

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

IVAN MARTIĆ, ANA OGUIĆ

**Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u izolaciji  
fenolnih spojeva bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i definiranje  
antioksidacijskog kapaciteta**

Zagreb, 2018.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća i Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Ivone Elez Garofulić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.“

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	2
<b>3. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>3.1. Osnovne karakteristike biljke (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)</b> .....	3
<b>3.2. Upotreba tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)</b> .....	3
<b>3.3. Fenolni spojevi tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)</b> .....	4
<b>3.3.1 Fenolne kiseline</b> .....	6
<b>3.3.2. Flavonoidi</b> .....	7
<b>3.3.3. Ostali fenolni spojevi</b> .....	9
<b>3.4. Ekstrakcija</b> .....	10
<b>3.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima</b> .....	12
<b>3.4.2. Mehanizam djelovanja mikrovalova</b> .....	13
<b>3.4.3. Utjecaj parametara na ekstrakciju mikrovalovima</b> .....	14
<b>3.5. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva</b> .....	17
<b>3.5.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta</b> .....	17
<b>3.5.2. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva prisutnih u bobicama tršlje</b> .....	18
<b>4. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	20
<b>4.1. Materijal</b> .....	20
<b>4.2. Kemikalije i standardi</b> .....	20
<b>4.3. Aparatura i pribor</b> .....	21
<b>4.4. Metode rada</b> .....	23
<b>4.4.1. Izolacija ukupnih fenolnih spojeva iz bobica tršlje (<i>Pistacia lentiscus</i> L.) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)</b> .....	23
<b>4.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola</b> .....	25
<b>4.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (ORAC metoda)</b> .....	27

4.4.4. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju .....	27
4.4.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka.....	30
<b>5. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>32</b>
5.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	32
5.2. Utjecaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije.....	35
5.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije .....	35
5.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije.....	35
5.2.3. Utjecaj snage mikrovalova .....	36
5.3. Fenolni profil ekstrakta bobica tršlje ( <i>Pistacia lentiscus L.</i> ) .....	39
5.4. Identifikacija i kvantifikacija spojeva .....	42
5.5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta bobica tršlje .....	46
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>47</b>
<b>7. ZAHVALE .....</b>	<b>48</b>
<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>49</b>
<b>9. SAŽETAK.....</b>	<b>60</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>61</b>

## 1. UVOD

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je zimzelena biljna vrsta porodice vonjača (*Anacardiaceae*) karakteristična za zemlje mediteranskog podneblja Europe, Maroko, Tursku, Irak i Iran (Tolić, 2003). Bobice, listovi i ostali dijelovi biljke koristili su se u narodnoj medicini od vremena starih Grka zbog brojnih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje od kojih se ističu diuretičko i antihipertenzivno djelovanje.

Bobice tršlje potencijalan su izvor različitih biološki aktivnih spojeva, posebice fenolnih spojeva. Prema dosadašnjim istraživanjima, bobice tršlje sadrže značajne količine fenolnih kiselina (hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih) te flavonoida od kojih su najzastupljeniji flavonoli (Belhachat i sur., 2017), a zbog brojnih pozitivnih utjecaja na zdravlje imaju i velik potencijal za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Budući da je proveden vrlo mali broj istraživanja i nedovoljno je literaturnih podataka o fenolnom sastavu bobica tršlje, postoji sve veća potreba za njihovom izolacijom, identifikacijom i kvantifikacijom.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) jedna je od suvremenih metoda ekstrakcije koja omogućuje velike prinose uz značajno skraćeno trajanje postupka u odnosu na klasične metode ekstrakcije (Mandal i sur., 2007). Također, primjenom suvremenih metoda ekstrakcije smanjuje se uporaba ekstrakcijskih otapala koja mogu izazvati onečišćenja okoliša, stoga su ekološki prihvatljivije od klasičnih metoda (Drosou i sur., 2015). Efikasnost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ovisi o brojnim procesnim parametrima: izboru otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, veličini čestica uzorka, omjeru uzorka i otapala te snazi mikrovalnog zračenja (Eskilsson i Bjorklund, 2000). S obzirom na raznolikost u fenolnom sastavu brojnih biljnih vrsta, ne postoji jedinstveni protokol za ekstrakciju već ga je potrebno dizajnirati i optimizirati ovisno o primijenjenoj tehnici (Şahin i Şamlı, 2013).

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U današnje vrijeme povećana je briga potrošača o vlastitom zdravlju i to je razlog zašto se sve više ispituju zelene metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnih vrsta koje imaju blagotvoran učinak na ljudski organizam.

Stoga je opći cilj ovog rada ispitivanje utjecaja različitih procesnih parametara (temperatura, vrijeme i snaga mikrovalova) na izolaciju fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima iz nedovoljno istraženih bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) te usporedba razvijenog protokola ekstrakcije s klasičnom metodom uz refluks.

Nadalje, budući je fenolni profil bobica tršlje (naročito s područja RH) još uvijek nedovoljno istražen, specifični cilj rada je identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva iz ekstrakta bobica tršlje primjenom UPLC-MS/MS te određivanje antioksidacijskog kapaciteta dobivenog ekstrakta ORAC metodom

Naime, klasična ekstrakcija traje duže vremena i odvija se na višim temperaturama u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima što može dovesti do degradacije bioaktivnih spojeva u uzorku. Uporabom mikrovalova dolazi do simultanog zagrijavanja cijelog volumena uzorka, oštećuju se vodikove veze i dolazi do rotacije dipola što rezultira boljim prodiranjem otapala u matriks i ekstrakcijom ciljanih spojeva. Stoga, početna hipoteza rada je da će se primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima skratiti vrijeme potrebno za ekstrakciju kompleksne smjese fenolnih spojeva bobica tršlje te postići veći prinosi pri optimalnim uvjetima u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom.

### 3. TEORIJSKI DIO

#### 3.1. Osnovne karakteristike biljke (*Pistacia lentiscus* L.)

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je dvodomna, zimzelena biljna vrsta porodice vonjača (*Anacardiaceae*). Raste u obliku grmova ili niskog drveća do 5 metara u visinu (Lo Presti i sur., 2008) te ima karakterističan i jak aromatični miris. Ima tamnozeleno, kožaste, ovalne listove, cvjeta od ožujka do svibnja i svojstveni su joj cvjetovi crvene boje koji se nalaze u obliku klasića (slika 1). Plod je sitna (2-3 mm) i spljoštena okrugla koštunica koja je u početku crvene boje, a kasnije postaje crna (Tolić, 2003). U mladosti je kora tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) sivkaste boje i glatke površine dok starenjem postaje tamnozeleno i ispucano (Sánchez Gomez i Guemes, 2011). Iz oštećene kore sakuplja se mirisni smolasti sok tzv. mastika koja je iznimno bogata taninima.



**Slika 1.** Izgled bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) (Anonymus 1)

Uzgaja se u najtoplijim zemljama mediteranskog podneblja Europe, Maroku, Turskoj, Iraku i Iranu (Nahida i sur., 2012) te dobro podnosi klimatske varijacije kao što su visoke temperature, suša i posolica (Baratto i sur., 2003). Tršlja je u Hrvatskoj sastavni dio mediteranske makije koja raste na otocima i u priobalju te se za nju koriste razna narodna imena poput: mrča, crnomrta, smarča, lanjstik, entišk, lentiska, mastika.

#### 3.2. Upotreba tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Plodovi i listovi tršlje, a naročito mastika, upotrebljavali su se u narodnoj medicini još od vremena starih Grka zbog brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Koristili su se kao stimulansi, diuretici i antihipertenzivi, ali i za ublažavanje kašlja, upale grla, ekcema, bolova u trbuhu, bubrežnih kamenaca i žutice (Benhammou i sur., 2008; Aouinti i sur., 2014). U prošlosti, eterična ulja tršlje nalazila su primjenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Danas se biljka koristi u fitoterapiji zbog svojih sedativnih, antiaterogenih i antioksidacijskih svojstava te u prehrambenoj industriji za poboljšanje arome alkoholnih pića i žvakaćih guma (Lo Presti i sur., 2008; Zrira i sur., 2003; Aouinti i sur., 2014). Zbog potvrđenih i dokazanih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, vodeni ekstrakt lišća popularno je piće u zemljama sjeverne Afrike (Trabelsi i sur., 2014). Antocijani ekstrahirani iz bobica tršlje mogu se upotrebljavati kao prehrambena bojila (Mehenni i sur., 2016), dok se eterična ulja potencijalno mogu koristiti kao dodatak ljudskoj prehrani zbog visokog sadržaja beta-sitosterola te mononezasićenih (oleinska i linolenska) i polinezasićenih masnih kiselina (Trabelsi i sur., 2012).

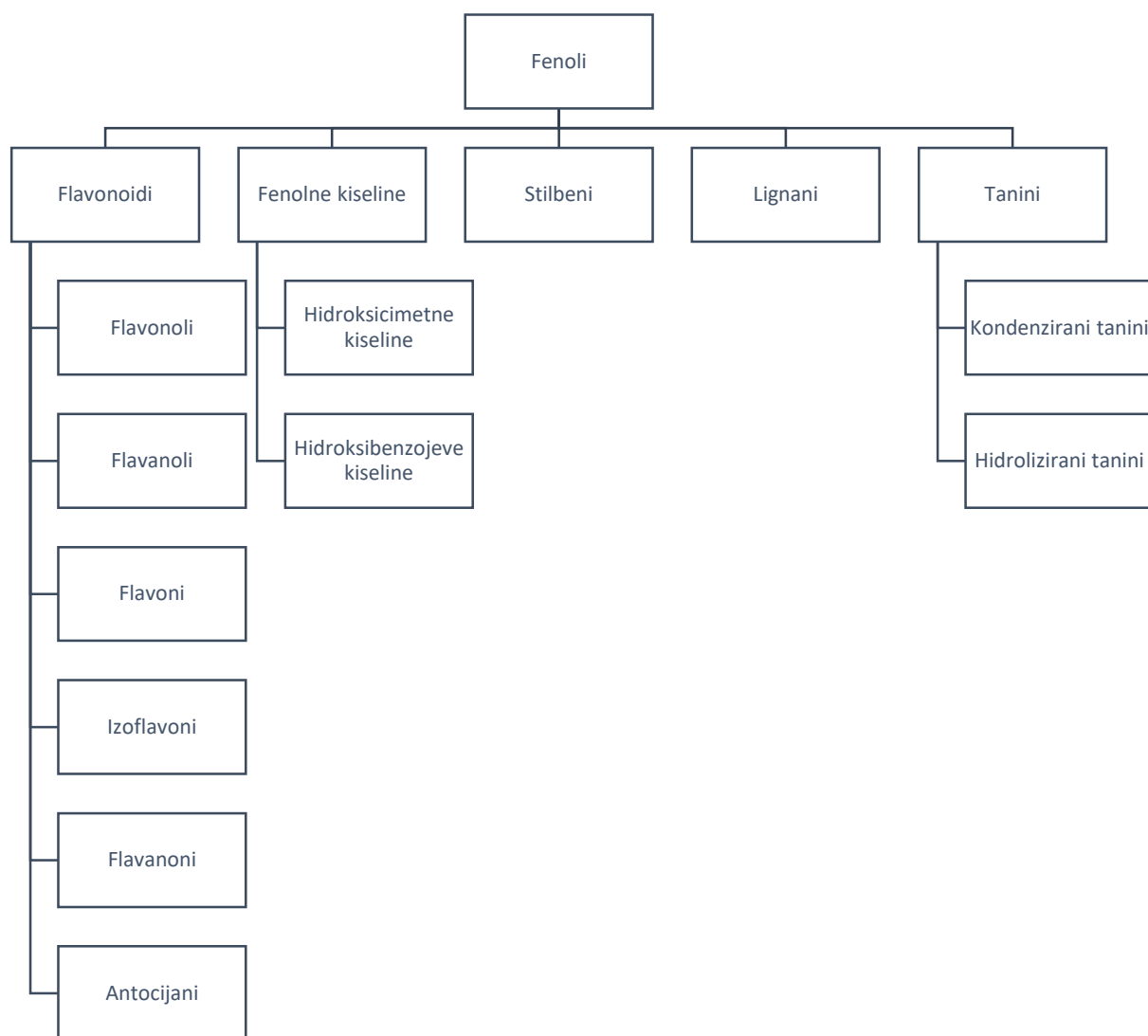
Ekstrakti tršlje iznimno su dobar izvor bioaktivnih spojeva, u prvom redu flavonoida i fenolnih kiselina koji pokazuju snažno antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Dosadašnja istraživanja pokazala su značajan utjecaj brojnih vanjskih čimbenika (klimatski uvjeti, geografski smještaj, tlo) na kemijski sastav biljke (Trabelsi i sur., 2016).

### **3.3. Fenolni spojevi tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)**

Fenolni spojevi glavni su bioaktivni spojevi u tršlji i spadaju u skupinu sekundarnih biljnih metabolita prisutnih u svim biljnim tkivima (voće, povrće, žitarice, čajevi, začini itd.) (Scalbert i sur., 2005). Značajno doprinose biološkim, nutritivnim i senzorskim svojstvima biljnih vrsta, a imaju vrlo važnu morfološku i fiziološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke te zaštiti od patogenih mikroorganizama i predatora (Bravo, 1998).

Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na kojeg mogu biti vezane jedna ili više hidroksilnih skupina ili neki drugi supstituenti. Postoje brojni načini klasifikacije fenolnih spojeva; s obzirom na strukturu, biološku aktivnost, biosintetski put ili na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli (Tsao, 2010). S obzirom na strukturu, fenolni spojevi dijele se u dvije velike skupine: flavonoide (flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli i antocijani) i ne-flavonoide (fenolne kiseline: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te lignani, stilbeni i tanini) (Rodriguez Montealegre i sur., 2006; Scalbert i sur., 2005) (slika 2). Udio fenolnih spojeva u tršlji razlikuje se ovisno o dijelu biljke (list, korijen, stabljika, cvijet, plod) (Bampouli i sur., 2014). Istraživanja su pokazala da je najviše ukupnih fenola prisutno u listu tršlje ( $216.289 \pm 20.62$  mg GAE/g), potom u stabljici ( $121.399 \pm 3.354$  mg GAE/g) i bobici ( $103.342 \pm 2.317$  mg GAE/g) (Zitouni i sur., 2016).

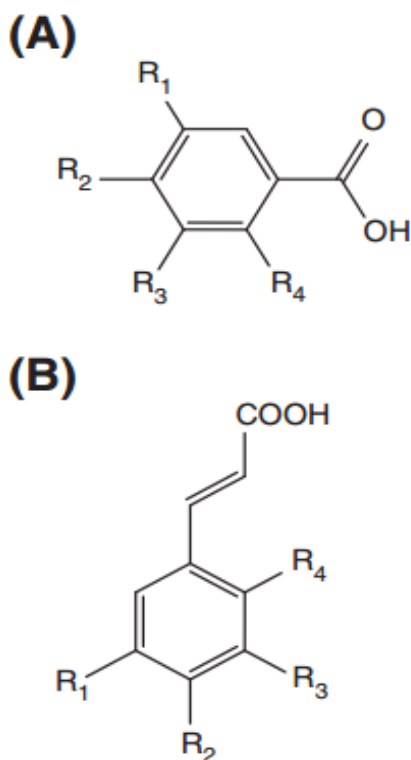




**Slika 2.** Osnovna podjela fenolnih spojeva (Erdman i sur., 2007)

### 3.3.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline jedna su od osnovnih skupina fenolnih spojeva prisutnih u bobicama tršlje. Spadaju u ne-flavonoidne spojeve koji se s obzirom na strukturu mogu svrstati u dvije grupe: hidroksibenzojeve (C1-C6) i hidroksicimetne (C3-C6) kiseline (slika 3) te njihove derivate (Tsao, 2010). Razlika između fenolnih kiselina i njenih derivata je u stupnju hidroksilacije i metilacije benzenskog aromatskog prstena od kojeg su sastavljene.



**Slika 3.** Kemijska struktura hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih kiselina (B) (Goncalves i sur., 2013)

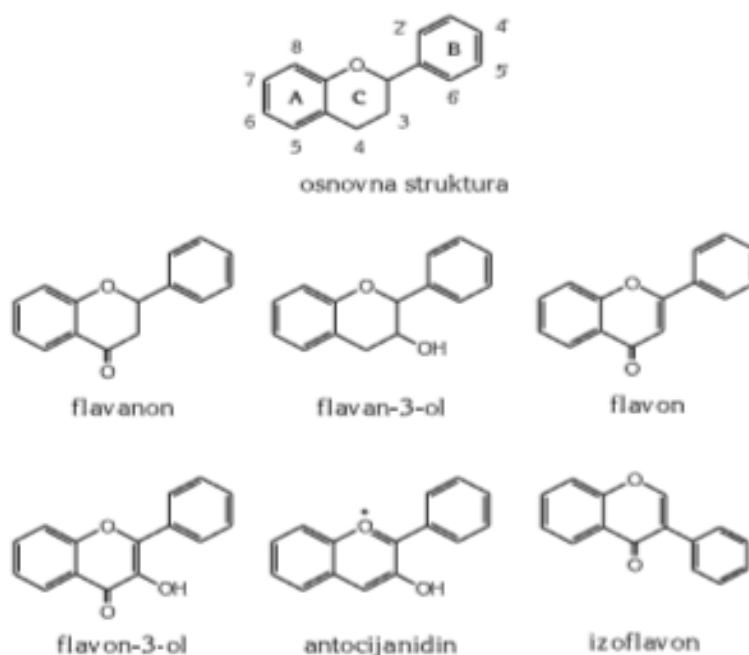
U skupinu hidroksibenzojevih kiselina spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska, elaginska i salicilna kiselina. Galna kiselina najzastupljenija je hidroksibenzojeva kiselina u bobici tršlje (Trabelsi i sur., 2016; Bhour i sur., 2010; Mehenni i sur., 2016) te zajedno sa svojim derivatima čini više od 70% ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u listovima tršlje (Romani i sur., 2002). U istraživanju Azaizeh i sur. (2013) uspoređivan je fenolni sastav biljke porijeklom iz Italije i Izraela te su uočeni vrlo slični rezultati u koncentracijama derivata galne kiseline. Koncentracija derivata galne kiseline u listu tršlje, prema jednom od istraživanja iznosi  $161.67 \pm 35.27$  mg GAE/g uzorka (Mehenni i sur., 2016; Romani i sur., 2002), a značajan je i njihov udio u ekstraktima bobica ove biljke. Identificirani derivati galne kiseline u listovima tršlje su mono, di i tri-*O*-galoilkina kiselina i monogaloil

glukoza, dok su u bobicama identificirane 1,2,3,4,6-pentagaloil glukoza (Bozorgi i sur., 2013), 5-galoilkina kiselina te 3,4,5-*O*-trigaloilkina kiselina (Bhoury i sur., 2010; Mehenni i sur., 2016; Trabelsi i sur., 2014). U listovima su također identificirane siringinska i elaginska kiselina te njihovi derivati, koji nisu prisutni u bobicama tršlje. Koncentracija siringinske kiseline u suhom ekstraktu lista biljke iznosi  $52.66 \pm 7.23$  mg/g dok koncentracija elaginske kiseline iznosi  $9.54 \pm 0.63$  mg/g (Mehenni i sur., 2016). U listu biljke identificirane su 3,5-*O*-galoilkina kiselina u koncentraciji od  $26,8 \pm 4,67$  mg/g, 3,4,5-trigaloilkina kiselina u koncentraciji od  $10,3 \pm 2,45$  mg/g te 5-*O*-galoilkina kiselina u koncentraciji od  $9,6 \pm 2,25$  mg/g suhe tvari (Romani i sur., 2002).

Najvažnije hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati prisutni u bobicama tršlje su: klorogenska kiselina, kina kiselina, *p*-kumarinska-4-*O*-glukozid i kafeoilkina kiselina (Baratto i sur., 2003; Trabelsi i sur., 2016; Bhoury i sur., 2010; Mehenni i sur., 2016).

### 3.3.2. Flavonoidi

Druga značajna skupina spojeva u bobicama tršlje su flavonoidi (slika 4) čiji visok udio daje biljci važnu terapijsku i prehrambenu vrijednost. Flavonoidi su spojevi niske molekulske mase koji sadrže 15 ugljikovih atoma organiziranih u C6-C3-C6 konfiguraciju (Ignat i sur., 2011). Skupine flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena i dijele se na flavanone, flavonole, flavanole, flavone, izoflavone i antocijane (slika 4) (Ignat i sur., 2011; Kazazić, 2004).



**Slika 4.** Podjela flavonoida (Kazazić, 2004)

Koncentracija ukupnih flavonoida (izražena u miligramima kvercetina po gramu suhog ekstrakta) u ekstraktu lista tršlje dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima iznosi  $68.34 \pm 0.10$  mg QE/g suhog ekstrakta (Bampouli i sur., 2014). U tršlji su identificirani flavonoli, flavanoli, flavoni i antocijani.

### **3.3.2.1. Flavonoli**

Flavonoli spadaju u flavonoide koji se u biljkama nalaze u glikozidnoj formi. Formiranje flavonola ovisi o prisustvu svjetla, stoga su najveće koncentracije ovih flavonoida pronađene u listovima i drugim vanjskim dijelovima biljaka. Flavonoli su, u usporedbi s ostalim fenolnim spojevima, dominantni u voćnim plodovima gdje se ponajprije nalaze u pokožici voća (Bravo, 1998). Glavni predstavnici flavonola su kamferol, miricetin, kvercetin i rutin (Ren i sur., 2003). Identificirani flavonoli u tršlji su kvercetin i njegovi derivati (Belhachat i sur., 2017). U bobicama prevladava derivat kvercetina, kvercetin-3-*O*-glukuronid (Baral i sur., 2017; Trabelsi i sur., 2016), dok su u listu biljke identificirani kvercetin-3-*O*-ramnozid u koncentraciji od  $0,12 \pm 0,053$  mg/g suhog ekstrakta lista (Mehenni i sur., 2016), miricetin-3-*O*-rutinozid (Azaizeh i sur., 2013; Benhammou i sur., 2008) te kamferol u koncentraciji od  $0,68 \pm 0,028$  mg/g ekstrakta. Derivati miricetina čine 20% od ukupnih fenolnih spojeva u listu tršlje (Romani i sur., 2002), te njihova koncentracija, prema nekim istraživanjima, iznosi  $1,33 \pm 0,055$  mg/g ekstrakta (Vaya i Mahmood, 2006).

### **3.3.2.2. Flavanoli ili flavan-3-oli**

Flavanoli su najraširenija skupina flavonoida prisutnih u biljkama. U prirodi se najčešće nalaze u glikoziliranom ili esterificiranom obliku, a vrlo rijetko se mogu pronaći u slobodnoj formi (Bravo, 1998). Imaju dva asimetrična ugljikova atoma (C2 i C3) u molekuli i pojavljuju se u četiri različita izomerna oblika. Glavni predstavnici flavan-3-ola su: katehin, epikatehin, galokatehin i epigalokatehin, a međusobnim povezivanjem flavanola nastaju procijanidini.

U tršlji su, u manjim količinama, zastupljeni jedino katehini i njihove koncentracije značajno se razlikuju ovisno o geografskom porijeklu same biljke. Tako u biljci s područja Italije katehini čine samo 2,5% od ukupnih fenolnih spojeva, dok se u tršlji izraelskog porijekla ta brojka penje i do 7,8% (Azaizeh i sur., 2013).

### **3.3.2.3. Flavoni**

Flavoni se u biljkama nalaze u glikozidnoj formi, najčešće u obliku O-glikozida, a mogu se pronaći i kao C-glikozidi. U svježim biljkama nisu prisutni aglikoni flavona, već oni mogu

nastati kao rezultat naknadnog procesiranja biljaka. Najzastupljeniji flavoni u biljkama su luteolin i apigenin (Hollman i Arts, 2000).

Taksifolin (Teselkin i sur., 2000) i luteolin-6,8-di-C-heksozid (Trabelsi i sur., 2016) također su identificirani u tršlji. Luteolin se u bobici nalazi u koncentraciji od  $2.97 \pm 0.1$  mg/g suhog ekstrakta bobice, a njegova koncentracija u listu iste biljke iznosi  $0.61 \pm 0.01$  mg/g (Mehenni i sur., 2016).

#### **3.3.2.4. Antocijani**

Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi i nositelji su prirodno plave, ljubičaste ili crvene boje voća i povrća (Ignat i sur., 2011). Međusobno se razlikuju po broju hidroksilnih skupina te vrsti, broju i poziciji supstituenata koji se mogu vezati (Kong i sur., 2003). U bobicama i listovima tršlje identificirani su cijanidin-3-*O*-glukozid i delfinidin-3-*O*-glukozid (Belhachat i sur., 2017), koji su uz pelargonidin-3-glukozid najrašireniji antocijani u prirodi (Kong i sur., 2003). U istraživanju koje su proveli Longo i sur. (2007), u bobicama tršlje identificirani su cijanidin-3-*O*-glukozid u koncentraciji od 3,8 mg/100 g, delfinidin-3-*O*-glukozid u koncentraciji 1,1 mg/100 g te cijanidin-3-*O*-arabinozid u koncentraciji od 0,05 mg/100 g.

#### **3.3.3. Ostali fenolni spojevi**

Osim fenolnih kiselina i flavonoida, u tršlji su prisutni i drugi fenolni spojevi kao što su tanini i sekoiridoidi. Tanini su velike fenolne molekule koje se dijele na hidrolizirane i kondenzirane tanine ili proantocijanidine, derivate galne kiseline (Ignat i sur., 2011). Oko 20 % ukupnih fenolnih spojeva u suhoj masi lista tršlje čine tanini (Azaizeh i sur., 2013), a njihove se koncentracije, kao i koncentracije ostalih fenolnih spojeva, razlikuju ovisno o porijeklu biljke. Tako koncentracije kondenziranih tanina (flavonol glukozida) variraju od 22,8% (od ukupnih tanina) u biljci iz Italije do 28,6% u biljci iz Izraela. Također, koncentracije hidroliziranih tanina (galoil derivata) variraju od 63,6% u biljci porijeklom iz Izraela do 74,7% u biljci iz Italije (Azaizeh i sur., 2013). Identificirani sekoiridoid iz bobica tršlje je oleozid, fenolni spoj karakterističan za maslinu. Istraživanja su pokazala da u biljci ima važnu ulogu u sprječavanju i/ili usporavanju brzine rasta različitih bakterija i gljivica (Trabelsi i sur., 2016).

### 3.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju (Lianfu i Zelong, 2008). Postupak ekstrakcije predstavlja ključni korak u izolaciji fenolnih spojeva iz biljnih materijala. Na ekstrakciju fenolnih spojeva utječu brojni čimbenici kao što su: vrsta otapala, fizikalno-kemijska svojstva uzorka iz kojeg se izoliraju spojevi, omjer uzorka i otapala te vrijeme i temperatura ekstrakcije (Veggi i sur., 2013). Zbog značajnih razlika u biološkoj aktivnosti i strukturi fenolnih spojeva, neophodno je odabrati ekstrakcijsku metodu koja će osigurati najveću moguću koncentraciju željene tvari uz minimalnu degradaciju ovih spojeva (Gupta i sur., 2012).

Klasične metode ekstrakcije fenolnih spojeva temelje se na pravilnom odabiru otapala te zagrijavanju i/ili miješanju otopine s ciljem povećanja topljivosti željenih komponenti (Mandal i sur., 2007). U klasične metode ekstrakcije spada ekstrakcija pomoću refluksa, maceracija, perkolacija i Soxhlet ekstrakcija. Klasične metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju mogu uzrokovati degradaciju bioaktivnih komponenti zbog visokih temperatura ili predugog trajanja ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Primjenom ovih metoda može doći i do oksidacije ili hidrolize bioaktivnih spojeva što je nepoželjno za bilo koji ekstrakcijski postupak.

Primjena suvremenih ekstrakcijskih metoda temelji se na principima zelene kemije. Zelena kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (Alfonsi i sur., 2008). Nove metode ekstrakcije pogodnije su za uporabu od klasičnih metoda jer se mogu izvoditi bez prisustva svjetla i kisika te omogućuju dobivanje sličnih ekstrakcijskih prinosa, ali u kraćem vremenskom periodu (Nayak i sur., 2015). Također, suvremenim metodama ekstrakcije smanjuje se uporaba ekstrakcijskih otapala koja mogu izazvati onečišćenja okoliša, stoga su ekološki prihvatljivije od klasičnih metoda (Drosou i sur., 2015).

U suvremene ekstrakcijske metode spadaju:

- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra se efikasnijom ekstrakcijskom metodom u usporedbi s klasičnim tehnikama zbog smanjene upotrebe otapala i kraćeg vremena tretmana (Dent i sur., 2015). Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal i direktni kontakt otapala sa sadržajem stanice.

Na taj način ubrzava se ekstrakcija i povećava njezina djelotvornost (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

- Superkritična tekućinska ekstrakcija (SFE)

Ekstrakcija superkritičnim fluidima predstavlja izvrsnu alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije pomoću organskih otapala. Prednosti superkritičnog otapala su bolja difuzija, niža viskoznost i manja površinska napetost čime se omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal iz kojeg se ekstrahira željena tvar. Navedenim postupkom omogućena je visoka selektivnost uz jednostavno uklanjanje otapala iz ekstrakta (Jokić i sur., 2012).

- Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

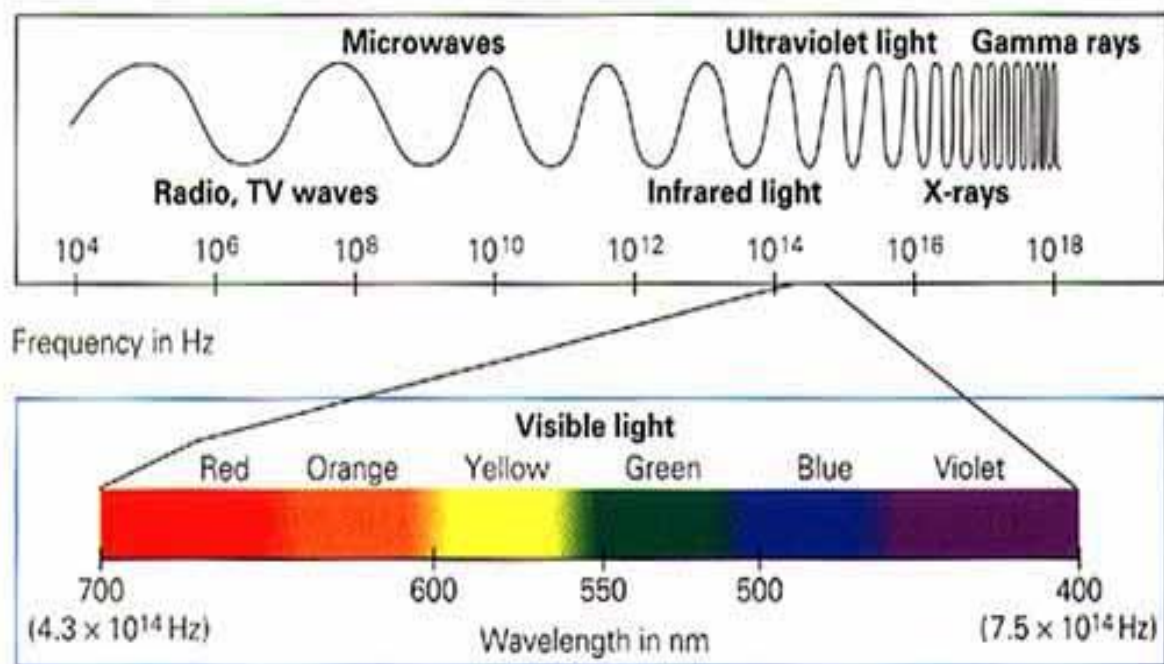
Ubrzana ekstrakcija otapalima je automatizirana tehnika ekstrakcije koja primjenom povišene temperature (40-200°C) i tlaka (do 20 Mpa) postiže brzo i učinkovito ekstrahiranje ciljanih spojeva iz analiziranog materijala. Primjenom visokih temperatura dolazi do slabljenja veza između otopine i sadržaja uzorka, brže difuzije i bolje topljivosti analita (Mustafa i Turner, 2011). Osnovna prednost ove metode nad klasičnim ekstrakcijskim metodama pri atmosferskom tlaku je da otapalo ostaje u tekućem stanju iznad svoje točke vrenja (Yong i Howard, 2003).

- Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima temelji se na uporabi energije mikrovalova za zagrijavanje otapala koje se nalazi u kontaktu s čvrstim uzorkom (Nayak i sur., 2015). Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano, oštećuju vodikove veze te potiču rotaciju dipola čime se povećava penetracija otapala u matriks i otapanje ciljanih spojeva (Eskilsson i Bjorklund, 2000; Lovrić i sur., 2017). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima omogućuje veće ekstrakcijske prinose uz smanjeno korištenje otapala i skraćeno trajanje ekstrakcijskog postupka u odnosu na klasične ekstrakcijske metode (Mandal i sur., 2007; Lovrić i sur., 2017).

### 3.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi predstavljaju oblik elektromagnetskog zračenja raspona valnih duljina od 1 mm do 300 mm, u frekvencijskom rasponu od 300 MHz do 300 GHz (Chan i sur., 2011). U elektromagnetskom spektru mikrovalovi su smješteni između radiofrekventnih valova i infracrvenog zračenja (slika 5).



**Slika 5.** Elektromagnetski spektar (Anonymus 2)

Mikrovalno zračenje spada u neionizirajuće zračenje i nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Ima ograničen energetske potencijal stoga ne uzrokuje promjene u strukturi materije koje mogu biti potencijalno štetne za zdravlje (Gonzalez-Nunez i Canizares-Macias, 2011; Chemat i sur., 2004).

U modernoj znanosti mikrovalovi se koriste u komunikaciji te zbog izravnog djelovanja na materijale koji imaju sposobnost pretvaranja dijela apsorbirane elektromagnetske energije u toplinsku energiju (Mandal i sur., 2007). U prehrambenoj industriji mikrovalno zračenje upotrebljava se za kuhanje, zagrijavanje, sušenje te pasterizaciju i sterilizaciju mnogih namirnica (Chandrasekaran i sur., 2013). Kao alternativa klasičnim metodama ekstrakcije, razvijena je brza analitička metoda ekstrakcije koja je potpomognuta mikrovalovima.



### 3.4.2. Mehanizam djelovanja mikrovalova

Mikrovalovi se sastoje od dva oscilirajuća polja, električnog i magnetskog, koja okružuju vodič. Promjenom smjera gibanja struje (elektrona) dolazi do pulsiranja oba polja i stvaranja elektromagnetnih valova koji se šire okomito na smjer struje (Chemat i sur., 2004). Princip zagrijavanja uporabom mikrovalova temelji se na kretanju molekula djelovanjem dvaju mehanizama, rotacije dipola i ionske vodljivosti, koji se u većini slučajeva odvijaju istovremeno (Zhang i sur., 2011). Ionska vodljivost podrazumijeva elektroforetsku migraciju iona pod utjecajem izmjeničnog električnog polja. Otopina pruža otpor migraciji iona te dolazi do trenja koje u konačnici rezultira zagrijavanjem otopine. Rotacija dipola temelji se na usmjeravanju polarnih molekula ovisno o brzim promjenama električnog polja. Molekule vode i druge polarne molekule ne uspijevaju se prilagoditi brzim promjenama električne komponente, nego vibriraju što stvara toplinu djelovanjem sile trenja. Do zagrijavanja dolazi samo primjenom mikrovalova frekvencije 2450 MHz pri čemu se električna komponenta mijenja  $4,9 \times 10^4$  puta u sekundi (Mandal i sur., 2007).

Učinkovitost zagrijavanja različitih otapala djelovanjem mikrovalova ovisi o tangensu gubitka ( $\tan \delta$ ) koji predstavlja mjeru sposobnosti otapala da apsorbira energiju mikrovalova i prenosi je u obliku topline okolnim molekulama.

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon'$$

gdje je  $\varepsilon''$  dielektrični gubitak koji pokazuje učinkovitost pretvaranja mikrovalne energije u toplinu, a  $\varepsilon'$  dielektrična konstanta koja je mjera sposobnosti apsorbiranja mikrovalne energije (Mandal i sur., 2007).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima zasniva se na lokaliziranom, dielektričnom zagrijavanju vlage prisutne u svim namirnicama, a posebno u biljnim materijalima (Ciriminna i sur., 2016). Energija mikrovalova zagrijava polarno otapalo koje je u kontaktu s uzorkom. Naglim povišenjem temperature i povećanjem unutarnjeg tlaka u stanici ubrzava se pucanje stanica, a to posljedično dovodi do razaranja površine uzorka te ekstrakcije fenolnih spojeva iz stanice u okolinu (Wang i Weller, 2006).

Razlozi zbog kojih se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima sve više koristi su: reducirano vrijeme trajanja procesa, visoka selektivnost, smanjena uporaba otapala te povećani prinos ekstrakta (Elez Garofulić i sur., 2013; Ciriminna i sur., 2016; Nayak i sur., 2015).

Efikasnost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ovisi o brojnim parametrima procesa od kojih su najvažniji: izbor otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije, veličina čestica uzorka, omjer uzorka i otapala te snaga mikrovalnog zračenja (Eskilsson i Bjorklund, 2000; Lovrić i sur., 2017).

### 3.4.3. Utjecaj parametara na ekstrakciju mikrovalovima

- Izbor otapala

Izbor otapala ovisi o topljivosti ekstrakta, međudjelovanju otapala i uzorka te sposobnosti otapala da apsorbira energiju mikrovalova. Poželjno je da izabrano otapalo ima visoku dielektričnu konstantu odnosno mogućnost dobre apsorpcije energije mikrovalova (Bousbia i sur., 2009; Letellier i Budzinski, 1999) te visoku selektivnost prema ciljanim spojevima. U tablici 1 navedena su najčešće korištena otapala u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima te vrijednosti njihovih dielektričnih konstanti. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima se uobičajeno provodi s otapalima koja se koriste i u postupcima klasične ekstrakcije. Otapala koja su najčešće korištena u izolaciji fenolnih spojeva iz tršlje su metanol (Trabelsi i sur., 2016), etanol (Belhacat i sur., 2017; Benhammou i sur., 2008) te smjesa metanol:voda (70:30 v/v) (Chryssavgi i sur., 2008). Lovrić i sur. (2017) su zaključili da je vodena otopina etanola pogodnija za izolaciju ukupnih fenolnih spojeva iz trnine (*Prunus spinosa* L.), od vodene otopine metanola. Pokazalo se da je 70%-tna vodena otopina alkohola (i etanola i metanola) učinkovitije otapalo od njihove 50%-tne vodene otopine u izolaciji ukupnih fenolnih spojeva iz trnine. To se može objasniti činjenicom da povišeni udio vode utječe na povećanje polarnosti smjese u mjeri koja više nije pogodna za ekstrakciju i rezultira smanjenim prinosom ekstrakcije.

**Tablica 1.** Vrijednosti dielektričnih konstanti za najčešće korištena otapala u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima (Mandal i sur., 2007)

Otapalo	Dielektrična konstanta
Aceton	20,7
Acetonitril	37,5
Etanol	24,3
Heksan	1,89
Metanol	32,6
2- propanol	19,9
Voda	78,3

*Određeno pri 20°C*

- Temperatura ekstrakcije

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima koja se provodi na višim temperaturama rezultira većim sadržajem ekstrahiranih tvari. Razlog tomu je što se povećanjem temperature smanji površinska napetost i viskoznost otapala što pomaže vlaženju matriksa uzorka i penetraciji otapala. Međutim, svaka tvar ima svoju gornju temperaturnu granicu iznad koje dolazi do njene razgradnje (Veggi i sur., 2013). Upravo zato se efikasnost ekstrakcije povećava sve dok se ne postigne optimalna ekstrakcijska temperatura, a daljnjim zagrijavanjem efikasnost značajno opada. Inglett i suradnici (2010) su, prilikom ekstrakcije polifenola iz heljde, zabilježili porast u sadržaju fenolnih spojeva kad se primijenila temperatura viša od 50°C.

- Snaga mikrovalova

Visoka snaga mikrovalova može značajno doprinijeti povišenju temperature ekstrakcijskog postupka, ali i povećanju nečistoća u dobivenom ekstraktu. Stoga, izabrana snaga mikrovalova mora biti pravilno postavljena kako bi se minimaliziralo vrijeme potrebno za zagrijavanje uzoraka, a istovremeno izbjeglo prekomjerno povišenje temperature koje bi moglo dovesti do razgradnje termoosjetljivih spojeva (Mandal i sur., 2007). Prilikom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima najčešće se koriste mikrovalovi snage 100-500 W. Dahmoune i sur. (2014) koristili su mikrovalove snage 400-600 W za ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva iz lišća mirte, dok su Elez Garofulić i suradnici (2013) primjenjivali mikrovalove snage 350-500 W za izolaciju polifenola iz višnje maraske.

- Vrijeme ekstrakcije

Osnovna prednost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima jest kraće vrijeme trajanja u odnosu na klasične ekstrakcijske metode. Općenito, prinos ekstrakcije povećava se što je duže trajanje samog postupka, ali time se povećava i rizik od degradacije termički osjetljivih spojeva (Mandal i sur., 2007). Prilikom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije fenolnih spojeva i teina iz lišća zelenog čaja bilježio se porast ekstrakta do 4. minute, a dulje trajanje ekstrakcije rezultiralo je smanjenjem ekstrakcijskog prinosa (Pan i sur., 2003). Često se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provodi u nekoliko kraćih ciklusa umjesto kontinuiranog postupka s ciljem poboljšanja ekstrakcijskog prinosa. Uobičajeno trajanje ekstrakcije varira od nekoliko sekundi pa sve do 30 minuta, a to ponajviše ovisi o odabranom otapalu i svojstvima biljke iz koje se ekstrahiraju ciljani spojevi. Snaga mikrovalova je usko povezana s trajanjem ekstrakcije i zato su razvijene dvije osnovne izvedbe ekstrakcijskog postupka: kratko trajanje uz uporabu visoke snage mikrovalova te primjena niske snage mikrovalova tijekom duljeg vremena (Mandal i sur., 2007).

- Veličina čestica uzorka

Veličina čestica uzorka može imati značajan utjecaj na prinos ekstrakta. Općenito, veličina čestica ekstrahiranih materijala kreće se u rasponu 100  $\mu\text{m}$  – 2 mm. Fino usitnjeni prahovi mogu poboljšati ekstrakciju zbog veće aktivne površine koja omogućuje bolji kontakt otapala i uzorka. Također, sitnije čestice omogućuju mnogo dublju penetraciju mikrovalova što pospješuje izolaciju bioaktivnih spojeva (Kormin i sur., 2010).

- Omjer volumena otapala i uzorka

Omjer uzorka i otapala također ima važan utjecaj na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima. Volumen otapala trebao bi biti dovoljno velik da uzorak bude u potpunosti uronjen u njega tijekom čitavog procesa (Tatke i Jaiswal, 2011) jer se na taj način osigurava ujednačeno i homogenizirano zagrijavanje uzorka (Chan i sur., 2011). Kod klasičnih ekstrakcijskih metoda, veći volumen otapala u odnosu na uzorak osigurava veće iskorištenje ekstrakcije, dok u slučaju mikrovalovima potpomognute ekstrakcije veći omjer otapalo: uzorak ne mora dati bolji prinos zbog neravnomjernog raspoređivanja i izloženosti uzorka mikrovalovima (Tatke i Jaiswal, 2011).

### 3.5. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva

Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom slobodnom radikalu. Neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima (Marković i Talić, 2013). Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale, a da pri tome ne postaju nestabilni odnosno podložni daljnjoj oksidaciji. Mogu djelovati na nekoliko načina:

- usporavaju reakcije oksidacije slobodnih radikala inhibiranjem stvaranja slobodnih lipidnih radikala
- prekidaju propagaciju autooksidativnih lančanih reakcija
- hvataju singletni kisik
- djeluju sinergistički s drugim antioksidansima
- inhibiraju prooksidativne enzime
- kelatno vežu metale prevodeći metalne prooksidanse (bakar i željezo) u stabilne spojeve (Carocho i sur., 2014)

#### 3.5.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Prema mehanizmu djelovanja, metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti dijele se u dvije osnovne skupine: SET (eng. *Single electron transfer*) i HAT (eng. *Hydrogen atom transfer*) metode. SET metode temelje se na tome da antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima, a ta reakcije popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja ukoliko dođe do redukcije antioksidansa. Pri tome je intenzitet obojenja izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa.

U SET metode spadaju: DPPH (eng. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*), TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), FRAP (eng. *Ferric reducing/antioxidant power*) i CUPRAC (eng. *Cupric ion reducing antioxidant capacity*) metoda (Dai i Mumper, 2010; Prior i sur., 2005).

HAT metode mjere sposobnost antioksidansa da neutralizira djelovanje slobodnih radikala doniranjem vodika. U HAT metode spadaju ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) i TRAP (eng. *Total radical-trapping antioxidant parameter*) metoda (Dai i Mumper., 2010). U ovom istraživanju koristili smo ORAC metodu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta fenolnih spojeva iz bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.).

### **3.5.1.1. ORAC metoda**

ORAC (engl. *oxygen radical absorbance capacity* - kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) je standardizirana metoda za dobivanje antioksidacijskih vrijednosti prehrambenih proizvoda. ORAC metoda koristi se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta antioksidansa topljivih u vodi (H-ORAC) i u mastima (L-ORAC), a temelji se na gašenju radikala transferom vodika. Tipična reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksilnih radikala, fluorescentnu probu te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Uslijed reakcije slobodnih radikala i fluorescentne probe (boja), boja se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje padom intenziteta fluorescencije. Ukoliko su u reakcijskoj smjesi prisutni antioksidansi, dolazi do usporavanja ove reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. Razlika u padu intenziteta fluorescencije između uzorka s antioksidansom i uzorka bez antioksidansa (slijepa proba) se uzima kao mjera antioksidacijskog kapaciteta. U testu se kao standardna otopina koristi sintetski antioksidans Trolox (6- hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina), u vodi topljivi analog vitamina E (Prior i sur., 2005; Zulueta i sur., 2009).

### **3.5.2. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva prisutnih u bobicama tršlje**

Fenolni spojevi predmet su brojnih znanstvenih istraživanja zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje i zaštitne uloge u biološkim sustavima. Ona se pripisuje njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala te kelatnog vezanja metalnih iona, sposobnosti aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiciji enzima oksidaza (Rice-Evans i sur., 1996). Aromatska struktura fenola omogućava delokalizaciju elektrona što dovodi do nastanka više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja elektrona ili vodikovih atoma i na taj način inaktiviraju slobodne radikale (Kazazić, 2004).

Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, stupnju hidroksilacije i prisustvu šećera. Zbog prisustva šećera, glukozidi se smatraju slabijim antioksidansima od aglikona. Na antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina značajno utječe broj i položaj hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu. Povećanje stupnja hidroksilacije pozitivno utječe na antioksidacijski kapacitet, naročito ako su hidroksilne grupe u orto i meta položaju u odnosu na karboksilnu. Hidroksicimetne kiseline, zbog prisustva dvostruke veze, djeluju kao jači antioksidansi u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline (Rice-Evans i sur., 1996). Istraživanje Baratta i sur. (2003) dokazuje snažan inhibicijski učinak galne i klorogenske kiseline te njihovih derivata na oksidaciju lipoproteina male gustoće (LDL). Galna kiselina i

njezini derivati imaju sposobnost uklanjanja DPPH radikala pri čemu su učinkovitiji od vitamina E koji je jedan od najjačih antioksidansa u prirodi. Istraživanja također pokazuju snažnu antikancerogenu aktivnost galne kiseline u prokariotskim organizmima (Abdelwahed i sur., 2007).

Flavonoidi se smatraju najmoćnijim biljnim antioksidansima zbog sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i prekida njihove lančane reakcije te sinergijskog djelovanja s vitaminima C i E (Kazazić, 2004). Imaju sposobnost aktiviranja antioksidativnih enzima i reduciranja tokoferoksil radikala, a mogu djelovati kao kelatori metala i hvatači singletnog kisika te hidroksil i peroksil radikala (Bravo, 1998). U bobici tršlje prevladava derivat kvercetina, kvercetin-3-*O*-glukuronid, koji ima potencijalan terapijski učinak kod neurodegenerativnih bolesti (Baral i sur., 2017). Značajna je i njegova uloga u inhibiciji rasta stanica raka (Atashpour i sur., 2015) te prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Ulasova i sur., 2013). Taksifolin ili dihidrokvercetin, također prisutan u bobici tršlje, štiti stanične membrane (Li i sur., 2017), poboljšava aktivnost kapilara, ima protuupalne i hepatoprotektivne učinke (Teselkin i sur., 2000) te smanjuje razinu kolesterola u krvi (Li i sur., 2017; Trabelsi i sur., 2016).

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Materijal

U ovom istraživanju korišteni su uzorci bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) ubrani na području otoka Korčule (koordinate: 42,961182/16,721574) u listopadu 2017. godine. Uzorci su, nakon branja, ostavljeni u prostoriji sobne temperature tijekom 5 dana kako bi se posušili. Nakon 5 dana, bobice tršlje su samljevene, stavljene u plastične spremnike i skladištene u hladnjaku pri temperaturi 4-5°C.



**Slika 6.** Uzorak sušenih bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) (vlastita fotografija)

### 4.2. Kemikalije i standardi

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 70 %-tni (v/v)

*Priprema:* u odmjernu tikvicu od 1000 mL doda se 729 mL 96 %-tnog etanola i do oznake se nadopuni destiliranom vodom.

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lach-Ner, Neratovice, Češka)



- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)  
*Priprema:* 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline  
*Priprema:* Odvažte se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Destilirana voda
- Fluorescein (C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Honeywell Riedel-de-Haën)
- 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) (Sigma-Aldrich)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Acros Organics)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Acros Organics)
- etanol (BDH Prolabo, Velika Britanija)
- redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ, Millipore, SAD
- acetonitril, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)
- mravlja kiselina, HPLC čistoće (Prolabo, Velika Britanija)
- Standardi za UPLC-MS/MS:
  - Standard kvercentin-3-glukoziida, kamferol-3-rutinoziida, kafeinske kiseline, ferulinske kiseline, galne kiseline, klorogenske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, miricetina (Sigma Aldrich, Njemačka)
  - Standard epikatehina, katehina, epigalokatehin galata, epikatehin galata, procijanidina B1, procijanidina B2, apigenina i luteolina (Extrasynthese, Francuska)
  - Standard kvercentin-3-rutinoziida (Acros Organics, SAD)

### 4.3. Aparatura i pribor

#### *Aparatura:*

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis, Sorisole, Italija)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Tehnička vaga Mettler (točnost ±0,01g)

- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS  $\beta$ , Velika Britanija)
- Clariostar (BMG Labtech, Njemačka)
- MARS 2.0 software (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent 1260 sistem (UPLC) opremljen sa:
  - 1260 kvarternom pumpom
  - 1260 autosamplerom
  - 1260 termostatirane kolone
  - Agilent 6490 trostrukim kvadropol MS/MS detektora
  - software MassHunter Workstation for QQQ
- Statistički program Statistica 11.0, (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD)

*Pribor:*

- Odmjerne tikvice (50 mL)
- Menzure (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Erlenmeyerova tikvica (1000 mL)
- Stakleni lijevci
- Pipeta (5 mL) i propipeta
- Plastične epruvete (Falcon) volumena 50 mL
- Mikropipete Eppendorf (100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni štapić
- Filter papir
- Magnetski mješači
- Plastična lađica za vaganje
- Tikvice s okruglim dnom
- Povratno vodeno hladilo
- Plamenik
- Klor-kalcijeva cijev

#### 4.4. Metode rada

##### 4.4.1. Izolacija ukupnih fenolnih spojeva iz bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija ukupnih fenola iz bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) potpomognuta je djelovanjem mikrovalova te je provedena u mikrovalnom reaktoru (START S Microwave Labstation for Synthesis, MILESTONE) (slika 7), prema planu pokusa navedenom u tablici 2. Sve ekstrakcije provedene su iz iste mase uzoraka (1 g), dok su prema centralno kompozitnom dizajnu pokusa varirani sljedeći parametri: temperatura (50°C –70°C), snaga (200-500 W) i vrijeme (4-12 min) ekstrakcije. Kao otapalo za ekstrakciju ukupnih fenola iz bobica tršlje koristio se 70%-tni etanol.

**Tablica 2.** Plan pokusa ekstrakcije ukupnih fenola primjenom mikrovalova

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)
1	50	200	4
2	50	200	12
3	50	500	4
4	50	500	12
5	70	200	4
6	70	200	12
7	70	500	4
8	70	500	12
9	43	350	8
10	77	350	8
11	60	98	8
12	60	602	8
13	60	350	1
14	60	350	15
15 (C)	60	350	8
16 (C)	60	350	8

*Postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima:*

Odvaže se 1 g usitnjenog, samljevenog uzorka s točnošću  $\pm 0,001$  g i prelije s 40 mL otapala (70% - tni etanol) u tikvici okruglog dna sa šlifom (50 mL). Tikvica se dobro promiješa i u nju se ubaci magnetski mješač. Tikvica s homogeniziranim uzorkom i magnetskim mješačem namjesti se na postolje mikrovalnog ekstraktora te se na nju spoji vodeno hladilo s klor-kalcijevom cijevi (Slika 7). Prije početka ekstrakcije, na ekranu uređaja postave se opći parametri ekstrakcijskog postupka: miješanje (50 %), vrijeme postizanja temperature (2 min) te ventilacija nakon ekstrakcije (1 min). Namjeste se i zadani parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prema navedenom planu pokusa (tablica 2). Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakti se filtriraju preko filter papira i kvantitativno prenose u odmjernu tikvicu volumena 50 ml te nadopune odgovarajućim otapalom (70%- tni etanol) do oznake. Etanolni ekstrakti se zatim preliju u plastične epruvete (Falcon) od 50 ml i čuvaju na  $+4^{\circ}\text{C}$  do trenutka provođenja analize ukupnih fenola.



**Slika 7.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, mikrovalni reaktor (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis) (vlastita fotografija)

#### *Postupak klasične ekstrakcije:*

Odvaže se 1 g fino samljevenog uzorka s točnošću  $\pm 0,001$  g u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL. Uzorak se homogenizira dodavanjem 40 mL otapala (70% - tni etanol) neposredno prije ekstrakcije. Provodi se postupak ekstrakcije pomoću refluksa u trajanju od 30 minuta od trenutka kad ekstrakt provrije. Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakt se filtrira preko filter papira i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 ml te nadopuni odgovarajućim otapalom (70%- tni etanol) do oznake. Etanolni ekstrakt se zatim prelije u plastičnu epruvetu (Falcon) od 50 ml i čuva na  $+4^{\circ}\text{C}$  do trenutka provođenja analize ukupnih fenola.

#### **4.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola**

##### *Princip određivanja:*

Za određivanje ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu uzorka primjenjuju se spektrofotometrijske metode, a najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji fenola.

##### *Postupak određivanja:*

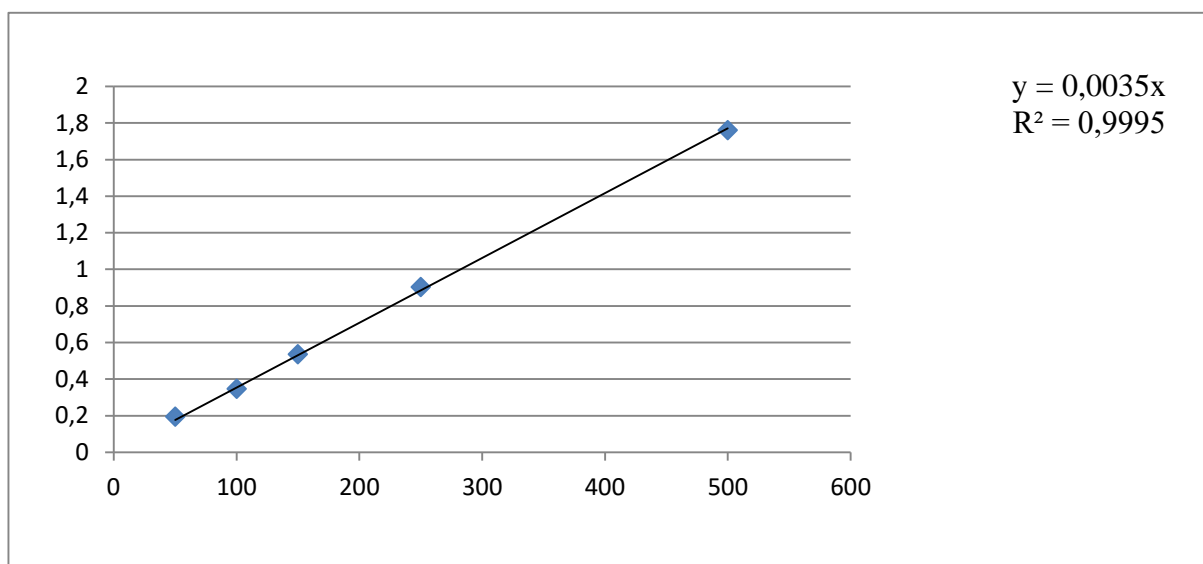
Određivanje ukupnih fenola provedeno je prema metodi koju su opisali Shortle i suradnici 2014. godine. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta (koji je 10x razrijeđen sa 70 %-tnim etanolom), 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran (70 %-tni etanol). Uzorci se promiješaju pomoću Vortexa, a zatim termostatiraju u kupelji od rotavapora u trajanju od 25 minuta pri temperaturi  $50^{\circ}\text{C}$ . Nakon termostatiranja mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

##### *Izrada baždarnog pravca:*

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100

mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200  $\mu$ L F.C. reagensa i 2 mL vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali umjesto otopine standarda uzima se 100  $\mu$ L destilirane vode. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Na temelju dobivenih rezultata dobivena je jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

$R^2$  – koeficijent determinacije

#### **4.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta (ORAC metoda)**

Antioksidacijski kapacitet ekstrakta određen je ORAC metodom prema radu Prior i sur. (2005) i Bender i sur. (2014) uz male modifikacije. U 75 mM fosfatnom puferu (pH 7,0) pripravljene su otopine fluoresceina (70.3 nM), otopine trolox standarda 6 različitih koncentracija pripremljenih razrjeđenja (3,12 – 103,99  $\mu$ M), izvor radikala 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (240 mM) te odgovarajuća razrjeđenja uzorka.

U svakoj jažici na ploči s 96 jažica otpipetira se:

150  $\mu$ l otopine fluoresceina od 70.3 nM (sve jažice)

+ 25  $\mu$ L Trolox® razrjeđivanje (standardi)

+25  $\mu$ L razrjeđivanje uzorka (uzorci)

+ 25  $\mu$ L fosfatnog pufera 75 mM, pH=7 (slijepa proba)

Inkubira se pločica s jažicama u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija ( $\lambda$  eks. 485 nm i  $\lambda$  em. 520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25  $\mu$ L svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta.

Mjerenje se provelo spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz  $\lambda$  eks. 485 nm i  $\lambda$  em. 520 nm. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) služi kao standard i zbog toga se ORAC vrijednosti izražavaju kao mikromol trolox ekvivalenta po litri ( $\mu$ mol TE/L).

ORAC analiza je provedena na uređaju Clariostar, a analiza podataka sa MARS 2.0 software (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka). MARS softver za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu, te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom.

#### **4.4.4. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju**

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju temelji se na gradijentnoj eluciji, pri čemu se ekstrahirani fenolni spojevi eluiraju u nizu padajuće polarnosti.

Ultradjelotvorna tekućinska kromatografija (UPLC) uz MS/MS detekciju provedena je na uređaju Agilent series 1290 RRLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) koji je opremljen binarnom pumpom, autosamplerom, termostatiranim kolonama, Agilent trostrukim kvadropolnim masenim spektrometrom (6430) s ESI izvorom iona te software-om MassHunter Workstation for QQQ.

Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je prema metodi opisanoj u istraživanju Serre i sur. (2011) uz određene modifikacije u sastavu otapala: umjesto 0,2% octene kiseline u vodi, otapalo A sadržavalo je 0,1% mravlje kiseline, a otapalo B 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu. Također, protok je smanjen s 0,4 mL/min na 0,35 mL/min.

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je pri uvjetima prikazanim u tablici 3.

**Tablica 3.** Kromatografski uvjeti

<b>Kolona</b>	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 $\mu\text{m}$ (100 $\times$ 2,1 mm I.D.)
<b>Pokretna faza</b>	Otapalo <b>A</b> : 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi Otapalo <b>B</b> : 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
<b>Detektor</b>	MS/MS trostruki kvadropol (QqQ)
<b>Ionski izvor</b>	ESI
<b>MS parametri</b>	Temperatura plina: 300 $^{\circ}\text{C}$ Protok plina (N <sub>2</sub> ): 11 L/h Nebulizer: 40 psi Pozitivni/negativni napon na kapilari: +4000 V; -3500 V
<b>Maseni detektor</b>	dMRM mode ( $m/z$ od 100 do 1000)
<b>Eluiranje</b>	Gradijentno (gradijent prikazan u Tablici 4.)
<b>Temperatura</b>	35 $^{\circ}\text{C}$
<b>Vrijeme trajanja</b>	12,5 min
<b>Injektirani volumen</b>	2,5 $\mu\text{L}$



**Tablica 4.** Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (Serra i sur., 2011)

t (min)	Otapalo A	Otapalo B	Protok (mL/min)
0	95	5	0,35
10	65	35	0,35
10,1	20	80	0,35
11	20	80	0,35
11,1	95	5	0,35
12,5	95	5	0,35

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona ( $m/z$ ) i fragment iona ( $m/z$ ) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja prikazanih u tablici 5.

**Tablica 5.** Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedine fenolne spojeve

Naziv standarda	Jednadžba baždarnog pravca
Kvercetin-3-glukozid	$y=3224,5x$
Kamferol-3-rutinozid	$y=3452x$
Kumarinska kiselina	$y=973,3x$
Epikatehin	$y=2776,2x$
Ferulinska kiselina	$y=368,81x$
Galna kiselina	$y=480,65x$
Klorogenska kiselina	$y=2056,2x$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y=994,29x$
Katehin	$y=2935,3x$
Epigalokatehin galat	$y=2873,1x$
Kvercetin-3-rutinozid	$y=1477,8x$
Epikatehin galat	$y=1101,6x$
Procijanidin B1	$y=55,582x$
Procijanidin B2	$y=69,972x$
Miricetin	$y=212,42x$
Apigenin	$y=1684,5x$
Luteolin	$y=1292,9x$

Identificirani fenolini spojevi kvantificirani su na temelju retencijskog vremena i masenog spektra u usporedbi s odgovarajućim standardima. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih molekularnih i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija je provedena na sljedeći način: 3-*O*-feruloilkina kiselina kvantificirana je prema standardu ferulinske kiseline, 4-*p*-kumaroilkina kiselina i 3-*p*-kumaroilkina kiselina *p*-kumarinskom kiselinom, 3-*O*-kafeoilkina kiselina prema standardu klorogenske kiseline, monogaloil glukoza, 5-*O*-galoilkina kiselina, digaloilkina kiselina te trigaloilkina kiselina kvantificirane su prema standardnoj krivulji galne kiseline, epikatehin prema standardu katehina, miricetin rutinozid, miricetin glukuronid i miricetin ramnozid prema standardu miricetina, kamferol-3-heksozid, kamferol ramnozil heksozid, kamferol pentozil heksozid, kamferol pentozid, kamferol ramnozid i kamferol acetilramnozil heksozid kvantificirani su prema standardu kamferol-3-rutinozida, a kvercetin pentozid i kvercetin ramnozid prema standardu kvercetin-3-glukozida. Dobivene koncentracije izražene su kao mg/100 g uzorka.

#### **4.4.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka**

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD).

Da bi se utvrdio utjecaj temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u bobici tršlje s ciljem optimiranja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine.

Centralno-kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od tri dijela: puni  $2^k$  faktorijalni dizajn (dizajn prvog reda), osni dio sastavljen od  $2k$  broja točaka smještenih tako da su dvije točke položene na osima kontrolnih varijabli na istoj udaljenosti  $\alpha$  od centra te od centralne točke i replikacije u istoj (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

Utvrđene su gornje i donje granice ispitivanih parametara kako slijedi: temperatura od 50 do 70 °C, snaga mikrovalova od 200 do 500 W te vrijeme ekstrakcije od 4 do 12 min. Svaki od tri ispitivana parametra promatran je na tri razine, nižoj (-1), središnjoj (0) i višoj (1) što je ukupno 16 pokusa uključujući faktorske, aksijalne i centralnu točku sa dva ponavljanja (tablica 2). Kao ovisna varijabla promatrana je koncentracija ukupnih fenola izražena u mg GAE/g uzorka.

Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (Response Surface Methodology). Regresijski model za svaku promatranu ovisnu varijablu izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=j}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

gdje je:

Y- predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

$\beta_0$  - fiksni koeficijent a  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

$X_i \dots X_j$  - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable

Da bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli te postojanje razlike među provedenim uvjetima ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, korištena je analiza varijance (ANOVA). Valjanost cijelog kvadratnog empirijskog modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom analize varijance na 95%- tnoj razini vjerojatnosti.

Prilikom optimizacije parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima postavljena je visoka preferencija (1,0) za ovisnu varijablu, odnosno koncentraciju ukupnih fenola. Ulazni parametri su promatrani u različitom broju koraka ovisno o njihovom rasponu radi preciznije optimizacije. Tako je temperatura promatrana u 20 koraka, snaga mikrovalova u 100 koraka, a vrijeme u 8 (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti izolacije fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima iz bobica tršlje, ekstrakcija je provedena prema eksperimentalnom dizajnu prikazanom u tablici 2. Tablica 6 prikazuje eksperimentalni dizajn s pripadajućim rezultatima tj. koncentracijama ukupnih fenola u mg GAE/g uzorka, koja je dobivena primjenom zadanih parametara (temperature, snage mikrovalova i vremena).

**Tablica 6.** Utjecaj temperature, snage mikrovalova i trajanja ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima bobica tršlje.

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)
1	50	200	4	29,54±0,81
2	50	200	12	33,00±0,20
3	50	500	4	30,57±1,21
4	50	500	12	37,71±2,12
5	70	200	4	35,86±1,31
6	70	200	12	41,72±2,82
7	70	500	4	36,78±2,92
8	70	500	12	38,29±0,81
9	43	350	8	22,69±1,41
10	77	350	8	34,36±2,52
11	60	98	8	38,14±0,20
12	60	602	8	34,43±2,53
13	60	350	1	27,00±2,22
14	60	350	15	40,82±1,01
15 (C)	60	350	8	33,50±0,60
16 (C)	60	350	8	34,25±1,01

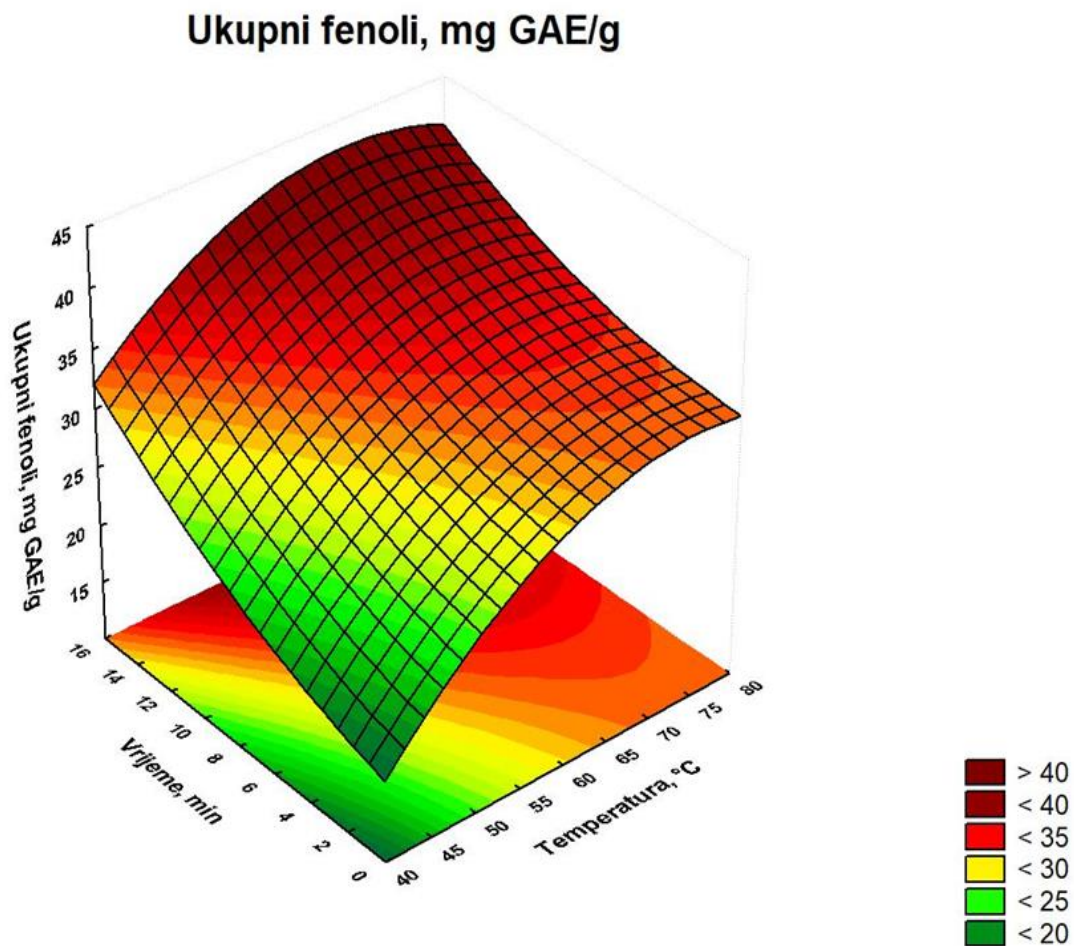
Koncentracija ukupnih fenola se, ovisno o uvjetima ekstrakcije kretala od 22,69±1,41 mg GAE/g uzorka do 41,72±2,82 mg GAE/g uzorka što je u skladu s istraživanjima Trabelsija i sur. (2016) prema kojem koncentracije ukupnih fenola u bobicama tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) variraju od 24,84 mg GAE/g do 46,07 mg GAE/g ovisno o podrijetlu biljke. Zitouni i sur. (2016) određivali su koncentraciju ukupnih fenola iz različitih dijelova biljke i u bobici odredili

koncentraciju ukupnih fenola koja iznosi  $103.342 \pm 2.317$  mg GAE/g suhe tvari. Iz rezultata (tablica 6) je vidljivo da je najveća koncentracija ukupnih fenola od 41,72 mg GAE/g dobivena ekstrakcijom pri temperaturi 70°C, u trajanju 12 minuta i primjenom snage od 200 W. S druge strane, najmanja koncentracija ekstrahiranih fenola iznosi 22,69 mg GAE/g, a ostvarena je pri znatno nižoj temperaturi (43°C) i snazi mikrovalova od 350 W u trajanju 8 minuta. Također, iz rezultata je vidljiv trend porasta koncentracije ukupnih fenola s produljenjem vremena ekstrakcije. Koncentracija ukupnih fenola dobivena ekstrakcijom u trajanju 1 minute iznosi 27,00 mg GAE/g, a koncentracija dobivena ekstrakcijom u trajanju od 15 minuta iznosi 40,82 mg GAE/g, pri istim vrijednostima temperature (60°C) i snage mikrovalova (350 W). Koncentracija ukupnih fenola pri temperaturi od 43°C iznosi 22,69 mg GAE/g uzorka, dok je pri temperaturi od 60°C 33,50 mg GAE/g uzorka, također pri istim vrijednostima vremena (8 min) i snage mikrovalova (350 W). Da bi se utvrdila signifikantnost utjecaja navedenih procesnih parametara (vrijeme, temperatura i snaga mikrovalova) na ekstrakciju ukupnih fenola iz bobica tršlje, provedena je analiza varijance (ANOVA) i rezultati su prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Analiza varijance (ANOVA) utjecaja temperature (X1), snage (X2) i vremena (X3) na količinu ukupnih fenola u ekstraktu bobica tršlje na 95%-tnom intervalu vjerojatnosti

Izvor varijacije	F-vrijednost	p-vrijednost
X <sub>1</sub>	448.007	0.030
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	57.290	0.084
X <sub>2</sub>	2.350	0.368
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	65.321	0.078
X <sub>3</sub>	447.319	0.030
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	9.252	0.202
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	30.250	0.114
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	4.637	0.277
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.200	0.733
<b>Nedostatak modela „Lack of Fit”</b>	34.695	0.128
<b>R<sup>2</sup></b>		0,869

Valjanost kvadratnog empirijskog modela testirana je analizom varijance (ANOVA) na 95%-tnoj razini vjerojatnosti (Elez Garofulić i sur., 2013). Na osnovu rezultata dobivenih ANOVA testom, uočava se statistički značajan učinak dvaju linearnih članova, vremena ( $p=0,030$ ) i temperature ( $p=0,030$ ) ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola ( $p<0,05$ ). Snaga mikrovalova nije pokazala statistički signifikantan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu ( $p=0,368$ ). U skladu s rezultatima ANOVE, na slici 8 je trodimenzionalan prikaz odzivnih površina za koncentraciju ukupnih fenola u ovisnosti o statistički signifikantnim vrijednostima (vremenu i temperaturi) uz konstantnu vrijednost snage (350 W). Iz prikaza je vidljivo da je porast temperature ekstrakcije kao i vremena rezultirao višom koncentracijom ukupnih fenola.



**Slika 8.** Trodimenzionalan prikaz odzivnih površina za koncentraciju ukupnih fenola u ovisnosti o vremenu i temperaturi ekstrakcije pri konstantnoj snazi mikrovalova (350 W)

## **5.2. Utjecaj procesnih parametara na prinos ekstrakcije**

### **5.2.1. Utjecaj vremena ekstrakcije**

Povećanje vremena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u pravilu rezultira većim ekstrakcijskim prinosima. Najviša koncentracija ukupnih fenola dobivena je provedbom ekstrakcije u trajanju 12 minuta (41,72 mg GAE/g uzorka) dok su značajno manje koncentracije zabilježene kod ekstrakcije u trajanju od 1 i 4 minute (27,00 mg GAE/g i 29,54 mg GAE/g). Do vrlo sličnih rezultata došli su Elez Garofulić i suradnici (2013) ispitujući utjecaj vremena (5-12 minuta) na koncentraciju fenolnih kiselina ekstrahiranih iz višnje maraske (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) pri čemu je duže trajanje ekstrakcije dalo veće ekstrakcijske prinose. Optimalnom se pokazala ekstrakcija fenolnih kiselina u trajanju 10 minuta. Značajan učinak vremena na prinos ukupnih fenola dokazali su i Teng i Lee (2013). Oni su optimizirali ekstrakciju fenolnih spojeva iz plodova murve (*Morus alba* L.) pri čemu se sadržaj ukupnih fenola povećavao trajanjem ekstrakcije od 1. do 7. minute, dok je prilikom dužeg tretiranja (9 minuta) zabilježen pad njihove ukupne koncentracije. Prilikom ekstrakcije flavonoida iz kozlinca (*Radix Astragali*) zabilježeno je povećanje ekstrakcijskog prinosa do 25. minute, a dužim tretiranjem došlo je do opadanja koncentracije flavonoida u ekstraktima (Xiao i sur., 2008). Dragović-Uzelac i suradnici (2012) su istraživali optimalne uvjete za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kadulje (*Salvia officinalis* L.), pri čemu su koristili 30 %-tne otopine etanola i acetona kao ekstrakcijska otapala. Koristili su mikrovalove snage 500-700 W te istražili utjecaj vremena ekstrakcije (3, 5, 7, 9 i 11 minuta) na ekstrakcijski prinos. Najučinkovitijom se pokazala ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u trajanju od 9 minuta.

### **5.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije**

Prema podacima koji su dobiveni ANOVA testom (tablica 7), temperatura je procesni parametar koji signifikantno utječe ( $p < 0,05$ ) na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima bobica tršlje. Porast temperature sustava u pravilu rezultira boljim ekstrakcijskim prinosima odnosno većim koncentracijama ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima. U ovom istraživanju primjenjivale su se temperature sustava u rasponu od 43°C do 77°C, a najveća koncentracija ukupnih fenola (41,72 mg GAE/g uzorka) postignuta je primjenom temperature od 70°C. Pri temperaturi od 43°C koncentracija ukupnih fenola iznosila je 22,69 mg GAE/g uzorka što je ujedno i najmanji prinos ekstrakcije. Do sličnih rezultata došli su Piovesan i suradnici (2017) koji su ispitivali utjecaj temperature (30, 40, 50 i 60°C) na mikrovalovima potpomognutu

ekstrakciju ukupnih fenola iz borovnice. Primjenom viših temperatura povećan je ekstrakcijski učinak i zabilježene su veće koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima.

Wu i suradnici (2012) ekstrahirali su fenolne spojeve iz krumpira. Primijenili su temperature od 50, 60, 70 i 80°C te zabilježili značajan porast koncentracije ukupnih fenola povećanjem temperature ekstrakcije. Sličan trend uočili su Jokić i suradnici (2012) optimizacijom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije fenolnih spojeva iz brokule. Koncentracija ekstrahiranih fenola povećavala se povišenjem temperature od 50°C do 73°C, a daljnje zagrijavanje (do 90°C) rezultiralo je opadanjem fenolnog sadržaja. Elez Gaofulić i suradnici (2013) ispitali su utjecaj temperature (50-70°C) na mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju fenolnih kiselina i antocijana iz višnje maraske. Za ekstrakciju antocijana pogodnije su bile niže temperature ekstrakcije (60°C), dok su se veći prinosi fenolnih kiselina dobili pri višim temperaturama ekstrakcije (70°C).

Navedena istraživanja dokazuju da povišenje temperature dovodi do porasta koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima, međutim prekomjerno izlaganje mikrovalovima može rezultirati termičkom degradacijom bioaktivnih spojeva. Na taj način dolazi do nepotrebnih gubitaka procesnih resursa, smanjuje se koncentracija ekstrahiranih fenolnih spojeva, a time i efikasnost ekstrakcijskog postupka.

### **5.2.3. Utjecaj snage mikrovalova**

Promjena snage mikrovalova ne pokazuje statistički značajan učinak na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima bobica tršlje. U istraživanju smo koristili mikrovalove u rasponu snage 98-602 W, a najveća koncentracija ukupnih fenola postigla se uporabom manje snage mikrovalova (200 W). Gao i suradnici (2006) ispitali su utjecaj snage mikrovalova (400 – 1200 W) na ekstrakciju flavonoida iz *Saussurea medusa Maxim.* Zaključili su da primjena mikrovalova različite snage (400, 800, 1200 W) statistički ne utječe značajno na prinos flavonoida. U drugom istraživanju, Filip i suradnici (2017) proveli su optimizaciju mikrovalovima potpomognute ekstrakcije fenolnih spojeva iz bosiljka koristeći mikrovalove snage 400 W, 600 W i 800 W. Uočili su da se sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima povećavao porastom snage mikrovalova od 400 W do 600 W, a zatim blago smanjivao korištenjem mikrovalova snage 800 W.

Za razliku od navedenih istraživanja, Haddadi-Guemghar i suradnici (2014) dokazali su statistički značajan utjecaj snage mikrovalova na prinos ukupnih fenola i epikatehin galata u ekstraktima šljive (*Prunus domestica L.*). Povišenjem snage mikrovalova od 100 W do 500 W



došlo je do porasta koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima za čak 66,88 %, dok se koncentracija epikatehin galata povećavala uporabom mikrovalova snage do 430 W, a daljnjim povećanjem snage mikrovalova njihova se koncentracija nije značajno mijenjala. Snaga mikrovalova i temperatura ekstrakcije međusobno su povezani na način da veća snaga mikrovalova uzrokuje povećanje temperature ekstrakcijskog postupka i povećava njegovu efikasnost. Međutim, previsoka snaga mikrovalova može potaknuti termičku degradaciju bioaktivnih spojeva i utjecati na značajno smanjenje ekstrakcijskih prinosa (Chandrasekar i sur., 2015). Stoga, izabrana snaga mikrovalova tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature što može dovesti do razgradnje termoosjetljivih supstanci (Font i sur., 1998).

Parametri ekstrakcije: vrijeme, temperatura i snaga mikrovalova, kombinirani su u linearne, kvadratne i koeficijente interakcija kako bi se dobila jednadžba regresijskog modela koja opisuje ovisnost koncentracije ukupnih fenola u bobicama tršlje u ovisnosti o ekstrakcijskim parametrima.

**Tablica 8.** Jednadžba regresijskog modela za koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Varijabla	Model
<b>Koncentracija ukupnih fenola</b>	$Y = -46,7913 + 2,1914 X_1 - 0,0131 X_1^2 - 0,0034 X_2 + 0,0001 X_2^2 + 0,9019 X_3 + 0,0312 X_3^2 - 0,0007 X_1X_2 - 0,0101 X_1X_3 - 0,0011 X_2X_3$
<b>X<sub>1</sub> = temperatura ekstrakcije; X<sub>2</sub> = snaga mikrovalova; X<sub>3</sub> = vrijeme ekstrakcije</b>	

Tablica 8 prikazuje jednadžbu regresijskog modela za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima bobice tršlje dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Model omogućuje predviđanje odziva koncentracije ukupnih fenola (promjenjive varijable) za bilo koje željeno vrijeme ekstrakcije, temperaturu i snagu mikrovalova. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) predstavlja omjer protumačenih i ukupnih odstupanja modela, a dobro prilagođen model ne smije imati odstupanja manja od 0,8 ( $R^2 > 0,8$ ). Iz tablice 7 je vidljivo da koeficijent determinacije za predstavljeni model iznosi 0,869, pa možemo zaključiti da je model prikladan za predviđanje koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima bobice tršlje dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Prikladnost modela dodatno je testirana određivanjem testa nedostatka modela koji je nesignifikantan ( $p=0,128$ ).

Za potrebe daljnjeg istraživanja koje uključuje identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva u bobicama tršlje te određivanje antioksidacijskog kapaciteta, provedena je optimizacija postupka ekstrakcije potpomognute mikrovalovima kako bi se utvrdili optimalni uvjeti temperature, vremena i snage mikrovalova pri kojima se ostvaruje najveća koncentracija ukupnih fenola (tablica 9).

**Tablica 9.** Optimalni uvjeti za mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju bobica tršlje s predviđenim i eksperimentalnim koncentracijama ukupnih fenola te dobivenim koncentracijama ukupnih fenola postupkom klasične ekstrakcije

Optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima		Ukupni fenoli predviđeno (mg GAE/g)	Ukupni fenoli eksperimentalno (mg GAE/g)
<b>Temperatura</b>	75 °C	41,85	41,14
<b>Snaga mikrovalova</b>	602 W		
<b>Vrijeme</b>	15 min		
Uvjeti klasične ekstrakcije uz refluks		/	42,71
<b>Vrijeme</b>	30 min		

Najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola ostvaren je na optimalnim uvjetima: temperaturi od 75 °C, trajanju 15 minuta i sa snagom mikrovalova 602 W te iznosi 41,14 mg GAE/g uzorka. Iz tablice 9 se može vidjeti sličnost koncentracije ukupnih fenola dobivenih eksperimentalnim putem na optimalnim uvjetima (41,14 mg GAE/g uzorka) i koncentracije predviđene regresijskim modelom (41,85 mg GAE/g uzorka). Da bi se mogla usporediti koncentracija ukupnih fenola dobivena suvremenom i klasičnom metodom ekstrakcije, proveden je postupak ekstrakcije uz refluks u trajanju od 30 minuta. Klasičnom ekstrakcijom dobivena je neznatno veća količina ukupnih fenola (42,71 mg GAE/g uzorka) u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima. Jedna od najvećih prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u odnosu na klasične metode je bitno skraćeno vrijeme potrebno za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala (Mandal i sur., 2007). Iz tablice 9 je vidljivo da se uporabom mikrovalova omogućuje dobivanje gotovo identičnih ekstrakcijskih prinosa uz značajno skraćivanje trajanja postupka.

Trabelsi i suradnici (2016) mjerili su količinu ukupnih fenola u bobicama triju različitih sorti tršlje s područja Tunisa. Ukupni fenoli ekstrahirani su postupkom maceracije koji je trajao 24 sata, a dobiveni su sljedeći prinosi: 24,84, 32,47 i 46,07 mg GAE/g uzorka. Ovaj postupak

klasične ekstrakcije trajao je višestruko duže od prethodno navedenih i može se zaključiti da ekstrakcija uz refluks, a naročito ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, bitno skraćuje trajanje postupka i osigurava velike ekstrakcijske prinose. Dahmoune i suradnici (2014) proveli su optimizaciju mikrovalovima potpomognute ekstrakcije polifenola iz lišća mirte (*Myrtus communis* L.) i usporedili dobivene prinose s prinosima klasične i ultrazvučno potpomognute ekstrakcije. Koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva nisu se bitno razlikovale primjenom ovih triju metoda, međutim uočena je značajna razlika u trajanju ekstrakcijskih postupaka. Vrijeme ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pokazalo se 14 do 15 puta kraćim u odnosu na klasičnu ekstrakciju i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, stoga se ova metoda pokazala najefikasnijom. Uporaba mikrovalova kod izolacije fenolnih spojeva iz listova kadulje značajno je pospješila i skratila cijeli ekstrakcijski postupak (Dragović-Uzelac i sur., 2012). Primjenom mikrovalova snage 500 W u trajanju 9 minuta pri 80°C ekstrahirane su veće količine ukupnih fenola nego provođenjem klasične ekstrakcije u trajanju 30 minuta pri istoj temperaturi.

### 5.3. Fenolni profil ekstrakta bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

Da bi se utvrdio fenolni profil ekstrakta bobica tršlje dobiven pri optimalnim uvjetima MAE, provedena je UPLC-MS/MS analiza dobivenog ekstrakta te identifikacija spojeva usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona ( $m/z$ ) i fragment iona ( $m/z$ ) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Za spojeve koji nisu imali svoje referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih molekularnih i fragment iona s literaturnim podacima. Tablica 10 prikazuje identificirane fenolne spojeve u ekstraktu bobice tršlje, njihovo retencijsko vrijeme te molekularne i fragment ione. Ukupno su identificirana 34 spoja od kojih je 11 fenolnih kiselina i 23 flavonoida (6 flavanola, 2 flavona i 15 flavonola). Nakon identifikacije, spojevi su kvantificirani i njihova koncentracija izražena u miligramima na 100 grama uzorka prikazana je na slici 9.

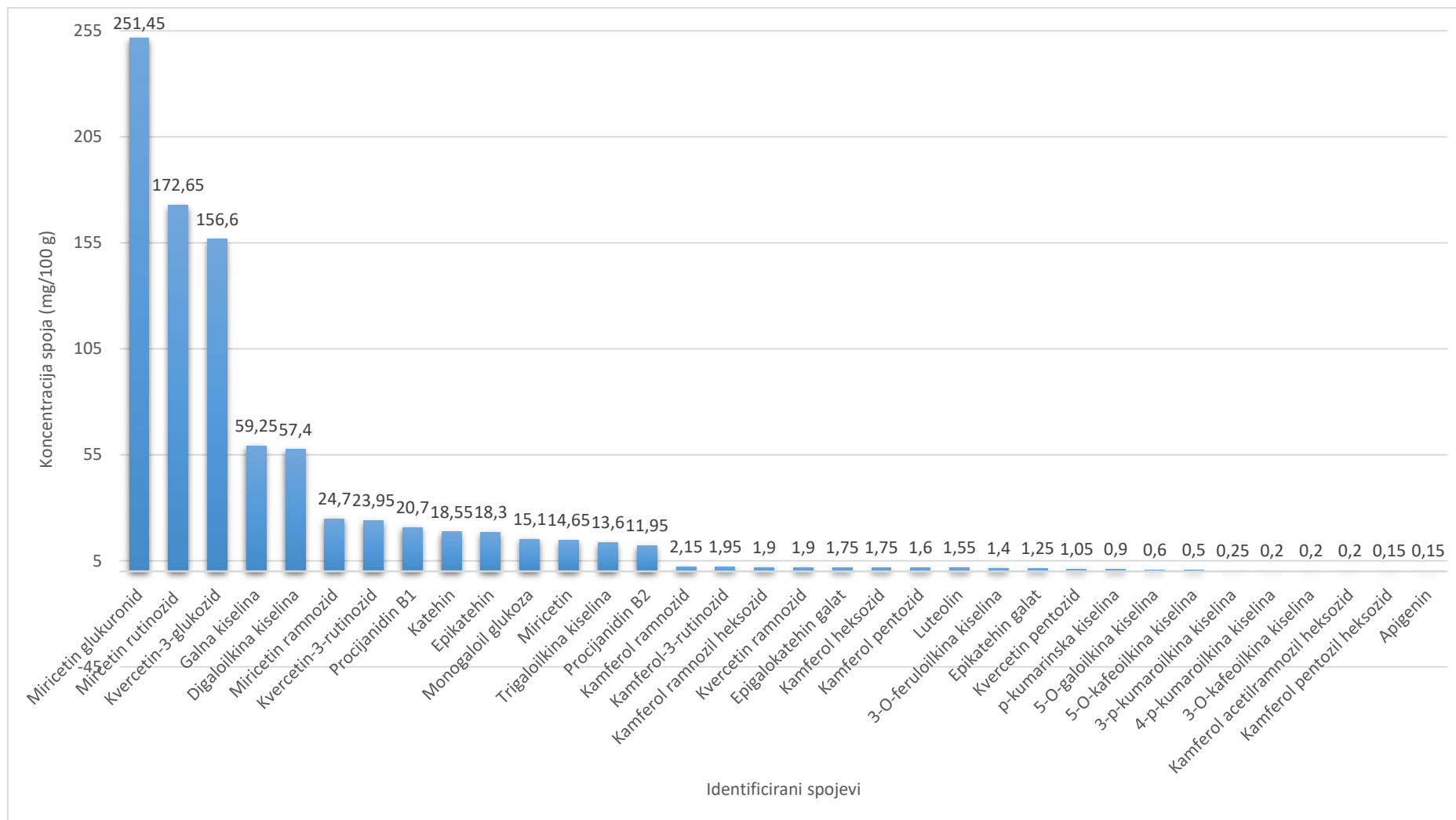
**Tablica 10.** Identifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakta bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

<i>Spoj</i>	<i>Retencijsko vrijeme</i>	<i>Molekularni ion (m/z)</i>	<i>Fragment ion (m/z)</i>	<i>Identificirani spoj</i>
1	0,905	367	193	3- <i>O</i> -feruloilkina kiselina
2	0,916	337	173	4- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina

**Tablica 10. (nastavak)** Identifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakta bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

<i>Spoj</i>	<i>Retencijsko vrijeme</i>	<i>Molekularni ion (m/z)</i>	<i>Fragment ion (m/z)</i>	<i>Identificirani spoj</i>
3	0,918	353	191	5- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina (neoklorogenska kiselina)
4	0,979	331	169	Monogaloil glukoza
5	1,313	169	125	Galna kiselina*
6	2,144	343	191	Galoilkina kiselina
7	2,639	353	191	3- <i>O</i> -kafeoilkina kiselina (klorogenska kiselina)*
8	2,351	495	343	Digaloilkina kiselina
9	3,346	579	427	Procijanidin B1*
10	3,486	579	427	Procijanidin B2*
11	3,602	337	163	3- <i>p</i> -kumaroilkina kiselina
12	3,935	291	139	Epikatehin
13	3,944	291	139	Katehin*
14	5,171	459	139	Epigalokatehin galat*
15	5,208	647	495	Trigaloilkina kiselina
16	5,836	627	319	Mircetin rutinozid
17	5,940	163	119	<i>p</i> -kumarinska kiselina*
18	5,992	319	273	Miricetin*
19	5,992	495	319	Miricetin glukuronid
20	6,549	611	303	Kvercetin-3-rutinozid
21	6,665	465	319	Miricetin ramnozid
22	6,770	442,9	139	Epikatehin galat
23	6,886	465	303,1	Kvercetin-3-glukozid*
24	6,946	449	287	Kamferol heksozid
25	7,309	595	287	Kamferol ramnozid heksozid
26	7,312	595	287	Kamferol-3-rutinozid*
27	7,342	435	303	Kvercetin pentozid
28	7,452	581	287	Kamferol pentozil heksozid
29	7,702	449	303	Kvercetin ramnozid
30	8,373	419	287	Kamferol pentozid
31	8,585	433	287	Kamferol ramnozid
32	9,989	287	153	Luteolin*
33	11,162	637	287	Kamferol acetilramnozid heksozid
34	11,185	271	153	Apigenin*

\* *Spojivi označeni zvjezdicom identificirani su pomoću referentnih standarda*



**Slika 9.** Kvantifikacija identificiranih fenolnih spojeva iz ekstrakta bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

#### 5.4. Identifikacija i kvantifikacija spojeva

Iz skupine fenolnih kiselina, spojevi 5, 7 i 17 identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao galna, 3-*O*-kafeoilkina (klorogenska) i *p*-kumarinska kiselina. Prema našim rezultatima, najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina u bobici tršlje je galna kiselina i njezina koncentracija iznosi 59,25 mg/100 g uzorka, a njezinu prisutnost u bobici tršlje potvrđuje istraživanje Trabelsija i suradnika iz 2016. godine. Mehenni i sur. (2016) također su dokazali prisutnost galne kiseline i navode ju kao najzastupljeniju hidroksibenzojevu kiselinu u bobicama tršlje. Usporedbom koncentracija galne kiseline u listovima i bobicama tršlje vidljiva je značajna razlika budući da je u listovima prisutna gotovo 10 puta veća koncentracija nego u bobicama (Mehenni i sur., 2016). Spoj 3 je pokazao isti put fragmentacije kao spoj 7, okarakteriziran molekularnim ionom  $m/z$  353 i fragment ionom  $m/z$  191 koji odgovara ostatku kina kiseline te upućuje na strukturu kafeoilkine kiseline. Kako je spoj 7 identificiran usporedbom sa standardom kao 3-*O*-kafeoilkina kiselina, spoj 3 je zbog istog puta fragmentacije i veće polarnosti identificiran kao 5-*O*-kafeoilkina, odnosno neoklorogenska kiselina. Koncentracije identificiranih spojeva u bobici tršlje, 3-*O*-kafeoilkina kiseline i 5-*O*-kafeoilkina kiseline, iznose 0,2 mg/100 g odnosno 0,5 mg/100 g uzorka. Spoj 1 je pokazao molekularni ion  $m/z$  367 i fragmentni ion  $m/z$  193 što odgovara strukturi 3-*O*-feruloilkine kiseline čija koncentracija u našem istraživanju iznosi 1,4 mg/100 g uzorka (Clifford i sur., 2003). MS/MS spektar spojeva 2 i 11 ima molekularni ion  $m/z$  337 sa sekundarnim ionima na  $m/z$  173, odnosno 163 što prema Clifford i sur. (2003) odgovara spektrima 4-*p*-kumaroilkine odnosno 3-*p*-kumaroilkine kiseline. Koncentracija identificirane 4-*p*-kumaroilkine kiseline iznosi 0,2 mg/100 g uzorka, a 3-*p*-kumaroilkina kiseline 0,25 mg/100 g uzorka. Spoj 4 ima molekularni ion  $m/z$  331, te uslijed gubitka glukoze (-162 amu) nastali fragment ion  $m/z$  169, što upućuje na strukturu monogaloil-glukoze (Wyrepkowski i sur., 2014). Koncentracija identificirane monogaloil-glukoze u bobici tršlje iznosi 15,1 mg/100 g uzorka, a njezinu prisutnost u listovima tršlje potvrdili su Bozorgi i sur. u radu iz 2013. Spojevi 6, 8 i 15 identificirani su kao derivati galne kiseline. Spoj 6 ima spektar s molekularnim ionom  $m/z$  343 i sekundarnim fragment ionom  $m/z$  191 gdje gubitak galoil jedinice od -152 amu upućuje na strukturu galoilkine kiseline. Po istom fragmentacijskom ključu gubitka jedne galoil jedinice su spojevi 8 i 15 identificirani kao digaloilkina odnosno trigaloilkina kiselina (Wyrepkowski i sur., 2014). Koncentracija galoilkina kiseline iznosi 0,6 mg/100 g uzorka, digaloilkina kiseline 57,4 mg/100 g, a trigaloilkina kiseline 13,6 mg/100 g uzorka. Istraživanje Remile i sur. (2015) potvrđuje prisutnost monogaloil, digaloil i trigaloilkine kiseline u bobicama tršlje, a Baratto i

sur. (2003) su identificirali navedene spojeve i u listovima tršlje. Koncentracija digaloilkina kiseline u listu tršlje, prema Romaniju i sur. (2002), iznosi  $2680 \pm 467$  mg/100 g suhe tvari ekstrakta, a trigaloilkina kiseline  $1030 \pm 245$  mg/100 g suhe tvari ekstrakta. Također, i u radovima Bampouli i sur. (2014) te Bozorgija i sur. (2013) identificirani su izomeri galoilkina kiseline u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* L.).

Iz skupine flavanola, spojevi 9, 10, 13 i 14 identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao procijanidin B1, procijanidin B2, katehin i epigalokatehin galat, od kojih je najzastupljeniji procijanidin B1 i njegova koncentracija iznosi 20,7 mg/100 g uzorka. Odmah nakon njega je katehin u koncentraciji 18,55 mg/100 g uzorka. Prisustvo katehina u bobici tršlje dokazali su Mehenni i sur. u istraživanju provedenom 2016. godine, dok je istraživanjem Zitounija i sur. (2016) dokazano prisustvo katehina i u listu tršlje u koncentraciji 4,106 mg/100 g suhe tvari. Koncentracija procijanidina B2 u našem istraživanju iznosi 11,95 mg/100 g uzorka, a epigalokatehin galata 1,75 mg/100 g uzorka. Ostali spojevi koji spadaju u flavanole identificirani su prema svojim spektralnim podacima i drugim literaturnim izvorima. Kako je spoj 13 u usporedbi sa standardom identificiran kao katehin, spoj 12 je zbog istog puta fragmentacije identificiran kao epikatehin i izomer je katehinu (Yuan i sur., 2018). Koncentracija identificiranog epikatehina iznosi 18,3 mg/100 g uzorka. Spoj 22 ima spektar s molekularnim ionom  $m/z$  442,9 i sekundarnim ionom  $m/z$  139 što prema Mulderu i sur. (2001) upućuje na strukturu epikatehin galata.

Iz skupine flavona, spojevi 32 i 34 identificirani su prema referentnim standardima kao luteolin i apigenin. U ekstraktima bobica tršlje uočena je značajno veća koncentracija luteolina (1,55 mg/100 g) u usporedbi s apigeninom (0,15 mg/100 g) koji je se nalazi u najmanjoj količini od svih fenolnih spojeva. Luteolin je drugi najzastupljeniji fenolni spoj u ekstraktima bobica tršlje prema istraživanju Mehenni i sur. (2016), a potvrđena je njegova prisutnost i u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) (Bampouli i sur. 2014; Djeridane i sur., 2007).

Iz skupine flavonola, spojevi 18, 23 i 26 identificirani su kao miricetin, kvercetin-3-glukozid i kamferol-3-rutinozid od kojih je prema našim rezultatima najzastupljeniji kvercetin-3-glukozid. MS/MS spektralni podaci navedenih spojeva u skladu su s podacima standardnih, referentnih spojeva koji služe za identifikaciju. Koncentracija identificiranog kvercetin-3-glukozida iznosi 156,6 mg/100 g uzorka, miricetina 14,65 mg/100 g, a kamferol-3-rutinozida 1,35 mg/100 g uzorka. Istraživanje Kawashtya i suradnika (2000) navodi kvercetin-3-glukozid kao najzastupljeniji flavonol u tršlji (*Pistacia lentiscus* L.) ali i u ostalim vrstama iz roda *Pistacia* (*Pistacia atlantica*, *Pistacia chinensis* i *Pistacia khinjuk*), kao i Bozorgi i sur. u radu iz 2013.

Spojevi 16, 19 i 21 identificirani su kao derivati miricetina jer su okarakterizirani fragmentnim ionom  $m/z$  319. Spoj 16 pokazao je molekularni ion  $m/z$  627 te uslijed gubitka ramnoze (-146 amu) i glukoze (-162 amu) nastali fragmentni ion  $m/z$  319 što odgovara strukturi miricetin rutinozida (Osterc i sur., 2014). Koncentracija identificiranog miricetin rutinozida iznosi 172,65 mg/100 g uzorka, a njegovu prisutnost u bobicama tršlje dokazali su Remila i sur u istraživanju iz 2015. godine. MS/MS spektar spoja 19 ima molekularni ion  $m/z$  495 i sekundarni ion  $m/z$  319 gdje gubitak glukuronilne jedinice (-176 amu) upućuje na strukturu miricetin glukuronida (Carocho i sur., 2014). Miricetin glukuronid najzastupljeniji je spoj u ekstraktu bobica tršlje i njegova koncentracija iznosi 251,45 mg/100 g uzorka, a identificiran je i u ekstraktima listova tršlje u istraživanju Romanija i sur. provedenom 2002. godine. Spoj 21 okarakteriziran je molekularnim ionom  $m/z$  465 i fragmentnim ionom koji odgovara gubitku ramnoze (-146 amu) što prema Ostercu i sur. (2014) upućuje na strukturu miricetin ramnozida, a njegova koncentracija iznosi 24,7 mg/100 g uzorka. Remila i sur. (2015) također su identificirali miricetin ramnozid u bobicama tršlje, dok istraživanje Bampoulija i suradnika iz 2014. godine navodi identificirani miricetin ramnozid i u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* var. *chia*). Istraživanje Romanija i sur. (2002) također navodi da miricetin i njegovi derivati čine 20% ukupnih fenolnih spojeva u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* L.).

Spojevi 20, 27 i 29 identificirani su kao kvercetin glikozidi na osnovu toga što su okarakterizirani fragmentnim ionom  $m/z$  303. Imenovani su kao kvercetin rutinozid (molekularni ion  $m/z$  611), kvercetin pentozid (molekularni ion  $m/z$  435), i kvercetin ramnozid (molekularni ion  $m/z$  449) čiji fragmentni ioni odgovaraju gubitku heksoze (-162 amu) i ramnoze (-146) te pentozil jedinice (-132 amu) (Carocho i sur., 2014). Od navedenih spojeva najzastupljeniji je kvercetin rutinozid čija koncentracija u ovom istraživanju iznosi 23,95 mg/100 g uzorka, a njegovo prisustvo u bobicama tršlje potvrđuje i istraživanje Remile i sur. (2015). Kvercetin ramnozid nalazi se u koncentraciji 1,9 mg/100 g uzorka, a identificiran je i u bobicama te listovima tršlje prema istraživanju Mehenni i sur. iz 2016. godine. Kvercetin pentozid nalazi se u najmanjoj količini od svih kvercetina u našem uzorku bobica tršlje i njegova koncentracija iznosi 1,05 mg/100 g uzorka.

Spojevi 24, 25, 28, 30, 31 i 33 identificirani su kao derivati kamferola jer u MS/MS spektru pokazuju svojstveni fragmentni ion  $m/z$  287. Ovi spojevi identificirani su prema karakterističnim fragmentnim gubicima i imenovani kao kamferol heksozid (molekularni ion  $m/z$  449, gubitak -162 amu što odgovara gubitku heksoze), kamferol ramnozid heksozid (molekularni ion  $m/z$  595, gubici -142 amu i -162 amu što odgovara gubitku ramnoze i heksoze),



kamferol pentozil heksozid (molekularni ion  $m/z$  581, gubici -132 amu i -162 amu odgovaraju gubitku pentoze i heksoze), kamferol pentozid (molekularni ion  $m/z$  419, gubitak -132 amu koji odgovara gubitku pentoze), kamferol ramnozid (molekularni ion  $m/z$  433, gubitak -146 amu upućuje na gubitak ramnoze) i kamferol acetilramnozid heksozid (molekularni ion  $m/z$  637, gubici -42, -146 i -162 amu odgovaju gubitku acetilne jedinice, ramnoze i heksoze) (Barros i sur., 2013; Pinheiro i Justino, 2012). Od svih identificiranih spojeva ove skupine, u bobici tršlje je najzastupljeniji kamferol ramnozid koncentracije 2,15 mg/100 g uzorka. U padajućem nizu po kvantificiranim koncentracijama slijede kamferol ramnozid heksozid čija je koncentracija jednaka koncentraciji kamferol acetil rutinozida, potom kamferol-3-glukozid, kamferol pentozid i konačno kamferol pentozil heksozid. Kamferol glukozid u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* var. *chia*), zajedno s njegovim izomerima, identificirao je i Bampouli sa svojim suradnicima u radu iz 2014. godine.

## 5.5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta bobica tršlje

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u ovom radu korištena je ORAC metoda. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) za ekstrakt bobica tršlje iznosi  $386,82 \pm 0,007$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta bobica tršlje odredili su i Remila i suradnici u istraživanju iz 2015. godine. ORAC vrijednost za ekstrakt bobica tršlje iznosio je  $281,2 \pm 15,89$   $\mu\text{mol TE/L}$  što je višestruko manja vrijednost u odnosu na naše istraživanje ( $7736,4 \pm 0,14$   $\mu\text{mol TE/L}$ ), a razlog tomu je razlika u odabranoj ekstrakcijskoj metodi i prirodi materijala. Naime, Remila i suradnici (2015) proveli su maceraciju svježih bobica tršlje, dok su u našem istraživanju korištene osušene bobice tršlje na kojima je provedena mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija što objašnjava puno veću ORAC vrijednost našeg uzorka. Autori su u istom istraživanju odredili i antioksidacijski kapacitet ekstrakta listova tršlje te zabilježili značajno veću ORAC vrijednost ekstrakta listova ( $442,1 \pm 30,60$   $\mu\text{mol TE/L}$ ) u usporedbi s ekstraktom svježih bobica tršlje.

Dahmoune i suradnici (2014) određivali su antioksidacijski kapacitet ekstrakata listova tršlje i usporedili ORAC vrijednosti ekstrakata dobivenih klasičnom metodom ekstrakcije, ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom (UAE) i ubrzanom ekstrakcijom otapalima (ASE). Najveću ORAC vrijednost imao je ekstrakt dobiven klasičnom metodom ekstrakcije ( $671,07 \pm 58,80$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka), zatim ekstrakt dobiven ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom ( $517,52 \pm 35,18$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka), a najmanji antioksidacijski kapacitet imao je ekstrakt dobiven ubrzanom ekstrakcijom otapalima ( $257,07 \pm 20,00$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka). Pretpostavka je da se ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom, a naročito ubrzanom ekstrakcijom otapalima dobije niži antioksidacijski kapacitet ekstrakata zbog nepovoljnijih ekstrakcijskih uvjeta. Konkretno, dolazi do drastičnog smanjenja količine otapala te skraćivanja ekstrakcijskog vremena u usporedbi s klasičnim ekstrakcijskim metodama što utječe na ORAC vrijednost dobivenih ekstrakata. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva iz bobica tršlje također se temelji na smanjenoj uporabi ekstrakcijskog otapala i kraćem trajanju ekstrakcijskog postupka, stoga bi se buduća istraživanja mogla usmjeriti prema usporedbi ORAC vrijednosti ekstrakata bobica tršlje dobivenih različitim ekstrakcijskim metodama.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) potpomognuta mikrovalovima pokazala se izrazito efikasnom s obzirom na visok ekstrakcijski prinos i skraćeno trajanje postupka u usporedbi s klasičnim postupkom ekstrakcije.
2. Vrijeme i temperatura ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su procesni parametri koji značajno utječu na koncentraciju fenolnih spojeva u ekstraktima bobica tršlje, dok je snaga mikrovalova procesni parametar koji ne pokazuje statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije.
3. Porast temperature sustava u pravilu rezultira boljim ekstrakcijskim prinosima, kao i produljeno trajanje ekstrakcije.
4. Optimalni uvjeti za mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju fenolnih spojeva su: temperatura 75 °C, snaga mikrovalova 602 W i vrijeme ekstrakcije od 15 minuta.
5. U ekstraktima bobica tršlje identificirana su ukupno 34 spoja od kojih je 11 fenolnih kiselina pri čemu je najzastupljenija galna kiselina u koncentraciji 59,25 mg/100 g uzorka. Ostala 23 spoja spadaju u skupinu flavonoida od kojih je 6 flavanola, 2 flavona i 15 flavonola. Najzastupljeniji flavanol je procijanidin B1 (20,7 mg/100 g uzorka), flavon luteolin (1,55 mg/100 g uzorka) i flavonol miricetin glukuronid koji je ujedno i najzastupljeniji fenolni spoj u analiziranom uzorku bobica tršlje (251,45 mg/100 g uzorka).
6. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) za ekstrakt bobica tršlje iznosi  $386,82 \pm 0,007$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka što dokazuje visok potencijal ove biljke za primjenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

## **7. ZAHVALE**

U prvom redu se zahvaljujemo našoj mentorici, doc.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić na prijateljskom pristupu, stručnoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade rada. Zahvaljujemo se i prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac, doc.dr.sc. Zoranu Zoriću i dr.sc. Sandri Pedisić na srdačnoj pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada. Upućujemo zahvalu i doc.dr.sc. Mojci Čakić Semenčić za ustupljanje uređaja neophodnih za izradu ovog rada.

## 8. POPIS LITERATURE

Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L. (2007) Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemi-Biol Interact.* **165**, 1–13. doi:10.1016/j.cbi.2006.10.003

Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P.J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T.A., Kleine, H.P., Knight, C., Nagy, M.A., Perry, D.A., Stefaniak, M. (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem.* **10**, 31–36. doi:10.1039/B711717E

Anonymus 1, Izgled bobice tršlje (*Pistacia lentiscus* L.)

<[http://quickbooker.org/kunden/wildherbsofcrete\\_com/pages/portraits-of-our-essential-oils-from-wild-herbs-of-crete/lentisk-or-mastic.php](http://quickbooker.org/kunden/wildherbsofcrete_com/pages/portraits-of-our-essential-oils-from-wild-herbs-of-crete/lentisk-or-mastic.php)>, pristupljeno: 12.02.2018.

Anonymus 2, Elektromagnetski spektar

<[https://www.google.hr/search?q=elektromagnetski+spektar&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj0itmKgMHaAhXC16QKHRtHDMkQ\\_AUICigB&biw=1242&bih=602#imgrc=z5xemIOpECQDiM](https://www.google.hr/search?q=elektromagnetski+spektar&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj0itmKgMHaAhXC16QKHRtHDMkQ_AUICigB&biw=1242&bih=602#imgrc=z5xemIOpECQDiM)>, pristupljeno: 15.02.2018.

Aouinti, F., Zidane, H., Tahri, M., Wathélet, J.P., El Bachiri, A. (2014) Chemical composition, mineral contents and antioxidant activity of fruits of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* **5**(1), 199-206.

Atashpour, S., Fouladdel, S., Komeili Movahhed, T., Barzegar, E., Ghahremani, M.H., Ostad, S.N., Azizi, E. (2015) Quercetin induces cell cycle arrest and apoptosis in CD133+ cancer stem cells of human colorectal HT29 cancer cell line and enhances anticancer effects of doxorubicin. *Iran J Basic Med Sci.* **18**(7), 635-643. doi: 10.22038/IJBMS.2015.4643

Azaizeh, H., Halahleh, F., Abbas, N., Markovics, A., Muklada, H., Ungar, E.D., Landau, S.Y. (2013) Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Vet parasitol.* **191**, 44–50. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.08.016

Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Nektarios, A., Krokida, M., Magoulas, K. (2014) Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves extracts using UHPLC-HRMS. *J food eng.* doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.10.021

- Baral, S., Pariyar, R., Kim, J., Lee, H.S., Seo, J. (2017) Quercetin-3-O-glucuronide promotes the proliferation and migration of neural stem cells. *Neurobiol Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.024
- Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R., Pogni, R. (2003) Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radic Res*. **37**(4), 405–412. doi: 10.1080/1071576031000068618
- Barros, L., Tiago Alves, C., Duenas, M., Silvac, S., Oliveirac, R., Carvalho, A.M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013) Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Ind Crops Prod*. **44**, 104–110. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.003
- Belhachat, D., Aidb, F., Mekimenea, L., Belhachat, M. (2017) Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* berries ethanolic extract growing in Algeria. *Med J Nutrition Metab*. **10**, 273–285. doi: 10.3233/MNM-17169
- Bender, C., Graziano, S., Zimmerman, B.F., Weidlich, H.H. (2014) Antioxidant potential of aqueous plant extracts assessed by the cellular antioxidant activity assay. *American Journal of Biology and Life Sciences*. **2**, 72-79.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., Kadifkova Panovska, K. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharmaco*. **2**(2), 022-028.
- Bhour, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M.B., Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2010) Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol in Vitro*. **24**, 509–515. doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.024
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem*. **114**, 355–362.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R. (2013) Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *ScientificWorldJournal*. doi: 10.1155/2013/219815

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* **56**(11), 317-333.
- Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014) *Castanea sativa* Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2014/232956
- Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C., Wai-Lee Kung, F. (2011) Microwave – assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A.* **1218**, 6213-6225. doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.040
- Chandrasekar, V., San Martin-Gonzalez, M.F., Hirst, P., Ballard, T.S. (2015) Optimizing microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from red delicious and jonathan apple pomace. *J. Food Process Eng.* **38**, 571-582. doi:10.1111/jfpe.12187
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Tanmay Basak (2013) Microwave food processing – A review. *Food Res. Int.* **52**, 243-261. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.033
- Chemat, S., Lagha, A., Amar, H. A., Chemat F. (2004) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason Sonochem.* **11**, 5-8. doi: 10.1016/S1350-4177(03)00128-7
- Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Michael, K. (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* **107**, 1120-1130. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.036
- Ciriminna, R., Carnaroglio, D., Delisi, R., Arvati, S., Tamburino, A., Pagliaro, M. (2016) Industrial feasibility of natural products extraction with microwave technology. *Chemistry Select.* **3**, 549-555. doi: 10.1002/slct.201600075
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003) Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2900–2911. doi: 10.1021/jf026187q
- 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 Crop Prod.* **61**, 31–40. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.035

- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. **15**(10), 7313-7352. doi: 10.3390/molecules15107313
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29**(3), 475–484. doi: 10.15255/CABEQ.2015.2168
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F., Stocker, P. (2007) Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol.* **224**, 801–809. doi: 10.1007/s00217-006-0361-6
- Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., 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**, 377-383.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva (Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds). *Cro J Food Sci Techn.* **2**(2), 22-33.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M. (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grapepomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crops Prod.* doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.063
- Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Režek Jambrak, A., Jukić, M. (2013) The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). *J Food Eng.* **117**, 437–42. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043
- Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J. (2007) Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. *J Nutr.* **137**, 718S–737S.
- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave assisted extraction. *J Chromatogr A.* **902**, 227–250. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00921-3



- Filip, S., Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., Zeković, Z. (2017) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from *Ocimum basilicum* by Response Surface Methodology. *Food Anal. Methods*. **10**, 2270-2280. doi: 10.1007/s12161-017-0792-7
- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J Chrom A*. **798**, 179–186. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01194-1
- Gao, M., Song, B.Z., Liu, C.Z. (2006) Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochem.Eng. J*. **32**, 79-83. doi: 10.1016/j.bej.2006.09.004
- Goncalves, S., Gomes, D., Costa, P., Romano, A. (2013) The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind Crop Prod*. **43**, 465–471. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.066
- Gonzalez-Nunez, L.N., Canizares-Macias, M.P. (2011) Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. *Food Chem*. **129**, 1819-1824. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.118
- Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci*. **1**, 8–26.
- 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. Tech*. **49**, 2158-2166. doi: 10.1111/ijfs.12526
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1081–1093. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G)
- Inglett, G.E., Rose, D.J., Chen, D., Stevenson, D.G., Biswas, A. (2010) Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) with or without microwave irradiation. *Food Chem*. **119**, 1216–1219. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.041

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**, 1821–1835. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026

Jokić, S., Cvjetko, M., Božić, Đ., Fabek, S., Toth, N., Vorkapić-Furač, J., Radojčić Redovniković, I. (2012) Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *Int. J. Food Sci. Tech.* **47**, 2613-2619. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03143.x

Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M., Saleh, N.A.M. (2000) The favonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Ecol.* **28**, 915-917.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. Advanced Review. *Wires Comput. Mol. Sci.* **2**, 128-149.

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* **64**, 923-933.

Kormin, F., Ahmed, I., Yunus, R.M., Yusof, Z.A.M. (2010) The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *Inter J Eng Technol.* **10**, 7-21. doi: 10.1.1.362.2303

Letellier, M., Budzinskui, H. (1999) Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis.* **27**, 259-270. doi: 10.1051/analisis:1999116

Li, X., Xie, H., Jiang, Q., Wei, G., Lin, L., Li, C., Ou, X., Yang, L., Xie, Y., Fu, Z., Liu, Y., Chen, D. (2017) The mechanism of (+) taxifolin's protective antioxidant effect for •OH-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Biol Lett.* **22**:31. doi: 10.1186/s11658-017-0066-9

Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem.* **15**, 731–737. doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.12.001

- Lo Presti, M., Sciarrone, D., Crupi, M.L., Costa, R., Ragusa, S., Dugo, G., Monedello, L. (2008) Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. *Flavour Fragr. J.* **23**, 249–257. doi: 10.1002/ffj.1878
- Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007) Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innov Food Sci Emerg.* **8**, 360–364. doi: 10.1016/j.ifset.2007.03.010
- 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**, 243-250. doi: 10.17113/fb.55.02.17.4687
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* **1**, 7–18.
- Marković, M., Talić, S. (2013) Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina. *Kem. Ind.* **62**, 7-12.
- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarcay, S., Perrin, D., Gerardin, P., Atmani, D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J Food Drug Anal.* **24**, 653-669. doi: 10.1016/j.jfda.2016.03.002
- Mulder, T.P.J., van Platerink, C.J., Wijnand Schuyl, P.J., van Amelsvoort, J.M.M. (2001) Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **760**, 271-279
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Act.* **703**, 8-18. doi: 10.1016/j.aca.2011.07.018
- Nahida, S., Ansari, S.H., Siddiqui, A.N. (2012) *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J Pharm Pharm Sci.* **4**(4), 16-20
- 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.081
- Osterc, G., Cunja, V., Mikulic-Petkovseka, M., Schmitzer, V., Stampar, F., Bavcon, J. (2014) Foliage identification of different autochthonous common cyclamen genotypes (*Cyclamen*

*purpurascens* Mill.) using various biochemical parameters. *Sci Hortic.* **173**, 37–44. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.034

Pan, X., Niu, G., Liu, H. (2003) Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process.* **42**, 129-33. doi: 10.1016/S0255-2701(02)00037-5

Pinheiro, P.F., Justino, G.C. (2012) Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. U: Phytochemicals—a Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health (Rao, V., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str. 33-56. doi: 10.5772/1387

Piovesan, N., Viera, V.B., Mello, R. De O., Santos, R.C.V. dos., Vaucher, R. De A., Dressler, V.L., Bizzi, C.A., Fries, L.L.M. (2017) Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) and their antioxidant and antimicrobial capacity. *International Food Research Journal.* **24**, 2526-2533.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.

Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015) Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med.* doi: 10.1016/j.eujim.2015.03.009

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003) Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medl Res Rev.* **23**(4), 519-534. doi: 10.1002/med.10033

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* **20**(7), 933-956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9

Rodriguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chaco'n Vozmediano, J.L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J Food Compos Anal.* **19**, 687–693. doi: 10.1016/j.jfca.2005.05.003

- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002) Identification and Quantification of Galloyl Derivatives, Flavonoid Glycosides and Anthocyanins in Leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem. Anal.* **13**, 79–86. doi: 10.1002/pca.627
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 595–602.
- Sanchez Gomez, P., Guemes, J. (2011) CXIV. ANACARDIACEAE. *Flora Iberica* [online] <[http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/09\\_114\\_02\\_Pistacia.pdf](http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/09_114_02_Pistacia.pdf)>, 6-13.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit Rev Food Sci.* **45**(4), 287–306. doi: 10.1080/1040869059096
- Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Pinol, C., Motilva, M.J. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879**(19), 1519-1528. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.03.042
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science.* **98**(4), 828-834.
- StatSoft, Inc. (2012) STATISTICA (data analysis software system), verzija 11.0., Tulsa, Oklahoma, SAD. < <http://www.statsoft.com/>>
- Tatke, P., Jaiswal, Y. (2011) An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Res J Med Plants.* **5**, 21–31. doi: 10.3923/rjmp.2011.21.31
- Teng, H., Lee, W.Y. (2013) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from mulberry fruits (*Morus alba* L.) using response surface methodology. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **56**, 317-324. doi: 10.1007/s13765-012-3262-3
- Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Kolhir, V.K, Baginskaya, A.I., Tjukavkina, N.A., Kolesnik, Y.A., Selivanova, I.A., Eichholz, A.A. (2000) Dihydroquercetin as a Means of Antioxidative Defence in Rats with Tetrachloromethane Hepatitis. *Phytother Res.* **14**(3), 160–162.
- Tolić, I. (2003) Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda *Pistacia*. *Šumarski list.* **9-10**, 501-507.

- Trabelsi, H., Lajnef, H.B., Arfa, K.B., Boukhchina, S. (2016) Phenolic Compounds Characterization from *Pistacia lentiscus* (lentisc) Fruit. *J Chem Pharm Res.* **8**(8), 1-8.
- Trabelsi, H., Renaud, J., Mayer, P., Boukhchina, S. (2014) Triacylglycerol and Glycerophospholipid Identification and Accumulation During Ripening of *Pistacia lentiscus* L. (Lentisc) Fruit. *J Am Oil Chem Soc.* doi: 10.1007/s11746-014-2453-y
- Trabelsi, H., Sakouhi, F., Renaud, J., Villeneuve, P., Khouja, M.L., Mayer, P., Boukhchina, S. (2012) Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (*Pistacia lentiscus*) fruits. *Eur J Lipid Sci Technol.* doi: 10.1002/ejlt.201100146
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* **2**, 1231-1246. doi:10.3390/nu2121231
- Ulasova, E., Perez, J., Hill, B.G., Bradley, W.E., Garber, D.W., Landar, A., Barnes, S., Prasain, J., Parks, D.A., Dell'Italia, L.J., Darley-USmar, V.M. (2013) Quercetin prevents left ventricular hypertrophy in the Apo E knockout mous. *Redox Biol.* **1**, 381–386. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.001
- Vaya, J., Mahmood, S. (2006) Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Bio Factors.* **28**, 169–175. doi: 10.1002/biof.5520280303
- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. (Chemat, F., Cravoto, G., ured.). Food engineering series. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media. **4**, 15–52. doi: 10.1007/978-1-4614-4830-3
- Wang, L.J., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* **17**(6), 300–312. doi: 10.1016/j.tifs.2006.12.004
- Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M.F., Akber Aisa, H., Tsao, R. (2012) Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chem.* **133**, 1292-1298. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.002
- Wyrepkowski, C.C., Maldonado Gomes da Costa, D.L., Sinhoro, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., Campaner dos Santos, L. (2014) Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem

Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules*. **19**, 16039-16057. doi:10.3390/molecules191016039

Xiao, W., Han, L., Shi, B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix astragali. *Sep Purif Technol*. **62**(3), 614–618. doi: 10.1016/j.seppur.2008.03.025

Yong, Z., Howard, L.R. (2003) Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J Agric Food Chem*. **51**, 5207-5213. doi: 10.1021/jf0302106

Yuan, B., Lu, M., Eskridge, K.M., Isom, L.D., Hanna, M.A. (2018) Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. *Food Chem*. **244**, 7–15. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.116

Zhang, H.F., Yang, X.H., Wang, Y. (2011) Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends Food Sci Tech*. **22**, 672–688. doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.003

Zitouni, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Ghembaza, N., Toul, F., AtikBekkara, F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. **8**(4), 627-633

Zulueta, A., Esteve, M.J., Frigola, A. (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*. **114**, 310-316.

Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B. (2003) Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco—a seasonal variation. *Flavour Fragr J*. **18**, 475–480. doi: 10.1002/ffj.1221

## 9. SAŽETAK

Ivan Martić i Ana Oguić

Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u izolaciji fenolnih spojeva bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i definiranje antioksidacijskog kapaciteta

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) optimizirana je s ciljem brze i učinkovite izolacije fenolnih spojeva iz bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). Da bi se utvrdio utjecaj temperature, snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola u bobici tršlje, korišten je centralni kompozitni dizajn. Uočen je porast koncentracije ukupnih fenola s povišenjem temperature i produljenjem vremena ekstrakcije, te su utvrđeni optimalni uvjeti: temperatura 75 °C, vrijeme 15 minuta i snaga mikrovalova 602 W pri čemu su izolirani fenolni spojevi u koncentraciji 41,14 mg GAE/g uzorka. Fenolni sastav ekstrakta bobica tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) određen je ultradjelotvornom tekućinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS). Ukupno su identificirana 34 spoja od kojih je 11 fenolnih kiselina i 23 flavonoida (6 flavanola, 2 flavona i 15 flavonola), pri čemu su miricetin glukuronid, miricetin rutinozid i kvercetin-3-glukozid određeni u najvišim koncentracijama. Antioksidacijski kapacitet dobivenog ekstrakta utvrđen je ORAC metodom te iznosi  $386,82 \pm 0,007$   $\mu\text{mol TE/g}$  uzorka. Na osnovu dobivenih rezultata, može se zaključiti da bobice tršlje pokazuju velik potencijal za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Ključne riječi: bobice tršlje, fenolni spojevi, UPLC-MS/MS, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ORAC



## 10. SUMMARY

Application of microwave assisted extraction in isolation of phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. berries and definition of antioxidant capacity

*Ivan Martić i Ana Oguić*

Microwave-assisted extraction (MAE) was optimized for fast and effective isolation of phenolic compounds from *Pistacia lentiscus* L. berries. Central composite design was used in order to determine the influence of temperature, microwave power and extraction time on concentration of phenolic compounds in obtained extracts. By increasing temperature and extraction time, concentration of phenolic compounds increased and the established conditions for optimal extraction were: temperature 75 °C, time 15 minutes and microwave power 602 W. Using those conditions, total phenolic concentration was 41,14 mg GAE/g sample. Phenolic profile of *Pistacia lentiscus* L. berries extract was determined using UPLC-MS/MS. A total of 34 different phenolic compounds were identified, belonging to the classes of phenolic acids (11) and flavonoids (6 flavanols, 2 flavons and 15 flavonols), with myricetin glucuronide, myricetin rutinoside and quercetin-3-glucoside in the highest concentration. Antioxidant capacity of obtained extract was  $386,82 \pm 0,007$   $\mu\text{mol TE/g}$  sample and it was determined by fluorimetry (ORAC). Based on collected results, *Pistacia lentiscus* L. berries have great potential for use in pharmaceutical and food industry.

Key words: *Pistacia lentiscus* L. berries, phenolic compounds, UPLC-MS/MS, microwave-assisted extraction (MAE), ORAC