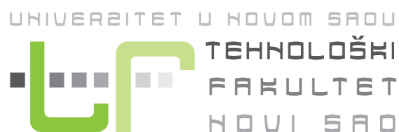


UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

Departman za primenjene i inženjerske hemije



Centar za istraživanje i razvoj funkcionalne hrane (CIDAF)



DOKTORSKA DISERTACIJA

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIONIH POSTUPAKA I
KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA KORENA GAVEZA (*Symphytum
officinale*), LISTA DUDA (*Morus nigra*) I PETELJKI TREŠNJE
(*Prunus avium*)**

Kandidat: Nataša Nastić, master inž. tehnol.

Mentor: Prof. dr Jaroslava Švarc-Gajić

Novi Sad, 2019. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nataša Nastić
Mentor: ME	Dr Jaroslava Švarc-Gajić, redovni profesor
Naslov rada: NR	Optimizacija ekstrakcionih postupaka i karakterizacija ekstrakata korena gaveza (<i>Symphytum officinale</i>), lista duda (<i>Morus nigra</i>) i peteljki trešnje (<i>Prunus avium</i>)
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Srbija, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 187 strana / 57 slika / 14 tabela / 378 literaturnih navoda / 6 priloga
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Morus nigra</i> , <i>Symphytum officinale</i> , <i>Prunus avium</i> , ekstrakcija subkritičnom vodom, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ubrzana ekstrakcija, biološki aktivna jedinjenja, tečna hromatografija, masena spektrometrija
UDK	66.061.3:[581.43+582.948.2:638.23:581.45+634.23
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	U okviru ove doktorske disertacije ispitane su i poređene različite ekstrakcione tehnike korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje. Poređene su konvencionalne i savremene ekstrakcione tehnike i izvedena je optimizacija ekstrakcionih postupaka s ciljem dobijanja ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta sa najvećom bioaktivnošću. Za svaku ekstrakcionu tehniku ispitan je uticaj najznačajnijih parametara: maceracija (rastvarač i vreme ekstrakcije), ubrzana ekstrakcija (temperatura i rastvarač), supekritična ekstrakcija (pritisak i koncentracija ko-rastvarača) i ekstrakcija subkritičnom vodom (temperatura, pritisak, vreme ekstrakcije i brzina mešanja). Ekstrakcija polifenola korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje je bila najefikasnija ekstrakcijom subkritičnom vodom. Primenjene su tehnika visokopritisne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom uz primenu različitih masenih analizatora, masenog analizatora na bazi vremena preleta jona i tandema kvadrupolnog i analizatora na bazi vremena preleta jona. Za karakterizaciju dobijenih ekstrakata instrumentalnom analizom su određene kvalitativne i kvantitativne karakteristike

dobijenih ekstrakata korena gaveza, lista crnog
duda i peteljki trešnje. HPLC-ESI-QTOF-MS/MS
analizom ekstrakata identifikovano je više od 27
novih jedinjenja različitih hemijskih klasa u
svakom od ispitivanih biljnih matriksa.

Datuma prihvatanja teme od strane

Senata:

01.12.2016.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije (ime i prezime / titula /
zvanje / naziv organizacije / status)

KO

Predsednik: dr Jelena Vladić, naučni saradnik,
Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom
Sadu;

Član, mentor: dr Jaroslava Švarc-Gajić, redovni
profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet
u Novom Sadu;

Član: dr Daniela Šojić Merkulov, vanredni
profesor, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu.

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number, ANO	
Identification number, INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TP	Textual material, printed
Contents code: CC	Doctoral disertation
Author: AU	Nataša Nastić
Mentor: ME	Dr Jaroslava Švarc-Gajić, full professor
Title: TI	Optimization of extraction techniques and characterization of comfrey root (<i>Symphytum officinale</i>), black mullberry leaves (<i>Morus nigra</i>) and sweet cherry stems (<i>Prunus avium</i>) extracts
Language of text: LT	Serbian, Latinic
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	7 chapters / 187 pages / 57 figures / 14 tables / 378 references / 6 appendices
Scientific field SF	Technological Engineering
Scientific discipline SD	Food Engineering
Subject, Key words SKW	<i>Morus nigra</i> , <i>Symphytum officinale</i> , <i>Prunus avium</i> , subcritical water extraction, supercritical fluid extraction, accelerated solvent extraction, bioactive compounds, liquid chromatography, mass spectrometry
UC	66.061.3:[581.43+582.948.2:638.23:581.45+634.23
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Within the scope of this doctoral dissertation, different extraction techniques of comfrey root, black mulberry leaves and sweet cherry stems were applied and compared. Conventional and novel extraction techniques were optimized and compared in order to obtain plant extracts with the highest content of bioactive compounds. The influence of the most important parameters was investigated for each extraction technique: maceration (solvent and extraction time), accelerated solvent extraction (temperature and solvent), supercritical fluid extraction (co-solvent percentage and pressure) and subcritical water extraction (temperature, pressure, extraction time and agitation rate). Extraction of polyphenolic compounds from comfrey root, black mulberry leaves and sweet cherry stems was the most effective using subcritical water. High-pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry techniques using time-of-flight and quadrupole-time-of-flight mass analyzers have been used to characterize bioactive compounds. Qualitative and quantitative characteristics of the obtained comfrey root, black mulberry leaves and</p>

sweet cherry stem extracts were determined. HPLC–ESI–QTOF–MS/MS revealed the presence of more than 27 compounds of different chemical classes that have been identified for the first time in the plant matrix.

Accepted on Senate on:

AS

01.12.2016.

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

President: Dr. Jelena Vladić, Research Associate, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad;

Member, mentor: Dr. Jaroslava Švarc-Gajić, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad;

Member: Dr. Daniela Šojić Merkulov, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. GAVEZ (<i>SYMPHYTUM OFFICINALE</i> L.)	5
2.2. CRNI DUD (<i>MORUS NIGRA</i> L.)	7
2.3. TREŠNJA (<i>PRUNUS AVIUM</i> L.)	8
2.4. BIOLOŠKI AKTIVNA JEDINJENJA	10
2.4.1. FENOLNA JEDINJENJA	11
2.4.2. TERPENOIDI	12
2.4.3. LIPIDI	14
2.5. EKSTRAKCIONE TEHNIKE	15
2.5.1. KONVENCIONALNE EKSTRAKCIONE TEHNIKE	16
2.5.1.1. Maceracija	16
2.5.2. NEKONVENCIONALNE EKSTRAKCIONE TEHNIKE ČVRSTIH UZORAKA	17
2.5.2.1. Ubrzana ekstrakcija	18
2.5.2.2. Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju	20
2.5.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom	25
2.5.2.3.1. Reaktivnost sub- i superkritične vode	30
2.5.2.3.2. Primena sub- i superkritične vode u valorizaciji otpada	32
2.5.2.4. Kombinovane ekstrakcione tehnike	35
2.6. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH JEDINJENJA	37
2.6.1. VISOKOPRITISNA TEČNA HROMATOGRAFIJA	37
2.6.1.1. Sistemi detekcije	38
2.6.1.1.1. UV/VIS detektori	39
2.6.1.1.2. Masena spektrometrija	40
2.6.1.1.2.1. Tehnike jonizacije	41
2.6.1.1.2.2. Maseni analizatori	45
2.6.1.1.3. Tandemska masena spektrometrija	48
2.6.1.1.4. Primena HPLC-MS analize	49
3. EKSPERIMENTALNI DEO	54
3.1. BILJNI MATERIJAL	55
3.2. HEMIKALIJE I REAGENSI	56
3.3. INSTRUMENTACIJA	56
3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE	57
3.5. EKSTRAKCIJA BILJNOG MATERIJALA	57
3.5.1. KONVENCIONALNA ČVRSTO-TEČNA EKSTRAKCIJA	57
3.5.2. UBRZANA EKSTRAKCIJA	57

3.5.3. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM UGLJENIK(IV)-OKSIDOM	58
3.5.4. EKSTRAKCIJA VODOM U SUBKRITIČNOM STANJU	59
3.6. UKUPAN PRINOS EKSTRAKCIJE	60
3.7. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA	60
3.8. HPLC-ESI-TOF-MS ANALIZA	61
3.9. HPLC-ESI-QTOF-MS/MS ANALIZA	62
4. REZULTATI I DISKUSIJA	63
4.1. SADRŽAJ VLAGE U BILJNOM MATERIJALU	64
4.2. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIONIH TEHNIKA	64
4.2.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE KORENA GAVEZA	64
4.2.1.1. Prinos ekstrakcije	64
4.2.1.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima korena gaveza	67
4.2.2. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE LISTA CRNOG DUDA	67
4.2.2.1. Prinos ekstrakcije	67
4.2.2.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista crnog duda	70
4.2.3. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE PETELJKI TREŠNJE	72
4.2.3.1. Prinos ekstrakcije	72
4.2.3.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima peteljki trešnje	74
4.2.4. SWE EKSTRAKCIJA	74
4.3. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA	78
4.3.1. HPLC-MS analiza odabranih ekstrakata korena gaveza	78
4.3.2. HPLC-MS analiza odabranih ekstrakata lista crnog duda	88
4.3.3. HPLC-ESI-TOF-MS analiza odabranih ekstrakata peteljki trešnje	102
4.4. EFIKASNOST EKSTRAKCIJE	113
4.4.1. KOREN GAVEZA	113
4.4.2. LIST CRNOG DUDA	120
4.4.3. PETELJKE TREŠNJE	127
5. ZAKLJUČCI	134
6. LITERATURA	137
7. PRILOZI	170

1. UVOD

Savremeni trendovi upućuju na sve širu primenu biljnih ekstrakata kako u farmaceutskoj industriji, tako i u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane. Dodatak biljnih ekstrakata prvenstveno ima za cilj modifikaciju senzornih, funkcionalnih i bioloških svojstava proizvoda. Funkcionalni proizvodi, pored svoje osnovne namene, ispoljavaju i određene pozitivne efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog doba. Prirodna biološki aktivna jedinjenja se sintetišu od strane velikog broja biljaka i drugih organizama, poput algi, mikroalgi, morskih organizama, itd. Najviše eksploatisan izvor prirodnih bioaktivnih jedinjenja su, ipak, biljke zbog njihove dostupnosti. Naučna istraživanja potvrđuju antioksidativno, antimikrobno i antikancerogeno dejstvo mnogih biljnih vrsta, a dokazano je da mnoga jedinjenja iz biljnih izvora imaju i povoljnu ulogu u prevenciji raka, neurodegenerativnih, metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti (Chlopčiková i dr., 2004; Lin i dr., 2016). Biološki aktivna jedinjenja biljaka su prisutna, u zavisnosti od biljne vrste, u različitim organima biljke uključujući plod, seme, koren, list i peteljke. Koren gaveza, list crnog duda i peteljke trešnje se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini zbog njihovog povoljnog zdravstvenog učinka. Koren gaveza je korišćen u lečenju preloma kostiju, povreda i za regeneraciju tkiva. Decenijama se čaj od usitnjenih listova crnog duda koristi kao antidijabetski napitak. Širom sveta peteljke trešnje se koriste u vidu čajeva i tinktura kao sedativ i diuretik. S obzirom na visoku farmakološku vrednost navedenog biljnog materijala, nameće se potreba za tehnikama efikasnog izolovanja biološki aktivnih komponenti, detaljnoj hemijskoj karakterizaciji ekstrakata i ispitivanju bioloških efekata.

Zahvaljujući novim naučnim saznanjima vezanim za mehanizme izdvajanja jedinjenja iz kompleksnih matriksa, razvijene su brže, efikasnije, bezbednije i reproduktivnije tehnike ekstrakcije. Tradicionalne tehnike ekstrakcije imaju nekoliko nedostataka, kao što su niska selektivnost, veliki utrošak vremena i organskih rastvarača, ispoljavajući negativan uticaj na životnu sredinu. Pored toga, dobijeni ekstrakti zahtevaju dodatno koncentrovanje i prečišćavanje. Imajući u vidu da su pojedina bioaktivna jedinjenja, kao što su npr. fenolne kiseline i flavonoidi, veoma osetljiva, termički nestabilna i prisutna u biljkama obično u vrlo malim količinama, tradicionalne tehnike ekstrakcije nisu najefikasnije za njihovo izolovanje. Primenom „zelenih“ tehnologija značajno se smanjuje upotreba organskih rastvarača u procesu ekstrakcije, doprinoseći bezbednosti, kvalitetu i primenjivosti ekstrakta (Švarc-Gajić, 2012). Neke od savremenih ekstrakcionih tehnika obuhvataju ubrzanu ekstrakciju, mikrotalasnu ekstrakciju, ekstrakciju superkritičnim fluidima i ekstrakciju subkritičnom vodom, dok najnapredniji pristupi podrazumevaju kombinaciju različitih mehanizama u jednom ekstrakcionom ciklusu, kao što su npr. tehnike ekstrakcije simultanom primenom ultrazvuka i mikrotalasa.

Pored efikasne ekstrakcije prirodnih bioaktivnih jedinjenja jednako je značajna i pouzdana karakterizacija hemijskih profila, odnosno identifikacija biološki aktivnih jedinjenja. Pri analizi biljnih ekstrakata, značajnu ulogu imaju napredne analitične tehnike zasnovane na tačnim i gasnim hromatografskim analizama uz primenu različitih detektora. Razvoj tačnih hromatografskih sistema sa jednim (HPLC-TOF-MS) ili više (HPLC-QTOF-MS/MS) masenih analizatora doprinosi povećanju pouzdanosti, osetljivosti i tačnosti hemijske karakterizacije prirodnih

jedinjenja. U poslednjoj deceniji uočljiv je trend snižavanja granica detekcije koje su ranije bile na nivou nanograma, dok su danas na nivou pikograma. Visokopritisna tečna hromatografija u kombinaciji sa tandemskom masenom spektrometrijom postala je prioritarna tehnika u analizi kompleksnih smeša i složenih matriksa. Usavršavanje postojećih i razvoj novih jonskih izvora, učinili su ovu tehniku primenjivom kako u analizi polarnih, tako i nepolarnih jedinjenja. Uporedo su se razvijali i maseni analizatori koji omogućavaju visoko selektivnu detekciju i identifikaciju zasnovanu na molekularnoj masi, dok se dodatne strukturne informacije mogu dobiti preko specifičnih fragmentacionih reakcija. Masena spektrometrija se zasniva na činjenici da su maseni spektri različitih jedinjenja dovoljno specifični da omogućavaju njihovu identifikaciju sa velikom verovatnoćom.

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su različite ekstrakcione tehnike izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje. Poređene su konvencionalne i savremene ekstrakcione tehnike i izvedena je optimizacija ekstrakcionih postupaka s ciljem dobijanja ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta sa najvećom bioaktivnošću. Tehnika bazirana na visokopritisnoj tečnoj hromatografiji spregnuta sa masenom spektrometrijom uz primenu različitih masenih analizatora, masenog analizatora na bazi vremena preleta jona i tandem kvadrupolnog i analizatora na bazi preleta jona, korišćena je za identifikaciju bioaktivnih jedinjenja. Instrumentalnom analizom su određene kvalitativne i kvantitativne karakteristike dobijenih ekstrakata korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje. Jedinjenja su identifikovana na bazi interpretacije njihovih MS spektara i MS/MS analize fragmentnih jona, kao i podataka objavljenih u literaturi.

2. OPŠTI DEO

2.1. Gavez (*Symphytum officinale* L.)

Gavez (*Symphytum officinale* L.) (Tabela 1) je višegodišnja polužbunasta biljka iz porodice oštrolista koja potiče iz Engleske, a samoniklo raste u Evropi i Aziji, te se uzgojem proširila na severnu Ameriku (Slika 1). Karakteriše je brz rast i rasprostranjena je u vlažnim područjima poput vlažnih livada, područja uz potoke i reke. Gavez je zeljasta biljka koja cveta od maja do jula. U tradicionalnoj medicini najčešće se koriste sirovi ili osušeni koren i listovi (Gruenwald i dr., 2004).

Tabela 1. Sistematski položaj *S. officinale*.

Carstvo	<i>Plantae</i>
Razdeo	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Familija	<i>Boraginaceae</i>
Rod	<i>Symphytum</i>
Vrsta	<i>Symphytum officinale</i>



Slika 1. *Symphytum officinale* L.

Hemijski sastav i dejstvo gaveza

Gavez se smatra lekovitom biljkom koja se preko 2000 godina koristi u narodu kao lek protiv raznih kožnih bolesti, ali i zbog svog povoljnog dejstva na regeneraciju tkiva i kosti (Jedlinszki i dr., 2017; Trifan i dr., 2018). U narodnoj medicini koren gaveza se koristi u formi tinktura i masti za opekotine, prelome, hematome, bolne zglobove, rane, čireve, reumu i giht. Oralna upotreba korena gaveza je veoma retka zbog prisustva toksičnih pirolizidinskih alkaloida. Listovi gaveza tradicionalno se koriste u vidu čajeva kod povreda, kao i kod bronhitisa i upale pluća (Bhat, 2014). Blagotvorno dejstvo gaveza se povezuje sa njegovim hemijskim komponentama, kao što su proteini i polisaharidi, alantoin, tanini, steroidni saponini, mikro- i makroelementi (kalijum, kalcijum, fosfor, gvožđe, magnezijum, sumpor, bakar, cink, selen), vitamini (A, B, B12, C i kolin), fenolne kiseline i alkaloidi (Roman i dr., 2008).

U literaturi su slabo dostupne publikacije koje opisuju detaljan hemijski profil delova gaveza, pre svega korena i lista. Od prisutnih fenolnih kiselina, u korenu gaveza su najviše zastupljene hlorogenska (0,012%), kafeinska (0,004%) i ruzmarinska (do 0,2%) (Andres, 1991; Grabias i Swiatek, 1998; Teuscher i dr., 2009). U ekstraktu korena gaveza dobijenom primenom subkritične vode ustanovljeno je prisustvo galne, protokateinske i *p*-kumarinske kiseline kao najdominantnijih komponenti, dok su identifikovane i kafeinska, ferulna, cinamična i β -rezorcilna kiselina, kao i flavonoidi, rutin, naringin i naringenin (Nastić i dr., 2018). U ekstraktima korena gaveza dobijenim primenom Soxhlet ekstrakcije, zabeleženo je prisustvo ruzmarinske, elaginske i 5-*O*-feruloilkininske kiseline, kao i prisutnost epikatehina, miricetina i katehina (Savić i dr., 2015). U studiji u kojoj su ekstrakti korena gaveza bili dobijeni primenom maceracije sa smešom etanol/voda, pored ruzmarinske i kafeinske kiseline, identifikovana je i salvianolna kiselina A, B, C i I (Trifan i dr., 2018). Smatra se da je za farmakološku aktivnost gaveza značajna ruzmarinska kiselina, estar kafeinske i 3,4-dihidroksifenil mlečna kiselina (Staiger, 2012). Ruzmarinska kiselina pokazuje kako antioksidativno, tako i antiinflamacijsko delovanje (Ito i dr., 1998; Chlopčiková i dr., 2004). Pored toga ima i svojstvo da helira metalne jone, inhibira HIV-1, a ispoljava i antihepatitičku i antitumornu aktivnost (Swarup i dr., 2007; Tepe i dr., 2007).

Duan i dr. (2018) su ispitivali i dokazali antioksidativnu i antidijabetsku aktivnost polisaharida izolovanih iz korena gaveza. Regenerativno dejstvo gaveza se vezuje za purinski heterociklični derivat, alantoin, prisutan u korenu gaveza u koncentraciji od 0,6–4,7% (Dennis i dr., 1987). Alantoin je aktivator ćelijskog rasta, podstiče regeneraciju vezivnog tkiva, kostiju i hrskavice. Studije na životinjama su pokazale smanjenje edema kod pacova pomoću korena gaveza i povećanje broja fibroblasta i kolagenskih vlakana kod lezija pacova pomoću listova gaveza (EMA/HMPC/572844/2009). Ispitivani su i antiproliferativni efekti vodenih i etanolnih ekstrakata listova gaveza, dobijenih primenom konvencionalnih tehnika ekstrakcije (Alkan i dr., 2014). Oba ekstrakta su pokazala antiproliferativnu aktivnost na 3T3 ćelijama fibroplasta Swiss albino miša. Tanini pirokateholskog tipa koje gavez sadrži (2,4%) deluju antiinflamacijsko (Staiger, 2012). Dosadašnji rezultati istraživanja gaveza i načina njegove upotrebe potvrđuju da gavez modifikuje upalni odgovor organizma, te podstiče sintezu kolagena. S druge strane, koren gaveza sadrži 0,2–0,4% toksičnih alkaloida pirolizidinske strukture, od kojih je najdominantniji likopsamin (Coulombe Jr., 2003). Prisutni su i intermedin, simfitin, simlandin i ehimidin, koji pri dužoj upotrebi ispoljavaju hepatotoksično, kancerogeno i mutageno delovanje u eksperimentima na pacovima (Mei i dr., 2010). Svi toksični pirolizidinski alkaloidi su derivati 1-hidroksimetil-1,2-dehidropirolizidina esterifikovani na položajima C1 i C7 (Stewart i Steenkamp, 2001). Kod ljudi se dugotrajna izloženost gavezu manifestuje kao veno-okluzivna bolest koju karakteriše akutno oštećenje jetre, koje se u nekim slučajevima razvija u cirozu (Prakash i dr., 1999). Zbog hepatotoksične i hepatokancerogene aktivnosti pirolizidinskih alkaloida i njihovih N-oksida, primena fitopreparata na bazi gaveza je ograničena (EMA/HMPC/572844/2009). Dermalna apsorpcija alkaloida gaveza nije izražena, te je primena preparata gaveza u formulacijama za spoljnu upotrebu, na neoštećenoj koži, bezopasna.

2.2. Crni dud (*Morus nigra* L.)

Crni dud (*Morus nigra* L.) (Tabela 2) je spororastuća listopadna drvenasta biljka koja raste u umerenim suptropskim i tropskim krajevima (Slika 2). Poreklom je iz zapadne Azije, a raste u čitavoj Evropi. Cveta u maju i junu, a sazreva u avgustu, kada se i bere. Otporan je na mrazeve i sušu, jer ima jako razvijen koren. Plodovi duda sazrevaju tokom dužeg vremenskog perioda, za razliku od drugog voća čiji plodovi sazrevaju odjednom. Na našim prostorima dud se sadi uglavnom duž puteva, po parkovima, ivicama parcela, oko vinograda, po dvorištima, itd. (Chevallier, 1996).

Tabela 2. Sistematski položaj *M. nigra*.

Carstvo	<i>Plantae</i>
Razdeo	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Rosales</i>
Familija	<i>Moraceae</i>
Rod	<i>Morus</i>
Vrsta	<i>Morus nigra</i>



Slika 2. *Morus nigra* L.

Hemijski sastav i dejstvo crnog duda

Poslednjih nekoliko godina, biljke roda *Morus* su predmet brojnih istraživanja zbog svojih višestrukih bioloških i fizioloških efekata, kao što su antimutageni, hipoglikemijski, hipotenzivni i diuretici (Song i dr., 2009). Gotovo svi delovi se primenjuju u tradicionalnoj medicini. Plod se uglavnom koristi kod upalnih procesa i za zaustavljanje krvarenja, kora protiv zubobolje, a listovi u lečenju dijabetesa, infekcija urinarnog trakta i kože (Volpato i dr., 2011). Listove crnog duda su koristile žene u menopauzi kao zamenu za konvencionalnu hormonsku terapiju (Miranda i dr., 2010). Plod crnog duda je bogat ugljenim hidratima, masnim kiselinama i vitaminima (C, E, B₂) (Imran i dr., 2010). Prisutni su i proteini, dijetetska vlakna, antocijani i druga polifenolna jedinjenja, od kojih su najzastupljenije *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska i hlorogenska kiseline (Memon i dr., 2010). U korenu crnog duda identifikovani su moracin N,

kuvanon H, mulberofuran G, morahalkon A, oksirezveratrol-3'-*O*- β -D-glukopiranozid i oksirezveratrol-2-*O*- β -D-glukopiranozid, povezani sa inhibitornim delovanjem na tirozinazu (Zheng i dr., 2010). U ekstraktima lista duda dobijenim primenom ultrazvučnog tretmana i smeše metanol/voda, identifikovane su fenolne kiseline jakog antioksidativnog dejstva (Memon i dr., 2010). Dominantne su bile vanilinska, hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva, siringinska, *p*-kumarinska i *m*-kumarinska kiseline. U drugoj studiji u vodeno-alkoholnom ekstraktu lista *M. nigra* ustanovljeno je prisustvo kafeoilkininske, kininske i kafeinske kiseline, derivata kvercetina i kaempferola, i dr. (Sánchez-Salcedo i dr., 2016). Takođe je zabeleženo i prisustvo galne, protokatehinske, kafeinske, hlorogenske, β -rezorcilne i *p*-kumarinske kiseline. U ekstraktima lista duda dobijenim primenom ekstrakcije subkritičnom vodom (Nastić i dr., 2018), pored navedenih jedinjenja detektovani su i rutin, katehin, epikatehin i naringin. U etanolnom ekstraktu lista crnog duda, De Freitas i dr. (2015) identifikovali su hlorogensku kiselinu, rutin i izokvercetin. Navodi se da list *M. nigra* sadrži i zasićene i nezasićene masne kiseline, gde su palmitinska, linolna i linolenska kiselina najdominantnije (Radojković, 2012). Prisustvo n-3 i n-6 masnih kiselina ukazuje na potencijalnu antiinflamacijsku, antitrombotičnu, antiaritmiju, hipolipidemičnu i vazodilatatornu aktivnost duda (Simopoulos, 1999). Smatra se da su n-3 masne kiseline efikasne u prevenciji bolesti srca, hipertenzije, dijabetesa tipa 2, reumatoidnog artritisa, ulcerativnog kolitisa i hronično opstruktivne plućne bolesti (Iso i dr., 2002; Tapiero i dr., 2002). Pored toga, u etanolnom ekstraktu lista duda dokazano je prisustvo makro- i mikroelemenata od kojih su najzastupljeniji bili kalcijum, magnezijum, gvožđe, bor, cink, bakar i mangan (Radojković, 2012). U listu crnog duda identifikovani su i germanikol, betulinska kiselina i β -sitosterol koji pripadaju klasi triterpena i steroida, potencijalno odgovornih za antiinflamacijsku aktivnost (Padilha i dr., 2010). Antiinflamacijska svojstva betulina dokazana su na eksperimentalnim modelima karagenan- i serotonin-indukovane upale šapa i ušiju kod miševa (Del Carmen Recio i dr., 1995; Mukherjee i dr., 1997). Dokazano je i da β -sitosterol poseduje antiinflamacijska aktivnost, sličnu aktivnosti hidrokortizona kada se daje intraperitonealno (Gupta i dr., 1980).

2.3. Trešnja (*Prunus avium* L.)

Trešnja (*Prunus avium* L.) (Tabela 3) je visoko listopadno drvo (preko 10 m), koje pripada porodici ruža (*Rosaceae*) (Slika 3). Divlja trešnja raste u mešovitim brdskim šumama u Evropi, zapadnoj Aziji i Severnoj Africi. U 8. veku pre nove ere trešnja je kultivisana na području današnje Turske i Grčke. Danas se širom sveta u područjima umerene klime uzgajaju mnogobrojne sorte (oko 2000) trešanja. Trešnja je mezofilna vrsta, raste na dubokom, plodnom i rastresitom zemljištu. Privredni značaj trešnje se prvenstveno ogleda u velikoj upotrebnoj vrednosti njenih plodova. Tehnološke osobine plodova trešnje, u prvom redu zavise od sorte, a zatim i od stepena zrelosti i vremenskih prilika koje su vladale u periodu sazrevanja plodova. Kao jedno od sortnih svojstava trešnje navodi se dužina peteljke koja predstavlja osnov za pravilnu determinaciju sorte (Mitrović, 1982). Poslednjih godina, osim plodova, sve veći značaj dobijaju i peteljke i listovi trešnje, kao industrijski otpad bogat biološki aktivnim jedinjenjima.

Tabela 3. Sistematski položaj *P. avium*.

Carstvo	<i>Plantae</i>
Razdeo	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Rosopsida</i>
Red	<i>Rosales</i>
Familija	<i>Rosaceae</i>
Rod	<i>Prunus</i>
Vrsta	<i>Prunus avium</i>

Slika 3. *Prunus avium* L.

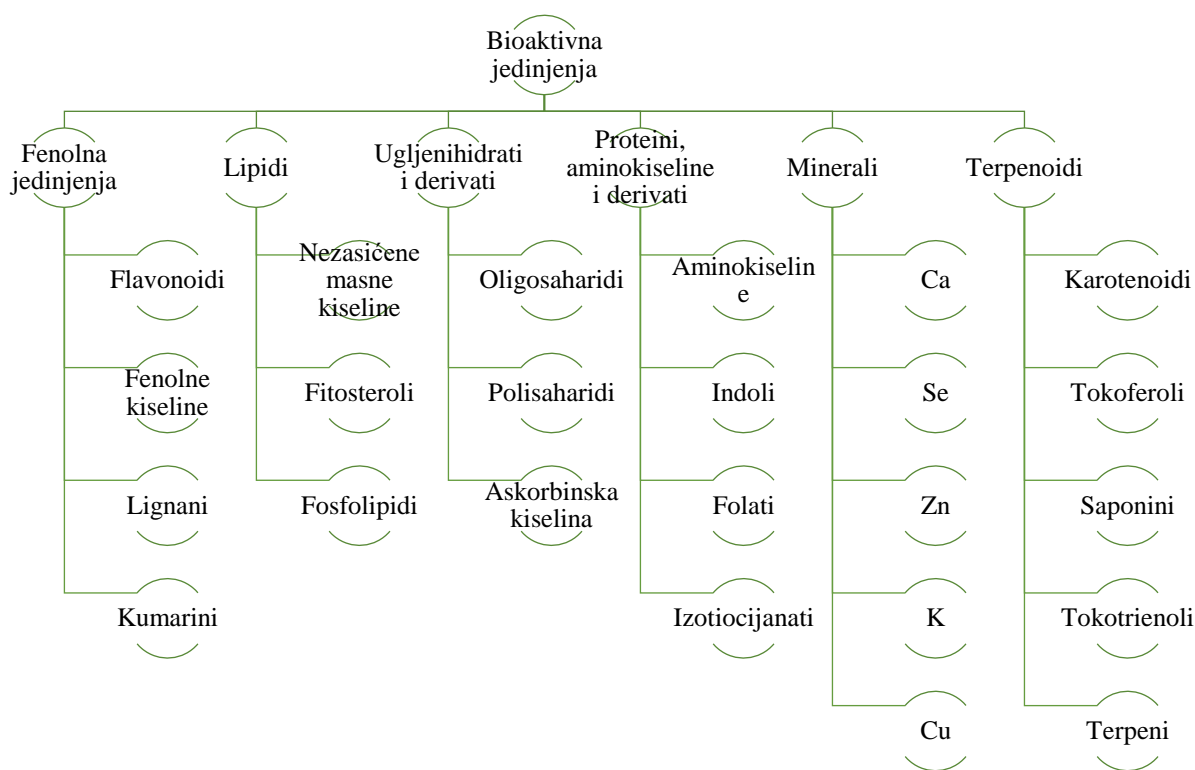
Hemijski sastav i dejstvo trešnje

Plod trešnje karakteriše atraktivan izgled, čvrstina, visoka nutritivna vrednost i bogat sladak ukus (Bastos i dr., 2015) zbog čega se uglavnom konzumira kao sveže voće. Manji deo se prerađuje u voćne sokove, džemove, mermeladu ili kompot. Plod trešnje je najbogatiji ugljenim hidratima (glukoza, fruktoza, saharoza) i organskim kiselinama (jabučna, limunska, mlečna, oksalna kiselina) (Usenik i dr., 2008; Pacifico i dr., 2014). Trešnja je takođe i dobar izvor vitamina A i C, minerala i flavonoida, a bogata je pigmentima ksantofilom, luteinom i zeaksantinom (Yigit i dr., 2009; Schmitz-Eiberger i Blanke, 2012). Sadržaj i sastav polifenolnih jedinjenja u plodu, posebno antocijana, varira između sorti (Usenik i dr., 2008.), a pod uticajem je i faktora spoljne sredine kao što su svetlost, temperatura i uslovi kultivacije (Wani i dr., 2014). Antocijani trešnje usporavaju razvoj kardiovaskularnih bolesti i proces starenja (Kong i dr., 2003). Neki od ostalih flavonoida identifikovanih u plodu trešnje su rutin, kvercetin, kampferol, katehin, epikatehin i fenolne kiseline (hlorogenska i neohlorogenska) (Casagrande i Darbon, 2001). Istraživanja su pokazala da trešnje povoljno deluju kod dijabetesa tako što snižavaju nivo šećera u krvi. Osim toga, snižavaju nivo holesterola u lipoproteinima male gustine (*eng.* Low-density Lipoprotein, LDL) i doprinose prevenciji karcinoma debelog creva (Song i dr., 2016). Koštice trešanja predstavljaju nusproizvod koji ima veliki sadržaj esencijalnih masnih kiselina, posebno linolne i oleinske. Osim masnih kiselina, u sastav koštica trešnje ulaze i karotenoidi, fitosteroli te vrlo važan antioksidant skvalen. Ova jedinjenja imaju značajan potencijal primene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Górnaš i dr., 2016). Koštica trešnje takođe sadrži tokoferole, vlakna i fenolna jedinjenja, ali i toksične cijanogene glikozide (E Santos i dr., 2014). Čaj od peteljki trešanja se koristi u

alternativnoj medicini protiv upale mokraćnih puteva, bolesti jetre i žuči, i u tretmanu gastrointestinalnih tegoba, edema i hipertenzije (Hooman i dr., 2009). U jednoj studiji ispitivan je diuretički efekat peteljki trešanja u prahu na 13 zdravih ispitanika kod kojih je zapaženo povećanje volumena urina (Hooman i dr., 2009). Neka od istraživanja upućuju i na antimikrobna svojstva ekstrakta peteljki trešnje. Ekstrakti dobijeni primenom etil-acetata kao rastvarača pokazale su znatno veće antimikrobno delovanje u odnosu na ekstrakte koji su dobijeni pomoću nekih drugih rastvarača (Radovanović i dr., 2013). Iako su peteljke trešnje poznate u tradicionalnoj medicini, jako je malo podataka u literaturi o njihovom fitohemijskom sastavu. Bursal i dr. (2013) su određivali sadržaj fenolnih jedinjenja u ovom biljnom otpadu, dok su se Bastos i dr. (2015) bavili detaljnijom karakterizacijom peteljki trešnje određujući slobodne šećere, organske kiseline, masne kiseline i tokoferole. Peteljke trešnje obiluju taninima, organskim kiselinama, flavonoidima, šećerima i mineralima. U studiji koju su izveli Švarc-Gajić i dr. (2018), ekstrakti dobijeni primenom subkritične vode su karakterisani gasno-masenom hromatografijom nakon primene optimizovanog protokola za DLLME (disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija) uz istovremenu derivatizaciju. Definisani protokol omogućio je identifikaciju različitih klasa jedinjenja. Ekstrakti su bili bogati organskim i fenolnim kiselinama, aldehidima, masnim kiselinama i proizvodima razgradnje lignina.

2.4. Biološki aktivna jedinjenja

Biološki aktivna jedinjenja se mogu definisati kao skup prirodnih i/ili sintetskih esencijalnih i neesencijalnih supstanci, koje utiču na različite funkcije u ljudskom i životinjskom organizmu. Prirodna organska bioaktivna jedinjenja mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobnog porekla. Biljni svet, kao najznačajniji resurs biološki aktivnih jedinjenja, predmet je ispitivanja mnogih naučnih oblasti. Ispitivanje biološke aktivnosti i hemijska karakterizacija do sada neispitanih biljnih vrsta su od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa, jer vode ka novim izvorima biološki aktivnih jedinjenja koji postaju modeli savremenih farmaceutika. Blagotvorno dejstvo biljaka na zdravlje ljudi pripisano je raznovrsnim jedinjenjima različite strukture i biološke aktivnosti (Slika 4), od kojih su najispitaniji polifenolna jedinjenja, terpenoidi, proteini, itd.



Slika 4. Bioaktivna jedinjenja biljaka.

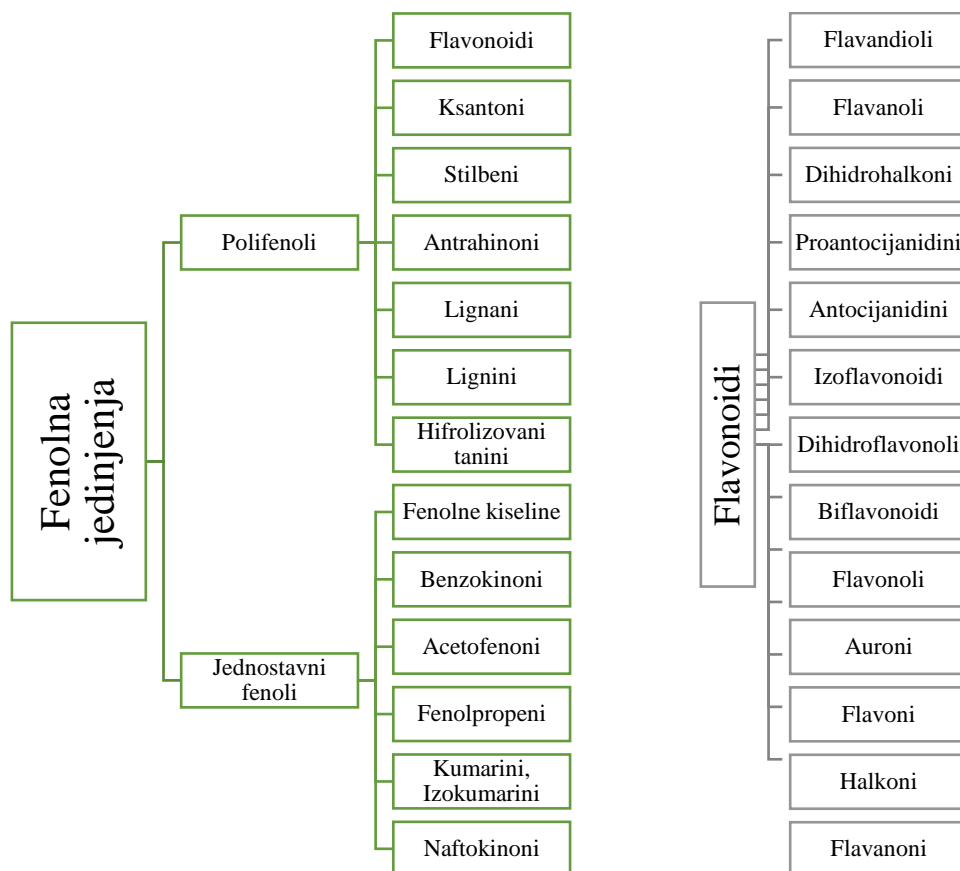
2.4.1. Fenolna jedinjenja

Sekundarni metaboliti biljaka su jedinjenja niske molekulske mase koja nisu neophodna za opstanak biljke, ali vrše važne funkcije unutar iste. Fenolna jedinjenja čine jednu od glavnih grupa sekundarnih metabolita biljaka i obuhvataju širok spektar jedinjenja, od najjednostavnijih, kao što su fenolne kiseline, do visoko polimerizovanih komponenata, kao što su tanini (Lin i dr., 2016). Biljke ih sintetišu tokom svog normalnog razvoja, a mogu imati različite funkcije, kao što je privlačenje insekata radi oprašivanja ili zaštita od patogena (fitoaleksini). Prirodna fenolna jedinjenja takođe učestvuju u mehanizmima zaštite od UV zračenja, u procesima rasta i reprodukcije, pružaju zaštitu od predatora, a doprinose i pigmentaciji biljke, između ostalog. Sadržaj ovih jedinjenja pod određenim stresnim uslovima se može povećati u biljci, na primer usled infekcije patogenom ili parazitom, izloženosti visokim temperaturama i suši, atmosferskom zagađenju ili UV zračenju. Osim toga, drugi faktori kao što su tehnika kultivacije, uslovi uzgoja, proces sazrevanja, kao i uslovi prerade i skladištenja mogu uticati na sadržaj ovih jedinjenja u biljkama (Wani i dr., 2014).

Fenolna jedinjenja se u biljci mogu naći u slobodnom obliku, ali najčešće su u konjugovanoj formi, odnosno u obliku glikozida sa različitim šećernim ostacima ili u obliku kompleksa sa organskim kiselinama, aminima, lipidima, ugljenim hidratima i drugim polifenolnim jedinjenjima. Iako je glukoza šećer koji se najviše jedini sa polifenolima, u biljkama su prisutni i glikozidi

galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukuronska i galakturonska kiseline (Borrás Linares, 2013).

Fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati na osnovu njihove hemijske strukture (Slika 5).



Slika 5. Klasifikacija fenolnih jedinjenja na osnovu njihove hemijske strukture.

2.4.2. Terpenoidi

Terpenoidi su velika grupa sekundarnih metabolita prisutnih u mnogim živim organizmima. Oni imaju raznovrsnu hemijsku strukturu i biološku aktivnost. Terpeni pripadaju klasi izoprenoida, jedinjenja lipofilnog karaktera, čije se strukture mogu izvesti primenom tzv. „izoprenskog pravila“ koje je postavio Wallach, po kojem se struktura svih terpenoida može izvesti „glava–rep“ vezivanjem izoprenskih, C5-jedinica (Wallach, 1914). U zavisnosti od broja izoprenskih jedinica, dele se na hemi- (C5), mono- (C10), seskvi- (C15), di- (C20), sester- (C15), tri-(C30) i tetraterpene (C40) (Slika 6).

Hemiterpeni	• tiglinska, angelinska kiselina i dr.
Monoterpeni	• mircen, ocimen, citronelal, citronelol, geraniol, nerol, linalol, citral, limonen, terpinolen, α -terinolen, γ -terpinen, α - i β -felandren, α -tujen, sabinen, δ -3-karen, α -pinen, kamfor, β -pinen, borneol i dr.
Seskviterpeni i derivati	• farnezol, nerolidol, humulen, germakren, kariofilen, azulen, gvajol, β -selinen, kadalen, kadinen, kedren, kedrol, seskviterpenske laktini: artemizin, santonin, partenolid, alantolaktonin, helanalin i dr.
Diterpeni i derivati	• geranilgeraniol, geranillinalol, fitol, abietinska kiselina, podokarpna kiselina, filokladen, kauren, steviol, kafestol, diterpeni mikrobiološkog porekla (giberelini) i dr.
Sesterpeni	• geranilfarnezol, geranilnerolidol, opiobolin, gaskardinska kiselina i dr.
Triterpeni, steroidi i derivati	• triterpeni - skvalen, ambrein, onocerin, lanosterol, oleanolna kiselina, β -amirin, α -amirin, cerin, fusidinska kiselina i dr. • steroidi - fitosteroli, sapogenini, steroidni alkaloidi, aglikoni kardiotioničnih heterozida i dr.
Tetraterpeni i derivati	• karotenoidi, biksin, kapsantnin, kapsorubin, krocetin, krocin, fukoksantin i dr.

Slika 6. Klasifikacija terpena na osnovu broja izoprenskih jedinica.

Monoterpeni su isparljiva jedinjenja i glavni su konstituenti etarskih ulja (Pichersky i Gershenzon, 2002). U prirodi ova jedinjenja predstavljaju integralni deo odbrambenog mehanizma biljke od patogena. Monoterpeni, kamfor, pinen, cineol, poznati su po svom antimikrobnom, hipotenzivnom, antiinflamacijskom, anti-pruritičnom, antiplazmodialnom i antikandidalnom delovanju, zbog čega se upotrebljavaju u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Mahmoud i Croteau, 2002). Seskviterpenske laktone se nalaze u mnogim lekovitim biljkama gde nastaju kao odgovor na napade mikroorganizama. Isparljivi seskviterpeni ulaze u sastav etarskih ulja, dok neisparljivi imaju izrazitu farmakološku aktivnost (Ahmed i Abdelgaeil, 2005; Saroglou i dr., 2005). Diterpeni izolovani iz različitih biljnih vrsta pokazuju antioksidativnu, antikoagulantnu, antihipertenzivnu, antifibrotičnu i antivirusnu aktivnost (Topču i Gören, 2007). Uloga diterpena je često insekticidna ili repelentna. Ostali diterpeni, kao što su giberelini, su značajni biljni hormoni koji utiču na regulaciju rasta.

Tokoferoli i tokotrienoli su izomeri vitamina E koji se u prirodi nalaze u četiri oblika (α , β , γ , δ). Sintetišu ih biljke i drugi fotosintetski organizmi, a razlikuju se po biološkoj raspoloživosti, fiziološkim i hemijskim osobinama. Veoma važne biološke uloge tokoferola su sposobnost hvatanja lipidnih peroksil-radikala, kao i prekidanje ili zaustavljanje lančane reakcije peroksidacije lipida (Wolf i dr., 1998). Zbog veoma izraženog antioksidativnog dejstva, smatra se da je uticaj α -tokoferola u sprečavanju hroničnih bolesti neosporan (Kumar i dr., 2009). Nasuprot α -tokoferolu, γ -tokoferol je snažan nukleofil koji uklanja elektrofilne mutagene u lipofilnim delovima ćelija štiteći ih od raznih oštećenja (Brigelius-Flohe i Traber, 1999).

Saponini su glikozidi velike molekulske mase, koji se sastoje iz šećera povezanog sa triterpenom ili steroidnim aglikonom. Šećerni deo uglavnom čine galaktoza, glukoza, glukuronska kiselina, metilpentoza, ksiloza i/ili ramnoza. U biljkama se saponini najčešće nalaze u obliku triterpenskih saponina. Relativno visoka koncentracija saponina u biljkama, oko 30%, ukazuje na činjenicu da imaju karakter depoa. Saponini poseduju brojna biološka svojstva, kao što su antiinflamacijska (Sirtori, 2001; Wei i dr., 2004), anti-HIV-1 proteazna (Yang i dr., 1999) i citotoksična aktivnost (Fu i dr., 2006). Nedavne studije su pokazale da saponini mogu preventivno da utiču na pojavu kardiovaskularnih bolesti (Jimenez-Ramos i Chavez-Santoscoy, 2016; Singh i Chaudhuri, 2018).

Karotenoidi su široko rasprostranjena grupa biljnih pigmenata rastvorljivih u mastima. Sastavljeni od osam izoprenskih jedinica, a podeljeni su u dve strukturne grupe: karotene i ksantofile. Ksantofili u svom sastavu pored ugljenika i vodonika imaju i kiseonik i to najčešće u keto ili hidroksi formi (lutein, zeaksantin). Brojne epidemiološke studije su utvrdile da je unos hrane bogate karotenoidima u korelaciji sa smanjenim rizikom od nekoliko degenerativnih poremećaja, uključujući razna kardiovaskularna i oftalmološka oboljenja (Mayne, 1996). Preventivni efekti karotenoida su povezani sa njihovom antioksidativnom aktivnošću, delujući na aktivne kiseonične vrste, deaktivirajući ih i sprečavajući da formiraju nove radikale (Shahidi i Zhong, 2005). Ustanovljeno je da β -karoten smanjuje rizik od određenih vrsta kancera i efektivno deluje u prevenciji koronarnih oboljenja (Mayne, 1996).

2.4.3. Lipidi

Lipidi predstavljaju rezervne energetske materije u biljkama neophodne za rast, reprodukciju i kretanje. Za čoveka oni predstavljaju izvor liposolubilnih vitamina, esencijalnih masnih kiselina i raznih mikro komponenata, a imaju i određene fiziološke i biohemijske funkcije (modulatori ćelijskih odgovora i gena) (Leonarduzzi i dr., 2000). Do sada je poznato više različitih aktivnosti lipida kao što su antioksidativna (Ponphaiboon i dr., 2018), antimikrobna (Radulović i dr., 2011), antiaterogena (Orehov i Panossian, 1994) i neuroprotektivna (Wang i dr., 2018). Mnogobrojna *in vitro* istraživanja su potvrdila pozitivan efekat određenih lipida na sprečavanje razvoja raka dojke i prostate, metabolizam lipoproteina, i razvoj kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti i artritisa (Rubba i Iannuzzi, 2001; Serini i dr., 2018). Studije uticaja polinezasićenih masnih kiselina na različite patološke promene su pokazale antipsoriatički, antidijabetski i antiinflamacijski efekat (posebno u lečenju upale zglobova), kao i veoma pozitivan zaštitni efekat na kožu (Dogra i dr., 2018). *In vivo* ispitivanjima je utvrđeno da *cis*-nezasićene masne kiseline, kao što su linolna, α -linolenska i oleinska kiselina, snižavaju koncentraciju LDL holesterola i triglicerida u plazmi, pri čemu pokazuju neznatan efekat na koncentraciju holesterola u lipoproteinima velike gustine (*eng.* High-density Lipoprotein, HDL) (Hornstra, 1999).

Fosfolipidi su po hemijskom sastavu diestri fosforne kiseline sa aminoalkoholima ili sa polialkoholima. Fosforna kiselina esterifikovana je derivatom glicerola (najčešće diacilglicerolom), ili sa holinom, etanolaminom ili serinom. Fosfolipidi imaju niz veoma važnih

funkcija u organizmu, posebno u transferu masnih kiselina i proteina u plazmi (Vance i Vance, 2002). Studije su pokazale da fosfolipidi deluju kao antioksidanti, ispoljavaju sinergizam sa tokoferolima i fenolnim komponentama, utiču na poboljšanje funkcija memorije i imunoloških funkcija organizma (Hidalgo i dr., 2005; Zhou i dr., 2018).

Biljni steroli (fitosteroli) predstavljaju esencijalne sastojke biljnih ćelijskih membrana. Najčešća klasifikacija fitosterola je prema položaju dvostruke veze u jezgru sterola ($\Delta 5$ -steroli i $\Delta 7$ -steroli). Većina biljaka sadrži $\Delta 5$ -fitosterole, a najzastupljeniji su kampesterol, stigmasterol i sitosterol, dok su predstavnici $\Delta 7$ -sterola, $\Delta 7$ -avenasterol, $\Delta 7$ -kampesterol, $\Delta 7$ -sitosterol, $\Delta 7$ -spinasterol i $\Delta 7$ -stigmasterol (Cossignani i dr., 2018; Moreau i dr., 2018). U biljkama se fitosteroli nalaze u formi sterol-estara (uglavnom sa masnim kiselinama), kao sterol-glikozidi i acilovani sterol-glikozidi. Mnogobrojnim objavljenim studijama je potvrđeno da fitosteroli pozitivno utiču na snižavanje ukupnog i LDL holesterola, krvnog pritiska, i povoljno deluju u prevenciji raka debelog creva, dojki i raka prostate (Awad i Fink, 2000; Trautwein i Demonty, 2007; Moreau i dr., 2018).

2.5. Ekstrakcione tehnike

Izolovanje, razdvajanje i identifikacija bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora predstavlja vrlo složen zadatak. Efikasno izdvajanje, odnosno ekstrakcija predstavlja prvi korak u identifikaciji ciljnih jedinjenja. U osnovi, svi ekstrakcioni postupci imaju za cilj da selektivno ekstrahuju ciljna bioaktivna jedinjenja. U vezi sa tim, objavljene su brojne studije o primeni različitih ekstrakcionih tehnika za izolovanje različitih klasa biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (terpeni, vitamini, karotenoidi, masne kiseline i dr.). Pri projektovanju procesa za izolovanje bioaktivnih jedinjenja ključni faktori su prinos ekstrakcije, selektivnost i stabilnost ciljnih jedinjenja (Ivanović, 2011). Prinos ekstrakcije je direktno povezan sa ekonomskom održivošću odabranog industrijskog procesa, dok se selektivnost odražava na kvalitet i čistoću željenog finalnog proizvoda.

Na efikasnost i selektivnost procesa ekstrakcije u najvećoj meri utiču priroda biljnog materijala, rastvarač, temperatura, pritisak, vreme i pH, kao i fizičko-hemijska svojstva samih ciljnih jedinjenja (Švarc-Gajić, 2012). Heterogenost uzoraka predstavlja problem ne samo u analitičkom postupku, već i pri projektovanju industrijskih procesa. Efekti matriksa značajno utiču na efikasnost ekstrakcije i spadaju u najmanje razjašnjene fenomene u ovim procesima. Analiti dobro rastvorni u primenjenom rastvaraču mogu biti zarobljeni u matriksu uzorka različitim mehanizmima, što negativno utiče na efikasnost ekstrakcije. Ovi fenomeni objašnjavaju različitu efikasnost ekstrakcije istog analit/rastvarač sistema u različitim uzorcima. Zbog kompleksnosti matriksa uzoraka, analitički postupak gotovo uvek obuhvata i korak prečišćavanja, što dodatno otežava razvoj analitičke metode, a i poskupljuje sam industrijski proces čiji je osnovni cilj skraćanje vremena obrade biljnog materijala i ušteda energije (Švarc-Gajić, 2012).

2.5.1. Konvencionalne ekstrakcione tehnike

Iako je fokus savremenih istraživanja usmeren ka razvoju novih ekstrakcionih tehnika, i dalje su u industrijskim uslovima najzasupljenije konvencionalne ekstrakcione tehnike. Prisutne su brojne konvencionalne ekstrakcione tehnike koje se mogu primeniti za izolovanje biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala, kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i hidrodestilacija. Prilikom odabira odgovarajuće ekstrakcione tehnike potrebno je voditi računa o toksičnosti rastvarača i selektivnosti procesa, kao i o mogućnostima degradacije bioaktivnih jedinjenja (Ivanović, 2011). Konvencionalne ekstrakcione tehnike karakteriše veliki utrošak biljnog materijala i organskih rastvarača, nedovoljna selektivnost organskih rastvarača i dugo vreme ekstrakcije, čineći ove procese nepogodnim sa aspekta održivog razvoja. Značaj konvencionalnih ekstrakcionih tehnika se ogleda u implementaciji novih procesa, služeći kao referentne tehnike u odnosu na koje se procenjuju prednosti novouvedenih tehnologija.

2.5.1.1. Maceracija

Konvencionalna čvrsto-tečna ekstrakcija se često naziva i maceracija, a podrazumeva difuzioni proces tokom kojeg jedna ili više komponenata, na osnovu razlike u rastvorljivosti i raspodeli, prelazi iz čvrstog materijala u tečni rastvarač. Čvrst porozan materijal se dovodi u kontakt sa tečnim rastvaračem na sobnoj temperaturi, pri čemu rastvarač prodire u pore čvrstog materijala. U opštem slučaju, maceracija se sastoji od tri odvojena procesa:

- 1) desorpcija analita, odnosno raskidanje veza analita sa komponentama matriksa,
- 2) difuzija analita kroz pore čvrstog matriksa sve do dostizanja granične površine matriks/rastvarač i
- 3) solvatacija analita odnosno difuzija rastvorene komponente u rastvarač.

Interakcija rastvarača sa čvrstim biljnim materijalom zavisi od niza faktora kao što su oblik i veličina čestica, hemijski sastav matriksa uzorka, njegova unutrašnja struktura, kao i veličina, odnosno, oblik pora materijala. Usitnjavanjem uzorka obezbeđuje se brži transfer mase usled povećanja specifične površine biljnog materijala. Previše mali srednji prečnik čestica biljnog materijala može dovesti do otežanog razdvajanja čvrste i tečne faze nakon ekstrakcije. Dozvoljeni udeo sitnih čestica prečnika manjeg od 0,5 mm je do 10%. Sušenje biljnog materijala je takođe važno jer dolazi do narušavanja ćelijske strukture čime se obezbeđuje bolji kontakt rastvarača sa sadržajem ćelije. Pri određivanju lako isparljivih jedinjenja, uzorci se suše bezvodnim natrijum-sulfatom, zbog rizika od njihovog gubitka.

Uticaj parametara ekstrakcije

Na proces maceracije utiče nekoliko parametara kao što su osobine rastvarača, odnos droga/rastvarač, vreme ekstrakcije, veličina čestica, sadržaj vlage u materijalu, kao i kontakt rastvarača sa matriksom uzorka. Optimizacija vremena ekstrakcije, odnosa droga/rastvarač i vrste rastvarača, kao najbitnijih parametara, predstavlja ključni korak procesa ekstrakcije.

Vrsta rastvarača direktno utiče na selektivnost ekstrakcije, a prema tome i na hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi u najvećoj meri od hemijske prirode ciljnih komponenata. Polarne supstance, sa visokim vrednostima dielektrične konstante (ϵ), dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obrnuto. Od polarnih rastvarača, najčešće se koriste voda, metanol, etanol, i njihove smeše, a od nepolarnih *n*-heksan, petroletar, dietiletar, benzen i dr. Nedostaci primene organskih rastvarača su njihova toksičnost i zaostajanje u ekstraktu, što ograničava njihovu dalju primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Xia i sar., 2010).

Pored rastvarača, odnos droga/rastvarač predstavlja bitan faktor u procesu maceracije, jer utiče na koncentracioni gradijent, osnovnu pogonsku silu procesa ekstrakcije. Smatra se da koncentracioni gradijent raste sa povećanjem odnosa droga/rastvarač, što rezultira povećanjem brzine difuzije. Pored toga, odnos droga/rastvarač utiče na aktivitet komponenti (Frank i dr., 1999). Aktivitet je takođe uslovljen i interakcijom komponenata koje se ekstrahuju (Tan i dr., 2011). Prema nekim autorima, veća količina rastvarača povećava efikasnost i prinos ekstrakcije (Bucić-Kojić i dr., 2007; Iličković i dr., 2012).

Vreme ekstrakcije predstavlja bitan faktor koji je potrebno pažljivo optimizovati. Kako proces maceracije određuju opšti zakoni prenosa mase, duže vreme ekstrakcije obezbeđuje duži kontakt rastvarača i uzorka, efikasniji prenos materije, a samim tim i viši prinos ekstrakcije. S druge strane, skraćenje procesa ekstrakcije ima niz praktičnih prednosti, među kojima je i ekonomski aspekt. Stoga, različiti aspekti se moraju uzeti u obzir prilikom optimizacije procesa maceracije s ciljem postizanja maksimalnog kvaliteta ekstrakta uz racionalizaciju postupka.

2.5.2. Nekonvencionalne ekstrakcione tehnike čvrstih uzoraka

Konvencionalne tehnike ekstrakcije se najčešće izvode upotrebom velikih količina rastvarača koji nisu dovoljno selektivni, tako da se u biljnim ekstraktima pored ciljnih komponenata nalaze i smole, masne komponente, pigmenti i druge interferirajuće komponente. Iz ekstrakta se rastvarač uklanja uparavanjem, ali u krajnjem proizvodu ipak postoji mogućnost zaostajanja u tragovima. Organski rastvarači čak i u tragovima štetno deluje na ljudski organizam, čime se ograničava upotreba ekstrakata dobijenih primenom konvencionalnih ekstrakcionih tehnika u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji (Tiwari, 2015). Nedostaci konvencionalnih ekstrakcionih tehnika su i dugo vreme trajanja procesa, velike količine polaznog materijala, mali prinos, nedovoljna selektivnost i potreba za naknadnim prečišćavanjem. Pored toga česta degradacija termolabilnih jedinjenja uzrokuje nepoželjne gubitke.

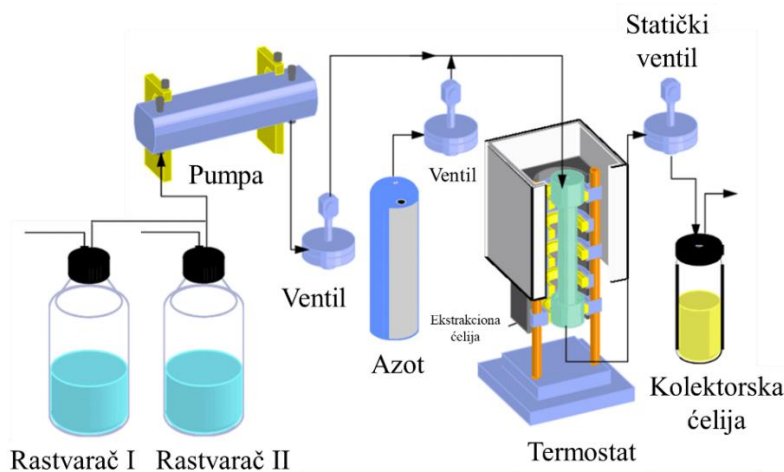
Poslednjih decenija razvijaju se nove tehnologije pripreme biljnih ekstrakata na industrijskom nivou, kao što su membranske tehnologije, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* Ultrasound-Assisted Extraction, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima (*eng.* Microwave-Assisted Extraction, MAE), ubrzana ekstrakcija (*eng.* Accelerated Solvent Extraction, ASE), ekstrakcija fluidima u superkričnom stanju (*eng.* Supercritical Fluid Extraction, SFE), te ekstrakcija vodom u subkričnom stanju (*eng.* Subcritical Water Extraction, SWE). Razvoj

ekološki prihvatljivih tehnologija za eksploataciju biljnog potencijala ima značajne prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije, a podrazumeva smanjenje ili eliminaciju upotrebe organskih rastvarača, izbegavanje potrebe za dodatnim prečišćavanjem i koncentrovanjem, kao i mogućnost automatizacije.

2.5.2.1. Ubrzana ekstrakcija

Ubrzana ekstrakcija se zasniva na ekstrakciji pri povišenoj temperaturi i pritisku kako bi se rastvarač zadržao u tečnom stanju. Za ovu tehniku koriste se i drugi nazivi kao što su ubrzana ekstrakcija rastvaračem, ekstrakcija fluidima pod pritiskom, ekstrakcija rastvaračima na povišenom pritisku, ekstrakcija rastvaračima na povišenim pritiscima i temperaturama.

Ubrzana ekstrakcija se izvodi na temperaturama od 40 do 200 °C i pritiscima od 5 do 200 bar u statičkom ili dinamičkom režimu (Slika 7).



Slika 7. Šematski prikaz sistema za ubrzanu ekstrakciju.

Sistem za ubrzanu ekstrakciju se sastoji od rezervoara za rastvarače, pumpe, boce sa azotom, ekstrakcione ćelije smeštene u termostatu i kolektorske ćelije. Osnovni operativni koraci kod ubrzane ekstrakcije podrazumevaju predgrevanje, ekstrakciju i provođenje azota radi kvantitativnog odvajanja ekstrakta. Čvrst uzorak se smešta u ekstrakcionu ćeliju. Pojedinačni rastvarači se pumpama dovode iz različitih rezervoara u mešač pre punjenja ekstrakcione ćelije. Često se radi smanjenja uticaja vlage uzorka dodaju sredstva za sušenje, kao što su natrijum-sulfat, dijatomejska zemlja ili celuloza. Nakon uspostavljanja radnog pritiska i temperature, sledi korak ekstrakcije u statičkom ili dinamičkom režimu. U statičkom režimu, uzorak i rastvarač se održavaju u kontaktu u vremenu koje programira korisnik pod konstantnim pritiskom i temperaturom, dok u dinamičkom režimu rastvarač kontinualno prolazi kroz uzorak. Statički režim se može ponoviti nekoliko puta radi potpunog iscrpljenja uzorka. Dinamička ubrzana ekstrakcija nudi bolju efikasnost zbog konstantnog održavanja koncentracionog gradijenta, ali se ovaj tip ekstrakcije retko koristi, uglavnom zbog velike potrošnje rastvarača (Giergielewicz-Možajska i

dr., 2001). Kombinacija statičkog i dinamičkog režima može poboljšati efikasnost ekstrakcije uz ograničavanje potrošnje rastvarača.

Prednosti ubrzane ekstrakcije u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije su znatno skraćanje vremena ekstrakcije (5 do 15 min) i mogućnost upotrebe širokog spektra rastvarača, čak i onih koje ne ispoljavaju visoku efikasnost kod tradicionalnih tehnika ekstrakcije. Primena smeše rastvarača predstavlja značajnu prednost ubrzane ekstrakcije. Uzorak može biti ekstrahovan različitim rastvaračima u uzastopnim ekstrakcionim ciklusima čime se postiže selektivna ekstrakcija različitih klasa jedinjenja. Takođe, ekstrakcija se izvodi u uslovima bez kiseonika i svetlosti, što je čini pogodnom za ekstrakciju jedinjenja koja lako oksiduju ili su osetljiva na svetlost. Ekstrakcija je automatizovana i dozvoljava sekvencijalno izdvajanje različitih klasa jedinjenja. Pored činjenice da ne zahteva dodatne faze filtracije, prednost ubrzane ekstrakcije je i mogućnost *on-line* kuplovanja sa nekom separacionom tehnikom. Pored navedenih prednosti, ubrzana ekstrakcija ima nekoliko ključnih nedostataka koji sprečavaju njenu širu primenu. To su relativno niska selektivnost, potreba za velikom količinom rastvarača, upotreba visokih pritisaka i visoka cena opreme za ekstrakciju.

Prvobitno, upotreba ubrzane ekstrakcije bila je uglavnom ograničena na ekstrakciju zagađujućih materija prisutnih u zemljištu, sedimentima i mulju otpadnih voda. Međutim, u skorije vreme, ova tehnika se koristi i u pripremi bioloških, farmakoloških i prehrambenih uzoraka. Nekoliko autora je ukazalo na efikasnost primene ubrzane ekstrakcije za izolovanje antocijanina i drugih fenolnih jedinjenja iz različitih izvora (Cai i dr., 2016; Ciulu i dr., 2017; Figueroa i dr., 2018). U istraživanju Rodríguez-Solana i dr. (2015) koji su ekstrahovali etarsko ulje iz komorača primenom ubrzane ekstrakcije, dobijeni su znatno viši prinosi u odnosu na konvencionalne tehnike izdvajanja etarskog ulja. Ubrzana ekstrakcija je takođe bila primenjena i za izdvajanje masnih kiselina iz makroalgi (Otero i dr., 2018), semena lubenice (Mahla i dr., 2018), žitarica (Moreau i dr., 2003), mleka (Teng i dr., 2018) i dr.

Uticao parametara ekstrakcije

Efikasnost ubrzane ekstrakcije u velikoj meri zavisi od primenjenih uslova ekstrakcije. Faktori koji utiču na proces ubrzane ekstrakcije i koji se mogu optimizovati su veličina čestica uzorka, zapremina, priroda rastvarača, protok rastvarača, odnos droga/rastvarač, temperatura, vreme ekstrakcije, režim i broj ciklusa ekstrakcije, i pritisak. Priroda rastvarača i temperatura imaju najveći uticaj na efikasnost ubrzane ekstrakcije.

Uopšteno, prilikom izbora rastvarača za ekstrakciju treba uzeti u obzir njegova fizičko-hemijska svojstva, kao što su tačka ključanja, polaritet, specifična gustina (utiče na penetraciju u matriks uzorka), kao i toksičnost. Polaritet rastvarača se bira spram polarnosti ciljnih jedinjenja. U slučaju da se žele ekstrahovati jedinjenja različite polarnosti, mešavina rastvarača niske i visoke polarnosti obično pruža efikasnu ekstrakciju. Alternativno je moguće izvesti dve ubrzane ekstrakcije, jednu sa nepolarnim, drugu sa polarnim rastvaračem. Ubrzana ekstrakcija se može izvoditi sa širokim spektrom rastvarača. Jake baze i pojedine koncentrovane slabe kiseline su korozivne te ih je

potrebno izbjegavati. Samozapaljivost rastvarača na temperaturama od 40–200 °C (npr. karbon-disulfid, dietiletar i 1,4-dioksan) ograničava primenu istih i čini ih manje adekvatnim za primenu kod ubrzane ekstrakcije. U pojedinim slučajevima je moguće poboljšati efikasnost ekstrakcije dodavanjem modifikatora, kao što su površinski aktivne materije (PAM), kiseline ili baze. Dodavanje određenih organskih ili neorganskih modifikatora može povećati rastvorljivost analita u rastvaraču, poboljšati kontakt sa matriksom uzorka, odnosno modifikovati sam matriks. Modifikatori takođe utiču na fizičko-hemijske osobine rastvarača na povišenoj temperaturi.

Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji utiču na proces ubrzane ekstrakcije. Povećanje temperature povećava rastvorljivost ciljnih komponenti i brzinu difuzije. Na višim temperaturama takođe dolazi do slabljenja molekularnih interakcija (Van der Waalove sile) između ciljnih komponenti i matriksa, do smanjenja viskoziteta i površinskog napona rastvarača, što poboljšava prodor rastvarača u matriks, pospešujući prenos mase. Gustina rastvarača opada dozvoljavajući bolji kontakt sa česticama čvrstog uzorka. Efekti povišenih temperatura su brojni, dok povišeni pritisci služe da bi se sprečilo isparavanje rastvarača. Povišeni pritisci takođe omogućavaju bolje prodiranje rastvarača u pore uzorka omogućavajući na taj način pristup ciljnim komponentama (Richter i sar., 1996). Primenom povišenih temperatura povećavaju se rastvorljivost i prenos mase, ali dolazi i do promene selektivnosti. Pored toga, visoke temperature mogu uzrokovati raspad termolabilnih jedinjenja (Simsek Kus, 2012).

2.5.2.2. Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju

Ekstrakcijom fluidima u superkritičnom stanju prevazilaze se osnovni nedostaci konvencionalnih tehnika, kao što su dugo trajanje ekstrakcije, velika potrošnja toksičnih rastvarača, niska selektivnost i mali prinosi ekstrakcije. U ovoj tehnici najčešće se koriste fluidi kao što su propan, butan, ugljenik(IV)-oksid (CO₂) i drugi. Fluidi u superkritičnom stanju, na pritisku i temperaturi iznad kritičnih, imaju znatno veću selektivnost u odnosu na tečne rastvarače. Efikasnost superkritičnih fluida u direktnoj je vezi sa njihovim fizičko-hemijskim karakteristikama koje se nalaze između karakteristika tečnosti i gasova (De Melo i dr., 2014). Superkritični fluidi se ponašaju kao vrlo gusti gasovi ili kao izuzetno pokretne tečnosti, kombinujući dobre solvacione osobine tečnosti i brz transfer mase koji se odigrava u gasovima. U superkritičnom stanju dinamički viskozitet, površinski napon i gustina fluida su niski, doprinoseći lakšoj penetraciji u čvrst porozan materijal.

Prednosti ekstrakcije superkritičnim fluidima u odnosu na klasičnu ekstrakciju su:

- selektivnost – podešavanje solvacionih osobina superkritičnog fluida promenom pritiska i temperature,
- jednostavno uklanjanje superkritičnog fluida iz ekstrakta,
- ekstrakcija komponenata visokih temperatura ključanja na relativno niskim temperaturama,
- ekstrakcija termolabilnih komponenata bez njihove degradacije,

- netoksičnost rastvarača (za ugljenik(IV)-oksid) i
- očuvanje životne sredine (za ugljenik(IV)-oksid).

Nedostaci ekstrakcije superkričnim fluidima su:

- rad na visokim pritiscima,
- složeno recikliranje korišćenih rastvarača, odnosno znatni energetske troškovi i
- veliki investicioni troškovi za procesnu opremu.

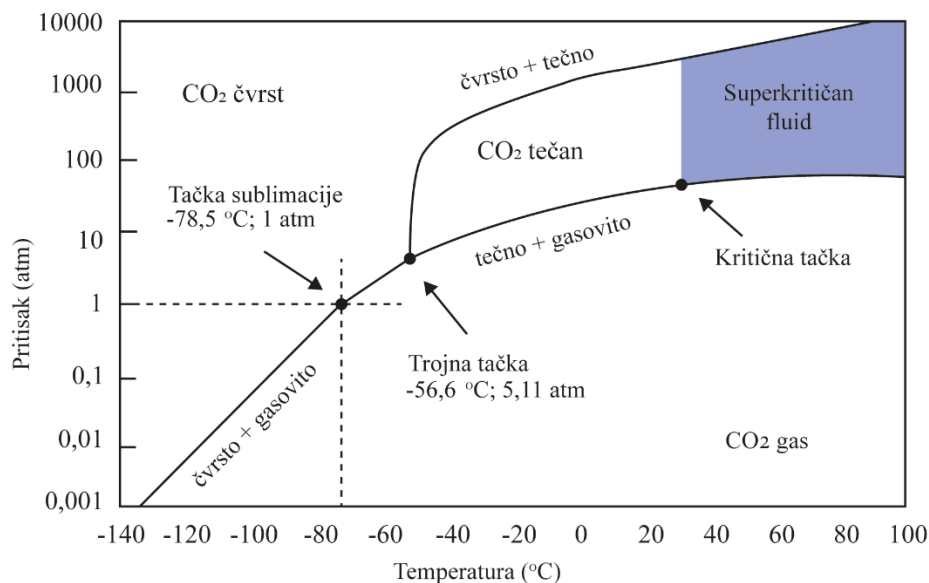
Materijal koji se podvrgava ekstrakciji mora biti usitnjen do određenog stepena, jer od veličine čestica zavise efikasnost i brzina ekstrakcije. Smanjenjem veličine čestica povećava se njihova specifična površina i smanjuje se put koji prelazi analit, što povećava brzinu ekstrakcije. S druge strane, ukoliko je materijal previše usitnjen, raste i otpor prenosu mase, a razdvajanje tečnosti i čvrstih čestica je otežano (Reverchon i De Marco, 2006).

Kao rastvarač za ekstrakciju superkričnim fluidima može se koristiti bilo koji fluid, međutim, njegova kritična tačka, toksičnost, troškovi i solvatazione osobine određuju njegovu primenu. Rastvorljivost organskih komponenata u fluidima u superkričnom stanju je bliska rastvorljivosti u organskim rastvaračima, međutim fluid ispoljava niži viskozitet i površinski napon, a koeficijent difuzije komponenata u njima je daleko veći (Tabela 4).

Tabela 4. Kritične tačke pojedinih fluida.

Fluid	Temperatura (°C)	Pritisak (atm)	Gustina (g/mL)	Rastvorljivost (cal ^{-1/2} cm ^{-3/2})
Eten	10,1	50,5	0,200	5,8
Voda	101,1	217,6	0,322	13,5
Metanol	-34,4	79,9	0,272	8,9
Ugljenik(IV)-oksid	31,2	72,9	0,470	7,5
Etan	32,4	48,2	0,200	5,8
Azot oksid	36,7	71,7	0,460	7,2
SF ₆	45,8	37,7	0,730	5,5
<i>n</i> -buten	-139,9	36,0	0,221	5,2
<i>n</i> -pentan	-76,5	33,3	0,237	5,1

Najčešće korišćen rastvarač u ekstrakciji superkričnim fluidima je ugljenik(IV)-oksid pre svega zbog netoksičnosti, niske cene, dostupnosti i umerenih kritičnih uslova. Tečni ugljenik(IV)-oksid ispod kritične temperature (31,06 °C) poseduje visoku moć rastvaranja, koja u maloj meri zavisi od pritiska. Na temperaturi iznad 31,06 °C i pritisku iznad kritičnog (73,8 bar), menjaju se fizičke osobine ugljenik(IV)-oksida čineći ove parametre veoma značajnim kod finog podešavanja selektivnosti (Reverchon i De Marco, 2006). Fazni dijagram ugljenik(IV)-oksida prikazan je na slici 8.



Slika 8. Fazni dijagram ugljenik(IV)-oksida.

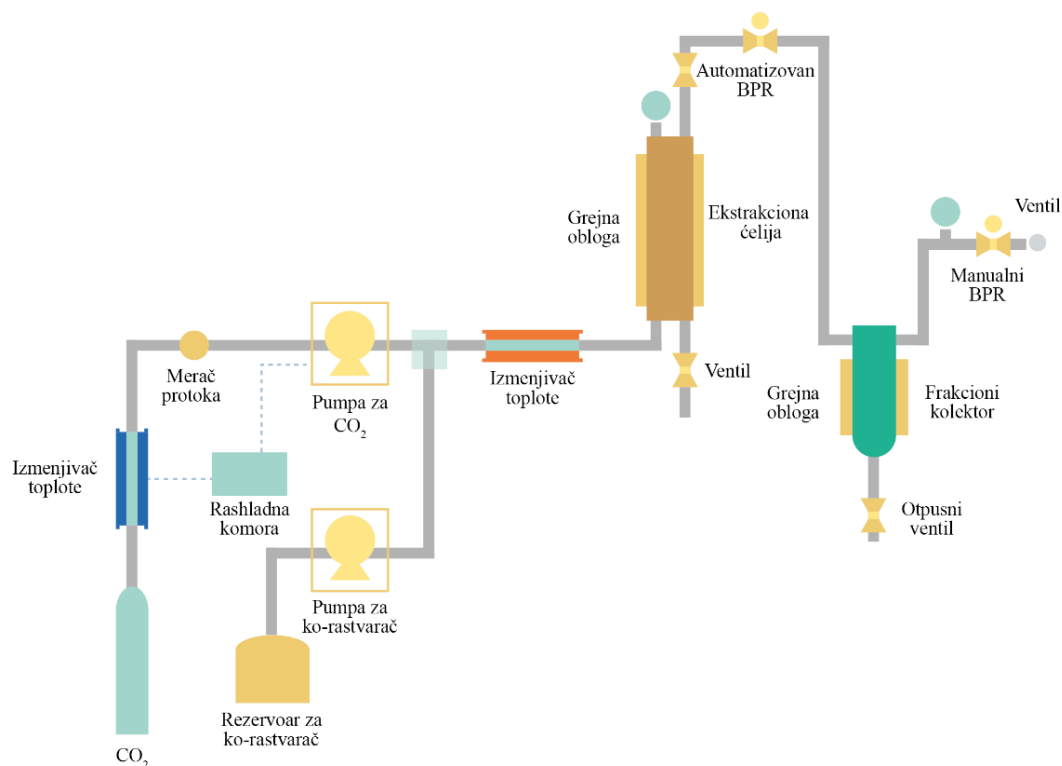
Ugljenik(IV)-oksid u superkritičnom stanju (*eng.* Supercritical Carbon dioxide, SC-CO₂) ima osobine nepolarnog rastvarača, te se kao takav uglavnom upotrebljava za ekstrakciju nepolarnih komponenata, kao što su etarska ulja, masne kiseline, jedinjenja sterolne strukture, određeni vitamini, voskovi, itd. Da bi se ekstrahovale umereno polarne komponente, ugljenik(IV)-oksidu se dodaju modifikatori, kao što su metanol, etanol, aceton, ugljen-disulfid, sumpor-dioksid, heksan, toluen, hloroform i dr.

Prednosti ugljenik(IV)-oksida u odnosu na ostale gasove su:

- Bezbednost za životnu sredinu,
- Niski kritični parametri,
- Netoksičnost,
- Nezapaljivost,
- Dostupnost,
- Niska cena,
- Odsustvo mirisa i ukusa, što omogućava upotrebu u prehrambenoj industriji,
- Selektivnost,
- Mogućnost frakcionisanja i
- Lako odvajanje od ekstrakata.

Osnovni delovi supekritičnog ekstraktora uključuju rezervoar fluida i rezervoar ko-rastvarača, visokopritisnu pumpu i ekstrakcionu ćeliju (Slika 9). Ugljenik(IV)-oksid se zajedno sa ko-rastvaračem komprimuje na radni pritisak koji se podešava sistemom ventila. Superkritični ugljenik(IV)-oksid i ko-rastvarač prolaze kroz ekstrakcionu ćeliju gde se ekstrahuju ciljne komponente. Nakon ekstrakcije ekstrahovane komponente se odvajaju od superkritičnog fluida dekompresijom. Ekstrahovane komponente je moguće frakcionisati postepenom redukcijom

pritiska primenom više frakcionih kolektora. Nakon ekstrakcije, superkritični ugljenik(IV)-oksid se zajedno sa ko-rastvaračem dovodi u prvi frakcioni kolektor gde se promenom procesnih parametara smanjuje rastvorljivost komponenata. Ekstrakt se sa jedinjenjima koja se nisu izdvojila u prvom frakcionom kolektoru uvodi u drugi gde se temperatura i pritisak spuštaju ispod kritičnih uslova. Ugljenik(IV)-oksid se kao gas oslobađa u atmosferu ili se vraća u proces do kompresora.



Slika 9. Šematski prikaz sistema za ekstrakciju superkritičnim fluidima.

Ekstrakcija superkritičnim fluidima već dugo nalazi komercijalnu primenu u raznim oblastima farmaceutske, prehrambene i tekstilne industrije. Na industrijskom nivou, ekstrakcija superkritičnim fluidima se danas primenjuje za dekofeinizaciju kafe i čaja, ekstrakciju hmelja, izdvajanje nikotina iz duvana, holesterola iz jaja, itd. U prehrambenoj industriji se koristi za proizvodnju ekstrakata paprike i začina (Da Silva i dr., 2016). Za dobijanje etarskih ulja ispoljava značajnu prednost s obzirom na to da se izbegava dekompozicija jedinjenja koja je česta kod hidroddestilacije. Ekstrakcija superkritičnim fluidima se uspešno koristila za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz trešnje, kakao ljuske, rogača, listova masline i dr. (Serra i dr., 2010; Taamalli i dr., 2012; Roseiro i dr., 2013; Valadez-Carmona i dr., 2018). Razlozi sporije implementacije ove tehnologije na industrijskom nivou su visoki inicijalni investicioni troškovi opreme i neophodnost kompleksnijeg inženjerskog pristupa, s obzirom da se tokom procesa koriste relativno visoki pritisci. Međutim, u pojedinim aplikacijama primena ekstrakcije superkritičnim fluidima je mnogo ekonomičnija u odnosu na klasične postupke. Pojedini proizvodi visokog kvaliteta se mogu dobiti jedino primenom ekstrakcije superkritičnim fluidima, kao što je beskofeinska kafa (Skala i dr., 2002).

Uticaj parametara ekstrakcije

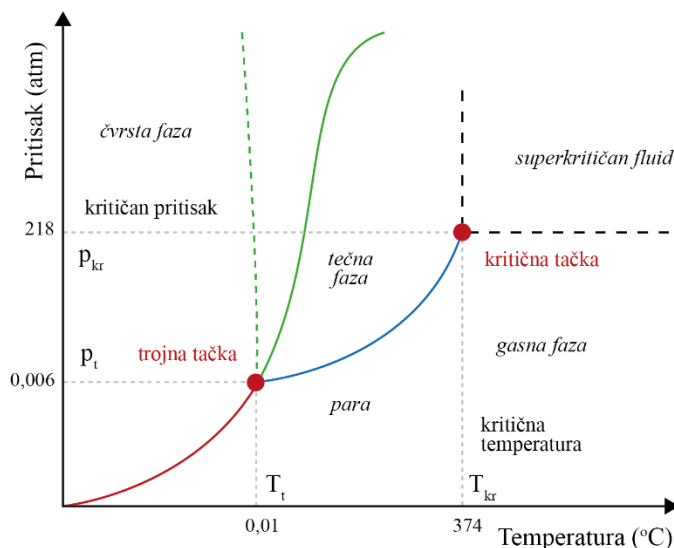
Različiti faktori, kao što su veličina čestica, poroznost, vlaga, priroda uzorka, kao i parametri procesa, mogu uticati na efikasnost ekstrakcije superkritičnim fluidima. Najčešći parametri procesa koji se optimizuju su: temperatura, pritisak, protok ugljenik(IV)-oksida, vreme ekstrakcije i dodatak ko-rastvarača.

Na efikasnost ekstrakcije superkritičnim fluidima najveći uticaj ima pritisak. Kao opšte pravilo, rastvorljivost u superkritičnim fluidima se povećava sa povećanjem pritiska, što je direktno povezano sa povećanjem gustine rastvarača. Shodno tome, što je veći pritisak ekstrakcije, potrebna je manja zapremina rastvarača za ekstrakciju. S druge strane, temperatura kod ekstrakcija superkritičnim fluidima predstavlja parametar koji utiče i na gustinu fluida i na napon pare jedinjenja koje se ekstrahuje. Povećanjem temperature do temperature bliske kritičnoj povećava se rastvorljivost jedinjenja. Daljim porastom temperature na nižim pritiscima smanjuje se rastvorljivosti jedinjenja usled smanjenja gustine superkritičnog fluida. Na umerenim i visokim pritiscima promena gustine sa temperaturom je manje izražena vodeći ka povećanju rastvorljivosti jedinjenja. S druge strane, izobarskim povećanjem temperature povećava se napon pare lako isparljivih jedinjenja, a i rastvorljivosti komponenata. Za slabo isparljive komponente, više temperature rezultiraju nižim prinosom ekstrakcije s obzirom da se rastvorljivost u ugljenik(IV)-oksidu smanjuje sa povećanjem temperature.

Dodatkom ko-rastvarača superkritičnim fluidima, moguće je uticati na polarnost, a samim tim i na selektivnost fluida. U tu svrhu se koriste organski rastvarači kao što su etanol, metanol, izopropanol, acetonitril, aceton, *n*-heksan, metilen-hlorid, a ponekad se koriste voda i biljna ulja (De Melo i dr., 2014). Ko-rastvarači moraju biti mešljivi sa superkritičnim fluidom i obično se dodaju u udelu 1–10%. Bitno je napomenuti da i najniža koncentracija dodatog ko-rastvarača utiče na kritične parametre, što se mora uzeti u obzir pri podešavanju procesnih uslova (Švarc-Gajić, 2012). Izbor ko-rastvarača zavisi od prirode komponenata koje se ekstrahuju. U prehrambenoj industriji etanol je najčešće korišćen ko-rastvarač, kako zbog svoje umerene polarnosti, tako i zbog toksičnosti (Skala i dr., 2002). Upotreba drugih organskih rastvarača može znatno uticati na porast prinosa, međutim, nakon ekstrakcije potreban je dodatni korak prečišćavanja da se odvoji zaostali rastvarač. Problem predstavlja zaostatak toksičnih rastvarača u ekstraktu, što umanjuje kvalitet i tržišnu vrednost proizvoda. S obzirom da većina biljnih uzoraka sadrži vezanu vodu (do 10%), pre izvođenja ekstrakcije superkritičnim fluidima potrebno je sušenje uzorka što poskupljuje sam tehnološki proces. Ko-rastvarači se mogu uvesti u ekstrakcioni sistem na dva načina, a svaki ima određene nedostatke. Ko-rastvarač pomešan sa fluidom uz pomoć procesne pumpe i u komori za mešanje, unosi rizik od kontaminacije pumpe. S druge strane, direktnim dodatkom ko-rastvarača na uzorak pre ekstrakcije u dinamičkoj ekstrakciji dolazi do njegovog brzog iscrpljenja.

2.5.2.3. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Voda predstavlja jeftin i ekološki prihvatljiv rastvarač čija se svojstva mogu značajno menjati promenom pritiska i temperature. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju se izvodi na temperaturama između 100 (tačka ključanja) i 374 °C (kritična tačka) i pritiscima dovoljno visokim da se održi tečno stanje vode (Slika 10) (Švarc-Gajić, 2012).



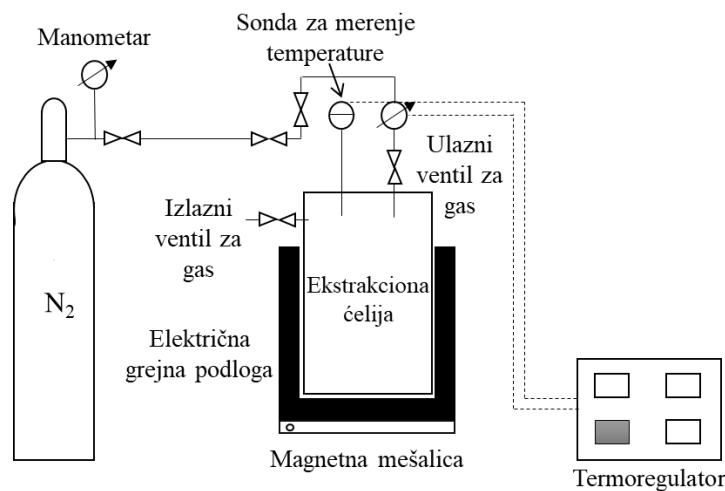
Slika 10. Fazni dijagram vode.

Sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja gustine, viskoziteta i površinskog napona vode, što doprinosi efikasnosti ekstrakcije. Povećanjem temperature sa 25 na 250 °C, vodonične veze u molekulima vode slabe smanjujući dielektričnu konstantu vode sa 80 na 27, što je veoma blisko metanolu ($\epsilon = 33$) i etanolu ($\epsilon = 24$). Zapravo, smanjenje dielektrične konstante vode približava solvaciona svojstva vode svojstvima organskih rastvarača. Na sobnoj temperaturi polarna jedinjenja imaju dobru rastvorljivost u vodi, dok voda u subkritičnom stanju predstavlja dobar rastvarač za umereno polarna i nepolarna jedinjenja (Plaza i Turner, 2015). Osim toga, na povišenim temperaturama i pritiscima raste i brzina difuzije, što znatno ubrzava ekstrakciju (Liang i Fan, 2013). Iznad kritičnog pritiska (220,9 bar) i temperature (374 °C), voda prelazi u superkritično stanje u kome značajno menja svoje osobine, postajući izuzetno reaktivna. Ekstremni uslovi superkritične vode se teško postižu i održavaju tokom procesa. Činjenica je da je voda u ovakvim uslovima izuzetno reaktivna i sposobna da razgradi toksične supstance, izazove raspad eksploziva, pa čak i koroziju nerđajućeg čelika (Švarc-Gajić, 2012). Zbog svoje izražene reaktivnosti pri ovakvim uslovima, područja primene vode u superkritičnom stanju sve su brojnija, i obuhvataju procese dobijanja visokovrednih jedinjenja iz otpada i biogoriva.

Rad sa vodom pri visokim temperaturama i pritiscima zahteva posebne mere predostrožnosti i korišćenje specijalno dizajniranih reaktora. Proces u subkritičnoj vodi mogu se izvoditi u šaržnim (diskontinualnim) i protočnim (kontinualnim) sistemima. Šaržna ekstrakcija subkritičnom vodom

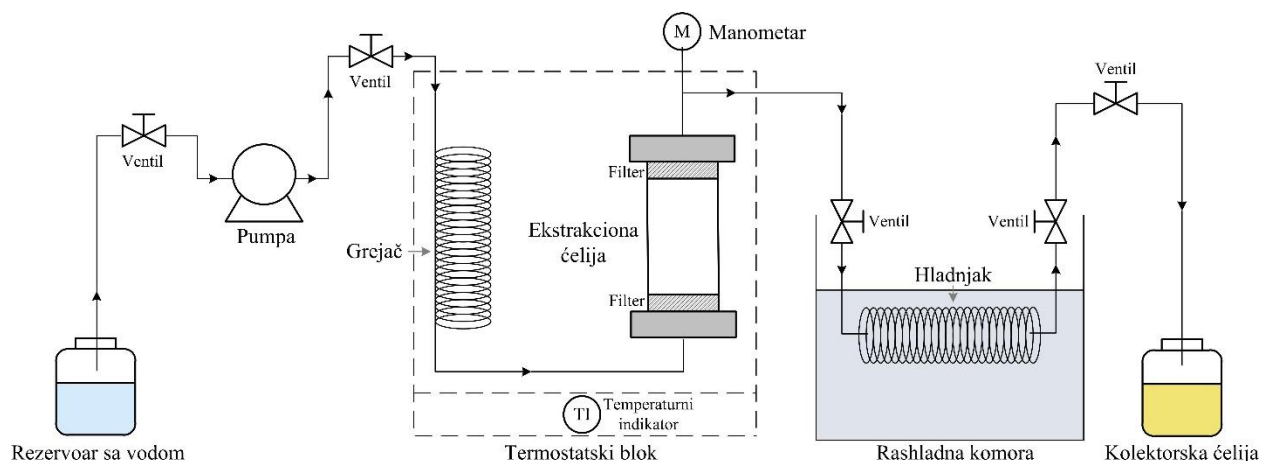
se odvija direktnim mešanjem uzorka i rastvarača (vode) u ekstraktoru, dok se kod protočne ekstrakcije subkritičnom vodom uzorak pakuje i imobilise, a rastvarač provodi kroz sloj čvrstog materijala. Proces ekstrakcije u šaržnom reaktoru (Slika 11) započinje dovođenjem smeše vode i uzorka na radne uslove pritiska i temperature. Radni pritisak se postiže kompresijom sa azotom, ugljenik(IV)-oksidom ili nekim drugim gasom. Radna temperatura se postiže zagrevanjem smeše preko električne grejne obloge. Merenje i regulacija temperature se izvode termoregulatorom uz mernu sondu (otporni termometar). Konvektivni prenos mase se postiže pomoću mešalice ili na druge načine, kako bi se ubrzao prenos mase i toplote i sprečilo lokalno pregrevanje na unutrašnjim zidovima ekstrakcione ćelije. Nakon ekstrakcije, ekstrakciona ćelija se hladi u ledenom kupatilu do sobne temperature i izvodi se dekompresija ispuštanjem azota kroz izlazni ventil.

Šaržni SWE reaktor je jednostavan i lak za upotrebu. Međutim, vreme zadržavanja analita u šaržnom SWE reaktoru je dugo, što može prouzrokovati degradaciju termolabilnog analita (Liu i dr., 2014). Ovaj nedostatak se može prevazići višestepenom kratkotrajnom ekstrakcijom iscrpljene sirovine svežom vodom.



Slika 11. Šematski prikaz šaržnog SWE sistema.

Kod protočne ekstrakcije subkritičnom vodom voda se komprimuje na radni pritisak pomoću visokopritisne pumpe i zagreva prolaskom komprimovane vode kroz termostatiran električni grejač (Slika 12). Nakon postizanja operativnih uslova, voda se uvodi u ekstrakcionu ćeliju. Transfer mase se odvija između vode koja kontinuirano protiče preko nepokretnog sloja uzorka u ekstrakcionoj ćeliji. Kontinuiranim tokom svežeg rastvarača koji dolazi u kontakt sa uzorkom održava se veći koncentracioni gradijent između rastvorka u čvrstoj i tečnoj fazi u odnosu na šaržnu ekstrakciju. Nakon koraka ekstrakcije dobijeni ekstrakt se hladi i sakuplja u kolektorsku ćeliju. Na oba kraja ekstrakcione ćelije nalaze se filteri koji omogućavaju razdvajanje ekstrakta od čvrste faze, kao i sprečavanje gubitka uzorka i začepljenja cevi.



Slika 12. Šematski prikaz protočnog SWE sistema.

Prethodno navedena fizičko-hemijska svojstva vode u subkritičnom stanju, kao i činjenica da je voda lako dostupna, bezbedna, jeftina, netoksična, nezapaljiva i ekološki prihvatljiva, doveli su do brojnih istraživanja o mogućnostima primene subkritične vode za ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja. Zbog svoje netoksičnosti i izvrsnih solvacionih svojstava, subkritična voda predstavlja odličan rastvarač za dobijanje farmakološki aktivnih biljnih ekstrakata koji se mogu koristiti u proizvodnji prehrambenih, kozmetičkih proizvoda i suplemenata (Koyu i dr., 2017; Kumar i dr., 2011; Švarc-Gajić i dr., 2017). Osim prethodno pomenutih prednosti, ekstrakti dobijeni primenom ekstrakcije subkritičnom vodom obično pokazuju veću bioaktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene konvencionalnim rastvaračima (Cvetanović i dr., 2015; Mašković i dr., 2017; Zeković i dr., 2017) ili superkritičnim fluidima (Rodríguez-Meizoso i dr., 2006; Fernández-Ponce i dr., 2012).

Brojne su studije koje ukazuju na primenu subkritične vode za ekstrakciju različitih klasa jedinjenja iz biljnog materijala, uključujući fenolne kiseline, izoflavone, alkaloide, terpene, masne kiseline, polisaharide i mnoge druge. Na osnovu literaturnih podataka, smatra se da su najbolji uslovi ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala temperature u opsegu od 80–150 °C i vreme ekstrakcije 5–60 min u statičkom režimu (Vetrova i dr., 2017; Moreira i dr., 2018). Yan i dr. (2017) sproveli su studiju u kojoj su ispitivali efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja kore nara primenom subkritične vode u širem rasponu temperatura (100–220 °C). Studija je pokazala jasan uticaj temperature na prinos ekstrakcije, koji se povećavao sa povećanjem temperature ekstrakcije do 130 °C, nakon čega je došlo do naglog pada prinosa. Resveratrol je ekstrahovan iz nusproizvoda grožđa pri optimalnoj temperaturi od 150–160 °C tokom 5–25 min (Tian i dr., 2017; Gabaston i dr., 2018). Najviši prinosi izoflavona iz *Puerariae lobata* su postignuti pri temperaturi ekstrakcije od 120 °C (Zhang i dr., 2018). Temperatura je uticala i na prinos izoflavona iz sojinog brašna i izolata sojinog proteina (Moras i dr., 2017). Malonil oblici su bili osetljiviji na više temperature, te su veći prinosi izoflavona dobijani na 60 °C. Na temperaturama iznad 60 °C dolazilo je do konverzije malonil oblika u glukozide i dalje hidrolize do aglikona na temperaturama iznad 160 °C, što je uticalo na pad ukupnog prinosa izoflavona s obzirom na nepolaran karakter

aglikona. Nešto više temperature ekstrakcije (150–170 °C) su primenjivane u ekstrakciji fenolnih jedinjenja iz crnog čaja, ljuske pistača, kore narandže i kurkume primenom protočnog ekstrakcionog sistema (Mottahedin i dr., 2017; Erşan i dr., 2018; He i dr., 2018).

Ozel i dr. (2003) su primenili subkritičnu vodu za ekstrakciju etarskog ulja iz listova *Thimbra spicata*. Ispitan je uticaj temperature (100–175 °C), pritiska (20–90 bar) i protoka (1–3 mL/min). Najbolji prinosi ekstrakcije (3,7%) su bili ostvareni primenom temperature od 150 °C i pritiska od 60 bar uz protok od 2 mL/min tokom 30 min. Najviši prinos etarskog ulja origana je postignut na 125 °C, 20 bar i pri protoku rastvarača od 1 mL/min (Ayala i de Castro, 2001). Poređenjem sa hidrodestilacijom, rezultati su ukazali na očigledne prednosti ekstrakcije subkritičnom vodom u pogledu vremena ekstrakcije, s obzirom da je primenom ekstrakcije subkritičnom vodom u trajanju od 15 min postignut viši prinos u odnosu na hidrodestilaciju u trajanju od 3 h. Zhang i dr. (2019) su primenili subkritičnu vodu za ekstrakciju polisaharida iz *Sagittaria sagittifolia*. Studija je pokazala jasan uticaj temperature na prinos ekstrakcije, koji se povećavao sa povećanjem temperature ekstrakcije. Autori su utvrdili da je maksimalan prinos polisaharida postignut na temperaturi ekstrakcije od 170 °C u trajanju od 16 min. Celuloza i hemiceluloza su takođe ekstrahovane primenom subkritične vode iz kore *Citrus junos* i listova palme (Tanaka i dr., 2012; Norsyabilah i dr., 2013). Najviši prinos celuloze iz *C. junos* kore (80%) je postignut na temperaturi od 200 °C, dok je iz listova palme postignut maksimalni prinos hemiceluloze od 69,60% na temperaturi od 190 °C.

Ekstrakcija subkritičnom vodom je bila uspešno primenjena i u simultanoj ekstrakciji ulja (slobodnih masnih kiselina) i jedinjenja rastvorljivih u vodi (proteina, ugljenih hidrata i fenolnih kiselina) iz semenki suncokreta (Ravber i dr., 2015). Najveći prinos ulja je postignut na 130 °C nakon 30 min ekstrakcije, dajući rezultate slične Soxhlet ekstrakciji u trajanju od 4 h. Znatno bolji prinosi ukupnih ugljenih hidrata su postignuti pri temperaturama iznad 100 °C, što je ukazivalo na veću rastvorljivost ugljenih hidrata na višim temperaturama. Suprotno tome, temperature iznad 100 °C su vodile znatno nižim prinosima proteina. Prinos ukupnih fenolnih jedinjenja je bio konstantan na temperaturama od 60–100 °C, dok je na temperaturama iznad 130 °C dolazilo do pada prinosa, verovatno kao posledica reakcija karamelizacije, termooksidacije ili Maillard-ove reakcije.

Uticaj parametara ekstrakcije

Na efikasnost i selektivnost ekstrakcije subkritičnom vodom najveći uticaj imaju temperatura, pritisak, vreme ekstrakcije, protok rastvarača i koncentracija ko-rastvarača. Najdominantniji operativni parametar kod ekstrakcije subkritičnom vodom je temperatura, za razliku od ekstrakcije supekritičnim fluidima kod koje je pritisak ključni parametar sa čijim porastom raste i rastvorljivost komponenata. Pri povišenim temperaturama dolazi do slabljenja veza između analita i matriksa (Van der Valsove sile, vodonične veze i interakcije dipola) čime se poboljšava efikasnost samog procesa. Male promene u radnoj temperaturi imaju značajan uticaj na polaritet vode. Pored toga, porast temperature dovodi do povećanja difuzivnosti, smanjenja viskoziteta vode

i površinskog napona (Švarc-Gajić, 2012). Ograničenje primene viših temperatura se javlja zbog moguće degradacije određenih jedinjenja, kao i intenziviranja procesa kao što su oksidacija i hidroliza usled porasta koncentracije hidronijum i hidroksilnih jona. Hidroliza, oksidacija, metilacija, izomerizacija, dekarboksilacija, enolizacija i druge reakcije dekompozicije koje se odigravaju u subkritičnoj vodi, zavise kako od primenjene temperature, tako i od strukture molekula i trajanja procesa (Carr i dr., 2011). Pojedini autori su ukazali na formiranje neželjenih jedinjenja kao rezultat termooksidacije, karamelizacije i Maillard-ove reakcije tokom ekstrakcije subkritičnom vodom (Tomšik i dr., 2017; Kheirkhah i dr., 2019). Prisustvo 5-hidroksimetilfurfurala i furfurala koji se formiraju tokom napredne faze Maillard-ove reakcije je nepoželjno s obzirom na njihove citotoksične, mutagene, kancerogene i genotoksične efekte (Morales, 2008). Takođe, proizvodi reakcija neenzimskog tamnjenja negativno utiču i na senzorna svojstva ekstrakta. S druge strane, pri višim temperaturama ekstrakcije može doći do nastanka novih bioaktivnih komponenti sa značajnim antioksidativnim kapacitetom, posredstvom reakcija termooksidacije, karamelizacije i Maillard-ove reakcije (Mustafa i Turner, 2011).

Uticaj pritiska na efikasnost ekstrakciju subkritičnom vodom je zanemarljiv jer voda ima nisku kompresibilnost. Najčešće se uloga pritiska svodi na održavanje vode u tečnom stanju (Mustafa i Turner, 2011). Povećanjem pritiska od 1 do 100 bar dielektrična konstanta vode se povećava za 0,37 jedinica (Uematsu i Frank, 1980). Prilikom ekstrakcije subkritičnom vodom preporučuje se primena umerenih pritisaka. Povećanje pritiska najčešće nema značajan uticaj na prinos ekstrakcije najvećeg broja jedinjenja zbog toga što promena pritiska ispod 1000 bar ima neznatan uticaj na promenu dielektrične konstante vode (Carr i dr., 2011). Povišeni pritisak povoljno deluje na kinetiku desorpcije ukoliko je analit zarobljen unutar pora matriksa, doprinoseći boljem prodoru vode u pore čvrstog materijala (Mustafa i Turner, 2011). Pored toga, protok rastvarača pod pritiskom tokom ekstrakcije uklanja vazdušne mehuriće iz matriksa uzorka koji ometaju solvataciju analita.

Prilikom određivanja optimalnog vremena ekstrakcije neophodno je uzeti u obzir degradaciju komponenata pri dužim vremenima. Optimalno vreme ekstrakcije treba da bude što je moguće kraće uz obezbeđivanje zadovoljavajućeg prinosa i izbegavanje degradacije ciljnih komponenata. Optimalno vreme ekstrakcije je vrlo često povezano sa temperaturom i prirodom jedinjenja koja se ekstrahuju.

Dodatak organskih ili neorganskih ko-rastvarača može doprineti boljoj interakciji vode sa matriksom uzorka ili ciljnim komponentama skraćujući neophodno vreme ekstrakcije. Dodatak ko-rastvarača menja fizičko-hemijske osobine vode ili matriksa uzorka na povišenoj temperaturi. S obzirom da povišene temperature favorizuju oksidacione procese koji su često odgovorni za degradaciju ciljnih jedinjenja, tokom ekstrakcije se mogu dodati antioksidanti, kao što su askorbinska kiselina i butilovani hidroksitoluol (BHT). Degradacioni potencijal subkritične vode se povećava kompresijom sa ugljenik(IV)-oksidom, pri čemu nastaje ugljenična kiselina koja se ponaša kao katalizator u daljim reakcijama (Hunter i Savage, 2003; Moreschi i dr., 2006). Hunter i Savage (2003) su u atmosferi ugljenik(IV)-oksida na 300 °C u subkritičnoj vodi izvodili reakciju

dehidracije cikloheksena do cikloheksanola. Kod ekstrakcije subkritičnom vodom mogu se koristiti različiti modifikatori matriksa uzorka kako bi se analit efikasnije izdvojio iz njega. Dodatkom jonskih i nejonskih površinski aktivnih materija postiže se efikasnije izdvajanje analita u formi micela (Fernandez-Perez i de Castro, 2000). Zakišeljavanje uzorka može biti efikasno kod ekstrakcije metala. Nekoliko organskih modifikatora kao što su etanol, metanol, aceton i acetonitril, kao i neorganski modifikatori (uglavnom azotna kiselina (1–10%, v/v)), korišćeni su za izdvajanje arsena i drugih organometalnih jedinjenja (Kronholm i dr., 2007). Dodatak organskih rastvarača mešljivih sa vodom (5% etanola i 1% mravlje kiseline) je doprineo boljoj ekstrakciji antocijana iz crvenog kupusa (Arapitsas i Turner, 2008). Međutim, ostaci ovih rastvarača u proizvodnji su nepoželjni (Hawthorne i Kubátová, 2002).

2.5.2.3.1. Reaktivnost sub- i superkritične vode

Poslednjih godina sve je veća primena hidrotermalnih procesa baziranih na primeni vode u sub- i superkritičnom stanju. Zbog svojih jedinstvenih svojstava, pre svega niske dielektrične konstante i visokog jonskog proizvoda, sub- i superkritična voda se mogu koristiti i kao ekološki prihvatljivi reagensi i katalizatori u organskoj sintezi. Sub- i superkritična voda su našle primenu kao reakcioni medijumi u hemijskoj sintezi, degradaciji otpada, recikliranju plastike i preradi biomase. Ponašanje vode na visokoj temperaturi u sub- i superkritičnim uslovima (od 200 °C do 600 °C) su objasnili brojni autori. Prema studiji koju je izvela Simsek Kus (2012), organska jedinjenja podležu brojnim hemijskim reakcijama u sub- i superkritičnoj vodi. Dokazano je da se u subkritičnoj vodi odigravaju reakcije alkilacije, dekarboksilacije, kondenzacije, pripajanja, ciklizacije, dekompozicije, Diels-Alder-ove reakcije, reakcije disproporcioniranja, eliminacije, izomerizacije, reakcije hidrogenacije/dehidrogenacije, hidrolize, oksidacije, organometalne reakcije i dr.

Reakcijom alkilacije fenola dobijaju se alkilfenoli, važni intermedijeri u procesima proizvodnje surfaktanata, polimera, antioksidanata, lekova, itd. Sato i dr. (2002) su pokazali da se regioselektivnost alkilacije fenola propionaldehidom mogla kontrolisati u superkritičnoj vodi bez primene katalizatora na 400 °C promenom gustine vode od 0,1–0,5 g/cm³, odnosno variranjem zapremine dodate vode u reaktor. Prinos nastalih fenolnih jedinjenja povećavao se sa povećanjem gustine vode. U studiji koju su izveli Chandler i dr. (1997) subkritična voda je primenjena kao katalizator u reakciji Friedel-Crafts-ove alkilacije, eliminišući potrebu za uobičajenim kiselim katalizatorom (AlCl₃), koji je korozivan, sa kojim je teško rukovati i koji zahteva veći utrošak. Na 275 °C fenoli su reagovali sa *tert*-butil alkoholom uz nastanak 2-*tert*-butilfenola, 4-*tert*-butilfenola i 2,4-di-*tert*-butilfenola.

Subkritična i superkritična voda su primenjene i u reakcijama hidrolize i retro-aldolne kondenzacije celobioze (Sasaki i dr., 2002). U studiji Sasaki i dr. (2002), degradacija celobioze vodom u subkritičnim i superkritičnim uslovima (325–400 °C, 25–40 MPa, 0,01–0,54 s) se odigravala reakcijama hidrolize i retro-aldolne kondenzacije. Hidrolizom β(1,4)-glikozidne veze nastajali su dva molekula glukoze. Retro-aldolna kondenzacija se odvijala na redukujućem kraju celobioze dajući glukozil-eritrozu i glikolaldehid. Daljom hidrolizom glukozil-eritroze nastajala je

glukoza i eritroza, kao i glukozil-glikolaldehid i glikolaldehid retro-aldolnom kondenzacijom. Nastali glukozil-glikolaldehid se hidrolizovao do glukoze i glikolaldehida. Glukoza se može konvertovati u gliceraldehid, dihidroksiaceton i neke organske kiseline. Hidroliza u subkritičnoj vodi je primenjena za dobijanje odgovarajućih kiselina i alkohola iz različitih estara (Lesutis i dr., 1999; Krammer i Vogel, 2000). Lesutis i dr. (1999) su ispitivali konverziju *n*-propil benzoata u benzoevu kiselinu i propanol u funkciji vremena na 250 °C. Efikasnost konverzije se eksponencijalno povećavala od prvog do trećeg sata (80%). Visoki prinosi produkata hidrolize su dobijeni i u studiji Krammer i Vogel-a (2000). Autori su ispitivali kinetiku hidrolize supstituisanog acetata, 1,4-butandiol-diacetata, poli (1,4-butandiol-diacetata), poli (tetrahidrofuran-diacetata), poli (tetrahidrofurana), acetamida i benzamida na 23–30 MPa i 350 °C.

Drugi primeri katalitičkih efekata subkritične vode uključuju oksidacione reakcije uz primenu kiseonika, s obzirom na to da je kiseonik veoma rastvorljiv u subkritičnoj vodi (Kayan i dr., 2005; Ozen i Aydin, 2006; Ozen i Kus, 2006). Kiseonik se pokazao kao efikasan oksidans za konverziju alkohola u karbonilna jedinjenja na temperaturi od 120 °C (Ozen i Kus, 2006), toluena u aromatične aldehide na 150 °C (Kayan i dr., 2005), i tiola do disulfida na 100 °C (Ozen i Aydin, 2006) u subkritičnoj vodi u odsustvu katalizatora. Organska i neorganska jedinjenja se mogu u potpunosti oksidativno razgraditi superkritičnom vodom u veoma kratkom vremenu i bez nastajanja neželjenih toksičnih gasova SO_x, NO_x (Alsoqyani, 2017). Tokom procesa oksidacije superkritičnom vodom C-H-N-jedinjenja bivaju brzo degradirana (<1 min) do ugljenik(IV)-oksida, vode, azota i neorganskih soli (Alsoqyani, 2017).

Reakcija Diels-Alder-a je jedna od najvažnijih reakcija u sintezi policikličkih sistema. Rideout i Breslow (1980) su pokazali da se brzina i stereoselektivnost Diels-Alder-ove reakcije drastično povećavaju u vodenom okruženju. Diels-Alder reakcije u superkritičnoj vodi (375 °C, 1h) su izvedene sa nekoliko različitih kombinacija dien/dienofil, i ustanovljeno je da su viši prinosi postignuti u superkritičnoj vodi u odnosu na reakcije koje se odvijaju u konvencionalnim uslovima, uz istovremeno povećanje brzine reakcije (Korzenski i Kolis, 1997).

Voda u subkritičnom stanju je primenjena u reakciji dekarboksilacije. U studiji koju su izveli Lindquist i Yang (2011), benzoeva kiselina i njeni derivati, antranilna, salicilna i siringinska kiselina su podvrgnuti reakciji dekarboksilacije u subkritičnoj vodi na temperaturama iznad 150 °C za dobijanje benzena, anilina, fenola i siringola. Amino, hidroksilna i metoksi grupa antranilne, salicilne i siringinske kiseline su aktivne grupe koje olakšavaju termičku dekarboksilaciju karboksilne grupe u subkritičnoj vodi. Benzoevoj kiselini nedostaje aktivna grupa čime se objašnjava njena izuzetna stabilnost na temperaturama do 300 °C. Derivati benzoeve kiseline su u potpunosti razgrađeni nakon 30 min na 250 °C.

2.5.2.3.2. Primena sub- i superkritične vode u valorizaciji otpada

Odlaganje i manipulacija biogenog i organskog otpada, kao što je čvrst komunalni otpad, nusproizvodi prehrambene i poljoprivredne industrije, životinjski otpad, kanalizacioni mulj, plastika, otpadne gume i petrohemijski otpad, dosta su zahtevni. S druge strane, biomasa često sadrži biološki aktivna jedinjenja i druge vredne komponente koje se odabirom odgovarajuće tehnologije mogu iskoristiti. Pored toga, konverzija biomase/otpada različitim tehnologijama u energiju je danas uobičajena.

Voda u subkritičnom stanju je prepoznata kao efikasan rastvarač za ekstrakciju proteina, ugljenih hidrata, lipida i jedinjenja dodate vrednosti iz različitog otpada, kao što su alge i otpad prehrambene i poljoprivredne industrije. Hidroliza proteina subkritičnom vodom je primenjena za dobijanje funkcionalnih hidrolizata iz različitih izvora, kao što je animalni otpad (Rogalinski i dr., 2005; Brunner, 2009; Esteban i dr., 2010), riblji otpad (Kang i dr., 2001; Ahmed i Chun, 2018) i otpad morskih plodova (Tavakoli i Yoshida, 2006; Uddin i dr., 2010). Hidroliza albumina goveđeg seruma, izvedena u protočnom reaktoru, rezultirala je potpunom razgradnjom proteina do aminokiselina (Rogalinski i dr., 2005). Stepenn hidrolize je zavisio od temperature sa optimalnom vrednošću od 310 °C, dok pritisak u opsegu od 15 do 27 MPa nije pokazao značajan uticaj na reakciju. Ovim postupkom dobijene su znatne količine glicina i alanina. Dodatak ugljenik(IV)-oksida rezultirao je većim prinosom aminokiselina pospešujući kiselu hidrolizu peptidnih veza. U studiji Brunner-a (2009), prinos aminokiselina hidrolizom keratina iz pačjeg perja (bez dodatka ugljenik(IV)-oksida) je bio viši u odnosu na prinos iz albumina (bez dodatka ugljenik(IV)-oksida) zbog kraće dužine lanaca molekula keratina. Hidroliza subkritičnom vodom se pokazala kao efikasan proces i za konverziju α -keratina iz svinjske dlake do aminokiselina (Esteban i dr., 2010). Uticaj operativnih parametara (temperatura, vreme reakcije i početna koncentracija supstrata) je ispitan u šaržnom reaktoru, pri čemu je najveći prinos aminokiselina postignut pri početnoj koncentraciji supstrata od 10 g/L, temperaturi od 250 °C i vremenu tretmana od 60 min. Mogućnost dobijanja aminokiselina subkritičnom vodom ispitana je i na otpadu od prerade ribe i morskih plodova. Kang i dr. (2001) su demonstrirali hidrolizu proteina iz ribljih iznutrica subkritičnom vodom. Autori su utvrdili da je maksimalni prinos aminokiselina bio na 250 °C i 4 MPa nakon 60 min u šaržnom reaktoru. Dobijene aminokiseline su bile uglavnom alanin i glicin. Primećeno je da je prinos aminokiselina zavisio pre svega od temperature i vremena hidrolize. Vreme reakcije kraće od 60 min je bilo praćeno nižim prinosima. Uopšteno, prinosi aminokiselina su se povećavali sa porastom temperature i vremena. Međutim, na suviše visokim temperaturama i pri dužim vremenima dolazilo je do reakcija dekompozicije aminokiselina, reakcija karboksilacije do amina i deaminacije do karboksilnih kiselina. U studiji Ahmed i Chun-a (2018), hidroliza subkritičnom vodom primenjena je za dobijanje hidrolizata kože tune i prethodno ekstrahovanog kolagena. Ispitivane su temperature od 150–300 °C, pritisak od 50–100 bar i vreme reakcije od 5 min. Najviši stepenn hidrolize postignut je na 250 °C. Oba hidrolizata su ispoljila antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost, s tim da je hidrolizat kolagena imao prednosti. Bioaktivnosti su varirale u zavisnosti od temperature i izvora proteina. Najvišu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost su ispoljili

hidrolizati dobijeni na 280 °C. Analiza dobijenih hidrolizata je pokazala da su peptidi male molekulske mase (<600 Da) i slobodne aminokiseline bili odgovorni za funkcionalnu aktivnost hidrolizata. Espíndola-Cortés i dr. (2017) su primenili tretman subkritičnom vodom za ekstrakciju hitina iz otpada cefalotoraksa škampi nakon deproteinizacije. Hitin i njegov deacetilovani derivat, hitozan, poseduju brojna biološka svojstva poput mukoadhezivnosti, antimikrobnog, hemostatičnog i hipoholesterolemičnog delovanja (Ding i dr., 2014). Budući da je hitozan jedini katjonski polisaharid prirodnog porekla, koristi se u farmaceutskim i biomedicinskim istraživanjima za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci i preparata za zarastanje rana (Priya i dr., 2016). U prehrambenoj industriji hitozan se koristi za konzervisanje hrane, formiranje biorazgradljivih filmova, kao emulgator i za stabilizaciju boja (Abd i Niamah, 2012). Zbog izražene biorazgradljivosti, hitin i hitozan se koriste i u prečišćavanju otpadnih voda, za modifikovanje tekstura ili uklanjanje veštačkih boja iz otpadnih voda tekstilne industrije (Bhatnagar i Sillanpää, 2009). Naime, deproteinizacija je glavni problem kod dobijanja hitina zbog ograničene hidrolize frakcija ugrađenih u kompleksnu hitin-protein mrežu. Zaostali protein može da izazove alergijske reakcije, zbog čega se zahteva potpuno uklanjanje proteina. Espíndola-Cortés i dr. (2017) su ispitali i optimizovali operativne parametre (temperatura (230, 260 i 280 °C), odnos uzorak/rastvarač (0,05, 0,09, 0,17 g CV/g H₂O) i vreme (5, 15, 30 min)) hidrolize proteina i ekstrakcije α-hitina. Maksimalan prinos α-hitina je postignut pri temperaturi ekstrakcije od 260 °C, vremenu ekstrakcije od 30 min i odnosu uzorak/rastvarač 0,17 g CV/g H₂O.

Pojedina ispitivanja su bila usmerena na primenu subkritične vode u procesu hidrolize lignocelulozne biomase, kao što je ljuska kikirikija (Zhu i dr., 2014), obezmaščene semenke grožđa i presovana palmına vlakna (Prado i dr., 2014), stabljika kukuruza (Zhao i dr., 2009), kora *Carya catheyensis* Sarg. (Shimanouchi i dr., 2014), stabljika pamuka (Williams, 2006) i dr. U studiji Sasaki i dr. (2003) je opisano dobijanje hidrolizata iz bagase šećerne trske postupnim povećanjem temperature vode sa 200 °C na 330 °C. Dobijene su frakcije bogate šećerima hemiceluloze (galaktoza, arabinoza i ksiloza) na nižim temperaturama (200–230 °C) i frakcije bogate celuloznim šećerima (glukoza i celobioza) na višim temperaturama (230–280 °C). Prinos prve i druge frakcije je bio oko 60% i 30% početne sirovine, redom. U drugoj studiji, tretman bagase šećerne trske subkritičnom vodom na 180 °C i 1 MPa tokom 30 min omogućio je izdvajanje 85% ksiloze u odnosu na početni sadržaj hemiceluloze, dok je čvrsta frakcija sadržala celulozu (Sukhbaatar i dr., 2014).

Lignocelulozna biomasa se smatra jeftinom sirovinom pogodnom za proizvodnju bio-vodonika kao obnovljivog izvora energije. Muharja i dr. (2018) su razvili integrisani proces proizvodnje vodonika iz kokosove kore primenom subkritične vode, enzimske hidrolize i fermentacije. Subkritična voda se koristila kao predtretman omogućavajući razrušavanje strukture lignoceluloznog materijala kokosove kore (41,2% lignin) i omogućavajući bolji pristup enzima celulozi i hemicelulozi. Najviši prinos redukujućih šećera (20,6%) je postignut predtretmanom subkritičnom vodom na 80 bar i 150 °C tokom 60 min i u korelaciji je sa rezultatima stepena razgradnje hemiceluloze, celuloze i lignina. U studiji koji su izveli Maciel-Silva i dr. (2019)

ispitivana je mogućnost valorizacije biomase açaí i otpadnih voda koje nastaju preradom (ukupan sadržaj šećera je oko 70%) u cilju dobijanja biogasa kroz integraciju tretmana subkritičnom vodom i anaerobne digestije. Najviši prinosi redukujućih šećera i monosaharida postignuti su primenom subkritične vode na 200 °C, tokom 20 min, pri protoku vode od 20 mL/min. Anaerobnom digestijom açaí hidrolizata dobijenog primenom subkritične vode nastajalo je 30% više metana u odnosu na proces bez predtretmana.

Poslednjih decenija, sve više pažnje se posvećuje proizvodnji biogoriva iz mikroalgi. Prinosi biodizela su daleko viši iz mikroalgi nego iz biljnih ulja. Problem predstavlja veliki sadržaj vode u biomasi zahtevajući korak sušenja. Razvijene su nove strategije koje omogućavaju konverziju mikroalgi u biodizel bez koraka sušenja. Huang i dr. (2019) su ispitali proizvodnju biodizela subkritičnom/hemijskom hidroesterifikacijom iz mikroalgi (*Nannochloropsis oceanica*, sadržaj vode 90% (m/m)). Proces hidroesterifikacije se odvijao u dva koraka: hidrolize ulja u slobodne masne kiseline subkritičnom vodom u protočnom reaktoru, i naknadne esterifikacije slobodnih masnih kiselina u metil este masnih kiselina, odnosno biodizel. Prinos slobodnih masnih kiselina nakon tretmana subkritičnom vodom na 260 °C je bio 72,3%, dok je efikasnost esterifikacije katalizovane kiselinom dostigla vrednost od 98,4%. Predtretman subkritičnom vodom je doprineo boljoj efikasnosti procesa u poređenju sa konvencionalnim tehnikama hidrolize (48,4%). Slični rezultati su zabeleženi i u studiji (Felix i dr., 2019) u kojoj je ispitana nekatalitička *in situ* transesterifikacija *Chlorella vulgaris* (sadržaj vlage 80%) u subkritičnim uslovima. Alternativna primena mikroalgi kao sirovine za proizvodnju biogoriva su makroalge, kod kojih je faza sakupljanja jednostavnija i jeftinija. Greiserman i dr. (2019) su ispitali potencijal zelene makroalge *Ulva sp.* za proizvodnju biogoriva primenom subkritične vode na temperaturi od 170–205 °C tokom 20–60 min pri udelu čvrste faze 2–8% i salinitetu vode 0–100%. Optimalni parametri za efikasno oslobađanje monosaharida su podrazumevali temperaturu od 170 °C, 5%-tni udeo čvrste faze, vreme od 40 min i 100%-tni salinitet vode. Utvrđeno je da je za oslobađanje glukoze, ksiloze, ramnoze, fruktoze i galaktoze, ali i za formiranje inhibitora fermentacije 5-hidroksimetilfurfurala, najznačajniji parametar bila procesna temperatura. Nekonvencionalni izvori ugljenika, kao što su makroalge, predstavljaju održivu alternativu za dobijanje biopolimera. U studiji koju su izveli Ghosh i dr. (2019) potvrđeno je da je hidrolizat makroalge *Ulva sp.* dobijen primenom subkritične vode na temperaturi od 180 °C tokom 30 min značajan izvor ugljenika za proizvodnju biorazgradljivog polihidroksialkanoata.

Zbog svoje izuzetne reaktivnosti, sub- i superkritična voda su se pokazale efikasnim u procesima razgradnje i recikliranja plastike. Izvedena su ispitivanja koja uključuju depolimerizaciju poli(etilen tetraftalata) (Sato i dr., 2006), najlon 6 monomera (Iwaya i dr., 2006), razgradnju termoreaktivnih smola, kao što je epoksidna smola (Okajima i dr., 2002), i razgradnja plastike ojačane karbonskim (Okajima i dr., 2017) i staklenim vlaknima (Nakagawa i Goto, 2015). U studiji koju su izveli Okajima i dr. (2019), poli(*p*-fenilen tereftalamid) vlakna su hidrolizovana u dva sastavna monomera, *p*-fenilendiamin i tereftalnu kiselinu, primenom superkritične vode, subkritične vode sa i bez dodatka natrijum-hidroksida. Tretman subkritičnom vodom i natrijum

hidroksidom u trajanju od 6 h se pokazao kao najefikasniji u potpunoj razgradnji polimernih vlakana, sa prinosima od približno 95% (250 °C, 4MPa) za svaki monomer. Bei i dr. (2017) su ispitivali uticaj temperature (240–280 °C), masenog odnosa voda/PEN (8,0 g/1,0 g do 16,0 g/1,0 g) i vremena reakcije (5–60 min) na depolimerizaciju poli(etilen naftalata) (PEN) subkritičnom vodom. Glavni proizvodi depolimerizacije su identifikovani i kvantifikovani kao 2,6-naftalen dikarboksilna kiselina i etilen-glikol. PEN je potpuno depolimerizovan na 260 °C tokom 60 min sa optimalnim odnosom mase voda/PEN od 12,0 g/1,0 g (12:1).

2.5.2.4. Kombinovane ekstrakcione tehnike

Uprkos velikom napretku u analitičkoj instrumentaciji, priprema uzoraka je i dalje kritičan korak jednog analitičkog postupka. Kompleksnost pripreme uzoraka naročito dolazi do izražaja kada je reč o analizi tragova i složenim matriksima uzoraka. Poslednjih godina razvijaju se kombinovane tehnike ekstrakcije čime se prevazilaze nedostaci individualnih tehnika uz poboljšanje efikasnosti i skraćanja vremena pripreme.

Primena ultrazvuka je česta u predtretmanu uzoraka. Ultrazvučna ekstrakcija se zasniva na akustičnoj kavitaciji koja dovodi do razaranja ćelija oštećenjem ćelijskog zida i membrane, što dalje vodi do lakšeg prodora rastvarača u ćelije, rastvaranja unutarćelijskog sadržaja i bržeg transfera jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu. Ultrazvučna ekstrakcija se može kombinovati sa drugim ekstrakcionim tehnikama, kao što su Soxhlet ekstrakcija, destilacija vodenom parom, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ubrzana ekstrakcija i ekstrakcija subkritičnom vodom (Tabela 5). Kombinovana tehnika UAE–MAE je posebno interesantna s obzirom da je dokazan efikasan sinergistički efekat ultrazvuka i mikrotalasa u ubrzavanju prenosa mase (Cravotto i Cintas, 2007; Bagherian i dr., 2011; Pongmalai i dr., 2015; Lianfu i Zelong, 2018). U cilju izolovanja etarskog ulja, ubrzana ekstrakcija može da se koristi u kombinaciji sa destilacijom sa vodenom parom (Pingret i dr., 2014; Chemat i dr., 2017). Sumere i dr. (2018) su ispitivali efikasnost kombinacije mikrotalasne i ubrzane ekstrakcije. Autori su utvrdili da kombinacija ove dve tehnike ne samo da poboljšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz kore nara, već i ubrzava sam proces (zahteva manje ciklusa). Optimizovani su snaga ultrazvuka i prečnik usitnjenih čestica pri čemu je utvrđeno da snaga ultrazvuka nije uticala na ekstrakciju čestica prečnika od 0,68 mm. Suprotno tome, efekat je bio očigledan primenom snage ultrazvuka od 480 i 640 V na uzorcima većih prečnika čestica (1,05 mm). Bagherian i dr. (2011) su istraživali efekat ultrazvučnog tretmana pre mikrotalasne ekstrakcije na prinos pektina iz grejpfruta. Ultrazvučni predtretman doprineo je većem prinosu pektina u poređenju sa vrednostima dobijenim primenom konvencionalnih ekstrakcionih tehnika i mikrotalasne ekstrakcije bez prethodnog tretmana ultrazvukom. Pongmalai i dr. (2015) su ispitivali uticaj ultrazvučnog tretmana pre mikrotalasne ekstrakcije na prinos ekstrakcije glukozinolata iz lišća kupusa. Autori su utvrdili da je ultrazvučni predtretman pri frekvenciji od 37 kHz i snazi od 320 V doveo do razrušavanja strukture biljnog materijala, rezultujući većim prinosom glukozinolata. U studiji koju su izveli Uribe i dr. (2015),

ekstrakcija primenom visokog hidrostatičkog pritiska u kombinaciji HHPE–UAE povećala je prinos bioaktivnih jedinjenja iz papaje.

Tabela 5. Primena kombinovanih ekstrakcionih tehnika.

Ekstrakciona tehnika	Ciljna klasa jedinjenja	Uzorak	Referenca
HHPE–UAE	Polifenoli, vitamin C	Papaja	Uribe i dr., 2015
HD–UAE	Etarska ulja, flavonoidi	Narandža (kora)	Allaf i dr., 2013
UAE–Soxhlet	Polifenoli	<i>Renalmia alpinia</i> (Rottb.) Maas (kora)	Vega i dr., 2017
UAE–HD	Etarska ulja	Narandža (kora)	Pingret i dr. 2014
UAE–SFE	Polifenoli	Grožđe (komina)	Da Porto i dr., 2015
UAE–SFE	Džindžerol	Đumbir	Balachandran i dr., 2006
UAE–ASE	Antocijani	Kupina, borovnica	Machado i dr., 2017
UAE–ASE	Fenoli	Nar (kora)	Sumere i dr., 2018
UAE–SWH	Polifenoli, proteini, redukujući šećeri	Kafa (talog)	Getachew i Chun, 2017
UAE–SWE	Pektin	Repin rezanac	Chen i dr., 2015
UAE–MAE	Likopen	Paradajz	Lianfu i Zelong, 2018
UAE–MAE	Glukozinolati, sulforafan, vitamin C, fenoli	Kupus	Pongmalai i dr., 2015
UAE–MAE	Pektin	Grejpfrut	Bagherian i dr., 2011
MAE–HD	Etarska ulja	Lavanda	Filly i dr., 2016
Soxhlet–SFE	Bioaktivna jedinjenja	Grožđe (semenke)	Calvo i dr., 2017
M–SFE	Flavonoidi, terpenoidi	Ginko (list)	Yang i dr., 2002
SFE–MD	Masne kiseline, tokoferoli, steroli, skvaleni	Kamelija	Zhou i dr., 2019
SFE–UAE	Masne kiseline, fenoli	Umbu (semenke)	Dias i dr., 2019
SFE–ASE	Tokoli, masne kiseline, karotenoidi, fenoli	Marakuja (semenke)	Viganó i dr., 2016a; Viganó i dr., 2016b
SFE–ASE	Polifenoli, karotenoidi	Mango (kora)	Garcia-Mendoza i dr., 2015
SFE–ASE	Stilbeni	Vinova loza	Zachová i dr., 2018
SC-Sub CO ₂	Antocijani, proantocijanidini, fenoli	Borovnica	Babova i dr., 2016

HHPE – ekstrakcija primenom visokog hidrostatičkog pritiska (*eng.* High Hydrostatic Pressure Extraction); HD – hidrodestilacija (*eng.* Hydrodistillation); SWH – hidroliza subkritičnom vodom (*eng.* Subcritical Water Hydrolysis); M – maceracija (*eng.* Maceration); SLE-EtOAc – čvrsto-tečna ekstrakcija etil-acetatom (*eng.* Solid Liquid Extraction with Ethyl-acetate); MD – destilacija (*eng.* Molecular Distillation); SC-SubC CO₂ – superkritični i subkritični ugljenik(IV)-oksid (*eng.* Supercritical-Subcritical CO₂).

S obzirom na nepolaran karakter superkritičnog ugljenik(IV)-oksida, ekstrakcija superkritičnim fluidima u kombinaciji sa drugim tehnikama ekstrakcije se uglavnom primenjuje radi uklanjanja nepolarnih komponenata s ciljem efikasnije ekstrakcije polarnijih jedinjenja. Babova i dr. (2016) su ekstrahovali antocijane i druga fenolna jedinjenja iz borovnica primenom ekstrakcije

superkritičnim ugljenik(IV)-oksidom pre ekstrakcije subkritičnim ugljenik(IV)-oksidom (*eng.* Subcritical Carbon dioxide, SubC-CO₂) sa 10%-tnim etanolom kao ko-rastvaračem. Višestepena superkritična/subkritična ekstrakcija je izvedena na 2,5 MPa i 40 °C tokom 5 h (1 h – SC-CO₂, 1 h – SubC-CO₂ sa 6%-tnim ko-rastvaračem, 3 h – SubC-CO₂ sa 9%-tnim ko-rastvaračem) što je omogućilo selektivno ekstrahovanje jedinjenja kao što su cijanidin-3-*O*-glukozid ili cijanidin-3-*O*-arabinozid za koje je dokazano da imaju visoko antioksidativno delovanje (Rop i dr., 2010; Cho i dr., 2014). Za efikasnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz tropa marakuje primenjena je kombinaciji SFE–ASE. Nekoliko uzastopnih ekstrakcija superkritičnim fluidima je primenjeno uz variranje gustine ugljenik(IV)-oksida promenom temperature i pritiska. Kao rezultat su dobijene frakcije tokola (tokoferoli i tokotrienoli), nezasićenih masnih kiselina i karotenoida (Viganó i dr., 2016a), nakon čega su iz ostataka tropa ekstrahovani fenoli primenom ubrzane ekstrakcije (Viganó i dr., 2016b). Yang i dr. (2002) su kombinovali konvencionalnu ekstrakciju sa superkritičnim ugljenik(IV)-oksidom za efikasnu ekstrakciju flavonoida i terpenoida iz *Ginkgo biloba* lista. Autori su utvrdili da se primenom ekstrakcije 70%-tnim etanolom kao predtretmana uz optimizovanu ekstrakciju superkritičnim fluidima (30 MPa, 60 °C, 5% ko-rastvarača) dobija najviši prinos flavonoida i terpenoida (35,9% i 7,3%, redom).

2.6. Određivanje bioaktivnih jedinjenja

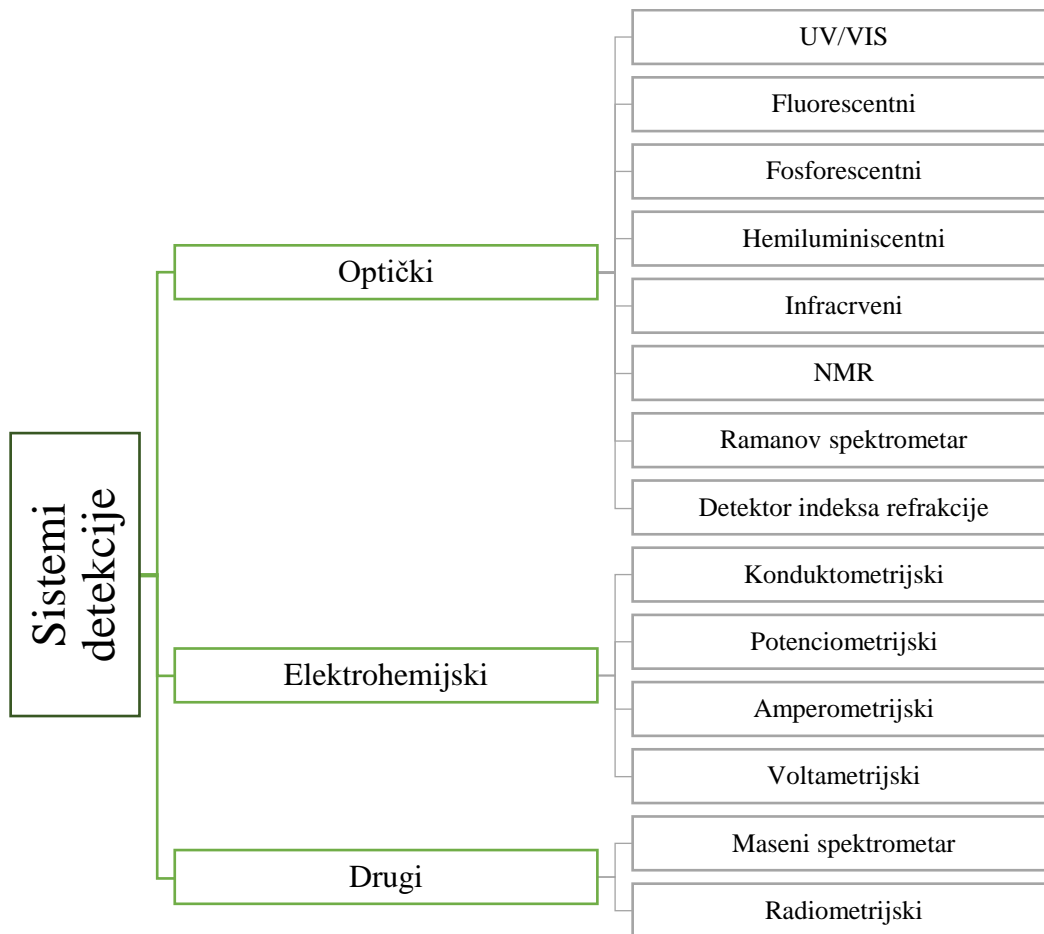
2.6.1. Visokopritisna tečna hromatografija

Separacione metode, među kojima vodeću ulogu ima hromatografija, zauzimaju značajno mesto u hemijskoj karakterizaciji uzoraka različitog porekla. U literaturi je opisan veliki broj hromatografskih metoda, metoda razdvajanja u električnom polju, difuzionih i sedimentacionih metoda, za određivanje različitih klasa jedinjenja u najrazličitijim uzorcima. Neke od najzastupljenijih metoda su UV/VIS spektrofotometrija, elektrohemijske metode (potencimetrija i amperometrija) i kapilarna elektroforeza, tankoslojna, tečna i gasna hromatografija. Elektroforeza se uspešno primenjuje za razdvajanje većih biopolimera (polipeptidi, proteini, oligonukleotidi, DNK, RNA i oligosaharidi) kako u preparativne, tako i u analitičke svrhe, kao i za određivanje njihovih genetskih varijanti. Gasna hromatografija (*eng.* Gas Chromatography, GC) se uglavnom koristi za određivanje nepolarnih i lako isparljivih organskih jedinjenja. Gasno-hromatografska analiza polarnih organskih supstanci najčešće zahteva i korak derivatizacije kojim se polarna organska jedinjenja prevode u manje polarne isparljivije i termički stabilnije derivate. U cilju povećanja osetljivosti hromatografske analize, hromatografija se kombinuje sa visokoselektivnim detektorima, kao što su maseni, infracrveni, nuklearno magnetno rezonantna spektroskopija (*eng.* Nuclear Magnetic Resonance, NMR), atomska apsorpciona spektrometrija i dr., a moguće je i međusobno kombinovati više hromatografskih koraka. Među hromatografskim metodama značajno mesto zauzima moderna, osetljiva, tačna i precizna visoko-efikasna tečna hromatografija. Visokopritisna tečna hromatografija (*eng.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je danas najšire primenjivana hromatografska tehnika u kvalitativnim, a posebno u kvantitativnim analizama najvećeg broja biološki aktivnih klasa jedinjenja. Osnovni cilj moderne tečne

hromatografije jeste visoka efikasnost razdvajanja u dovoljno kratkom vremenu, uz nisku granicu detekcije.

2.6.1.1. Sistemi detekcije

Najčešći sistemi detekcije se mogu grupisati u tri velike grupe: optički, elektrohemijski i drugi. Detektori se takođe mogu klasifikovati prema tome da li su destruktivni (elektrohemijski, masena spektrometrija, itd.) ili nedestruktivni (UV/VIS, fluorescentni, itd.). Slika 13 prikazuje podelu osnovnih sistema detekcije koji se koriste u tačnoj hromatografiji.



Slika 13. Osnovni sistemi detekcije tačno-hromatografskim tehnikama (Borrás Linares, 2013).

U slučaju određivanja fenolnih jedinjenja najprimenjeniji detektori su UV/VIS, kao i maseni detektori. Pored njih, u analizi fenolnih komponenti primenu nalaze i elektrohemijski, fluorescentni detektor, kao i NMR (Peyrat-Maillard i dr., 2000; Jürgenliemk i Nahrstedt, 2002; Zhou i dr., 2011). Tačna hromatografija spregnuta sa više sistema detekcije, npr. LC-UV/VIS-MS, LC-MS/MS i LC-NMR-MS, omogućava detekciju velikog broja jedinjenja u širokom opsegu koncentracija. U nastavku su opisani UV/VIS i maseni detektori, koji su se koristili u eksperimentalnom delu ove doktorske teze.

2.6.1.1.1. UV/VIS detektori

UV/VIS detektor je najčešće korišćen detektor u tačnoj hromatografiji. Može se koristiti za supstance koje apsorbuju u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti. Apsorpcija vidljivog i ultraljubičastog zračenja dovodi do elektronskih prelaza u molekulima i njihovim jonima. Elektronski prelazi se uglavnom ostvaruju prelaskom elektrona sa osnovnih singletnih na pobuđene energetske nivoe na način da se elektroni pobuđuju u orbitalu više energije. Prilikom prelaza elektrona dolazi do promene internuklearnih udaljenosti, kao i promene rotacione i vibracione energije kao dela ukupne energije molekula. Elektronski prelazi se ostvaruju u uskoj oblasti energija u UV i VIS oblasti, te su odgovarajući spektri različitih jedinjenja slični, ograničavajući oblast njihove primene.

Detekcija UV/VIS detektorima se zasniva na merenju apsorpcije ispitivane supstance na određenoj talasnoj dužini. Zbog svojih biohemijskih i molekulskih svojstava, fenolna jedinjenja su pogodna za detekciju UV/VIS sistemom. Sposobnost fenolnog prstena da apsorbuje UV zračenje i činjenica da su neka od fenolnih jedinjenja obojena, tj. da apsorbuju u vidljivoj oblasti, koriste se za karakterizaciju ovih jedinjenja. Hidroksibenzojeve kiseline, kao što je galna kiselina, apsorbuju u oblasti spektra od 200–290 nm. S druge strane, hidroksicimetne kiseline (kaftarna i kumarna kiselina) imaju maksimum apsorpcije na 270–360 nm. UV spektri flavonoida sastoje se iz dva glavna apsorpciona maksimuma. Apsorpcija u oblasti spektra od 300–380 nm (apsorpciona traka I) potiče od cinamoil sistema prstena B, dok apsorpcija u oblasti 240–280 nm (apsorpciona traka II) potiče od benzoil sistema prstena A (Abad-García i dr., 2009). Pored navedenih apsorpcionih traka, svaka grupa flavonoida poseduje karakteristične apsorpcione trake. Flavonoli apsorbuju u dve oblasti spektra i to na 250–270 nm i na 350–380 nm (rutin, kvercetin). S obzirom da je apsorpciona traka II kod flavanola i flavonona identična, za razlikovanje ove dve grupe flavonoida posmatra se opseg apsorpcione trake I. Monomeri flavanola apsorbuju UV zračenje sa maksimumom apsorpcije na oko 280 nm. Ova bezbojna jedinjenja ne pokazuju svojstva apsorpcije u vidljivom području elektromagnetnog spektra. Monomeri flavanola mogu sadržati galoil grupu vezanu za strukturu flavan-3-ola. Galoilovani flavanoli imaju veći intenzitet apsorpcije u poređenju sa negaloilovanim oblikom, pokazujući maksimum apsorpcije na 310 nm, karakterističan za galoil grupu (Boulet i dr., 2017). Za polimere flavanola ili tanine karakteristike apsorpcije ostaju iste uprkos stepenu polimerizacije. UV spektri antocijana sastoje se iz dva apsorpciona maksimuma, na 240–280 nm, zajedničkim za većinu fenolnih jedinjenja, kao i na 450–560 nm karakterističnim za crveno bojena jedinjenja. Flavanoni, flavan-3-oli i proantocijanidini apsorbuju samo u jednoj oblasti spektra na 270–290 nm (apsorpciona traka II). Odsustvo ili mala apsorpcija u opsegu apsorpcione trake I uzrokovana je nedostatkom konjugacije između prstena B i ostatka molekula (odsustvo dvostruke veze). Prstenovi mogu biti supstituisani šećernim jedinicama, hidroksilnim, metoksi ili drugim grupama, što dovodi do promene položaja i intenziteta apsorpcionih maksimuma u odnosu na polazno jedinjenje. Glikozilacija hidroksilne grupe može da prouzrokuje smanjenje širine apsorpcione trake I (Santos-

Buelga i dr., 2003). Acilni supstituenti u glikozilima izazivaju dodatni maksimum u UV spektru flavonoidnih glikozida. Kumaroil supstituent uvodi dodatni maksimum apsorpcije na 310–320 nm u UV spektru kaempferol i kvercetin glikozida (Soliman i dr., 2000; Mihara i dr., 2004).

Tabela 6. Apsorpcione trake različitih grupa fenolnih jedinjenja (Borrás Linares, 2013).

Fenolna jedinjenja		Apsorpciona traka (nm)	
Fenolne kiseline	Hidroksibenzoeve kiseline	200–290	
	Hidroksicimetne kiseline	270–360	
Flavonoidi	Kumarini	220–230	310–350
	Halkoni	220–270	340–390
	Dihidrohalkoni	~220	~280
	Auroni	240–270	340–370
	Flavoni	250–270	330–350
	Flavonoli	250–270	350–380
	Flavanoni		270–295
	Flavan-3-oli		270–280
	Izoflavoni	245–270	300–340
Antocijanini	Antocijanidini	240–280	450–560
	Proantocijanidini		~280

Jedno od ograničenja primene UV/VIS detektora je nemogućnost prepoznavanja prisustva šećera ili akil grupa vezanih sa fenolnim jedinjenjima, jer ove grupe jedinjenja nisu jaki hromofori. Pored toga, ovaj način detekcije ne pruža informacije o strukturi jedinjenja, te je potrebno koristiti komercijalne standarde za nedvosmislenu identifikaciju jedinjenja. Međutim, jednostavnost, brzina i relativno niska cena UV/VIS detektora čine njihovu upotrebu široko rasprostranjenom, samostalno ili u kombinaciji sa drugim načinima detekcije kao što su masena spektrometrija i NMR.

2.6.1.1.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (*eng.* Mass Spectrometry, MS) je savremena instrumentalna tehnika koja ima široku primenu u savremenoj analitici pri identifikaciji jedinjenja, a pre svega zbog svoje selektivnosti i činjenice da je jedan od retkih sistema detekcije koji pruža informacije o strukturi jedinjenja (Aaby i dr., 2007). Hromatografske tehnike spregnute sa masenom spektrometrijom se najčešće primenjuju u analizi kompleksnih smeša. Supstance koje su temperaturno nestabilne, visoko polarne ili sa visokom molekulskom masom najčešće se određuju pomoću HPLC–MS.

Masena spektrometrija se najčešće koristi za:

- identifikaciju i kvantifikaciju poznatih jedinjenja,
- identifikaciju nepoznatih jedinjenja i
- upoznavanje hemijske strukture i osobina različitih jedinjenja.

Princip rada masenog spektrometra zasniva se na karakterističnoj jonizaciji molekula i razdvajanju nastalih jona na osnovu razlike odnosa mase prema naelektrisanju (m/z). Svi maseni spektrometri rade pod visokim vakuumom da bi se međusobno reagovanje jona svelo na minimum (De Hoffmann i Stroobant, 2002). Osnovne komponente masenog spektrometra su: sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, jedan ili više masenih analizatora i jonski detektor. Uzorak se unosi u jonski izvor direktno ili nakon hromatografskog razdvajanja, gde se molekuli jonizuju na specifičan način. Nastali joni se razdvajaju prema njihovom m/z odnosu u masenom analizatoru, nakon čega se detektuju (Ardrey, 2003). Maseni analizatori se nalaze u polju visokog vakuuma koji omogućava da joni dođu do detektora bez sudara sa molekulima vazduha, jer bi u protivnom bili neutralisani i ne bi se mogli detektovati (De Hoffmann i Stroobant, 2002).

Grafički prikaz signala masenog detektora u toku vremena predstavlja maseni hromatogram. Registrovanjem intenziteta svih nastalih jona dobija se ukupni jonski hromatogram (*eng.* Total Ion Chromatogram, TIC). Radi povećanja osetljivosti i selektivnosti u detektoru se mogu registrovati samo određeni joni, čime se dobija hromatogram odabranog jona (*eng.* Selected Ion Monitoring, SIM) koji povećava osetljivost i selektivnost MS analize. Detektovanjem jona koji je nastao kao rezultat fragmentacije prethodno nastalog jona dobija se hromatogram odabrane reakcije (*eng.* Selected Reaction Monitoring, SRM).

U pojedinim slučajevima, MS ne može dati detaljnu informaciju o strukturi jedinjenja. Na primer, masenim detektorom se ne mogu razlikovati izomeri (Pérez-Trujillo i dr., 2010). U tom slučaju treba primeniti neki drugi vid detekcije, na primer NMR spektroskopiju ili tandemsku masenu spektrometriju.

2.6.1.1.2.1. Tehnike jonizacije

Izbor tipa jonizacije zavisi od nekoliko faktora, od kojih su najbitniji polarnost jedinjenja, molekulska masa, termička stabilnost i sastav uzorka.

U zavisnosti od vrste izvora energije za jonizaciju razlikuju se sledeće tehnike jonizacije:

- Jonizacija elektronima (*eng.* Electron Impact, EI) – postiže se bombardovanjem neutralnih molekula u gasovitom stanju elektronima velike energije, koji pri sudaru izbijaju elektrone iz molekula analita. Elektroni koji se koriste za jonizaciju elektronima nastaju na užarenoj niti (katodi) i dalje se ubrzavaju električnim poljem do željene energije. Sudarom snopa elektrona sa molekulima ispitivane supstance dolazi do izbijanja valentnih elektrona. Ovaj vid jonizacije se koristi samo u slučaju kada su analiti u gasovitom stanju.
- Hemijska jonizacija (*eng.* Chemical Ionization, CI) – spada u „meke“ jonizacione tehnike koje favorizuju nastanak molekuskog jona sa malim viškom energije i bez značajne fragmentacije. Hemijska jonizacija se postiže bombardovanjem molekula elektronima gasa (metan, amonijak, izobutan), jonizujući ih. Nastali joni gasa dalje, posredno, reaguju sa molekulima uzorka. Ovaj vid jonizacije se koristi samo u slučaju kada su analiti u gasovitom stanju.

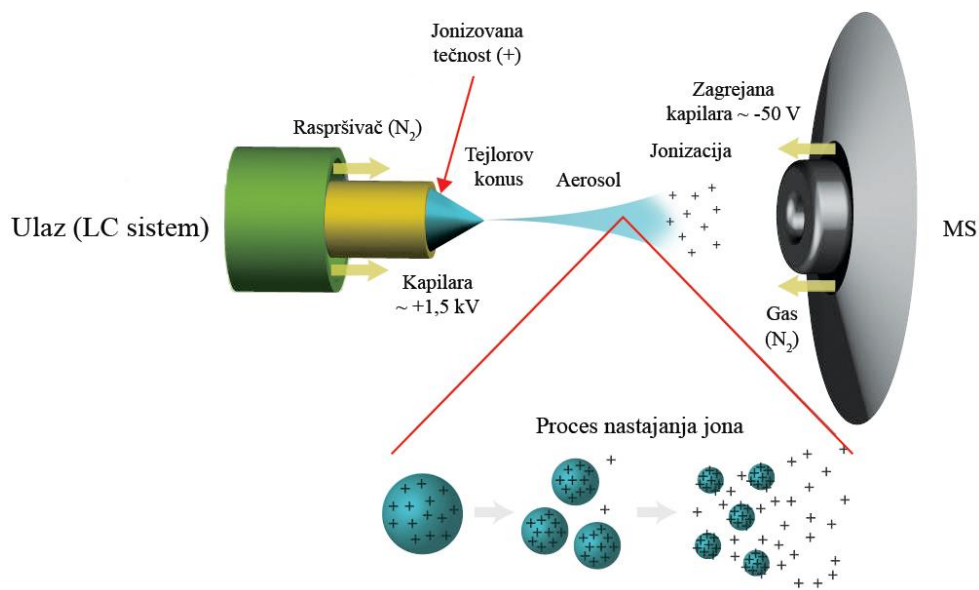
- Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (*eng.* Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) – jonizacioni proces se postiže na sličan način kao kod hemijske jonizacije, ali se odvija na atmosferskom pritisku. U jonski izvor se uvodi fini aerosol tečnog uzorka iz kojeg se rastvarač uklanja uparavanjem u zagrejanu kvarcnu komori, čime se neutralni molekuli analita prevode u gasovito stanje. Molekuli analita zatim stižu do elektrode na kojoj se odigrava jonizacija. Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku se koristi u analizi slabo polarnih i jedinjenja male molekulske mase do 1500 Da.
- Termosprej jonizacija (*eng.* Thermospray Ionization, TS) – spada u „meke“ jonizacione tehnike. Mehanizam formiranja jona pomoću termosprej jonizacije je definisan sledećim koracima: (a) prolazak tečnog uzorka kroz tanku zagrejanu kapilaru u kojoj dolazi do delimičnog isparavanja rastvarača i raspršivanja tečnog uzorka; (b) dekompozicija formiranih kapljica izazvana toplotnom energijom, kao i mehaničkim i hidrodinamičkim procesima u zagrejanu komori; (c) uklanjanje rastvarača uparavanjem pri čemu se oslobađaju joni iz sitnih kapljica i usmeravaju ka masenom analizatoru. Termosprej jonizacija je pogodna za jonizaciju neisparljivih i termonestabilnih jedinjenja (Ardrey, 2003).
- Fotojonizacija na atmosferskom pritisku (*eng.* Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) – tokom fotojonizacije na atmosferskom pritisku molekul se prevodi u jonsko stanje nakon interakcije sa fotonom koji dolazi od svetlosnog izvora. Kao svetlosni izvor se koristi kripton lampa koja emituje fotone. Molekuli sa jonizacionim potencijalom nižim od ovih vrednosti se jonizuju i prelaze u M^+ ili $(M+H)^+$ jonizacioni oblik, dok se molekuli sa većim jonizacionim potencijalom ne mogu jonizovati na ovaj način.
- Bombardovanje brzim atomima (*eng.* Fast Atom Bombardment, FAB) – zasniva se na bombardovanju molekula analita rastvorenih u neisparljivom matriksu (sastoji se od slaboisparljivih rastvarača kao što su glicerol, tioglicerol, trietanolamin, itd.) snopom neutralnih atoma ili jonskim snopom. Snop neutralnih atoma se dobija jonizacijom najčešće argona ili ksenona, koji se zatim neutrališu protokom kroz kolizionu ćeliju. Jonski snop se dobija jonizacijom molekula cezijuma. Ovaj način jonizacije obezbeđuje veću osetljivost u analizi jedinjenja velikih molekulskih masa.
- Jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom (*eng.* Matrix-Assisted Laser Desorption, MALDI) – zasniva se na bombardovanju uzorka pomoću pulsno laserskog snopa. Laser izaziva desorpciju i jonizaciju ispitivane supstance bez hemijske degradacije. Uzorak se za ovu tehniku priprema mešanjem uzorka sa specijalnim matriksom. Matriks ima ulogu da apsorbuje energiju primenjenog lasera, štiteći molekule uzorka od raspada. Kao matriks se najčešće koriste nikotinska, sinapinska, 2,5-dihidroksibenzoeva i α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina. Ova tehnika se koristi za analizu velikih molekula, prirodnih polimera, proteina i peptida (Nordhoff i dr., 2003).
- Elektrosprej jonizacija (*eng.* Electrospray Ionization, ESI) – tehnika jonizacije u spreju pri atmosferskom pritisku koja omogućava detekciju širokog spektra jedinjenja pre svega neisparljivih i termonestabilnih. Za elektrosprej jonizaciju neophodno je da jedinjenja poseduju funkcionalne grupe koje se mogu jonizovati kiselobaznim reakcijama ili građenjem

adukata sa jonima iz rastvora. Elektrosprej jonizacija spada u tzv. „meke“ jonizacione tehnike, tj. koristi relativno blage uslove jonizacije, zbog čega u jonskom izvoru najčešće ne dolazi do fragmentacije ili je fragmentacija slabo izražena, i moguće je detektovati pseudomolekulske jone analita. Elektrosprej jonizacija je detaljnije opisana u nastavku, s obzirom na to da se koristila u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije.

Osim gore navednih načina jonizacije, danas se koriste i drugi, poput površinske ili termalne jonizacije (*eng.* Surface Ionization, SI), jonizacije desorpcijom u električnom polju (*eng.* Field Desorption, FD), jonizacije plazma desorpcijom (*eng.* Plasma Desorption, PD), jonizacije i desorpcije laserom (*eng.* Laser Ionization/Laser Desorption, LI/LD), jonizacije brzim jonima (*eng.* Fast Ion Bombarding (Secondary Ion Mass Spectrometry), FIB (SIMS)) i dr.

Elektrosprej jonizacija

Elektrosprej jonizacija podrazumeva stvaranje finog aerosola tečnog uzorka njegovim propuštanjem kroz naelektrisanu kapilaru od nerđajućeg čelika (Slika 14). Naelektrisane čestice, od kojih svaka sadrži jone analita i molekule rastvarača, formiraju se na atmosferskom pritisku. Od izlaza iz kapilare do ulaza u područje visokog vakuuma, koji su razdvojeni 1–3 cm, dolazi do isparavanja rastvarača iz malih naelektrisanih kapljica tečnog uzorka. U toploj struji gasa za sušenje (azot), rastvarač isparava, uz smanjenje veličine kapljica i povećanja gustine naelektrisanja na njihovoj površini. U momentu kada gustina naelektrisanja dostigne kritičnu vrednost i elektrostatičko odbijanje nadjača površinski napon, dolazi do tzv. „Kulonove eksplozije“ i oslobađanja jona analita. Ovaj proces se ponavlja sve dok na kraju ne ostanu potpuno desolvatisani joni. U zavisnosti od električnog polja i broja mesta u molekulu koja se mogu jonizovati, nastali joni mogu biti pozitivno ili negativno, kao i jednostruko ili višestruko naelektrisani. Nastali joni se jonskom kapilaram vode do masenog analizatora.



Slika 14. Elektrosprej jonizacija.

Elektrosprej jonizacija predstavlja tzv. „meku“ jonizacionu tehniku, koja daje protonovani molekulski jon $[M+H]^+$ u pozitivnoj jonizaciji, odnosno deprotonovani molekulski jon $[M-H]^-$ u negativnoj jonizaciji, ili adukt jone sa natrijumom (MNa^+), amonijakom (MNH_4^+) ili acetatom (MCH_3COO^-), a pri tom se izvor jona nalazi na atmosferskom pritisku. Elektrosprej jonizacija je pogodna za polarna jedinjenja sa molekulskom masom od 100 do 100000 Da (Ardrey, 2003). Da bi se potpomoglo protonovanje baznih molekula, obično se u mobilnu fazu dodaju organske kiseline (mravlja ili sirćetna). Za neutralne molekule, koji teško jonizuju, koriste se organske soli (npr. amonijum-acetat ili amonijum-formijat), čime se pospešuje formiranje adukata sa katjonima (NH_4^+ , Na^+ ili K^+) ili anjonima (acetatni ili formijatni) u rastvoru (Zhu i Cole, 2000).

Na proces jonizacije, kao i na jačinu ESI signala, utiču osobine mobilne faze (viskozitet, isparljivost, provodljivost, dielektrična konstanta, površinski napon, koncentracija elektrolita i pH) i fizičko-hemijske osobine analita (hidrofobnost, površinska aktivnost, kiselo-bazna svojstva, itd.). Sastav mobilne faze u značajnoj meri utiče na stabilnost elektrospreja. Sa povećanjem udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi, raste i stabilnost elektrospreja (Cech i Enke, 2001). Veći udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi doprinosi i povećanju osetljivosti, tj. signala ESI-MS detektora. Utvrđeno je da je intenzitet signala jona polarnih analita veći u mobilnoj fazi sa metanolom, nego u mobilnoj fazi koja kao organsku komponentu sadrži acetonitril (Mathis i McCord, 2005). Dodatak kiseline u mobilnu fazu suzbija jonizaciju fenolnih i karboksilnih grupa, čime se poboljšava simetrija (smanjuje „tailing“ efekat) pikova.

Osnovna prednost elektrosprej jonizacione tehnike je mogućnost analize jedinjenja koja nisu pogodna za gasno-masenu analizu i termosprej jonizaciju, kao što su termolabilna jedinjenja. Kako elektrosprej jonizacijom nastaju višestruko naelektrisani joni, moguće je kao detektore koristiti i spektrometre masa uskog m/z mernog opsega. Ovom tehnikom jonizacije moguće je određivanje kako relativno malih molekula poput peptida te organskih i neorganskih jedinjenja, tako i velikih makromolekula poput proteina, RNA i DNA (Vučinić, 2012). Naročito je pogodna za analizu jonizovanih i polarnih jedinjenja kao što su biopolimeri (proteini, glikoproteini i nukleotidi), lekovi i njihovi metaboliti, kao i industrijski polimeri (polietilenglikol).

Iako je elektrosprej jonizacija jedna od najčešće korišćenih tehnika jonizacije u HPLC-MS analizi, njen glavni nedostatak je mogućnost pojave efekta nedovoljne jonizacije, a ređe pojačane jonizacije, usled prisustva koeluirajućih interferirajućih supstanci iz matriksa. Smanjena jonizacija analita u kompleksnim matriksima može se objasniti visokom koncentracijom neisparljivih supstanci u spreju koje smanjuju efikasnost otparavanja rastvarača. Zato je izuzetno važno uklanjanje neisparljivih komponenti tokom pripreme uzorka. Jedan od nedostataka je i nelinearnost signala detektora pri višim koncentracijama, kao i neophodnost podešavanja optimalnih pH-vrednosti mobilne faze.

2.6.1.1.2.2. Maseni analizatori

Različiti tipovi masenih analizatora koriste statičko ili dinamičko električno ili magnetno polje ili njihovu kombinaciju, a razlikuju se prema principu rada, opsegu razdvajanja m/z , preciznosti, rezoluciji, brzini spektralne akvizicije, osetljivosti i dr.

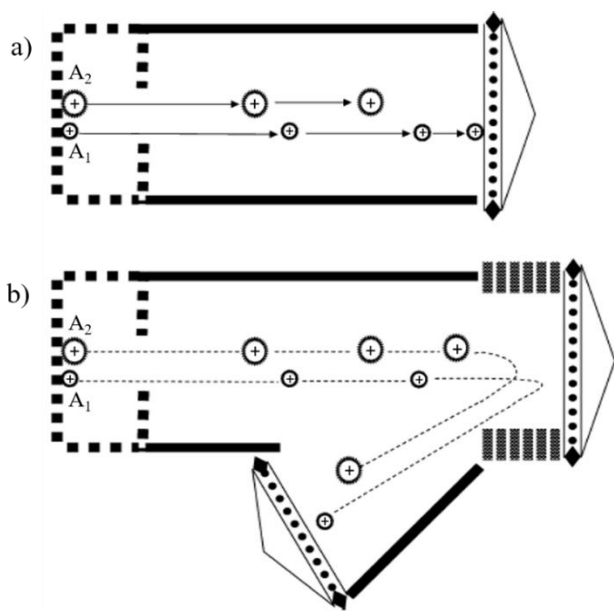
- Magnetni analizator (*eng.* Magnetic Sector Analyzer, MSA) – sastoji se od magneta, između čijih polova prolaze joni nastali u jonskom izvoru. Na ulasku i izlasku iz magnetnog sektora nalaze se dve pukotine koje ograničavaju snop jona koji ulaze, odnosno izlaze iz sektora. U magnetnom polju dolazi do različitog skretanja jona u zavisnosti od njihove vrste. Pri ulasku u analizator svi joni imaju istu brzinu tako da se razdvajanje u magnetnom polju izvodi na osnovu vrednosti odnosa m/z jona tj. joni različitog m/z putuju različitim radijusima krivine. Jačina magnetnog polja određuje jon koji će biti detektovan. Ovaj analizator je spor, ali odlikuje ga visoka rezolucija, osetljivost i širok opseg masa.
- Električni analizator (*eng.* Electric Sector Analyzer, ESA) – sličan je magnetnom analizatoru, samo što se umesto magnetnog polja upotrebljava električno polje, a razdvajanje u električnom polju izvodi se promenom napona na elektrodama.
- Kvadrupolni analizator (*eng.* Quadrupole Analyzer, Q) – sastoji se od četiri valjkaste paralelne elektrode, kojima se saopštava naizmenična struja. Joni koji se kreću između elektroda bivaju privučeni suprotno naelektrisanim elektrodama i kreću se ka njima. Pre nego što udare u njih menja se polaritet elektrode. Kroz analizator prolaze samo određeni joni, dok ostali udaraju u elektrode i razelektrišu se.
- Analizator na bazi vremena preleta jona (*eng.* Time of Flight Analyzer, TOF) – razdvajanje jona se izvodi na bazi vremena koje je potrebno jonima različitih masa da stignu od jonskog izvora do detektora. Joni se iz jonizatora ubrzavaju pomoću homogenog električnog polja. Joni nižih masa se jače ubrzavaju i prvi dolaze do detektora. Vreme koje je potrebno da jon pređe put od jonskog izvora do detektora (region preleta ili *drift* tuba) će zavisiti od njegovog m/z odnosa. TOF analizator je brz, ali ima lošiju selektivnost u odnosu na električni ili magnetni analizator. On je opisan detaljnije u nastavku, s obzirom na to da je korišćen u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije.
- Jonska zamka (*eng.* Ion Trap Analyzer, IT) – je uređaj koji se ponaša kao trodimenzionalni kvadrupol, a sastoji se od tri elektrode, jedne prstenaste i dve tanjiraste koje zatvaraju prsten sa donje i gornje strane, stvarajući tako komoru u kojoj su „zarobljeni“ joni različitih masa. Joni ulaze i napuštaju detektor kroz otvore na tanjirastim elektrodama. Dovođenjem određenog radiofrekventnog signala na prstenastu elektrodu postiže se zadržavanje samo odabranog jona u prostoru elektrode. Tanjiraste elektrode su uzemljene. Unutar komore joni se kreću stabilnim trodimenzionalnim putanjama sve do promene napona elektroda. Helijum se uvodi u komoru pod visokim vakuumom i ima ulogu da, sudarajući se sa jonima, smiruje njihove oscilacije i na taj način ih stabilizuje. Promenom napona na prstenastoj elektrodi putanja jona određene mase se destabilizuje i oni bivaju izbačeni ka detektoru. Glavni nedostatak IT masenog analizatora je ograničen dinamički opseg, usled ograničenog broja jona koji mogu biti prisutni u „zamci“.

Jonska zamka koristi radiofrekventno kvadrupolno polje koje čuva jone u tri ili dve dimenzije. Tako se IT analizatori mogu podeliti na 3D jonsku zamku i 2D jonsku zamku. Velika prednost 2D analizatora u odnosu na 3D je veći kapacitet skladištenja jona zbog veće zapremine „zamke“ i zbog toga što se joni ne skladište samo u jednoj tački u centru, već po centralnoj liniji „zamke“.

- Orbitrap (*eng.* Orbitrap) – baziran je na konceptu jonske zamke gde su joni zarobljeni u elektrostatičkom polju koje stvaraju centralna vretenasta i dve spoljašnje cilindrične elektrode. Komora koju čini prostor između unutrašnje i spoljašnjih elektroda povezana je sa sistemom vakuum pumpi koji omogućava uslove visokog vakuuma. Joni koji ulaze u orbitrap spiralno osciluju oko centralne elektrode istom amplitudom, ali na različitim frekvencijama, što rezultuje njihovim odvajanjem. Joni osciluju na frekvenciji radijalnog oscilovanja, frekvenciji rotacije i frekvenciji aksijalnog oscilovanja, pri čemu se samo aksijalna frekvencija koristi za analizu masa. Aksijalna frekvencija je obrnuto proporcionalna odnosu mase i naelektrisanja jona i može se konvertovati u maseni spektar Furijeovom transformacijom signala. Orbitrap ima visoku rezoluciju do 150000, opseg m/z do 6000, kao i preciznost m/z pri visokim masama od 2–5 ppm.

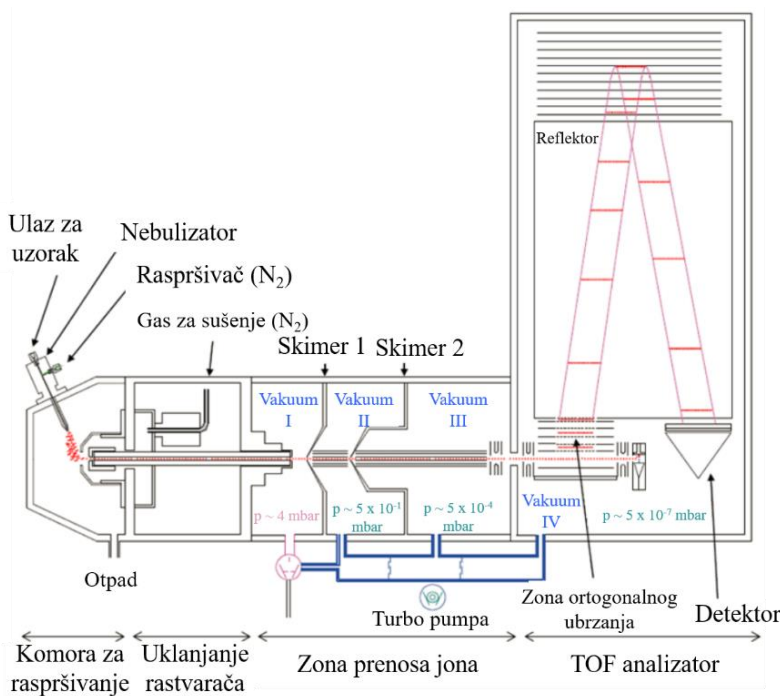
Analizator na bazi vremena preleta jona (TOF)

Analizator na bazi vremena preleta jona razdvaja jone na osnovu razlike u vremenu koje je potrebno jonima različitih masa da stignu od jonskog izvora do detektora kroz cev dužine 1–2 m. Joni se u cevi ubrzavaju primenom elektrostatičkog polja koje im saopštava visoku kinetičku energiju. Za istovremeno formirana dva jona istog naelektrisanja (A_1 i A_2), pri čemu je masa A_1 manja od mase A_2 , pod istim uslovima, do detektora prvi stiže A_1 (Slika 15a). Linearni analizator karakteriše visoka osetljivost, ali lošija selektivnost. U cilju poboljšanja selektivnosti, razvijen je refleksioni TOF analizator koji sadrži elektrostatički reflektor (Slika 15b). Joni istog odnosa m/z nemaju potpuno istu kinetičku energiju zbog čega do detektora stižu u različito vreme. Kako bi se razlika njihovog vremena preleta povećala, pre detektora oni se usmeravaju na reflektor. Elektrostatički reflektor je elektrostatičko ogledalo sastavljeno od serije prstenova ili rešetki rastućeg potencijala. Uloga reflektora je produženje putanje i fokusiranje kinetičke energije jona. Joni sa nižom kinetičkom energijom, ali istim odnosom m/z manje prodiru u elektrostatičko polje prelazeći kraće distance, dok joni sa višom kinetičkom energijom dublje prodiru u elektrostatičko polje prelazeći duža rastojanja. Iako fokusiranje jona poboljšava selektivnost, ono smanjuje osetljivost i uvodi ograničenje opsega masa. Refleksioni mod koristi se kod analize peptida i malih molekula, a linearni za proteine srednjih i visokih molekulskih masa.



Slika 15. TOF analizador u a) linearnom i b) refleksionom modu.

Slika 16 daje šematski prikaz delova masenog detektora sa TOF masenim analizatorom. Glavne prednosti ovog detektora su neograničen opseg m/z vrednosti, velika brzina skeniranja, visoka osetljivost, selektivnost i tačnost merenja m/z vrednosti. Vrednosti m/z određene ovim analizatorom, u kombinaciji sa izotopskom raspodelom, omogućavaju određivanje molekulske formule analita, što značajno olakšava identifikaciju, zbog čega se TOF trenutno kupluje sa skoro svim jonizacionim tehnikama.



Slika 16. Šema masenog detektora sa TOF analizatorom.

2.6.1.1.3. Tandemska masena spektrometrija

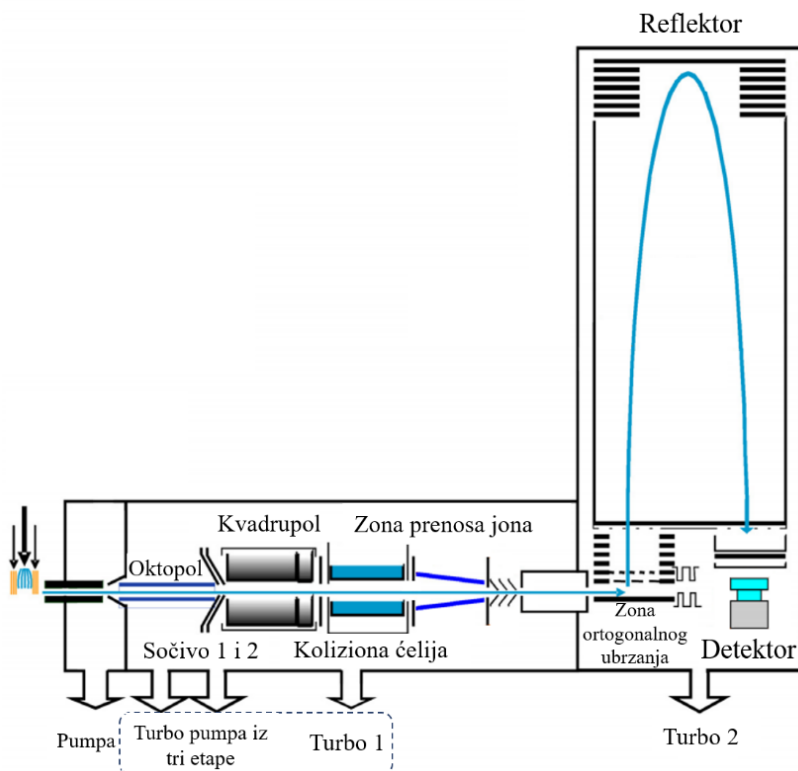
Tandemska masena spektrometrija omogućava tačnu i pouzdanu detekciju veoma niskih koncentracija analita u kompleksnim matriksima. Ovom metodom rešava se problem identifikacije i kvantifikacije analita koji imaju istu molekulsku masu, ali različite fragmentne jone, ili jedinjenja koje nije moguće potpuno hromatografski razdvojiti. Ipak, određeni stepen prethodnog razdvajanja je potreban radi smanjenja uticaja matriksa i poboljšanja odnosa signala i šuma (Díaz-Cruz i Barceló, 2005). Tandemska masena spektrometrija podrazumeva najmanje dva stepena analize masa, odnosno barem dva masena analizatora. Pri tome prvi analizator služi da izoluje jon prekursor, koji se zatim fragmentiše, dajući kao proizvode fragmentacije produkt jon i neutralni fragment. Drugi maseni analizator služi za analizu nastalih fragmenata. Moguće je, takođe povećati broj koraka, odnosno vezati još jedan maseni analizator koji će fragmentisati nastali produkt jon, analizirati novonastale fragmente, pa od njih izdvojiti novi jon koji će se dalje fragmentisati. Ovakva višestepena maseno-spektrometrijska analiza se označava kao MSⁿ (De Hoffmann i Stroobant, 2002; Ardrey, 2003). Dvostepena masena analiza (MS/MS) može se izvoditi tandemom u prostoru ili tandemom u vremenu.

MS/MS u prostoru postiže se primenom dva masena spektrometra vezana serijski pri čemu se analize simultano izvode, ali su prostorno odvojene. Moguće je izvoditi i MS analizu u prostoru sa tri seta kvadrupolnih analizatora povezanih serijski. Prvi kvadrupol izoluje jon prekursor, u drugom (koliziona ćelija) se izvodi fragmentacija i fokusiranje određenih jona ka trećem analizatoru, dok se u trećem izvodi analiza produkt jona i fragmenata. Koliziona ćelija uz pomoć inertnog gasa argona omogućuje dodatnu, kolizijom indukovanu fragmentaciju (disocijaciju) molekulskih jona (*eng.* Collision Induced Dissociation, CID) nastalih u jonskom izvoru i propuštenih kroz prvi maseni kvadrupol. Dodatna fragmentacija se ostvaruje pri određenom naponu, ubrzavanjem kretanja stvorenih jona (prekursor joni) i preostalih neutralnih molekula uslovljavajući njihovo međusobno sudaranje sa molekulima vazduha i/ili argona. Krajnji ishod je cepanje veza u molekulu analita i stvaranje novih jonskih fragmenata – produkt jona. Najčešće nastaju fragmenti raskidanjem C–N i C–O veza. U drugom kvadrupolu mogu se dalje pratiti svi novonastali joni ili samo selektovane jonske masa. Primenom CID-a obogaćuje se maseni spektar, a analiza postaje specifičnija i osjetljivija. Moguće je takođe kombinovati elektromagnetni analizator sa dva kvadrupola ili dva kvadrupola sa TOF-om.

MS/MS u vremenu znači da se analize izvode u istom prostoru, ali u različito vreme. Postiže se korišćenjem jonske zamke, gde se sukcesivno u samoj zamci prvo izvodi odabir jona prekursora, zatim njegova fragmentacija, analiza produkt jona, njihova fragmentacija, itd. (De Hoffmann i Stroobant, 2002). Izolovanje jona analita koji treba dalje da se fragmentiše postiže se povećanjem napona, pri čemu se iz zamke izbacuju svi ostali joni osim onih sa ciljnim m/z odnosom.

Tandem kvadrupolnog i analizatora na bazi vremena preleta jona (QTOF)

Tandem kvadrupolnog i analizatora na bazi vremena preleta jona je veoma sličan TOF masenom analizatoru, a glavna razlika je što su kvadrupol i kolizijska ćelija geometrijski centrirani u vertikalnoj liniji. Kvadrupol vrši selekciju određenih jona za naknadnu fragmentaciju u kolizijskoj ćeliji uz pomoć kolizionog gasa (najčešće azot). Fragmentisani joni se dalje razdvajaju kao u TOF analizatoru, na osnovu njihovog m/z odnosa. Ova modifikacija omogućava visoku rezoluciju i tačnost merenja masa, kao i do 100 puta veću osetljivost od trostrukog kvadrupolnog analizatora (*eng.* Triple Quadrupole Analyzer, QqQ) (Glish i Burinsky, 2008; El-Aneed i dr., 2009). Slika 17 prikazuje šemu različitih delova masenog detektora sa QTOF-om.



Slika 17. Šematski prikaz masenog detektora sa QTOF-om.

2.6.1.1.4. Primena HPLC–MS analize

HPLC–MS obezbeđuje efikasnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih jedinjenja iz različitih uzoraka. Brojne studije opisuju primenu HPLC–MS za karakterizaciju sekundarnih metabolita u biljnim ekstraktima, uglavnom fenolnih jedinjenja, fosfolipida, flavonoida, alkaloida (Tabela 7). HPLC–ESI–MSⁿ je primenjena za identifikaciju flavonoida i fenolnih kiselina, u indijskom orahu (De Brito i dr., 2007), pasulju (Lin i dr., 2008), ekstraktima ruzmarina i žalfije (Kontogianni i dr., 2013) i rtanjskom čaju (López-Cobo i dr., 2015). Metoda je takođe primenjena za karakterizaciju jednostavnih fenola, flavonoida i sekoiridoida u maslinama, otpadu od prerade

maslina (Obied i dr., 2007) i ekstraktima lista masline (Kontogianni i Gerothanassis, 2012). Stilbeni i flavonoidi su istovremeno identifikovani pomoću ESI-MS u negativnom režimu jonizacije i kvantifikovani PDA detekcijom u genetski modifikovanom paradajzu (Nicoletti i dr., 2007). Polifenolni sastav u ekstraktima propolisa je ispitan primenom visokopritisne tečne hromatografije kuplovane sa diodnim detektorom (HPLC-DAD) i HPLC-ESI-MS/MS upoređujući performanse IT i QqQ masenih analizatora (Pellati i dr., 2011). Studije su pokazale da u analizi polifenola, naročito flavonoida, najveću primenu ima ESI kao jonski izvor, iako se u pojedinim ispitivanjima APCI pokazao kao efikasniji (Fabre i dr., 2001; De Rijke i dr., 2003). Razvijena je i metoda zasnovana na LC/APCI-MS za direktno određivanje katehina u ekstraktima zelenog i crnog čaja (Zeeb i dr., 2000). MALDI-TOF tehnika se pokazala kao pogodna za određivanje procijanidinskih oligomera u proteinskim kompleksima (Fulcrand i dr., 2008). Polifenoli iz brusnice, ekstrakta semenki grožđa i nara su odvojeni tečnom hromatografijom i podvrgnuti MALDI-TOF-MS koristeći *trans*-3-indolakrilnu kiselinu kao matriks (Reed i dr., 2005). APPI spregnut sa QqTOF-MS korišćen je za analizu nepoznatih uzoraka vina. Dobijeni rezultati su bili zadovoljavajući u poređenju sa ESI-MS koji je takođe korišćen (Gómez-Ariza i dr., 2006).

Hemijski profili lipidnih komponenata su uspešno definisani primenom HPLC-MS analize. Pri određivanju složenih fosfo- i glikolipida najčešće je korišćena ESI kao blaga jonizaciona tehnika (Christie i Han, 2010). S druge strane APCI je našla primenu u analizi nepolarnih jedinjenja u čili paprikama, uglavnom karotenoida, glicerolipida, kapsaicinoida i vitamina rastvorljivih u lipidima (Bijttebier i dr., 2014). U studiji koju su izveli Cichon i dr. (2017), LC-QTOF-MS (APCI⁺) je primenjena za poređenje fitohemijskog sastava crvenog i „tangerine“ paradajz soka. Metoda je omogućila identifikaciju velikog broja jedinjenja različitih klasa, uključujući karotenoide (likopen, fitoen, fitofluen, neurosporen i ξ-karoten), hlorofil (feofitin a i pirofeofitin a) i neutralne lipide (di- i trigliceridi). Identifikovana su i polarna i umereno polarna jedinjenja (derivati cimetne kiseline, flavonoidi i glikoalkaloidi).

HPLC-MS je našla primenu i u detekciji različitih toksičnih supstanci prisutnih u hrani. Studija koju su izveli Ezekiel i dr. (2013) bila je fokusirana na utvrđivanje podložnosti sušenih gljiva infekciji toksigenim plesnima i posledičnoj kontaminaciji mikotoksinima. Spektar mikrobni metabolita, uključujući mikotoksine, analiziran je pomoću HPLC-MS tehnike. UHPLC-MS je primenjena u analizi pesticida u banani, koristeći QqQ kao maseni analizator, postigavši da ukupno vreme analize bude 13 min (Carneiro i dr., 2013). Na isti način, Wang i dr. (2017) su identifikovali 270 pesticida u hrani (povrće, voće, čaj, ulje, žitarice i jaja), koristeći hibridni trostruki kvadrupol sa linearnim jonska zamka analizatorom (*eng.* Triple Quadrupole Linear Ion Trap, QTRAP), sa ukupnim trajanjem analize od 13 min. Dias i dr. (2016) su identifikovali 165 pesticida u jestivim uljima primenom UHPLC-QqQ-MS/MS.

Tabela 7. Primena HPLC–MS u analizi uzoraka biljnog porekla.

Uzorak	Jedinjenja	Tehnika jonizacije	Maseni analizator	Referenca
Maslina (list)	Fenolna jedinjenja	ESI	TOF/MS	Talhaoui i dr., 2014
Heljda	Fenolna jedinjenja	ESI	TOF/MS	Verardo i dr., 2010
Hibiskus	Fenolna jedinjenja	ESI	TOF/MS	Pimentel-Moral i dr., 2018
Rtanjski čaj	Fenolna jedinjenja	ESI	TOF/MS	López-Cobo i dr., 2015
Limun	Fenolna jedinjenja i organske kiseline	ESI	TOF/MS	García-Salas i dr., 2013
Đumbir	Fenolna jedinjenja, šećeri, peptidi, terpenodi, aromatični alkoholi i dr. Organske kiseline,	ESI	TOF/MS	Švarc-Gajić i dr., 2017
Marula (kora)	fenolna jedinjenja, masne kiseline i dr.	ESI	QTOF/MS ²	Jiménez-Sánchez i dr., 2015a
Guava (list)	Fenolna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	Díaz-de-Cerio i dr., 2016
Ruzmarin	Fenolna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	Fernández-Ochoa i dr., 2017
Avokado (pulpa, kora, koštica)	Fenolna i druga polarna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	López-Cobo i dr., 2016
Lubenica	Fenolna i druga polarna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	Abu-Reidah i dr., 2013
Špargla	Bioaktivna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	Jiménez-Sánchez i dr., 2016
Krastavac	Bioaktivna jedinjenja	ESI	QTOF/MS ²	Abu-Reidah i dr., 2012
Badem	Proantocijanidini	ESI MALDI	QqQ/MS ² TOF/TOF MS	Pérez-Jiménez i LluísTorres, 2012
Grožđe (semenke, kožica i peteljke)	Proantocijanidini	MALDI	TOF/MS	Vivas i dr., 2004
Sirak	Proantocijanidini	MALDI	TOF/MS	Krueger i dr., 2003
Paprika	Kapsinoidi	ESI	QTOF/MS ²	Fayos i dr., 2019
Jabuka	Ugljeni-hidrati	MALDI	TOF/MS	Horikawa i dr., 2019
Ovas, pšenica i soja	Proteini	MALDI	TOF/MS	Rigueira i dr., 2016
Ječam	Proteini	MALDI	TOF/TOF MS	Petry-Podgórska i dr., 2010
Šipak	Karotenoidi	APCI	MS	Zhong i dr., 2016
Peruanska jagoda	Karotenoidi	APCI	IT/MS ⁿ	Etzbach i dr., 2018
Kapar (koren)	Alkaloidi	ESI	Q–IT/MS ⁿ	Khatib i dr., 2016
Soja	Fosfolipidi	MALDI	Q–IT/MS ²	Shrivasi Tapadia, 2015
Mango (kora)	Tanini	MALDI	TOF–TOF MS	Sáyago-Ayerdi i dr., 2013

Da bi primenjena metoda bila brza i efikasna i omogućila razdvajanje i identifikaciju različitih grupa i podklasa fenolnih jedinjenja, uslovi analize moraju biti pažljivo optimizovani. Slika 18 sumira najznačajnije parametre HPLC analize.

Zapremina injektovanog uzorka	[1–20 μ L		
Mobilna faza	Faza A	[Polarni rastvarač Ko-rastvarač 0,1–1% (v/v)	→ Voda [Sirćetna kiselina Mravlja kiselina
	Faza B	[Slabije polarni organski rastvarač	[Metanol Acetonitril
Protok	DAD	[1–1,5 mL/min	
	MS MS/MS	[0,2–1 mL/min	
Kolona	[Dužina → 100–300 mm Unutrašnji prečnik → 2,1–10 mm Prečnik čestica → 1,7–10 μ m		
Termostat	[Sobna temperatura ili viša 35 °C		
Detektor	DAD	[<u>Apsorpcione trake karakteristične za fenolna jedinjenja</u> Traka II Prsten A 240–280 nm	
		[Traka I Prsten B 300–380 nm	
Vreme analize	MS	[TOF	50–3000 m/z 3 ppm interna kalibracija 5 ppm eksterna kalibracija
		[QTOF	50–20000 m/z < 1 ppm
Vreme analize	[Od nekoliko minuta do jednog sata.		

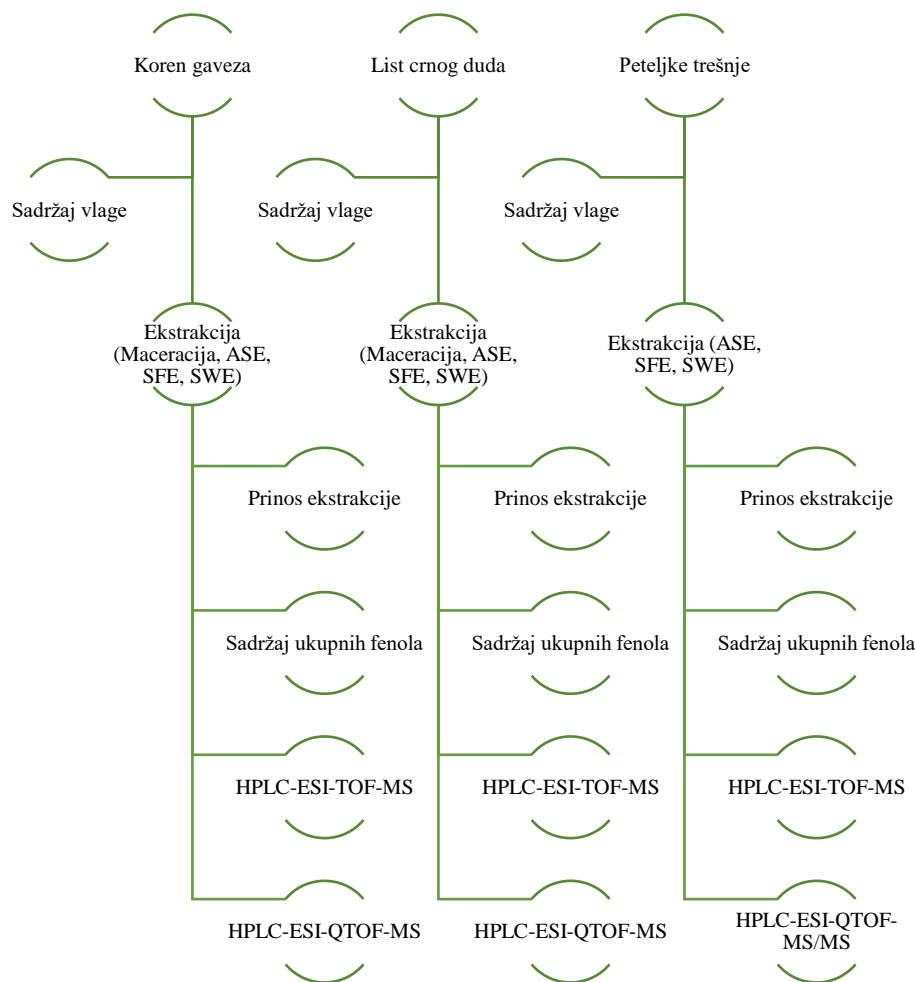
Slika 18. Osnovni parametri HPLC analize.

U praksi HPLC–MS se najčešće primenjuje u analizi jedinjenja srednje i visoke polarnosti sa relativnom molekulskom masom većom od 50 amu. Poboľšane performanse ove tehnike u

pogledu njene osjetljivosti, selektivnosti i brzine proširile su njenu primenu. Danas ova tehnika ima nezamenljivu ulogu u analizi uzoraka životne sredine, prehrambenih i farmaceutskih uzoraka, u biohemiji i biofarmaceutskoj industriji, kontroli kvaliteta lekova, itd. HPLC–MS se takođe koristi i u proteomskoj analizi složenih uzoraka za identifikaciju pojedinačnih peptida. Uzorci složenih bioloških tečnosti kao što je humani serum su analizirani LC–MS/MS sistemom uz identifikaciju preko 1000 proteina (Sudhakar i dr., 2016). LC–MS tehnika je korišćena za otkrivanje steroidnih lekova u telesnim tečnostima i za profilisanje endogenih steroida (Mazzarino i dr., 2008; Ray i dr. 2015). U medicinskoj praksi, HPLC–MS/MS tehnika je uspešno primenjena u prevenciji i praćenju mnogih bolesti metaboličke, genetske, endokrinološke ili hematološke etiologije. Velika osjetljivost HPLC–MS/MS-a doprinela je njenoj primeni i u prenatalnim i post-natalnim „screening“ procedurama.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovan je u laboratorijama Centra za istraživanje i razvoj funkcionalne hrane (Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional – CIDAF) u Granadi (Španija) i u laboratoriji Katedre za primenjene i inženjerske hemije, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu (Srbija). Šema i tok aktivnosti eksperimentalnog rada prikazani su na Slici 19.



Slika 19. Šema i tok aktivnosti eksperimentalnog rada.

3.1. Biljni materijal

Osušen koren gaveza (*Symphytum officinale* L.) i listovi crnog duda (*Morus nigra* L.) kupljeni su u lokalnoj prodavnici zdrave hrane (Novi Sad, Srbija). Peteljke trešnje (*Prunus avium* L.) su dostavljene od strane proizvođača trešanja La Picota del Jerte (Španija). Biljni materijal je sakupljen tokom maja meseca 2014. godine. Peteljke trešnje su sušene na sobnoj temperaturi. Uzorci navedenih biljnih vrsta su usitnjeni upotrebom ultracentrifugalnog mlina do veličine čestica od 1 mm, i skladišteni na sobnoj temperaturi na tamnom i suvom mestu. Od pripremljenih uzoraka formiran je reprezentativan uzorak ukupne mase od oko 3 kg. Od formiranog reprezentativnog uzorka uzimani su uzorci za pojedinačna ispitivanja.

3.2. Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi korišćeni tokom istraživanja su kupljeni od sledećih proizvođača:

- Folin-Ciocalteu reagens – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);
- Aceton, etanol, metanol i natrijum-karbonat – Panreac (Barselona, Španija);
- Celulozni filter i morski pesak korišćeni za ubrzanu ekstrakciju i ekstrakciju superkritičnim ugljenik(IV)-oksidom – Fisher Scientific (Madrid, Španija);
- Za pripremu mobilne faze korišćeni su mravlja kiselina i acetonitril – Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka) i Fisher Scientific (Madrid, Španija), redom;
- Galna kiselina korišćena kao spoljni standard – Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka).
- Komercijalni ugljenik(IV)-oksid ($\geq 99\%$) – Praxair Inc. (Danbury, CT, USA)
- Komercijalni azot (99,99% čistoće) – Messer (Srbija);
- Ultračista voda sa provodljivošću ispod $18,2 \text{ M}\Omega$ je dobijena korišćenjem sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili stepena analitičke čistoće.

3.3. Instrumentacija

Tokom rada na eksperimentalnom delu doktorske disertacije korišćeni su sledeći uređaji i oprema:

- Uređaj za ubrzanu ekstrakciju – Dionex ASE 350 (Dionex Corporation, Sunnyvale, SAD);
- Uređaj za ekstrakciju ugljenik(IV)-oksidom u superkritičnom stanju – Waters Prep Supercritical Fluid Extraction systems (SFE-100) (Waters, Milford Massachusetts, SAD);
- Sistem za ekstrakciju subkritičnom vodom, sa regulatorom temperature domaće konstrukcije i proizvodnje (Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu);
- Magnetna mešalica (IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemačka);
- Ultracentrifugalni mlin – ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Nemačka);
- Centrifuga – Heraeus Sepatech Labofuge 200 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA);
- Rotacioni vakuum uparivač – R-200 (Büchi Labortechnik, 9230 Flawil, Švajcarska);
- Centrifugalni vakuum koncentrador – Savant SC250EXP SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA);
- Spektrofotometar – Synergy Mx, BioTek. Bad Friedrichshall (Nemačka);
- Uređaj za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom sa masenim detektorom – Agilent 1200-HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) sa MicroTOFTM-om (Bruker Daltonik, Bremen, Nemačka) i G1607A ESI interfejsom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD);
- Uređaj za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom sa tandemskom masenom spektrometrijom – Agilent 1260 Series Rapid Resolution (Agilent Technologies, Palo Alto,

- CA, SAD) sa Agilent 6540 Ultra High Definition QTOF-om (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) i Agilent Dual Jet Stream ESI interfejsom;
- Špric filter 0,2 – Millipore (Bedford, MA, SAD).

3.4. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u ispitivanom biljnom materijalu određen je gravimetrijskim postupkom koji propisuje Jugoslovenska farmakopeja (*Ph. Jug.* IV, 1984).

3.5. Ekstrakcija biljnog materijala

U radu su primenjene i poređene različite ekstrakcione tehnike, uključujući maceraciju, ubrzanu ekstrakciju, ekstrakciju superkritičnim fluidima i ekstrakciju subkritičnom vodom. Sa ciljem dobijanja ekstrakata sa maksimalnim prinosom biološki aktivnih klasa jedinjenja, izvedena je optimizacija najznačajnijih operativnih parametara primenjenih ekstrakcionih tehnika.

3.5.1. Konvencionalna čvrsto-tečna ekstrakcija

Konvencionalna čvrsto-tečna ekstrakcija (maceracija) je izvedena sa ciljem poređenja efikasnosti konvencionalnih i savremenih ekstrakcionih tehnika. Kao rastvarači primenjeni su i poređeni vodeni rastvori metanola (MeOH), etanola (EtOH) i acetona u različitim odnosima (100:0, 75:25, 50:50 v/v). U svim eksperimentima, 5,0 g osušenog i samlevenog biljnog materijala je ekstrahovano sa 20 mL rastvarača. Ekstrakcije su izvođene na sobnoj temperaturi tokom 30 min, 60 min i 12 h na magnetnoj mešalici. Po završetku ekstrakciju ekstrakti su centrifugirani 15 min pri broju obrtaja centrifuge od 7000 rpm. Zatim je supernatant odvajan i uparavan do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturama ispod 40 °C da bi se izbegla degradacija termolabilnih jedinjenja. Izmerena je masa suvog ostatka i izračunat prinos. Suvi ostatak je zatim rastvaran u nekoliko različitih rastvarača do konačne koncentracije od 1000 mg/L. Rekonstituisani ekstrakti su filtrirani kroz filtre prečnika pora od 0,2 µm i čuvani na -20 °C.

3.5.2. Ubrzana ekstrakcija

Ubrzana ekstrakcija uzoraka je izvedena na uređaju prikaznom na Slici 20. Proces ekstrakcije se sastojao iz sledećih koraka: 1) punjenje ekstrakcione ćelije uzorkom (6,0 g biljnog materijala je pomešano sa morskim peskom u odnosu 1:2); 2) uvođenje rastvarača i komprimovanje; 3) zagrevanje ćelije napunjene uzorkom, pod konstantnim pritiskom (vreme zagrevanja je zavisilo od temperature ekstrakcije i iznosilo je 5 min za temperature ekstrakcije 40 i 63 °C, 7 min za temperature ekstrakcije 120 i 176 °C i 9 min za temperaturu ekstrakcije od 200 °C), 4) ekstrakcija sa zatvorenim sistemskim ventilima u trajanju od 5 min, 5) ispiranje ekstrakcione ćelije sa rastvaračem i ispuštanje ekstrakta u kolektorsku ćeliju, 6) propuštanje azota kroz ekstrakcionu ćeliju u trajanju od 60 s kako bi se zaostali rastvarač u potpunosti uklonio i 7) dekompresija. Ceo proces je bio automatizovan i vremenski programiran.



Slika 20. Dionex ASE 350 ekstraktor.

Sve ekstrakcije su bile izvedene u statičkom režimu na pritisku od 1500 psi i vremenu ekstrakcije od 20 min sa različitim udelima vodenog rastvora etanola (0–100%) i na različitim temperaturama (40–200 °C). Rastvarači su neposredno pre upotrebe držani u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 min radi uklanjanja rastvorenog kiseonika i sprečavanja oksidativne degradacije ciljnih komponenti. Nakon ekstrakcije, rastvarač je uparen u SpeedVac koncentratoru, a dobijeni ekstrakti su čuvani na –20 °C zaštićeni od svetlosti. Za dalju analizu, osušeni ekstrakti su rekonstituisani u primenjenom rastvaraču do koncentracije od 1000 mg/L i filtrirani kroz filtre prečnika pora od 0,2 µm.

3.5.3. Ekstrakcija superkričnim ugljenik(IV)-oksidom

Uređaj za ekstrakciju superkričnim ugljenik(IV)-oksidom prikazan je na Slici 21. Nakon punjenja ekstrakcione ćelije (1500 mL) uzorkom (u svim ekstrakcijama 5,0 g biljnog materijala je pomešano sa morskim peskom u odnosu 1:2), ugljenik(IV)-oksid i modifikator su preko pumpe dovedeni u kontakt sa uzorkom i zajedno komprimovani na radni pritisak. Ekstrakcija je izvedena u dinamičkom režimu pri kojem je ugljenik(IV)-oksid kontinuirano prolazio kroz uzorak. Nakon ekstrakcije ekstrahovane komponente su odvojene od superkričnog fluida dekompresijom.

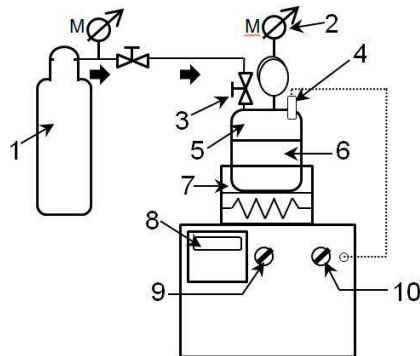


Slika 21. Waters Prep SFE-100 ekstraktor.

Ekstrakcije su izvođene pri različitim vrednostima pritiska (150 i 300 bar) i udela modifikatora (7 i 15%), pri protoku ugljenik(IV)-oksida od 22 g/min. Ukupno vreme ekstrakcije iznosilo je 4 sata. Prinos ekstrakcije praćen je na svakih sat vremena. Sakupljeni ekstrakt je uparen do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača na temperaturi od 40 °C. Suvi ostatak je zatim rastvaran u etanolu do konačne koncentracije od 1000 mg/L. Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz filtre prečnika pora od 0,2 µm i čuvani na -20 °C.

3.5.4. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je izvedena u preparativnom ekstraktoru zapremine 1,7 L (Slika 22). Biljni materijal je zajedno sa rastvaračem (destilovana voda) unosen u ekstrakcionu posudu (6). Kompresija je izvođena azotom čistoće 99,99% preko ventila (3). Pomoću manometra (2) (Inol, Slovenija, model IM 811A12) kontrolisana je vrednost pritiska u ekstrakcionoj posudi, dok je temperatura merena pomoću termopara Pt 100 (4) i regulisana pomoću regulatora temperature (8) (Nigos, Srbija, model 1101P). Zagrevanje ekstrakcione ćelije je izvedeno preko grejne podloge. Vibraciona plataforma (7) je korišćena radi efikasnijeg prenosa mase i toplote, kao i za izbegavanje lokalnog pregrevanja. Nakon ekstrakcije, ekstrakciona ćelija je hlađena u ledenom kupatilu do temperature 30 °C i dekomprimovana otvaranjem ventila (4). Ekstrakti su nakon filtracije čuvani na tamnom mestu i temperaturi od 4 °C.



Slika 22. Šematski prikaz primenjene aparature za ekstrakciju subkritičnom vodom: (1) boca sa gasom; (2) manometar; (3) sigurnosni ventil; (4) termoelement za merenje temperature; (5) poklopac ekstrakcione/reakcione posude; (6) ekstrakciona/reakciona posuda; (7) mehanička obloga sa vibracionom platformom; (8) termoregulator; (9) glavni prekidač; (10) prekidač za uključivanje vibracione platforme.

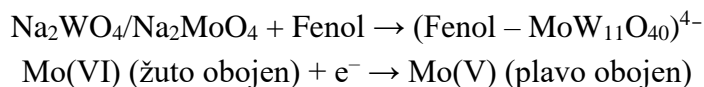
U cilju optimizacije uslova ekstrakcije, ispitan je uticaj temperature, pritiska, vremena ekstrakcije i brzine mešanja. Odnos droga/rastvarač (1:10) je bio konstantan tokom procesa optimizacije. Ispitano je šest različitih vrednosti temperature (60, 80, 110, 130, 150, 170 °C), dok su ostali parametri održavani konstantnim. Odabir optimalnih vrednosti temperature ekstrakcije je izveden na osnovu određivanja sadržaja ukupnih fenola. Ispitivanje narednog parametra je izvedeno pri usvojenoj optimalnoj temperaturi. Uticaj pritiska ispitan je u opsegu od 40 do 100 bar, pri optimalnoj temperaturi i uslovima ekstrakcije prethodno navedenim. Praćen je uticaj vremena ekstrakcije pri prethodno usvojenim optimalnim vrednostima temperature i pritiska. Ekstrakcije su izvođene u trajanju od 30 do 90 min. Nakon odabranih optimalnih vrednosti prethodno posmatranih parametara, praćen je uticaj brzine mešanja, odnosno vibracije na sadržaj pomenutih komponenti. Uticaj frekvencije vibracije ispitan je u opsegu vrednosti od 2 do 6 Hz.

3.6. Ukupan prinos ekstrakcije

Ukupan prinos ekstrakcije određen je primenom standardne metode prema Jugoslovenskoj farmakopeji (*Ph. Jug. IV*, 1984). Ekstrakt (10 mL je preneseno u prethodno izmereni balon i sadržaj balona je uparavan do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeni ekstrakt je dalje sušen u sušnici na temperaturi od 105 °C tokom 3 sata, odnosno do konstantne mase. Prinos ekstrakcije je izražen kao % (m/m).

3.7. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (*eng.* Total Phenolic Content, TPC) u ispitivanim biljnim ekstraktima je određen metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965; Kähkönen i dr., 1999), koja se zasniva na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW₁₂O₄₀)⁴⁻:



Reakciona smeša je pripremana mešanjem 10 μL ekstrakta, 600 μL destilovane vode i 50 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 10 min, u reakcionu smešu je dodavano 150 μL 20% natrijum-karbonata i 190 μL destilovane vode. U pripremi slepe probe je umesto 10 μL ekstrakta korišćeno 10 μL destilovane vode, odnosno odgovarajućeg rastvarača korišćenog u postupku maceracije i ubrzane ekstrakcije. Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca ispitivane smeše na talasnoj dužini od 760 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Sadržaj ukupnih fenola u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline po 100 g droge \pm standardna devijacija (mg EGK/100 g \pm SD).

3.8. HPLC-ESI-TOF-MS analiza

Hemijski profili biljnih ekstrakata definisani su tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa DAD i MS detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf, sačinjen od vakuum-degazera, binarne pumpe, autosemplera, G1316B termostataranog odeljka za kolone i DAD detektora, kuplovan sa MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno na Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (dužine 150 mm, unutrašnjeg prečnika 4,6 mm, sa punjenjem čestica prečnika 1,8 μm) koloni (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD).

Injektovano je 10 μL uzorka. Kao mobilna faza A korišćena je 0,1%-tna mravlja kiselina, a kao faza B – acetonitril. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 5% B, 15 min 65% B, 36 min 95% B, 40 min 5% B, *post time* 5 min, uz konstantan protok od 0,80 mL/min. Kolona je temperirana na 25 °C (eluat je nakon kolone hlađen na temperaturu detektora). Praćen je UV/VIS signal eluata na 240 nm, 280 nm i 330 nm, kao i kontinualni spektar u opsegu 200–600 nm.

Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. MS analiza je izvedena upotrebom microTOFTM uređaja kuplovanog sa HPLC sistemom. Korišćenjem separatora T-tipa redukovana je protok mobilne faze od 0,8 do 0,2 mL/min pre uvođenja u maseni spektrometar da bi se postigao stabilan sprej i obezbedila ponovljivost rezultata. TOF maseni spektrometar je bio opremljen sa ESI interfejsom koji je operisao u negativnom jonizacionom režimu u opsegu masa od 50 do 1000 *m/z*. Optimalne vrednosti parametara ESI-TOF jonskog izvora su bili: napon na kapilari +4,5 kV; temperatura gasa za sušenje 190 °C; protok gasa za sušenje 9 L/min; pritisak gasa za nebulizaciju 2 bar. Vrednosti parametara prenosa jona: napon na izlazu iz kapilare –150 V; napon na skidaču (skimer) 1 –50 V; napon na skidaču (skimer) 2 –22,5 V.

Eksterna MS kalibracija je izvedena pomoću 74900-00-05 Cole Parmer špric pumpe (Vernon Hills, Illinois, SAD) direktno povezanom sa interfejsom, propuštanjem rastvora natrijum-formatnog klastera (5 mM natrijum-hidroksid u smeši voda/2-propanol=1/1 (v/v) sa 0,2% mravlje kiseline), u kvadratnom regresionom režimu kalibracije visoke preciznosti (*eng.* High-Precision

Calibration, HPC). Koristeći ovu metodu dobijena je tačna kalibraciona kriva bazirana na brojnim masama klastera, pri čemu se svaki od njih razlikovao za 68 Da (NaCHO_2). Kalibracioni rastvor je ubrizgavan na početku svake analize i svaki spektar je kalibrisan pre identifikacije.

Podaci o masi molekulskih jona su dobijeni pomoću programa Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Nemačka), koji je nudio moguće molekulske formule pomoću Generate Molecular Formula™ Editor-a. Editor koristi sigma Fit™ algoritam, CHNO algoritam, koji ima standardne funkcije kao što su minimalni/maximalni opseg elemenata, elektronska konfiguracija, kao i poređenje teoretskog i izmerenog izotopskog sastava molekula (mSigma Value). Za većinu jedinjenja preciznost potvrđene molekulske formule je iznosila 10 ppm.

3.9. HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analiza

Identifikacija bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima je izvedena tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa tandemskom MS detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies 1260 Series Rapid Resolution tečni hromatograf (sastavljen od vakuum-degazera, binarne pumpe, autosemplera, termostatiranog odeljka za kolone i DAD detektora) kuplovan sa MS detektorom sa elektrosprej jonizacijom, kao i kvadrupolnim masenim analizatorom i masenim analizatorom na bazi vremena preleta jona. Hromatografsko razdvajanje je postignuto na Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (dužine 150 mm, unutrašnjeg prečnika 4,6 mm, sa punjenjem čestica prečnika 1,8 μm) koloni (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD).

Injektovano je 10 μL uzorka. Kao mobilna faza A korišćena je 0,1%-tna mravlja kiselina, a kao faza B – acetonitril. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 5% B, 15 min 65% B, 36 min 95% B, 40 min 5% B. Početni uslovi su održavani 5 min da bi se sistem uravnotežio pre sledeće analize. Protok mobilne faze je bio konstantan i iznosio je 0,80 mL/min. Kolona je temperirana na 25 °C (eluat je nakon kolone hlađen na temperaturu detektora). Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. MS analiza je izvedena upotrebom QTOF-MS uređaja kuplovanog za HPLC sistem u opsegu masa od 50 do 1700 m/z , u negativnom jonizacionom režimu. Agilent Dual Jet Stream elektrosprej jonizator je operisao pri sledećim uslovima: protok gasa za sušenje 10 L/min; temperatura gasa za sušenje 325 °C; pritisak gasa za nebulizaciju 20 psi; temperatura gasa za nebulizaciju 400 °C; protok gasa za nebulizaciju 12 L/min; radiofrekventni napon na kapilari, mlaznici, fragmentoru, skimeru i oktapolu 4000, 500, 130, 45 and 750 V, redom.

MS/MS analize su izvedene automatskom fragmentacijom gde su dva najintenzivnija masena pika fragmentisana sa vrednostima kolizione energije od m/z 100, 30 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 40 eV i m/z 1500, 45 eV. Kao gas za sušenje, raspršivanje i koliziju korišćen je azot. Da bi se održala tačnost pri merenju masa, korišćena je kontinuirana infuzija referentnih jona sa m/z 112,9856 (trifluoroacetatni anjon) i 1033,9881 (adukt heksakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoksi) fosfazin ili HP-921). Za kontrolu instrumenta i akviziciju podataka korišćen je MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 softver (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD). Pretraživanje literature za objavljene spektralne podatke izvedeno je korišćenjem SciFinder®-a.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Sadržaj vlage u biljnom materijalu

U radu je ispitan list crnog dudu, koren gaveza i peteljke trešnje. U ispitivanom biljnom materijalu sadržaj vlage je iznosio $4,24 \pm 0,07\%$, $4,97 \pm 0,03\%$ i $4,81 \pm 0,05\%$, za list crnog dudu, koren gaveza i peteljke trešnje, redom.

4.2. Optimizacija ekstrakcionih tehnika

4.2.1. Optimizacija ekstrakcije korena gaveza

4.2.1.1. Prinos ekstrakcije

Primena odgovarajuće tehnike ekstrakcije je od velikog značaja za postizanje najvišeg prinosa ciljnih komponenti. Iz literature je poznato da efikasnost procesa ekstrakcije zavisi od samog biljnog uzorka (sorta, geografski region, klima, stres, itd.) i operativnih parametara ekstrakcione tehnike (rastvarač, temperatura, pritisak) (Švarc-Gajić, 2012). Optimizacija parametara ekstrakcije je od suštinskog značaja kako bi se postigla najveća efikasnost ekstrakcije uz minimalan utrošak vremena, energije i rastvarača. Optimizacija uslova ekstrakcije je takođe važna jer omogućava potpuniju eksploataciju uzorka i definisanje najadekvatnijeg postupka na poluindustrijskom i industrijskom nivou.

U okviru ove disertacije optimizovane su i poređene konvencionalna (maceracija) i savremene (ASE, SFE i SWE) tehnike ekstrakcije u pogledu prinosa fitohemikalija iz korena gaveza, lista crnog dudu i peteljki trešnje, kao i svojstava samih ekstrakata. U Tabeli 8 prikazani su prinosi ekstrakcije korena gaveza za različite ekstrakcione tehnike i različite operativne uslove. Primenom različitih ekstrakcionih tehnika i operativnih parametara, prinos ekstrakcije, izražen kao masa suvog ekstrakta (g) u 100 g biljnog materijala (% , m/m), kretao se u opsegu od 0,58 do 52,56%. Najviši prinos ekstrakcije korena gaveza je postignut primenom subkritične vode, dok su najniže vrednosti zabeležene primenom SFE. Izrazit uticaj temperature kod ASE zabeležen je drastičnom razlikom u ukupnom prinosu ekstrakcije između krajnjih temperaturnih tačaka. Tako je prinos ASE na 63 °C bio 3,73%, dok je na 200 °C bio 49,92%. Kod SWE nije primećen toliko izražen uticaj temperature kao kod ASE.

U slučaju maceracije prinos je u velikoj meri zavisio od primenjenog rastvarača. Veća efikasnost ekstrakcije postignuta je primenom smeše rastvarača (metanol/etanol/aceton–voda) u poređenju sa čistim rastvaračima. Smeša metanol/voda je omogućila najviši prinos ekstrakcije od 21,63%. S druge strane, primenom čistog acetona efikasnost ekstrakcije je bila znatno manja (0,58%), verovatno zbog niže dielektrične konstante rastvarača i, posledično, nižeg prinosa polarnijih jedinjenja. Značajne razlike u efikasnosti ekstrakcije nakon 30 min, 60 min i 12 h nisu primećene.

Efikasnost ASE je bila veća u odnosu na SFE i maceraciju dajući znatno više prinose pri kraćem vremenu ekstrakcije. Temperatura kao parametar sa najizrazitijim uticajem kod ASE, doprinela je

porastu prinosa ekstrakcije više od deset puta (na 200 °C) u odnosu na najnižu primenjenu temperaturu (na 40 °C). Više temperature i 50%-tni etanol omogućili su visok prinos ekstrakcije (ASE 9, 49,92%), dvostruko viši u odnosu na prinos dobijen primenom maceracije pri optimalnim operativnim uslovima (M 4). Uopšteno, primena visokih temperatura kod ASE povećava rastvorljivost jedinjenja i brzinu prenosa mase.

Postignuti rezultati prikazani u Tabeli 8 takođe pokazuju da je efikasnost SFE bila manja u poređenju sa SWE, ASE i maceracijom. Primena SFE na 40 °C, 300 bar i korišćenjem 7%-tnog etanola kao ko-rastvarača, omogućila je najviši prinos ekstrakcije. Prema studiji koju su izveli Hamburger i dr. (2004), porast pritiska doveo je do porasta gustine superkritičnog ugljenik(IV)-oksida, povećavajući njegovu solvatacionu moć i rezultirajući višim prinosom ekstrakcije. Najniži prinos ekstrakcije je ostvaren primenom SFE sa dodatkom 7%-tnog etanola kao ko-rastvarača na 150 bar i 40 °C.

Najviši prinos u ekstraktima korena gaveza je postignut primenom SWE na temperaturi od 110 °C i pritisku od 40 bar u trajanju od 30 min. Dalje povećanje temperature bilo je praćeno smanjenjem prinosa ekstrakcije. Na prinos ekstrakcije značajno utiče polarnost vode koja direktno utiče na rastvorljivost jedinjenja. Dielektrična konstanta vode opada sa temperaturom, povećavajući rastvorljivost manje polarnih jedinjenja. Prinos ekstrakcije se nije znatno menjao sa promenom pritiska i brzine mešanja. Vreme ekstrakcije je imalo blag uticaj na prinos ekstrakcije izazivajući porast prinosa na početku i sporije smanjenje prinosa primenom dužih vremena ekstrakcije. Najniži prinos ekstrakcije postignut primenom SWE (SWE 6) je bio jednak vrednosti prinosa pri optimalnim uslovima maceracije (M 4).

Tabela 8. Prinos ekstrakcije korena gaveza primenom različitih ekstrakcionih tehnika pri različitim operativnim uslovima.

Oznaka	Ekstrakciona tehnika	Rastvarač	Parametri ekstrakcije	Prinos (%)	TPC (mg EGK/ g)
M 1	Maceracija	100% MeOH	$t = 30$ min	2,02	27,85±0,75
M 2	Maceracija	100% MeOH	$t = 60$ min	2,59	39,85±0,34
M 3	Maceracija	100% MeOH	$t = 12$ h	4,40	132,32±1,43
M 4	Maceracija	75% MeOH	$t = 30$ min	21,63	211,96±0,98
M 5	Maceracija	75% MeOH	$t = 60$ min	18,61	192,56±2,48
M 6	Maceracija	75% MeOH	$t = 12$ h	21,37	202,51±3,74
M 7	Maceracija	100% EtOH	$t = 30$ min	1,60	3,58±0,45
M 8	Maceracija	100% EtOH	$t = 60$ min	1,50	2,47±0,23
M 9	Maceracija	100% EtOH	$t = 12$ h	2,12	10,01±1,25
M 10	Maceracija	75% EtOH	$t = 30$ min	12,33	94,45±0,95
M 11	Maceracija	75% EtOH	$t = 60$ min	13,34	125,42±2,87
M 12	Maceracija	75% EtOH	$t = 12$ h	14,30	122,07±1,53
M 13	Maceracija	100% Aceton	$t = 30$ min	0,58	0,53±0,01
M 14	Maceracija	100% Aceton	$t = 60$ min	0,58	0,95±0,02

Nastavak Tabele 8.

M 15	Maceracija	100% Aceton	$t = 12 \text{ h}$	1,19	2,59±0,70
ASE 1	ASE	50% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	4,07	3,64±0,59
ASE 2	ASE	85% EtOH	$T = 63 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	3,73	5,49±0,87
ASE 3	ASE	15% EtOH	$T = 63 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	4,12	1,60±0,15
ASE 4	ASE	100% H ₂ O	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	9,04	1,46±0,09
ASE 5	ASE	100% EtOH	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	5,50	15,33±1,75
ASE 6	ASE	50% EtOH	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	8,84	7,59±0,93
ASE 7	ASE	85% EtOH	$T = 176 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	36,33	89,24±3,43
ASE 8	ASE	15% EtOH	$T = 176 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	41,90	140,81±4,45
ASE 9	ASE	50% EtOH	$T = 200 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	49,92	200,44±6,76
SFE 1	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, p = 150 \text{ bar}, t = 2 \text{ h}$	0,51	1,77±0,11
SFE 2	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, p = 150 \text{ bar}, t = 2 \text{ h}$	1,24	4,14±0,32
SFE 3	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, p = 300 \text{ bar}, t = 2 \text{ h}$	1,57	5,28±0,54
SFE 4	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, p = 300 \text{ bar}, t = 2 \text{ h}$	0,76	2,43±0,26
SWE 1	SWE	H ₂ O	$T = 60 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	35,68	186,55±3,41
SWE 2	SWE	H ₂ O	$T = 80 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	34,70	230,56±6,65
SWE 3	SWE	H ₂ O	$T = 110 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	52,56	279,21±2,12
SWE 4	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	45,74	307,01±3,70
SWE 5	SWE	H ₂ O	$T = 150 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	25,30	301,36±4,92
SWE 6	SWE	H ₂ O	$T = 170 \text{ }^\circ\text{C}, p = 40 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	22,48	261,26±3,40
SWE 7	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 30 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	34,70	291,37±2,20
SWE 8	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	35,10	312,22±4,71
SWE 9	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 80 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	34,00	307,88±5,39
SWE 10	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 100 \text{ bar}, t = 30 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	32,78	306,58±7,34
SWE 11	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 20 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	34,60	331,77±5,80
SWE 12	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 40 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	37,86	293,11±3,36
SWE 13	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 60 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	35,18	274,87±2,97
SWE 14	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 75 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	33,90	266,76±3,45
SWE 15	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 90 \text{ min}, 2 \text{ Hz}$	29,88	276,55±5,29
SWE 16	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 20 \text{ min}, 1 \text{ Hz}$	30,02	323,52±2,94
SWE 17	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 20 \text{ min}, 3 \text{ Hz}$	36,06	313,96±7,35
SWE 18	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 20 \text{ min}, 4 \text{ Hz}$	35,60	325,25±5,83
SWE 19	SWE	H ₂ O	$T = 130 \text{ }^\circ\text{C}, p = 60 \text{ bar}, t = 20 \text{ min}, 5 \text{ Hz}$	34,30	307,88±4,64

4.2.1.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima korena gaveza

Fenolna jedinjenja sintetiše jako veliki broj biljaka kao sekundarne metabolite. Različitim kliničkim i epidemiološkim studijama je dokazano da polifenoli mogu da deluju preventivno kod kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja, kancera, dijabetesa, starenja i dr. (Kris-Etherton i dr., 2002; Taamalli i dr., 2012; Lin i dr., 2016).

Rezultati sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima korena gaveza su prikazani u Tabeli 8. U slučaju maceracije, najveći TPC je postignut korišenjem 75%-tnog etanola (M 4: 211,96±0,98 mg EGK/g droge), dok je primenom acetona, TPC bio najmanji (M 13: 0,53±0,01 mg EGK/g droge). Alkan i dr. (2014) su primenom etanola (Soxhlet ekstrakcija) i vode (100 °C, 30 min) postigli dosta manji TPC u odnosu na maceraciju pri optimalnim uslovima primenjenih u ovom radu (M 4) (116,93 i 99,49 mg EGK/g ekstrakta, redom). U studiji Sowa i dr. (2018), TPC od 49,51 mg EGK/g droge u korenu gaveza postignut je primenom maceracije sa smešom etanol/voda kao rastvarač na sobnoj temperaturi, dok je još manji TPC (6,14 mg EGK/g droge) postignut primenom vode kao rastvarača. Uticaj vremena ekstrakcije na prinos fenolnih jedinjenja ukazao je na male promene TPC-a sa vremenom.

Sadržaj fenolnih jedinjenja primenom ASE se kretao od 1,46±0,09 do 200,44±6,76 mg EGK/g droge. Najmanji TPC je dobijen primenom vode na temperaturi od 120 °C, dok je najviši prinos postignut primenom 50%-tnog etanola na temperaturi od 200 °C. Uzorci dobijeni na višim temperaturama imali su znatno veći TPC (>89,24 mg EGK/g droge) u poređenju sa ekstraktima dobijenim na 40, 63 i 120 °C, što ukazuje da se temperatura ističe kao najvažniji ASE parametar. Ne toliko izrazit uticaj temperature je zabeležen kod SWE kod koje je i postignut najveći TPC. TPC na najvišoj ASE temperaturi je bila uporediva sa TPC-om postignutim na 60 i 80 °C primenom SWE, ukazujući na izrazitu prednost primene subkritične vode.

Uticaj parametara SFE na sadržaj fenolnih jedinjenja je bio neznan u poređenju sa parametrima drugih primenjenih ekstrakcionih tehnika. TPC u SFE ekstraktima je bio u opsegu od 1,77±0,11 do 5,28±0,54 mg EGK/g droge, uporediv sa najnižim vrednostima TPC-a postignutim primenom maceracije i ASE. Najveći TPC je zabeležen primenom ugljenik(IV)-oksida sa 7%-tnim etanolom na pritisku od 300 bar (SFE 3: 5,28±0,54 mg EGK/g droge). Manji TPC postignuti primenom SFE su i očekivani s obzirom na veću selektivnost SFE prema nepolarnijim jedinjenjima, uprkos primeni etanola kao ko-rastvarača.

4.2.2. Optimizacija ekstrakcije lista crnog dudu

4.2.2.1. Prinos ekstrakcije

Radi dobijanja ekstrakata lista crnog dudu, primenjene su konvencionalna i savremene tehnike ekstrakcije, i ispitan je uticaj različitih parametara na prinos ekstrakcije. U Tabeli 9 su prikazani prinosi ekstrakcija dobijeni za svaku primenjenu ekstrakcionu tehniku pri različitim operativnim uslovima. Ukupan prinos ekstrakcije je izražen kao masa ekstrakta (g) u 100 g biljnog materijala

(%, m/m). Najviši prinos ekstrakcije postignut je primenom SWE (49,08%), dok je najniži ostvaren primenom SFE (4,11%). Uticaj temperature kod ASE je bio evidentan s obzirom na to da je prinos ekstrakcije na najvišoj temperaturi bio dvostruko viši u odnosu na prinos dobijen na 40 °C. Za razliku od ASE, kod SWE temperatura nije imala toliko izrazit uticaj.

Što se tiče maceracije, upotrebom čistih rastvarača (tj. metanola, etanola i acetona) postignut je najniži prinos ekstrakcije. S druge strane, upotreba smeše rastvarača značajno je poboljšala efikasnost ekstrakcije ciljnih jedinjenja. Najviši prinosi postignuti su primenom metanola i etanola (50 i 75%). Generalno, kombinacije vode i drugih rastvarača omogućavaju selektivnu ekstrakciju širokog spektra jedinjenja (Mustafa i Turner, 2011). Produženjem vremena ekstrakcije primenom istih udela rastvarača postignut je porast prinosa ekstrakcije.

Što se tiče ASE, najviši prinos ekstrakcije (48,29%) postignut je na 200 °C primenom smeše 50% etanol/voda (v/v). Ovaj prinos je bio znatno viši u odnosu na maceraciju pri optimalnim uslovima (M 15, 11,73%), a pri vremenu ekstrakcije od 12h. Najniži prinos ekstrakcije primenom ASE (ASE 2, 11,27%) je postignut sa 85%-tnim etanolom na 63 °C pri 20 min. ASE je ispoljila značajnu prednost u pogledu uštede vremena pri efikasnom automatizovanom procesu. Što se tiče temperature, najbolji rezultati su postignuti kod ASE 8 i 9 izvedenih na 176 i 200 °C, redom. Povišene temperature u ASE utiču na performanse samog ekstrakcionog procesa što je, pretpostavlja se, razlog bolje efikasnosti ASE u poređenju sa maceracijom izvedenom na sobnoj temperaturi.

Najniži prinos ekstrakcije zabeležen je primenom SFE. Pri optimalnim SFE uslovima (SFE 4) prinos ekstrakcije je iznosio 6,89%, što je približno vrednostima postignutim maceracijom korišćenjem čistih rastvarača. Povećanjem pritiska od 150 do 300 bar, pri konstantnoj temperaturi (40 °C), što odgovara povećanju gustine ugljenik(IV)-oksida (od 780,3 do 910 kg/m³), postigao se 1,68 puta viši prinos ekstrakcije. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa prethodno objavljenim koji ističu porast prinosa ekstrakcije sa povećanjem pritiska (Hamburger i dr., 2004). Takođe i porast procenta etanola kao ko-rastvarača rezultirao je višim prinosom ekstrakcije što se objašnjava većom polarnošću.

Prinos SWE se kretao od 31,36 do 49,08%. Najniži prinos je postignut pri najmanjoj brzini mešanja i umerenoj temperaturi i pritisku (SWE 16, 130 °C, 60 bar). Čak i najniži prinos SWE je bio viši u odnosu na prinose ostalih ekstrakcionih tehnika pri različitim operativnim uslovima. Izuzetak su bili ekstrakti ASE 8 i 9 kod kojih je prinos bio sličan najvišem prinosu postignutom primenom SWE (SWE 5). Prema rezultatima iz Tabele 9, može se zaključiti da je u SWE neophodno optimizovati temperaturu subkritične vode, trajanje ekstrakcije i brzinu mešanja kako bi se ostvario viši prinos ekstrakcije.

Tabela 9. Prinos ekstrakcije lista crnog dudu primenom različitih ekstrakcionih tehnika pri različitim operativnim uslovima.

Oznaka	Ekstrakciona tehnika	Rastvarač	Parametri ekstrakcije	Prinos (%)	TPC (mg EGK/g)
M 1	Maceracija	100% MeOH	$t = 30 \text{ min}$	5,07	98,25±2,62
M 2	Maceracija	100% MeOH	$t = 60 \text{ min}$	5,54	131,13±5,83
M 3	Maceracija	100% MeOH	$t = 12 \text{ h}$	7,75	137,72±6,03
M 4	Maceracija	100% EtOH	$t = 30 \text{ min}$	2,78	15,91±1,64
M 5	Maceracija	100% EtOH	$t = 60 \text{ min}$	2,75	14,81±1,53
M 6	Maceracija	100% EtOH	$t = 12 \text{ h}$	5,92	84,41±4,48
M 7	Maceracija	100% Aceton	$t = 30 \text{ min}$	2,53	10,70±0,64
M 8	Maceracija	100% Aceton	$t = 60 \text{ min}$	2,89	13,74±3,80
M 9	Maceracija	100% Aceton	$t = 12 \text{ h}$	5,34	47,20±3,02
M 10	Maceracija	75% MeOH	$t = 30 \text{ min}$	10,01	170,72±6,03
M 11	Maceracija	75% MeOH	$t = 60 \text{ min}$	10,31	202,04±5,99
M 12	Maceracija	75% MeOH	$t = 12 \text{ h}$	11,33	374,43±8,43
M 13	Maceracija	50% MeOH	$t = 30 \text{ min}$	7,24	104,14±4,65
M 14	Maceracija	50% MeOH	$t = 60 \text{ min}$	10,95	237,42±5,02
M 15	Maceracija	50% MeOH	$t = 12 \text{ h}$	11,73	242,02±5,85
M 16	Maceracija	75% EtOH	$t = 30 \text{ min}$	7,31	137,22±4,33
M 17	Maceracija	75% EtOH	$t = 60 \text{ min}$	6,98	118,04±3,54
M 18	Maceracija	75% EtOH	$t = 12 \text{ h}$	10,22	364,06±5,83
M 19	Maceracija	50% EtOH	$t = 30 \text{ min}$	9,81	244,97±5,55
M 20	Maceracija	50% EtOH	$t = 60 \text{ min}$	8,88	273,04±4,94
M 21	Maceracija	50% EtOH	$t = 12 \text{ h}$	11,45	323,06±5,65
M 22	Maceracija	75% Aceton	$t = 30 \text{ min}$	6,56	173,31±4,75
M 23	Maceracija	75% Aceton	$t = 60 \text{ min}$	6,34	110,80±5,03
M 24	Maceracija	75% Aceton	$t = 12 \text{ h}$	7,32	219,66±5,77
M 25	Maceracija	50% Aceton	$t = 30 \text{ min}$	9,36	309,43±4,73
M 26	Maceracija	50% Aceton	$t = 60 \text{ min}$	8,97	290,38±4,09
M 27	Maceracija	50% Aceton	$t = 12 \text{ h}$	9,54	371,28±6,34
ASE 1	ASE	50% EtOH	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	18,72	136,94±2,83
ASE 2	ASE	85% EtOH	$T = 63 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	11,27	94,25±2,99
ASE 3	ASE	15% EtOH	$T = 63 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	12,77	98,34±4,54
ASE 4	ASE	100% H ₂ O	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	13,40	46,21±3,94
ASE 5	ASE	100% EtOH	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	11,74	77,10±2,35
ASE 6	ASE	50% EtOH	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	25,05	231,27±8,53
ASE 7	ASE	85% EtOH	$T = 176 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	28,69	271,25±5,29
ASE 8	ASE	15% EtOH	$T = 176 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	46,55	283,51±5,66
ASE 9	ASE	50% EtOH	$T = 200 \text{ }^\circ\text{C}, t = 20 \text{ min}$	48,29	446,89±5,03

Nastavak Tabele 9.

SFE 1	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 150\text{ bar}, t = 2\text{ h}$	4,11	13,50±1,45
SFE 2	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 150\text{ bar}, t = 2\text{ h}$	6,07	21,08±1,29
SFE 3	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 300\text{ bar}, t = 2\text{ h}$	4,44	13,53±1,83
SFE 4	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 300\text{ bar}, t = 2\text{ h}$	6,9	19,05±2,03
SWE 1	SWE	H ₂ O	$T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	35,52	231,00±5,53
SWE 2	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	36,68	421,68±7,74
SWE 3	SWE	H ₂ O	$T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	43,30	457,74±5,55
SWE 4	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	48,20	478,15±4,93
SWE 5	SWE	H ₂ O	$T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	49,08	459,04±5,56
SWE 6	SWE	H ₂ O	$T = 170\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 40\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	37,00	406,34±9,29
SWE 7	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 30\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	35,86	491,18±10,33
SWE 8	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	37,50	502,48±5,20
SWE 9	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 80\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	38,00	472,50±4,83
SWE 10	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 100\text{ bar}, t = 30\text{ min}, 2\text{ Hz}$	33,16	463,82±6,53
SWE 11	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 20\text{ min}, 2\text{ Hz}$	35,70	458,60±7,54
SWE 12	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 40\text{ min}, 2\text{ Hz}$	41,88	523,76±6,88
SWE 13	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 60\text{ min}, 2\text{ Hz}$	44,72	484,23±8,05
SWE 14	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 75\text{ min}, 2\text{ Hz}$	39,52	459,04±9,87
SWE 15	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 90\text{ min}, 2\text{ Hz}$	38,00	441,66±5,22
SWE 16	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 40\text{ min}, 1\text{ Hz}$	31,36	404,31±6,01
SWE 17	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 40\text{ min}, 3\text{ Hz}$	44,24	489,73±5,41
SWE 18	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 40\text{ min}, 4\text{ Hz}$	43,96	463,67±5,14
SWE 19	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}, p = 60\text{ bar}, t = 40\text{ min}, 5\text{ Hz}$	40,50	479,02±9,02

4.2.2.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista crnog dudu

Primenom različitih rastvarača, temperatura i pritiska, kao i različitim trajanjem ekstrakcije, ispitan je uticaj procesnih parametara na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima lista crnog dudu (Tabela 9). Najveći TPC postignut je primenom SWE, dok je najniža vrednost zabeležena primenom maceracije. Temperatura kao najvažniji parametar u SWE imala je značajan uticaj na TPC koji je bio skoro dvostruko veći na najvišoj primenjenoj temperaturi u odnosu na najnižu.

Primenom ASE ispitan je uticaj koncentracije etanola i temperature ekstrakcije na TPC. TPC je u slučaju ASE bio između 46,21±3,94 i 446,89±5,03 mg EGK/g droge, u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova. Najveći TPC je zabeležen u ekstraktu dobijenom primenom 50%-tnog etanola na temperaturi od 200 °C, koji je bio i do tri puta veći u odnosu na prinos postignut na 40 °C. Dobijen TPC na najvišoj primenjenoj temperaturi kod ASE je bio uporediv sa TPC-om postignutim primenom SWE. Osim temperature, rastvarač je takođe imao uticaj na TPC čija je

vrednost bila veća primenom smeše etanol/voda. Polarnost rastvarača u velikoj meri utiče na ekstrakciju fenolnih jedinjenja, stoga i dielektrična konstanta primenjene smeše rastvarača utiče na ekstrakcionu moć ASE. U Tabeli 10 je prikazano smanjenje dielektrične konstante rastvarača primenom viših temperatura. Temperatura, osim uticaja na fizičke osobine rastvarača, kao što su površinski napon, viskoznost i dielektrična konstanta, povoljno utiče i na transfer mase kroz pore čvrstog matriksa (Švarc-Gajić, 2012).

Tabela 10. Dielektrična konstanta smeše rastvarača.

Rastvarač	Temperatura	Dielektrična konstanta
15% EtOH	63 °C	59,09
15% EtOH	176 °C	33,43
50% EtOH	40 °C	48,02
50% EtOH	120 °C	34,71
50% EtOH	200 °C	26,00
85% EtOH	63 °C	31,02
85% EtOH	176 °C	21,55
100% EtOH	120 °C	50,41
100% H ₂ O	120 °C	19,00

Što se tiče SFE, najveći TPC je ostvaren primenom ugljenik(IV)-oksida sa 15%-tnim etanolom na pritisku od 150 bar. Primenom viših koncentracija ko-rastvarača postignut je i veći TPC. Kao i u slučaju korena gaveza, i ovde se može zaključiti da se primenom maceracije, ASE i SWE postiže znatno veći TPC u odnosu na SFE. Razlog tome je veća selektivnost ugljenik(IV)-oksida prema nepolarnim jedinjenjima.

U Tabeli 9 je prikazan uticaj smeše rastvarača i vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u maceratima. Primenom smeše rastvarača i sa produženim vremenom ekstrakcije postizali su se veći TPC. Ova ekstrakciona tehnika je najduže trajala (12 h), s obzirom da se proces odvijao na sobnoj temperaturi. Sve druge tehnike su izvedene na povišenoj temperaturi, što je dovelo do značajnog povećanja TPC-a. TPC u ekstraktima dobijenim primenom maceracije su bili u opsegu 10,70±0,64–374,43±8,43 mg EGK/g droge. Iako je najveći TPC zabeležen primenom 75%-tnog metanola tokom 12 h trajanja, može se zaključiti da je proces racionalniji primenom 50%-tnog metanola/etanola/acetona. Produženo vreme ekstrakcije i potrošnja organskih rastvarača su evidentni nedostaci maceracije u odnosu na SWE koja je pokazala izrazitu prednost u odnosu na druge tehnike ekstrakcije.

U ranije objavljenim studijama ispitivan je TPC u ekstraktima korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz lista *M. nigra* primenom 70%-tnog etanola na temperaturi od 30 °C rezultirala je TPC-om u opsegu od 9,94 do 24,27 mg EGK/g droge (Radojković i dr., 2016), što je veće od sadržaja dobijenog u ovom istraživanju za istu ekstrakcionu tehniku. Primenom metanola na sobnoj temperaturi dobijeno je 11 mg EGK/g ukupnih fenola u

listu *M. nigra* (Žugić i dr., 2014). Iqbal i dr. (2012) su odredili TPC u ekstraktima lista crnog duda dobijenim primenom UAE korišćenjem 80%-tnog metanola kao ekstragensa. Ostvareni TPC je iznosio $24,37 \pm 2,14$ mg EGK/g, približno vrednosti dobijenoj primenom SFE i maceracije uz 100%-tni aceton i 100%-tni etanol. Za nedvosmislenije poređenje potrebna je sistematska analiza jer osim od primenjene tehnike ekstrakcije, prinos i kvalitet ekstrakata zavise i od samog biljnog materijala. Geografsko poreklo, klimatski uslovi, morfologija, sastav zemljišta, biljna sorta i drugi faktori mogu značajno uticati na sastav biljke (Švarc-Gajić, 2012).

4.2.3. Optimizacija ekstrakcije peteljki trešnje

4.2.3.1. Prinos ekstrakcije

Prinos ekstrakcije peteljki trešnje primenom ASE, SFE i SWE u velikoj meri je zavisio od uslova ekstrakcije što je prikazano u Tabeli 11. Prinos ekstrakcije je za sve tehnike varirao u opsegu od 1,42 do 43,94%. Kao i kod ekstrakcije korena gaveza i lista crnog duda, tako i kod ekstrakcije peteljki trešnje, rezultati su ukazali na očiglednu prednost SWE u pogledu prinosa ekstrakcije, dok je primenom SFE prinos bio najniži. Uticaj temperature kod SWE je bio jednako izražen kao i kod ASE s obzirom da su se vrednosti prinosa dvostruko razlikovale primenom najniže i najviše ispitane temperature.

Kao što se može videti u Tabeli 11, najviši prinos primenom ASE dobijen je pri temperaturi od 176 °C i primenom 15%-tnog etanola pri trajanju ekstrakcije od 20 min (37,31%). Uzimajući u obzir temperaturu kao osnovni ekstrakcioni parametar u ASE, najbolji rezultati su postignuti za ASE 8 i ASE 9 izvedene na 176 i 200 °C, redom, čiji su prinosi bili uporedivi sa prinosisima postignutim na 80 °C primenom SWE. Rastvorljivost jedinjenja raste sa temperaturom, kao i njihova disocijacija iz kompleksa sa matriksom uzorka (Švarc-Gajić, 2012). Rezultati su takođe pokazali da su viši prinosi bili postignuti korišćenjem nižih udela etanola. Iako upotreba binarne smeše rastvarača može povećati efikasnost ekstrakcije, viši udeli etanola dovode do snižavanja prinosa ekstrakcije (Mustafa i Turner, 2011).

Kao što je prikazano u Tabeli 11, najviši prinos ekstrakcije primenom SFE dobijen je za SFE 4 (4,42%). Ova vrednost je bila značajno niža od one dobijene za ASE pri optimalnim ekstrakcionim uslovima (ASE 8). Povećanje pritiska i udela etanola kao ko-rastvarača su uticali na porast prinosa ekstrakcije. Etanol kao ko-rastvarač povećava polarnost ugljenik(IV)-oksida olakšavajući rastvaranje analita i omogućavajući viši prinos jedinjenja srednje polarnosti (Fabrowska i dr., 2016; Valadez-Carmona i dr., 2018). Pored toga, Hamburger i dr. (2004) su utvrdili da porast pritiska omogućava povećanje prinosa ekstrakcije usled povećanja gustine fluida, a samim tim i moći solvatacije.

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da se primenom subkritične vode postiže viši prinos ekstrakcije uz smanjenje vremena ekstrakcije. Umerene temperature i pritisci omogućili su dobijanje najvišeg prinosa ekstrakcije (SWE 12, 43,94%) koji je bio dvostruko viši u odnosu na prinos dobijen na 170 °C (20,38%). Potencijalni uzrok pada prinosa na višim temperaturama je

degradacija termolabilnih jedinjenja prisutnih u peteljka trešnje. Ostvareni prinosi većine SWE su bili viši u odnosu na dobijene prinose primenom drugih tehnika ekstrakcije.

Tabela 11. Prinos ekstrakcije peteljki trešanja primenom različitih ekstrakcionih tehnika pri različitim operativnim uslovima.

Oznaka	Ekstrakciona tehnika	Rastvarač	Parametri ekstrakcije	Prinos (%)	TPC (mg EGK/ g)
ASE 1	ASE	50% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	16,92	424,07±11,32
ASE 2	ASE	85% EtOH	$T = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	10,03	227,94±3,13
ASE 3	ASE	15% EtOH	$T = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	18,95	237,22±6,83
ASE 4	ASE	100% H ₂ O	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	16,21	58,92±1,02
ASE 5	ASE	100% EtOH	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	10,54	199,70±3,89
ASE 6	ASE	50% EtOH	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	20,72	199,59±3,03
ASE 7	ASE	85% EtOH	$T = 176\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	16,54	182,17±2,80
ASE 8	ASE	15% EtOH	$T = 176\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	37,31	344,95±4,77
ASE 9	ASE	50% EtOH	$T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	31,08	245,04±1,83
SFE 1	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 150\text{ bar}$, $t = 1\text{ h}$	1,42	2,48±0,23
SFE 2	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 150\text{ bar}$, $t = 1\text{ h}$	2,69	5,89±0,15
SFE 3	SFE	CO ₂ + 7% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 300\text{ bar}$, $t = 1\text{ h}$	1,96	2,59±0,03
SFE 4	SFE	CO ₂ + 15% EtOH	$T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 300\text{ bar}$, $t = 1\text{ h}$	4,42	7,93±0,84
SWE 1	SWE	H ₂ O	$T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	40,26	415,60±9,43
SWE 2	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	40,80	436,74±8,45
SWE 3	SWE	H ₂ O	$T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	41,10	373,61±4,03
SWE 4	SWE	H ₂ O	$T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	33,90	331,62±4,33
SWE 5	SWE	H ₂ O	$T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	23,96	293,98±8,40
SWE 6	SWE	H ₂ O	$T = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	20,38	251,70±6,34
SWE 7	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 30\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	40,08	353,05±5,93
SWE 8	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 60\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	39,05	374,34±4,09
SWE 9	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 80\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	38,32	419,95±5,67
SWE 10	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 100\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 2 Hz	37,96	388,67±3,04
SWE 11	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 20\text{ min}$, 2 Hz	30,62	417,63±9,53
SWE 12	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 40\text{ min}$, 2 Hz	43,94	346,10±8,44
SWE 13	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 60\text{ min}$, 2 Hz	40,56	396,49±5,40
SWE 14	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 75\text{ min}$, 2 Hz	39,30	370,43±3,02
SWE 15	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 90\text{ min}$, 2 Hz	36,56	358,27±7,34
SWE 16	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 1 Hz	28,75	373,39±4,93
SWE 17	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 3 Hz	42,02	369,63±5,59
SWE 18	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 4 Hz	38,84	400,08±2,45
SWE 19	SWE	H ₂ O	$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 40\text{ bar}$, $t = 30\text{ min}$, 5 Hz	31,48	358,34±1,73

4.2.3.2. Uticaj parametara ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima peteljki trešnje

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima peteljki trešnje dobijenim pri različitim operativnim uslovima prikazan je u Tabeli 11. Najveći TPC ostvaren je primenom SWE. Sličan rezultat je postignut primenom ASE na najnižoj temperaturi. Kao i kod SWE, i kod ASE temperatura je pokazala značajan uticaj na TPC. Eksperimentalno dobijene vrednosti TPC-a u ASE ekstraktima su se kretale od $58,92 \pm 1,02$ do $424,07 \pm 11,32$ mg EGK/g droge. Sastav smeše rastvarača je imao manji uticaj na TPC u odnosu na temperaturu. TPC na najnižoj ispitivanoj temperaturi ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) je bio najveći ukazujući na degradaciju termolabilnih jedinjenja na višim temperaturama. U studiji koju su izveli Ademović i dr. (2017) TPC u ekstraktima peteljki trešnje dobijenim primenom UAE sa etanolom je bio od 2 do 4 puta manji u odnosu na TPC u ASE ekstraktima.

Kod SFE sadržaj ukupnih fenola se kretao od $2,48 \pm 0,23$ do $7,93 \pm 0,84$ mg EGK/g droge sa porastom pritiska od 150 do 300 bar pri konstantnoj temperaturi ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) i vremenu ekstrakcije (2 h). Pored toga, moglo se uočiti i povećanje TPC-a sa porastom koncentracije ko-rastvarača. Pritisak predstavlja najvažniji SFE parametar koji utiče na efikasnost ekstrakcije. Porastom pritiska raste gustina ugljenik(IV)-oksida, odnosno moć rastvaranja, dok se selektivnost ekstrakcije smanjuje. Primenom SFE postignut je manji TPC u odnosu na ASE. Dobijeni rezultati su bili očekivani s obzirom na to da SFE karakteriše selektivnost prema nepolarnim jedinjenjima.

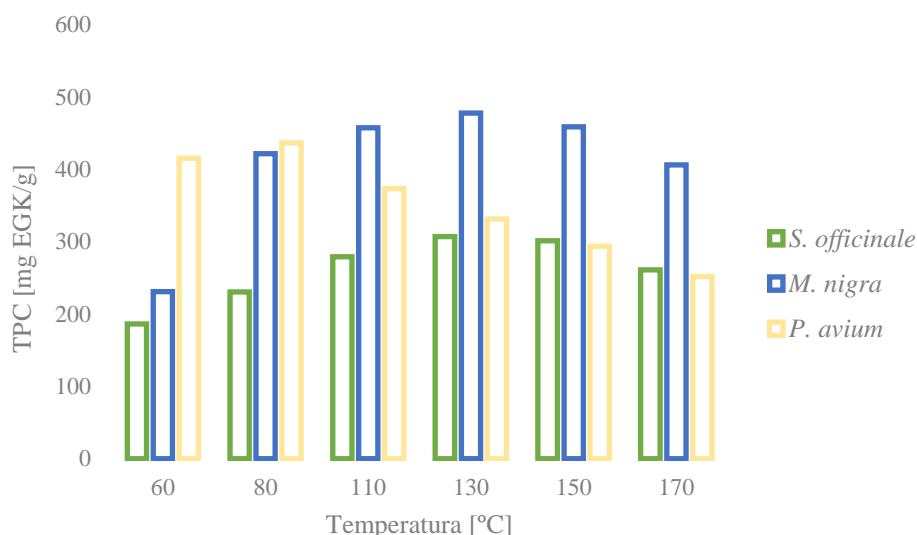
4.2.4. SWE ekstrakcija

Primenom SWE postignuta je najviša efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, koja je u poređenju sa maceracijom i SFE bila višestruko veća. U poređenju sa najoptimalnijim uslovima ekstrakcije primenom ASE, primenom subkritične vode prinosi ekstrakcije su za uzorak korena gaveza i lista crnog duda bili čak 40% i 15% viši, redom, dok su za uzorak peteljki trešnje prinosi bili vrlo slični. S obzirom na superiornost ove ekstrakcione tehnike, detaljnije je ispitan uticaj SWE parametara na kvalitativni i kvantitativni sastav ekstrakata.

Kod SWE, najdominantniji operativni parametar je temperatura jer utiče na dielektričnu konstantu vode, viskozitet, površinski napon, transfer mase, kao i na interakciju sa matriksom uzorka (Švarc-Gajić, 2012). Kao polarni rastvarač na sobnoj temperaturi, voda dobro rastvara polarna jedinjenja. U subkritičnim uslovima, više temperature izazivaju pad polarnosti vode, povećavajući njenu sposobnost da rastvara jedinjenja srednje ili niske polarnosti. Dielektrična konstanta vode opada sa temperaturom (npr. od $\epsilon = 80$ na sobnoj temperaturi do $\epsilon = 27$ na $250\text{ }^{\circ}\text{C}$) i postaje bliska dielektričnoj konstanti metanola ($\epsilon = 33,6$ na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i etanola ($\epsilon = 24,5$ na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Povišene temperature takođe povećavaju kinetiku difuzije i desorpcije (Švarc-Gajić, 2012). S druge strane, suviše visoke temperature mogu dovesti do raspada i gubitka ciljnih jedinjenja. SWE na visokim temperaturama je često praćena i reakcijama karamelizacije, termooksidacije i Maillard-ovim reakcijama (Plaza i dr., 2010). Produkti Maillard-ove reakcije mogu doprineti

biološkoj aktivnosti ekstrakata (npr. antioksidativnoj aktivnosti), ali oni takođe mogu biti i kancerogeni, toksični i mutageni (Husøy i dr., 2008; Cheriot i dr., 2009).

Stoga je za SWE vrlo važno optimizovati temperaturu u zavisnosti od ciljnih jedinjenja. U radu je ispitana primena različitih temperatura (60, 80, 110, 130, 150 i 170 °C) na konstantnom pritisku od 40 bar pri vremenu ekstrakcije od 30 min, pri brzini mešanja od 2 Hz. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 23.

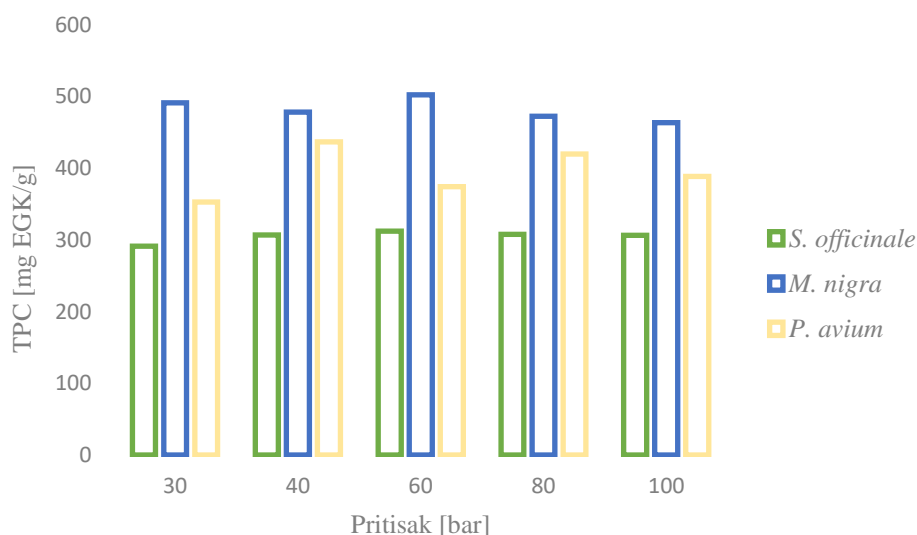


Slika 23. Uticaj temperature na sadržaj ukupnih fenola.

Kao što se može videti na Slici 23, temperatura je uticala na sadržaj ukupnih fenola kod svih ispitivanih uzoraka. Na temperaturi od 130 °C postignut je maksimalni TPC za *S. officinale* ($307,01 \pm 3,70$ mg EGK/g) i *M. nigra* ($478,15 \pm 4,93$ mg EGK/g), dok je maksimalan TPC kod *P. avium* postignut pri temperaturi ekstrakcije od 80 °C ($436,74 \pm 8,45$ mg EGK/g). Slični rezultati su zabeleženi i u studiji u kojoj je ispitivan uticaj SWE temperature na TPC u drugim biljnim vrstama (Kumar i dr., 2011; Ahmadian-Kouchaksaraie i dr., 2016; Cvetanović i dr., 2017). Toplotna energija intenzivira desorpciju ciljnih jedinjenja iz njihovih kompleksa sa komponentama matriksa. Povećanje temperature takođe rezultira smanjenjem viskoznosti rastvarača i površinskog napona što doprinosi efikasnosti ekstrakcije (Švarc-Gajić, 2012). Smanjenje površinskog napona rastvarača omogućava bolje ispunjavanje pora uzorka, kao i bolji kontakt rastvarača i matriksa uzorka. S druge strane, temperature ekstrakcije iznad 80 i 130 °C su uzrokovale pad TPC-a u ispitivanim biljnim ekstraktima usled degradacije termolabilnih fenolnih jedinjenja (Teo i dr., 2010). Pad TPC-a iznad 80 °C kod *P. avium* moguće da je posledica i visokog udela polarnijih jedinjenja sa većom rastvorljivošću u vodi na nižim temperaturama. Porast temperature utiče na smanjenje selektivnosti ekstrakcije zbog povećane rastvorljivosti i drugih jedinjenja prisutnih u ispitivanom biljnom uzorku. Kada su u pitanju biljni materijali, odnosno uzorci složenog hemijskog sastava, ciljni analiti su obično čvrstim vezama vezani za matriks uzorka, što doprinosi otežanoj difuziji analita. Efekti matriksa su najmanje razjašnjeni fenomeni u procesima ekstrakcija

koji objašnjavaju različitu efikasnost ekstrakcije iste klase jedinjenja iz različitih matriksa (Švarc-Gajić, 2012).

Optimizacija pritiska (30, 40, 50, 80 i 100 bar) izvedena je uz prethodno usvojene vrednosti optimalne temperature (80 °C za peteljke trešnje i 130 °C za koren gaveza i list crnog duda). Vreme ekstrakcije (30 min) i brzina mešanja (2 Hz) bili su kao i u prethodnim eksperimentima. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 24.



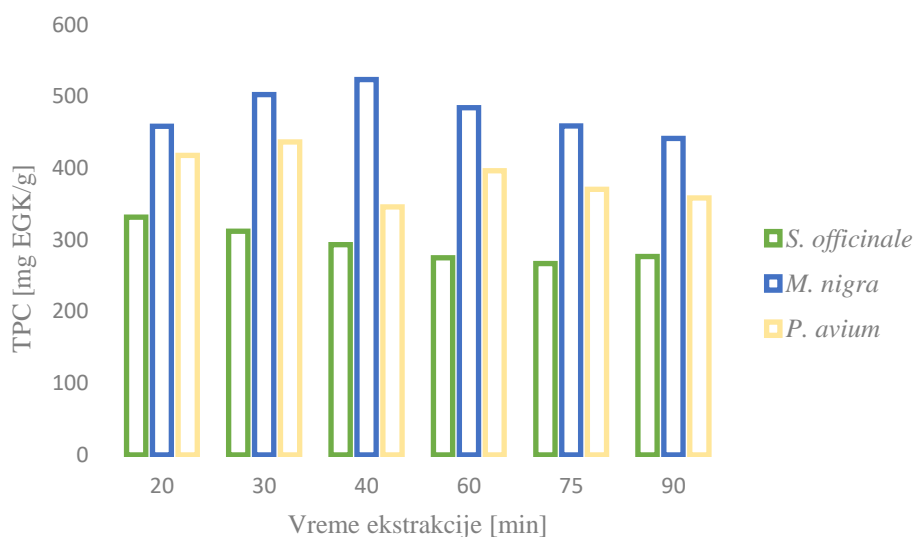
Slika 24. Uticaj pritiska na sadržaj ukupnih fenola.

Kod SWE, pritisak ima manji uticaj na selektivnost i efikasnost procesa, i najčešće se njegova uloga svodi na održavanje vode u tečnom stanju, iako pritisak takođe ima mali uticaj i na solvaciona svojstva i polarnost vode (dielektrična konstanta) (Švarc-Gajić, 2012). Haar i dr. (1984) su utvrdili da porast pritiska od 100 do 6000 bar na 25 °C dovodi do malog porasta dielektrične konstante sa 79 na 93. Visoki pritisci i visoke temperature omogućavaju bolje prodiranje rastvarača u pore uzorka, smanjujući probleme koji nastaju usled formiranja vazdušnih mehurića u porama matriksa (Mustafa i Turner, 2011). S druge strane, za primenu visokih pritisaka neophodno je da se ispune posebni zahtevi od strane opreme i pratećih elemenata. Čak iako je efekat pritiska zanemarljiv na prinos velike većine jedinjenja prisutnih u biljnom matriksu, ovaj parametar je potrebno ispitati radi potpune optimizacije procesa ekstrakcije.

U ispitivanim ekstraktima TPC se neznatno povećavao sa porastom pritiska od 30 do 60 bar, dostižući svoj maksimum na 40 bar za *P. avium* (436,74±8,45 mg EGK/g) i 60 bar za *M. nigra* i *S. officinale* (502,48±5,20 i 312,22±4,71 mg EGK/g, redom). Daljim povećavanjem pritiska, primećen je blagi pad TPC-a. Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa studijom Zeković i dr. (2014), koji su primetili neznatne razlike u TPC-u u ekstraktima semena korijandera dobijenim primenom subkritične vode na pritisacima od 30 do 90 bar. Aliakbarian i dr. (2012) su takođe potvrdili minorni efekat promene pritiska (80–150 bar) na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz grožđa

subkritičnom vodom. Slični rezultati su zabeleženi i u drugoj studiji ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala pomoću subkritične vode u kojoj su autori utvrdili neznatnu razliku u TPC-u na 45 i 90 bar (Cvetanović i dr., 2017).

Definisanje optimalnog vremena ekstrakcije je izvedeno u opsegu od 20 do 90 min pri konstantnim prethodnom definisanim parametrima (Slika 25). U ispitivanom opsegu TPC je varirao pri čemu su najveći sadržaji ostvareni pri kraćim vremenima ekstrakcije. Mogućnost primene kraćeg vremena ekstrakcije se pozitivno odražava i na ekonomsku isplativost tehnološkog procesa. Pri dužim vremenima ekstrakcije dolazi do degradacije bioaktivnih jedinjenja, što je i verovatno bio razlog manjeg sadržaja pri trajanju ekstrakcije od 60, 75 i 90 min. Na osnovu dobijenih rezultata, vreme ekstrakcije od 20, 30 i 40 min je usvojeno kao optimalno za koren gaveza, peteljke trešnje i list crnog duda, redom. U suštini, vreme ekstrakcije je vrlo često povezano sa temperaturom i prirodom matriksa, kao i sa ciljnim jedinjenjima koja se ekstrahuju.

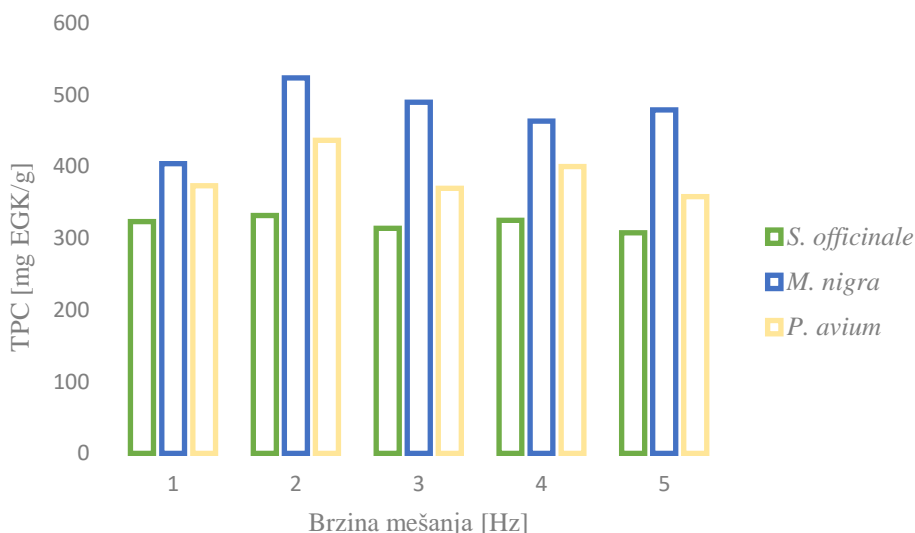


Slika 25. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola.

Pored ispitanih eksperimentalnih uslova, mešanje i mehanizmi prenosa mase su takođe značajni parametri koji utiču na prinos ciljnih analita. Podešavanjem odgovarajuće brzine mešanja uzorka i rastvarača skraćuje se vreme potrebno za dostizanje termodinamičke ravnoteže (Fontanals i dr., 2006). Intenziviranje prenosa mase i toplote, kao i sprečavanja lokalnog pregrevanja materijala na unutrašnjim zidovima ekstrakcione ćelije, bilo je obezbeđeno vibracionim kretanjem platforme na koju se smeštala ekstrakciona ćelija. Uticaj brzine mešanja u opsegu od 1 do 5 Hz na TPC prikazan je na Slici 26. Usvojene optimalne vrednosti temperature, pritiska i vremena ekstrakcije su održavane konstantnim. Najveći TPC za sve tri ispitivane biljne vrste ostvareni su pri brzini mešanja od 2 Hz. U opsegu između 3 i 5 Hz efikasnost ekstrakcije se naznatno menjala.

Ustanovljeni optimalni uslovi SWE za koren gaveza su podrazumevali temperaturu od 130 °C, pritisak od 60 bar, vreme ekstrakcije od 20 min i brzinu mešanja od 2 Hz. Za list crnog duda

optimalne vrednosti parametara ekstrakcije podrazumevali su temperaturu od 130 °C, pritisak od 60 bar, vreme ekstrakcije od 40 min i brzinu mešanja od 2 Hz. Definisani optimalni uslovi procesa za peteljke trešnje su obuhvatili temperaturu od 80 °C, pritisak od 40 bar, vreme ekstrakcije od 30 min i brzinu mešanja 2 od Hz. Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom ispitivanog biljnog materijala subkritičnom vodom pri optimalnim uslovima korišćeni su u definisanju hemijskog profila primenom HPLC–ESI–TOF–MS analize.



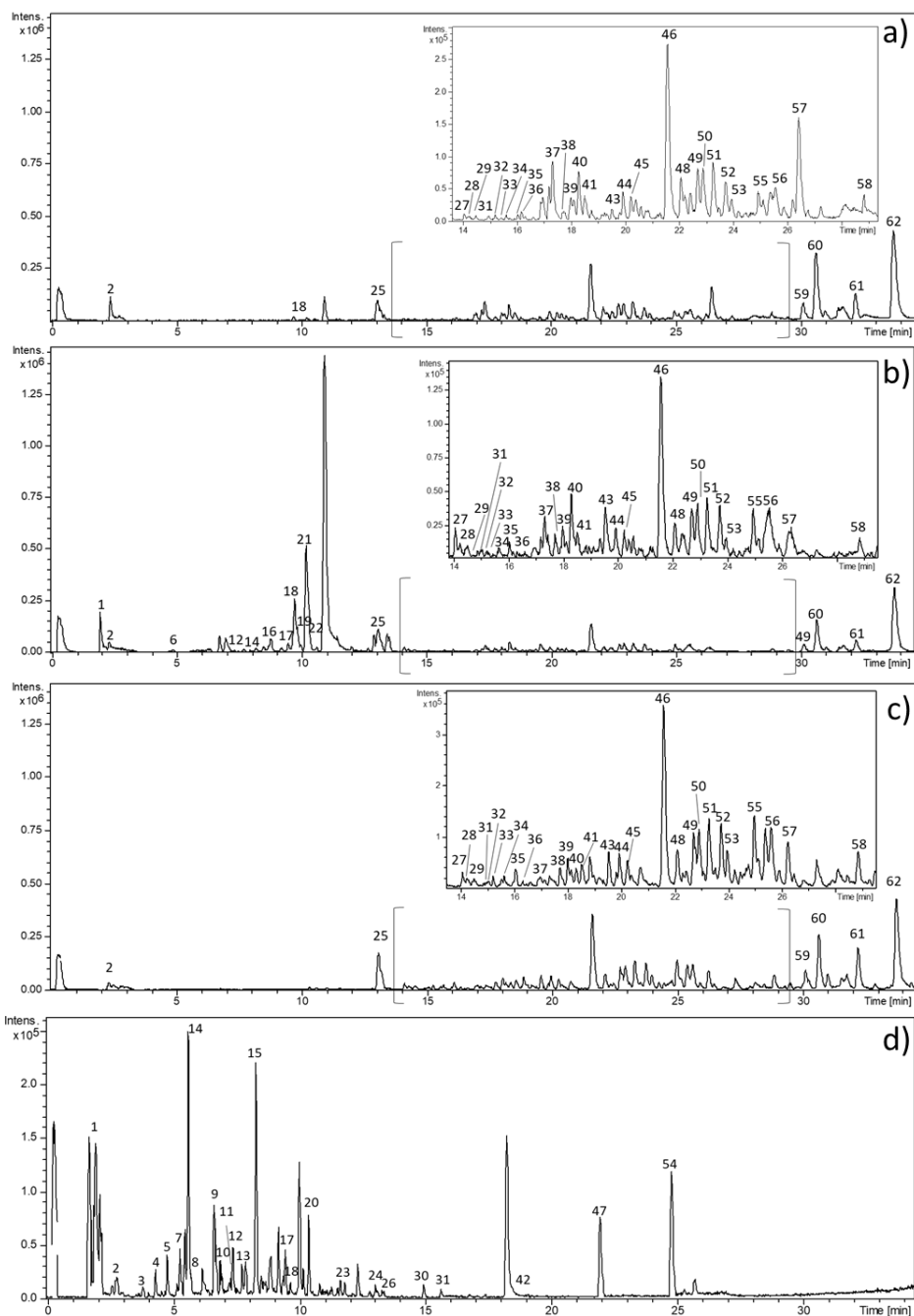
Slika 26. Uticaj brzine mešanja na sadržaj ukupnih fenola.

Sadržaji ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim pri optimalnim uslovima SWE su bili znatno veći u odnosu na vrednosti kod ekstrakata dobijenih primenom drugih ekstrakcionih tehnika pri različitim operativnim uslovima. Velika prednost SWE se ogledala u kratkom vremenu ekstrakcije, s obzirom da je za 20 min postignut mnogo veći TPC u odnosu na maceraciju, ASE i SFE koje su izvođene od 20 min do 12 h. Primenom SWE postignut je približno isti ili do dva puta veći TPC u odnosu na ASE ekstrakte dobijene na višim temperaturama. Prikazani rezultati su pokazali da je temperatura najznačajniji SWE parametar. Dominantan efekat temperature na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja je zabeležen i u literaturi (Ibañez i dr., 2003; Aliakbarian i dr., 2012). Pritisak tokom ekstrakcije nije ispoljio značajan uticaj na TPC u ekstraktima.

4.3. Hemijska karakterizacija ekstrakata

4.3.1. HPLC–MS analiza odabranih ekstrakata korena gaveza

Ekstrakti korena gaveza dobijeni primenom maceracije, ASE, SFE i SWE analizirani su HPLC–ESI–QTOF–MS/MS metodom (Slika 27). Identifikacija jedinjenja je izvedena na osnovu molekulske formule izračunate iz masa ESI pseudomolekulskih jona, uzimajući u obzir podatke koji su prethodno objavljeni u literaturi i baze podataka obrazaca fragmentacije. Tentativno identifikovana jedinjenja su numerisana u hromatogramima prema njihovom redosledu eluiranja. Prvi pik odgovara kalibracionom rastvoru.



Slika 27. Hromatogrami ekstrakata korena gaveza dobijenih primenom: a) maceracije, b) ASE, c) SFE i d) SWE.

Očitane vrednosti retencionih vremena, molekulske mase pseudomolekulskih jona i glavnih fragmentnih jona date su u Tabeli 12. U korenu gaveza je tentativno identifikovano ukupno 62 jedinjenja različitih hemijskih klasa, uključujući antrahinone, organske, fenolne i masne kiseline i njihove derivate. Neka od ovih jedinjenja su ranije identifikovana u korenu gaveza, međutim, visoka selektivnost QTOF-MS-a, kao i specifičnost pojedinih ekstrakata su omogućili detekciju čak 53 jedinjenja čije prisustvo u korenu gaveza do sada nije utvrđeno.

Tabela 12. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima korena gaveza.

Pik	Retenciono vreme (min)	Eksperimentalna m/z vrednost	Izračunata m/z vrednost	(M-H) ⁻	Greška (ppm)	MS ² fragmenti (relativna abundanca, %)	Identifikovano jedinjenje	Ekstrakti**
1	1,98	377,0876	377,0878	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	0,4	341,1074 (3,49%)	Derivat kafene kiseline*	M 4-6, 10-12, ASE 1-9, SWE 11
2	2,33	191,0188	191,0197	C ₆ H ₇ O ₇	5,0	111,0062 (15,15%)	Limunska kiselina*	M 4-6, 10-15 ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 11
3	3,85	549,0876	549,0886	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	1,9	nije fragmentovan	Kvercitin-3-malonilglukozid izomer 1*	SWE 11
4	4,33	549,0875	549,0886	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	2,1	nije fragmentovan	Kvercitin-3-malonilglukozid izomer 2*	SWE 11
5	4,79	137,0245	137,0244	C ₇ H ₅ O ₃	-0,3	nije fragmentovan	Hidroksibenzoeva kiselina izomer 1	SWE 11
6	4,83	299,0767	299,0772	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	1,7	93,0303 (100%); 137,0189 (38,79%)	Glukozid hidroksibenzoeve kiseline*	M 4-6, 10-12 ASE 1-9
7	5,15	151,0406	151,0401	C ₈ H ₇ O ₃	-3,8	nije fragmentovan	Hidroksifenilacetatna kiselina	SWE 11
8	5,72	313,0725	313,0718	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-2,3	nije fragmentovan	Cirismaritin izomer 1*	SWE 11
9	6,64	163,0411	163,0401	C ₉ H ₇ O ₃	-6,4	nije fragmentovan	<i>p</i> -kumarinska kiselina	SWE 11
10	6,88	313,0735	313,0718	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-5,5	nije fragmentovan	Cirismaritin izomer 2*	SWE 11
11	7,24	271,0971	271,0976	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	1,8	nije fragmentovan	Dihidroksi-dimetoksi-dihydrofenantren*	SWE 11
12	7,48	137,0226	137,0244	C ₇ H ₅ O ₃	13,6	108,0215 (67,17%); 92,0265 (38,19%)	Hidroksibenzoeva kiselina izomer 2	ASE 5, 7, 8, SWE 11
13	7,73	219,0665	219,0663	C ₁₂ H ₁₁ O ₄	0,9	nije fragmentovan	Dimetoksi-metilumarin*	SWE 11
14	7,96	179,0332	179,035	C ₉ H ₇ O ₄	9,9	135,046 (100%); 107,0505 (5,69%)	Kafena kiselina	M 4,10, ASE 2,3,5,6, SWE 11
15	8,30	507,1144	507,1144	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	0,1	nije fragmentovan	Siringetin-3- <i>O</i> -glukozid*	SWE 11

Nastavak Tabele 12.

16	8,76	537,1036	537,1038	$C_{27}H_{21}O_{12}$	0,4	197,0437 (100%); 339,0496 (86,75%); 295,0595 (70,42%); 135,0429 (69,26%)	Salvianolna kiselina H/I	M 4-6, 10- 12, ASE 1- 6
17	9,48	717,1483	717,1461	$C_{36}H_{29}O_{16}$	-3,0	475,1057 (100%); 339,0527 (83,44%)	Salvianolna kiselina B izomer 1	M 4-6, 10- 12, ASE 1- 9, SWE 11 M 4-6, 10-
18	9,7	311,0565	311,0561	$C_{17}H_{11}O_6$	-1,4	267,0667 (100%)	Acetil-monometil- trihidroksi antrahinon*	15, ASE 1- 9, SFE 2,3, SWE 11 M 4-6, 10-
19	9,87	717,1458	717,1461	$C_{36}H_{29}O_{16}$	0,5	475,1128 (100%); 339,0568 (46,94%)	Salvianolna kiselina B izomer 2	M 4-6, 10- 12, ASE 1- 8
20	10,15	161,0247	161,0244	$C_9H_5O_3$	-1,7	nije fragmentovan 161,0222 (100%);	Hidroksikumarin*	SWE 11
21	10,17	719,163	719,1618	$C_{36}H_{31}O_{16}$	-1,7	359,075 (37,78%); 197,0432 (31,09%)	Sageriniska kiselina*	M 4-6, 10- 12, ASE 1- 7
22	10,3	187,0963	187,0976	$C_9H_{15}O_4$	6,8	125,0974 (100%); 97,0658 (54,77%)	Azelainska kiselina*	ASE 5, SFE 1-4
23	11,64	159,046	159,0452	$C_{10}H_7O_2$	-5,3	nije fragmentovan	Metilkumarin*	SWE 11
24	13,00	243,0657	243,0663	$C_{14}H_{11}O_4$	2,2	nije fragmentovan	Oksirezveratrol*	SWE 11
25	13,03	329,2339	329,2333	$C_{18}H_{33}O_5$	-1,7	211,1256 (100%); 229,1358 (40,5%)	Trihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 1*	M 4-6, 10- 15, ASE 1- 9, SFE 1-4
26	13,33	137,0241	137,0244	$C_7H_5O_3$	2,5	nije fragmentovan	Hidroksibenzoeva kiselina izomer 3	SWE 11
27	14,07	329,2344	329,2333	$C_{18}H_{33}O_5$	-3,2	199,131 (100%); 211,1311 (67,96%); 129,0891 (43,67%)	Trihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 2*	M 4-6, 10- 15, ASE 1- 3, 5-7, SFE 1-4

Nastavak Tabele 12.

28	14,3	327,2166	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	3,2	209,119 (100%); 129,0922 (48,53%); 185,1188 (46,63%)	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 1*	M 13-15, ASE 2,5, SFE 1-4
29	14,5	327,2186	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	-2,7	209,119 (100%); 171,1031 (41,88%); 185,1189 (22,87%)	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 2*	M 13-15, ASE 2,5, SFE 1-4
30	14,9	221,1171	221,1183	$C_{13}H_{17}O_3$	5,6	nije fragmentovan	Dehidrovomifoliol*	SWE 11
31	15,07	329,2344	329,2333	$C_{18}H_{33}O_5$	-3,1	201,1134 (100%); 171,1029 (90,74%); 199,134 (84,53%)	Trihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 3*	M 12-15, ASE 2,5, SFE 1-4, SWE 11
32	15,24	313,2396	313,2384	$C_{18}H_{33}O_4$	-3,8	127,1128 (12,62%); 99,0815 (11,69%)	Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 1*	M 13-15, ASE 1,5, SFE 1-4
33	15,54	287,222	287,2228	$C_{16}H_{31}O_4$	2,8	269,2123 (35,08%); 199,1342 (16,94%)	Dihidroksiheksadekanska kiselina izomer 1*	M 13-15, ASE 2,5, SFE 1-4
34	15,64	313,2383	313,2384	$C_{18}H_{33}O_4$	0,3	99,0813 (18,71%); 127,1132 (15,64%)	Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 2*	M 12-15, ASE 2,5, SFE 1-4
35	16,06	287,2225	287,2228	$C_{16}H_{31}O_4$	1,0	269,2129 (39,5%); 85,0657 (13,92%)	Dihidroksiheksadekanska kiselina izomer 2*	M 12-15, ASE 1,2,5, SFE 1-4
36	16,34	309,208	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	-2,7	99,0813 (100%); 209,1183 (67,85%); 185,118 (45,57%)	Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1*	M 12-15, ASE 2,5, SFE 1-4
37	17,68	313,2357	313,2384	$C_{18}H_{33}O_4$	8,8	183,139 (100%); 129,0921 (55,77%)	Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 3*	M 4-6, 10- 15, ASE 1,2,5-7, SFE 1-4

Nastavak Tabele 12.

38	17,94	313,239	313,2384	$C_{18}H_{33}O_4$	-1,8	201,1136 (100%); 127,113 (21,88%)	Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 4*	M 4-6, 10- 15, ASE 1,2,5-7, SFE 1-4
39	18,13	311,2237	311,2228	$C_{18}H_{31}O_4$	-3,0	293,2105 (100%); 211,1317 (53,74%); 197,1162 (39,72%)	Hidroperoksi- oktadekadienska kiselina izomer 1*	M 13-15, ASE 1,2,5, SFE 1-4
40	18,51	311,2219	311,2228	$C_{18}H_{31}O_4$	3,0	171,0966 (100%); 211,1269 (34,77%); 139,1079 (24,92%)	Hidroperoksi- oktadekadienska kiselina izomer 2*	M 13-15, ASE 1,2,5, SFE 1-4
41	18,83	315,2544	315,2541	$C_{18}H_{35}O_4$	-1,0	297,2433 (23,81%); 141,1286 (15,51%)	Dihidroksistearinska kiselina izomer 1*	M 12-15, ASE 2,5,7,9, SFE 1-4
42	19,00	313,237	313,2384	$C_{18}H_{33}O_4$	4,6	nije fragmentovan	Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 5*	SWE 11
43	19,52	315,2548	315,2541	$C_{18}H_{35}O_4$	-2,4	297,244 (31,33%); 141,1284 (13,19%)	Dihidroksistearinska kiselina izomer 2*	M 4,6,10, 12-15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4
44	19,88	309,2064	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	2,3	171,1043 (100%); 137,0981 (99,09%)	Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 2*	M 4-6, 10- 15, ASE 1,2,5, SFE 1-4
45	20,2	309,2067	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	1,5	139,1131 (100%); 291,1966 (34,57%); 125,0971 (27,59%)	Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 3*	M 4-6, 10- 15, ASE 1,2,5, SFE 1-4
46	21,51	295,2277	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	0,4	277,2177 (100%); 171,1026 (49,67%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1*	M 4-6, 10- 15, ASE 1,2,5-7, SFE 1-4

Nastavak Tabele 12.

47	21,88	221,1542	221,1547	$C_{14}H_{21}O_2$	2,1	nije fragmentovan	Di-terc-butil-hidrokinon*	SWE 11 M 4-6, 10-
48	22,08	295,2296	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-5,9	277,218 (100%); 171,1031 (82,29%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2*	15, ASE 1,2,5-7, SFE 1-4 M 4-6, 10-
49	22,66	293,2135	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-4,4	113,0973 (100%); 57,0345 (35,05%)	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 1*	15, ASE 1,2,5-7, SFE 1-4 M 4-6, 10-
50	22,88	293,2141	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-6,5	113,0978 (100%); 57,0346 (33,26%)	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 2*	15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4 M 4-6, 10-
51	23,23	293,2136	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-4,6	185,1158 (47,63%); 125,0947 (38,98%)	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 3*	15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4 M 4-6, 10-
52	23,7	293,2137	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-5,0	185,1183 (51,23%); 125,0973 (30,13%)	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 4*	15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4 M 4-6, 10-
53	23,91	297,2447	297,2435	$C_{18}H_{33}O_3$	-3,9	155,1079 (95,6%); 279,2334 (82,35%)	Ricinoleinska kiselina izomer 1*	15, ASE 2,3,5-7,9 SFE 1-4 M 4-6, 10-
54	24,67	205,1596	205,1598	$C_{14}H_{21}O$	1,1	nije fragmentovan	Di-terc-butil-fenol*	SWE 11 M 12-15, ASE 2,5,7, SFE 1-4
55	25,07	295,2287	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-3,0	139,1135 (11,07%); 277,2188 (8,11%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 3*	ASE 2,5,7, SFE 1-4

Nastavak Tabele 12.

56	25,54	295,2308	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-9,9	59,0144 (21,6%); 125,0974 (16,49%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 4*	M 12-15, ASE 1,2,5,7, SFE 1-4
57	26,17	295,2293	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-5,0	111,0813 (31,26%); 165,1289 (15,95%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 5*	M 12-15, ASE 1,2,5,7, SFE 1-4
58	28,78	297,2448	297,2435	$C_{18}H_{33}O_3$	-4,3	171,1025 (36,22%); 280,2375 (17,18%)	Ricinoleinska kiselina izomer 2*	M 6, 12-15, ASE 1,2,5- 7, SFE 1-4 M 4-6, 10-
59	30,02	277,2171	277,2173	$C_{18}H_{29}O_2$	0,7	59,0141 (77,82%)	Linolenska kiselina izomer 1*	15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4 M 4-6, 10-
60	30,55	277,2191	277,2173	$C_{18}H_{29}O_2$	-6,6	59,0139 (100%); 83,0503 (14,38%)	Linolenska kiselina izomer 2*	15, ASE 1,2,5-7,9, SFE 1-4 M 4-6, 10-
61	32,11	253,2169	253,2173	$C_{16}H_{29}O_2$	1,7	191,108 (2,02%)	Palmitoleinska kiselina*	15, ASE 1- 7,9, SFE 1- 3
62	33,63	279,2345	279,233	$C_{18}H_{31}O_2$	-5,5	59,0131 (3,51%)	Linolna kiselina*	M 4-6, 10- 15, ASE 1- 9, SFE 1-4

* Jedinjenja identifikovana u korenu gaveza po prvi put.

*** Ekstrakcioni uslovi za dobijene ekstrakte su navedeni u Tabeli 8.

Organske kiseline

Na osnovu masenih spektara i profila eluiranja, samo jedno jedinjenje je bilo okarakterisano kao organska kiselina. Jedinjenje koje je eluirano kao pik 2 pri m/z 191,0197 je bilo identifikovano kao limunska kiselina. Fragmentacijom molekuskog jona je dobijen fragmentni jon sa m/z 111,0062 usled gubitka molekula vode i ugljenik(IV)-oksida $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$. U korenu gaveza je po prvi put utvrđeno prisustvo limunske kiseline.

Polifenolna jedinjenja i derivati

U ekstraktima korena gaveza detektovana su dva derivata hidroksicimetne kiseline. Analizom masenih spektara jedinjenja 1 i 14 utvrđeno je prisustvo molekulskih jona $[M-H]^-$ sa m/z 377,0878 i 179,035. Jedinjenja 1 i 14 su okarakterisana kao derivat kafene kiseline i kafena kiselina, redom, na osnovu fragmentacije odgovarajućeg deprotonovanog molekuskog jona i nastalih MS^2 fragmentnih jona sa m/z 341,1074 i 135,046 usled gubitka ugljenik(IV)-oksida. Prisustvo kafene kiseline u korenu gaveza su prethodno utvrdili Roman i dr. (2008) primenom HPLC-UV/VIS tehnike. Jedinjenja eluirana kao pikovi 3 i 4 tentativno su identifikovana kao izomeri kvercetin-3-malonilglukozida na osnovu literaturnih podataka (Melguizo-Melguizo i dr., 2014). Kod jedinjenja eluiranih kao pikovi 5, 12 i 26 uočeni su $[M-H]^-$ sa m/z 137,0244 i fragmentni jon sa m/z 108,0215, a identifikovana su kao izomeri hidroksibenzoeve kiseline. Zapažen je i gubitak ugljenik(IV)-oksida dajući $[M-H-44]^-$ kao karakterističan jon sa m/z 92,0265. Pik 6 koji potiče od molekuskog jona $[M-H]^-$ sa m/z 299,0772 tentativno je identifikovan kao glukozid hidroksibenzoeve kiseline. Fragmentacijom molekuskog jona dobijen je fragmentni jon sa m/z 137,0189 koji ogovara hidroksibenzojoj kiselini nakon gubitka glukozne grupe. Jedinjenja (pikovi 7 i 9) koja potiču od molekulskih jona sa m/z 151,0401 i 163,0401 tentativno su identifikovana kao hidroksifenilacetatna i *p*-kumarinska kiselina na osnovu podataka za *S. officinale* objavljenih u studiji Grabias i Swiatek (1998). Metoksi flavonoid detektovan je kao jedinjenja 8 i 10 sa $[M-H]^-$ sa m/z 313,0718, a identifikovan je kao cirismaritin (Fattahi i dr., 2013). Kod jedinjenja koje je eluirano kao pik 16 uočen je pseudomolekulski jon sa m/z 537,1038 koji je odgovarao strukturi salvianolne kiseline H/I ili litospermične kiseline A. Jedinjenje 16 je tentativno identifikovano kao salvianolna kiselina H/I zbog prisustva karakterističnog fragmentnog jona sa m/z 339 opisanog u literaturi (Liu i dr., 2007). Prisustvo salvianolne kiseline H/I je takođe potvrđeno uočenim fragmentnim jonima sa m/z 197,0437, 295,0595 i 135,0429. Jedinjenja koja su eluirana kao pikovi 17 i 19 predstavljaju izomere salvianolne kiseline B sa deprotonovanim molekuskim jonom sa m/z 717,1461. Dobijen obrazac fragmentacije je bio u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima iz studije Liu i dr. (2007). Kod ESI-MS/MS spektra molekuskog jona $[M-H]^-$ uočeni su fragmenti nastali usled neutralnog gubitka dva molekula danshensu (DSS) (198 Da) i kafene kiseline (CA) (180 Da), što je rezultovalo fragmentnim jonima sa m/z 475,1057 ($-CA-CO_2$) i 339,0527 ($-DSS-CA$). Pik 21 je odgovarao molekuskom jonu $[M-H]^-$ sa m/z 719,1618, dajući jone glavnih fragmenata sa m/z 359,075 i 161,0222, koji su dalje odgovarali ruzmarinskoj kiselini ($[M-2H]^{2-}$) i njenom deprotonovanom kafeoil ostatku, redom. Dobijeni podaci bili su u

saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima u studiji Barros i dr. (2013) za sagerinsku kiselinu, dimera ruzmarinske kiseline i tetramera kafene kiseline. Dimerizacija nastaje [2+2] vezivanjem olefinskih grupa formirajući ciklobutansku strukturu (Lu i Foo, 1999).

Masne kiseline i derivati

U analiziranim ekstraktima korena gaveza detektovano je 36 masnih kiselina, uključujući nezasićene, zasićene i hidroksi masne kiseline. Derivati masnih kiselina prirodno se javljaju kao sastojci biljnih lipida koji ulaze u sastav ćelijskih membrana. Takođe se u biljnim tkivima mogu naći i metabolički produkti masnih kiselina koji nastaju reakcijom oksidacije (Bonaventure i dr., 2004; Yang i dr., 2019). Među njima, hidroksi masne kiseline ispoljavaju biološku aktivnost i to antibakterijsku, antiinflamacijsku i antiproliferativnu (Mundt i dr., 2003; Isobe i dr., 2012; Clericuzio i dr., 2017). HPLC-ESI-MS/MS analiza jedinjenja 22 je pokazala prisustvo deprotonovanog molekulskog jona $[M-H]^-$ sa m/z 187,0976 koji je mogao biti pripisan azelainskoj kiselini. Ova 9-ugljenična zasićena dikarboksilna masna kiselina igra ulogu u sistemskom imunitetu biljaka i nalazi se u pojedinim biljkama (Jung i dr., 2009). Na osnovu MS^2 spektra jasno je da od molekulskog jona nastaju fragmentni joni sa m/z 125,0974 $[M-H-H_2O-COO]^-$ i m/z 97,0658 $[M-H-H_2O-COO-CO]^-$ gubitkom jedne od kiselinskih grupa i daljom reakcijom dehidracije. Kod pikova 25, 27 i 31 sa $[M-H]^-$ jonom pri m/z 329,2333 su uočeni fragmentni joni sa m/z 211,1256 $[M-H-C_6H_{14}O_2]^-$ i 199,131 $[M-H-C_7H_{14}O_2]^-$ karakteristični za trihidroksi-oktadekansku kiselinu (Zhang i dr., 2014). Kod jedinjenja koja su eluirana kao pikovi 28 i 29 sa istom molekulskom formulom $C_{18}H_{32}O_5$, uočeni su MS^2 fragmentni joni sa m/z 209,119, 171,1031 i 185,1189. Fragmentacioni model jedinjenja identifikovanih kao izomeri trihidroksi-oktadekadienske kiseline bili su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Rodríguez-Pérez i dr., 2018). Gubitak dva molekula vode iz jedinjenja koja su eluirana kao pikovi 25, 27, 31 i 28, 29 ukazali su na prisustvo hidroksilnih grupa, dok je razlika mase od 2 Da između njih ukazala na prisustvo dvostruke veze (Frag i dr., 2015). Jedinjenja koja su eluirana kao pikovi 32, 34, 37, 38 i 42 sa $[M-H]^-$ jonom sa m/z 313,2384 su identifikovana kao izomeri dihidroksi-oktadekanske kiseline poređenjem njihovih obrazaca fragmentacije i literaturnih podataka (Figueroa i dr., 2018; Nematallah i dr., 2018). Izomeri dihidroksiheksadekanske kiseline sa deprotonovanim molekulskim jonom sa m/z 287,2228 i fragmentnim jonom sa m/z 269,2123 (gubitak H_2O) su identifikovani kao jedinjenja 33 i 35 na hromatogramu. Jedinjenja (pikovi 36, 44 i 45) sa prekursor jonom sa m/z 309,2071 su tentativno identifikovana kao izomeri hidroperoksi-oktadekatrienske kiseline, a na osnovu nastalih fragmentnih jona sa m/z 99,0813, 209,1183, 185,118, 171,1043 i 137,0981 i literaturnih podataka (Jiménez-Sánchez i dr., 2016; Rodríguez-Pérez i dr., 2018). Detektovana su dva izomera hidroperoksida oktadekadienske kiseline sa m/z 311,2228 (pikovi 39 i 40). Glavni MS^2 fragment nastao je raskidanjem najslabije veze u molekulu u blizini funkcionalne grupe, što je praćeno gubitkom molekula vode. Druga dva izomera hidroksi masnih kiselina identifikovana u ekstraktima korena gaveza su bili izomeri dihidroksistearinske kiseline (pikovi 41 i 43). Njihovi fragmenti su dobijeni sa m/z 297,2433 i 141,1286. Jedinjenja 46, 48, 55, 56 i 57 su tentativno identifikovana kao izomeri hidroksi-oktadekadienske kiseline na osnovu

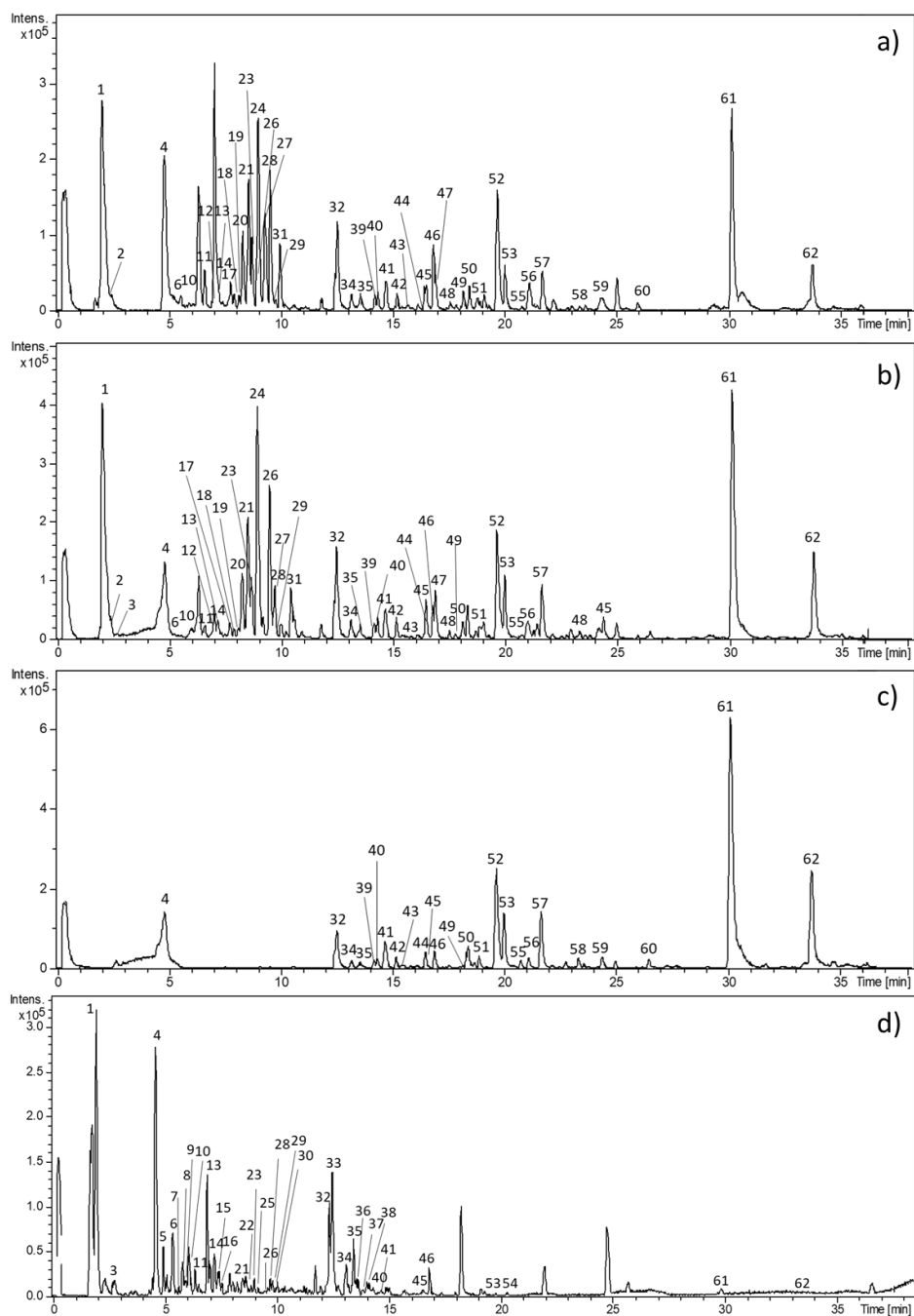
molekulskog jona sa m/z 295,2279 i fragmentnih jona sa m/z 277,2177 i 171,1026 nastalih usled neutralnog gubitka molekula vode i raskidanja C–C veze pored hidroksilne grupe, redom. Jedinjenja koja su eluirana kao pikovi 49, 50, 51 i 52 sa molekulskim jonom sa m/z 293,2122, okarakterisana su kao izomeri okso-oktadekadienske kiseline. U MS² spektru su uočeni karakteristični fragmentni joni sa m/z 185,1158 i 113,0973 formirani raskidanjem dvostruke veze pored karbonilne grupe. Detektovan je i fragmentni jon sa m/z 125,0947 nastao iz jona sa m/z 185,1158 gubitkom CH₃COOH. U ekstraktima korena gaveza detektovana su dva izomera ricinoleinske kiseline sa molekulskim jonom sa m/z 297,2435 (pikovi 53 i 58) i MS/MS fragmentnim jonima sa m/z 155,1079, 279,2334 i 171,1025 (Martin-Arjol i dr., 2010). U MS² spektrima oba izomera ricinoleinske kiseline je uočeno prisustvo fragmentnog jona sa m/z 279 nastalog usled neutralnog gubitka vode. Jedinjenja (pikovi 59 i 60) sa prekursor jonom [M–H]⁻ sa m/z 277,2173 su nedvosmisleno identifikovana kao izomeri linolenske kiseline, a na osnovu podataka iz prethodnih studija (Jiménez-Sánchez i dr., 2016). Dve mononezasićene i polinezasićene masne kiseline (pikovi 61 i 62) su detektovane kao palmitoleinska kiselina i linolna kiselina, na osnovu dobijenih deprotonovanih molekulskih jona sa m/z 253,2173 i 279,233, redom, kao i literaturnih podataka (Jiménez-Sánchez i dr., 2016; Liu i dr., 2019).

Ostala bioaktivna jedinjenja

U ekstraktima korena gaveza detektovan je i jedan antrahinon. Jedinjenje koje je eluirano kao pik 18 je odgovaralo [M–H]⁻ sa m/z 311,0561. Na osnovu prethodnih podataka o antrahinonima prisutnim u biljnom materijalu (Stodůlková i dr., 2010), kao i na osnovu zastupljenosti pojedinih fragmentnih jona, pre svega jona sa m/z 267,0667 usled gubitka ugljenik(IV)-oksida iz odgovarajućeg deprotonovanog jona, jedinjenje 18 je tentativno identifikovano kao acetylmonometil-trihidroksi antrahinon. Jedinjenje eluirano kao pik 30 identifikovano je kao dehidrovomifoliol na osnovu literaturnih podataka (Melguizo-Melguizo i dr., 2014).

4.3.2. HPLC–MS analiza odabranih ekstrakata lista crnog duda

Kao što je već pomenuto, širok spektar bioaktivnih jedinjenja različite polarosti koja se nalaze u niskim koncentracijama u matriksima uzoraka doveo je do razvoja moćnih analitičkih platformi sposobnih za razdvajanje, identifikaciju i razjašnjavanje struktura jedinjenja. Ekstrakti lista crnog duda dobijeni primenom različitih tehnika ekstrakcije okarakterisani su primenom HPLC–ESI–TOF–MS i HPLC–ESI–QTOF–MS/MS sistema. Za identifikaciju korišćeni su podaci o tačnoj masi [M–H]⁻ deprotonovanog molekula, karakteristični fragmenti u MS² spektrima zajedno sa podacima koji su prethodno navedeni u literaturi. Rezultirajući hromatogrami reprezentativnih ekstrakata *M. nigra* za svaku tehniku ekstrakcije prikazani su na Slici 28. Pikovi su numerisani u skladu sa redosledom eluiranja. Prvi pik odgovara kalibracionom rastvoru. Hemijski profili ekstrakta *M. nigra* dobijeni primenom maceracije (Slika 28a) i ASE (Slika 28b) bili su vrlo slični i pokazali su najveći broj identifikovanih jedinjenja, dok je ekstrakt dobijen primenom SFE (Slika 28c) pokazao prisustvo većeg broja nepolarnih jedinjenja kao što se i očekivalo.



Slika 28. Hromatogrami ekstrakata lista crnog dudu dobijenih primenom: a) maceracije, b) ASE, c) SFE i d) SWE.

Tabela 13 sadrži spisak identifikovanih jedinjenja u različitim ekstraktima sa njihovim retencionim vremenima, masama molekularnih jona ($[M-H]^-$), eksperimentalnim i izračunatim m/z vrednostima, greškama i fragmentnim jonima. Ukupno 62 jedinjenja identifikovano je u ekstraktima lista *M. nigra*. Analiza je omogućila identifikaciju jedinjenja različitih hemijskih klasa obuhvatajući organske kiseline i derivate vitamina, fenolna jedinjenja (jednostavni fenoli, flavonoidi i lignani) i njihove derivate, te masne kiseline i njihove derivate (glikolipidi).

Tabela 13. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima lista crnog duda.

Pik	Retenciono vreme (min)	Eksperimentalna m/z vrednost	Izračunata m/z vrednost	(M-H) ⁺	Greška (ppm)	MS ² fragmenti (relativna abundance, %)	Identifikovano jedinjenje	Ekstrakti**
1	2,14	191,0556	191,0561	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,6	85,0279 (100%); 59,0125 (34,55%); 93,0326 (32,39%); 87,0071 (17,99%); 127,0383 (11,03%)	Kimniska kiselina	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-4, 6-9, SWE 12
2	2,40	337,0764	337,0776	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₁	3,2	311,0964 (14,79%); 149,0434 (14,4%)	Glukozid L-askorbinske kiseline*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-4, 6-9
3	2,61	191,0188	191,0197	C ₆ H ₇ O ₇	5,2	111,0071 (32,54%); 87,0072 (21,81%); 85,028 (16,8%)	Limunska kiselina	ASE 3-4, 8, SWE 12
4	4,82	169,0138	169,0142	C ₇ H ₅ O ₅	2,7	125,0247 (100%); 79,0193 (39,37%)	Galna kiselina	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
5	4,97	329,0877	329,0878	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	0,3	nije fragmentovan	Glukozid vanilinske kiseline*	SWE 12
6	5,54	315,0714	315,0722	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	2,3	108,0195 (100%); 152,0092 (74,6%)	Glukozid protokatehinske kiseline*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-4, 6-9, SWE 12

Nastavak Tabele 13.

7	5,65	313,0929	313,0929	$C_{14}H_{17}O_8$	-0,1	nije fragmentovan	Ramnozid vanilinske kiseline*	SWE 12
8	5,82	521,1287	521,1301	$C_{24}H_{25}O_{13}$	2,6	nije fragmentovan	Glukozid ruzmarinske kiseline*	SWE 12
9	5,97	179,0367	179,035	$C_9H_7O_4$	9,9	nije fragmentovan	Kafena kiselina	SWE 12
10	6,36	353,0891	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	-3,6	191,0539 (100%); 135,0429 (58,71%); 179,0327 (57,9%)	Hlorogenska kiselina izomer 1	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-4, 6-9, SWE 12
11	6,61	625,1401	625,141	$C_{27}H_{29}O_{17}$	1,4	462,0793 (100%); 301,0335 (37,47%)	Kvercetin di-O-glukozid izomer 1	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
12	7,04	609,1447	609,1461	$C_{27}H_{29}O_{16}$	2,4	447,0933 (100%); 285,0407 (75,01%)	Rutin izomer 1	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
13	7,06	353,0906	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	-7,9	191,0542 (100%); 85,0274 (3,44%)	Hlorogenska kiselina izomer 2	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-4, 6-9, SWE 12
14	7,12	353,0909	353,0878	$C_{16}H_{17}O_9$	-8,7	191,0543 (100%); 85,0275 (4,06%)	Hlorogenska kiselina izomer 3	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-4, 6-9, SWE 12

Nastavak Tabele 13.

15	7,32	359,0784	359,0772	$C_{18}H_{15}O_8$	-3,2	nije fragmentovan	Ruzmarinska kiselina*	SWE 12
16	7,38	137,0254	137,0244	$C_7H_5O_3$	-7,4	nije fragmentovan	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	SWE 12
17	7,76	755,2002	755,204	$C_{33}H_{39}O_{20}$	5,1	300,0254 (42,72%); 178,9956 (2,81%)	NI 1	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
18	7,94	625,1427	625,141	$C_{27}H_{29}O_{17}$	-2,7	300,0254 (100%)	Kvercetin di- <i>O</i> -glukozid izomer 2	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-3, 5-9
19	8,15	739,2076	739,2091	$C_{33}H_{39}O_{19}$	2,0	284,0238 (36,81%); 575,1252 (2,83%)	NI 2	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
20	8,31	609,1452	609,1461	$C_{27}H_{29}O_{16}$	1,5	300,0191 (100%); 284,0242 (14,08%)	Rutin izomer 2	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
21	8,56	609,1473	609,1461	$C_{27}H_{29}O_{16}$	3,8	300,0311 (89,84%); 178,9992 (2,98%)	Rutin izomer 3	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SWE 12
22	8,68	151,0423	151,0401	$C_8H_7O_3$	-10,6	nije fragmentovan	Vanilin*	SWE 12

Nastavak Tabele 13.

23	8,73	593,1513	593,1512	$C_{27}H_{29}O_{15}$	-0,1	284,0333 (100%); 255,0303 (4,23%)	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinozid	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SWE 12
24	9,00	463,0908	463,0882	$C_{21}H_{19}O_{12}$	-5,5	300,028 (100%); 271,0243 (7,62%)	Izokvercitrin	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
25	9,02	419,1689	419,1711	$C_{22}H_{27}O_8$	5,5	nije fragmentovan	Lingerzinol*	SWE 12
26	9,22	417,1578	417,1555	$C_{22}H_{25}O_8$	-5,6	59,0136 (100%); 101,0245 (92,71%); 71,0139 (80,25%)	Siringarezinol*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SWE 12
27	9,32	505,1007	505,0988	$C_{23}H_{21}O_{13}$	-3,7	300,0287 (2,26%)	Kvercetin <i>O</i> - acetilglukozid izomer 1	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9
28	9,53	447,0961	447,0933	$C_{21}H_{19}O_{11}$	-6,4	284,0376 (100%); 255,0326 (28,43%)	Kaempferol 3- <i>O</i> -glukozid	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SWE 12
29	9,72	505,0956	505,0988	$C_{23}H_{21}O_{13}$	6,5	300,0279 (100%)	Kvercetin <i>O</i> - acetilglukozid izomer 2	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9

Nastavak Tabele 13.

30	9,82	445,2069	445,2079	$C_{21}H_{33}O_{10}$	2,3	nije fragmentovan	Sakranozid A*	SWE 12
31	9,97	489,1067	489,1038	$C_{23}H_{21}O_{12}$	-5,9	284,0357 (100%); 255,0321 (13,48%)	Kaempferol-3-O-6"-O-acetil- β -D-glukopiranozid	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1,2, 5-9, SWE 12
32	12,51	327,2182	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	-1,6	211,1346 (100%); 171,1029 (76,16%)	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
33	12,58	327,2169	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	2,4	nije fragmentovan	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2*	SWE 12
34	13,18	329,2322	329,2333	$C_{18}H_{33}O_5$	3,6	211,1341 (100%); 229,1449 (43,03%)	Trihidroksi-oktadekanska kiselina*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
35	13,53	327,2171	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	1,9	171,1035 (100%); 137,0978 (35,65%)	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 3*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
36	13,63	287,2222	287,2228	$C_{16}H_{31}O_4$	2,1	nije fragmentovan	Dihidroksiheksadekanska kiselina*	SWE 12

Nastavak Tabele 13.

37	13,83	327,2162	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	4,4	nije fragmentovan	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 4*	SWE 12
38	14,00	327,2169	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	2,4	nije fragmentovan	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 5*	SWE 12
39	14,18	309,2071	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	0,0	71,0502 (100%); 121,1021 (86,51%); 171,1038 (82,81%)	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 1*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
40	14,32	309,2062	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	3,0	71,0496 (100%); 171,104 (99,83%); 121,1024 (81,7%); 251,1687 (70,06%)	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 2*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
41	14,47	309,2073	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	-0,7	171,103 (100%); 71,0506 (81,99%)	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 3*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 12
42	15,05	307,1912	307,1915	$C_{18}H_{27}O_4$	0,8	97,0661 (100%); 65,0401 (88,99%); 121,066 (85,49%)	Dihidrokapstat izomer 1*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-9, SFE 1-4

Nastavak Tabele 13.

43	15,49	307,1912	307,1915	$C_{18}H_{27}O_4$	1,0	97,066 (100%); 65,0401 (84,06); 121,0661 (74,45%); 71,0504 (73,22%)	Dihidrokaptsiat izomer 2*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-3, 5-7, 9, SFE 1-4
44	16,41	305,1739	305,1758	$C_{18}H_{25}O_4$	6,3	135,0793 (100%); 249,147 (24,37%)	Dehidrovani proizvod dihidroperksidoktadekatrienske kiseline*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1-9, SFE 1-4
45	16,44	309,2086	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	-4,9	171,103 (100%); 137,0974 (76,64%); 119,0865 (32,88%)	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 4*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1, 2, 5-9, SFE 2, 4, SWE 12
46	16,76	675,3582	675,3597	$C_{33}H_{55}O_{14}$	2,2	277,2182 (100%); 397,1361 (49,32%)	Glikolipid A*	M 10-12, 16-18, ASE 1, 2, 5-9, SWE 12
47	16,88	309,208	309,2071	$C_{18}H_{29}O_4$	-3,0	223,1707 (100%); 87,0453 (40,92%)	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 5*	M 10-12, 16-18, 25-27, ASE 1, 2, 5-9, SFE 2, 4

Nastavak Tabele 13.

48	17,49	339,126	339,1297	$C_{13}H_{23}O_{10}$	10,8	135,0432 (100%); 177,0899 (76,57%)	NI 3	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-6
49	18,13	601,3248	601,323	$C_{30}H_{49}O_{12}$	-3,1	277,2154 (100%); 89,0233 (62,82%); 59,0123 (49,26%)	NI 4	M 10-12, 16-18, 25- 26, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 2, 4
50	18,36	421,1664	421,1657	$C_{25}H_{25}O_6$	-1,8	299,1298 (100%); 309,0408 (25,36%)	Kuvanon C*	M 11, 12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 2, 4
51	18,83	339,1614	339,1602	$C_{21}H_{23}O_4$	-3,5	203,1098 (100%); 149,0617 (32,12%); 134,0379 (24,53%)	NI 5	M 11, 12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 5-7, 9, SFE 1-4
52	19,62	293,2127	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-1,6	275,202 (100%); 235,1706 (90,98%); 59,0139 (55,41%)	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-3, 5-9, SFE 1- 4
53	19,95	293,2138	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-5,3	195,1394 (100%); 223,1341 (62,64%); 275,2021 (31,77%)	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 2*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1-3, 5-9, SFE 1- 4, SWE 12

Nastavak Tabele 13.

54	20,25	271,2287	271,2279	$C_{16}H_{31}O_3$	-3,2	nije fragmentovan	Hidroksiheksadekanska kiselina*	SWE 12
55	20,70	291,1971	291,1966	$C_{18}H_{27}O_3$	-1,7	71,0485 (100%); 97,0636 (40,31%)	Hidroperoksi- oktadekatrienske kiseline izomer 1*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 1-4
56	21,07	291,1968	291,1966	$C_{18}H_{27}O_3$	-0,8	121,1 (100%); 185,1161 (52,7%)	Hidroperoksi- oktadekatrienske kiseline izomer 2*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 1-4
57	21,66	295,2309	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-10,1	277,2181 (100%); 171,1026 (72,62%); 295,2286 (33,57%)	Hidroksi- oktadekadienska kiselina*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-9, SFE 1- 4
58	23,38	293,2105	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	-1,3	185,1117 (52,16%); 125,0923 (30,99%)	Okso-oktadekadienska kiselina*	M 10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 1-4
59	24,33	405,1724	405,1707	$C_{25}H_{25}O_5$	-4,1	281,046 (79,25%); 293,0453 (32,19%)	NI 6	M 11, 12, 16-18, 27, ASE 1, 2, 5- 7, 9, SFE 2, 4
60	26,41	299,2028	299,2017	$C_{20}H_{27}O_2$	-3,8	152,1815 (0,96%); 185,8578 (0,78%)	NI 7	M 11, 12, 27, ASE 2, 5, SFE 1-4

Nastavak Tabele 13.

61	30,07	277,2175	277,2173	$C_{18}H_{29}O_2$	-0,8	59,0103 (13,07%)	Linolenska kiselina	M10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 1-4, SWE 12
62	33,66	279,2349	279,233	$C_{18}H_{31}O_2$	-7,1	59,0137 (4,4%)	Linolna kiselina	M10-12, 16-18, 25- 27, ASE 1, 2, 5-7, 9, SFE 1-4, SWE 12

* Jedinjenja identifikovana u listu crnog duda po prvi put.

** Ekstrakcioni uslovi za dobijene ekstrakte su navedeni u Tabeli 9.

NI – neidentifikovano jedinjenje.

Organske kiseline i derivati vitamina

Jedinjenje eluirano kao pik 1 (m/z 191,0561), identifikovano je kao kininska kiselina. Kod dobijenih MS² podataka su uočeni različiti fragmentni joni sa m/z 85,0279, 59,0125, 93,0326 i 127,0383, koji su predstavljali karakterističan obrazac fragmentacije kininske kiseline (Melguizo-Melguizo i dr., 2014). Pik 3, sa m/z 191,0917, identifikovan je kao limunska kiselina sa fragmentnim jonom sa m/z 111,0071 koji je odgovarao gubitaku $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$. Limunska kiselina je polarna trikarboksilna kiselina i bila je prethodno identifikovana u listu *M. nigra* u studiji Sánchez-Salcedo i dr. (2016). Pik 2 sa m/z 337,0776 je identifikovan kao glikozilovani oblik askorbinske kiseline. Ovaj visoko stabilni konjugat askorbinske kiseline i glukoze je identifikovan i u drugim biljnim matriksima (Hancock i dr., 2008; Jiménez-Sánchez i dr., 2015b).

Polifenolna jedinjenja

U ekstraktima *M. nigra* detektovan je veliki broj fenolnih jedinjenja i njihovih derivata. Prekursor jon sa m/z 169,0142 (pik 4), čijom su fragmentacijom dobijeni najintenzivniji joni sa m/z 124,0247 i 79,0913, pripadao je galnoj kiselini koja je ranije bila identifikovana u listu *M. nigra* (Nastić i dr., 2018). Jedinjenje eluirano kao pik 5 sa m/z 329,0878 tentativno je identifikovano kao glukozid vanilinske kiseline na osnovu literaturnih podataka (Abu-Reidah i dr., 2012). Pik 6 na 5,54 min, koji potiče od deprotonovanog molekulskog jona sa m/z 315,0722, identifikovan je pomoću njegovog karakterističnog obrazaca fragmentacije kao glukozid protokatehinske kiseline. Joni sa m/z 108,0195 i 152,0092 detektovani u negativnom režimu su odgovarali gubicima ugljenik(IV)-oksida i delova glukoze, redom. Pikovi 7 i 8 su identifikovani kao ramnozid vanilinske kiseline i glukozid ruzmarinske kiseline na osnovu podataka iz studija Termentzi i dr. (2009) i Ha i dr. (2012). Kafena kiselina, prethodno identifikovana u listu crnog duda (Sánchez-Salcedo i dr., 2016), detektovana je i u ovoj studiji sa dobijenim molekulskim jonom sa m/z 179,035. Detektovana su tri pika (10, 13 i 14) koja su odgovarala jedinjenjima sa istom molekulskom formulom sa m/z 353,0878 pri različitim retencionim vremenima (6,36, 7,06 i 7,12 min) ukazujući na pojavu izomernih struktura. Nastali fragmentni jon sa m/z 191,0539 identifikovan je nakon neutralnog gubitka kafene kiseline $[M-2H-163]^-$ kao kininska kiselina, što se može protumačiti kao dokaz prisustva izomera hlorogenske kiseline, prethodno identifikovanog u plodovima *M. nigra* (Jiménez-Sánchez i dr., 2015b). Ruzmarinska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina (pikovi 15 i 16) su bile i prethodno identifikovane u listu crnog duda (Memon i dr., 2010; Turgut i dr., 2016).

U odnosu na broj identifikovanih fenolnih kiselina u listu crnog duda, flavonoidi su bili brojniji. Detektovana su tri izomera rutina (pikovi 12, 20 i 21) sa istim $[M-H]^-$ pri m/z 609,1461. Identifikacija je izvedena na osnovu podataka iz studije Sánchez-Salcedo i dr. (2016). Jedinjenje (pik 22) identifikovano kao vanilin prethodno je detektovano u *Morus* vrstama u studiji Zhang i dr. (2017). Izokvercitrin (pik 24), kao prekursor jon sa m/z 463,0882 i MS/MS fragmentnim jonima sa m/z 300,028 i 271,0243, prethodno je identifikovan u listu *M. nigra* (Sánchez-Salcedo i dr., 2016). Prilikom identifikacije flavonoida u negativnom režimu, fragmenti uglavnom nastaju

gubitkom funkcionalnih grupa kao sto su H₂O (-18 Da), CO (-28 Da), C₂H₂O (-42 Da) i CO₂ (-44 Da). Metilovani ili metoksilovani flavonoidi su karakteristični po gubitku CH₃ grupe (-15 Da) (De Rijke i dr., 2006). Pik 50 eluiran na 18,36 min odgovarao je jedinjenju sa molekulskim jonom sa m/z 421,1657, čijom su fragmentacijom dobijeni joni sa m/z 299,1298 i 309,0408. Shodno tome, jedinjenje je tentativno identifikovano kao kivanon C, prethodno detektovan u kori *Morus nigra* i *Morus alba* (Abbas i dr., 2014; Jeong i dr., 2015), ali ne i u listu. U ispitivanim ekstraktima najzastupljeniji su bili glikozilovani oblici kvercetina i kaempferola. Veliki broj derivata je formiran vezivanjem različitih šećernih komponenti za aglikone. Dva molekulska jona sa m/z 625,141 (pikovi 11 i 18) identifikovana su kao izomeri kvercetin di-*O*-glukozida, prethodno identifikovanog u listu *M. nigra* (Sánchez-Salcedo i dr., 2016). Pikovi 27 i 29 sa istim molekulskim jonom sa m/z 505,0988 tentativno su identifikovani kao izomeri kvercetin *O*-acetilglukozida na osnovu karakterističnog fragmentnog jona sa m/z 300,0279 (Sánchez-Salcedo i dr., 2016). Pik 23, okarakterisan kao kaempferol 3-*O*-rutinozid, odgovarao je deprotonovanom molekulskom jonu sa m/z 593,1512 i prethodno je bio identifikovan u listu *M. nigra* (Sánchez-Salcedo i dr., 2016). Pik 28 (m/z 447,0933 i 9,53 min) je tentativno identifikovan kao kaempferol 3-*O*-glukozid, dajući fragmentni jon sa m/z 284,0376 gubitkom heksozil ostatka. Pik 31 sa [M-H]⁻ jonom sa m/z 489,1038 identifikovan je kao kaempferol-3-*O*-6"-*O*-acetil-β-D-glukopiranozid. Ovo jedinjenje je prethodno detektovano u listu *M. nigra* (Sánchez-Salcedo i dr., 2016), kao i kod drugih Moraceae vrsta (Dugo i dr., 2009).

U ovom istraživanju identifikovan je i fenolni lignan koji pripada klasi furofurana. Fragmentacijom molekulskog jona sa m/z 417,1555 (pik 26) dobijeni su najintenzivniji produkt joni sa m/z 59,0136, 101,0245 i 71,0139. Pretpostavka je da je navedeno jedinjenje siringarezinol, nedavno identifikovan u plodovima *M. nigra* (Mena i dr., 2016). Jedinjenje eluirano kao pik 25 tentativno je identifikovano kao lingerzinol prema podacima iz studije (Wu i dr., 2003). Dva jedinjenja (pikovi 42 i 42) sa [M-H]⁻ jonom sa m/z 307,1915 su identifikovana kao izomeri dihidrokapsiata, koji se mogu smatrati derivatima fenolnih jedinjenja. U MS² spektrima dobijeni su fragmentni joni sa m/z 97,0661, 65,0401 i 121,066.

Masne kiseline

U ekstraktima *M. nigra* identifikovane su dve nezasićene masne kiseline, tj. linolenska i linolna kiselina sa m/z 277,2173 i 279,233 (pikovi 61 i 62, redom). Negativan režim jonizacije takođe je omogućio detekciju i nekoliko hidrosilovanih masnih kiselina. Kod pikova 32, 33, 35, 37 i 38 su uočeni [M-H]⁻ jon sa m/z 327,2177 i MS² fragmentni joni sa m/z 211,1346 i 171,1029. Navedena jedinjenja su identifikovana kao izomeri trihidroksi-oktadekadienske kiseline na osnovu literaturnih podataka (Bao i dr., 2018). Pik 34 koji je odgovarao jedinjenju sa m/z 329,2333 tentativno je identifikovan kao trihidroksi-oktadekanska kiselina (Zhang i dr., 2014). Jedinjenje (pik 36) sa dobijenim molekulskim jonom sa m/z 287,2228 tentativno je identifikovano kao dihidroksiheksadekanska kiselina na osnovu podataka iz studije Farag i dr. (2015). U listu *M. nigra* (pikovi 52 i 53) su detektovana dva izomera hidroksi-oktadekatrienske kiseline sa molekulskim jonom sa m/z 293,2122. Najintenzivniji MS² fragmentni jon sa m/z 275,202 je formiran u blizini

funkcionalne grupe. U MS spektrima hidroksi-oktadekatrienske kiseline i okso-oktadekadienske kiseline (pik 58) uočen je isti deprotonovani molekulski jon $[M-H]^-$ sa m/z 293,2122. Jedinjenje eluirano kao pik 54 sa m/z 271,2279 tentativno je identifikovano kao hidroksiheksadekanska kiselina na osnovu literaturnih podataka (Filip i dr., 2015). Pikovi 55 i 56 sa m/z 291,1966 identifikovani su kao izomeri hidroperoksi-oktadekatrienske kiseline na osnovu njihovog karakterističnog obrasca fragmentacije i literaturnih podataka (Zhang i dr., 2014). U MS spektru hidroksi-oktadekadienske kiseline (pik 57) uočen je deprotonovani molekulski jon $[M-H]^-$ sa m/z 295,2279. Intenzivni fragmentni joni sa m/z 277,2181 i 171,1026 dobijeni su neutralnim gubitkom molekula vode i cepanjem C–C veze pored hidroksilne grupe.

Pored navedenih jedinjenja, detektovano je i pet izomera hidroperoksida linolenske kiseline sa deprotonovanim molekulskim jonom sa m/z 309,2071 (pikovi 39, 40, 41, 45 i 47). MS² fragmentacijom su dobijeni fragmentni joni sa m/z 71,0496, 171,104, 121,1024 i 251,1687. Fragmentni jon sa m/z 251,1687 nastao je raskidanjem najslabije veze u molekulu u blizini funkcionalne grupe. Pik 44 sa molekulskim jonom sa m/z 305,1758 je tentativno identifikovan kao dehidrirani produkt dihidroperoksi-oktadekatrienske kiseline na osnovu literaturnih podataka (Yan i dr., 2015).

Gliceroglikolipidi

U ekstraktima *M. nigra* detektovani su gliceroglikolipidi. Ova jedinjenja predstavljaju složene ugljene hidrate sačinjene od glikana i lipidnih ostataka vezanih za glicerol ostatak. Pik 46 sa m/z 675,3597 tentativno je identifikovan kao glikolipid A đumbira (3'-*O*-linolenoilgliceril 6-*O*-galaktopiranozil-galaktopiranozid), nastao vezivanjem hidrofobnog molekula linolenske kiseline sa delom glicerola i hidrofilnim molekulom digalaktoze (Jiménez-Sánchez i dr., 2016). Prema našem saznanju, ovaj glikolipid je prvi put detektovan u biljnim uzorcima iz *Morus* roda. Glikozidni monoterpen, sakranozid A, identifikovan je na osnovu podataka iz studije Rodríguez-Pérez i dr. (2018).

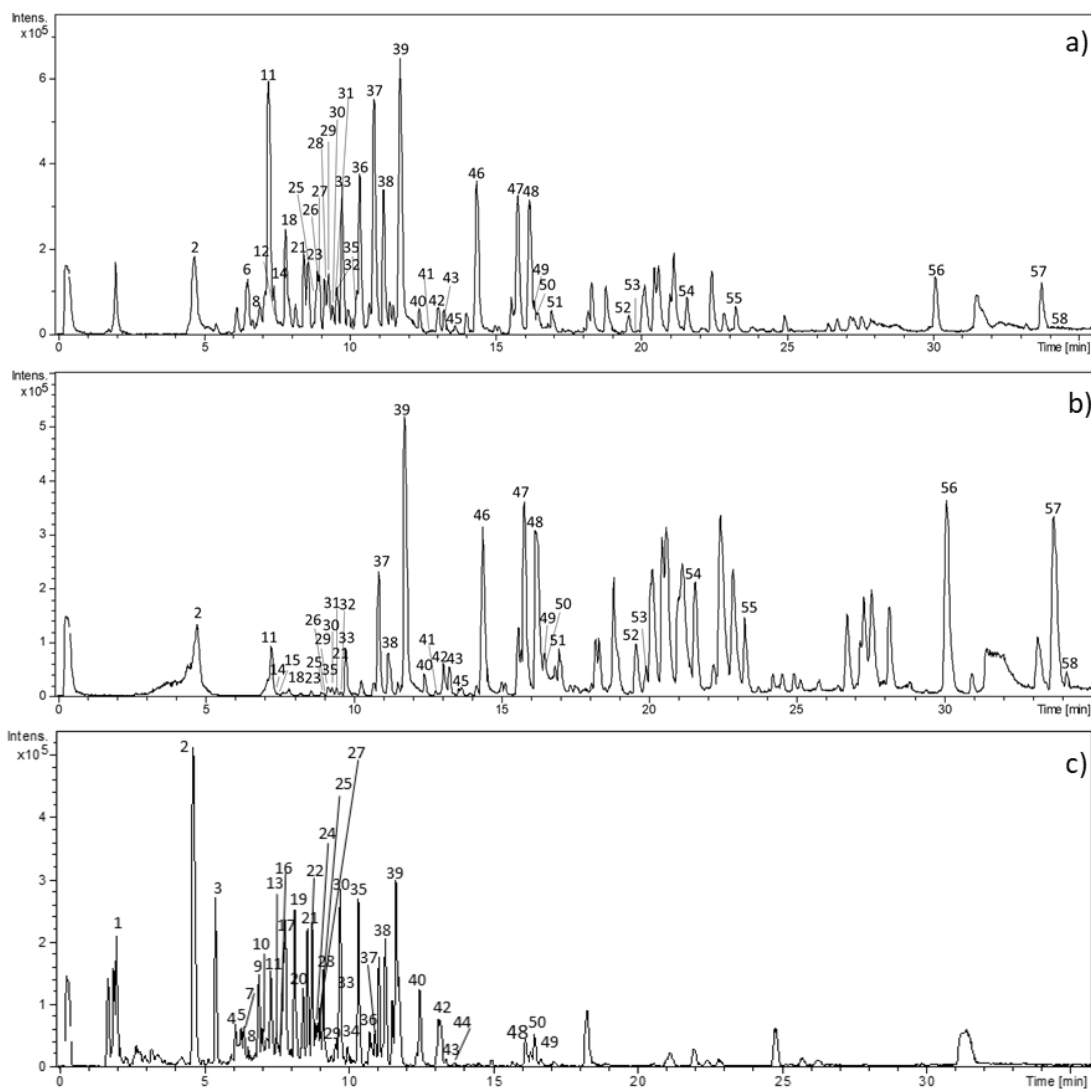
HPLC–ESI–QTOF–MS/MS analiza ekstrakata lista *M. nigra* omogućila je identifikaciju širokog spektra jedinjenja, od kojih je većina detektovana po prvi put. Nekoliko prethodnih istraživanja su takođe bila fokusirana na karakterizaciju lista *M. nigra* naglašavajući prisustvo različitih fitohemikalija (Radojković i dr., 2016; Sánchez-Salcedo i dr., 2016; Nastić i dr., 2018). Međutim, potencijal HPLC–ESI–QTOF–MS/MS analize izvedene u ovom radu omogućio je potpunu karakterizaciju, uz tentativnu identifikaciju nekoliko jedinjenja koja ranije nisu detektovana, predstavljajući najpotpuniji hemijski profil lista *M. nigra* do danas.

4.3.3. HPLC–ESI–TOF–MS analiza odabranih ekstrakata peteljki trešnje

U prethodnim studijama vezanim za karakterizaciju peteljki *P. avium* korišćene su ekstrakcija subkritičnom vodom (Švarc-Gajić i dr., 2018) i maceracija 80%-tnim metanolom (Bastos i dr., 2015). U studiji Švarc-Gajić i dr. (2018), ekstrakti dobijeni primenom subkritične vode su okarakterisani GC–MS analizom nakon primene optimizovanog protokola za DLLME

(disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija) uz simultanu derivatizaciju. Definisan protokol omogućio je identifikaciju različitih klasa jedinjenja. Ekstrakti su bili bogati organskim i fenolnim kiselinama, aldehydima, masnim kiselinama i produktima razgradnje lignina. S druge strane, Bastos i dr. (2015) ispitivali su nutritivni sastav i određivali pojedinačna bioaktivna jedinjenja u infuzijama i dekaktima peteljki trešnje primenom HPLC–DAD i gasne hromatografije sa plameno-jonizujućim detektorom (GC–FID). Analiza je omogućila određivanje šećera, organskih kiselina, masnih kiselina, tokoferola i fenolnih jedinjenja. Ipak, kombinacija HPLC-a sa QTOF–MS-om omogućila je detekciju znatno većeg broja bioaktivnih jedinjenja prethodno neidentifikovanih u peteljka trešnje.

Sastav ekstrakata peteljki trešnje dobijenih primenom različitih tehnika ekstrakcije određen je HPLC–ESI–QTOF–MS/MS analizom. Jedinjenja su tentativno identifikovana na osnovu interpretacije softverskih podataka (tačna masa, distribucija izotopa, MS spektri i molekulska formula), zajedno sa karakterističnim MS² fragmentima upoređenim sa literaturnim podacima. Hromatogrami reprezentativnih ekstrakata *P. avium* za svaku tehniku ekstrakcije su prikazani na Slici 29. Tentativno identifikovana jedinjenja su numerisana u hromatogramima prema njihovom redosledu eluiranja.



Slika 29. Hromatogrami ekstrakata peteljki trešnje dobijenih primenom: a) ASE, b) SFE i c) SWE.

U peteljkama trešnje identifikovano je ukupno 58 jedinjenja (Tabela 14). Među njima, pojedina jedinjenja su bila ranije detektovana u *P. avium* peteljkama, međutim, visoka rezolucija QTOF-MS-a omogućila je detekciju čak 27 novih jedinjenja. Tentativno identifikovana jedinjenja klasifikovana su u tri hemijske klase, fenolna jedinjenja i derivate, masne kiseline i derivate, kao i terpene.

Tabela 14. Identifikovana jedinjenja u ekstraktima peteljki trešnje.

Pik	Retenciono vreme (min)	Ekspperimentalna m/z vrednost	Izračunata m/z vrednost	(M-H) ⁺	Greška (ppm)	MS ² fragmenti (relativna abundance, %)	Identifikovano jedinjenje	Ekstrakti**
1	2,03	191,0562	191,0561	C ₇ H ₁₁ O ₆	-1,6	nije fragmentovan	Kininska kiselina*	SWE 2
2	4,70	169,0148	169,0142	C ₇ H ₅ O ₅	-3,3	125,0251 (100%); 79,0198 (41,16%)	Galna kiselina	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
3	5,54	315,9721	315,0722	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	0,1	nije fragmentovan	Glukozid protokatehinske kiselina*	SWE 2
4	6,11	353,087	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	3,4	nije fragmentovan	Hlorogenska kiselina izomer 1	SWE 2
5	6,29	289,0715	289,0718	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	0,9	nije fragmentovan	(Epi)katehin izomer 1	SWE 2
6	6,52	577,1381	577,1351	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	-5,0	289,0727 (100%); 407,0778 (68,45%)	Proantocijanidin B2 izomer 1*	ASE 1-9
7	6,54	179,0348	179,035	C ₉ H ₇ O ₄	1,1	nije fragmentovan	Kafena kiselina	SWE 2
8	6,81	341,0856	341,0878	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	6,6	179,0362 (100%); 135,0453 (72,89%); 161,0253 (54,62%)	Heksozid kafene kiseline	ASE 1-7, SWE 2
9	6,91	353,0974	352,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	-27,2	nije fragmentovan	Hlorogenska kiselina izomer 2	SWE 2
10	7,04	353,087	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	2,2	nije fragmentovan	Hlorogenska kiselina izomer 3	SWE 2
11	7,23	289,0732	289,0718	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-5,1	109,0295 (100%); 123,0452 (79,49%)	(Epi)katehin izomer 2	SFE 1-4, SWE 2

Nastavak Tabele 14.

12	7,43	577,1381	577,1351	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	-5,1	289,0724 (100%); 407,0779 (78,01%)	Proantocijanidin B2 izomer 2*	ASE 1-9
13	7,49	193,0494	193,0506	C ₁₀ H ₉ O ₄	6,4	nije fragmentovan	Ferulna kiselina	SWE 2
14	7,64	325,0930	325,0929	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	-0,3	119,05 (100%); 145,0296 (97,12%); 163,0399 (78,75%)	Heksozid <i>p</i> -kumarinske kiseline	ASE 1-9, SFE 1-4
15	7,73	329,0853	329,0878	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	7,5	121,0294 (100%); 77,0393 (24,49%)	Heksozid vanilinske kiseline*	SFE 4
16	7,76	165,0551	165,0557	C ₉ H ₉ O ₃	3,9	nije fragmentovan	Dihidro- <i>p</i> -kumarinska kiselina*	SWE 2
17	7,81	449,1101	449,1089	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2,6	nije fragmentovan	Eriodiktrol-glukozid*	SWE 2
18	7,83	289,0735	289,0718	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-5,9	109,0296 (100%); 123,0454 (81,23%)	(Epi)katehin izomer 3	ASE 1-9, SFE 2, 4
19	8,01	163,0392	163,0401	C ₉ H ₇ O ₃	5,1	nije fragmentovan	<i>p</i> -kumarinska kiselina	SWE 2
20	8,15	195,0653	195,0663	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	4,8	nije fragmentovan	Dihidro-ferulna kiselina*	SWE 2
21	8,45	609,1482	609,1461	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	-2,1	300,0282 (83,79%)	Rutin	ASE 1-9, SWE 2
22	8,56	271,0601	271,0612	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	4,0	nije fragmentovan	Naringenin izomer 1*	SWE 2
23	8,58	465,1073	465,1038	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-3,4	125,0244 (100%); 285,0407 (45,36%); 437,1085 (27,42%); 259,0614 (26,07%)	Epikatehin- <i>O</i> -glukuroniid*	ASE 1-9, SFE 2, 4
24	8,73	271,0601	271,0612	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	4,1	nije fragmentovan	Naringenin izomer 2*	SWE 2
25	8,85	463,0903	463,0882	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-2,1	300,028 (100%); 271,0245 (9,11%)	Kvercetin-glukozid izomer 1	ASE 1-9, SFE 4, SWE 2

Nastavak Tabele 14.

26	8,91	431,1011	431,0984	$C_{21}H_{19}O_{10}$	-6,2	269,0482 (100%); 311,0589 (1,72%)	Genistein- <i>O</i> -glukozid izomer 1	ASE 1-9, SFE 2, 4
27	8,95	593,1534	593,1512	$C_{27}H_{29}O_{15}$	-3,7	285,0331 (100%)	Kaempferol- <i>O</i> -rutinozid	ASE 1-9, SFE 2, SWE 2
28	9,15	431,1007	431,0984	$C_{21}H_{19}O_{10}$	-5,3	269,0468 (100%)	Genistein- <i>O</i> -glukozid izomer 2	ASE 1-9, SFE 2, 4, SWE 2
29	9,28	431,1004	431,0984	$C_{21}H_{19}O_{10}$	-4,6	269,0379 (100%)	Genistein- <i>O</i> -glukozid izomer 3	ASE 1-9, SFE 2, 4, SWE 2
30	9,42	447,0955	447,0933	$C_{21}H_{19}O_{11}$	-4,9	284,0327 (100%)	Kaempferol- <i>O</i> -glukozid	ASE 1-9, SFE 2, 4, SWE 2
31	9,47	477,1076	477,1038	$C_{22}H_{21}O_{12}$	-7,9	269,0455 (100%); 431,0989 (58,29%)	Izorhametin-glukozid*	ASE 1-7, SFE 2
32	9,58	431,0995	431,0984	$C_{21}H_{19}O_{10}$	-2,7	268,0389 (100%)	Genistein- <i>O</i> -glukozid izomer 4	ASE 1-9, SFE 2, 4
33	9,75	433,1158	433,1140	$C_{21}H_{21}O_{10}$	-4,1	271,0625 (100%); 151,0038 (27,41%)	Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 1	ASE 1-5, 7-9, SFE 2-4, SWE 2
34	9,97	463,088	463,0882	$C_{21}H_{19}O_{12}$	-0,4	nije fragmentisan	Kvercetin-glukozid izomer 2	SWE 2
35	10,25	433,1123	433,1140	$C_{21}H_{21}O_{10}$	4,0	125,0248 (100%); 253,0512 (33,5%); 145,0299 (18,47%)	NI 1	ASE 1-5, 7-9, SFE 1-4, SWE 2

Nastavak Tabele 14.

36	10,69	433,1148	433,1140	$C_{21}H_{21}O_{10}$	-1,7	271,0616 (100%)	Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 2	ASE 1-5, 7-9, SFE 1-4, SWE 2
37	10,84	415,1064	415,1035	$C_{21}H_{19}O_9$	-6,2	253,0496 (100%)	Hrizin- <i>O</i> -glukozid	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
38	11,17	433,1176	433,1140	$C_{21}H_{21}O_{10}$	-8,2	271,0616 (100%)	Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 3	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
39	11,72	447,1395	447,1355	$C_{15}H_{27}O_{15}$	-1,0	269,0464 (100%); 285,0782 (31,46%)	NI 2	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
40	12,39	327,2175	327,2177	$C_{18}H_{31}O_5$	0,6	211,1347 (100%); 229,1452 (42,18%)	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina*	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
41	12,78	433,1161	433,1140	$C_{21}H_{21}O_{10}$	-4,9	125,0245 (100%); 253,051 (15,52%)	NI 3	ASE 1-2, 5-7, SFE 2, 4
42	13,04	329,2346	329,2333	$C_{18}H_{33}O_5$	-3,8	211,1344 (100%); 229,145 (42,12%)	Trihidroksi-oktadekanska kiselina*	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
43	13,23	271,0607	271,0612	$C_{15}H_{11}O_5$	1,7	119,0501 (100%); 151,0036 (53,05%)	Naringenin izomer 3*	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
44	13,34	285,0414	285,0405	$C_{15}H_9O_6$	-3,5	nije fragmentovan	Kaempferol*	SWE 2

Nastavak Tabele 14.

45	13,53	271,0600	271,0612	$C_{15}H_{11}O_5$	4,2	253,0516 (90,24%); 83,0139%; 197,0606%; 125,0247%)	Naringenin izomer 4*	ASE 1-3, 5-7, ASE 9, SFE 1-4
46	14,35	517,3187	517,3171	$C_{30}H_{45}O_7$	-3,2	469,2969 (65,82%); 487,3059 (13,57%)	Jaligonska kiselina*	ASE 1-3, 5-9, SFE 1- 4
47	15,74	501,3250	501,3222	$C_{30}H_{45}O_6$	-5,7	453,3021 (60,55%); 471,3119 (9,27%)	Hidroksiceanotična kiselina izomer 1*	ASE 1-3, 5-9, SFE 1- 4
48	16,14	253,0503	253,0506	$C_{15}H_9O_4$	1,4	63,0245 (34,595%) 143,0507 (17,22%); 107,0142 (11,33%)	Hrizin*	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
49	16,31	285,0775	285,0768	$C_{16}H_{13}O_5$	-2,3	110,0011 (100%); 165,9913 (56,79%) 137,9961 (42,37%), 270,0543 (42,19%)	Metilnaringenin*	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
50	16,44	255,0644	255,0663	$C_{15}H_{11}O_4$	7,3	151,0039 (57,49%); 213,0561 (56,15%); 107,0139 (50,57%)	NI 4	ASE 1-9, SFE 1-4, SWE 2
51	16,77	501,3238	501,3222	$C_{30}H_{45}O_6$	-3,2	453,3018 (10,17%)	Hidroksiceanotična kiselina izomer 2*	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 2-3
52	19,53	293,2122	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	0,0	171,1037 (100%); 121,1022 (83,76%)	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1*	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4
53	19,87	293,2104	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	6,1	195,1402 (100%); 223,1351 (63,58%)	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 2*	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4

Nastavak Tabele 14.

54	21,52	295,2291	295,2279	$C_{18}H_{31}O_3$	-4,2	277,2164 (100%); 171,1014 (75,17%)	Hidroksi-oktadekadienska kiselina*	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4
55	23,21	293,2111	293,2122	$C_{18}H_{29}O_3$	3,7	185,1193 (57,18%); 125,0974 (35,01%)	Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 3*	ASE 1-3, 5-7, 9, SFE 1-4
56	30,02	277,2182	277,2173	$C_{18}H_{29}O_2$	-3,4	59,0145 (11,91%)	Linolenska kiselina	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4
57	33,64	279,2327	279,2330	$C_{18}H_{31}O_2$	1,1	59,0143 (2,19%)	Linolna kiselina	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4
58	34,06	299,2590	299,2592	$C_{18}H_{35}O_3$	0,4	59,0145 (100%)	Hidroksi-oktadekanska kiselina*	ASE 1-2, 5-7, 9, SFE 1-4

* Jedinjenja identifikovana u petljikama trešnje po prvi put.

** Ekstrakcioni uslovi za dibijene ekstrakte su navedeni u Tabeli 11.

NI – neidentifikovano jedinjenje.

Polifenolna jedinjenja

U peteljka *P. avium* identifikovano je ukupno trinaest fenolnih kiselina i njihovih derivata. Najintenzivniji pik 2 sa m/z 160,0142 je tentativno identifikovan kao galna kiselina, prethodno identifikovana u *Cerasus avium* peteljka (Bursal i dr., 2013). Glukozid protokatehinske kiseline, izomeri hlorogenske kiseline, kafena, ferulna, dihidro-*p*-kumarinska i *p*-kumarinska kiselina, prethodno su bile detektovane jedino u ekstraktima peteljki trešnje dobijenim primenom subkritične vode. Navedena jedinjenja, eluirana kao pikovi 3, 4, 7, 9, 10, 13, 16 i 19, identifikovana su na osnovu literaturnih podataka (De la Luz Cádiz-Gurrea i dr., 2013; Pacifico i dr., 2014; Repajić i dr., 2015). Pik 8 je odgovarao deprotonovanom molekulskom jonu sa m/z 341,0878 i njegovom fragmentnom jonu sa m/z 179,0362 koji potiče od [kafena kiselina-H]⁻. Prema karakterističnoj MS² fragmentaciji, redosledu eluiranja i molekulskoj formuli, ovo jedinjenje je identifikovano kao heksozid kafene kiseline. Pik 14 odgovarao je jedinjenju molekulske formule C₁₅H₁₇O₈ čijom je fragmentacijom nastajao fragmentni jon sa m/z 163 [kumarinska kiselina-H]⁻ nakon gubitka heksozil ostatka (-162 Da). Ovo jedinjenje je tentativno identifikovano kao *p*-kumarinska kiselina *O*-heksozid, prethodno detektovan u peteljka i plodovima *P. avium* (Bastos i dr., 2015). Heksozid vanilinske kiseline identifikovan je na osnovu njegovog obrasca fragmentacije. Za pik 15 koji je odgovarao prekursor jonu sa m/z 329,0878 u negativnom režimu jonizacije, uočen je fragmentni jon sa m/z 121,0294, ukazujući na prisustvo ostatka vanilinske kiseline.

Uz dvadeset i osam identifikovanih jedinjenja, flavonoidi su predstavljali najbrojniju hemijsku klasu u ekstraktima peteljki trešnje. U tom smislu, dva izomera (pikovi 6 i 12) sa molekulskim jonom sa m/z 577,1351 su identifikovana kao (epi) katehin-(epi) katehin (proantocijanidin B2), na osnovu karakterističnih fragmentnih jona sa m/z 289,0727 i 407,0778 (Jiménez-Sánchez i dr., 2015b). Pikovi 5, 11 i 18 su odgovarali istom molekulskom jonu sa m/z 289,0718 i MS² fragmentnim jonima sa m/z 109,0295 [M-H-180]⁻ i 123,0452 [M-H-166]⁻. Na osnovu obrasca fragmentacije, pretpostavilo se da je reč o (epi)katehinu, prethodno identifikovanom u peteljka i plodovima *P. avium* (González-Gómez i dr., 2010; Jesus i dr., 2019). Rutin (pik 21) je identifikovan na osnovu prekursor jona sa m/z 609,1461 i MS/MS fragmentnog jona sa m/z 300,0282 nastalog usled gubitka disaharidnog heksozil-deoksiheksozil ostatka (162 + 146 Da). Rutin je prethodno bio detektovan u *P. avium* peteljka (Bastos i dr., 2015). Detektovana su četiri izomera naringenina (pikovi 22, 24, 43 i 45) sa istim [M-H]⁻ sa m/z 271,0612. Fragmentacijom prekursor jona dobijeni su MS² fragmentni joni sa m/z 119,0501 i 151,0036, što je bilo u saglasnosti sa podacima objavljenim u studiji Mekky i dr. (2015). Jedinjenje eluirano kao pik 44, koje potiče od molekulskog jona sa m/z 285,0405, prethodno je bilo identifikovano u *Prunus* rodu kao kaempferol (Olszewska i dr., 2011). Pik 48 eluiran pri 16,14 min sa molekulskim jonom sa m/z 253,0506, identifikovan je kao hrizin u skladu sa molekulskom formulom, obrascem fragmentacije i literaturnim podacima (De Rosso i dr., 2015). Metilnaringenin (pik 49) je bio tentativno identifikovan u peteljka *P. avium*. U masenom spektru su uočeni prekursor jon sa m/z 285,0768 i fragmentni joni sa m/z 165,9913 i 270,0543. Obrazac fragmentacije je bio u skladu

sa rezultatima koji su zabeleženi u studiji De Rosso i dr. (2015). Do sada, ovo jedinjenje nije detektovano u peteljka *P. avium*.

Jedinjenje eluirano kao pik 17, koje potiče od molekuskog jona sa m/z 449,1089, identifikovano je kao eriodiktiol-glukozid na osnovu podataka iz studija Tretter i dr. (1985) i Koprivica i dr. (2018). HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analiza jedinjenja 22 je pokazala prisustvo deprotonovanog molekuskog jona $[M-H]^-$ sa m/z 465,1038 koji je odgovarao epikatehin-*O*-glukuronidu. Ovo je potvrđeno i putem dostupnih podataka koje su objavili Urpi-Sarda i dr. (2009). Pikovi 25 i 34 su odgovarali $[M-H]^-$ sa m/z 463,0882 od koga su nastajali fragmentni joni sa m/z 300,028 i 271,0245. Ovo jedinjenje je tentativno identifikovano kao kvercetin-glukozid, čije je prisustvo prethodno utvrđeno u plodovima i peteljka *P. avium* (Bastos i dr., 2015).

Jedinjenja 26, 28, 29 i 32 sa molekulskim jonom $[M-H]^-$ sa m/z 431,0984 identifikovana su kao izomeri genistein-*O*-glukozida na osnovu literaturnih podataka (Bastos i dr., 2015). Prisustvo kaempferol-*O*-rutinozida (pik 27, m/z 593,1512), prethodno identifikovanog u peteljka *P. avium* (Bastos i dr., 2015), potvrđeno je na osnovu MS/MS spektra dajući fragmentni jon sa m/z 285,0331. Fragmentni jon je nastao gubitkom rutinozid ostatka, $[M-H-308]^-$, karakterističnog jona retro-Diels-Alder-ove (RDA) fragmentacije na C-prstenu uključujući 1,3-raskidanje veze aromatičnog prstena (Hvattum i Ekeberg, 2003). Pik 31 eluiran pri 9,13 min sa m/z 477,1038, identifikovan je kao izorhamnetin-glukozid u skladu sa molekulskom formulom i literaturnim podacima (Park i dr., 2012). U masenom spektru pika 30 uočen je prekursor jon u negativnom režimu jonizacije sa m/z 447,0933 i fragmentni jon sa m/z 284,0327, kao rezultat eliminacije ostatka glukoze (162 Da) iz prekursor jona. Tentativno je identifikovan kao kaempferol-*O*-glukozid na osnovu molekulske mase i karakterističnog obrasca fragmentacije (Bastos i dr., 2015). Pikovi 33, 36 i 38 sa m/z 433,114 identifikovani su kao izomeri naringenin-*O*-glukozida, a prethodno su detektovani u peteljka *P. avium* (Bastos i dr., 2015). Fragmentacijom molekuskog jona dobijen je najintenzivniji fragmentni jon sa m/z 271,0616 ($[M-naringenin]^-$). Obrazac fragmentacije jedinjenja eluiranog kao pik 37 (m/z 415,1035) je bio u skladu sa literaturnim podacima (Bastos i dr., 2015), stoga je ovo jedinjenje tentativno identifikovano kao hrizin-*O*-glukozid.

Masne kiseline

Hromatografska analiza je omogućila tentativnu identifikaciju masnih kiselina i njihovih derivata u ekstraktima peteljki trešnje. Jedinjenja 56 i 57 sa molekulskim jonima $[M-H]^-$ sa m/z 277,2173 i 279,233 su identifikovana kao linolenska i linolna kiselina, prethodno detektovane u peteljka *P. avium* (Švarc-Gajić i dr., 2018). Negativni režim jonizacije takođe je omogućio detekciju i nekoliko hidrosilovanih masnih kiselina. Kod jedinjenja 40 je uočeno prisustvo molekuskog jona $[M-H]^-$ sa m/z 327,2177 koji je daljom fragmentacijom davao intenzivan MS^2 pik sa m/z 211,1347, što je u kombinaciji sa literaturnim podacima potvrdilo da je u pitanju trihidroksi-oktadekadienska kiselina (Rodríguez-Pérez i dr., 2013). Na isti način, pik 42 sa m/z 329,2333 je tentativno identifikovan kao trihidroksi-oktadekanska kiselina (Zhang i dr., 2014).

Pikovi 52, 53 i 55 su odgovarali $[M-H]^-$ jonu sa m/z 293,2122 čijom su MS^2 fragmentacijom nastajali fragmentni joni sa m/z 211,1346 i 171,1029. Na osnovu iznetih i literaturno dostupnih podataka, jedinjenja 52, 53 i 55 su identifikovana kao izomeri hidroksi-oktadekatrienske kiseline (Zhang i dr., 2014). Pik 54 sa m/z 295,2279 je tentativno identifikovan kao hidroksi-oktadekadienska kiselina na osnovu karakterističnog obrasca fragmentacije i literaturnih podataka (Zhang i dr., 2014). MS spektar pika 58 potiče od deprotonovanog molekulskog jona sa m/z 299,2592 omogućavajući identifikaciju hidroksi-oktadekanske kiseline.

Terpeni

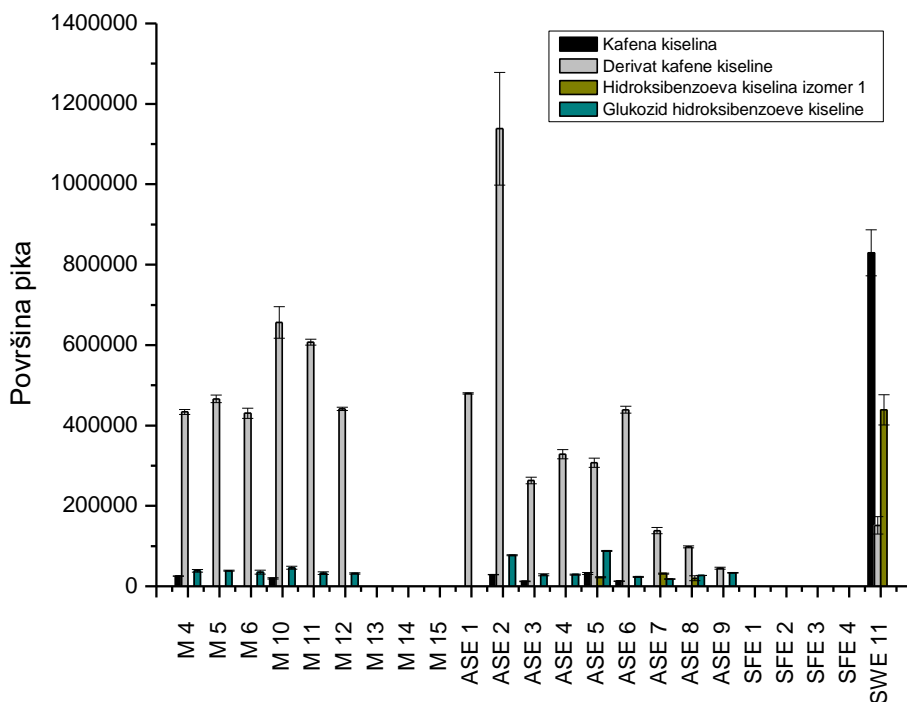
Na osnovu hromatografskog profila i masenih spektara, u ekstraktima peteljki trešnje tri jedinjenja su okarakterisana kao terpeni. Pik 46 je odgovarao deprotonovanom molekulskom jonu sa m/z 517,3171 i molekulskom formulom $C_{30}H_{45}O_7$, na osnovu čega je tentativno identifikovan kao jaligonska kiselina. Detektovana su i dva jedinjenja (pikovi 47 i 51) sa $[M-H]^-$ jonom sa m/z 501,3222 identifikovana kao izomeri hidroksiceanotične kiseline. Fragmentacijom molekulskog jona nastao je najintenzivniji fragmentni jon sa m/z 453,3021. Navedeni terpeni su prvi put detektovani u biljnim uzorcima *Prunus* roda.

4.4. Efikasnost ekstrakcije

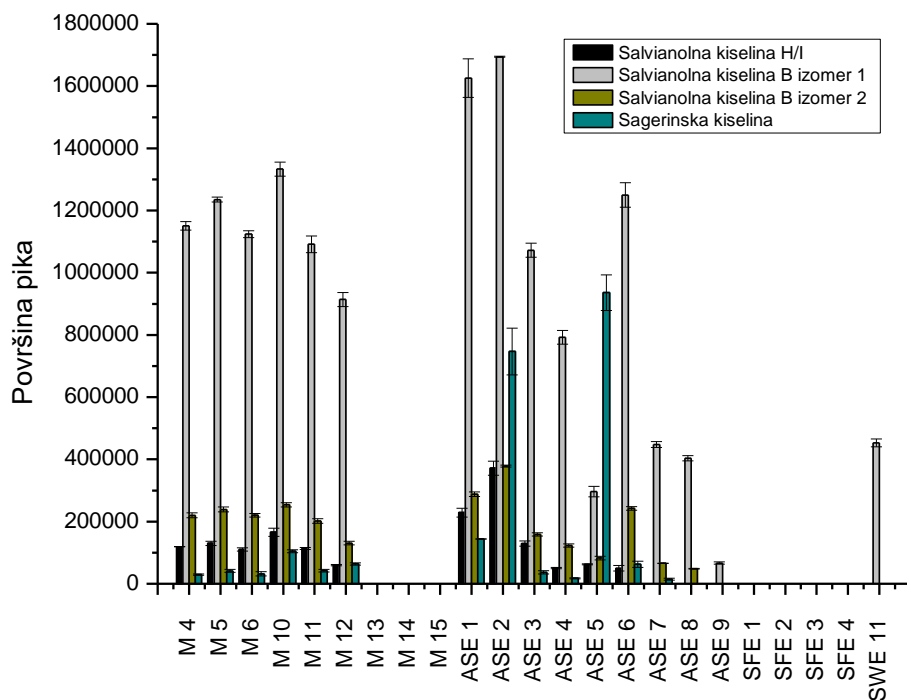
4.4.1. Koren gaveza

Poređenje efikasnosti primenjenih tehnika ekstrakcije je izvedeno poređenjem površina pikova identifikovanih jedinjenja. Efikasnost ekstrakcije prikazana je za svaku tehniku ekstrakcije pri različitim operativnim uslovima za sva identifikovana jedinjenja (Slike 30–39). Površine pikova identifikovanih jedinjenja u ekstraktima korena *S. officinale* izražene su kao srednja vrednost (X_{sr}) \pm standardna devijacija (SD) tri ponovljene analize (Tabela P1). Razlike između tehnika ekstrakcije u pogledu sadržaja identifikovanih jedinjenja analizirane su statistički (Tabela P2). Rezultati izvedenih analiza pokazali su da su prinosi jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom maceracije, ASE, SFE i SWE bili statistički značajni.

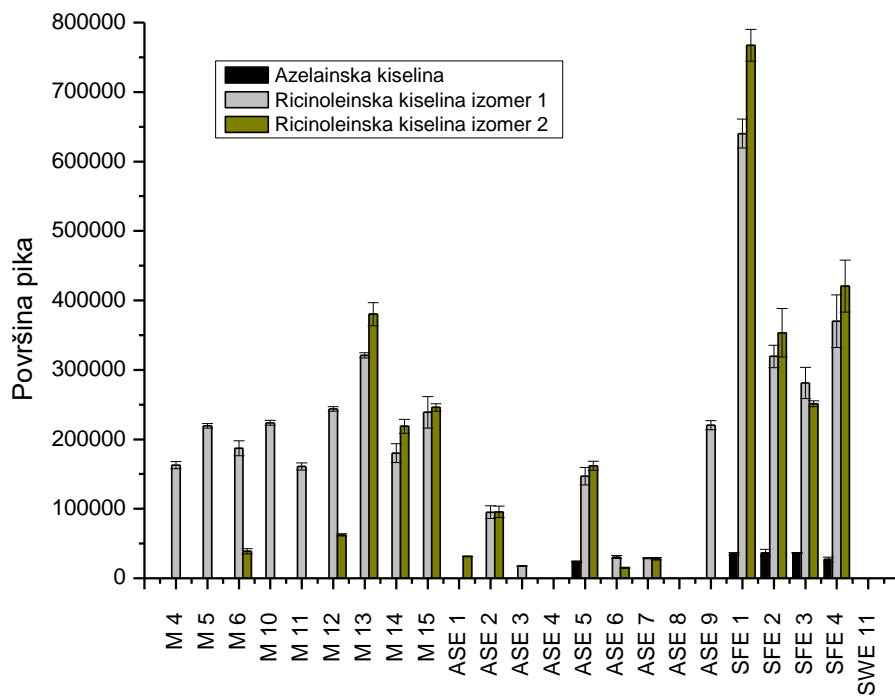
Karakterizacija ekstrakata je izvedena samo za odabrane ekstrakte dobijene primenom maceracije, ASE, SFE i SWE (M 4–6, 10–15, ASE 1–9, SFE 1–4 i SWE 11). Kao što je prikazano na Slikama 27 i 30–39, u ekstraktima dobijenim primenom ASE je identifikovan najveći broj jedinjenja. Prinos limunske kiseline je bio sličan u svim ispitivanim ekstraktima, ukazujući na neznatan uticaj odabira ekstrakcione tehnike. Ekstrakt dobijen primenom maceracije sa 75%-tnim etanolom tokom 30 min bio je najbogatiji limunskom kiselinom.



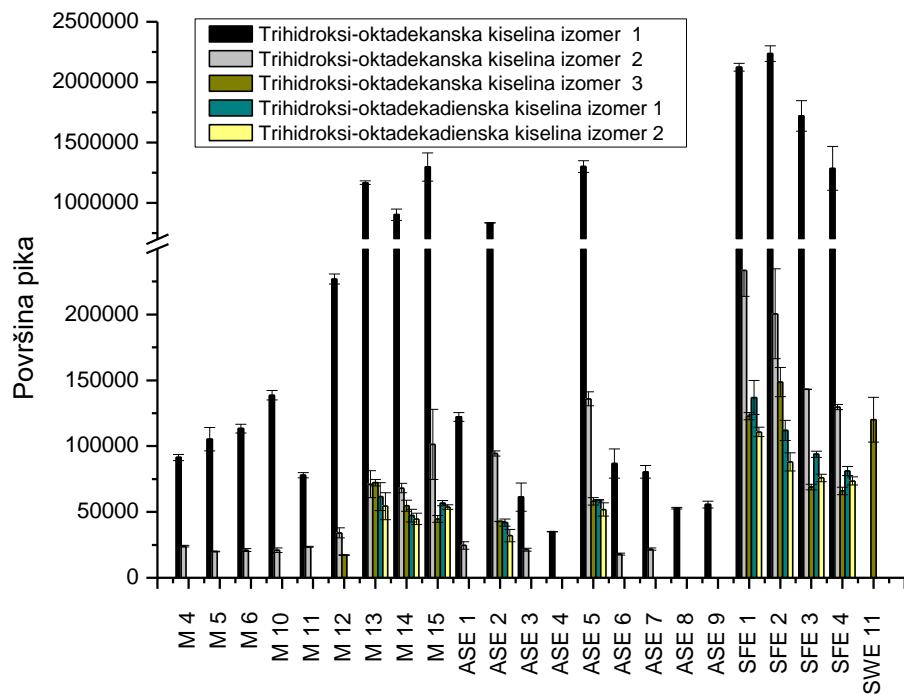
Slika 30. Efikasnost ekstrakcije kafene kiseline, derivata kafene kiseline, izomera 1 hidroksibenzoeve kiseline i glukozida hidroksibenzoeve kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



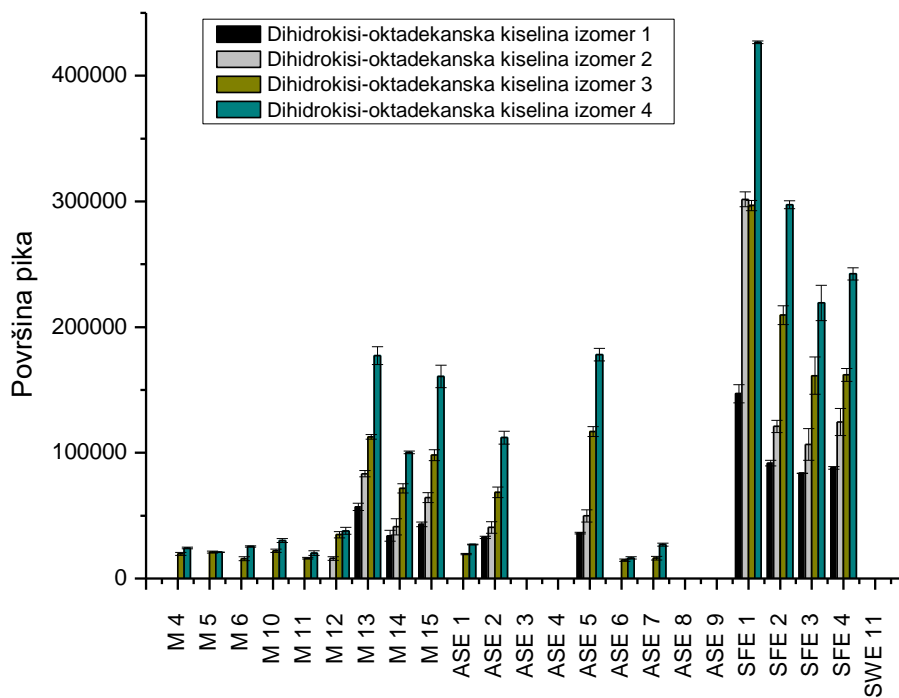
Slika 31. Efikasnost ekstrakcije salvianolne kiseline H/I, izomera salvianolne kiseline B i sagerinske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



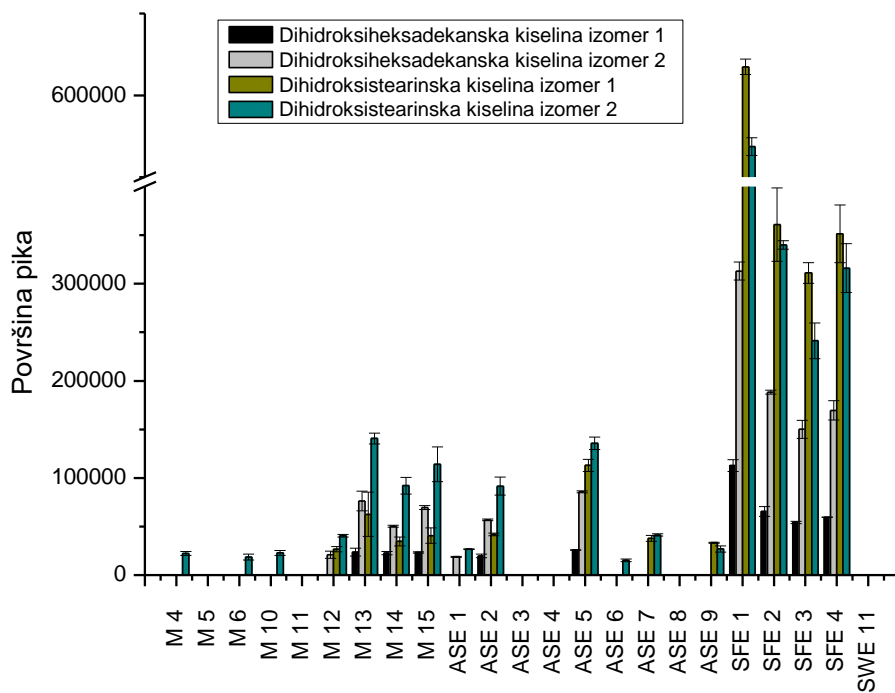
Slika 32. Efikasnost ekstrakcije azelainske kiseline i izomera ricinoleinske kiseline različitim ekstrakcijskim tehnikama.



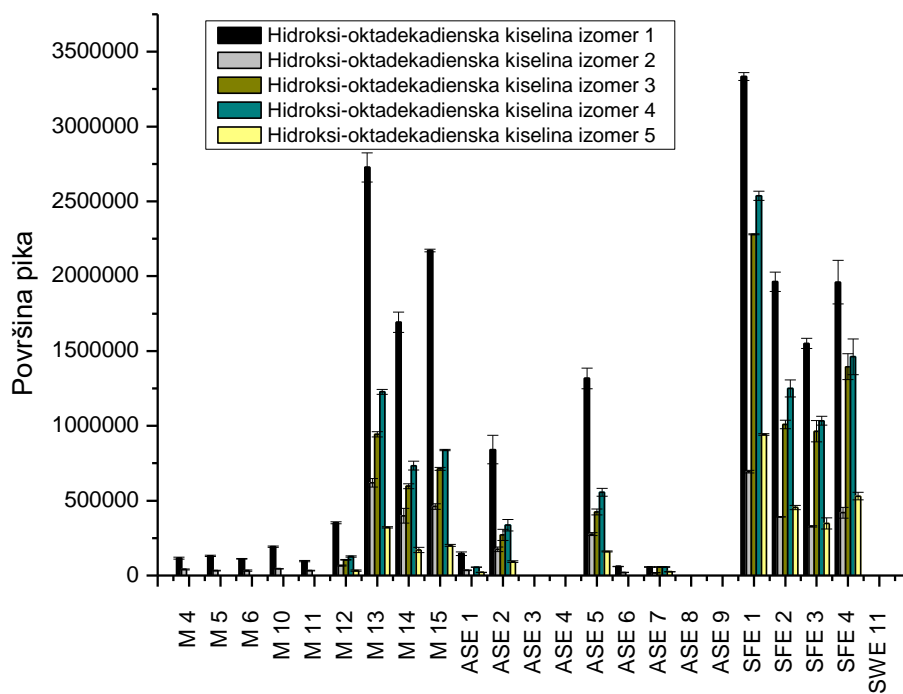
Slika 33. Efikasnost ekstrakcije izomera trihidroksi-oktadekanske kiseline i izomera trihidroksi-oktadekadienske kiseline različitim ekstrakcijskim tehnikama.



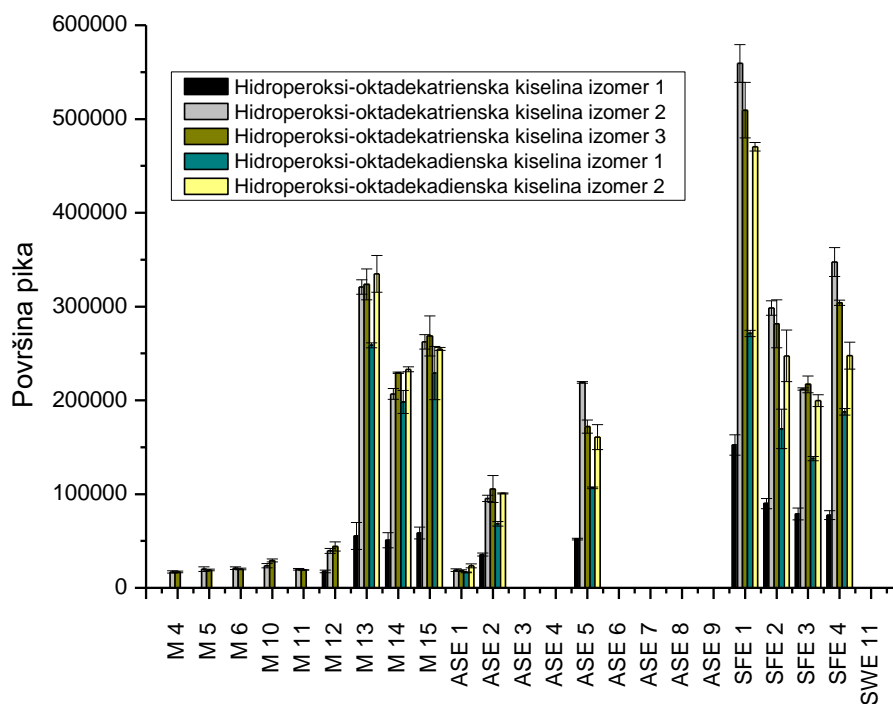
Slika 34. Efikasnost ekstrakcije izomera dihidroksi-oktadekanske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



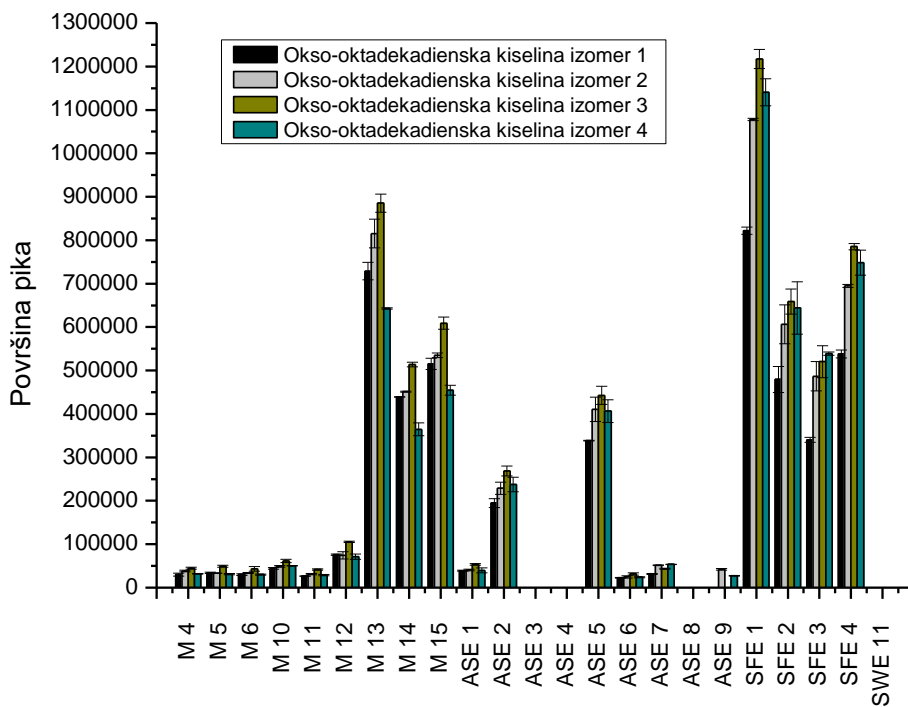
Slika 35. Efikasnost ekstrakcije izomera dihidroksiheksadekanske kiseline i izomera dihidroksistearinske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



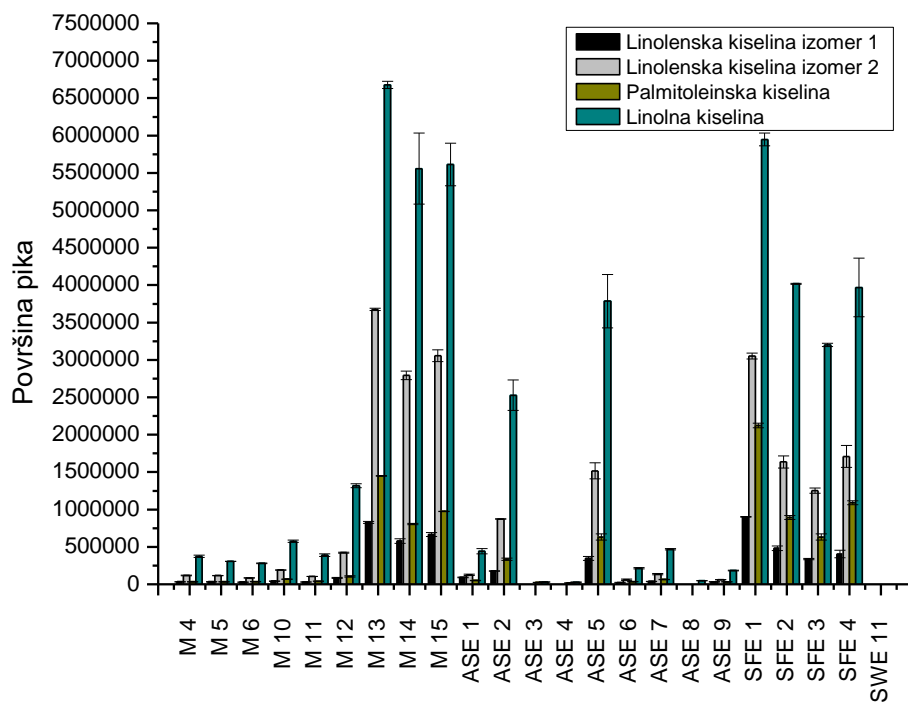
Slika 36. Efikasnost ekstrakcije izomera hidroksi-heksadekadienske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 37. Efikasnost ekstrakcije izomera hidroperoksi-oktadekatrienske i hidroperoksi-oktadekadienske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 38. Efikasnost ekstrakcije izomera okso-oktadekadienske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 39. Efikasnost ekstrakcije izomera linolenske kiseline, palmitoleinske i linolne kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.

Kao što se može videti na Slici 30, fenolne kiseline i derivati nisu bili ekstrahovani postupkom maceracije koristeći aceton, kao ni primenom SFE, što ukazuje na to da je za efikasnu ekstrakciju fenolnih jedinjenja potrebna primena polarnijih rastvarača poput etanola i metanola. Najviši prinos izomera 1 salvianolne kiseline B je bio u ekstraktima dobijenim primenom ASE i maceratima koristeći 75%-tni etanol i metanol (Slika 31). Najveći sadržaj je primećen u ASE ekstraktu dobijenom primenom 85%-tnog etanola na 63 °C. Sadržaj izomera 2 salvianolne kiseline u ekstraktu dobijenom pri navedenim uslovima bio je više nego četverostruko veći nego u ostalim ekstraktima. Dobijeni rezultati bili su u skladu sa rezultatima Trifan-a i dr. (2018) koji su ispitivali sadržaj salvianolne kiseline B u maceratima *S. officinale* dobijenim sa 65%-tnim etanolom. Primećeni su nešto manji sadržaji derivata kafene kiseline pri istim eksperimentalnim uslovima (Slika 30). Sadržaj kafene kiseline u SWE ekstraktu je bio znatno veći u odnosu na ostale ekstrakte. Za ostala fenolna jedinjenja, primena ASE uz 85%-tni etanol na 63 °C je bila najefikasnija. Tahirović i dr. (2010) su identifikovali kafenu kiselinu u maceratima korena gaveza primenom vode kao ekstragensa, ali u nižim koncentracijama u poređenju s drugim fenolnim kiselinama. Prisustvo kafene kiseline u maceratima (70% EtOH, 7 dana) su takođe potvrdili i Roman i dr. (2008). Suprotno tome, prinos izomera 1 hidroksibenzoeve kiseline je bio viši primenom ASE uz 85%-tni etanol na 176 °C, dok je sagerinska kiselina bolje ekstrahovana primenom ASE uz 100%-tni etanol na 120 °C. Poređenjem površina pikova fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom ASE pri različitim temperaturama, primećeno je da je porast temperature vodio smanjenju efikasnosti ekstrakcije. Što se tiče maceracije i primene različitih rastvarača i vremena ekstrakcije, nije bilo značajne razlike između ekstrakata u smislu sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Pored navedenih polifenolnih jedinjenja, u SWE ekstraktima su identifikovani izomeri kvercetin-3-malonilglukozida, izomeri 2 i 3 hidroksibenzoeve kiseline, hidroksifenilacetatna kiselina, izomeri cirismaritina, *p*-kumarinska kiselina, dihidroksi-dimetoksi-dihidrofenantren, dimetoksi-metilkumarin, siringetin-3-*O*-glukozid, hidroksikumarin, metilkumarin i oksirezveratrol koji nisu detektovani u ostalim ispitivanim ekstraktima, potvrđujući visoku selektivnost i moć ove ekstrakcione tehnike.

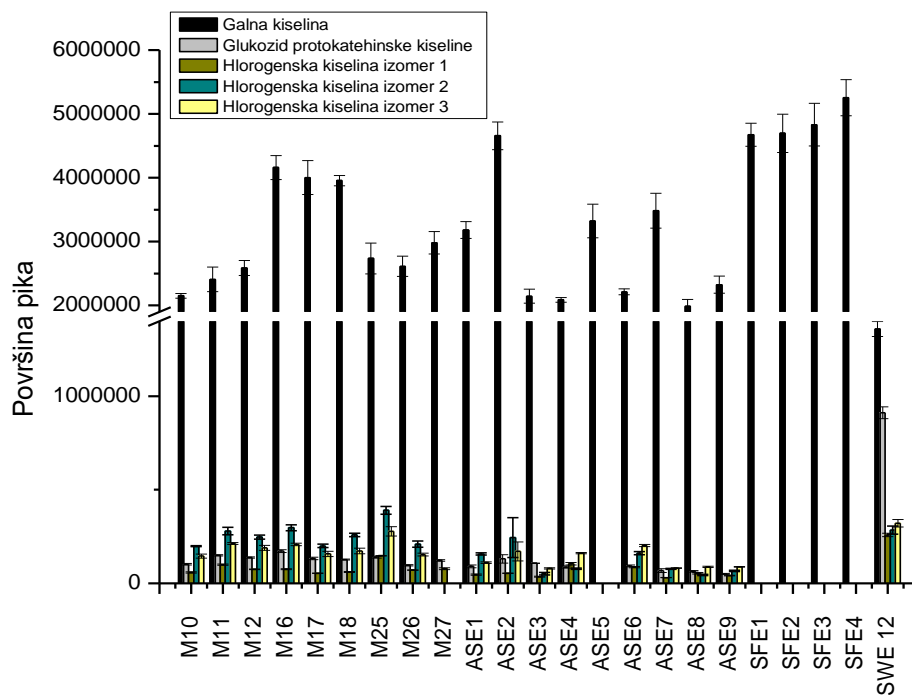
Sadržaj acetil-monometil-trihidroksi antrahinona se značajno razlikovao u ispitivanim ekstraktima, dostižući najveće vrednosti u ASE ekstraktima primenom 100%-tnog etanola na 120 °C i 85%-tnog etanola na 63 °C. Ekstrakt dobijen primenom maceracije pri optimalnim uslovima za ovo jedinjenje (M 12) i SWE ekstrakt imali su četverostruko manji sadržaj ovog jedinjenja, dok je sadržaj antrahinona u svim SFE ekstraktima bio veoma nizak.

U ekstraktima korena *S. officinale* najzastupljenije su bile masne kiseline. Kao što se vidi na Slikama 32–39, njihov prinos u ekstraktima dobijenim primenom SFE i maceracije sa acetonom je bio znatno iznad vrednosti u ostalim ekstraktima. Nešto niži prinosi su postignuti primenom ASE uz 100%-tni etanol na 120 °C. U studiji Mani i dr. (2007) potvrđena je uspešna primena acetona za ekstrakciju lipida iz biljnog materijala. Rezultati su bili slični onima dobijenim primenom nepolarnih rastvarača kao što su heksan i petrol-etar. Pojedine masne kiseline, kao što su izomeri dihidroksi-oktadekanske kiseline, izomeri hidroperoksi-oktadekatrienske kiseline,

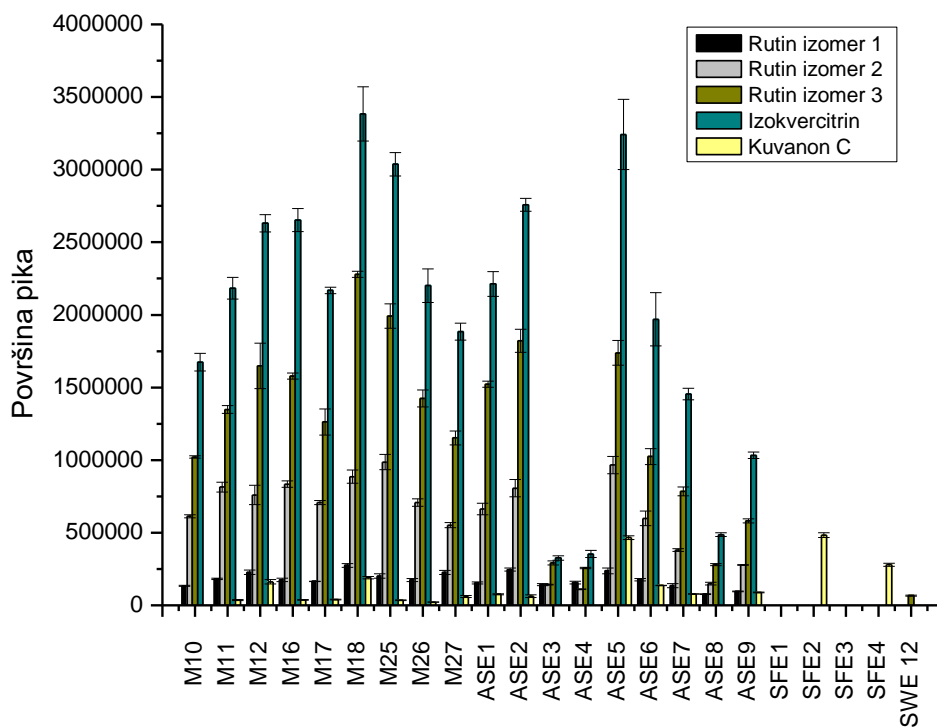
izomeri hidroksi-oktadekadienske kiseline, izomeri hidroksi-oktadekadienske kiseline, izomeri dihidroksiheksadekanske kiseline, nisu detektovani pri određenim uslovima ekstrakcije. Linolna kiselina je bila najzastupljenija i detektovana je u svim ekstraktima (Slika 39). Ostale dominantne masne kiseline bile su linolenska kiselina, zatim hidroksi-oktadekadienska kiselina, trihidroksi-oktadekanska kiselina i palmitoleinska kiselina. Ekstrakcija sa 100%-tnim acetonom u trajanju od 30 min (M 13) omogućila je najviši prinos izomera 1 trihidroksi-oktadekadienske kiseline, izomera 1 linolenske kiseline i linolne kiseline, dok je najveći sadržaj izomera 1 hidroksi-oktadekadienske kiseline i palmitoleinske kiseline bio u SFE ekstraktu (7% EtOH, 150 bar). Izomeri 1 i 3 trihidroksi-oktadekanske kiseline su najbolje ekstrahovani primenom SFE uz 15%-tni etanol kao ko-rastvarač na 150 bar (Slika 34). Azelainska kiselina je ekstrahovana u jako niskim koncentracijama i to samo primenom ASE (5) i SFE (Slika 32). Ekstrakcija derivata masnih kiselina je bila manje efikasna primenom smeše rastvarača. U SWE ekstraktima identifikovani su samo izomer 3 trihidroksi-oktadekanska kiseline i izomer 5 dihidroksi-oktadekanska kiseline.

4.4.2. List crnog dudu

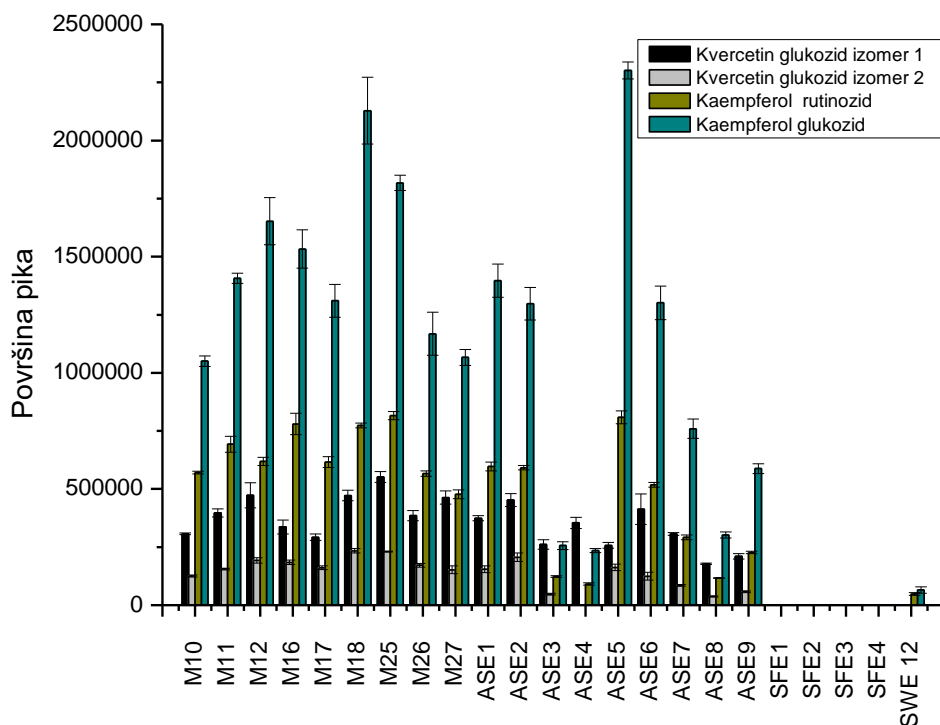
Kvantitativno, efikasnost ekstrakcije je procenjena merenjem površine pikova identifikovanih jedinjenja i prikazana je za svaku tehniku ekstrakcije pri različitim operativnim uslovima (Slike 40–48). Hemijska karakterizacija je izvedena za odabrane ekstrakte (M 10–12, 16–18, 25–27, ASE 1–9, SFE 1–4 i SWE 2). Kao što se vidi na Slikama 40–48, najveći broj jedinjenja je identifikovan u ekstraktima dobijenim primenom maceracije i ASE. Efikasnost SFE je bila niska za većinu jedinjenja. Glukozid L-askorbinske kiseline, koji je bio identifikovan u maceratima i ASE ekstraktima, nije ekstrahovan primenom SWE, SFE i ASE (100% EtOH). SWE pri optimalnim uslovima je bila najefikasnija za ekstrakciju limunske i kininske kiseline. Prinos kininske kiseline je bio veći primenom ASE nego maceracije, dok je limunska kiselina ekstrahovana samo primenom ASE i SWE.



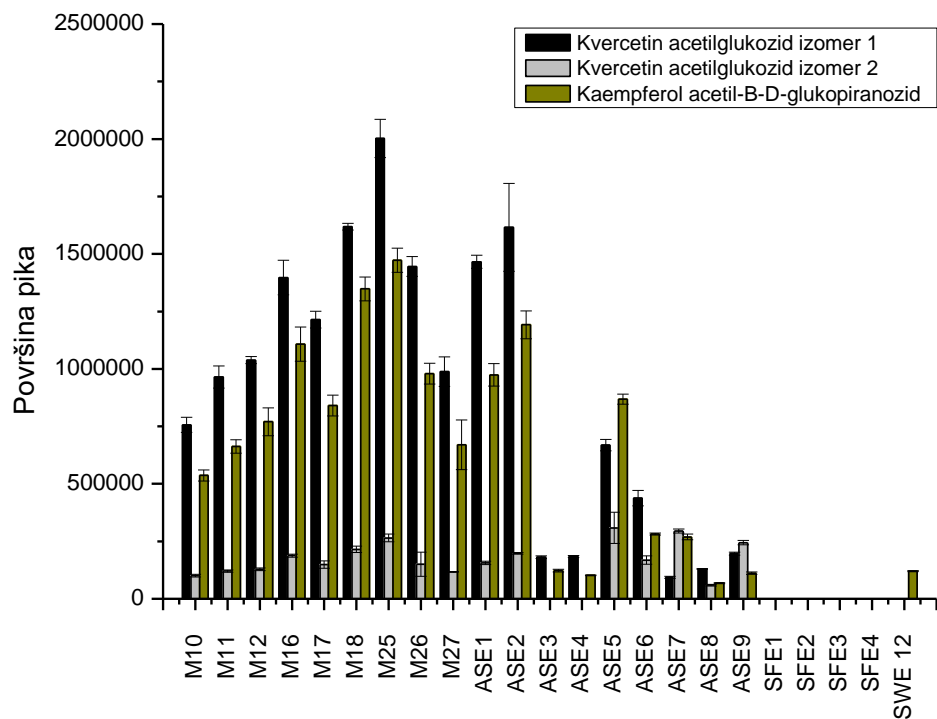
Slika 40. Efikasnost ekstrakcije fenolnih kiselina i derivata različitim ekstrakcionim tehnikama.



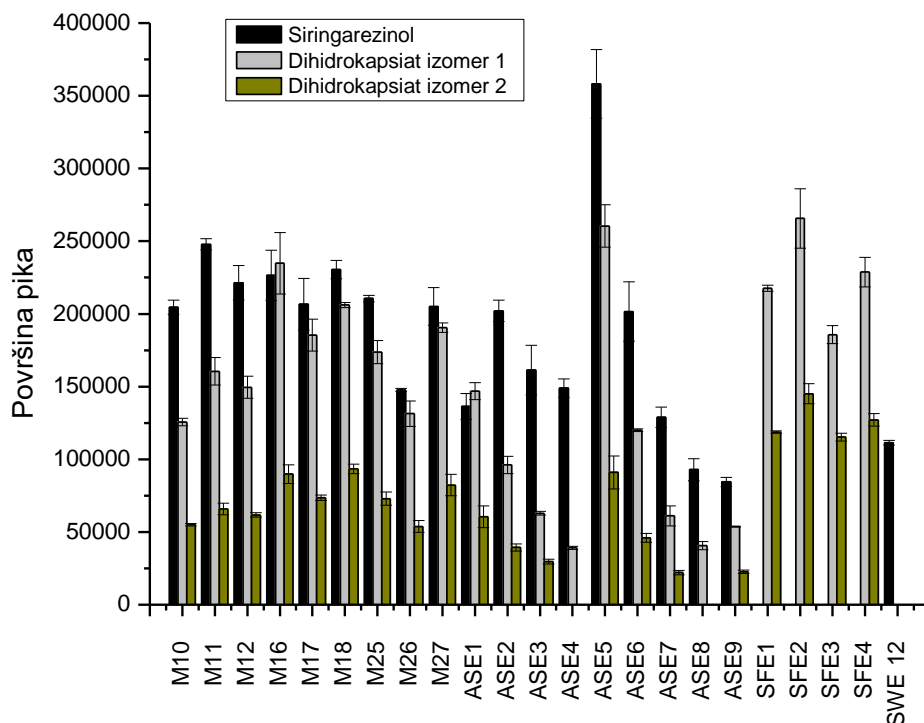
Slika 41. Efikasnost ekstrakcije flavonoida različitim ekstrakcionim tehnikama.



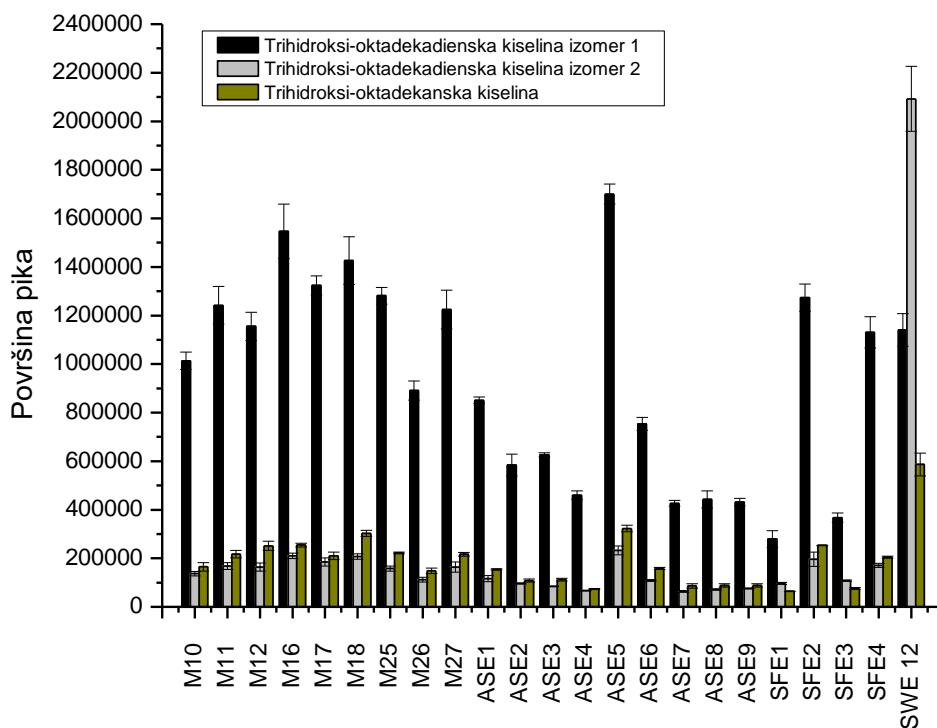
Slika 42. Efikasnost ekstrakcije izomera kvercetin-glukozida, kaempferol rutinozida i kaempferol glukozida različitim ekstrakcionim tehnikama.



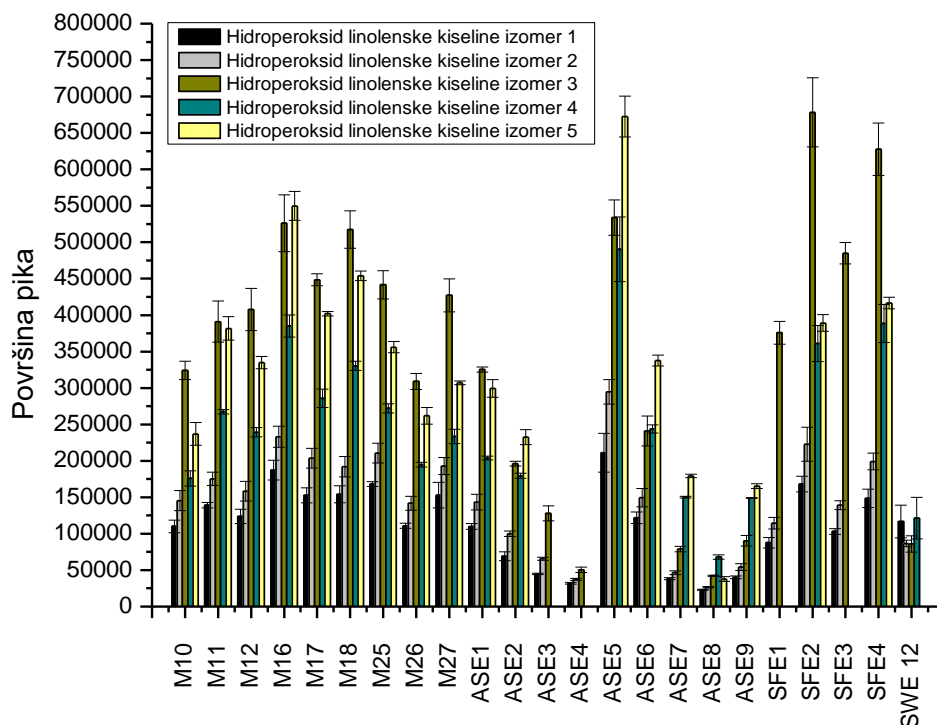
Slika 43. Efikasnost ekstrakcije izomera kvercetin acetilglukozida i kaempferol acetil- β -D-glukopiranozida različitim ekstrakcionim tehnikama.



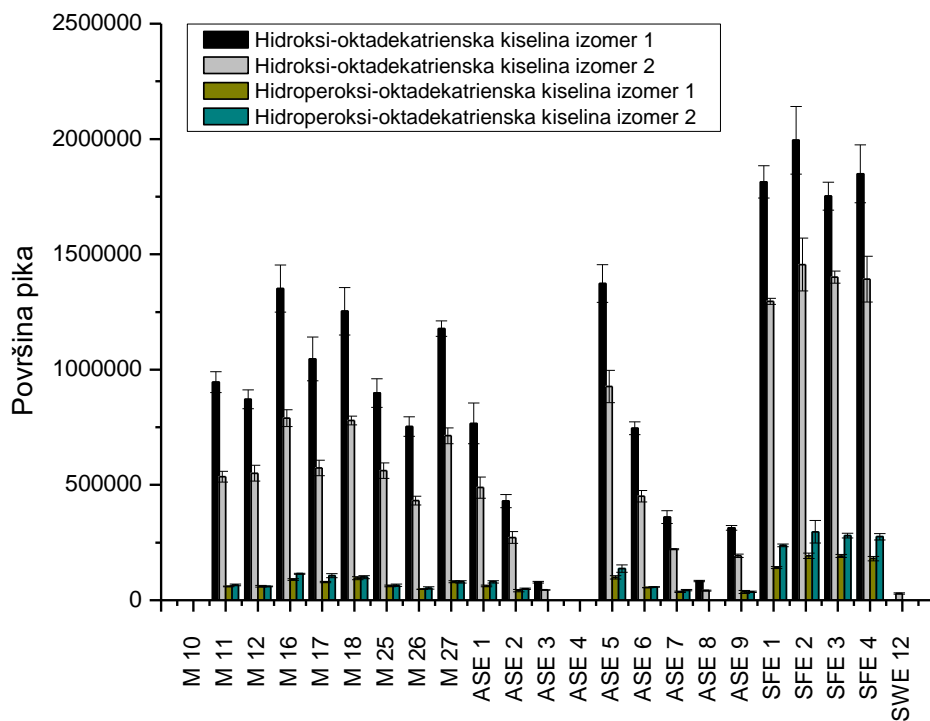
Slika 44. Efikasnost ekstrakcije siringarezinola i izomera dihidrokaptsiata različitim ekstrakcionim tehnikama.



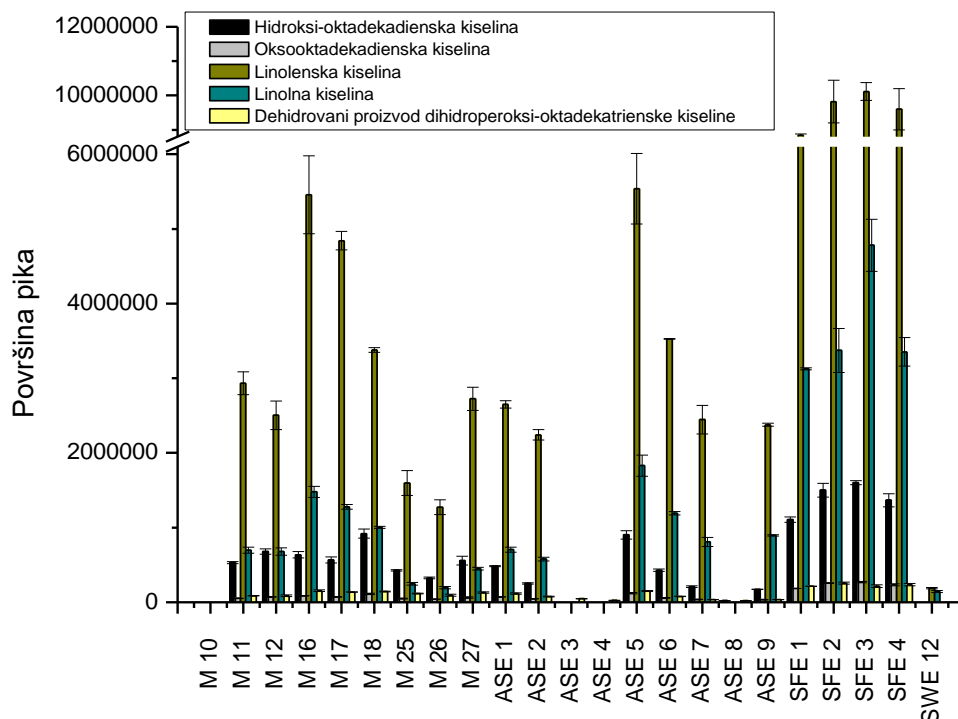
Slika 45. Efikasnost ekstrakcije izomera trihidroksi-oktadekadienske kiseline i trihidroksi-oktadekanske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 46. Efikasnost ekstrakcije izomera hidroperoksida linolenske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 47. Efikasnost ekstrakcije izomera hidroksi-oktadekatrienske kiseline i hidroperoksi-oktadekatrienske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 48. Efikasnost ekstrakcije izomera masnih kiselina i derivata različitim ekstrakcionim tehnikama.

U ekstraktima *M. nigra* najbrojnija klasa su bila fenolna jedinjenja. Najzastupljenija fenolna jedinjenja su bila galna kiselina, rutin, izokvercitrin, kaempferol-3-*O*-glukozid i izomeri kvercetin *O*-acetilglukozida. Sadržaj fenolnih kiselina je bio najmanji u SFE ekstraktima. Izuzetak je bila galna kiselina čiji je prinos bio najviši u SFE ekstraktima primenom 15%-tnog etanola kao ko-rastvarača na 300 bar. Nešto manji sadržaji su postignuti primenom ASE uz 85%-tni etanol na 63 °C i maceracije uz 75%-tni etanol pri različitim vremenima ekstrakcije (Slika 40). Slični sadržaji galne kiseline u *M. nigra* su bili određeni i u maceratima dobijenim 70%-tnim etanolom tokom 12 h (Radojković i dr., 2016). Suprotno tome, SWE i maceracija 50%-tnim acetonom tokom 30 min su bile najefikasnije za ekstrakciju izomera hlorogenske kiseline, dok je SWE ekstrakt bio najbogatiji glukozidom protokatehinske kiseline. Glukozid vanilinske kiseline, ramnozid vanilinske kiseline, glukozid ruzmarinske kiseline, kafena kiselina, ruzmarinska kiselina i *p*-hidroksibenzoeva kiselina su detektovani samo u SWE ekstraktima.

Efikasnost ekstrakcije flavonoida je značajno zavisila od primenjenih uslova ekstrakcije (Slike 41–43). Najefikasnija ekstrakcija kuanona C i kaempferol-3-*O*-glukozida je postignuta primenom SFE (7% EtOH, 150 bar) i ASE (100% EtOH, 120 °C), redom, dok je sadržaj ostalih flavonoida i njihovih derivata bio veći u maceratima. Najveći sadržaj izomera rutina 1 i 3 i izokvercitrina je bio u ekstraktima dobijenim primenom maceracije sa 75%-tnim etanolom tokom 12 h (Slika 41). Sadržaji kvercetin di-*O*-glukozid izomera 1, kaempferol 3-*O*-rutinozida, kvercetin *O*-acetilglukozid izomera 1 i kaempferol-3-*O*-6"-*O*-acetil- β -D-glukopiranozida su bili najveći

primenom maceracije sa 50%-tnim acetonom tokom 30 min. Herrero i dr. (2011) su ispitivali ASE fenolnih jedinjenja iz lista drveta masline etanolom i ustanovili da je povećanje temperature ekstrakcije od 50 do 200 °C vodilo smanjenju efikasnosti ekstrakcije flavonoida usled njihove razgradnje na višim temperaturama. Prednost maceracije na sobnoj temperaturi za ekstrakciju flavonoida je potvrđena u ovoj, a i u prethodnim studijama. Prema podacima koje su naveli Radojković i dr. (2016), najveći sadržaji kvercetina i rutina su bili u maceratima *M. nigra* dobijenim primenom 70%-tnog etanola. Pored toga, Chan i dr. (2009) su poredili ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz kore limete primenom različitih rastvarača (voda, etanol, metanol i aceton) pri čemu se smeša aceton/voda pokazala kao najefikasnija.

U pogledu dihidrokapsiatnih izomera, sadržaj dihidrokapsiatnog izomera 1 se značajno razlikovao u SFE ekstraktima, dostižući najveću vrednost primenom pritiska od 150 bar i 15%-tnog etanola, dok je sadržaj dihidrokapsiatnog izomera 2 bio dva puta manji u odnosu na izomer 1 (Slika 44). Suprotno tome, najefikasnija ekstrakcija siringarezinola je bila postignuta primenom ASE uz 100%-tni etanol na 120 °C. Lingerzinol je detektovan samo u SWE ekstraktu.

Kada je u pitanju maceracija različitim rastvaračima, najveći sadržaj fenolnih jedinjenja je bio postignut u ekstraktima dobijenim primenom 75%-tnog etanola. Upoređivanjem površina pikova fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom ASE na 120 °C sa 100%-tnom vodom, 50%- i 100%-tnim etanolom, najveća efikasnost je bila postignuta primenom 100%-tnog etanola. Ekstrakti dobijeni na 63 i 176 °C korišćenjem 85%-tnog etanola imali su nešto veće sadržaje fenolnih jedinjenja u poređenju sa onima dobijenim primenom 15%-tnog etanola pri istim temperaturama. Može se zaključiti da je prinos fenolnih jedinjenja primenom ASE rastao sa udelom etanola. Imajući u vidu veliku hemijsku varijabilnost ekstrakata dobijenih primenom ASE, može se zaključiti da je za svako pojedinačno jedinjenje potrebno odabrati određene uslove ekstrakcije, što ukazuje na visoku selektivnost ASE.

Kao što je prikazano na Slikama 40–48, broj identifikovanih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom SFE je bio manji u poređenju sa onim dobijenim primenom maceracije, kao i pomoću ASE i SWE. Ovo se može objasniti nepolarnom prirodom superkritičnog ugljenik(IV)-oksida iako je list *M. nigra* bogat kako polarnim fenolnim jedinjenjima tako i nepolarnim jedinjenjima. Kao što se može videti na Slikama 45–48, viši prinosi većine derivata masnih kiselina su postignuti primenom SFE. SFE ekstrakti bili su najbogatiji izomerima hidroksi-oktadekatrienske kiseline, hidroksi-oktadekadienske kiseline, linolenske i linolne kiseline. Prinos linolenske i linolne kiseline bio je najviši u ekstraktima dobijenim sa 7%-tnim etanolom kao ko-rastvaračem na 300 bar. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima u kojima je određen veći sadržaj linolenske i linolne kiseline u ekstraktima *M. nigra* primenom SFE (pritisak 300 bar, vreme ekstrakcije 17 h) u odnosu na druge identifikovane masne kiseline (Radojković dr., 2016). Najefikasnija ekstrakcija masnih kiselina i derivata maceracijom je postignuta primenom 75%-tnog etanola tokom 30 min, pri čemu je linolenska kiselina bila najzastupljenija, ali i dalje u nižoj koncentraciji u poređenju sa SFE. Najviši prinosi izomera hidroperoksida linolenske kiseline postignuti su primenom ASE koristeći 100%-tni etanol kao rastvarač na 120 °C, osim za izomer 3

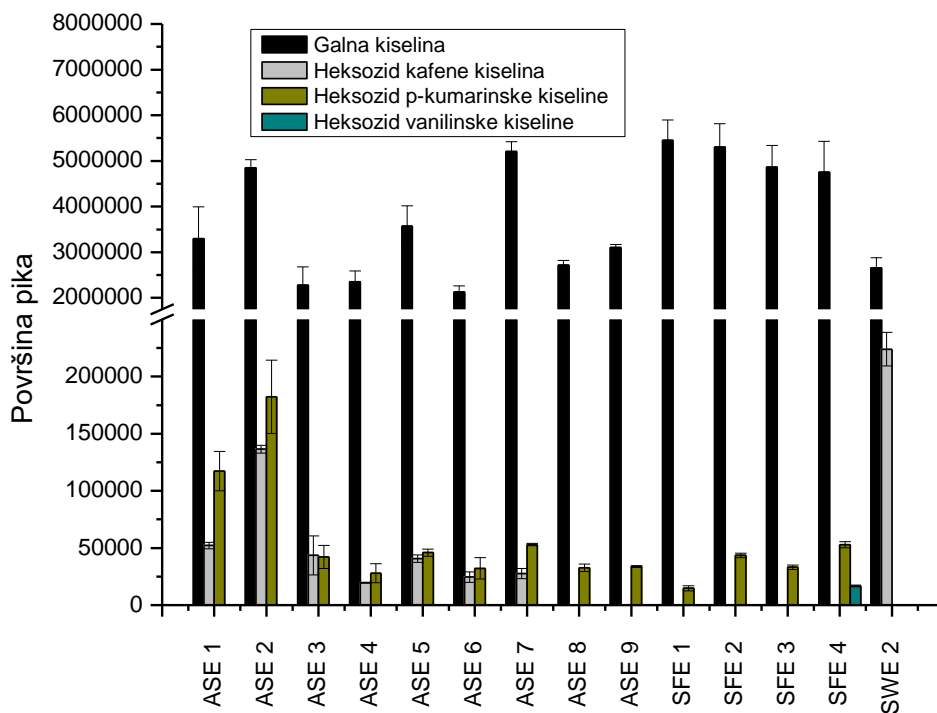
hidroperoksida linolenske kiseline (Slika 46). Njegov najveći sadržaj postignut je primenom SFE uz 15%-tni etanol na 150 bar. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa rezultatima koji su zabeleženi u studiji Toubane i dr. (2017) u kojoj se navodi visoka efikasnost ekstrakcije masnih kiselina iz korena *Carthamus caeruleus* primenom etanola kao ko-rastvarača. U SWE ekstraktu većina masnih kiselina je imala manji sadržaj u odnosu na ekstrakte dobijene primenom maceracije, ASE i SFE. Izuzetak su bili izomer 2 trihidroksi-oktadekadienske kiseline i trihidroksi-oktadekanska kiselina.

Sadržaj glikolipida A je bio najveći u maceratima dobijenim primenom 75%-tnog etanola tokom 12 h. Slični rezultati su zabeleženi u studiji Jiménez-Sánchez i dr. (2016) u kojoj je izvedena efikasna ekstrakcija glikolipida A iz zelene špargle primenom 80%-tnog metanola kao rastvarača. Što se tiče ASE, u ekstraktu dobijenom primenom 100%-tnog etanola na 120 °C (ASE 5) je bio najviši prinos ovog jedinjenja. Isti prinos postignut je primenom SWE. S druge strane, glikolipid A nije ekstrahovan iz lista *M. nigra* primenom SFE.

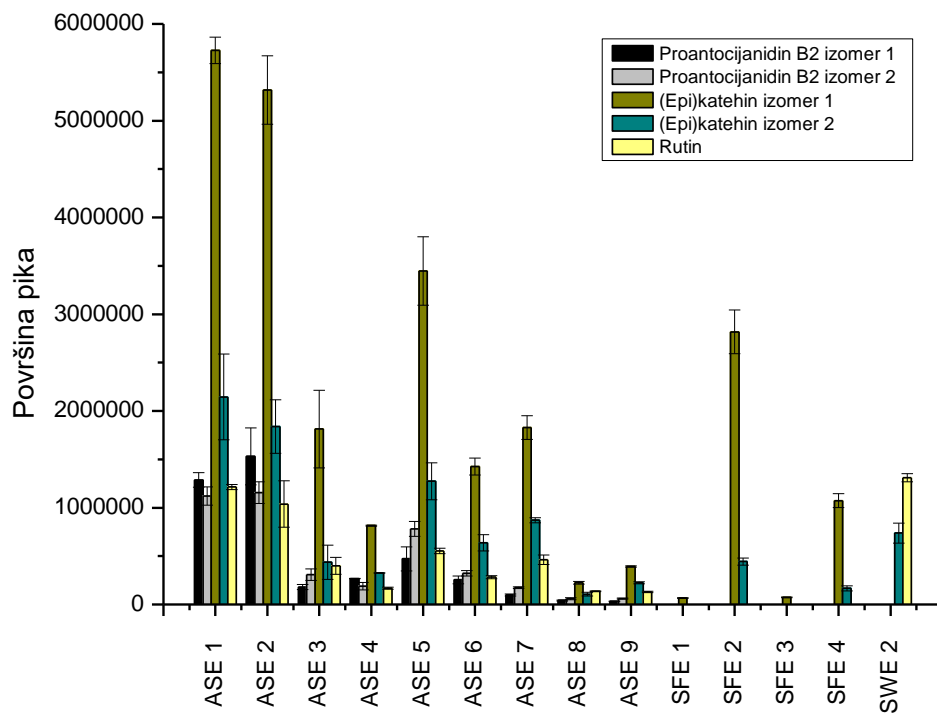
Poređenjem efikasnosti primenjenih tehnika ekstrakcije može se zaključiti da se primenom SWE i ASE postiže efikasna ekstrakcija širokog spektra jedinjenja različite polarnosti iz lista *M. nigra*. Za efikasnu i selektivnu ekstrakciju flavonoida preporučuje se maceracija, dok se masne kiseline iz *M. nigra* lista najefikasnije ekstrahuju primenom SFE. SWE ekstrakcija je pokazala očiglednu prednost u pogledu ekstrakcije fenolnih kiselina, dok se prednost ASE ispoljila u pogledu visokoefikasne ekstrakcije pri najkraćem vremenu. ASE je ekološki prihvatljiviji postupak ekstrakcije u odnosu na maceraciju jer koristi minimalnu zapreminu organskih rastvarača, dok je SWE najbezbednija tehnika uz korišćenje vode kao rastvarača. Ugljenik(IV)-oksid je jeftin i „zelen“ rastvarač koji se može lako ukloniti iz finalnog ekstrakta. Superkritični ugljenik(IV)-oksid ne dovodi do velikih hemijskih promena jedinjenja, čuvajući njihova biološka svojstva (Knez i dr., 2013; Espinosa-Pardo i dr., 2014). Ipak, upotreba superkritičnog ugljenik(IV)-oksida kao nepolarnog rastvarača ima ograničenja pri ekstrakciji polarnih i umereno polarnih jedinjenja, kao što su fenoli lista *M. nigra*. Dodavanje ko-rastvarača blago je poboljšalo afinitet ugljenik(IV)-oksida prema polarnijim jedinjenjima.

4.4.3. Peteljke trešnje

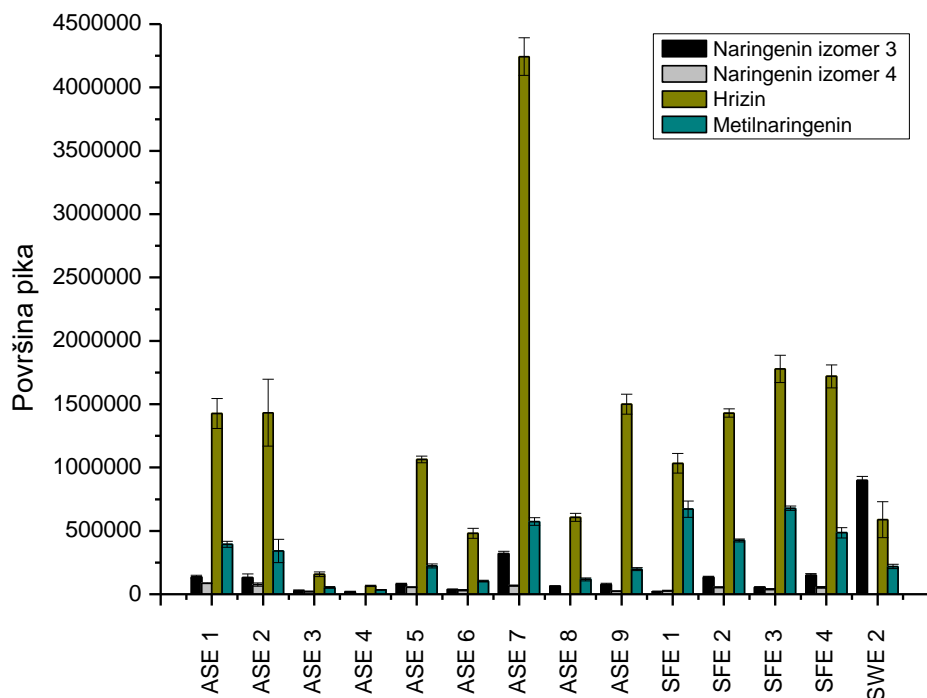
Efikasnost primenjenih tehnika ekstrakcije peteljki trešnje procenjena je kvantitativno merenjem površine pikova identifikovanih jedinjenja u ekstraktima dobijenim pri različitim operativnim uslovima (Slike 49–57). Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktima *P. avium* date su u Tabeli P5. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri ponovljene analize. Pored toga, u Tabeli P6 su prikazane statistički značajne razlike između tehnika ekstrakcije u pogledu sadržaja identifikovanih jedinjenja. Rezultati izvedene statističke analize pokazali su da je postojala značajna razlika u prinosu većine jedinjenja identifikovanih u ekstraktima dobijenim primenom ASE, SFE i SWE.



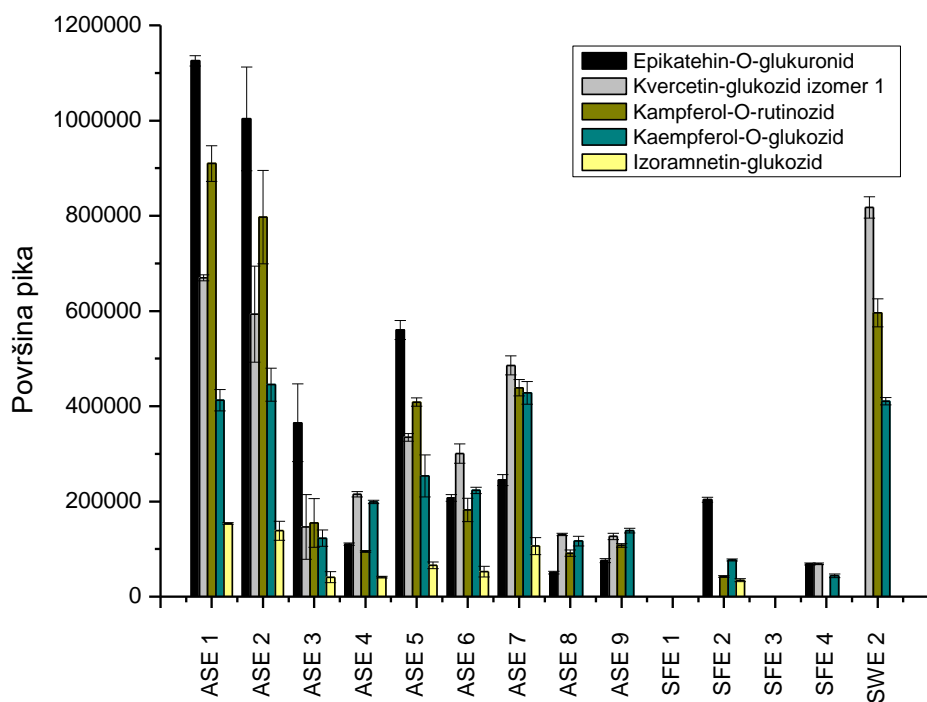
Slika 49. Efikasnost ekstrakcije fenolnih kiselina i derivata različitim ekstrakcionim tehnikama.



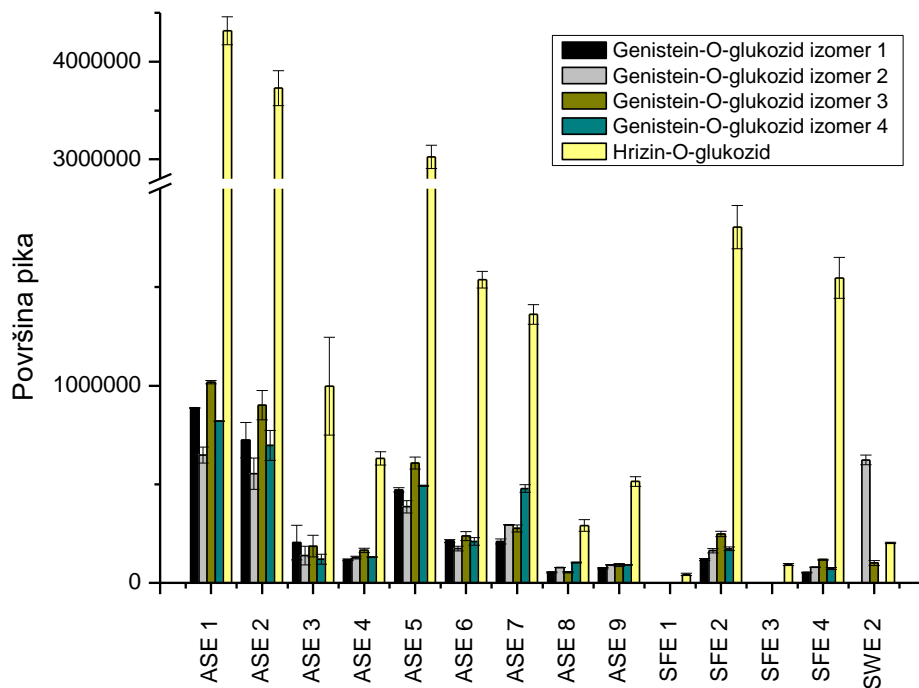
Slika 50. Efikasnost ekstrakcije izomera proantocijanidina B2, izomera (epi)katehina i rutina različitim ekstrakcionim tehnikama.



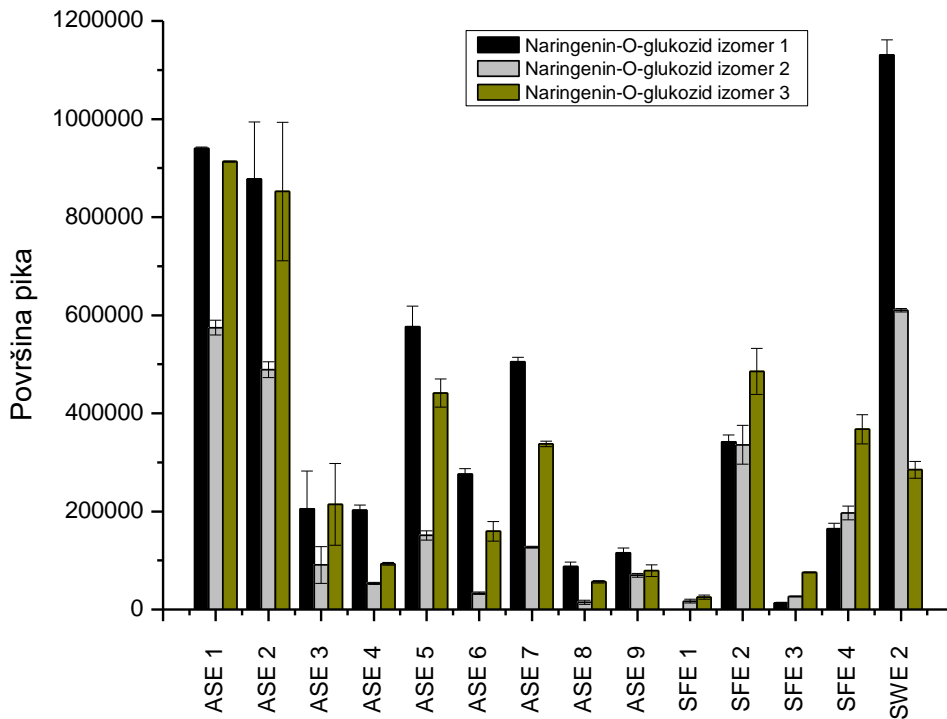
Slika 51. Efikasnost ekstrakcije izomera naringenina, hrizina i metilnaringenina različitim ekstrakcionim tehnikama.



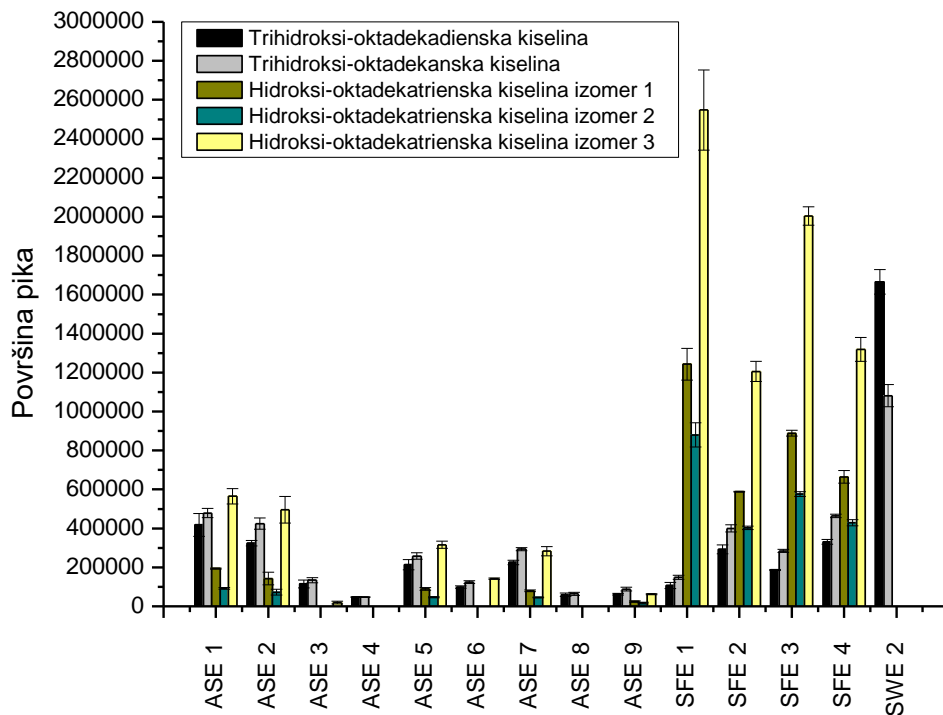
Slika 52. Efikasnost ekstrakcije epikatehin-*O*-glukuronida, izomera 1 kvercetin-glukozida, kaempferol-*O*-rutinozida, kaempferol-*O*-glukozida i izoramnetin-glukozida različitim ekstrakcionim tehnikama.



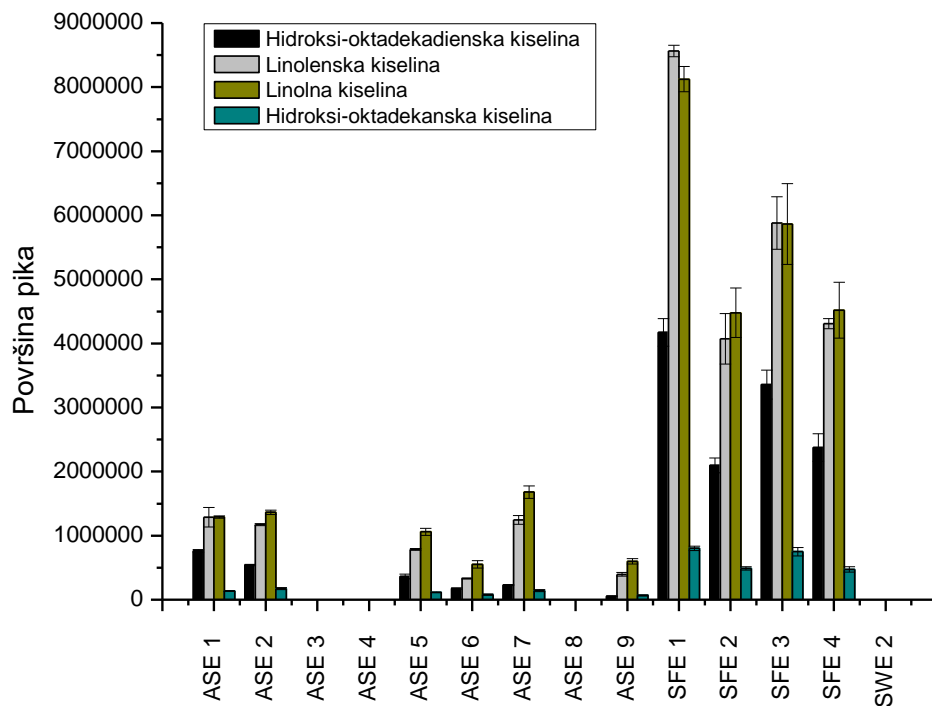
Slika 53. Efikasnost ekstrakcije izomera genistein-*O*-glukoziida i hrizin-*O*-glukoziida različitim ekstrakcionim tehnikama.



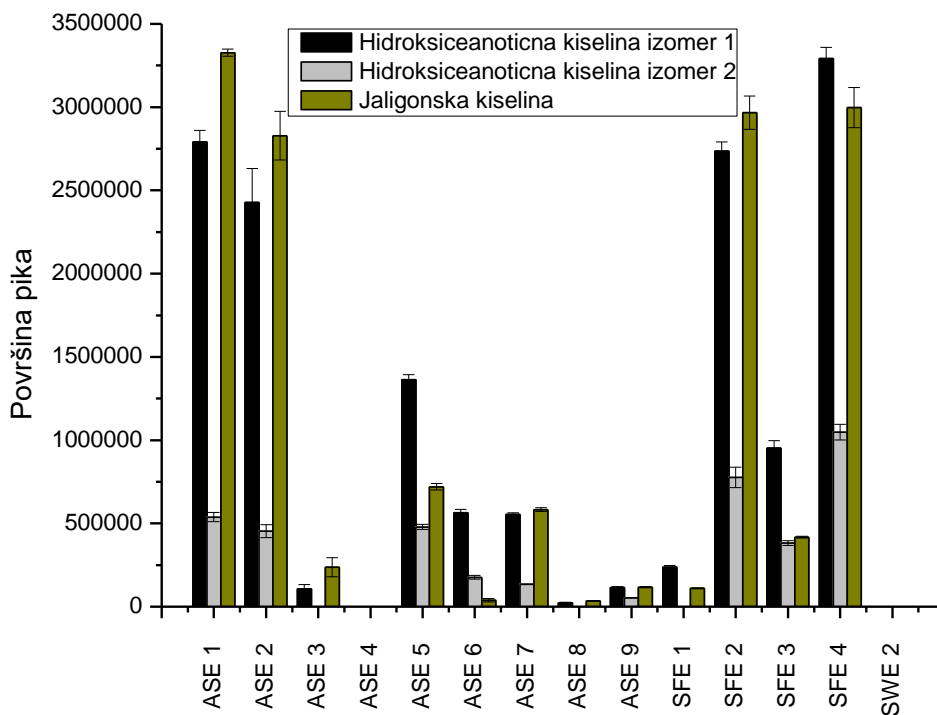
Slika 54. Efikasnost ekstrakcije izomera naringenin-*O*-glukoziida različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 55. Efikasnost ekstrakcije trihidroksi-oktadekadienske kiseline, trihidroksi-oktadekanske kiseline i izomera hidroksi-oktadekatrienske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 56. Efikasnost ekstrakcije hidroksi-oktadekadienske kiseline, linolenske kiseline, linolne kiseline i hidroksi-oktadekanske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.



Slika 57. Efikasnost ekstrakcije izomera hidroksiceanotične kiseline i jaligonske kiseline različitim ekstrakcionim tehnikama.

Najveći broj jedinjenja identifikovan je u SWE i ASE ekstraktima. U ekstraktima peteljki trešnje najzastupljenija su bila polifenolna jedinjenja, kao što su galna kiselina, glukozid protokatehinske kiseline, (epi)katehin, eriodiktiol-glukozid, hrizin-*O*-glukozid i hrizin. Prinos galne kiseline bio je najviši u ekstraktu dobijenom primenom SFE sa 7%-tnim etanolom kao ko-rastvaračem na 150 bar. Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa prethodno objavljenim radovima vezanim za sadržaj galne kiseline u ekstraktima *Vitis labrusca* dobijenim primenom SFE pri pritiscima 137–167 bar sa 5–8%-tnim etanolom (Ghafoor i dr., 2012). Nešto niži prinosi su postignuti primenom ASE sa 85%-tnim etanolom na 63 °C i 176 °C. ASE sa 85%-tnim etanolom na 63 °C je bila najefikasnija za ekstrakciju heksozida *p*-kumarinske kiseline (Slika 49). U studiji Bastos i dr. (2015), heksozid *p*-kumarinske kiseline je bio detektovan u maceratima peteljki *P. avium* dobijenim primenom 80%-tnog metanola u višoj koncentraciji u odnosu na ostale heksozide fenolnih kiseline, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Heksozid vanilinske kiseline je ekstrahovan samo primenom SFE (15% etanol, 300 bar), dok je najviši prinos heksozida kafene kiseline postignut primenom SWE pri optimalnim uslovima. SWE je pokazala značajnu prednost u pogledu ekstrakcije fenolnih kiseline i derivata, kao što su glukozid protokatehinske kiseline, hlorogenska kiselina, kafena kiselina, dihidro-*p*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina i dihidro-ferulna kiselina, koji su bili jedino detektovani u SWE ekstraktima.

U ekstraktima peteljki *P. avium*, najbrojnija klasa su bili flavonoidi i njihovi derivati, što je u skladu sa rezultatima Bastos-a i dr. (2015). Iz rezultata prikazanih na Slikama 50–54 može se

zapaziti da je ASE bila efikasnija za ekstrakciju većine flavonoidnih derivata u odnosu na SWE i SFE. Izuzetak je bio metilnaringenin čiji je najveći prinos postignut primenom SFE sa 7%-tnim etanolom na 150 bar, dok je primena SWE omogućila najefikasniju ekstrakciju rutina, izomera kvercetin-glukozida, izomera 1 i 2 naringenin-*O*-glukozida i izomera 3 naringenina. Pored toga, izomer 1 (epi)katehina, eriodiktiol-glukozid, izomeri 1 i 2 naringenina i kaempferol su detektovani jedino u SWE ekstraktima, naglašavajući dodatnu prednost SWE u smislu broja ekstrahovanih flavonoida. Najefikasnija ekstrakcija većine flavonoida je postignuta primenom ASE (85% etanol, 40 °C). Kaempferol-*O*-glukozid je uspešno ekstrahovan primenom ASE sa 85%-tnim etanolom na 63 °C. Najviši prinosi za naringenin izomer 1 i hrizin postignuti su primenom ASE sa 85%-tnim etanolom kao rastvaračem na 176 °C. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa rezultatima Gomes i dr. (2017), koji su potvrdili visoku efikasnost ekstrakcije flavonoida iz lista vrste *Passiflora* korišćenjem etanola u većem procentu. Najniži prinos pojedinih flavonoida i svih flavonoidnih derivata postignut je primenom SFE sa 7%-tnim etanolom. Generalno je primećeno da su prinosi fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom 50, 85 i 100%-tnog etanola bili viši u poređenju sa onima dobijenim primenom 15%-tnog etanola. Najveći prinos fenolnih jedinjenja primenom ASE je postignut na temperaturi od 40 °C.

Većina masnih kiselina i njihovih derivata su bili uspešno ekstrahovani primenom SFE. Ipak, rezultati su pokazali varijacije u sadržaju, zavisno od primenjenih uslova ekstrakcije (Slike 55 i 56). U SFE ekstraktima najdominantnije su bile linolenska, linolna i hidroksi-oktadekadienska kiselina. Prinosi trihidroksi-oktadekadienske i trihidroksi-oktadekanske kiseline su bili najviši u ekstraktima dobijenim primenom subkritične vode, dok je za ostale masne kiseline i njihove derivate dovoljno efikasna bila SFE (7% EtOH, 150 bar). Kod ASE rezultati su pokazali porast prinosa masnih kiselina sa povećanjem procenta etanola, ali su određeni sadržaji masnih kiselina i dalje bili znatno manji u poređenju sa SFE. Pritisak nije znatno uticao na prinos masnih kiselina u ekstraktima dobijenim primenom SFE sa 15%-tnim etanolom. U studiji Sánchez-Vicente i dr. (2009) povećanje sadržaja ko-rastvarača je vodilo povećanju efikasnosti ekstrakcije masnih kiselina iz semenki *Prunus persica*, dok je s druge strane povećanje pritiska SFE ekstrakcije imalo negativan efekat na rastvorljivost lipida.

Sadržaj jaligonske kiseline se značajno razlikovao u ASE i SFE ekstraktima, dostižući najveću vrednost primenom ASE na temperaturi od 40 °C i korišćenjem 50%-tnog etanola. S druge strane, najefikasnija ekstrakcija izomera hidroksiceanotične kiseline je postignuta primenom SFE sa 15%-tnim etanolom na 300 bar. Površina pika dobijena za izomer 1 hidroksiceanotične kiseline bila je trostruko veća u odnosu na izomer 2.

5. ZAKLJUČCI

- U okviru ove disertacije ispitane su i poređene konvencionalna (maceracija) i savremene (ASE, SFE i SWE) tehnike ekstrakcije korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje. Ispitan je uticaj najznačajnijih parametara ekstrakcionih tehnika na hemijske profile ekstrakata i prinos ciljnih jedinjenja.
- SWE je omogućila najefikasniju ekstrakciju polifenolnih jedinjenja korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje.
- Optimalni uslovi SWE pri kojima je postignut maksimalan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima korena gaveza su bili temperatura od 130 °C, pritisak od 60 bar, vreme ekstrakcije od 20 min i brzina mešanja od 2 Hz. Ostvareni sadržaj ukupnih fenola pri navedenim uslovima je iznosio 331,77±5,80 mg EGK/g droge.
- Optimalni uslovi SWE pri kojima je postignut maksimalan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima lista crnog duda su bili temperatura od 130 °C, pritisak od 60 bar, vreme ekstrakcije od 40 min i brzina mešanja od 2 Hz. Ostvareni sadržaj ukupnih fenola pri navedenim uslovima je iznosio 502,48±5,20 mg EGK/g droge.
- Optimalni uslovi SWE pri kojima je postignut maksimalan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima peteljki trešnje su bili temperatura od 80 °C, pritisak od 40 bar, vreme ekstrakcije od 30 min i brzina mešanja od 2 Hz. Ostvareni sadržaj ukupnih fenola pri navedenim uslovima je iznosio 436,74±8,45 mg EGK/g droge.
- QTOF-MS/MS analizom ekstrakata korena gaveza detektovano je ukupno 62 jedinjenja različitih hemijskih klasa, uključujući antrahinone, organske, fenolne i masne kiseline i njihove derivate. Po prvi put je u korenu gaveza detektovano 53 jedinjenja.
- HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analizom ekstrakata lista crnog duda identifikovano je 34 novih jedinjenja, od ukupno 62 identifikovanih jedinjenja. Dominantna jedinjenja u ekstraktima lista crnog duda su bile fenolne kiseline i derivati (galna kiselina), flavonoidi i njihovi derivati (izokercitrin, rutin i kaempferol-3-O-glukozid), i masne kiseline (linolenska i linolna kiselina).
- HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analizom ekstrakata peteljki trešnje identifikovano je ukupno 58 jedinjenja, od kojih je 27 jedinjenja po prvi put identifikovano u ispitivanom matriksu. Tentativno identifikovana jedinjenja klasifikovana su u tri hemijske klase, fenolna jedinjenja i derivate, masne kiseline i derivate, kao i terpene.
- Kvantitativnom analizom pojedinačnih identifikovanih jedinjenja u ekstraktima korena gaveza je zaključeno da se primenom SWE, ASE i maceracijom pomoću rastvarača na bazi alkohola (metanolni i etanolni rastvor) ostvaruje najviši prinos polarnijih jedinjenja. Najveći broj polifenolnih jedinjenja je bio identifikovan u SWE ekstraktima pri optimalnim uslovima. Prinos nepolarnih jedinjenja je bio viši primenom SFE i maceracije acetonom u trajanju od 30 min. Prinos masnih kiselina je bio najviši primenom SFE uz 15%-tni etanol kao ko-rastvarač na 150 bar. Najveći uticaj na sastav ekstrakata dobijenih primenom različitih tehnika ekstrakcije je ispoljio tip rastvarača.
- Efikasnost ekstrakcije je posmatrana za sva identifikovana jedinjenja lista crnog duda. Varijacije u sadržaju ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja lista crnog duda su u najvećoj meri zavisile od temperature ekstrakcije i polarnosti rastvarača. SWE ekstrakcija je pokazala

očiglednu prednost u pogledu ekstrakcije fenolnih kiselina, dok je ASE omogućila efikasnu ekstrakciju pri najkraćem vremenu. Očekivano, SFE je bila najefikasnija pri ekstrakciji nepolarnih jedinjenja kao što su masne kiseline.

- Najviši prinos fenolnih kiselina i derivata kao što su hlorogenska, kafena, ferulna i *p*-kumarinska kiselina u ekstraktima peteljki trešnje je postignut primenom SWE, dok se primenom ASE postigao najviši prinos flavonoida i njihovih derivata. Prinosi fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim primenom 50, 85 i 100%-tnog etanola su bili viši u poređenju sa onima dobijenim primenom 15%-tnog etanola. Najviši prinos fenolnih jedinjenja primenom ASE je bio postignut na temperaturi od 40 °C. SFE ekstrakcijom je dobijen najviši prinos masnih kiselina (linolenska, linolna i hidroksi-oktadekadienska kiselina). ASE je ispoljila veliku selektivnost prema terpenoidnim jedinjenjima, međutim prinos pojedinačnih terpena je bio viši u ekstraktima dobijenim primenom SFE.
- Definisani optimalni uslovi ekstrakcije korena gaveza, lista crnog duda i peteljki trešnje primenom različitih ekstrakcionih tehnika imaju značajan doprinos u eksploataciji ovih matriksa i proizvodnji funkcionalnih ekstrakata koji mogu naći primenu u dizajniranju novih farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda.
- Novoidentifikovana jedinjenja u korenu gaveza, listu crnog duda i peteljkama trešnje pružaju vredne informacije o hemijskom sastavu ovih matriksa, omogućavajući razumevanje biološkog potencijala i razjašnjavanje mehanizama dejstva.

6. LITERATURA

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4395-4406.
- Abad-García, B., Berrueta, L. A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5398-5415.
- Abbas, G. M., Abdel Bar, F. M., Baraka, H. N., Gohar, A. A., Lahloub, M. F. (2014). A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. *Natural Product Research*, 28(13), 952-959.
- Abd, A. J., Niamah, A. K. (2012). Effect of chitosan on apple juice quality. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 2(4), 153-157.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Quirantes-Piné, R., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2012). HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*, 46(1), 108-117.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). *Food Research International*, 51(1), 354-362.
- Ademović, Z., Hodžić, S., Zahirović, Z. H., Husejnagić, D., Džananović, J., Šarić-Kundalić, B., Suljagić, J. (2017). Phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of the wild cherry (*Prunus avium* L.) stem. *Acta Periodica Tehnologica*, 48, 1-13.
- Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R., Najafi, M. N. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 234-244.
- Ahmed, S. M., Abdelgaleil, S. A. (2005). Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (*Magnoliaceae*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, 638-642.
- Ahmed, R., Chun, B. S. (2018). Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen. *The Journal of Supercritical Fluids*, 141, 88-96.
- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.

- Alkan, F. U., Anlas, C., Ustuner, O., Bakirel, T., Sari, A. B. (2014). Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of *Symphytum officinale* on 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 4(4), 62-68.
- Allaf, T., Tomao, V., Besombes, C., Chemat, F. (2013). Thermal and mechanical intensification of essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 72, 24-30.
- Alsoqyani, F. S. (2017). Supercritical water oxidation of nitrogen-containing organic compounds: process enhancement using isopropyl alcohol. Doctoral dissertation, University of Birmingham, UK.
- Andres, R. M. P. (1991). Klinische und instrumentalanalytische Untersuchung von Dermatika mit Extrakten aus *Symphytum officinale* L. Juris-Dr. und Verlag., Dissertation, University of Bern.
- Arapitsas, P., Turner, C. (2008). Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta*, 74(5), 1218-1223.
- Ardrey, R. E. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. John Wiley & Sons.
- Awad, A.B., Fink, C.S. (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 130, 2127-2130.
- Ayala, R. S., De Castro, M. L. (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75(1), 109-113.
- Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1237-1243.
- Bao, T., Li, Y., Xie, J., Sun, C., Li, X., Pu, Y., Chen, W. (2018). Systematic evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of some new and common bayberry cultivars using an in vitro gastrointestinal digestion method. *Food Research International*, 103, 326-334.
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M. E. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 358-363.
- Balachandran, S., Kentish, S. E., Mawson, R., Ashokkumar, M. (2006). Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 471-479.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136(1), 1-8.

- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2015). Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: the widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chemistry*, 173, 1045-1053.
- Bei, K., Ma, P., Wang, J., Li, K., Lyu, J., Hu, Z., Chou, I. M., Pan, Z. (2017). Depolymerization of poly (ethylene naphthalate) in fused silica capillary reactor and autoclave reactor from 240 to 280° C in subcritical water. *Polymer Engineering & Science*, 57(12), 1382-1388.
- Bhat, R. B. (2014). Medicinal plants and traditional practices of *Xhosa* people in the Transkei region of Eastern Cape, South Africa. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(2), 292-298.
- Bhatnagar, A., Sillanpää, M. (2009). Applications of chitin-and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - a short review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 26-38.
- Bijttebier, S., Zhani, K., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S., Voorspoels, S. (2014). Generic characterization of apolar metabolites in red chili peppers (*Capsicum frutescens* L.) by orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4812-4831.
- Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., Pollard, M. (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis: occurrence of octadeca-*cis*-6, *cis*-9-diene-1, 18-dioate as the major component. *The Plant Journal*, 40(6), 920-930.
- Borrás-Linares, I. (2014). Uso de técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabolómicos de nutraceuticos y matrices vegetales. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, España.
- Boulet, J. C., Ducasse, M. A., Cheynier, V. (2017). Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines: relationship between astringency and the concentration of phenolic substances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 193-199.
- Brigelius-Flohe, R., Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145-1155.
- Brunner, G. (2009). Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 373-381.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A. C. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food research international*, 51(1), 66-74.

- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P., Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, *197*, 266-272.
- Calvo, A., Morante, J., Plánder, S., Székely, E. (2017). Fractionation of biologically active components of grape seed (*Vitis vinifera*) by supercritical fluid extraction. *Acta Alimentaria*, *46*(1), 27-34.
- Carneiro, R. P., Oliveira, F. A., Madureira, F. D., Silva, G., de Souza, W. R., Lopes, R. P. (2013). Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, *33*(2), 413-423.
- Carr, A. G., Mammucari, R., Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, *172*(1), 1-17.
- Casagrande, F., Darbon, J. M. (2001). Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, *61*(10), 1205-1215.
- Cech, N. B., Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, *20*(6), 362-387.
- Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Mustapha, W. A. W., Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, *16*(2), 203-213.
- Chandler, K., Deng, F., Dillow, A. K., Liotta, C. L., Eckert, C. A. (1997). Alkylation reactions in near-critical water in the absence of acid catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *36*(12), 5175-5179.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540-560.
- Chen, H. M., Fu, X., Luo, Z. G. (2015). Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chemistry*, *168*, 302-310.
- Cheriot, S., Billaud, C., Pöchtrager, S., Wagner, K. H., Nicolas, J. (2009). A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. *Food Chemistry*, *114*(1), 132-138.
- Chevallier, A. (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley Limited, London.

- Chlopčíková, Š., Psotová, J., Miketová, P., Soušek, J., Lichnovský, V., Šimánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(5), 408-413.
- Cho, B. O., Lee, C. W., So, Y., Jin, C. H., Kang, S. Y., Kim, D. S., Seo, K.I., Yook, H.S., Jeong, I. Y. (2014). Cyanidin-3-glucoside ameliorates CCl₄-induced liver injury in mice. *Food Science and Biotechnology*, 23(4), 1313-1319.
- Christie, W. W., Han, X. (2010). Lipid analysis – Isolation, separation, identification and lipidomic analysis (4th ed.). The Oily Press, Bridgwater, England.
- Cichon, M. J., Riedl, K. M., Schwartz, S. J. (2017). A metabolomic evaluation of the phytochemical composition of tomato juices being used in human clinical trials. *Food Chemistry*, 228, 270-278.
- Ciulu, M., Quirantes-Piné, R., Spano, N., Sanna, G., Borrás-Linares, I., Segura-Carretero, A. (2017). Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Industrial Crops and Products*, 108, 106-112.
- Clericuzio, M., Burlando, B., Borghesi, B., Salis, A., Damonte, G., Ribulla, S., Cornara, L. (2017). Antiproliferative hydroxy-fatty acids from the fodder legume *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 141, 157-164.
- Cossignani, L., Blasi, F., Simonetti, M. S., Montesano, D. (2018). Fatty acids and phytosterols to discriminate geographic origin of *Lycium barbarum* berry. *Food Analytical Methods*, 11(4), 1180-1188.
- Coulombe Jr, R. A. (2003). Pyrrolizidine alkaloids in foods. *Advances in Food Nutrition Research*, 45, 61-99.
- Cravotto, G., Cintas, P. (2007). The combined use of microwaves and ultrasound: improved tools in process chemistry and organic synthesis. *Chemistry - A European Journal*, 13(7), 1902-1909.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mašković, P., Savić, S., Nikolić, L. (2015). Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 65, 582-591.
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gašić, U., Tešić, Ž., Zengin, G., Zeković, Z., Đurović, S. (2017). Isolation of apigenin from subcritical water extracts: optimization of the process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 32-42.

- Da Porto, C., Natolino, A., Decorti, D. (2015). The combined extraction of polyphenols from grape marc: Ultrasound assisted extraction followed by supercritical CO₂ extraction of ultrasound-caffinate. *LWT-Food science and Technology*, 61(1), 98-104.
- Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.
- De Brito, E. S., de Araújo, M. C. P., Lin, L. Z., Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 105(3), 1112-1118.
- De Freitas, M., Souza, P. M., Fonseca-Bazzo, Y. M., Silveira, D., Simeoni, L. A., de Mello, M. H., Fagg, C., Magalhães, P. (2015). Tyrosinase inhibition and cytotoxicity of *Morus nigra* leaves for cosmetic application. *Toxicology Letters*, 2(238), S357.
- De Hoffmann, E., Stroobant, V. (2002). *Mass Spectrometry: Principles and Application*, John Wiley & Sons.
- De la Luz Cádiz-Gurrea, M., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., Segura-Carretero, A. (2013). Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 50(1), 197-204.
- De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176.
- De Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Udo, A. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography A*, 984(1), 45-58.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- De Rosso, M., Panighel, A., Vedova, A., Gardiman, M., Flamini, R. (2015). Characterization of non-anthocyanic flavonoids in some hybrid red grape extracts potentially interesting for industrial uses. *Molecules*, 20(10), 18095-18106.
- Del Carmen Recio, M., Giner, R. M., Manez, S., Gueho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K., Rios, J. L. (1995). Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Medica*, 61(01), 9-12.
- Dennis, R., Dezelak, C., Grime, J. (1987). Studies on *Symphytum* species-HPLC determination of allantoin. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 57(6), 267.

- Dias, J. V., Cutillas, V., Lozano, A., Pizzutti, I. R., Fernández-Alba, A. R. (2016). Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *Journal of Chromatography A*, 1462, 8-18.
- Dias, J. L., Mazzutti, S., de Souza, J. A., Ferreira, S. R., Soares, L. A., Stragevitch, L., Danielski, L. (2019). Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 145, 10-18.
- Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2005). LC-MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(7), 645-657.
- Díaz-de-Cerio, E., Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2016). Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *Journal of Functional Foods*, 22, 376-388.
- Ding, F., Deng, H., Du, Y., Shi, X., Wang, Q. (2014). Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale*, 6(16), 9477-9493.
- Dogra, N. K., Kumar, S., Thakur, K., Kumar, D. (2018). Antipsoriatic effect of fatty acid enriched fraction of *Vernonia anthelmintica* Willd. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 85-90.
- Duan, M., Shang, H., Chen, S., Li, R., Wu, H. (2018). Physicochemical properties and activities of comfrey polysaccharides extracted by different techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 876-882.
- Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., Paola Germanò, M., Rapisarda, A., Mondello, L. (2009). Characterization of the polyphenolic fraction of *Morus alba* leaves extracts by HPLC coupled to a hybrid IT-TOF MS system. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3627-3634.
- E Santos, D. N., de Souza, L. L., Ferreira, N. J., de Oliveira, A. L. (2015). Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 365-374.
- El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210-230.
- EMA, European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Symphytum officinale* L., radix. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/08/WC500110648.pdf
- Erşan, S., Üstündağ, Ö. G., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chemistry*, 253, 46-54.

- Espíndola-Cortés, A., Moreno-Tovar, R., Bucio, L., Gimeno, M., Ruvalcaba-Sil, J. L., Shirai, K. (2017). Hydroxyapatite crystallization in shrimp cephalothorax wastes during subcritical water treatment for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 172, 332-341.
- Espinosa-Pardo, F. A., Martínez, J., Martínez-Correa, H. A. (2014). Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 93, 2-6.
- Esteban, M. B., García, A. J., Ramos, P., Márquez, M. C. (2010). Sub-critical water hydrolysis of hog hair for amino acid production. *Bioresource technology*, 101(7), 2472-2476.
- Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., Schieber, A. (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSⁿ. *Food Chemistry*, 245, 508-517.
- Ezekiel, C. N., Sulyok, M., Frisvad, J. C., Somorin, Y. M., Warth, B., Houbraken, J., Samson, R.A., Krska, R., Odebo, A. C. (2013). Fungal and mycotoxin assessment of dried edible mushroom in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 231-236.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
- Fabrowska, J., Ibañez, E., Łęska, B., Herrero, M. (2016). Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae. *Algal Research*, 19, 237-245.
- Farag, M. A., Sakna, S. T., El-fiky, N. M., Shabana, M. M., Wessjohann, L. A. (2015). Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 119, 41-50.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R. M., Zamani, Z., Palazon, J. (2013). Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry*, 141(1), 139-146.
- Fayos, O., Savirón, M., Orduna, J., Barbero, G. F., Mallor, C., Garcés-Claver, A. (2019). Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF). *Food Chemistry*, 270, 264-272.
- Felix, C., Ubando, A., Madrazo, C., Gue, I. H., Sutanto, S., Tran-Nguyen, P. L., Go, A. W., Ju, Y. H., Culaba, A., Chang, J. S., Chen, W. H. (2019). Non-catalytic in-situ (trans) esterification of lipids in wet microalgae *Chlorella vulgaris* under subcritical conditions for the synthesis of fatty acid methyl esters. *Applied Energy*, 248, 526-537.
- Fernández-Ochoa, Á., Borrás-Linares, I., Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., González-Álvarez, I., Arráez-Román, D., Micol, V., Segura-Carretero, A. (2017). Phenolic compounds in

rosemary as potential source of bioactive compounds against colorectal cancer: *In situ* absorption and metabolism study. *Journal of Functional Foods*, 33, 202-210.

Fernandez-Perez, V., de Castro, M. L. (2000). Micelle formation for improvement of continuous subcritical water extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 902(2), 357-367.

Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., de la Ossa, E. M. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 168-175.

Figueroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. (2018). Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 105, 752-763.

Filip, S., Djarmati, Z., Lisichkov, K., Csanadi, J., Jankov, R. M. (2015). Isolation and characterization of *Maclura* (*Maclura pomifera*) extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Industrial Crops and Products*, 76, 995-1000.

Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernandez, X., Chemat, F. (2016). Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 707-717.

Fontanals, N., Barri, T., Bergström, S., Jönsson, J. Å. (2006). Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1133(1-2), 41-48.

Frank, T. C., Downey, J. R., Gupta, S. K. (1999). Quickly screen solvents for organic solids. *Chemical Engineering Progress*, 95(12), 41-61.

Fu, G., Liu, Y., Yu, S., Huang, X., Hu, Y., Chen, X., Zhang, F. (2006). Cytotoxic oxygenated triterpenoid saponins from *Symplocos chinensis*. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1680-1686.

Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J. P., Souquet, J.M., Meudec, E., Li, Y., Cole, R.B., Cheynier, V. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69(18), 3131-3138.

Gabaston, J., Leborgne, C., Valls, J., Renouf, E., Richard, T., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J. M. (2018). Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: A new green chemistry approach. *Industrial Crops and Products*, 126, 272-279.

Garcia-Mendoza, M. P., Paula, J. T., Paviani, L. C., Cabral, F. A., Martinez-Correa, H. A. (2015). Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 131-137.

- García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Influence of technological processes on phenolic compounds, organic acids, furanic derivatives, and antioxidant activity of whole-lemon powder. *Food Chemistry*, 141(2), 869-878.
- Getachew, A. T., Chun, B. S. (2017). Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: A green waste valorization approach. *Journal of Cleaner Production*, 142, 3719-3727.
- Ghafoor, K., AL-Juhaimi, F. Y., Choi, Y. H. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. *Plant Foods for Human nutrition*, 67(4), 407-414.
- Ghosh, S., Gnam, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Gozin, M., Golberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferox mediterranei*. *Bioresource Technology*, 271, 166-173.
- Giergielewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł., Namieśnik, J. (2001). Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples - some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(3), 149-165.
- Glish, G. L., Burinsky, D. J. (2008). Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(2), 161-172.
- Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F. (2006). Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionisation coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 570(1), 101-108.
- González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M. F., Bernalte, M. J., Ayuso, M. C., Rodríguez, A. B. (2010). Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 533-539.
- Górnaś, P., Rudzińska, M., Raczyk, M., Mišina, I., Soliven, A., Segliņa, D. (2016). Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) by-products: Impact of the cultivar on potential applications. *Industrial Crops and Products*, 82, 44-50.
- Grabias, B., Swiatek, L. (1998). Phenolic acids in *Symphytum officinale* L. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 8(2), 81-84.
- Greiserman, S., Epstein, M., Chemodanov, A., Steinbruch, E., Prabhu, M., Guttman, L., Jinjikhshvily, G., Shamis, O., Gozin, M., Kribus, A., Golberg, A. (2019). Co-production of monosaccharides and hydrochar from green macroalgae *Ulva* (Chlorophyta) sp. with subcritical hydrolysis and carbonization. *BioEnergy Research*, 1-14.

- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2004). PDR for Herbal Medicines. Thomson PDR, Montvale, New York.
- Gupta, M. B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K. P. (1980). Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Medica*, 39(06), 157-163.
- Ha, T. J., Lee, J. H., Lee, M. H., Lee, B. W., Kwon, H. S., Park, C. H., Shim, K.B., Kim, H.T., Baek, I.Y., Jang, D. S. (2012). Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry*, 135(3), 1397-1403.
- Haar, L., Gallagher, J. S., Kell, G. S. (1984). NBS/NRC Steam tables: Thermodynamic and transport properties and computer programs for vapor and liquid states of water in SI Units, Hemisphere Publishing Corporation, Washington DC.
- Hamburger, M., Baumann, D., Adler, S. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, 15(1), 46-54.
- Hancock, R. D., Chudek, J. A., Walker, P. G., Pont, S. D., Viola, R. (2008). Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of *Cucurbitaceae*. *Phytochemistry*, 69(9), 1850-1858.
- Hawthorne, S. B., Kubátová, A. (2002). Hot (subcritical) water extraction. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 37, 587-608.
- He, C., Du, H., Tan, C., Chen, Z., Chen, Z., Yin, F., Xu, Y., Liu, X. (2018). Semi-continuous pressurized hot water extraction of black tea. *Journal of Food Engineering*, 227, 30-41.
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7511-7520.
- Hidalgo, F. J., Nogales, F., Zamora, R. (2005). Changes produced in the antioxidative activity of phospholipids as a consequence of their oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 659-662.
- Hooman, N., Mojab, F., Nickavar, B., Pouryousefi-Kermani, P. (2009). Diuretic effect of powdered *Cerasus avium* (cherry) tails on healthy volunteers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 381-383.
- Horikawa, K., Hiramata, T., Shimura, H., Jitsuyama, Y., Suzuki, T. (2019). Visualization of soluble carbohydrate distribution in apple fruit flesh utilizing MALDI-TOF MS imaging. *Plant Science*, 278, 107-112.
- Hornstra, G. (1999). Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Lipid/Fett*, 101(12), 456-466.

- Huang, R., Cheng, J., Qiu, Y., Zhang, Z., Zhou, J., Cen, K. (2019). Solvent-free lipid extraction from microalgal biomass with subcritical water in a continuous flow reactor for acid-catalyzed biodiesel production. *Fuel*, 253, 90-94.
- Hunter, S. E., Savage, P. E. (2003). Acid-catalyzed reactions in carbon dioxide-enriched high-temperature liquid water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(2), 290-294.
- Husøy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L. H., Bjellaas, T., Rønningborg, C., Glatt, H., Alexander, J. (2008). Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3697-3702.
- Hvattum, E., Ekeberg, D. (2003). Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43-49.
- Ibañez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 375-382.
- Iličković, Z., Redžić, E., Andrejaš, F., Avdić, G., Stuhli, V. (2012). Ispitivanje mogućnosti dobijanja ulja iz čvrstog ostatka zaostalog nakon spravljanja napitka od kafe kao potencijalne sirovine za dobijanje biodizela. *Hemijska Industrija*, 66(4).
- Imran, M., Khan, H., Shah, M., Khan, R., Khan, F. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(12), 973-980.
- Iqbal, S., Younas, U., Chan, K. W., Sarfraz, R. A., Uddin, M. (2012). Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6651-6664.
- Iso, H., Sato, S., Umemura, U., Kudo, M., Koike, K., Kitamura, A., Imano, T., Okamura, Y., Naito, T., Shimamoto, T. (2002). Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke. *Stroke*, 33(8), 2086-2093.
- Isobe, Y., Arita, M., Matsueda, S., Iwamoto, R., Fujihara, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Masuda, K., Sasaki, K., Urabe, D., Inoue, M. (2012). Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10525-10534.
- Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H. (1998). Antiallergic activities of rabsosiin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(7), 1051-1056.

- Ivanović, J. (2011). Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Iwaya, T., Sasaki, M., Goto, M. (2006). Kinetic analysis for hydrothermal depolymerization of nylon 6. *Polymer Degradation and Stability*, 91(9), 1989-1995.
- Jedlinszki, N., Balázs, B., Csányi, E., Csupor, D. (2017). Penetration of lycopsamine from a comfrey ointment through human epidermis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, 1-4.
- Jeong, J., Liu, Q., Kim, S., Jo, Y., Mo, E., Yang, H., Song, D., Hwang, B., Lee, M. (2015). Characterization of melanogenesis inhibitory constituents of *Morus alba* leaves and optimization of extraction conditions using response surface methodology. *Molecules*, 20(5), 8730-8741.
- Jesus, F., Gonçalves, A. C., Alves, G., Silva, L. R. (2019). Exploring the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and anti-hemolytic potential of *Prunus avium* vegetal parts. *Food Research International*, 116, 600-610.
- Jimenez-Ramos, A., Chavez-Santoscoy, R. A. (2016). Pharmaceutical formulation Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats and their hypocholesterolemic properties for the prevention of cardiovascular diseases. *The FASEB Journal*, 30, 1199-2.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Gabaldón-Hernández, J. A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2015a). RP-HPLC–ESI–QTOF/MS² based strategy for the comprehensive metabolite profiling of *Sclerocarya Birrea* (Marula) bark. *Industrial Crops and Products*, 71, 214-234.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2015b). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282-291.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS² metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 46, 78-87.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89-91.
- Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A. (2002). Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, 68(01), 88-91.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kang, K., Quitain, A. T., Daimon, H., Noda, R., Goto, N., Hu, H. Y., Fujie, K. (2001). Optimization of amino acids production from waste fish entrails by hydrolysis in sub and supercritical water. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 79(1), 65-70.
- Kayan, B., Özen, R., Gizir, A. M., Kus, N. S. (2005). Oxidation of toluenes to aromatic aldehydes with molecular oxygen in subcritical water. *Organic Preparations and Procedures International*, 37(1), 83-86.
- Khatib, M., Pieraccini, G., Innocenti, M., Melani, F., Mulinacci, N. (2016). An insight on the alkaloid content of *Capparis spinosa* L. root by HPLC-DAD-MS, MS/MS and ¹H qNMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123, 53-62.
- Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y. (2019). Evaluation of bioactive compounds extracted from Hayward kiwifruit pomace by subcritical water extraction. *Food and Bioprocess Processing*, 115, 143-153.
- Knez, Ž., Škerget, M., KnezHrnčič, M. (2013). Principles of supercritical fluid extraction and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. In *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*. Woodhead Publishing, 3-38.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Kontogianni, V. G., Gerothanassis, I. P. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Natural Product Research*, 26(2), 186-189.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120-129.
- Koprivica, M. R., Trifković, J. Đ., Dramićanin, A. M., Gašić, U. M., Akšić, M. M. F., Milojković-Opsenica, D. M. (2018). Determination of the phenolic profile of peach (*Prunus persica* L.) kernels using UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS technique. *European Food Research and Technology*, 244(11), 2051-2064.
- Korzenski, M. B., Kolis, J. W. (1997). Diels-Alder reactions using supercritical water as an aqueous solvent medium. *Tetrahedron Letters*, 38(32), 5611-5614.

- Koyu, H., Kazan, A., Ozturk, T. K., Yesil-Celiktas, O., Haznedaroglu, M. Z. (2017). Optimizing subcritical water extraction of *Morus nigra* L. fruits for maximization of tyrosinase inhibitory activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 127, 15-22.
- Krammer, P., Vogel, H. (2000). Hydrolysis of esters in subcritical and supercritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 16(3), 189-206.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A.E., Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88.
- Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396-412.
- Krueger, C. G., Vestling, M. M., Reed, J. D. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 538-543.
- Kumar, V., Rani, A., Dixit, A. K., Bhatnagar, D., Chauhan, G. S. (2009). Relative changes in tocopherols, isoflavones, total phenolic content, and antioxidative activity in soybean seeds at different reproductive stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2705-2710.
- Kumar, M. Y., Dutta, R., Prasad, D., Misra, K. (2011). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(3), 1309-1316.
- Leonarduzzi, G., Arkan, M. C., Başağa, H., Chiarpotto, E., Sevanian, A., Poli, G. (2000). Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1370-1378.
- Lesutis, H. P., Gläser, R., Liotta, C. L., Eckert, C. A. (1999). Acid/base-catalyzed ester hydrolysis in near-critical water. *Chemical Communications*, (20), 2063-2064.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 731-737.
- Liang, X., Fan, Q. (2013). Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 1(05), 1-6.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 399-410.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.

- Lindquist, E., Yang, Y. (2011). Degradation of benzoic acid and its derivatives in subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1218(15), 2146-2152.
- Liu, A. H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y. H., Sun, J. H., Xu, M., Guo, D. A. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161(1-2), 170-182.
- Liu, J., Sandahl, M., Sjöberg, P. J., Turner, C. (2014). Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(2), 441-445.
- Liu, M., He, M., Gao, H., Guo, S., Jia, J., Ouyang, H., Feng, Y., Yang, S. (2019). Strategy for rapid screening of antioxidant and anti-inflammatory active ingredients in *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and characteristic ion filtration. *Biomedical Chromatography*, e4635.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Švarc-Gajić, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *Journal of Functional Foods*, 18, 1167-1178.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Pasini, F., Caboni, M. F., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 505-513.
- Lu, Y., Foo, L. Y. (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 51(1), 91-94.
- Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., Martínez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1-10.
- Maciel-Silva, F. W., Mussatto, S. I., Forster-Carneiro, T. (2019). Integration of subcritical water pretreatment and anaerobic digestion technologies for valorization of açai processing industries residues. *Journal of Cleaner Production*, 228, 1131-1142.
- Mahla, H. R., Rathore, S. S., Venkatesan, K., Sharma, R. (2018). Analysis of fatty acid methyl esters and oxidative stability of seed purpose watermelon (*Citrullus lanatus*) genotypes for edible oil. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1552-1561.
- Mahmoud, S. S., Croteau, R. B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(8), 366-373.

- Mani, S., Jaya, S., Vadivambal, R. (2007). Optimization of solvent extraction of Moringa (*Moringa oleifera*) seed kernel oil using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 85(4), 328-335.
- Martin-Arjol, I., Bassas-Galia, M., Bermudo, E., Garcia, F., Manresa, A. (2010). Identification of oxylipins with antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(4-5), 341-346.
- Mašković, P., Veličković, V., Mitić, M., Đurović, S., Zeković, Z., Radojković, M., Cvetanović, J., Švarc-Gajić, J., Vujić, J. (2017). Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity. *Industrial Crops and Products*, 109, 875-881.
- Mathis, J. A., McCord, B. R. (2005). Mobile phase influence on electrospray ionization for the analysis of smokeless powders by gradient reversed phase high-performance liquid chromatography-ESIMS. *Forensic Science International*, 154(2-3), 159-166.
- Mayne, S. T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10(7), 690-701.
- Mazzarino, M., de la Torre, X., Botrè, F. (2008). A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(4), 681-698.
- Mei, N., Guo, L., Fu, P. P., Fuscoe, J. C., Luan, Y., Chen, T. (2010). Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 13(7-8), 509-526.
- Mekky, R. H., del Mar Contreras, M., El-Gindi, M. R., Abdel-Monem, A. R., Abdel-Sattar, E., Segura-Carretero, A. (2015). Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *RSC Advances*, 5(23), 17751-17767.
- Melguizo-Melguizo, D., Diaz-de-Cerio, E., Quirantes-Piné, R., Švarc-Gajić, J., Segura-Carretero, A. (2014). The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 10, 192-200.
- Memon, A. A., Memon, N., Luthria, D. L., Bhangar, M. I., Pitafi, A. A. (2010). Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1), 25-32.
- Mena, P., Sánchez-Salcedo, E. M., Tassotti, M., Martínez, J. J., Hernández, F., Del Rio, D. (2016). Phytochemical evaluation of eight white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry

clones grown in Spain based on UHPLC-ESI-MSⁿ metabolomic profiles. *Food Research International*, 89, 1116-1122.

Mihara, R., Mitsunaga, T., Fukui, Y., Nakai, M., Yamaji, N., Shibata, H. (2004). A novel acylated quercetin tetraglycoside from oolong tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Tetrahedron Letters*, 45(26), 5077-5080.

Miranda, M. A., Vieira, G. D. V., Alves, M. S., Yamamoto, C. H., de Sousa, O. V. (2010). Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. *HU Revista*, 36(1), 61-68.

Mitrović, M. (1982). Usporedna proučavanja agrobioloških i pomološko-tehnoloških osobina nekih sorti trešanja u ekološkim uslovima Čačka. Magistarski rad, Sveučilište u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Morales, F. J. (2008). Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. *Process-induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*, 135-174.

Moras, B., Rey, S., Vilarem, G., Pontalier, P. Y. (2017). Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and soybean protein isolate. *Food Chemistry*, 214, 9-15.

Moreau, R. A., Powell, M. J., Singh, V. (2003). Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1063-1067.

Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70, 35-61.

Moreira, M. M., Barroso, M. F., Porto, J. V., Ramalhosa, M. J., Švarc-Gajić, J., Estevinho, L., Morais, S., Delerue-Matos, C. (2018). Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, 634, 831-842.

Moreschi, S. R. M., Leal, J. C., Braga, M. E. M., Meireles, M. A. A. (2006). Ginger and turmeric starches hydrolysis using subcritical water+CO₂: the effect of the SFE pre-treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(2), 235-242.

Mottahedin, P., Haghghi Asl, A., Khajenoori, M. (2017). Extraction of curcumin and essential oil from *Curcuma longa* L. by subcritical water via response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13095.

Muharja, M., Junianti, F., Ranggina, D., Nurtono, T., Widjaja, A. (2018). An integrated green process: subcritical water, enzymatic hydrolysis, and fermentation, for biohydrogen production from coconut husk. *Bioresource Technology*, 249, 268-275.

- Mukherjee, P. K., Saha, K., Das, J., Pal, M., Saha, B. P. (1997). Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. *Planta Medica*, 63(04), 367-369.
- Mundt, S., Kreitlow, S., Jansen, R. (2003). Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 263-267.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18.
- Nakagawa, T., Goto, M. (2015). Recycling thermosetting polyester resin into functional polymer using subcritical water. *Polymer Degradation and Stability*, 115, 16-23.
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue-Matos, C., Barroso, M. F., Soares, C., Moreira, M. M., Morais, S., Mašković, P., Srček, V.G., Slivac, I., Radošević, K. (2018). Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 111, 579-589.
- Nematallah, K. A., Ayoub, N. A., Abdelsattar, E., Meselhy, M. R., Elmazar, M. M., El-Khatib, A. H., Linscheid, M.W., Hathout, R.M., Godugu, K., Adel, A., Mousa, S. A. (2018). Polyphenols LC-MS² profile of Ajwa date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) and their microemulsion: Potential impact on hepatic fibrosis. *Journal of Functional Foods*, 49, 401-411.
- Nicoletti, I., De Rossi, A., Giovinazzo, G., Corradini, D. (2007). Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3304-3311.
- Nordhoff, E., Schürenberg, M., Thiele, G., Lübbert, C., Kloeppe, K. D., Theiss, D., Lebrach, H., Gobom, J. (2003). Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports. *International Journal of Mass Spectrometry*, 226(1), 163-180.
- Norsyabilah, R., Hanim, S. S., Norsuhaila, M. H., Noraishah, A. K., Siti, K. (2013). Subcritical water extraction of monosaccharides from oil palm fronds hemicelluloses. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 17, 272-275.
- Obied, H. K., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.
- Okajima, I., Yamada, K., Sugeta, T., Sako, T. (2002). Decomposition of epoxy resin and recycling of CFRP with sub- and supercritical water. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 28(5), 553-558.
- Okajima, I., Watanabe, K., Haramiishi, S., Nakamura, M., Shimamura, Y., Sako, T. (2017). Recycling of carbon fiber reinforced plastic containing amine-cured epoxy resin using supercritical and subcritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 44-51.

- Okajima, I., Okamoto, H., Sako, T. (2019). Recycling of aramid fiber using subcritical and supercritical water. *Polymer Degradation and Stability*, 162, 22-28.
- Olszewska, M. A., Kwapisz, A. (2011). Metabolite profiling and antioxidant activity of *Prunus padus* L. flowers and leaves. *Natural Product Research*, 25(12), 1115-1131.
- Orehov, A. N., Panossian, A. G. (1994). Trihydroxyoctadecadienoic acids exhibit antiatherosclerotic and antiatherogenic activity. *Phytomedicine*, 1(2), 123-126.
- Otero, P., Quintana, S. E., Reglero, G., Fornari, T., García-Risco, M. R. (2018). Pressurized liquid extraction (PLE) as an innovative green technology for the effective enrichment of Galician algae extracts with high quality fatty acids and antimicrobial and antioxidant properties. *Marine Drugs*, 16(5), 156.
- Ozel, M. Z., Gogus, F., Lewis, A. C. (2003). Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, 82(3), 381-386.
- Ozen, R., Aydin, F. (2006). Oxidation of thiols to disulfides with molecular oxygen in subcritical water. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 137(3), 307-310.
- Ozen, R., Kus, N. S. (2006). Oxidation of alcohols to carbonyl compounds, benzylic carbons to their ketones, and arenes to their quinones with molecular oxygen in subcritical water. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 137(12), 1597-1600.
- Pacifico, S., Di Maro, A., Petriccione, M., Galasso, S., Piccolella, S., Di Giuseppe, A. M., Scortichini, M., Monaco, P. (2014). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from Campania Region. *Food Research International*, 64, 188-199.
- Padilha, M. M., Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, M. J., Soncini, R., dos Santos, M. H., Alves-da-Silva, G., Giusti-Paiva, A. (2010). Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1496-1500.
- Park, H. S., Park, K. I., Lee, D. H., Kang, S. R., Nagappan, A., Kim, J. A., Lee, W.S., Shin, S.C., Hah, Y.S., Kim, G. S. (2012). Polyphenolic extract isolated from Korean *Lonicera japonica* Thunb. induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells: involvements of PI3K/Akt and MAPKs. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2407-2416.
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., Benvenuti, S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 934-948.
- Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L. (2012). Analysis of proanthocyanidins in almond blanch water by HPLC-ESI-QqQ-MS/MS and MALDI-TOF/TOF MS. *Food Research International*, 49(2), 798-806.

- Pérez-Trujillo, M., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Parella, T. (2010). Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea Europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9129-9136.
- Petry-Podgórska, I., Žídková, J., Flodrová, D., Bobálová, J. (2010). 2D-HPLC and MALDI-TOF/TOF analysis of barley proteins glycosylated during brewing. *Journal of Chromatography B*, 878(30), 3143-3148.
- Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S., Berset, C. (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51(4), 709-716.
- Pharmacopoea Jugoslavica, Editio Quarta (Ph. Jug. IV), vol. 1, Savezni zavod za zaštitu zdravlja, Beograd, Jugoslavija, 1984.
- Pichersky, E., Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 237-243.
- Pimentel-Moral, S., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Arráez-Román, D., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A. (2018). Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156, 313-322.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F. (2014). An improved ultrasound Clevenger for extraction of essential oils. *Food Analytical Methods*, 7(1), 9-12.
- Plaza, M., Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39-54.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M. D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341-2348.
- Pongmalai, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., Soponronnarit, S. (2015). Enhancement of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from cabbage outer leaves via the application of ultrasonic pretreatment. *Separation and Purification Technology*, 144, 37-45.
- Ponphaiboon, J., Limmatvapirat, S., Chaidedgumjorn, A., Limmatvapirat, C. (2018). Physicochemical property, fatty acid composition, and antioxidant activity of ostrich oils using different rendering methods. *LWT-Food Science and Technology*, 93, 45-50.
- Prado, J. M., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M. A., Follegatti-Romero, L. A., Maugeri Filho, F., Meireles, M. A. A. (2014). Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 89, 89-98.

- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E., Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1), 53-67.
- Priya, M. V., Sabitha, M., Jayakumar, R. (2016). Colloidal chitin nanogels: A plethora of applications under one shell. *Carbohydrate Polymers*, 136, 609-617.
- Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Radojković, M., Zeković, Z., Mašković, P., Vidović, S., Mandić, A., Mišan, A., Đurović, S. (2016). Biological activities and chemical composition of *Morus leaves* extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 117, 50-58.
- Radovanović, B. C., Anđelković, S. M., Radovanović, A. B., Anđelković, M. Z. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5), 813-819.
- Radulović, N., Dekić, M., Stojanović-Radić Z., Palić, R. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (*Geraniaceae*). *Turkish Journal of Chemistry*, 35(3), 499-512.
- Ravber, M., Knez, Ž., Škerget, M. (2015). Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food Chemistry*, 166, 316-323.
- Ray, J. A., Kushnir, M. M., Yost, R. A., Rockwood, A. L., Meikle, A. W. (2015). Performance enhancement in the measurement of 5 endogenous steroids by LC-MS/MS combined with differential ion mobility spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 438, 330-336.
- Reed, J. D., Krueger, C. G., Vestling, M. M. (2005). MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*, 66(18), 2248-2263.
- Repajić, M., Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Kušt, J., Čošić, Z., Levaj, B. (2015). Influence of cultivar and industrial processing on polyphenols in concentrated sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Technology and Biotechnology*, 53(2), 215.
- Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- Rideout, D. C., Breslow, R. (1980). Hydrophobic acceleration of Diels-Alder reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 102(26), 7816-7817.

- Rigueira, L. M., Lana, D. A., dos Santos, D. M., Pimenta, A. M., Augusti, R., Costa, L. M. (2016). Identification of metal-binding to proteins in seed samples using RF-HPLC-UV, GFAAS and MALDI-TOF-MS. *Food Chemistry*, 211, 910-915.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Señorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1560-1565.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2013). Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Research International*, 54(2), 1519-1527.
- Rodríguez-Pérez, C., Gómez-Caravaca, A. M., Guerra-Hernández, E., Cerretani, L., García-Villanova, B., Verardo, V. (2018). Comprehensive metabolite profiling of *Solanum tuberosum* L.(potato) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 112, 390-399.
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2015). Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC-MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC-ESI/MS/MS) from *Lamiaceae* Species. *Phytochemical Analysis*, 26(1), 61-71.
- Rogalinski, T., Herrmann, S., Brunner, G. (2005). Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 36(1), 49-58.
- Roman, G. P., Neagu, E., Moroceanu, V., Radu, G. L. (2008). Concentration of *Symphytum officinale* extracts with cytostatic activity by tangential flow ultrafiltration. *Roumanian Biotechnological Letters*, 13, 4008-4013.
- Rop, O., Mlček, J., Juríková, T., Valšíková, M., Sochor, J., Řezníček, V., Kramářová, D. (2010). Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. *Journals of Medicinal Plants Research*, 4(22), 2431-2437.
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Rauter, A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47, 132-138.
- Rubba, P., Iannuzzi, A. (2001). N-3 to n-6 fatty acids for managing hyperlipidemia, diabetes, hypertension and atherosclerosis: Is there evidence?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(6), 407-418.

- Sánchez-Salcedo, E. M., Tassotti, M., Del Rio, D., Hernández, F., Martínez, J. J., Mena, P. (2016). (Poly) phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach. *Food Chemistry*, 212, 250-255.
- Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J. A., Pando, C. (2009). Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(2), 167-173.
- Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F. A. (2003). On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. *Methods in Polyphenol Analysis*, 92, 127.
- Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., Skaltsa, H. (2005). Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 68(9), 1404-1407.
- Sasaki, M., Furukawa, M., Minami, K., Adschiri, T., Arai, K. (2002). Kinetics and mechanism of cellobiose hydrolysis and retro-aldol condensation in subcritical and supercritical water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(26), 6642-6649.
- Sasaki, M., Adschiri, T., Arai, K. (2003). Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. *Bioresource Technology*, 86(3), 301-304.
- Sato, T., Sekiguchi, G., Adschiri, T., Smith Jr, R. L., Arai, K. (2002). Regioselectivity of phenol alkylation in supercritical water. *Green Chemistry*, 4(5), 449-451.
- Sato, O., Arai, K., Shirai, M. (2006). Hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) and poly (ethylene 2,6-naphthalene dicarboxylate) using water at high temperature: Effect of proton on low ethylene glycol yield. *Catalysis Today*, 111(3-4), 297-301.
- Savić, V. L., Savić, S. R., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Najman, S. J., Lazarević, J. S., Đorđević, A. S. (2015). The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity. *Hemijska Industrija*, 69(1), 1-8.
- Schmitz-Eiberger, M. A., Blanke, M. M. (2012). Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 388-392.
- Serini, S., Cassano, R., Corsetto, P., Rizzo, A., Calviello, G., Trombino, S. (2018). Omega-3 PUFA loaded in resveratrol-based solid lipid nanoparticles: Physicochemical properties and antineoplastic activities in human colorectal cancer cells *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 586.

- Serra, A. T., Seabra, I. J., Braga, M. E., Bronze, M. R., de Sousa, H. C., Duarte, C. M. (2010). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 184-191.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shimanouchi, T., Ueno, S., Yang, W., Kimura, Y. (2014). Extraction of reducing sugar with antioxidative scavengers from peels of *Carya cathayensis* Sarg.: use of subcritical water. *Environmental Engineering Research*, 19(1), 41-45.
- Shrivastava, K., Tapadia, K. (2015). Ionic liquid matrix-based dispersive liquid-liquid microextraction for enhanced MALDI-MS analysis of phospholipids in soybean. *Journal of Chromatography B*, 1001, 124-130.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 560s-569s.
- Simsek Kus, N. (2012). Organic reactions in subcritical and supercritical water. *Tetrahedron*, 68, 949-958.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Singh, D., Chaudhuri, P. K. (2018). Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins. *Integrative Medicine Research*, 7(1), 33-43.
- Sirtori, C. R. (2001). Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*, 44(3), 183-193.
- Skala, D. U., Žižović, I. T., Gavrančić, S. S. (2002). Supercritical fluid extraction: Application in the food industry. *Hemijska Industrija*, 56(5), 179-190.
- Soliman, F., Shehata, A., Khaleel, A., Ezzat, S. (2002). An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. dulce*. *Molecules*, 7(2), 245-251.
- Song, W., Wang, H. J., Bucheli, P., Zhang, P. F., Wei, D. Z., Lu, Y. H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9133-9140.
- Song, H., Wu, T., Xu, D., Chu, Q., Lin, D., Zheng, X. (2016). Dietary sweet cherry anthocyanins attenuate diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice. *Nutrition*, 32(7-8), 827-833.
- Sowa, I., Paduch, R., Strzemeski, M., Zielińska, S., Rydzik-Strzemska, E., Sawicki, J., Kocjan, R., Polkowski, J., Matkowski, A., Latalski, M., Wójciak-Kosior, M. (2018). Proliferative and

antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract. *Natural Product Research*, 32(5), 605-609.

Sáyago-Ayerdi, S. G., Moreno-Hernández, C. L., Montalvo-González, E., García-Magaña, M. L., de Oca, M. M. M., Torres, J. L., Pérez-Jiménez, J. (2013). Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) as a source of hydrolyzable tannins. Analysis by MALDI-TOF/TOF MS. *Food Research international*, 51(1), 188-194.

Staiger, C. (2012). Comfrey: a clinical overview. *Phytotherapy Research*, 26(10), 1441-1448.

Stewart, M. J., Steenkamp, V. (2001). Pyrrolizidine poisoning: a neglected area in human toxicology. *Therapeutic drug monitoring*, 23(6), 698-708.

Stodůlková, E., Man, P., Kolařík, M., Flieger, M. (2010). High-performance liquid chromatography-off line mass spectrometry analysis of anthraquinones produced by *Geosmithia lavendula*. *Journal of Chromatography A*, 1217(40), 6296-6302.

Sudhakar, P., Ladha, P., Reddy, P. V. (2016). Phenotyping crop plants for physiological and biochemical trait. BS Publication, A Unit of BSP Book Pyt Ltd., India.

Sukhbaatar, B., Kim, M., Steele, P., Ingram, L. (2014). Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 101, 196-202.

Sumere, B. R., de Souza, M. C., dos Santos, M. P., Bezerra, R. M. N., da Cunha, D. T., Martinez, J., Rostagno, M. A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 151-162.

Swarup, D. P. R. C., Patra, R. C., Prakash, V., Cuthbert, R., Das, D., Avari, P., Pain, D. J., Green, R. E., Sharma, A. K., Saini, M., Das, D., Taggart, M. (2007). Safety of meloxicam to critically endangered *Gyps* vultures and other scavenging birds in India. *Animal Conservation*, 10(2), 192-198.

Švarc-Gajić, J. (2012). Sampling and sample preparation in analytical chemistry. Nova Science Publishers.

Švarc-Gajić, J., Cvetanović, A., Segura-Carretero, A., Linares, I. B., Mašković, P. (2017). Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 123, 92-100.

Švarc-Gajić, J., Clavijo, S., Suárez, R., Cvetanović, A., Cerdà, V. (2018). Simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction derivatisation and gas chromatography mass spectrometry analysis of subcritical water extracts of sweet and sour cherry stems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(7), 1943-1953.

- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 1817-1825.
- Tahirović, I., Rimpapa, Z., Cavar, S., Huseinović, S., Muradić, S., Salihović, M., Sofić, E. (2010). Content of some phenolic acids and rutin in the leaves and roots of *Symphytum officinale* L. *Planta Medica*, 76(12), P293.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1), 28-34.
- Tan, P. W., Tan, C. P., Ho, C. W. (2011). Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal*, 18(2), 557-562.
- Tanaka, M., Takamizu, A., Hoshino, M., Sasaki, M., Goto, M. (2012). Extraction of dietary fiber from *Citrus junos* peel with subcritical water. *Food and Bioprocess Processing*, 90(2), 180-186.
- Tapiero, H., Ba, G. N., Couvreur, P., Tew, K. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5), 215-222.
- Tavakoli, O., Yoshida, H. (2006). Conversion of scallop viscera wastes to valuable compounds using sub-critical water. *Green Chemistry*, 8(1), 100-106.
- Teng, F., Reis, M. G., Ma, Y., Day, L. (2018). Effects of season and industrial processes on volatile 4-alkyl-branched chain fatty acids in sheep milk. *Food Chemistry*, 260, 327-335.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100(3), 985-989.
- Termentzi, A., Zervou, M., Kokkalou, E. (2009). Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from *Sorbus domestica* fruits. *Food Chemistry*, 116(1), 371-381.
- Teuscher, E., Willuhn, G., Loew, D. (2009). *Symphyti radix* - Beinwellwurzel. In: Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 644-646.

- Tian, Y., Wang, Y., Ma, Y., Zhu, P., He, J., Lei, J. (2017). Optimization of subcritical water extraction of resveratrol from grape seeds by response surface methodology. *Applied Sciences*, 7(4), 321.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Cindrić, M., Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., Vidović, S. (2017). Subcritical water extraction of wild garlic (*Allium ursinum* L.) and process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 79-88.
- Topçu, G., Gören, A. C. (2007). Biological activity of diterpenoids isolated from Anatolian Lamiaceae plants. *Records of Natural Products*, 1(1), 1-16.
- Trautwein, E. A., Demonty, I. (2007). Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 14(5), 259-266.
- Tretter, D., Galensa, R., Feucht, W., Schmid, P. P. S. (1985). Flavanone glucosides in callus and phloem of *Prunus avium*: Identification and stimulation of their synthesis. *Physiologia Plantarum*, 65(1), 95-101.
- Trifan, A., Opitz, S. E., Josuran, R., Grubelnik, A., Esslinger, N., Peter, S., Bräme, N. Meiere, E., Wolfram, E. (2018). Is comfrey root more than toxic pyrrolizidine alkaloids? Salvianolic acids among antioxidant polyphenols in comfrey (*Symphytum officinale* L.) roots. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 178-187.
- Toubane, A., Rezzoug, S. A., Besombes, C., Daoud, K. (2017). Optimization of accelerated solvent extraction of *Carthamus Caeruleus* L. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*, 97, 620-631.
- Turgut, N. H., Mert, D. G., Kara, H., Egilmez, H. R., Arslanbas, E., Tepe, B., Gungor, H., Yilmaz, N., Tuncel, N. B. (2016). Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of D-galactose-induced aging mice. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1052-1064.
- Uddin, M. S., Ahn, H. M., Kishimura, H., Chun, B. S. (2010). Production of valued materials from squid viscera by subcritical water hydrolysis. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 675-679.
- Uematsu, M., Frank, E. U. (1980). Static dielectric constant of water and steam. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 9(4), 1291-1306.
- Uribe, E., Delgadillo, A., Giovagnoli-Vicuña, C., Quispe-Fuentes, I., Zura-Bravo, L. (2015). Extraction techniques for bioactive compounds and antioxidant capacity determination of chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-8.

- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R. M., Jáuregui, O., Estruch, R., Izquierdo-Pulido, M., Andrés-Lacueva, C. (2009). Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7258-7267.
- Usenik, V., Fabčič, J., Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 185-192.
- Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., Ibáñez, E. (2018). Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 131, 99-105.
- Vance, J. E., Vance, D. E. (2002). Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Elsevier Science, New York.
- Vega, A. J. D., Hector, R. E., Jose, L. G. J., Paola, H. C., Raúl, Á. S., Enrique, O. V. C. (2017). Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas peel. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(5), 456-465.
- Verardo, V., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Marconi, E., Fernández-Gutiérrez, A., Caboni, M. F. (2010). Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS). *Journal of Cereal Science*, 52(2), 170-176.
- Vetrova, E. V., Maksimenko, E. V., Khizrieva, S. S., Bugaeva, A. F., Borisenko, N. I., Minkin, V. I. (2017). A simple way for the preparation of natural antioxidant quercetin from rutin by subcritical water. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 8(2), 213.
- Viganó, J., Coutinho, J. P., Souza, D. S., Baroni, N. A., Godoy, H. T., Macedo, J. A., Martínez, J. (2016a). Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 110, 1-10.
- Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B., Junior, M.R.M., Martínez, J. (2016b). Sequential high-pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, 85, 51-58.
- Vivas, N., Nonier, M. F., Gaulejac, N. V. D. (2004). Structural characterization and analytical differentiation of grape seeds, skins, stems and Quebracho tannins. *Bulletin de l'OIV-Office International de la Vigne et du Vin*, 77(883-884), 643-660.
- Volpato, G. T., Calderon, I. D. M. P., Sinzato, S., Campos, K. E. D., Rudge, M. V. C., Damasceno, D. C. (2011). Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3), 691-696.

- Vučinić, S. (2012). Proteomski pristup istraživanju molekularnih mehanizama razvoja makularne degeneracije na modelu štakora *in vivo*. Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska.
- Wallach, O. (1914). Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen. Leipzig: Veit.
- Wang, J., He, Z., Wang, L., Xu, Y., Peng, Y., Liu, X. (2017). Automatic single-step quick, easy, cheap, effective, rugged and safe sample preparation devices for analysis of pesticide residues in foods. *Journal of Chromatography A*, 1521, 10-18.
- Wang, L., Luo, G., Zhang, L. F., Geng, H. X. (2018). Neuroprotective effects of epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 138, 9-14.
- Wani, A. A., Singh, P., Gul, K., Wani, M. H., Langowski, H. C. (2014). Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 86-99.
- Wei, F., Ma, L. Y., Jin, W. T., Ma, S. C., Han, G. Z., Khan, I. A., Lin, R. C. (2004). Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52(10), 1246-1248.
- Williams, K. C. (2006). Subcritical water and chemical pretreatments of cotton stalk for the production of ethanol. Master's thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
- Wolf, R., Wolf, D., Ruocco, V. (1998). Vitamin E: the radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 10(2), 103-117.
- Wu, Q. L., Wang, M., Simon, J. E., Yu, S. C., Xiao, P. G., Ho, C. T. (2003). Studies on the chemical constituents of loquat leaves (*Eriobotrya japonica*). In: *Oriental foods and herbs: chemistry and health effects* (C.T. Ho, J.K. Lin, Q.Y. Zheng, eds.), Culinary and Hospitality Industry Publication Services, Weimar, TX, 292-306.
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646.
- Yan, S., Liang, Y., Zhang, J., Chen, Z., Liu, C. M. (2015). Autoxidated linolenic acid inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* via oxylipin species. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 229-237.
- Yan, L., Cao, Y., Zheng, G. (2017). Optimization of subcritical water extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel by response surface methodology. *Analytical Methods*, 9(32), 4647-4656.

- Yang, X. W., Zhao, J., Cui, Y. X., Liu, X. H., Ma, C. M., Hattori, M., Zhang, L. H. (1999). Anti-HIV-1 protease triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Journal of Natural Products*, 62(11), 1510-1513.
- Yang, C., Xu, Y. R., Yao, W. X. (2002). Extraction of pharmaceutical components from Ginkgo biloba leaves using supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 846-849.
- Yang, Z., Piironen, V., Lampi, A. M. (2019). Epoxy and hydroxy fatty acids as non-volatile lipid oxidation products in oat. *Food Chemistry*, 295, 82-93.
- Yığıt, D., Baydas, E., Gülerüüz, M. (2009). Elemental analysis of various cherry fruits by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4), 2935-2942.
- Zachová, Z., Tříska, J., Vrchotová, N., Balík, J., Sajfrtová, M., Sovová, H. (2018). Combining high-pressure methods for extraction of stilbenes from grape cane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 142, 38-44.
- Zeeb, D. J., Nelson, B. C., Albert, K., Dalluge, J. J. (2000). Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(20), 5020-5026.
- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejcin, A., Elgndi, M. A., Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.
- Zeković, Z., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gorjanović, S., Sužnjević, D., Mašković, P., Savić, S., Radojković, M., Đurović, S. (2017). Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 108, 423-430.
- Zhang, L., Tu, Z. C., Yuan, T., Wang, H., Fu, Z. F., Wen, Q. H., Wang, X. Q. (2014). Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz. *Industrial Crops and Products*, 56, 223-230.
- Zhang, Y., Du, W., Zhang, X., Zhao, H., Wang, Y. (2017). Antioxidant activity and the potential for cholesterol-lowering of phenolic extract of *Morus alba*, *Morus multicaulis*, and *Morus laevigata* leaves from Yunnan (China). *Journal of Food Biochemistry*, 41(1), e12339.
- Zhang, H., Liu, S., Li, H., Xue, F., Han, S., Wang, L., Cheng, Y., Wang, X. (2018). Extraction of isoflavones from *Puerariae lobata* using subcritical water. *RSC Advances*, 8(40), 22652-22658.
- Zhang, J., Wen, C., Chen, M., Gu, J., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., Ma, H. (2019). Antioxidant activities of *Sagittaria sagittifolia* L. polysaccharides with subcritical water extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 172-179.

- Zhao, Y., Lu, W. J., Wang, H. T., Yang, J. L. (2009). Fermentable hexose production from corn stalks and wheat straw with combined supercritical and subcritical hydrothermal technology. *Bioresource Technology*, 100(23), 5884-5889.
- Zheng, Z. P., Cheng, K. W., Zhu, Q., Wang, X. C., Lin, Z. X., Wang, M. (2010). Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: A structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5368-5373.
- Zhong, L., Gustavsson, K. E., Oredsson, S., Głąb, B., Yilmaz, J. L., Olsson, M. E. (2016). Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI⁺-MS. *Food Chemistry*, 210, 541-550.
- Zhou, Q., Gao, Y., Xie, G. (2011). Determination of bisphenol A, 4-*n*-nonylphenol, and 4-*tert*-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. *Talanta*, 85(3), 1598-1602.
- Zhou, M. M., Che, H. X., Huang, J. Q., Zhang, T. T., Xu, J., Xue, C. H., Wang, Y. M. (2018). Comparative study of different polar groups of EPA-enriched phospholipids on ameliorating memory loss and cognitive deficiency in aged SAMP8 mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(7), 1700637.
- Zhou, D., Shi, Q., Pan, J., Liu, M., Long, Y., Ge, F. (2019). Effectively improve the quality of camellia oil by the combination of supercritical fluid extraction and molecular distillation (SFE-MD). *LWT-Food Science and Technology*, 110, 175-181.
- Zhu, J., Cole, R. B. (2000). Formation and decompositions of chloride adduct ions, $[M+Cl]^-$, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), 932-941.
- Zhu, G., Zhu, X., Xiao, Z., Zhou, R., Zhu, Y., Wan, X. (2014). Kinetics of peanut shell pyrolysis and hydrolysis in subcritical water. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 16(3), 546-556.
- Žugić, A., Đorđević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S., Tadić, V. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Industrial Crops and Products*, 52, 519-527.

7. PRILOZI

Tabela P1a. Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktima korena gaveza ($X_{sr} \pm SD$).

Identifikovana jedinjenja	Površina pikaxE+4										
	M 4	M 5	M 6	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15		
Organske kiseline											
Limunska kiselina	125±3	112±0,80	111±6	127±0,10	137±16	134±3	62±2	68±1	77±2		
Polifenolna jedinjenja i derivati											
Derivat kafene kiseline	43±0,60	47±1	43±1	66±4	61±0,70	44±0,40	0	0	0		
Kvercetin-3-maloni-glukozid izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Kvercetin-3-maloni-glukozid izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Glukozid hidoksibenzoeve kiseline	4±0,40	4±0,10	4±0,50	5±0,30	3±0,30	3±0,20	0	0	0		
Hidoksibenzoeva kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hidoksibenzoeva kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hidoksibenzoeva kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hidroksifenilacetna kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Cirismarin izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
p-kumarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Cirismarin izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dihidroksi-dimetoksi-dihidrofenantren	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dimetoksi-metilumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Kafena kiselina	3±0,01	0	0	2±0,20	0	0	0	0	0		
Salvianolna kiselina H/I	12±0,10	13±0,70	11±0,50	17±1	11±0,30	6±0,20	0	0	0		
Siringetin-3-O-glukozid	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Salvianolna kiselina B izomer 1	115±1	123±0,80	112±1	133±2	109±3,20	91±2	0	0	0		
Salvianolna kiselina B izomer 2	22±0,80	24±0,80	22±0,60	25±0,70	20±0,70	13±0,60	0	0	0		
Hidroksikumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Sagerinska kiselina	3±0,20	4±0,50	3±0,70	10±0,50	4±0,40	6±0,40	0	0	0		
Metilumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Oksirezveratrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Masne kiseline i derivati											
Azelainska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Trihidroksi-oktaadekanska kiselina izomer 1	9±0,20	11±0,90	11±0,30	14±0,30	8±0,20	23±0,40	118±2	90±5	130±12		
Trihidroksi-oktaadekanska kiselina izomer 2	2±0,10	2±0,01	2±0,10	2±0,20	2±0,01	3±0,40	7±1	7±0,40	10±3		
Trihidroksi-oktaadekadienska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	6±1	5±0,50	6±0,20		
Trihidroksi-oktaadekadienska kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	5±1	4±0,40	5±0,20		
Trihidroksi-oktaadekanska kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	2±0,01	7±0,20	5±0,40	4±0,30		
Dihidroksi-oktaadekanska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	6±0,30	3±0,40	4±0,20		
Dihidroksi-heksadekanska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	2±0,40	2±0,20	2±0,10		

Nastavak Tabele P1a.

Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	2±0,10	8±0,20	4±0,60	6±0,20
Dihidroksiheksadekanska kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	2±0,40	8±1	5±0,10	7±0,20
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	2±0,10	6±1	5±0,80	6±0,60
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 3	2±0,10	2±0,10	2±0,20	2±0,10	2±0,10	2±0,10	2±0,10	2±0,10	3±0,30	11±0,20	7±0,40	10±0,40
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 4	2±0,10	2±0,01	3±0,01	3±0,20	3±0,20	3±0,20	3±0,20	2±0,20	4±0,30	18±0,70	10±0,10	16±1,
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroperoksi-oktadekadienska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26±0,30	20±1	23±3
Hidroperoksi-oktadekadienska kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33±2	23±0,30	25±0,20
Dihidroksisteirinska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	3±0,30	6±2	3±0,50	4±0,80
Dihidroksisteirinska kiselina izomer 2	2±0,20	0	2±0,30	2±0,30	2±0,30	2±0,30	2±0,30	0	4±0,10	14±0,60	9±0,90	11±2
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	2±0,10	2±0,30	2±0,10	2±0,20	2±0,20	2±0,10	2±0,10	2±0,10	4±0,30	32±0,80	21±0,60	26±0,80
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 3	2±0,10	2±0,10	2±0,10	3±0,20	3±0,20	2±0,01	2±0,01	2±0,01	4±0,50	32±20	23±0,10	27±2
Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1	12±0,60	13±0,40	11±0,20	19±0,40	19±0,40	10±0,50	10±0,50	10±0,50	35±0,60	273±10	169±7	217±1
Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2	4±0,30	3±0,20	3±0,30	5±0,10	5±0,10	3±0,20	3±0,20	3±0,20	7±0,40	62±5	40±5	46±2
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 1	3±0,40	3±0,10	3±0,20	4±0,20	4±0,20	3±0,01	3±0,01	3±0,01	8±0,20	73±2	44±0,01	52±1
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 2	4±0,20	3±0,10	3±0,10	5±0,20	5±0,20	4±0,20	4±0,20	4±0,20	7±0,80	82±5	45±0,10	54±0,50
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 3	4±0,30	5±0,20	4±0,50	6±0,40	6±0,40	3±0,10	3±0,10	3±0,10	11±0,10	89±2	51±0,50	61±1
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 4	3±0,10	3±0,10	3±0,10	5±0,10	5±0,10	3±0,20	3±0,20	3±0,20	7±0,60	64±0,10	36±1	45±1
Ricinoleinska kiselina izomer 1	16±0,50	22±0,30	19±1	22±0,40	22±0,40	16±0,50	16±0,50	16±0,50	24±0,30	32±0,40	18±1	24±2
Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	11±0,20	94±2	60±2	71±1
Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 4	0	0	0	0	0	0	0	0	13±0,40	123±2	73±3	84±0,30
Hidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 5	0	0	0	0	0	0	0	0	3±0,40	32±0,40	17±2	20±0,70
Ricinoleinska kiselina izomer 2	0	0	4±0,40	0	0	0	0	0	6±0,20	38±2	22±1	25±0,50
Linolenska kiselina izomer 1	3±0,10	3±0,40	3±0,20	4±0,20	4±0,20	3±0,10	3±0,10	3±0,10	9±0,80	83±1	58±3	67±3
Linolenska kiselina izomer 2	12±0,40	12±0,10	8±0,20	19±0,20	19±0,20	11±0,10	11±0,10	11±0,10	42±0,70	368±2	279±6	306±8
Palmitolenska kiselina	3±0,20	3±0,20	4±0,20	7±0,20	7±0,20	4±0,30	4±0,30	4±0,30	10±0,90	145±0,30	81±0,80	98±0,30
Linolna kiselina	37±2	31±0,10	28±0,50	58±2	58±2	39±2	39±2	39±2	132±3	668±5	556±47	561±28
Druga bioaktivna jedinjenja												
Acetil-monometil-trihidroksi antrahinon	18±1	19±0,60	17±0,60	27±3	27±3	20±0,10	20±0,10	20±0,10	40±0,01	13±0,50	10±0,60	26±0,50
Dehidrovomifolol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Di-terc-butil-hidrokinon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Di-terc-butil-fenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela P.Ib. Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktima korena gaveza ($X_{sr} \pm SD$).

Identifikovana jedinjenja	Površina pikaxE+4													
	ASE 1	ASE 2	ASE 3	ASE 4	ASE 5	ASE 6	ASE 7	ASE 8	ASE 9	SFE 1	SFE 2	SFE 3	SFE 4	SWE 11
<i>Organske kiseline</i>														
Limunska kiselina	93±0,3	125±11	93±0,50	69±0,30	95±8	104±4	116±9	75±0,80	97±1	64±0,50	68±1	88±2	71±2	41±4
<i>Polifenolna jedinjenja i derivati</i>														
Derivat kafene kiseline	48±0,10	114±14	26±0,80	33±1	31±1	44±0,90	13±0,80	10±0,20	4±0,20	0	0	0	0	15±2
Kvercetin-3-malonilglukozid izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41±4
Kvercetin-3-malonilglukozid izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17±0,60
Glukozid hidroksibenzoeve kiseline	0	8±0,10	3±0,20	3±0,10	8±0,10	2±0,10	2±0,10	3±0,01	1±0,10	0	0	0	0	0
Hidroksibenzoeva kiselina izomer 1	0	0	0	0	2±0,10	0	3±0,10	2±0,60	0	0	0	0	0	44±4
Hidroksibenzoeva kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60±8
Hidroksibenzoeva kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11±0,20
Hidroksifenilacetatna kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18±4
Cisrmaritin izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25±2
p-kumarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36±2
Cisrmaritin izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34±5
Dihidroksi-dimetoksi-dihidrofenantren	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21±2
Dimetoksi-metilikumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30±4
Kafena kiselina	0	3±0,01	1±0,10	0	3±0,20	1±0,10	0	0	0	0	0	0	0	83±6
Salvianolna kiselina H/I	23±0,90	37±2	13±0,80	5±0,20	6±0,20	5±0,90	0	0	0	0	0	0	0	0
Siringetin-3-O-glukozid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	204±2
Salvianolna kiselina B izomer 1	163±6	169±0,20	107±2	79±2	30±2	125±4	44±0,90	40±0,80	7±0,40	0	0	0	0	45±1
Salvianolna kiselina B izomer 2	29±7	38±0,30	16±0,50	12±0,60	8±0,60	24±0,60	6±0,10	5±0,10	0	0	0	0	0	0
Hidroksikumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28±2
Sagerinska kiselina	14±0,01	75±8	4±0,60	2±0,10	94±7	6±0,10	1±0,30	0	0	0	0	0	0	0
Metilikumarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13±1
Oksirezveratrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14±2

Nastavak Tabele P1b.

<i>Masne kiseline i derivati</i>																
Azelajska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4±0,20	4±0,50	4±0,10	3±0,30	0
Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 1	12±0,30	83±0,10	6±1	4±0,01	130±5	9±1	8±0,10	5±0,10	6±0,30	212±3	224±5	172±13	224±5	172±13	129±18	0
Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 2	2±0,30	9±0,20	2±0,10	0	14±0,50	2±0,10	2±0,10	0	0	23±2	20±3	14±0,01	20±3	14±0,01	13±0,20	0
Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	0	4±0,30	0	0	6±0,10	0	0	0	0	14±1	11±0,80	9±0,20	11±0,80	9±0,20	8±0,30	0
Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	0	3±0,50	0	0	5±0,50	0	0	0	0	11±0,40	9±0,70	8±0,30	9±0,70	8±0,30	7±0,30	0
Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 3	0	4±0,01	0	0	6±0,30	0	0	0	0	12±0,30	15±1	7±0,20	15±1	7±0,20	7±0,30	12±2,4
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 1	0	3±0,10	0	0	4±0,10	0	0	0	0	15±0,70	9±0,20	8±0,01	9±0,20	8±0,01	9±0,10	0
Dihidroksihexadekansk a kiselina izomer 1	0	2±0,20	0	0	3±0,01	0	0	0	0	11±0,60	7±0,50	5±0,10	7±0,50	5±0,10	6±0,01	0
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 2	0	4±0,50	0	0	5±0,50	0	0	0	0	30±0,60	12±0,50	11±1	12±0,50	11±1	12±1	0
Dihidroksihexadekansk a kiselina izomer 2	2±0,01	6±0,10	0	0	9±0,10	0	0	0	0	31±0,90	19±0,20	15±0,90	19±0,20	15±0,90	17±1	0
Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1	0	4±0,20	0	0	5±0,10	0	0	0	0	15±1,30	9±0,50	8±0,60	9±0,50	8±0,60	8±0,50	0
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 3	2±0,10	7±0,40	0	0	12±0,40	1±0,10	2±0,10	0	0	30±0,40	21±0,70	16±1	21±0,70	16±1	16±0,50	0
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 4	3±0,01	11±0,50	0	0	18±0,50	2±0,10	3±0,10	0	0	43±0,10	30±0,30	22±1	30±0,30	22±1	24±0,50	0
Dihidroksi-oktadekanska kiselina izomer 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8±0,1
Hidroperoksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	2±0,01	7±0,30	0	0	11±0,10	0	0	0	0	27±0,30	17±2	14±0,20	17±2	14±0,20	19±0,40	0
Hidroperoksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	2±0,20	10±0,10	0	0	16±1	0	0	0	0	47±0,50	25±3	20±0,60	25±3	20±0,60	25±1	0
Dihidroksisteirinska kiselina izomer 1	0	4±0,10	0	0	11±0,60	0	4±0,30	0	3±0,10	62±0,50	36±4	31±1	36±4	31±1	35±3	0
Dihidroksisteirinska kiselina izomer 2	3±0,01	9±0,90	0	0	14±0,60	2±0,10	4±0,10	0	3±0,30	57±0,50	34±0,50	24±2	34±0,50	24±2	32±3	0
Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 2	2±0,10	10±0,30	0	0	22±0,10	0	0	0	0	56±2	30±0,80	21±0,10	30±0,80	21±0,10	35±2	0

Nastavak Tabele P1b.

Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 3	2±0,10	11±1	0	0	17±0,70	0	0	0	0	51±3	28±3	22±0,90	30±0,30	0
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	15±0,90	84±10	0	0	131±7	6±0,20	6±0,20	0	0	333±3	196±7	155±3	196±15	0
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	4±0,20	18±2	0	0	28±1	2±0,10	2±0,10	0	0	69±0,80	39±0,10	33±0,40	42±4	0
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 1	4±0,10	19±1	0	0	34±0,10	2±0,10	2±0,10	0	0	82±0,90	48±3	34±0,50	54±0,90	0
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 2	4±0,20	23±1	0	0	41±0,30	2±0,30	2±0,30	0	4±0,20	108±0,20	61±4	49±3	70±0,30	0
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 3	5±0,20	27±1	0	0	44±2	3±0,20	3±0,20	0	0	122±2	66±3	52±4	79±0,70	0
Okso-oktadekadienska kiselina izomer 4	4±0,50	24±2	0	0	41±3	2±0,10	2±0,10	0	3±0,10	114±3	64±6	54±0,40	75±3	0
Ricinoleinska kiselina izomer 1	0	10±0,90	2±0,01	0	15±1	3±0,20	3±0,10	0	22±0,70	64±2	32±2	28±2	37±4	0
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 3	0	27±4	0	0	42±2	0	6±0,20	0	0	228±0,40	101±3	96±7	140±9	0
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 4	6±0,10	33±4	0	0	56±3	0	6±0,20	0	0	254±3	125±6	103±3	146±12	0
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 5	2±0,20	9±0,50	0	0	16±0,40	0	3±0,20	0	0	94±0,50	45±1	35±4	53±3	0
Ricinoleinska kiselina izomer 2	3±0,01	10±0,80	0	0	16±0,70	1±0,10	3±0,20	0	0	77±2	35±3	25±0,40	42±4	0
Linolenska kiselina izomer 1	9±0,3	179±0,20	0	0	35±3	2±0,40	4±0,10	0	3±0,20	90±0,40	48±3	34±0,80	40±5	0
Linolenska kiselina izomer 2	13±0,90	87±0,10	0	0	152±11	6±0,80	14±0,90	0	6±0,10	305±4	164±8	125±4	171±15	0
Palmitoleinska kiselina	5±0,10	34±2	2±0,01	2±0,01	63±4	3±0,10	6±0,20	0	3±0,10	212±3	89±3	63±4	109±3	0
Linolna kiselina	44±3,10	253±20	3±0,01	3±0,01	379±36	21±0,90	47±0,80	5±0,01	18±0,40	595±9	402±0,70	320±2	397±39	0
Druga bioaktivna jedinjenja														
Acetil-monometil- trihidroksi antrahinon	29±2,10	114±12	17±0,10	25±1	199±3	35±2	32±3	16±2	34±0,40	0	4±0,20	4±0,30	0	17±1
Dehidrovomifolol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18±1
Di-terc-butil-hidrokinon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103±4
Di-terc-butil-fenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	187±5

Tabela P2. Statistička analiza (ANOVA) sadržaja identifikovanih jedinjenja u ekstraktima korena gaveza dobijenih primenom dve ili više ekstrakcionih tehnika pri najboljim ekstrakcionim uslovima.

Organske kiseline		Polifenolna jedinjenja i derivati													
Limunska kiselina	Derivat kafeine kiseline	Glukozid hidrokisbenzoeve kiseline		Hidroksibenzoeva kiselina izomer 1	Kafena kiselina	Salvianolna kiselina H/I	Salvianolna kiselina B izomer 1	Masne kiseline i derivati							
		Azelaínska kiselina	Sagerínska kiselina					Azelaínska kiselina	Sagerínska kiselina	Azelaínska kiselina					
M 11	ASE 2 0	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 2 1
ASE 2	SFE 3 1	SWE 11	M 10 1		SWE 11	M 10 1	SWE 11	M 10 1		SWE 11	M 10 1				
SFE 3	M 11 1	SWE 11	ASE 2 1		SWE 11	ASE 2 1				SWE 11	ASE 2 1				
SWE 11	M 11 1				SWE 11	ASE 2 1				SWE 11	ASE 2 1				
SWE 11	ASE 2 1														
SWE 11	SFE 3 1														
Masne kiseline i derivati															
Salvianolna kiselina B izomer 2	Sagerínska kiselina	Azelaínska kiselina		Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 1	Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 2	Trihidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	Trihidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 2							
		Azelaínska kiselina	Sagerínska kiselina												
M 10	ASE 2 1	M 10	ASE 5 1	M 5	SFE 2 1	M 15	ASE 5 0	M 15	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0
				ASE 5	SFE 2 1	ASE 5	SFE 2 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1
				SFE 2	M 15 1	SFE 1	M 15 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1
Masne kiseline i derivati															
Trihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 3	Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 1	Dihidroksiheksadekan ska kiselina izomer 1	Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 2	Dihidroksiheksadekan ska kiselina izomer 2	Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1	Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 3									
							Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 1	Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 2							
M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 1	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0	M 13	ASE 5 0
ASE 5	SFE 2 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1	ASE 5	SFE 1 1
SFE 2	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1	SFE 1	M 13 1
SWE 11	M 13 0														
SWE 11	ASE 5 0														
SWE 11	SFE 2 1														

Nastavak Tabele P2.

Dihidroksi- oktadekanska kiselina izomer 4	Hidropoksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	Hidropoksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	Dihidroksistearina kiselina izomer 1	Dihidroksistearina kiselina izomer 2	Hidropoksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	Hidropoksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	Hidropoksi- oktadekadienska kiselina izomer 3
M13 ASE 5 0 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 0 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 1	Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 2	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 1	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 2	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 3	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 4	Okso-oktadekadienska kiselina izomer 4	Ricinoleinska kiselina izomer 1
M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13
Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 3	Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 4	Hidroksi- oktadekadienska kiselina izomer 5	Ricinoleinska kiselina izomer 2	Linolenska kiselina izomer 1	Linolenska kiselina izomer 2	Linolenska kiselina izomer 2	Palmitoleinska kiselina
M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13
Ostala bioaktivna jedinjenja							
Acetil-monometil- trihidroksi antrahinon							
M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13
Linolna kiselina							
M13 ASE 5 1 M13 ASE 5 1	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13	ASE 5 SFE 1 M13
SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13	SFE 1 M13
1 – statistički značajna razlika; 0 – statistički beznačajna razlika							

Tabela P3a. Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktu lista crnog duda ($\bar{X}_{st} \pm SD$).

Identifikovana jedinjenja	Površina pika x E+4										
	M 10	M 11	M 12	M 16	M 17	M 18	M 25	M 26	M 27		
Organske kiseline i derivati vitamina											
Kiminska kiselina	41±0,40	54±3	63±2	41±2	35±0,80	47±3	59±2	48±1	65±8		
Limunska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Glukozid askorbinske kiseline	5±0,20	10±0,20	9±0,40	8±0,01	7±0,60	9±0,01	13±0,20	10±0,60	11±0,80		
Fenolne kiseline i derivati											
Galna kiselina	215±3	240±19	259±12	416±19	400±27	396±8	274±24	261±16	298±18		
Glukozid vanilinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Glukozid protokatehinske kiseline	10±0,40	14±0,30	14±0,30	17±0,70	13±0,70	12±0,20	14±0,60	10±0,30	12±0,40		
Ramnozid vanilinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Glukozid ruzmarinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Kafena kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hlorogenska kiselina izomer 1	5±0,20	10±0,30	7±0,10	8±0,20	5±0,10	6±0,20	15±0,10	7±0,10	8±0,50		
Hlorogenska kiselina izomer 2	20±0,20	28±2	25±1	30±2	20±0,90	26±0,90	39±2	21±2	16±1		
Hlorogenska kiselina izomer 3	15±1	21±0,40	19±1	20±0,6	16±1	17±1	28±2	15±0,70	15±0,70		
Ruzmarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Flavonoidi i derivati											
Rutin izomer 1	13±0,40	18±0,50	23±2	18±1	17±0,10	27±1	20±1	17±1	22±1		
Rutin izomer 2	61±1	81±3	76±7	83±2	71±1	89±5	99±5	71±3	55±2		
Rutin izomer 3	102±0,80	135±3	165±16	158±2	126±9	228±2	199±8	142±6	115±5		
Vanilin	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Izokvercitrin	167±6	218±8	263±6	265±8	217±2	338±19	304±8	220±12	188±6		
Kuanon C	0	4±0,30	16±1	4±0,20	4±0,20	19±0,80	4±0,10	2±0,10	6±0,60		
Kvercetin di- <i>O</i> -glukozid izomer 1	30±0,40	40±2	47±5	34±3	29±1	47±2	55±2	39±2	46±3		
Kvercetin di- <i>O</i> -glukozid izomer 2	12±0,40	16±0,40	19±1	18±1	16±0,80	23±1	23±0,10	17±0,80	15±2		
Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinozid	57±0,50	69±3	62±2	78±5	62±2	77±1	82±2	57±1	48±2		
Kaempferol 3- <i>O</i> -glukozid	105±2	140±2	165±10	153±8	131±7	213±14	182±3	117±9	107±3		
Kvercetin <i>O</i> -acetilglukozid izomer 1	76±3	96±5	104±2	140±7	121±4	162±1	200±8	145±4	99±6		
Kvercetin <i>O</i> -acetilglukozid izomer 2	10±0,60	12±0,50	13±0,60	19±0,70	15±2	22±1	26±2	18±2	11±0,10		
Kaempferol-3- <i>O</i> -6'- <i>O</i> -acetil-β-D-glukopiranozid	53±2	66±3	77±6	111±7	84±4	135±5	147±5	98±6	67±11		
Druga fenolna jedinjenja											
Siringarezinol	20±0,50	25±0,40	22±1	23±2	21±2	23±0,60	21±0,20	15±0,10	21±1		
Lingerzinol	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dihidrokapitat izomer 1	13±0,30	16±0,90	15±0,80	23±2	19±1	21±0,20	17±0,80	13±0,90	19±0,30		

Nastavak Tabele P3a.

Dihidrokapstat izomer 2	6±0,10	7±0,40	6±0,10	9±0,60	7±0,20	9±0,30	7±0,50	5±0,40	8±0,70
Masne kiseline i derivati									
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1	101±4	124±8	116±6	155±11	132±4	143±10	128±3	89±4	122±8
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2	14±1	17±1	16±2	21±1	18±2	21±1	16±1	11±1	16±2
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina	16±2	22±2	25±2	25±0,80	21±2	30±1	22±0,40	15±1	22±0,80
Dihidroksiheksadekanska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 1	11±0,80	14±0,40	12±1	19±0,90	15±1	15±1	17±0,30	11±0,30	15±2
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 2	15±1	18±0,90	16±1	23±0,70	20±1	19±1	21±1	14±1	19±1
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 3	32±1	39±3	41±3	53±4	45±0,80	52±3	44±2	31±1	43±2
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 4	18±1	27±0,30	24±0,60	39±2	29±1	33±0,60	27±0,60	19±0,30	23±1
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 5	24±2	38±2	33±0,80	55±2	40±0,30	45±0,70	36±0,80	26±1	31±0,30
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	76±3	95±5	87±4	135±10	105±9	125±10	90±6	75±4	118±3
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	42±0,10	54±2	55±3	79±4	57±3	78±2	56±3	43±2	71±3
Hidroksiheksadekanska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	5±0,30	6±0,20	6±0,40	9±0,40	8±0,20	10±0,70	6±0,40	5±0,10	8±0,40
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	6±0,70	7±0,40	6±0,20	11±0,20	11±0,90	10±0,70	6±0,50	5±0,50	8±0,50
Hidroksi-oktadekadienska kiselina	41±2	53±1	68±4	64±4	57±4	92±6	43±1	33±1	56±6
Okso-oktadekadienska kiselina	5±0,10	5±0,40	7±0,40	9±0,30	7±0,40	11±0,90	5±0,40	4±0,10	65±0,90
Linolenska kiselina	243±8	293±15	250±19	546±52	484±12	338±3	160±17	127±10	272±15
Linolna kiselina	57±3	70±4	68±5	148±7	128±3	100±1	25±2	20±2	45±2
Dehidrovani proizvod dihidroperoksi-oktadekatrienske kiseline	7±0,70	9±0,20	9±1	15±1	14±0,30	14±0,40	12±0,40	10±1	13±1
Gliceroglikolipidi									
Glikolipid A	60±0,80	70±3	87±4	53±0,60	46±0,40	61±3	0	0	0
Sakranozid A	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela P3b. Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktu lista crnog duda ($X_{sF} \pm SD$).

Identifikovana jedinjenja	Površina pika x E-14													
	ASE 1	ASE 2	ASE 3	ASE 4	ASE 5	ASE 6	ASE 7	ASE 8	ASE 9	SFE 1	SFE 2	SFE 3	SFE 4	SWE 12
Organske kiseline i derivati vitamina														
Kininska kiselina	65±2	39±3	73±6	102±3	0	62±2	78±2	94±5	105±3	0	0	0	0	343±18
Limunska kiselina	0	0	8±0,30	12±0,20	0	0	0	3±0,70	0	0	0	0	0	55±7
Glukozid askorbinske kiseline	11±0,40	10±0,60	10±1	6±0,10	0	8±0,40	5±0,10	5±0,20	5±0,40	0	0	0	0	0
Fenolne kiseline i derivati														
Galna kiselina	318±13	465±31	215±11	209±4	332±26,1	221±5	348±27	199±11	233±13	467±18	470±30	483±33	526±28	136±4
Glukozid vanilinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52±1
Glukozid protokatehinske kiseline	9±0,80	12±0,01	11±0,10	9±0,60	0	9±0,60	7±1	6±0,40	5±0,20	0	0	0	0	91±3
Ramnozid vanilinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14±0,70
Glukozid ruzmarinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34±2
Kafena kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12±0,90
Hlorogenska kiselina izomer 1	5±0,30	5±0,10	4±0,20	10±0,60	0	9±0,30	3±0,10	5±0,40	4±0,20	0	0	0	0	26±1
Hlorogenska kiselina izomer 2	16±0,60	18±0,70	5±0,60	8±0,30	0	16±0,80	8±0,20	4±0,30	7±0,30	0	0	0	0	28±2
Hlorogenska kiselina izomer 3	11±0,40	14±0,60	8±0,30	16±0,30	0	20±0,60	8±0,20	9±0,40	9±0,10	0	0	0	0	32±2
Ruzmarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32±1
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26±1
Flavonoidi i derivati														
Rutin izomer 1	15±0,80	25±1	14±0,70	16±0,90	24±2,3	18±0,80	14±1	8±0,30	9±0,20	0	0	0	0	0
Rutin izomer 2	66±4	81±6	14±0,20	11±0,10	97±6,2	60±5	38±1	15±0,90	28±0,20	0	0	0	0	0
Rutin izomer 3	152±2	182±8	29±1	26±0,40	174±9,2	102±5	79±3	28±0,70	58±1	0	0	0	0	7±0,40
Vanilin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8±1
Izokvercitrin	221±8	276±4	33±2	35±2	324±24,2	197±18	146±4	49±1	103±2	0	0	0	0	0
Kuvanon C	8±0,40	6±0,80	0	0	47±1,3	14±0,10	8±0,10	0	9±0,20	0	48±2	0	28±1	0
Kvercetin di- <i>O</i> -glukozid izomer 1	37±1	45±3	26±2	35±2	26±1,1	41±7	31±0,60	18±0,30	21±1	0	0	0	0	0
Kvercetin di- <i>O</i> -glukozid izomer 2	15±1	21±2	5±0,40	0	16±1,2	12±2	9±0,40	4±0,20	6±0,40	0	0	0	0	0
Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinozid	60±2	59±1	12±0,30	9±0,50	81±3,2	52±1	30±1	12±0,20	23±0,50	0	0	0	0	5±0,60
Kaempferol 3- <i>O</i> -glukozid	140±7	130±7	26±2	23±0,80	230±4,2	130±7	76±4	30±1	59±2	0	0	0	0	6±1
Kvercetin <i>O</i> -acetylglukozid izomer 1	147±3	162±19	18±0,60	18±0,50	67±3,1	44±3	9±0,40	13±0,10	20±0,60	0	0	0	0	0
Kvercetin <i>O</i> -acetylglukozid izomer 2	16±0,70	20±0,40	0	0	31±7,3	16±2	29±0,90	6±0,30	24±1	0	0	0	0	0

Nastavak Tabele P3b.

Kaempferol-3-O-6"-O-acetil- β -D-glukopiranozid	97 \pm 5	119 \pm 6	12 \pm 0,60	10 \pm 0,20	87 \pm 2,1	28 \pm 0,50	27 \pm 1	7 \pm 0,20	11 \pm 0,60	0	0	0	0	12 \pm 0,30
Druga fenolna jedinjenja														
Siringarezinol	14 \pm 0,90	20 \pm 0,70	16 \pm 2	15 \pm 0,60	36 \pm 2,2	20 \pm 2	13 \pm 0,70	9 \pm 0,80	8 \pm 0,30	0	0	0	0	11 \pm 0,10
Lingerzanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20 \pm 3
Dihidrokapsiat izomer 1	15 \pm 0,60	10 \pm 0,60	6 \pm 0,10	4 \pm 0,10	26 \pm 1,1	12 \pm 0,10	6 \pm 0,70	4 \pm 0,30	5 \pm 0,01	22 \pm 0,20	27 \pm 2	19 \pm 0,60	23 \pm 1	0
Dihidrokapsiat izomer 2	6 \pm 0,70	4 \pm 0,20	3 \pm 0,20	0	9 \pm 1,2	5 \pm 0,30	2 \pm 0,10	0	2 \pm 0,10	12 \pm 0,10	15 \pm 0,70	12 \pm 0,30	13 \pm 0,40	0
Masne kiseline i derivati														
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1	85 \pm 1	58 \pm 4	63 \pm 0,80	46 \pm 2	170 \pm 4,3	75 \pm 3,2	42 \pm 1,2	44 \pm 3	43 \pm 2	28 \pm 3	127 \pm 6	37 \pm 2	113 \pm 6	114 \pm 7
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2	12 \pm 1	10 \pm 0,20	8 \pm 0,10	7 \pm 0,10	23 \pm 2,1	12 \pm 0,3	6 \pm 0,3	7 \pm 0,20	8 \pm 0,20	10 \pm 0,50	20 \pm 3	11 \pm 0,20	17 \pm 0,80	209 \pm 13
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15 \pm 0,30
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12 \pm 0,50
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19 \pm 0,50
Trihidroksi-oktadekanska kiselina	15 \pm 0,20	11 \pm 0,60	11 \pm 0,50	7 \pm 0,20	32 \pm 1,1	16 \pm 0,4	9 \pm 0,9	9 \pm 0,70	9 \pm 0,70	6 \pm 0,10	25 \pm 0,10	8 \pm 0,40	20 \pm 0,50	59 \pm 5
Dikihidroksiheksadekanska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19 \pm 0,50
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 1	11 \pm 0,40	7 \pm 0,60	4 \pm 0,10	3 \pm 0,10	21 \pm 3,1	12 \pm 0,8	4 \pm 0,1	2 \pm 0,10	4 \pm 0,20	9 \pm 0,70	17 \pm 1	10 \pm 0,40	15 \pm 1	12 \pm 2
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 2	14 \pm 1	10 \pm 0,40	7 \pm 0,20	4 \pm 0,10	29 \pm 2,2	15 \pm 1,1	5 \pm 0,2	3 \pm 0,10	5 \pm 0,50	11 \pm 0,80	22 \pm 2	14 \pm 0,60	20 \pm 1	9 \pm 0,40
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 3	33 \pm 0,40	20 \pm 0,30	13 \pm 1	5 \pm 0,40	53 \pm 2,4	24 \pm 2,1	8 \pm 0,4	4 \pm 0,10	9 \pm 0,70	38 \pm 2	68 \pm 5	48 \pm 1	63 \pm 4	9 \pm 1
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 4	20 \pm 0,30	18 \pm 0,30	0	0	49 \pm 4,2	24 \pm 0,6	15 \pm 0,1	7 \pm 0,30	15 \pm 0,10	0	36 \pm 2	0	39 \pm 3	12 \pm 3
Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 5	30 \pm 1	23 \pm 1	0	0	67 \pm 3,1	34 \pm 0,8	18 \pm 0,1	4 \pm 0,30	17 \pm 0,30	0	39 \pm 1	0	42 \pm 0,80	0
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	77 \pm 9	43 \pm 3	8 \pm 0,30	0	137 \pm 8,1	75 \pm 3,2	36 \pm 3,2	8 \pm 0,20	31 \pm 1	181 \pm 7	199 \pm 15	175 \pm 6	185 \pm 13	0
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	49 \pm 5	27 \pm 3	4 \pm 0,10	0	93 \pm 7,3	45 \pm 2,1	22 \pm 0,3	4 \pm 0,30	19 \pm 0,70	130 \pm 1	146 \pm 12	140 \pm 3	139 \pm 9	3 \pm 0,30
Hidroksiheksadekanska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8 \pm 0,30
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	6 \pm 0,40	4 \pm 0,50	0	0	10 \pm 0,8	6 \pm 0,0	4 \pm 0,3	0	3,6 \pm 0,60	14 \pm 0,50	19 \pm 1	19 \pm 0,70	18 \pm 1	0
Hidroperoksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	8 \pm 0,60	5 \pm 0,20	0	0	14 \pm 2,1	6 \pm 0,0	4 \pm 0,3	0	3,6 \pm 0,30	24 \pm 0,60	30 \pm 5	28 \pm 1	28 \pm 1	0

Nastavak Tabele P3b.

Hidroksi-oktadekadienska kiselina	48±0,50	25±0,90	0	0	90±5,1	43±1,3	21±1,2	2±0,10	17±0,20	111±4	150±9	160±3	137±9	0
Oksio-oktadekadienska kiselina	7±0,10	5±0,20	0	0	12±0,9	6±0,4	4±0,1	0	3±0,10	19±0,01	26±0,50	27±0,80	23±1	0
Linolenska kiselina	265±5	224±7	0	0	554±47,1	353±0,5	245±19,1	0	238±2	884±4	982±62	101±26	960±60	19±1
Linolna kiselina	70±4	58±3	0	0	183±14,1	119±2,1	81±6,2	0	90±0,90	313±1	337±30	478±35	335±19	14±1
Dehidrovani proizvod dihidroperoksi-oktadekatrienske kiseline	12±0,90	8±0,50	5±0,10	2±0,30	15±0,5	8±0,1	4±0,1	2±0,20	4±0,10	21±0,20	25±1	22±2	24±1	0
Gliceroglikolipidi														
Glikolipid A	31±2	24±3	0	0	44±3,1	28±5,1	13±0,5	5±0,0	18±0,2	0	0	0	0	31±3
Sakranozid A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30±6

Tabela P4. Statistička analiza (ANOVA) sadržaja identifikovanih jedinjenja u ekstraktima lista crnog đuda dobijenih primenom dve ili više ekstrakcionih tehnika pri najboljim ekstrakcionim uslovima.

Organske kiseline i derivati vitamina		Fenolne kiseline i derivati				
Kiminska kiselina	Limunska kiselina	Glukozyd L-askorbinske kiseline	Galna kiselina	Glukozyd protokatehinske kiseline	Hlorogenska kiselina izomer 1	Hlorogenska kiselina izomer 2
M27	ASE 9 0	SWE 12 ASE 4 1	M 16 ASE 2 0	M 16 ASE 2 0	M 25 ASE 4 1	M 25 ASE 2 0
SWE 12	M 27 1	ASE 2 SFE 4 1	SWE 12 M 16 1	SWE 12 M 16 1	SWE 12 M 25 1	SWE 12 M 25 1
SWE 12	ASE 9 1	SFE 4 M 16 1	SWE 12 M 16 1	SWE 12 ASE 2 1	SWE 12 ASE 4 1	SWE 12 ASE 2 0
		SWE 12 M 16 1				
		SWE 12 ASE 2 1				
		SWE 12 SFE 4 1				
Flavonoidi i derivati						
Hlorogenska kiselina izomer 3	Rutin izomer 1	Rutin izomer 2	Rutin izomer 3	Izokvercitrin	Kuванon C	Kvercetin di-O-glukozyd izomer 1
M 25 ASE 6 1	M 16 ASE 2 0	M 25 ASE 5 0	M 18 ASE 5 1	M 18 ASE 5 0	M 18 ASE 5 1	M 25 ASE 2 1
SWE 12 M 25 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 18 1	ASE 5 SFE 2 0	
SWE 12 ASE 6 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SFE 2 M 18 1	
Druga fenolna jedinjenja						
Kvercetin di-O-glukozyd izomer 2	Kaempferol 3-O-rutinozyd	Kaempferol 3-O-glukozyd	Kvercetin O-acetilglukozyd izomer 1	Kvercetin O-acetilglukozyd izomer 2	Kaempferol-3-O-6"-O-acetil-β-D-glukopiranozyd	Dihidrokaapsiat izomer 1
M 18 ASE 2 0	M 25 ASE 5 0	M 18 ASE 5 0	M 25 ASE 2 1	M 25 ASE 5 0	M 25 ASE 2 1	M 16 ASE 5 0
SWE 12 M 25 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 18 1	SWE 12 M 25 1	SWE 12 M 25 1	ASE 5 SFE 2 0
SWE 12 ASE 6 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 2 1	M 16 ASE 2 0
Masne kiseline i derivati						
Dihidrokaapsiat izomer 2	Siringarezinol	Glikolipid A	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 1	Trihidroksi-oktadekadienska kiselina izomer 2	Trihidroksi-oktadekanska kiselina	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 1
M 16 ASE 5 0	M 11 ASE 5 1	M 12 ASE 5 1	M 16 ASE 5 0	M 16 ASE 5 0	M 18 ASE 5 0	M 16 ASE 5 0
ASE 5 SFE 2 1	SWE 12 M 11 1	SWE 12 M 12 1	ASE 5 SFE 2 1	ASE 5 SFE 2 0	ASE 5 SFE 2 1	ASE 5 SFE 2 0
SFE 2 M 16 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SFE 2 M 16 1	SFE 2 M 16 0	SFE 2 M 18 1	SFE 2 M 16 0
			SWE 12 M 16 1	SWE 12 M 16 1	SWE 12 M 18 0	SWE 12 M 16 1
			SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 1	SWE 12 ASE 5 0	SWE 12 ASE 5 1
			SWE 12 SFE 2 1	SWE 12 SFE 2 1	SWE 12 SFE 2 1	SWE 12 SFE 2 1

Nastavak Tabele P4.

Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 2	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 3	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 4	Hidroperoksid linolenske kiseline izomer 5	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1	Hidroksi- oktadekatrienska kiselina izomer 2	Hidroperoksi- oktadekatrienska kiselina izomer 1
M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0	ASE.5 SFE.2 1 ASE.5 SFE.2 1 M 16 SFE.2 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0	ASE.5 SFE.2 1 ASE.5 SFE.4 1 ASE.5 SFE.4 1 M 16 SFE.4 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 18 ASE.5 0 M 18 ASE.5 1 M 18 ASE.5 1 M 18 ASE.5 1 M 18 ASE.5 1 M 18 ASE.5 1 M 18 ASE.5 1
M 17 ASE.5 0 M 18 ASE.5 0 M 18 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0	ASE.5 SFE.2 1 ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 M 18 SFE.3 1 M 18 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 M 18 SFE.3 1 M 18 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1
M 17 ASE.5 0 M 18 ASE.5 0 M 18 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 0	ASE.5 SFE.2 1 ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 M 18 SFE.3 1 M 18 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 ASE.5 SFE.3 1 M 18 SFE.3 1 M 18 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1	M 16 ASE.5 0 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1 M 16 ASE.5 1

1 – statistički značajna razlika; 0 – statistički beznačajna razlika

Tabela P5. Površine pikova jedinjenja identifikovanih u ekstraktima peteljki trešnje ($X_{st} \pm SD$).

Identifikovana jedinjenja	Površina pika x E+4													
	ASE 1	ASE 2	ASE 3	ASE 4	ASE 5	ASE 6	ASE 7	ASE 8	ASE 9	SFE 1	SFE 2	SFE 3	SFE 4	SWE 2
Organske kiseline														
Kininska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	221±15
Fenolne kiseline i derivati														
Galna kiselina	330±70	485±17	228±40	235±24	357±44	213±13	521±21	272±10	311±8	545±44	530±51	487±47	475±68	265±22
Glukozid protokatehinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273±8
Hlorogenska kiselina izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41±1
Hlorogenska kiselina izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22±0,60
Hlorogenska kiselina izomer 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63±1
Kafena kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19±2
Heksozid kafene kiseline	5±0,30	14±0,30	4±1	2±0,03	4±0,30	2±0,40	3±0,40	0	0	0	0	0	0	22±1
Ferulna kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39±5
<i>O</i> -heksozid <i>p</i> -kumarinske kiseline	12±2	18±3	4±1	3±0,80	5±0,30	3±0,90	5±0,10	3±0,30	3±0,10	1±0,20	4±0,20	3±0,20	5±0,30	0
Heksozid vanilinske kiseline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2±0,10	0
Dihidro- <i>p</i> -kumarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	185±11
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29±0,60
Dihidro-ferulna kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	111±4
Flavonoidi i derivati														
Proantocijanidin B2 izomer 1	129±8	153±29	18±3	26±0,10	47±12	25±4	10±1	4±0,50	3±0,30	0	0	0	0	0
(Epi)katehin izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40±3
(Epi)katehin izomer 2	573±14	532±35	181±40	81±0,40	345±35	143±9	183±12	22±1	39±0,70	7±0,30	282±23	7±0,30	107±7	74±10
Proantocijanidin B2 izomer 2	112±9	116±11	31±6	19±4	78±8	32±3	17±0,80	6±1	6±0,50	0	0	0	0	0
(Epi)katehin izomer 3	214±44	184±28	54±1	33±0,01	127±19	64±8	87±3	10±2	22±9	0	44±4	0	17±3	0
Rutin	121±3	104±24	40±9	17±1	55±3	28±1	46±5	14±0,30	13±0,70	0	0	0	0	131±4
Eriodiktioi-glukozid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	353±44
Naringenin izomer 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	143±4
Naringenin izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	177±4
Epikatehin- <i>O</i> -glukoronid	113±1	100±11	37±8	11±0,30	56±2	21±0,70	24±1	5±0,30	8±0,40	0	20±0,50	0	7±0,20	0
Kvercetin-glukozid izomer 1	67±0,60	59±10	15±7	21±0,60	33±0,80	30±2	49±2	13±0,20	13±0,60	0	0	0	7±0,20	82±2
Kvercetin-glukozid izomer 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32±2
Gemistein- <i>O</i> -glukozid izomer 1	89±0,10	72±9	20±9	11±0,40	47±1	21±0,80	20±1	5±0,20	7±0,40	0	12±0,50	0	5±0,20	0
Kaempferol- <i>O</i> -rutinozid	91±4	80±9	15±5	10±0,20	41±0,90	18±2	44±2	9±0,70	10±0,40	0	4±0,20	0	0	60±3
Izoramnetin-glukozid	15±0,20	14±2	4±1	4±0,20	7±0,70	5±1	11±2	0	0	0	3±0,30	0	0	0
Gemistein- <i>O</i> -glukozid izomer 2	65±4	55±8	14±5	13±0,60	39±3	17±1	29±0,10	8±0,01	9±0,10	0	16±1	0	8±0,01	62±2
Gemistein- <i>O</i> -glukozid izomer 3	102±0,80	90±7	19±5	16±1	60±3	24±2	28±2	5±0,30	9±0,70	0	24±1	0	12±0,30	10±1

Nastavak Tabele P5.

Kaempferol- <i>O</i> -glukozid	41±2	45±3	12±2	20±0,30	25±4	22±0,70	42±2	12±1	14±0,50	0	8±0,20	0	4±0,40	41±0,80
Genistein- <i>O</i> -glukozid izomer 4	82±0,03	70±8	12±2	13±0,10	49±0,30	21±2	48±2	10±0,20	9±0,20	0	17±1	0	7±0,50	0
Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 1	94±0,20	88±12	24±6	20±1	58±4	28±1	51±0,90	9±0,90	12±0,90	0	34±1	1±0,1	16±1	113±3
Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 2	57±1	49±2	9±4	5±0,20	15±0,90	3±0,30	13±0,20	1±0,40	7±0,40	2±0,40	34±4	3±0,1	20±1	61±2
Hrizin- <i>O</i> -glukozid	432±14	373±18	100±25	63±3	302±12	153±4	136±5	29±3	51±2	4±0,60	180±1	9±0,5	155±10	20±0,40
Naringenin- <i>O</i> -glukozid izomer 3	91±0,08	85±14	21±8	9±0,30	44±3	16±2	34±0,50	6±0,30	8±1	3±0,40	49±5	8±0,09	37±3	28±2
Naringenin izomer 3	14±1	13±2	3±0,80	2±0,40	8±0,60	4±0,30	32±2	6±0,20	8±1	2±0,02	13±0,80	6±0,2	15±1	90±3
Naringenin izomer 4	9±0,20	8±1	2±0,30	0	6±0,20	3±0,40	7±0,40	0	2±0,30	3±0,40	5±0,40	4±0,6	5±0,70	0
Hrizin	143±12	143±26	16±2	7±0,40	106±3	48±4	424±15	61±3	150±8	103±8	143±3	178±11	172±9	59±14
Metilnaringenin	39±2	34±9	5±0,60	4±0,09	22±2	10±0,70	57±3	12±1	20±1	67±6	42±1	68±2	48±4	22±2
Kaempferol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13±2
Masne kiseline i derivati														
Trihidroksi-oktadekadienska kiselina	42±6	32±1	12±2	5±0,20	21±3	10±0,70	23±1	6±0,80	6±0,40	12±1	29±2	19±0,3	33±1	167±6
Trihidroksi-oktadekanska kiselina	48±2	42±3	13±1	5±0,20	25±2	12±0,70	29±0,80	6±0,70	9±1	15±1	40±2	28±0,8	46±0,80	108±6
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1	19±0,30	14±3	0	0	9±0,70	0	8±0,40	0	2±0,40	124±8	59±0,20	89±1	66±3	0
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2	9±0,50	7±1	0	0	5±0,30	0	5±0,20	0	2±0,50	88±6	40±0,80	58±1	43±2	0
Hidroksi-oktadekadienska kiselina	76±2	54±1	0	0	36±4	17±1	23±0,70	0	55±0,20	417±21	210±12	336±23	237±22	0
Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 3	57±4	50±7	2±0,70	0	32±2	14±0,40	28±2	0	6±0,30	255±21	121±5	200±5	132±6	0
Linolenska kiselina	129±15	117±2	0	0	78±1	33±0,40	124±7	0	40±3	856±9	407±39	588±40	431±8	0
Linolna kiselina	129±2	136±3	0	0	106±6	55±6	168±10	0	60±4	812±20	448±39	587±63	452±44	0
Hidroksi-oktadekanska kiselina	13±0,30	17±2	0	0	11±0,40	8±1	14±1	0	7±0,90	80±4	49±3	75±7	47±4	0
Terpeni														
Jaligonska kiselina	333±2	283±15	24±7	0	72±2	5±1	58±1	4±0,20	12±0,30	11±0,20	297±10	42±0,5	300±12	0
Hidroksiceanotična kiselina izomer 1	279±7	243±21	11±3	0	136±3	56±2	55±1	2±0,30	11±0,60	24±1	273±6	95±4	329±7	0
Hidroksiceanotična kiselina izomer 2	54±3	45±4	0	0	48±2	17±1	13±0,09	0	5±0,20	0	78±6	38±1	105±5	0

Tabela P6. Statistička analiza (ANOVA) sadržaja identifikovanih jedinjenja u ekstraktima peteljki trešnje dobijenih primenom dve ili više ekstrakcionih tehnika pri najboljim ekstrakcionim uslovima.

Fenolne kiseline i derivati		Flavonoidi i derivati																		
Galna kiselina		Heksozid kafene kiseline	O-heksozid <i>p</i> -kimarinske kiseline		(Epi)katehin izomer 2	(Epi)katehin izomer 3	Rutin	Epikatehin-O-glukuronid												
ASE 20	SFE 1	0	SWE 2	ASE 2	0	ASE 20	SFE 4	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1
SWE 2	ASE 20	1				SWE 2	ASE 19	1												
SWE 2	SFE 1	1				SWE 2	SFE 2	0												
Kvercetin-glukozid izomer 1		Kaempferol-O-rutinozid	Kaempferol-O-glukozid		Izorametnin-glukozid	Kaempferol-O-glukozid	Genistein-O-glukozid izomer 1	Genistein-O-glukozid izomer 2	Genistein-O-glukozid izomer 3											
ASE 19	SFE 4	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 20	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1
SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 20	1				SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1
SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1				SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1
Genistein-O-glukozid izomer 4		Naringenin-O-glukozid izomer 1	Naringenin-O-glukozid izomer 2	Naringenin-O-glukozid izomer 3	Hrizin-O-glukozid		Naringenin izomer 3		Naringenin izomer 4											
ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 4	0	ASE 19	SFE 4	1
SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1
SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 2	1	SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 4	1
Masne kiseline i derivati		Trihidroksi-oktadekadienska kiselina		Trihidroksi-oktadekanska kiselina		Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 1		Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 2		Hidroksi-oktadekatrienska kiselina izomer 3										
ASE 40	SFE 3	1	ASE 19	SFE 3	1	ASE 19	SFE 4	1	ASE 19	SFE 4	1	ASE 19	SFE 1	1	ASE 19	SFE 2	1	ASE 19	SFE 1	1
SWE 2	ASE 40	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1
SWE 2	SFE 3	1	SWE 2	SFE 3	1	SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 4	1	SWE 2	SFE 4	1
Hidroksi-oktadekadienska kiselina		Linolenska kiselina		Linolna kiselina		Hidroksi-oktadekanska kiselina		Jaligonska kiselina		Hidroksiceanoična kiselina izomer 1		Hidroksiceanoična kiselina izomer 2								
ASE 19	PLE 1	1	ASE 19	SFE 1	1	ASE 40	SFE 1	1	ASE 20	SFE 1	1	ASE 19	SFE 4	1	ASE 19	SFE 4	1	ASE 19	SFE 4	1
SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1	SWE 2	ASE 19	1

1 – statistički značajna razlika; 0 – statistički beznačajna razlika

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Оптимизација екстракционих поступака и карактеризација екстраката корена гавеза (<i>Symphytum officinale</i>), листа дуда (<i>Morus nigra</i>) и петелјки трешње (<i>Prunus avium</i>)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду (Србија) б) Центар за истраживање и развој функционалне хране (Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional - CIDAF), Гранада (Шпанија) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Пројекат који се реализује у оквиру програма Министарства просвете, науке и технолошког развоја (пројектни циклус 2011 - 2015): “Развој нових функционалних кондиторских производа на бази уљарица” (ТР 31014)
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</p> <p><u>Докторска дисертација</u></p> <hr/> <hr/> <hr/>
<p>1.2 Врсте података</p> <p><input type="checkbox"/> а) квантитативни</p> <p><input type="checkbox"/> б) квалитативни</p>

1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови,. навести врсту _____
- г) административни подаци, навести врсту _____
- д) узорци ткива, навести врсту: корен гавеза, лист црног дуда и петељке трешње
- ђ) снимци, фотографије, навести врсту _____
- е) текст, навести врсту: литература
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало, описати: web садржај

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека _____
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) PDF фајл, датотека _____
- д) Текст фајл, датотека _____
- е) JPG фајл, датотека _____
- ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мерења је 1 h
- б) варијабле које се више пута мере односе се на садржај влаге у испитиваном биљном материјалу, укупан садржај фенолних једињења, површина пикова идентификованих једињења

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: хемијска анализа

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

HPLC-ESI-TOF-MS, HPLC-ESI-QTOF-MS

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и одбацивањем
екстрема.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са
литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму _____ репозиторијум.

3.1.2. URL адреса: накнадно _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на

учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
 - b) Подаци су анонимизирани
 - c) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- јавно доступни
- b) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- c) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Наташа Настић, natasa.nastic@uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Наташа Настић, natasa.nastic@uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Наташа Настић, natasa.nastic@uns.ac.rs