježena je najviša koncentracija obje kiseline (38,98 mg/L i 17,01 mg/L). Drugi najbolji uvjeti za ekstrakciju su postignuti konvencionalnom metodom pri 40 °C, a najlošiji korištenjem UAE. Souid i sur.⁴³ su pored klorogenske kiseline također detektirali neoklorogensku i klorogensku kiselinu kao najzastupljenije fenolne kiseline u etanolnim ekstraktima lišća motra. Isto su utvrdili Pereira i sur.⁴² istraživanjem ekstrakata raznih dijelova motra (cvjetovi, lišće, stabljika).

3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata motra određena je primjenom DPPH i FRAP metode.

3.4.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Na slici 13 prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti uzoraka korištenjem FRAP metode, a izraženi su kao $\mu\text{M Fe(II)}$.



Slika 16. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode

Primjenom FRAP metode, najbolju antioksidacijsku sposobnost su pokazali MAE uzorci ($17350\text{-}18125 \mu\text{M Fe(II)}$), dok su se FRAP vrijednosti kod uzoraka kod kojih je korišten ultrazvuk bile $13666\text{-}14291 \mu\text{M Fe(II)}$, a kod uzoraka ekstrahiranih konvencionalnom metodom $13431\text{-}15392 \mu\text{M Fe(II)}$). Također, Generalić Mekinić i sur.⁴⁹ su prethodno navedenim ekstraktima različitih dijelova motra odredili i antioksidacijsko djelovanje, a najbolje rezultate su dobili za ekstrakt lišća. FRAP metodom antioksidacijsku aktivnost ekstrakata motra testirali su Pereira i sur.⁴², Aleman

i sur.⁴⁸, Souid i sur.⁴⁴ pri čemu su testirani uzorci pokazali također veliku sposobnost redukcije željeza.

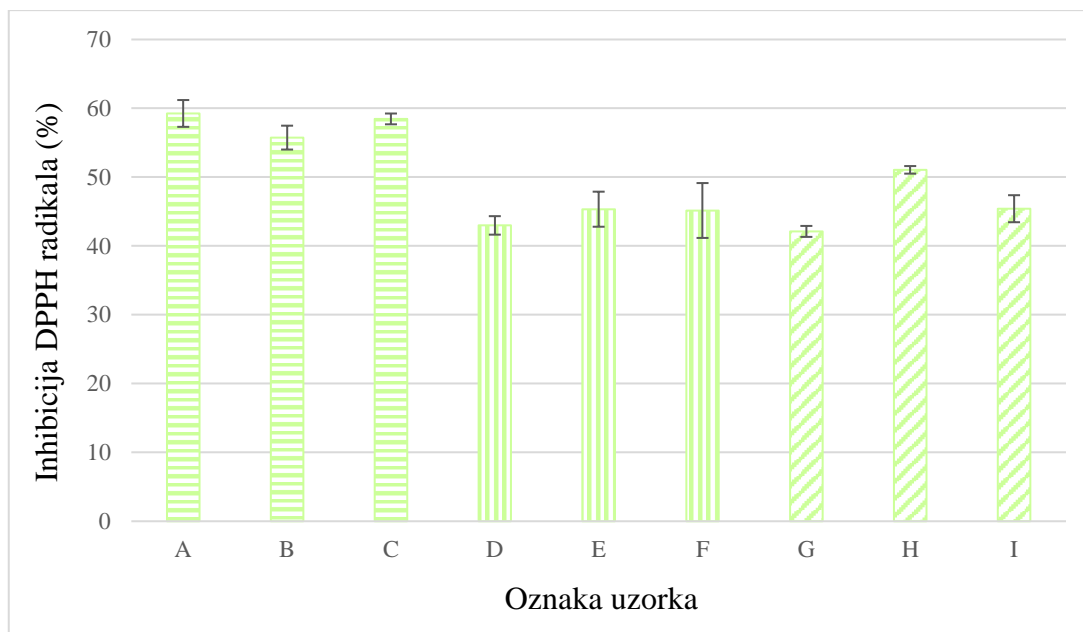
Najvišu redukcijsku aktivnost imao je uzorak B za čiju ekstrakciju je upotrijebljena snaga mikrovalova od 500 W, dok su za ostala dva uzorka pripremljena djelovanjem mikrovalova zabilježene nešto niže vrijednosti. Od ekstrakata dobivenih djelovanjem ultrazvuka pri različitim temperaturama, najbolja antioksidacijska sposobnost detektirana je kod uzorka F koji je pripremljen pri 60 °C, a najlošija kod uzorka E koji je pripremljen pri 40 °C.

Može se uočiti da od svih uzoraka najnižu redukcijsku aktivnosti imao uzorak I pripremljen konvencionalnim postupkom pri 60 °C. Od ostalih uzoraka pripremljenih konvencionalnim postupkom, najvišu vrijednost je imao uzorak H ekstrahiran pri 40 °C.

Određivanje korelacijskih odnosa primjenom statističke analize potvrđena je snažna pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti testirane FRAP metodom ($R=0,9222$), kao i između sadržaja klorogenske kiseline i redukcijske sposobnosti uzoraka ($R=0,8979$).

3.4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Na slici 14 prikazani su rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka korištenjem DPPH metode izraženi kao postotak inhibicije DPPH radikala.



Slika 17. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode

Dobiveni rezultati postotka inhibicije ukazuju na najbolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala za uzorke A, B i C, odnosno uzorke MAE (56-59%), dok su kod ostalih uzoraka vrijednosti inhibicije nešto niže. Navedeno je bilo i očekivano obzirom na znatno viši sadržaj fenolnih spojeva u njima. Osim sadržaja fenolnih spojeva, Chenga i sur.⁶⁵ su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakata nangka dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije, prethodno navedenim, pri čemu je najveća aktivnost hvatanja DPPH radikala pronađena također u MAE ekstraktu (56,4%, 550 W).

U istraživanju Meot-Duros i sur.³³ i u brojnim drugim, snažno antioksidativno djelovanje motra pripisuje se visokom sadržaju klorogenske kiseline i njenih derivata. Kao i kod FRAP metode, najbolji učinak na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata ima MAE, međutim kod DPPH metode, najpovoljnijom snagom mikrovalova se pokazala jačina od 700 W. Kod ekstrakata pripremljenih djelovanjem ultrazvuka vidljivo je da ne postoji značajna razlika u inhibicijskoj sposobnosti uzoraka E i F pripremljenih pri 40 i 60 °C (45%), dok je kod D uzorka aktivnost bila 43%.

Najnižu antiradikalnu aktivnost pokazao je uzorak G pripremljen konvencionalnom ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi, dok su vrijednosti postotka inhibicije kod ostalih ekstrakata pripremljenih konvencionalnim postupkom ekstrakcije (H i I) pokazali nešto više vrijednosti.

Statističkom analizom podataka dokazana je snažna pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima i antioksidacijske aktivnosti dokazane korištenjem DPPH metode ($R=0,9459$), kao i između sadržaja klorogenske kiseline i DPPH vrijednosti inhibicije ($R=0,9187$).

Antioksidacijsku aktivnost ekstrakata korištenjem DPPH metode u svojim istraživanjima koristili su još Soud i sur.⁴⁴, Siracusa i sur.⁵⁴, Alves-Silva i sur.⁸⁰, Özcan i sur.⁵⁷, Pereira i sur.⁴² te potvrdili dobru antiradikalnu aktivnost uzoraka.

4. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata prezentiranih u ovom radu može se zaključiti da različite metode ekstrakcije kao i uvjeti provedbe istih imaju utjecaj na izolaciju fenolnih spojeva i antioksidacijsku djelotvornost uzoraka motra. Najvišu učinkovitost izolacije ukupnih fenola, kao i ukupnih flavonoida, pokazala je MAE sa snagom mikrovalova od 300 W, a može se uočiti i da porastom mikrovalne snage opada sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima. Kao druga najbolja metoda pokazala se konvencionalna metoda ekstrakcije uz miješanje. Kod tanina uočljivo je da su sadržaji dobiveni MAE sa snagom mikrovalova od 700 W i UAE pri sobnoj temperaturi približno jednaki, ali s nešto višom vrijednošću kod UAE. U uzorcima podvrgnutim MAE pri 700 W, pronađene su najveće količine kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline, dok je najviši udio klorogenske kiseline zabilježen pri MAE s 500 W. Najbolja antioksidacijska svojstva, primjenom DPPH i FRAP metode, pokazali su uzorci također ekstrahirani s MAE koje odlikuje i najviša koncentracija fenola i flavonoida, što je bilo i očekivano. Navedeno ukazuje da se MAE može smatrati najboljim izborom za ekstrakciju fenolnih spojeva iz uzoraka motra, dok izbor optimalnih uvjeta varira ovisno o komponenti koja se izdvaja. Također, na temelju rezultata antioksidativne aktivnosti može se zaključiti da udio fenolnih spojeva utječe na biološku aktivnost ekstrakata motra.

5. LITERATURA

1. *T. Lovrić*, *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. HINUS, Zagreb, 2003, str. 299-300.
2. *Lj. Savić*, Metode ekstrakcije biljnih materijala: Usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkričnog ugljen dioksida, *Lek sir.* **34** (2014) 93-103.
3. *Y. Yi, Q. W. Zhang, S. L. Li, Y. Wang, W. C. Ye, J. Zhao, Y. T. Wang*, Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography, *Food Chem.* **135** (2012) 528–533, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.010>.
4. *Y. Q. Zhou, Q. W. Zhang, S. L. Li, Z. Q. Yin, X. Q. Zhang, W. C. Ye*, Quality evaluation of semen oroxyli through simultaneous quantification of 13 components by high performance liquid chromatography, *Curr. Pharm. Anal.* **8** (2012) 206–13.
5. *S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh*, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (1st Edn), no. 66., International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy, 2008, str. 22,31.
6. *J. Dai, R. J. Mumper*, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Mol.* **15** (2010) 7313-7352, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
7. *Y. Hernández, M. G. Lobo, M. González*, Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple, *Food Chem.* **114** (2009) 734–741, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.021>.
8. *Q. W. Zhang, L. G. Lin, W. C. Ye*, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin. Med.* **13** (2018), doi: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
9. *J. Raso, P. Manas, R. Pagan, F. J. Sala*, Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* **5** (1999) 157–162, doi: [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(98\)00042-x](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(98)00042-x).

10. *R. M. Smith*, Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. of Chromatogr. A* **1000** (2003) 3–27, doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00511-9).
11. *B. Chibuye, S. S. Indra, C. Luke, M. K. Kakoma*, A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants, *Sci. Afr.* **19** (2023) e01585, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>.
12. *L. Wang, C. L. Weller*, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* **17** (2006) 300–312, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>,
13. *N. N. Azwanida*, A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation, *Med. Aromat. Plants* **4** (2015) 196, doi: <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.
14. *M. M. Cowan*, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 564–582, doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.
15. *M. Puri, D. Sharma, C. J. Barrow*, Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends Biotechnol.* **30** (2012) 37–44, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>.
16. *J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, H. M. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar*, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials, *J. Food Eng.* **117** (2013) 426–436, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
17. *S. U. Kadam, B. K. Tiwari, C. P. O'Donnell*, Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 4667–4675, doi: <https://doi.org/10.1021/jf400819p>.
18. *H. M. Kingston, L. B. Jassie* (ur.), *Introduction to Microwave Sample Preparation*. Vol. 187, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.
19. *J. Thuery*, u *E.H. Grant* (ur.), *Microwaves: Industrial, Scientific and Medical Applications*. Artech House, Boston MA, 1992.
20. *L. Jassie, R. Revesz, T. Kierstead, E. Hasty, S. Metz*, u *H.M. Kingston and S.J. Haswell* (ur.), *Microwave-Enhanced Chemistry*. American Chemical Society, Washington, DC, 1997, str. 569.

21. C. S. Eskilsson, E. Bjorklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr.* **902** (2000) 227-250, doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00921-3).
22. M. Saifullah, R. McCullum, Q. V. Vuong, Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Lemon Myrtle: Comparison of Modern and Conventional Extraction Techniques Based on Bioactivity and Total Polyphenols in Dry Extracts, *Processes*. **9** (2021) 2212, doi: <https://doi.org/10.3390/pr9122212>.
23. Z. Dong, F. Gu, F. Xu, Q. Wang, Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews, *Food Chem.* **149** (2014) 54-61, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.052>.
24. B. Kaufmann, P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anal.* **13** (2002) 105-113, doi: <https://doi.org/10.1002/pca.631>.
25. F. Chemat, V. Tomao, M. Virost, Ultrasound assisted extraction in food analysis, u S. Ötleş, Handbook of food analysis instruments. Boca Raton, 2008, str. 85-103.
26. F. J. Sala, J. Burgos, S. Condon, P. Lopez, J. Raso, Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes, G. W. Gould (Ed.), *New methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, 1995.
27. T. J. Mason, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrason. Sonochem.* **3** (1996) 253–260, doi: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X).
28. M. Muchuweti, Phenolic composition and antioxidant properties of some spices, *Am. J. Food Technol.* **2** (2007) 414–421, doi: <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.414.420>.
29. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann. Ist. Super. Sanita.* **43** (2007) 348-361.
30. N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* **99** (2006) 191-203, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
31. URL:<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/fig1/> (8. 6. 2023.)

32. P. Padmanabhan, J. Correa-Betanzo, G. Paliyath. Berries and Related Fruits, u B. Caballero, P. Finglas and F. Toldrá (Eds.), Encyclopedia of Food and Health. Vol. 1, Academic Press, Waltham, MA, 2016, str. 364-371.
33. L. Meot-Duros, C. Magne, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves, Plant Physiol. Biochem. **47** (2009) 37–41, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.006>.
34. O. Politeo, M. Popović, M. Veršić Bratinčević, K. Kovačević, B. Urlić, I. Generalić Mekinić, Chemical Profiling of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) Essential Oils and Their Isolation Residual Waste-Waters, Plants **12** (2023) 214, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12010214>.
35. G. Ljubiša, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb, 1986, str. 231-232.
36. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jasprica, S. Bogdanović, J. Topić, Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga, Zagreb, 2008, str. 246-247.
37. A. Atia, Z. Barhoumi, R. Mokded, C. Abdelly, A. Smaoui, Enviromental eco physiology and economical potential of the halophtye *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), J. Med. Plants Res. **5** (2011) 3564-3571, doi: <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000569>.
38. F. Senatore, F. Napolitano, M. Özcan, Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey, Flavour Fragr. J. **15** (2000) 186–189, doi: [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200005/06\)15:3<186::AID-FFJ889>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200005/06)15:3<186::AID-FFJ889>3.0.CO;2-I).
39. M. Renna, M. Gonnella, The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations, Int. J. Gastron. Food Sci. **1** (2012) 111–115, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2013.06.004>.
40. URL:https://www.freepik.com/premium-photo/samphire-crithmum-maritimum-plant-spain_4336006.htm (13. 5. 2023.)
41. A. Nimac, Utjecaj različitih predtretmana na klijavost i energiju klijanja sjemena motra (*Crithmum maritimum* L.), Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
42. C.G., Pereira, L. Barreira, N. da Rosa Neng, J. Nogueira, F. Manuel, C. Marques, T. F. Santos, J. Varela, L. Custódio, Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro

- antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L., Food and Chem. Toxicol. **107** (2017) 581-589, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.018>.
43. I. Generalić Mekinić, V. Šimat, I. Ljubenković, F. Burčul, M. Grga, M. Mihajlovski, R. Lončar, V. Katalinić, D. Skroza, Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities, Ind. Crops Prod. **124** (2018) 947-953, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.080>.
44. A. Souid, C. M. Della Croce, S. Frassinetti, M. Gabriele, L. Pozzo, M. Ciardi, C. Abdelly, K. B. Hamed, C. Magné, V. Longo, Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanollic Extract of the Edible Halophyte *Crithmum maritimum* L., Mol. **26** (2021) 5380, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26175380>.
45. I. Jallali, W. Megdiche, B. M'Hamdi, S. Oueslati, A. Smaoui, C. Abdelly, R. Ksouri, Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method, Acta Physiol. Plant **34** (2012) 1451–1459, doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0943-9>.
46. J. Burczyk, K. Wierzchowska-Renke, P. Głowniak, D. Marek, Geographic and environmental influences on the variation of essential oil and coumarins in *Crithmum maritimum* L., J. Herbs Spices Med. Plants **9** (2002) 305–311, doi: https://doi.org/10.1300/j044v09n04_07.
47. D. Piatti, S. Angeloni, G. Caprioli, F. Maggi, M. Ricciutelli, L. Arnoldi, Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.): A Promising Biosaline Crop. Extraction, Purification and Chemical Characterization of Polar Extracts, Biol. Life Sci. **1** (2021) 61, doi: <https://doi.org/10.3390/xxxxx>.
48. A. Aleman, D. Marín, D. Taladrid, P. Montero, M. C. Gómez-Guillén, Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes, Food Res. Int. **119** (2018) 665–674, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.044>.
49. I. Generalić Mekinić, I. Blažević, I. Mudnić, F. Burčul, M. Grga, D. Skroza, I. Jerčić, I. Ljubenković, M. Boban, M. Miloš, V. Katalinić, Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): Phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity, J. Food Sci Tech. **53** (2016) 3104–3112, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z>.

50. O. Houta, A. Akrou, M. Neffati, H. Amri, Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Crithmum maritimum* L. cultivated in Tunisia Arid Zones, J. Biol. Act. Prod. Nat. **1** (2011) 138-143, doi: <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719081>.
51. M. Renna, Reviewing the Prospects of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as Emerging Vegetable Crop, Plants **7** (2018) 92, doi: <https://doi.org/10.3390/plants7040092>.
52. URL:<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/chlorogenic-acid.html> (29. 6. 2023.)
53. Ž. Maleš, I. Žuntar, B. Nigović, M. Plazibat, V. Bilušić Vundar, Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire-*Crithmum maritimum* L., Acta Pharm. **53** (2003) 139-144.
54. L. Siracusa, T. Kulišić Bilušić, O. Politeo, I. Krause, B. Dejanovic, G. Ruberto, Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model, J. Agric Food Chem. **59** (2011) 12453-12459, doi: <https://doi.org/10.1021/jf203096q>.
55. I. Jallali, Y. Zaouali, I. Missaoui, A. Smeoui, C. Abdelly, R. Ksouri, Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonc extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula Chritmoides* L., Food Chem. **145** (2014) 1031-1038, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.034>.
56. N. Nabet, H. Boudries, N. Chougui, S. Loupassaki, S. Souagui, F. Burló, F. Hernández, A. Carbonell-Barrachina, K. Madani, R. Larbat, Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts, Int. J. Food Prop. **20** (2016) 1843–1855, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12020252>.
57. M. Özcan, N. Uslu, G. Figuéredo, F. Juhaimi, K. Ghafoor, E. E. Babiker, O. N. Alsawmahi, M. Özcan, A. Isam, M. Ahmed, The effect of fermentation process on bioactive properties, essential oil composition and phenolic constituents of raw fresh and fermented sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) leaves, Indian J. Tradit. Knowl. **18** (2019) 800-804.
58. M. A. Amerine, C. S. Ough, Methods for analysis of musts and wines, JWS. (1980) 181-200, doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb04017.x>.

59. J. Yang, K. J. Meyers, J. Van der Heide, R. H. Liu, Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions, *J. Agr Food Chem.* **52** (2004) 6787-6793, doi: <https://doi.org/10.1021/jf0307144>.
60. R. Julkunen-Titto, Phenolic constituents in the leaves of northern willow: Methods for the analysis of certain phenolics, *J. Agric Food Chem.* **33** (1985) 213-217, doi: <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>.
61. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70–76, doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
62. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, *Meth. Enzymol.* **299** (1999) 15-27, doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5).
63. I. Generalić Mekinić, Ž. Skračić, A. Kokeza, B. Soldo, I. Ljubenković, M. Banović, V. Šimat, D. Skroza, Effect of Enzyme-Assisted Vinification on Wine Phenolics, Colour Components, and Antioxidant Capacity, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **70** (2020) 113-121, doi: <https://doi.org/10.31883/pjfn/115461>.
64. E. Vieira, S. Souza, M. Moreira, R. Cruz, A. Silva, S. Casal, C. Delerue-Matos, Valorization of Phenolic and Carotenoid Compounds of *Sechium edule* (Jacq. Swartz) Leaves: Comparison between Conventional, Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction Approaches, *Mol.* **27** (2022) 7193, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27217193>.
65. C. Ming, H. Jiali, W. Huaijie, L. Chuan, W. Gang, Z. Kexue, C. Xiaoi, Z. Yanjun, T. Lehe, Comparison of microwave, ultrasound and ultrasound-microwave assisted solvent extraction methods on phenolic profile and antioxidant activity of extracts from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp, *LWT.* **173** (2023) 114395, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114395>.
66. M. Oroian, F. Dranca, F. Ursachi, Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis, *J. Food Sci. Technol.* **57** (2020) 70-78, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>.
67. O. R. Alara, N. H. Abdurahman, H. A. Ali, N. M. Zain, Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Carica papaya* leaves: An optimization

- study and LC-QTOF-MS analysis, *Future Foods* **3** (2021) 100035, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100035>.
68. S. Gunalan, A. Thangaiah, J. Gnanaguru Janaki, A. Thiyagarajan, S. Kuppusamy, L. Arunachalam, Optimization of Microwave-Assisted Extraction Method for Increased Extraction Yield and Total Phenol Content from Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam.) var. PKM. 1, *Adv. Agric.* **1** (2022) doi: <https://doi.org/10.1155/2022/7370886>.
69. C. Costa, L. Padalino, S. Spinelli, F. Serio, M. A. Del Nobile, A. Conte, Study of the Efficacy of Two Extraction Techniques from *Crithmum maritimum* and *Salicornia europaea*, *J. Food Nutr. Res.* **6** (2018) 456–463, doi: <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-6>.
70. H. Haslina, D. Larasati, E. Sani, N. Nazir, Sudjatinah,, Black Mangrove Powder Extracts with Variation of Temperature and Length of Time using Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), *Environ. Earth Sci.* **1177** (2023) 012040, doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1177/1/012040>.
71. Ž. Tarasevičiene, M. Vitkauskaitė, A. Paulauskiene, J. Cerniauskiene, Wild Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Roots Chemical Composition and Phenols Extraction, *Plants* **12** (2023) 309, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12020309>.
72. Y. Yi Ling, P. Sook Fun, A. Yeop, M. M. Yusoff, J. Gim bun, Assessment of Maceration, Ultrasonic and Microwave Assisted Extraction for Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Kaempferol Yield from *Cassia alata* via Microstructures Analysis, *Mater. Today: Proc.* **19** (2019) 1273-1279, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.133>.
73. L. Cui, Z. Ma, D. Wang, Y. Niu, Ultrasound-assisted extraction, optimization, isolation, and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves, *Ultrason. Sonochem.* **90** (2022) 106190, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106190>.
74. Z. E. Huma, V. Jayasena, S. M. Nasar-Abbas, M. Imran, M. K. Khan, Process Optimization of Polyphenol Extraction from Carob (*Ceratonia Siliqua*) Kibbles Using Microwave-Assisted Technique, *J. Food Process. Preserv.* **42** (2018), doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13450>.
75. URL:<https://www.helenacoffee.vn/chlorogenic-acid/> (29. 6. 2023.)

76. URL:<https://www.medchemexpress.com/Cryptochlorogenic-acid.html> (23. 6. 2023.)
77. URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Neochlorogenic_acid#/media/File:Neochlorogenic_acid.svg (23. 6. 2023.)
78. *O. Politeo, M. Popović, M. Veršić Bratinčević, P. Koceić, T. Ninčević Runjić, I. Generalić Mekinić*, Conventional vs. Microwave Assisted Hydrodistillation: Influence on the Chemistry of Sea Fennel Essential Oil and Its By-Products, *Plants* **12** (2023) 1466, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12071466>.
79. *W. Routray, V. Orsat*, MAE of Phenolic Compounds from Blueberry Leaves and Comparison with Other Extraction Methods, *Ind. Crops Prod.* **58** (2014) 36–45, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.038>.
80. *J. M. Alves-Silva, I. Guerra, M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, M. T. Cruz, A. Figueirinha, L. Salgueiro*, Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and their biological activities, *Ind. Crops and Prod.* **149** (2020) 112329, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112329>.