

Optimiranje parametara ekstrakcije fenolnih spojeva korijena i lista maslačka primjenom ultrazvuka visokog intenziteta

Marić, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:442479>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2016.

Antonela Marić
655/PI

OPTIMIRANJE PARAMETARA
EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA
KORIJENA I LISTA MASLAČKA
PRIMJENOM ULTRAZVUKA
VISOKOG INTENZITETA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehničku termodinamiku na Zavodu za procesno inženjerstvo i Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Mladena Brnčića. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistenta dr.sc. Filipa Dujmića i asistenta dr.sc. Ivone Elez Garofulić.

Zahvaljujem se djelatnicima Laboratorija za tehničku termodinamiku i Laboratorija za procese konzerviranja i preradu voća i povrća na tehničkoj opremi za izradu ovog rada, pruženoj pomoći i danim savjetima.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr.sc. Mladenu Brnčiću na pomoći pri izradi diplomskog rada, kao i na strpljenju i posvećenom vremenu.

Najveće hvala mojim roditeljima i mojoj sestri Renati na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za tehničku termodinamiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIRANJE PARAMETARA EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA KORIJENA I LISTA MASLAČKA PRIMJENOM ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA

Antonela Marić 655/PI

Sažetak: Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta je nekonvencionalna metoda ekstrakcije analita otapalom iz uzorka mehaničkim djelovanjem ultrazvučnih valova čime se postiže bolje iskorištenje uz manju potrošnju otapala i kraće vrijeme ekstrakcije, te nižu potrošnju energije.

Cilj ovog rada je bio istraživanje optimalnih uvjeta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta, te poboljšati iskorištenje ukupnih fenola iz korijena i lista maslačka. U svrhu što bolje ekstrakcije ispitana su različita otapala (50%-tna vodena otopina metanola i 70%-tna vodena otopina metanola), različito vrijeme obrade ultrazvukom visokog intenziteta (3, 6, 9 minuta) i različite amplitude (50%, 75% i 100%). Rezultati su pokazali da se primjenom 70%-tne vodene otopine metanola, amplitude od 100% i pri vremenu obrade ultrazvukom od 9 minuta postiže najviši ekstrakcijski kapacitet ukupnih fenola.

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija, korijen maslačka, list maslačka, fenolni spojevi.

Rad sadrži: 53 stranice, 24 slike, 54 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom (PDF format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-Biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Prof.dr.sc. Mladen Brnčić*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Ivona Elez Garofulić, asistent, dr.sc. Filip Dujmić, asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Dr.sc. Mladen Brnčić*, red.prof.
2. *Dr.sc. Verica Dragović Uzelac*, red.prof.
3. *Dr.sc. Branka Levaj*, red.prof.
4. *Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević*, doc. (zamjena)

Datum obrane: 26. rujan 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Thermodynamics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF EXTRACTION PARAMETERS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM DANDELION ROOT AND LEAF USING HIGH INTENSITY ULTRASOUND

Antonela Marić, 655/PI

Abstract: Ultrasound-assisted extraction is unconventional extraction method and utilizes a mechanical effects of acoustic cavitation and has following advantages in comparison to conventional extraction techniques: improved efficiency with lower solvent consumption, reduced extraction time and lower energy consumption.

The aim of this study was to select optimal extraction parameters like solvent composition (50% aqueous solution of methanol and 70% aqueous solution of methanol), extraction time (3, 6, 9 minutes) temperature and different amplitude of ultrasound (50%, 75% and 100%) for isolation of total phenolic content from dandelion root and leaf. The results showed that the most efficient extraction parameters for extraction of total phenols were achieved by using 70% aqueous solution of methanol, with amplitude of 100% and at extraction time of 9 minutes.

Keyword: Ultrasound-assisted extraction, extraction, dandelion root, dandelion leaf, phenolics compounds.

Thesis contains: 53 pages, 24 figures, 54 references

Original in: Croatian

Thesis in printed and electronic (PDF format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Mladen Brnčić, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić, Scientific assistant,*
PhD. Filip Dujmić, Scientific assistant

Reviewers:

1. *PhD. Mladen Brnčić, Full professor*
2. *PhD. Verica Dragović Uzelac, Full professor*
3. *PhD. Branka Levaj, Full professor*
4. *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor (substitute)*

Thesis defended: 26 september 2016

| Sadržaj | Stranice |
|---|----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. MASLAČAK (<i>Taraxacum officinale</i> L.) | 2 |
| 2.1.1. Opće karakteristike maslačka i botanička obilježja | 2 |
| 2.1.2. Kemijski sastav maslačka..... | 3 |
| 2.2. FENOLNI SPOJEVI | 3 |
| 2.2.1. Flavonoidi i fenolne kiseline | 4 |
| 2.2.1.1 Flavonoidi..... | 4 |
| 2.2.1.2. Fenolne kiseline..... | 6 |
| 2.2.2 Polifenolni spojevi maslačka..... | 7 |
| 2.3. EKSTRAKCIJA | 8 |
| 2.4. ULTRAZVUK | 11 |
| 2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom..... | 14 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 3.1. MATERIJAL..... | 16 |
| 3.2. METODE RADA | 17 |
| 3.2.1. Postupak ekstrakcije | 17 |
| 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola | 18 |
| 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida..... | 21 |
| 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 31 |
| 4.1. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA | 32 |
| 4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOIDA..... | 36 |
| 4.3. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 4.4. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOLA | 44 |
| 5. ZAKLJUČCI | 48 |
| 6. LITERATURA..... | 49 |

1. UVOD

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je livadna biljka koja raste i cvate od ranog proljeća do kasne jeseni. Cijela biljka je jestiva i ljekovita (bogata vitaminom C i mineralima: kalijem, željezom, natrijem i fosforom, kao i eteričnim uljima i masnim kiselinama) pa se zbog toga često sakuplja s prirodnih staništa. Mladi listovi se beru prije nego maslačak počne cvjetati, a koriste se za pripremu salate. Cvjetovi se koriste za pripremu meda ili slatkog, dok se korijenje vadi u jesen, a koristi se, zbog visokog sadržaja inulina, kao zamjena za kavu, a dobro djeluje i na peristaltiku crijeva.

Pri izolaciji fenolnih spojeva iz prirodnog supstrata, ekstrakciju je važno provesti pri optimalnim uvjetima, a provodi se uz primjenu različitih tehnika, od klasične preko ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ultrazvukom, visokim hidrostatskim tlakom (VHT) i sl. U ovom radu provedena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj vodene otopina metanola (50% i 70%, v/v), vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min) te amplitude (50%, 75% i 100%) na izolaciju fenolnih spojeva iz korijena i lista maslačka (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola te hidroksicimetnih kiselina) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcija je provedena sondom promjera 7 mm. U pripremljenim ekstraktima su određivani ukupni fenoli. Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida, flavonola te hidroksicimetnih kiselina određivane su primjenom spektrofotometrijskih metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLAČAK (*Taraxacum officinale L.*)

2.1.1. Opće karakteristike maslačka i botanička obilježja

Maslačak (*Taraxacum officinale L.*) je trajna zeljasta višegodišnja biljka iz porodice Asteraceae, koja se većinom smatra dosadnim korovom, iako u sebi skriva znatnu ljekovitost (Popescu i sur., 2010). Rasprostranjen je u cijeloj Europi i Aziji. Nalazimo ga na svakoj livadi, suhoj ili vlažnoj, na pašnjacima, oranicama i u vrtovima. Uspijeva i na visokim planinama, u tom slučaju ima manju rozetu. Izgled biljke varira prema staništu i ekološkim uvjetima. Korijen je vretenast i zadebljan, može biti dug do 140 cm čime crpi vodu i hranjive tvari iz dubokih slojeva (Slika 1.). Stvara duguljaste, nazubljene listove složene u prizemnu rozetu (Slika 2.). Zeljasta, šuplja stabljika bez listova, visoka je 15-25 cm, nosi po jednu cvjetnu glavicu. Cvate na proljeće, ponekad sve do listopada. Cvjetovi su dvospolni, jezičasti, zlatnožuti, skupljeni u glavice promjera 3-5 cm. Otvoreni su do podne, a i za vrijeme oblačnog vremena se zatvaraju. Nakon cvjetanja cvijet se pretvara u prepoznatljive loptice. Riječ je o roškama sa kunadrom, odnosno sitnim dlačicama na plodovima, koji služe za rasprostranjenje sjemena pomoću vjetra. Jedna biljka u sezoni proizvede 3000 – 8000 sjemenki koje zadržavaju sposobnost klijanja i nakon 600 godina. Svi dijelovi biljke sadrže mliječni sok. List maslačka koristi se u pučkoj medicini kao dobar diuretik, snižava visok krvni tlak, a ubran ranije u proljeće koristi se kao namirnica u prehrani (Grlić, 1990). Mladi listovi se beru prije nego maslačak počne cvjetati, a koriste se za pripremu salate. Cvjetovi se koriste za pripremu meda ili slatkog, dok se korijenje vadi u jesen, a koristi se, zbog visokog sadržaja inulina, kao zamjena za kavu, a dobro djeluje i na peristaltiku crijeva.



Slika 1. Korijen maslačka (Anonymus 1)



Slika 2. List maslačka (Anonymus 2)

2.1.2. Kemijski sastav maslačka

Maslačak sadrži holin, gorku tvar, škrob, koji se kod dužeg čuvanja pretvara u voćni šećer, saponin, masti, tragove eteričnog ulja, vosak, sluz, kaučuk, šećer, bjelančevine, levulin i taraksin. U korijenu sadrži još i dosta kalija, kalcija, mangana, natrija, kremičnu kiselinu, sumpora. Sadržaj tvari u biljnim dijelovima mijenjaju se s godišnjom dobom. Tako Willfort, (2002) navodi da svježi korijen, iskopan u proljeće (od sredine ožujka do sredine travnja), sadrži većim dijelom gorku tvar, prema sredini kolovoza, umjesto mliječnog soka, stvara se inulin, a u listopadu je u korijenu najviše tarakserina i levulina.

Kemijski sastojci koji prevladavaju u maslačku su: triterpenski spojevi (homotaksasterol, teraksasterol, androsterol, tarakserol, beta-amirin), sterin, beta-sisterin, stigmasterin, taraksol, levuloza, nikotinska kiselina, nikotin-amid, te inulin. U maslačku se mogu naći vitamini A, B i C, karotinoide, triterpenski alkohol. Bogat je i željezom, magnezijem, fosforom, silicijom i enzimima.

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi se ubrajaju u specifične pigmente i sekundarni su biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljaka u značajnim količinama, a do danas je poznato više od 8000 različitih struktura. Po broju hidroksilnih grupa dijele se na mono, di, tri i polifenole. Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih

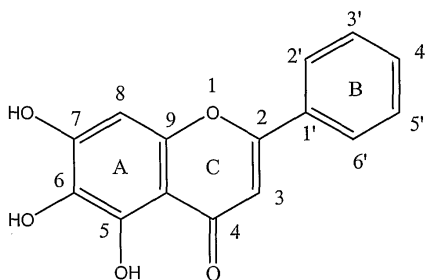
skupina, a prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide (fenolne kiseline i srodni spojevi).

Sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima tijekom zrenja i dozrijevanja, a u samim biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno i kao fotoreceptori. Znatno utjecaj imaju i na boju, okus i miris hrane, obzirom da su uključeni u nastajanje tvari boje, formiranja okusa i arome svojstvene svakoj pojedinoj vrsti voća i njihovim proizvodima. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu parametri okoliša kao što su svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja, obrade i prerade.

2.2.1. Flavonoidi i fenolne kiseline

2.2.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida (Harborne i Baxter, 1999). Najraširenija je skupina flavonoida čija se temeljna struktura sastoji od C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) flavonskog kostura odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 3.). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren.



Slika 3. Kemijska struktura flavonoida (Fennema, 1996)

Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, flavonoidi se dijele u podskupine:

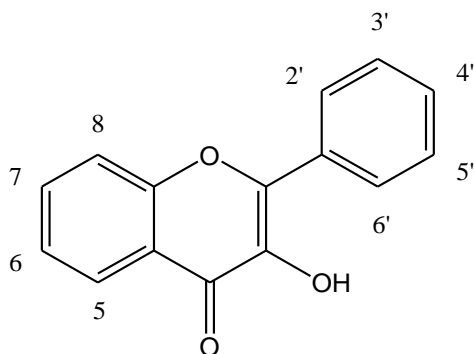
- antocijanidini,
- antocijan glikozidi,
- flavoni,
- izoflavoni,
- flavanoni,
- flavanoli,
- flavonoli,
- flavonol glikozidi,
- procijanidini i
- dihidrohalkoni.

Nastajanje flavonoida u biljkama uvjetovano je brojnim faktorima kao što su svjetlost, uvjeti okoliša, genetika biljke, stupanj zrelosti i vrsta biljke (Fruhbeck, 1996).

Flavonoli su žuto obojeni pigmenti. Imaju nezasićenu vezu između C_2 i C_3 atoma C prstena, imaju hidroksilnu skupinu vezanu na C_3 atomu C prstena (Slika 4.).

Glavni predstavnici flavonola su:

- kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon),
- kamferol (3,5,7,4'-tetrahidroksiflavon),
- miricetin (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavon) i
- izomiricetin (3,5,7,4'-tetrahidroksi-3'-metoksiflavon).

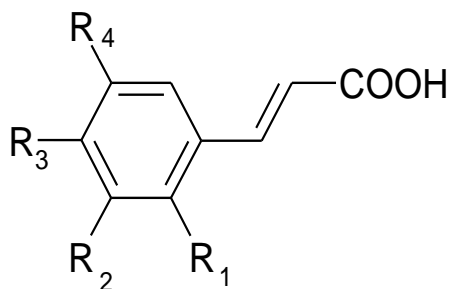


Slika 4. Kemijska struktura flavonola (Robards i sur., 1999)

Najzastupljeniji su kvercetin i kamferol. Uglavnom su prisutni u obliku glikozida te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom.

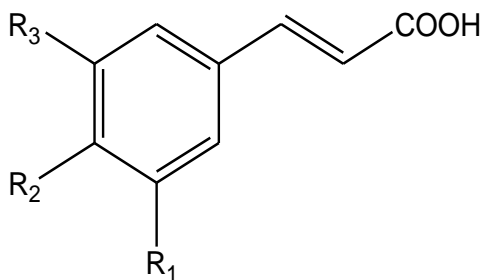
2.2.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su po strukturi jednostavni fenoli, a dijele se u derivate benzojeve i derivate cimetine kiseline. Hidroksicimetine kiseline su aromatski spojevi strukture C_6-C_3 i najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri (Slika 5.). Najpoznatiji ester je klorogenska kiselina (5' kafeoilkina kiselina), a zatim slijede p - kumaroilkina kiselina, 3' - kafeoilkina kiselina (klorogenska kiselina) te 4' - kafeoilkina kiselina (izoklorogenska kiselina) (Balasundram i sur., 2006). Mnogo su češće od hidroksibenzojevih kiselina a sastoje se od p-kumarinske, kafeinske, ferulinske i sinapinske kiseline.



Slika 5. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Robards i sur., 1999)

S druge strane, hidroksibenzojeve kiseline imaju zajedničku C₆-C₁ strukturu, a uključuju galnu, p-hidroksibenzojevu, vanilinsku, siriginsku te prokatehinsku kiselinu (Slika 6.). U hrani su prisutni u slobodnom i vezanom obliku, s time da su rijeđe prisutne u slobodnom obliku (osim u procesiranoj hrani), a u vezanom su obliku glikozilirani oblici ili esteri kviniske, šikiminske i tartarne kiseline (Pandey i Rizvi, 2009; Manach i sur., 2004). Navedene razlike u strukturi između hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990)

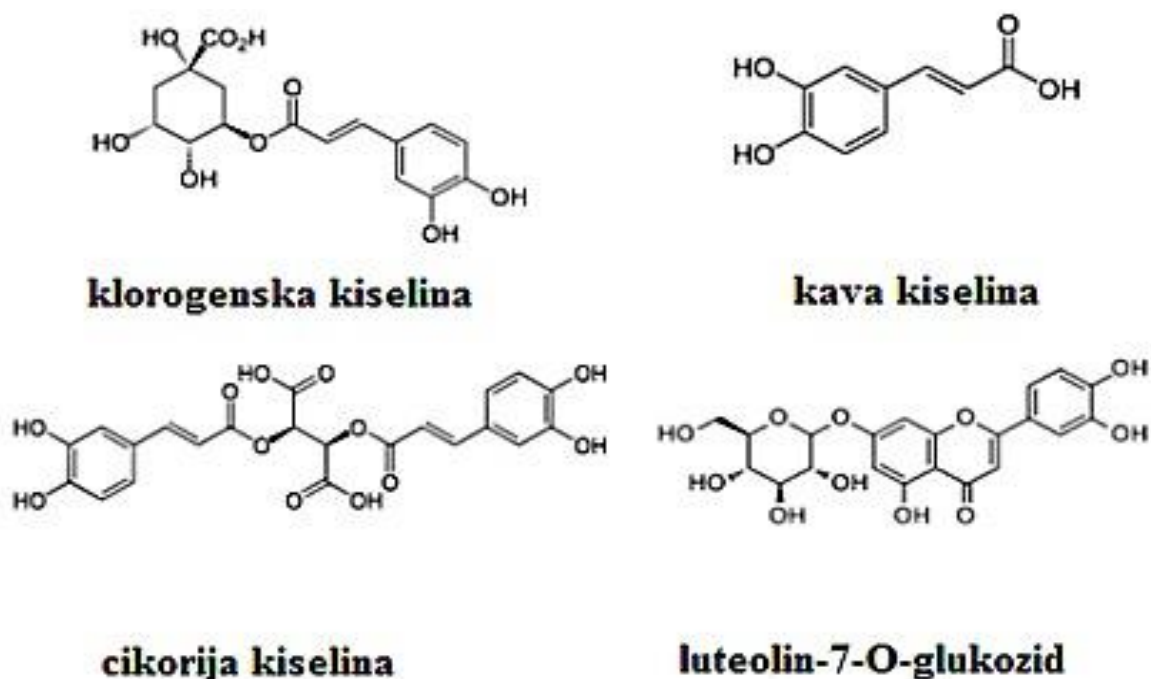


Slika 6. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

2.2.2 Polifenolni spojevi maslačka

Udio polifenolnih spojeva veći je u cvjetovima i listovima, odnosno vanjskim dijelovima biljke ($9,9 \pm 0,28$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka) nego u korijenu ($0,086 \pm 0,003$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka). Glavni polifenolni spojevi cvjetova maslačka (Slika 7.)

su hidroksicimetne kiseline i njezini derivati, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina i cikorinska kiselina, od kojih je cikorinska kiselina prisutna u najvećoj koncentraciji. Osim hidroksicimetnih kiselina u maslačku su identificirani i luteolin te luteolin-7-O-glukozid. Polifenoli maslačka pokazali su značajno antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno, antivirusno, protuupalno i hepatoprotektivno djelovanje u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima (González-Castejón i sur., 2012).



Slika 7. Struktura glavnih polifenola cvjetova maslačka (Chen i sur., 2012)

2.3. EKSTRAKCIJA

Da bi mogli analizirati određene bioaktivne tvari u nekom uzorku potrebno ih je izolirati, a po potrebi i koncentrirati. Metode izolacije, odnosno ekstrakcije i koncentriranja (Slika 8.), mogu biti različite i mogu se kombinirati ovisno o polarnosti, veličini, stabilnosti i naboju molekula i vrsti uzorka.

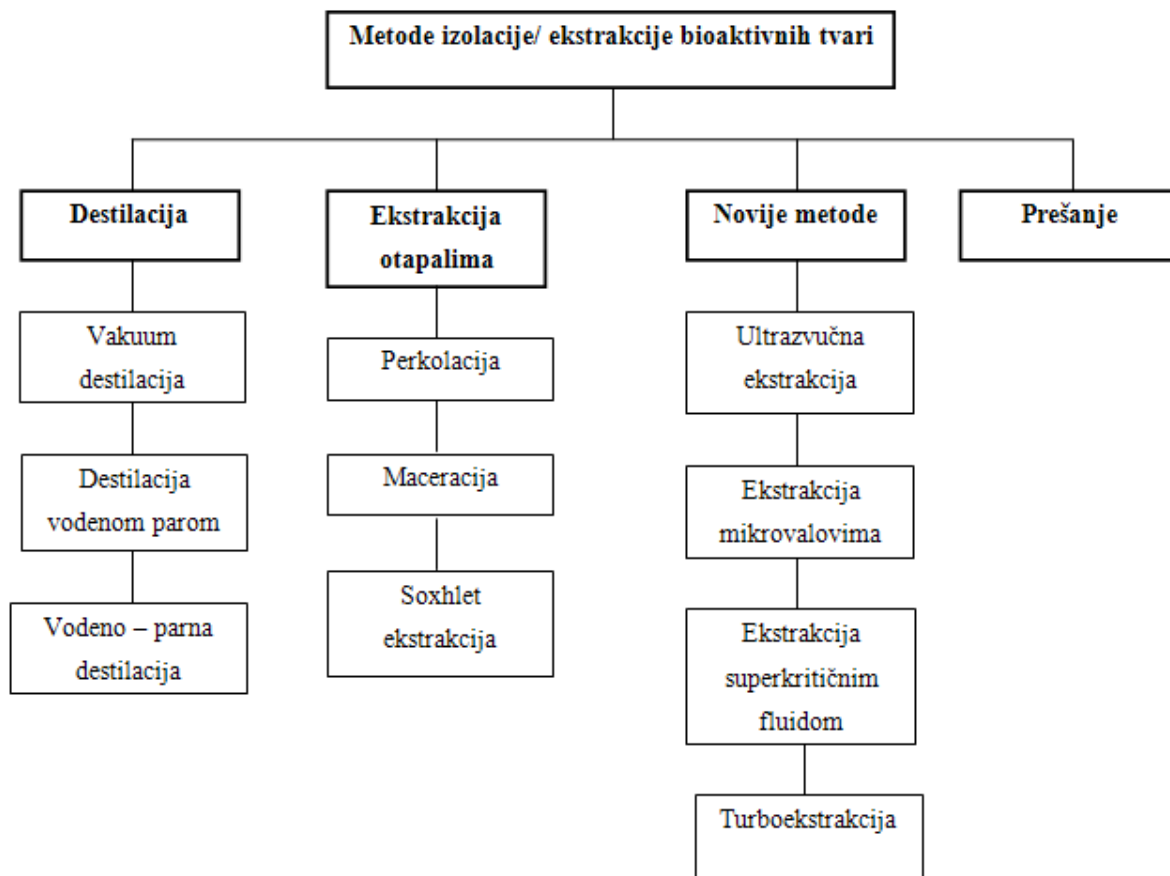
Fenomen ekstrakcija možemo definirati kao izdvajanje neke tvari iz otopine, suspenzije ili čvrste tvari pomoću otapala, tj. radi se o prijenosu tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo. Iz

definicije se vidi da postoje dvije vrste ekstrakcija, ekstrakcije tekuće-tekuće i ekstrakcija čvrsto tekuće.

Cijeli proces ekstrakcije temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Pri tom dolazi do razdvajanja tvari između dva otapala. Većinom su to voda (odnosno vodena otopina tvari) i neko organsko otapalo koje se ne miješa s vodom. Dobiveni ekstrakt mora se pročititi kako bi izdvojili bioaktivnu tvar u čistom obliku. Pročišćavanje ekstrakta provodi se filtriranjem, odnosno dodatkom aktivne tvari na koje se vežu pojedini sastojci i talože i centrifugiranjem (Lianfu i Zelong, 2008). Ekstrakcija se može provesti korištenjem tekućine, tj. otapala iz krutine ili neke druge tekućine koja sadrži željenu tvar. Za ekstrakciju je vrlo važan izbor otapala, ono ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju želimo izolirati. Prilikom odabira otapala vrlo je bitno uzeti u obzir: polarnost otapala, točku ključanja (poželjno je da bude što niža da se olakša odvajanje otapala od komponente), reaktivnost (otapalo ne smije reagirati s ekstraktom), viskozitet (poželjno je da otapalo ima što nižu viskoznost), ekstrakcijski kapacitet otapala, selektivnost, stabilnost otapala na temperaturu, kisik i svjetlo, otapalo ne smije biti škodljivo za ljude niti za okoliš. (Albu i sur., 2004).

Čimbenici koji utječu na brzinu i učinkovitost ekstrakcije su topljivost tvari u otapalu, temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija, veličina čestica, površina namirnice izloženoj otapalu i gibanje otapala. Pogodno je provođenje ekstrakcije na višim temperaturama zbog toga jer dolazi do povećanja brzine otapanja tvari, povećanja brzine difuzije tvari u volumen otapala (Raso i sur., 1999). Vrlo je bitno odabrati optimalno vrijeme i temperaturu ekstrakcije kako bi se izbjeglo moguće oštećenje željene komponente ili izolacije nepoželjnih tvari. Prije ekstrakcije namirnica se usitnjava zbog proporcionalnog odnosa brzine difuzije i površine namirnice te se prema potrebi homogenizira (Jerman i sur., 2010).

Uz klasične metode ekstrakcije kao što su destilacija, maceracija, perkolacija, i dr. sve se više upotrebljavaju novije metode kao što su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidom.



Slika 8. Metode izolacije bioaktivnih tvari (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Za izolaciju polifenolnih spojeva najčešće se koriste slijedeće metode ekstrakcije:

- Soxhlet ekstrakcija
- Ekstrakcija superkritičnim fluidom
- Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima
- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta (Grigonis i sur., 2004).

2.4. ULTRAZVUK

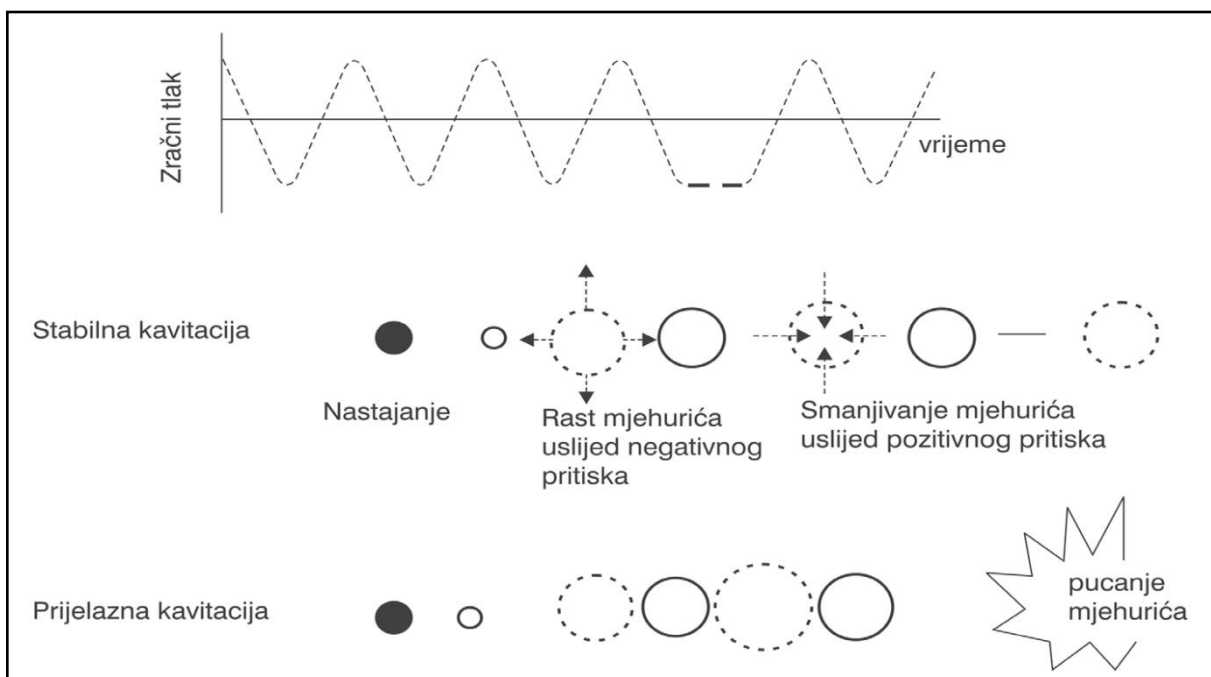
Primjena ultrazvuka kao analitičke metode koristi se od dvadesetih godina 20. stoljeća. Ultrazvuk ima značajnu ulogu kao analitička metoda u prehrambenoj tehnologiji, u početku je upotreba ultrazvuka korištena u medicinskoj dijagnostici primjenom viših frekvencija (iznad 10 MHz) a kasnije velikim unaprjeđenjima se počeo koristiti i u drugim područjima. Paralelno sa razvojem ultrazvuka kao analitičke metode razvio se i veliki interes za upotrebu ultrazvuka visokih intenziteta pri obradi hrane pri čemu se koriste niže frekvencije i to najčešće od 16 do 100 kHz.

Glavne primjene ultrazvuka u prehrambenoj industriji su sljedeće:

- pri niskim intenzitetima (niže od 1 W/cm^2) i visokim frekvencijama koristi se kao analitička metoda, te
- pri visokim intenzitetima (više od 1 W/cm^2) i niskim frekvencijama može se koristiti pri različitim procesima u obradi hrane (Povey i Mason, 1995).

Ultrazvučni valovi slični su zvučnim valovima, ali ih ljudsko uho ne može čuti, jer imaju frekvencije više od 16 kHz (Dujmić i sur., 2013).

Kavitacija nastaje uslijed nastanka longitudinalnog vala u tekućoj fazi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije uslijed čega dolazi do naizmjeničnog izmjenjivanja tlaka pri čemu se formiraju mjehurići plina u materijalu. Nastali mjehurići imaju veću površinu tijekom ekspanzijskog ciklusa, što povećava difuziju plina uzrokujući ekspanziju mjehurića (Slika 9.). Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza, u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije. Ove kondenzirane molekule sudaraju se velikom brzinom pri čemu nastaju udarni valovi koji uzrokuju vrlo visoke temperature i tlakove (Herceg i sur., 2004; Bosiljkov i sur., 2009). Na pojavu kavitacije utječe frekvencija i intenzitet ultrazvuka, viskoznost i površinska napetost uzorka te okolni uvjeti (temperatura i tlak) (Dolatowski i sur., 2007). Sve je to moguće iskoristiti pri obradi hrane izazivanjem određenih poželjnih efekata. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji proučava se već mnogo godina, ali još uvijek je relativno nova metoda koja nije u potpunosti istražena iako se smatra jednom od obećavajućih tehnologija obrade hrane u industriji.



Slika 9. Prijelazna i stabilna kavitacija (Kujipers, van Eck, Kemmere, Keurentjes, 2002)

Djelovanje ultrazvuka s obzirom na primjenu u prehrambenoj industriji, znanosti i tehnologiji se može podijeliti u dva glavna smjera (Slika 10.):

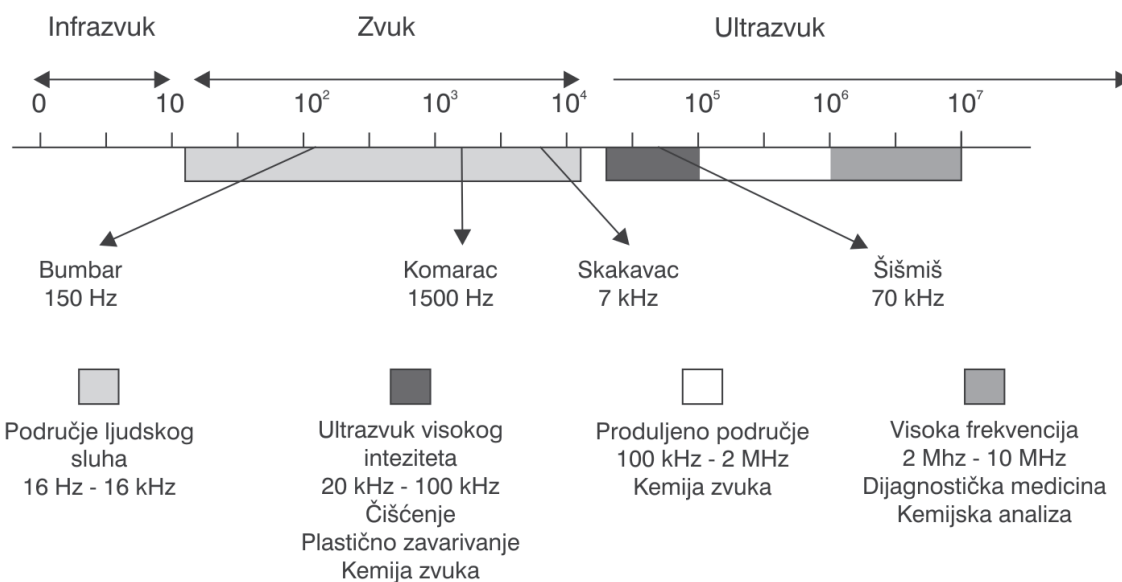
Ultrazvuk niskog intenziteta frekvencije od 2 MHz na više

Prolaskom ultrazvučnog vala kroz materijal ne dolazi do fizičkih i kemijskih promjena u svojstvima uslijed djelovanja nerazorne tehnike sa značajkama visokih frekvencija i niskih intenziteta (nižim od 1 W cm^{-2}). Koristi se kao analitička metoda za kontrolu obrade hrane i sastava, viskoznosti, kontrolu koncentracije tvari u hrani, otkrivanju stranih tijela i dr.

Ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne uzrokuju nikakva fizička oštećenja materijala, niti dovode do bilo kakvih kemijskih promjena unutar ispitivanog sustava. (McClements, 1995; Brnčić, 2006; Brnčić i sur., 2009a).

Ultrazvuk visokog intenziteta frekvencije od 16 do 100 kHz

Ultrazvuk visokog intenziteta frekvencije od 16 do 100 kHz uz prošireno područje do 2 MHz, te visokih intenziteta (u rasponu od 1 do 1000 W cm⁻²), a najčešće uzrokuje fizikalne i kemijske promjene materijala koji se obrađuju. Većina istraživanja temelji se na frekvencijskom području od 20 do 100 kHz. Koristi se za ekstrakciju, destilaciju, homogenizaciju tekućina, sušenje, i uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama (Brnčić, 2006; Brnčić i sur., 2009b; Herceg i sur., 2009; Jeličić i sur., 2012). Primjenjuje se često za ekstrakciju različitih spojeva iz hrane, kao što su enzimi, proteini, minerali, metali, elementi u tragovima, biološki aktivni spojevi, ali i u reaktorskom inženjerstvu za modifikaciju enzimske aktivnosti i ubrzavanje kemijskih reakcija. Sama ultrazvučna obrada nije potpuno učinkovita u inaktivaciji bakterija u hrani, međutim ako se ultrazvuk koristi zajedno sa tlakom i/ili toplinom daje vrlo dobre rezultate (Brnčić i sur., 2009b; Jeličić i sur., 2012).



Slika 10. Zvučno područje s osnovnim primjenama ultrazvuka (Mason i sur., 1996)

U novije vrijeme se pokazuje veliko zanimanje za primjenu ultrazvuka i razvoj postupaka koji omogućuju minimalnu obradu hrane, a mogle bi unaprijediti ili zamijeniti pojedine standardne operacije pri čemu se dobivaju proizvodi bolje kvalitete, postiže se ušteda energije, a skraćuje se i trajanje tehnološkog procesa (Barbosa-Cannovas i sur., 2005.) Uvođenjem ultrazvuka smanjuje se potrebna temperatura i vrijeme trajanja obrade, skraćuje vrijeme procesa, povećava brzina prijenosa topline itd. Međutim, ne smije se zaboraviti kako je ultrazvučna obrada hrane još uvijek nedovoljno istraženo područje koje zahtjeva daljnja istraživanja, kako sa industrijskog, tako i s ekonomskog i znanstvenog gledišta.

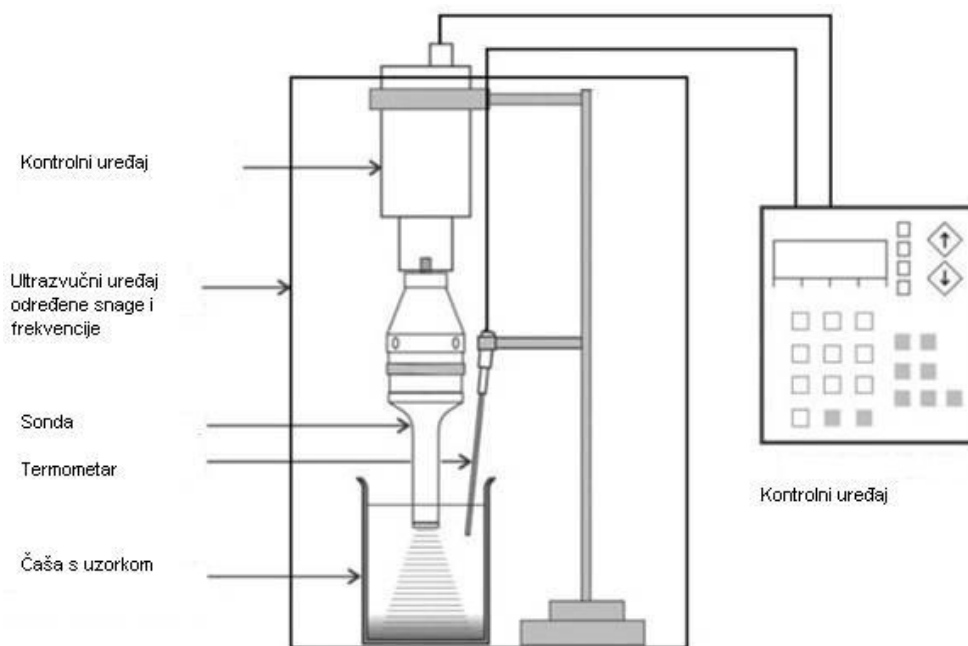
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se provodi na dva načina, u ultrazvučnim kupeljima ili uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij (Slika 11.) koji želimo ekstrahirati. Postoji cijeli niz izvedbi različitih uređaja kao i postupaka ekstrakcije. Na ekstrakciju utječe cijeli niz parametara: snaga i frekvencija ultrazvuka, amplituda, promjer sonde, vrijeme ekstrakcije, izbor organskog otapala kojim se provodi ekstrakcija.

Mehanički učinak ultrazvuka se sastoji u tome da uslijed djelovanja ultrazvuka dolazi do boljeg prodiranja otapala u stanični materijal i boljeg prijenosa mase te olakšanog oslobađanja sadržaja koji se treba izdvojiti (Chemat i sur., 2004, Rostagno i sur., 2003). Drugi mehanički efekt uslijed djelovanja ultrazvuka doprinosi većem gibanju molekula čime dolazi do boljeg kontakta između otapala i materijala koji se ekstrahira te prodiranja u unutrašnjost. Princip ultrazvuka očituje se u zvučnim valovima frekvencije više od 20 kHz koji stvaraju mehaničke vibracije u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Za razliku od elektromagnetskih valova, zvučni valovi putuju kroz sustav i izazivaju ekspanziju i kompresiju uslijed čega dolazi do boljeg kontakta molekula. Uslijed ekspanzije dolazi do stvaranja mjehurića u tekućem stanju te nastanka negativnog tlaka. Mjehurići nastaju, rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije kada dolazi do bržeg prijenosa na krutu fazu unutar tekućeg medija (Luque Garcia i Luque de Castro, 2003; Brnčić i sur. 2010).

Mehaničko djelovanje ultrazvuka osigurava više dobrobiti koje poboljšavaju ekstrakciju klasičnim putem:

- bolji prolazak otapala u stanicu;
- poboljšan prijenos mase;
- razbijanje stijenki stanica u biljnom materijalu što omogućuje lakše otpuštanje staničnih sastojaka.



Slika 11. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom (Zhang i sur., 2008)

Učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom je daleko veća i vremenski znatno kraća u usporedbi s konvencionalnim načinom ekstrakcije. Glavna prednost primjene ultrazvuka je u skraćivanju vremena ekstrakcije i manjoj količini otapala (Wu i sur., 2001). Stoga se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra ekonomičnijim i s ekološkog aspekta zdravstveno prihvatljivijim postupkom ekstrakcije u odnosu na klasičnu ekstrakciju (Albu i sur., 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišten je list i korijen maslačka nabavljen u suradnji sa Suban d.o.o. List i korijen maslačka su sakupljeni na području Republike Hrvatske te su osušeni prirodnim načinom sušenja, na suhom i hladnom mjestu sa dobrim protokom zraka. Nakon sušenja osušeni list i korijen zapakirani su u kartonske vrećice te su do provođenja analiza čuvani pri sobnoj temperaturi i na tamnom mjestu. Prije provođenja analiza list i korijen usitnjeni su pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita, Italy) u sitni prah.

Aparatura i pribor:

1. Analitička vaga (METTLER), $\pm 0,0001\text{g}$
2. Ultrazvučni uređaj UP400S (Hielscher, Njemačka)
3. Zaštitne naočale
4. Zaštitne slušalice
5. Infracrveni termometar
6. Centrifuga (HETTICH, Rotofix 32)
7. Laboratorijske čaše (50 mL, 100mL)
8. Stakleni štapić
9. Stakleni lijevak
10. Laboratorijska žlica
11. Menzura (100mL)
12. Stakleni štapić
13. Pipete (20 i 25 mL)
14. Odmjerne tikvice (50 mL)
15. Erlenmeyer-ove tikvice volumena (25 mL)
16. Falkonice

Kemikalije i otapala:

1. 50%-tna vodena otopina metanola (u odmjernu tikvicu od 500 mL otpipetira se 500,00 mL 100%-tnog metanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)
2. 70%-tna vodena otopina metanola (u odmjernu tikvicu od 500 mL otpipetira se 700,00 mL 100%-tnog metanola i nadopuni destiliranom vodom do oznake)

3.2. METODE RADA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista i korijena maslačka provedena je primjenom ultrazvuka visokog inteziteta upotrebom vodene otopine metanola (50%, 70%). Za ultrazvučnu obradu lista i korjena maslačka korišten je ultrazvučni procesor njemačke tvrtke *Hielscher* oznake UP400S, snage od 400 W, frekvencije 24 kHz, sa sondom promjera 7 mm izrađene od titana. Vršilo se tretiranje uzoraka primjenom različitih amplituda (50%, 75% i 100%), u trajanju od 3, 6 i 9 minuta. Ciklus je podešen na 1 te označava puno vrijeme obrade ultrazvukom.

Koristile su se tri metode:

1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola
2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida
3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroskicimetnih kiselina i flavonola

U svakom pripremljenom ekstraktu određen je udjel ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih hidroskicimetnih kiselina i ukupnih flavonola.

3.2.1. Postupak ekstrakcije

Priprema ekstrakta za analizu se odvijala na način da se samljeveni korijen i list maslačka odvažuju po $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ u 36 uzoraka (18 uzoraka korijena i 18 uzoraka lista maslačka) u laboratorijske čaše, dodavanjem po 50 ml 50%-tnog i 70%-tnog metanola. Čaša s uzorkom i otapalom postavljena je na predviđeni prostor na postolju u ultrazvučnom uređaju sa uronjenom sondom od 7 mm do polovice čaše. Na procesoru je postavljena određena amplituda (50%,70%, 100%) i ciklus ultrazvuka te je štopericom mjereno vrijeme ekstrakcije (3, 6, 9 min).

Temperatura se mjerila na početku, kao i na kraju postupka ekstrakcije. Nakon ekstrakcije uzorci su prebačeni u odmjernu tikvicu od 50 ml, koja je nadopunjena korištenim otapalom do oznake. Cijeli sadržaj prebačen je u čiste falkonice, nakon čega je slijedio postupak centrifugiranja na 5500 okretaja u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja vršilo se prelijevanje supernatanta u drugu falkonicu radi odvajanja taloga. Pripremljeni uzorci su se čuvali u zamrzivaču na -18°C do trenutka njihovog korištenja za analize.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Protokolom je definirana metoda određivanja ukupnih fenola. Određivanje ukupnih fenola provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na obojenoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopljeno je u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata te odmjerna tikvica nadopunjena do volumena 1000 mL i nakon 24 h otopina je filtrirana.

- Standard galne kiseline

Priprema: Odvagano je 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te je pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljeno u datom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.

Priprema uzorka

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u postupku ekstrakcije.

Razrijeđenja:

Ekstrakti lista maslačka dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom prije analize razrijeđeni su 10X.

Ekstrakti korijena maslačka dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom prije analize nisu razrijeđivani.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodan je 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa je promiješano (pomoću Vortexa), a potom su uzorci termostimirani 25 minuta pri $T=50$ °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjerena je apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzimalo otapalo za ekstrakciju.

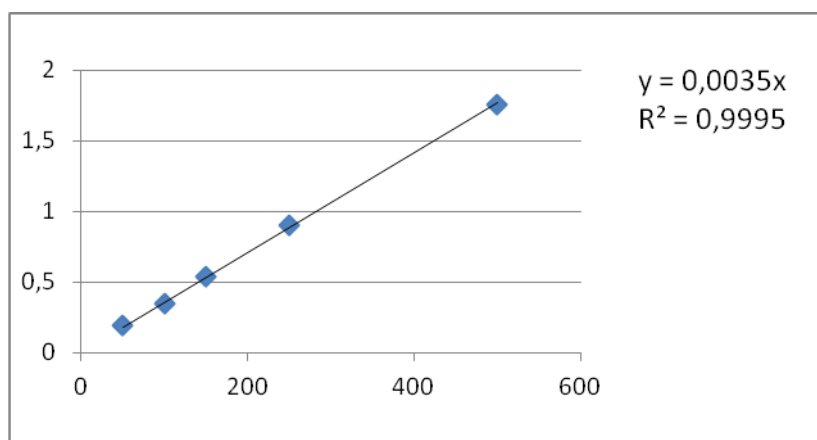
Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvažano je 0,5 g galne kiseline. Odvaga je otopljena u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopunjeno je destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rađena su razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da je otpipetirano redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopunjavano do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznosile su 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetirano je 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom je dodano redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodan je 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa je promiješano (pomoću Vortexa), a potom su uzorci termostirani 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzimalo se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjerena je apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtan je baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanasene koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 12.).



| mg L ⁻¹ | A 765 nm |
|--------------------|----------|
| 50 | 0,194 |
| 100 | 0,347 |
| 150 | 0,535 |
| 250 | 0,902 |
| 500 | 1,761 |

Slika 12. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1}).

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja je temeljena na obojenoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te se mjerio intenzitet nastalog obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Zbog selektivnosti reakcija flavonoida sa AlCl_3 i 2,4-dinitrofenilhidrazinom, bilo bi dobro određivati sadržaj specifičnih grupa flavonoida po obje metode, a njihova suma bi dala realniju vrijednost za sadržaj ukupnih flavonoida.

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 μL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminijev klorid, 10%-tni

Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminj-klorid–heksahidrat,p.a.) otopljen je u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjen do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopljen je u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetina (100 mg L⁻¹)

Priprema: Odvagano je 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te je pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljen u datom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno metanolom. Iz alikvotne otopine priređena su redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg L⁻¹.

Priprema uzorka

Ekstrakti su pripremljeni kao što je opisano u postupku ekstrakcije.

Razrijeđenja:

Ekstrakti lista maslačka dobiveni pomoću ultrazvučne ekstrakcije prije analize razrijeđeni su 5 X.

Ekstrakti korijena maslačka sa 50% metanolom dobiveni pomoću ultrazvučne ekstrakcije prije analize nisu razrijeđivani.

Za analizu ekstrakta korijena maslačka sa 70% metanolom korišten je 1 mL ekstrakta.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta uzeto otapalo za ekstrakciju te je umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodan isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stajala je potom 30 minuta, nakon čega je slijedilo mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

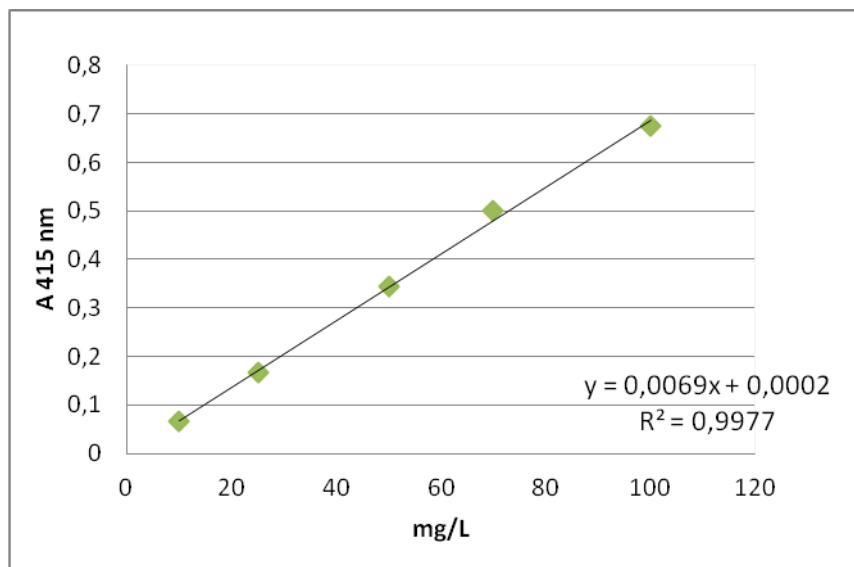
Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca

Pripremljena je otopina standarda kvercetina koncentracije 100 mg L⁻¹. Od te otopine standarda rađena su razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da je otpipetirano redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom nadopunjeno do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznosile su 10, 25, 50 i 75 mg L⁻¹. Također je za analizu uzeta i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg L⁻¹.

Iz svake tikvice otpipetirano je redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta korišteni 100%-tni metanol te je umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodan isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stajala je potom 30 minuta, nakon čega je slijedilo mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtan je baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 13.).



| mg L ⁻¹ | A 415 nm |
|--------------------|----------|
| 10 | 0,066 |
| 25 | 0,167 |
| 50 | 0,344 |
| 70 | 0,5 |
| 100 | 0,674 |

Slika 13. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih flavonoida

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0069 \times X + 0,0002$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg L⁻¹).

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje je provodeno u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu je intenzitet nastalog obojenja mjeren pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Etanol, 96%
- Klorovodična otopina masene koncentracije $1 \text{ g L}^{-1} \text{ HCl}$ (u 96% etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) je otpipetirano u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno etanolom (96%) do oznake.

- Klorovodična otopina masene koncentracije $2 \text{ g L}^{-1} \text{ HCl}$

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) je otpipetirano u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno destiliranom vodom do oznake.

- Standard kafeinske kiseline (100 mg L^{-1})

Priprema: Najprije je pripremljena otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg L^{-1} . Odvagano je 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te je pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljena u datom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno 80%-tnim metanolom.

- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})

Priprema: Najprije je pripremljena otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg L^{-1} . Odvagano je 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te je pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljen u datom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno metanolom.

- Standard klorogenske kiseline (100 mg L^{-1})

Priprema: Najprije je pripremljena otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg L^{-1} . Odvagano je 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te je pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopljena u datom volumenu, a potom do oznake nadopunjeno metanolom.

Priprema uzorka

Ekstrakti su pripremljeni kao što je opisano u postupku ekstrakcije.

Razrijeđenja:

Ekstrakti lista maslačka dobiveni pomoću ultrazvučne ekstrakcije prije analize razrijeđeni su 2,5 X.

Ekstrakti korijena maslačka sa 50% metanolom dobiveni pomoću ultrazvučne ekstrakcije, za određivanje apsorbancije na 320 nm, prije analize nisu razrijeđivani.

Za analizu ekstrakta korijena maslačka sa 50% metanolom, za određivanje apsorbancije na 360 nm, korišteno je 750 μL ekstrakta.

Za analizu ekstrakta korijena maslačka sa 70% metanolom, za određivanje apsorbancije na 320 nm, korišteno je 500 μL ekstrakta.

Za analizu ekstrakta korijena maslačka sa 70% metanolom, za određivanje apsorbancije na 360 nm, korišteno je 1250 μL ekstrakta.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija je mjerena na 320 i 360 nm. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta korišteno otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje

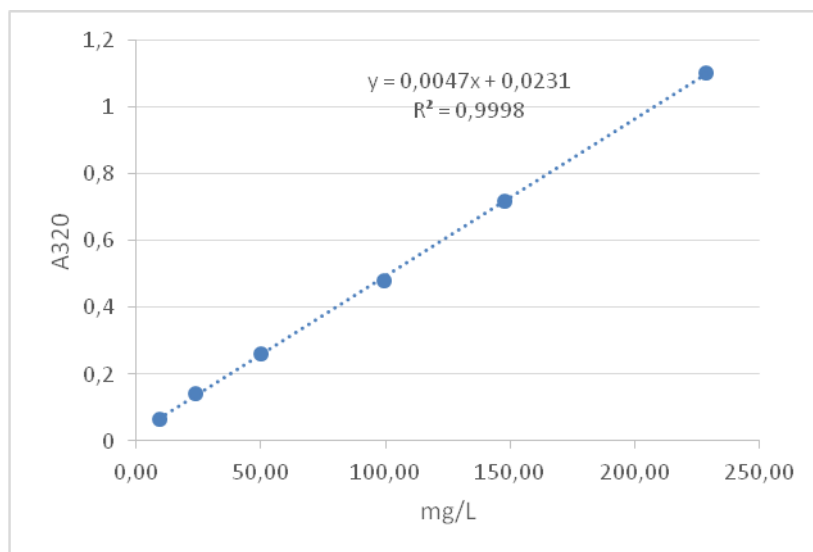
Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodena je pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu (Slika 14. i 15.), dok je kvantifikacija ukupnih flavonola provodena pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin (Slika 16.).

a) Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg L^{-1} priređena su razrjeđenja: 9,23, 23,99, 49,82, 99,63, 147,60, 228,78 mg L^{-1} .

U staklenu epruvetu otpipetirano se redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta korišten 80%-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija je mjerena na 320 nm.



| mg L ⁻¹ | A 320 nm |
|--------------------|----------|
| 9,23 | 0,065 |
| 23,99 | 0,141 |
| 49,82 | 0,262 |
| 99,63 | 0,481 |
| 147,60 | 0,718 |
| 228,78 | 1,104 |

Slika 14. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0047X + 0,0231$$

gdje je:

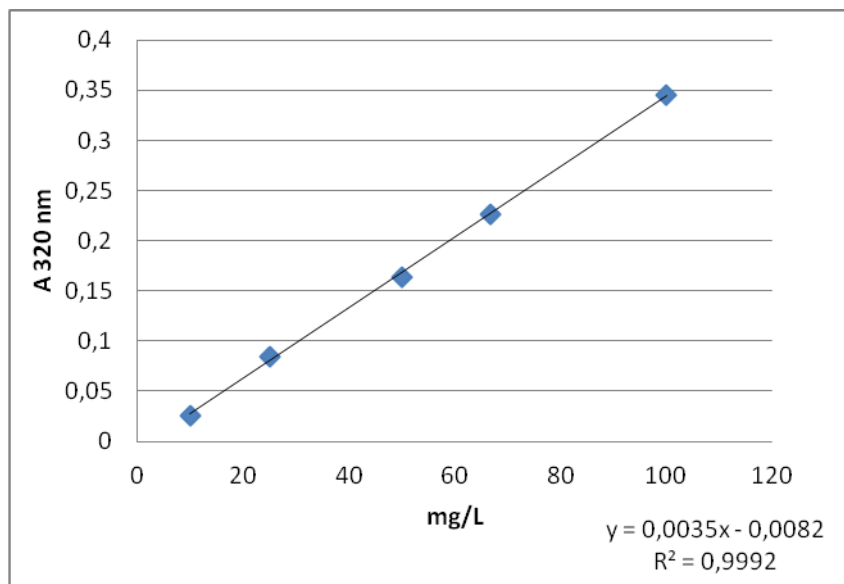
Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija kafeinske kiseline (mg L⁻¹).

Klorogenska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg L⁻¹ priređena su razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg L⁻¹ na način da je iz otopine alikvota otpipetirano redom: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopunjeno 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta korišten 80%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija je mjerena na 320 nm.



| mg L^{-1} | A 320 nm |
|--------------------|----------|
| 10 | 0,025 |
| 25 | 0,085 |
| 50 | 0,164 |
| 66,7 | 0,227 |
| 100 | 0,345 |

Slika 15. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035X - 0,0082$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

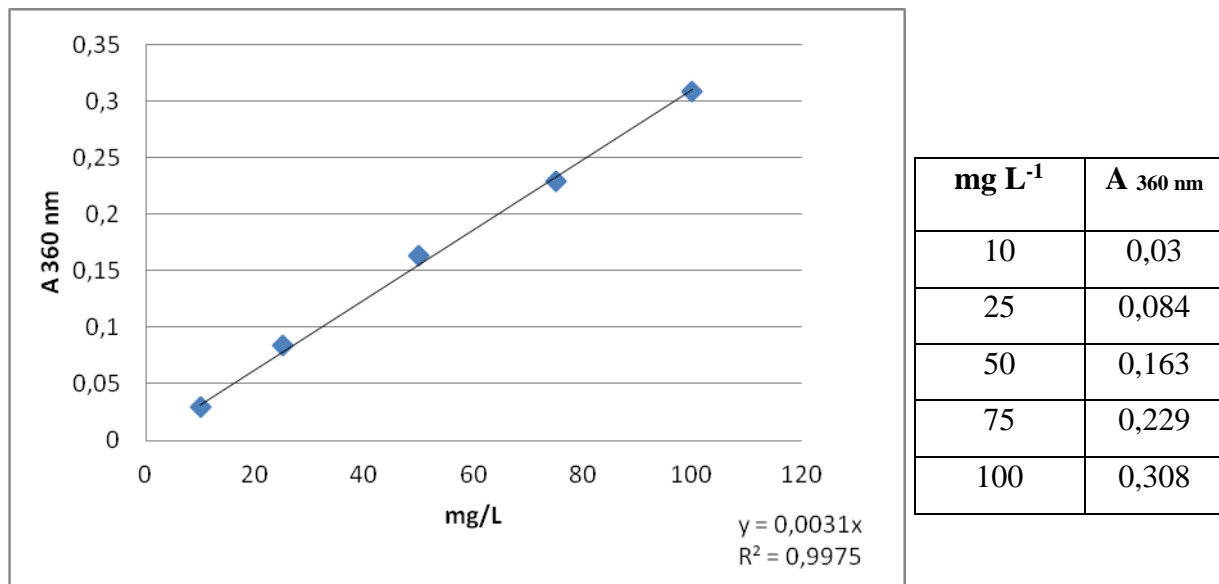
X – koncentracija klorogenske kiseline (mg L^{-1}).

b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg L^{-1} priređena su razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg L^{-1} na način da je iz otopine alikvota otpipetirano redom: 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL i nadopunjeno

100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta korišten 100%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija je mjerena na 360 nm.



Slika 16. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih flavonola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0031 X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg L^{-1}).

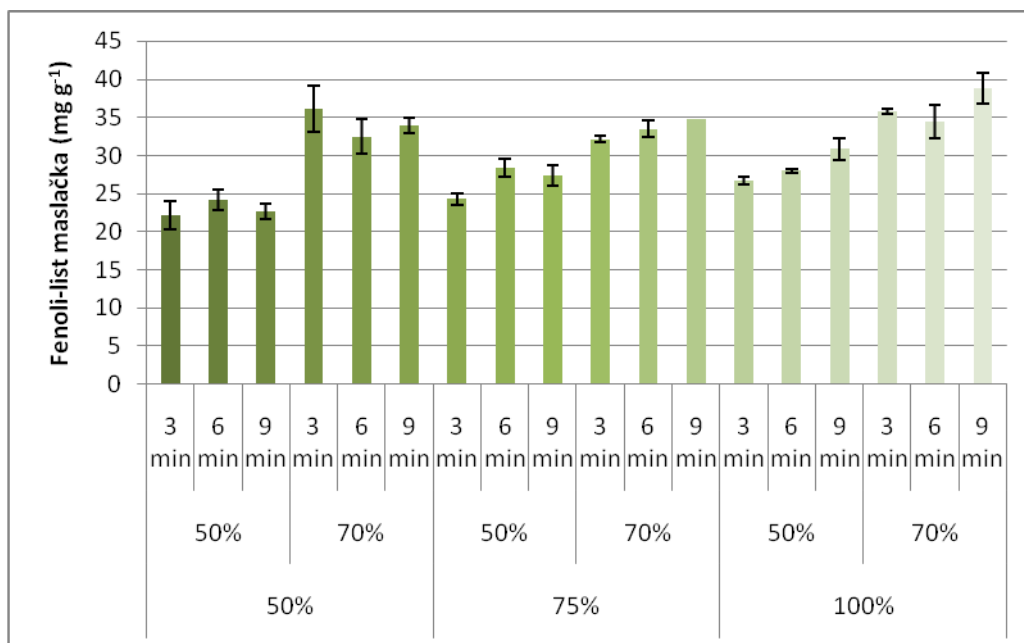
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom dijelu bit će prikazani rezultati određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijskim metodama iz ekstrakta lista i korijena maslačka dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom visokog intenziteta.

Rezultati provedenih spektrofotometrijskih mjerenja o udjelu ukupnih fenola u ovisnosti o vremenu obrade (3, 6, 9 min), amplitudi (50%, 75%, 100%) i o upotrijebljenom otapalu (50%-tna i 70%-tna vodena otopina metanola), obrađeni su u MS Excel programskom paketu. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću stupičastih dijagrama uređeni tako da je na y-osi koncentracija određenih spojeva, a na x-osi su prikazani uvjeti ekstrakcije (vrijeme trajanja, amplituda i polarnost otapala). Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD (standardna devijacija).

4.1. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA

Na slikama 17. i 18. prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola u listu i korijenu maslačka u ovisnosti o utjecaju vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min), utjecaju vodene otopine metanola (50%, 70%) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%).



Slika 17. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u listu maslačka (mg GAEg⁻¹) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Udio ukupnih fenola u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 29,504 mgGAE g⁻¹, te se povećanjem vremena ekstrakcije povećavao. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 30,164 mgGAE g⁻¹, a dok je nakon 9 minuta postignut najveći udio ukupnih fenola, u prosjeku je iznosio 31,418 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije je utjecalo na masene udjele fenolnih spojeva lista maslačka.

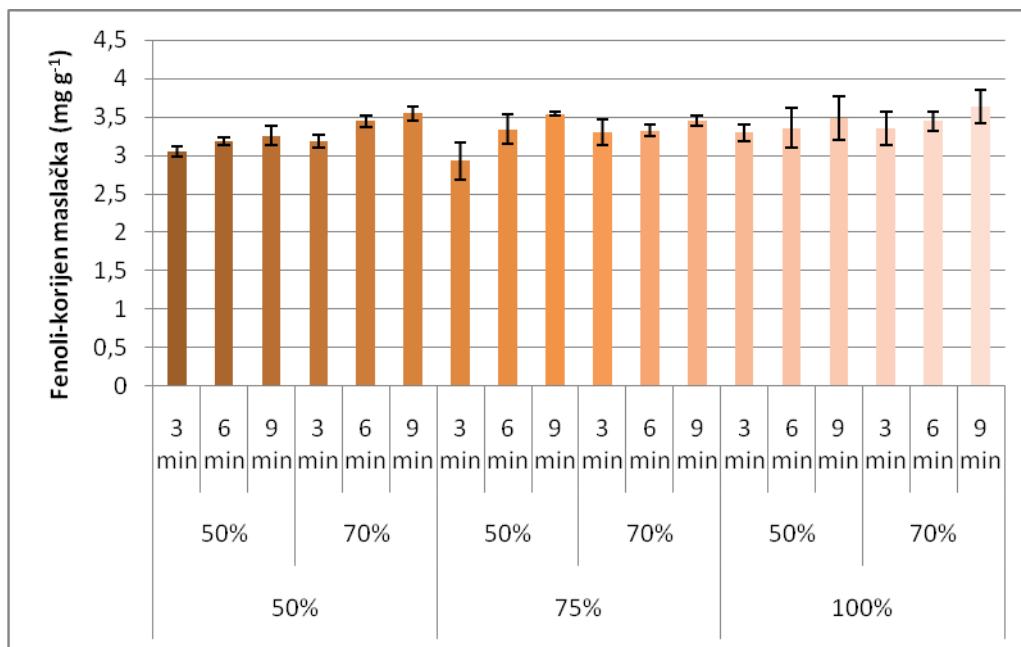
Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih fenola u prosjeku 26,057 mgGAE g⁻¹, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih

fenola u prosjeku od 34,666 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da povećanje udjela MeOH daje veći prinos ukupnih fenola tijekom ekstrakcije.

Na temelju dobivenih podataka možemo vidjeti da je maseni udio ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 20,517 mgGAE g⁻¹, primjenom amplitude 75% i 100% vrijednosti se nisu značajno razlikovale (22,195 mgGAE g⁻¹, 22,543 mgGAE g⁻¹). Na temelju rezultata može se zaključiti da je povećanje amplitude utjecalo na veću učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista maslačka.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos fenola u listu maslačka dobiven pri amplitudi od 100%, primjenom 70% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Fecka i Turek (2008) su proveli ekstrakciju fenolnih kiselina i flavon glikozida iz mažurana i timjana u ultrazvučnoj kupelji primjenom 30, 50 i 70 % vodenih otopina metanola u trajanju 15-30 minuta te ekstrakciju u vodenoj kupelji primjenom metanola. Najveći ekstrakcijski kapacitet je postignut primjenom kupelji s binarnim sustavom otapala koja su sadržavala veći udjel vodene faze u organskoj, tj. 50 % metanola kroz 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji. U najvećoj koncentraciji su izolirali derivate kava kiseline i luteolin glikozide.



Slika 18. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u korijenu maslačka (mg GAE g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih fenola u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $3,183 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio $3,345 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $3,486 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na masene udjele fenolnih spojeva korijena maslačka.

Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih fenola u prosjeku $3,268 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih fenola u prosjeku od $3,407 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da povećanje udjela MeOH ne utječe značajno na povećanje prinosa ukupnih fenola ekstrahiranih iz korijena maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih fenola ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio $3,276 \text{ mgGAE g}^{-1}$, primjenom amplitude 75% iznosio je $3,312 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je primjenom amplitude 100% maseni udio ukupnih fenola u prosjeku iznosio $3,426 \text{ mgGAE g}^{-1}$.

g⁻¹. Povećanje amplitude nije značajno poboljšalo ekstrakciju fenolnih spojeva iz korijena maslačka.

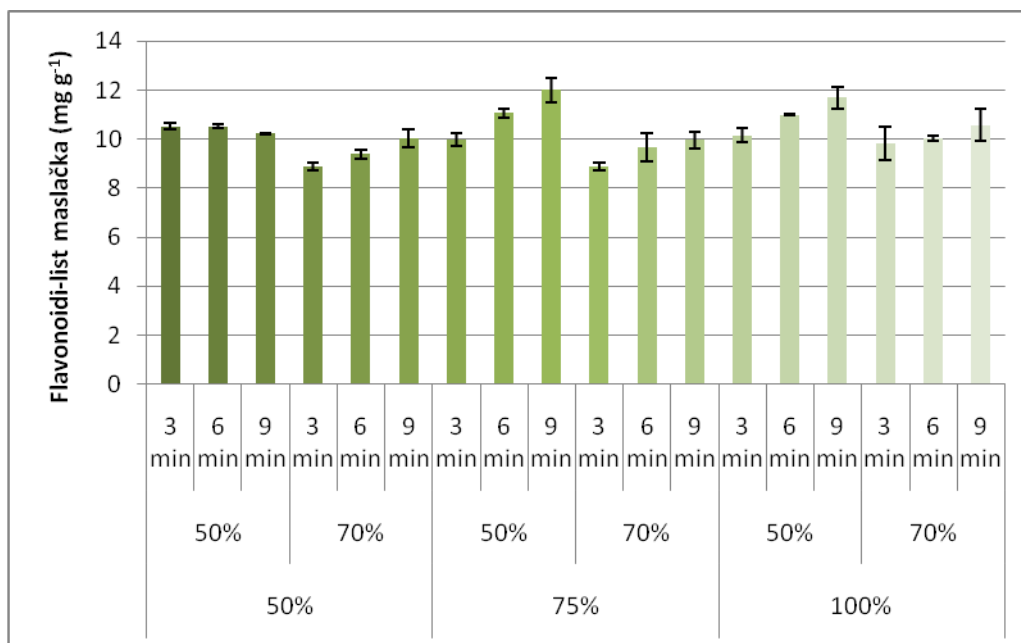
Na temelju grafičkih prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos fenola u korijenu maslačka dobiven pri amplitudi od 100%, primjenom 70% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Rodrigues i Pinto (2007) su proveli ekstrakciju fenola iz praha kokosove ljuske koristeći 50% etanol, pri vremenu trajanja ekstrakcije od 20 do 60 minuta u ultrazvučnoj kupelji i zabilježen je 3 puta veća prinos u usporedbi sa kontrolnom ekstrakcijom, pod optimiranim uvjetima (25 kHz / 150 W / 30°C / 20 min).

Rezultati pokazuju da velike količine fenola mogu biti ekstrahirane iz kokosove ljuske pomoću ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, te da vrijeme trajanja ekstrakcije ima najveći utjecaj. Tijekom našeg istraživanja najveći prinos fenola također je dobiven najdužim vremenom trajanja ekstrakcije.

4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Na slikama 19. i 20. prikazani su maseni udjeli ukupnih flavonoida u listu i korijenu maslačka u ovisnosti o utjecaju vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min), utjecaju vodene otopine metanola (50%, 70%) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%).



Slika 19. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u listu maslačka (mg GAEg⁻¹) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

Udio ukupnih flavonoida u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio 9,705 mgGAE g⁻¹. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio 10,273 mgGAE g⁻¹, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio 10,746 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije u trajanju od 6 i 9 min, u odnosu na trajanje ekstrakcije od 3 min, je imalo malo veći učinak na masene udjele flavonoida.

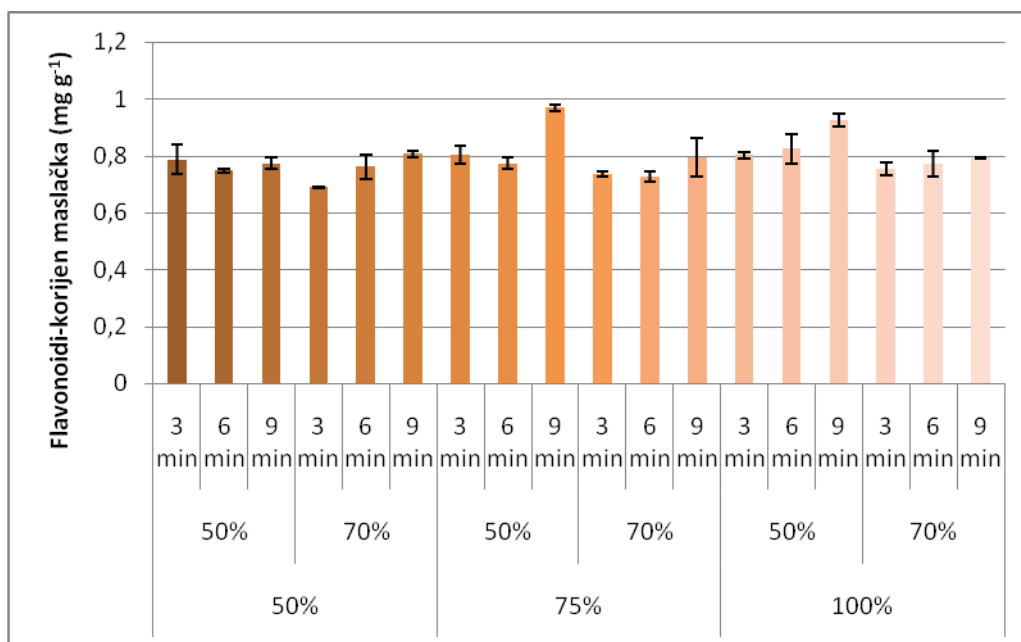
Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih flavonoida u prosjeku 10,791 mgGAE g⁻¹, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih flavonoida u prosjeku od 9,692 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da

povećanje udjela MeOH utječe na smanjenje prinosa ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz lista maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih flavonoida ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 9,924 mgGAE g⁻¹, primjenom amplitude 75% iznosio je 10,260 mgGAE g⁻¹, dok je primjenom amplitude 100% u prosjeku iznosio 10,541 mgGAE g⁻¹. Na temelju rezultata može se zaključiti da povećanje amplitude nije utjecalo na veću učinkovitost ekstrakcije flavonoida iz lista maslačka.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos flavonoida u listu maslačka dobiven pri amplitudi od 75%, primjenom 50% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Različite metode ekstrakcije korištene su za ekstrakciju flavonoida maslačka (*Taraxacum officinale* L.) kao što su konvencionalna ekstrakcija, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (Sun i sur., 2014). U istraživanju je korišten etanol (30, 40, 50%), a vrijeme trajanja ekstrakcije iznosilo je 30, 40 i 50 minuta. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pokazala se kao najbolja metoda. Prema rezultatima iskorištenje ekstrakcije raste s porastom koncentracije etanola od 30 do 39,6%, ali iznad 39,6%, iskorištenje ekstrakcije se smanjuje s povećanjem koncentracije etanola. Učinak ekstrakcije se povećava kada se vrijeme ekstrakcije povećalo sa 30 na 43,8 min i nakon dužeg vremena počela lagano opadati. Maksimalni učinak ekstrakcije (2,62%), je postignut kada su kada omjer tekuća-kruta tvar iznosi 69,5, a vrijeme ekstrakcije 43,8 min. U našem istraživanju također je vidljivo da se iskorištenje ekstrakcije smanjuje s povećanjem koncentracije metanola, te povećava s dužim vremenom ekstrakcije.



Slika 20. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u korijenu maslačka (mg GAE g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih flavonoida u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $0,762 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio $0,768 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $0,845 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na masene udjele flavonoida.

Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih flavonoida u prosjeku $0,823 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih flavonoida u prosjeku od $0,759 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da se povećanje udjela MeOH smanjuje prinos ukupnih flavonoida ekstrahiranih iz korijena maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih flavonoida ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio $0,761 \text{ mgGAE g}^{-1}$, primjenom amplitude 75% iznosio je $0,801 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je primjenom amplitude 100% u prosjeku iznosio $0,812 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Na temelju rezultata može se zaključiti da povećanje amplitude sa 50% na 75% nije drastično utjecalo na veću

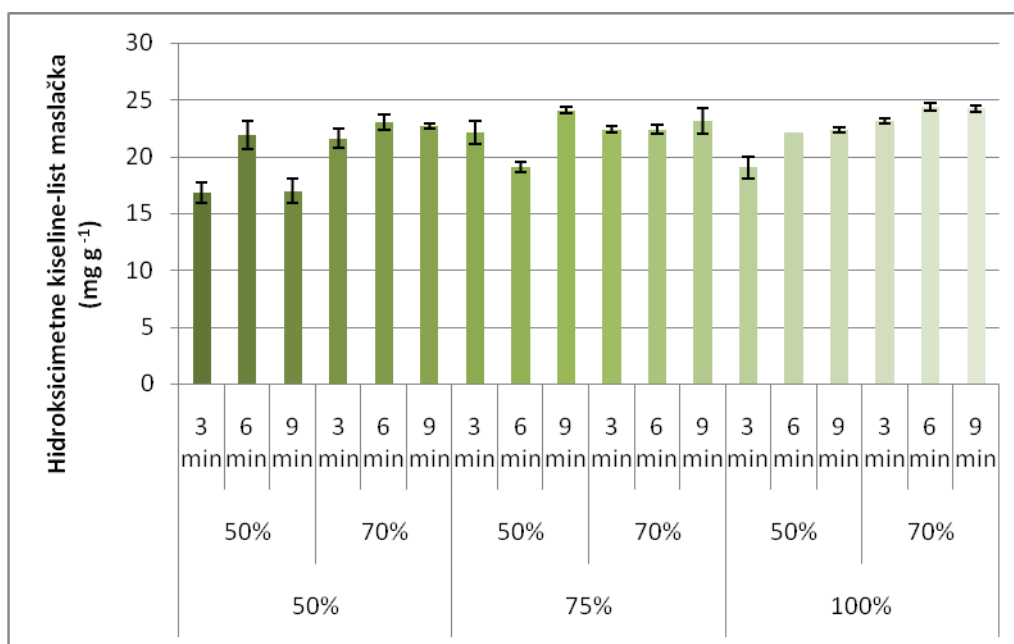
učinkovitost ekstrakcije flavonoida iz korijena maslačka, između amplituda od 75% i 100% nema razlike.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos flavonoida u korijenu maslačka dobiven pri amplitudi od 75%, primjenom 50% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Ekstrakcija flavonoida iz sjemena gloga potpomognuta ultrazvukom provodila se u ultrazvučnoj kupelji, frekvencije 40 kHz, snage 40 W. Rezultati istraživanja pokazuju da je UAE bila učinkovita i pouzdana za ekstrakciju flavonoida iz sjemena gloga. Optimalni uvjeti za ekstrakciju su pri temperaturi 65° C, vremenu trajanja 37 min i korištenjem 72% etanola. Duže vrijeme ekstrakcije rezultiralo je većim prinosom flavonoida (Pan i sur., 2012).

4.3. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA

Na slikama 21. i 22. prikazani su maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina u listu i korijenu maslačka u ovisnosti o utjecaju vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min) utjecaju vodene otopine metanola (50%, 70%) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%).



Slika 21. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u listu maslačka (mg GAEg^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $20,869 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku iznosio $22,143 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $22,243 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, produženjem vremena sa 3 min na 6 min povećao se maseni udio hidroksicimetnih kiselina, dok nema značajne razlike u vremenu trajanja ekstrakcije između 6 i 9 minuta.

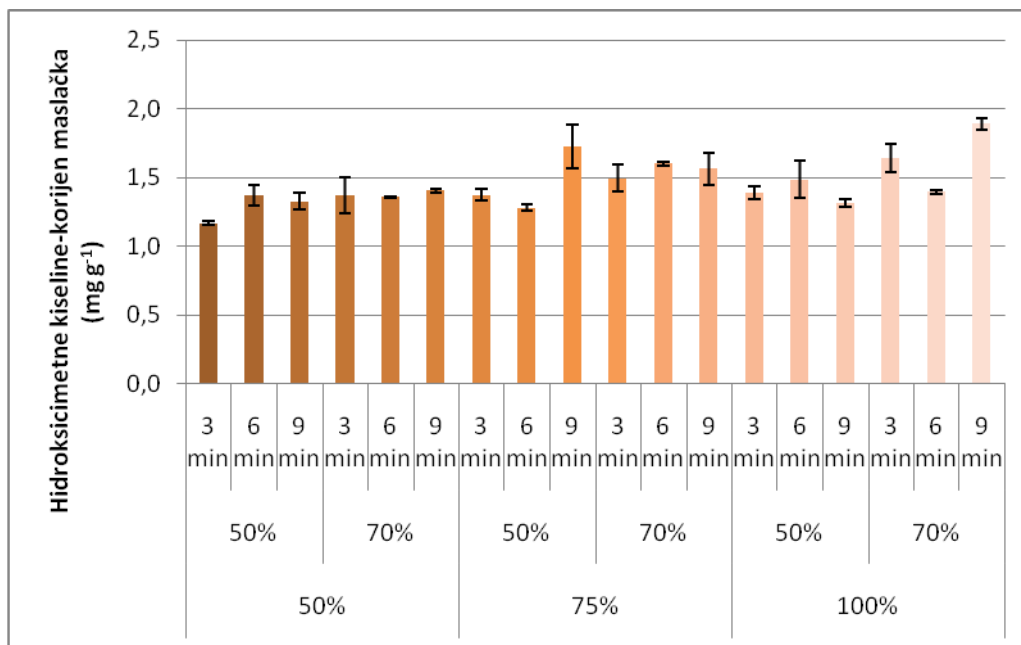
Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prosjeku $20,505 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH prinos

ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prosjeku 22,998 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da se povećanje udjela MeOH povećava prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz lista maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 20,517 mgGAE g⁻¹, primjenom amplitude 75% iznosio je 22,195 mgGAE g⁻¹, dok je primjenom amplitude 100% u prosjeku iznosio 22,543 mgGAE g⁻¹. Na temelju rezultata može se zaključiti da je povećanje amplitude na 75% utjecalo na veću učinkovitost ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina iz lista maslačka, no između amplituda od 75% i 100% nema značajne razlike.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos hidroksicimetnih kiselina u listu maslačka dobiven pri amplitudi od 100%, primjenom 70% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 6 min.

Stylianou i sur. (2014) su proveli istraživanje kako bi utvrdili optimalne parametre za ekstrakciju kafeinske kiseline iz lista maslačka. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji, frekvencije 35 kHz, pri različitim temperaturama (35°C, 45°C, 55°C, 65°C), pri vremenu trajanja ekstrakcije od 15 min, 30 min, 45 min i 60 min, te je korištena vodena otopina EtOH u različitim koncentracijama (50%, 60%, 70%, 80%). Najveći prinos kafeinske kiseline bio je pri temperaturi od 55°C, vremenu trajanja ekstrakcije od 45 minuta i korištenjem 50% etanola. Kraćim trajanjem ekstrakcije postignut je veći prinos HCK, što je vidljivo i u našem istraživanju.



Slika 22. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina u korijenu maslačka (mg GAE g^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $1,407 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku iznosio $1,415 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $1,538 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na masene udjele hidroksicimetnih kiselina.

Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prosjeku $1,383 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina u prosjeku $1,525 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da povećanje udjela MeOH ne povećava značajno prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz korijena maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio $1,334 \text{ mgGAE g}^{-1}$, primjenom amplitude 75% iznosio je $1,506 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je primjenom amplitude 100% u prosjeku iznosio $1,521 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Na temelju rezultata može se zaključiti da je povećanje amplitude na 75% utjecalo

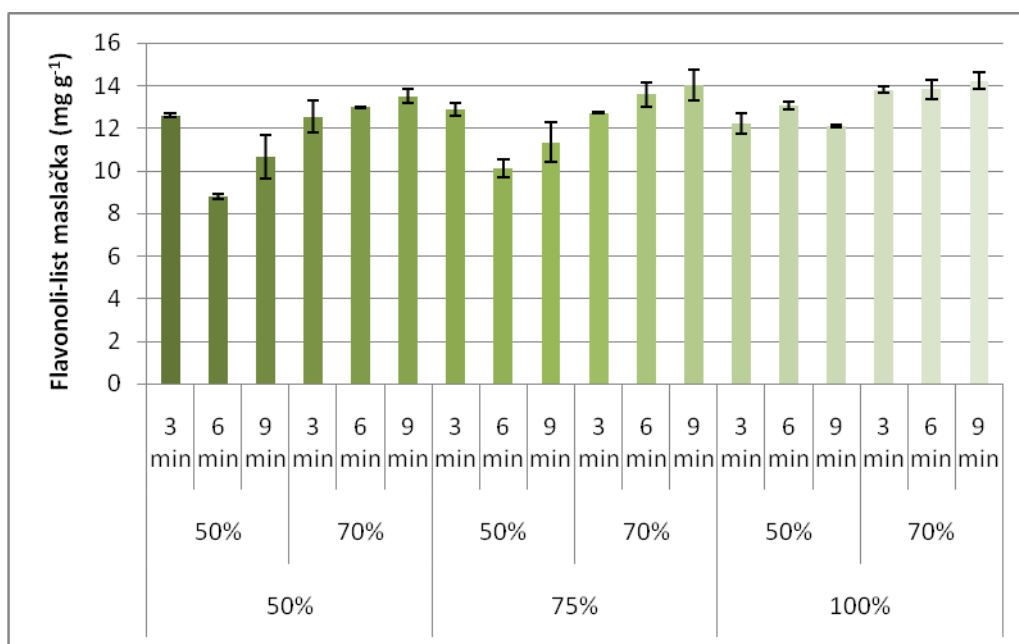
na veću učinkovitost ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina iz korijena maslačka, no između amplituda od 75% i 100% nema značajne razlike.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos hidroksicimetnih kiselina u korijenu maslačka dobiven pri amplitudi od 100%, primjenom 70% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Ma i suradnici (2008) su istraživali učinak ultrazvuka na ekstrakciju cimetine i benzojeve kiseline iz kore citrusa (*Citrus unshiu* Marc). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji, frekvencije 60 kHz, snage 30 W. Istraživani su različiti parametri: vrijeme trajanja ekstrakcije (10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min), temperatura (15°C, 30°C, 40°C), te je korišten 80 % metanol. Rezultati su pokazali da su prinosi povećani s dužim vremenom trajanja ekstrakcije pri nižoj temperaturi, što je u skladu i s našim rezultatima.

4.4. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOLA

Na slikama 23. i 24. prikazani su maseni udjeli ukupnih flavonola u listu i korijenu maslačka u ovisnosti o utjecaju vremena trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min) utjecaju vodene otopine metanola (50%, 70%) te utjecaju amplitude (50%, 75%, 100%).



Slika 23. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonola u listu maslačka (mg GAEg^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih flavonola u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $12,797 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku iznosio $12,064 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $12,645 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije utjecalo na masene udjele flavonola.

Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih flavonola u prosjeku od $11,535 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih

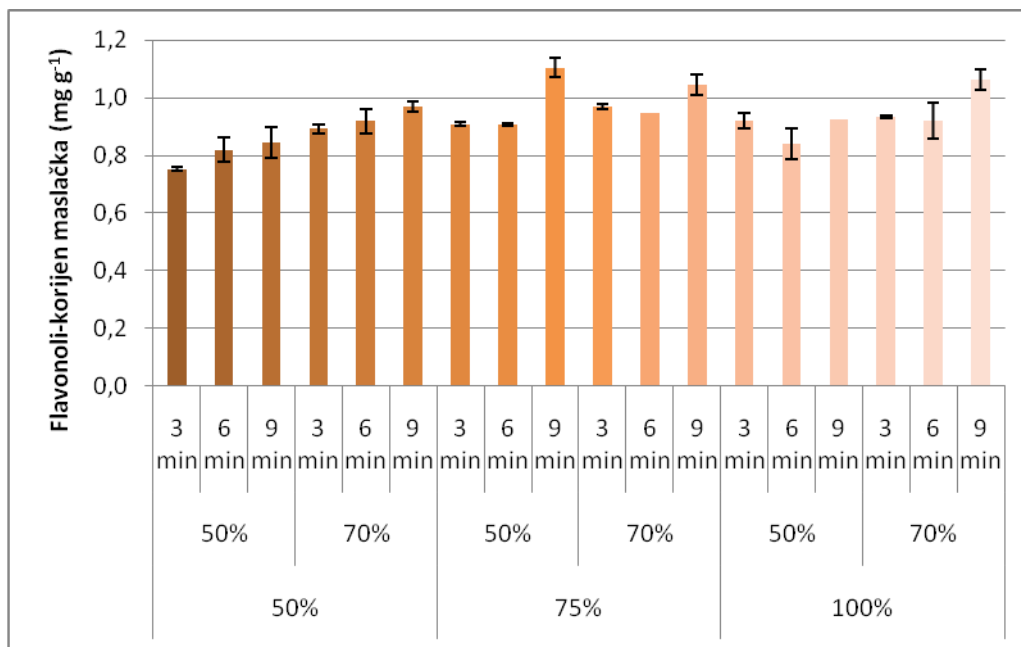
flavonola u prosjeku od 13,645 mgGAE g⁻¹. Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da povećanje udjela MeOH daje veći prinos ukupnih flavonola tijekom ekstrakcije.

Na temelju dobivenih podataka možemo vidjeti da je maseni udio flavonola ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio 11,849 mgGAE g⁻¹, primjenom amplitude 75% iznosio je 12,454 mgGAE g⁻¹ i primjenom amplitude 100% iznosio je 13,203 mgGAE g⁻¹. Na temelju rezultata može se zaključiti da se povećanjem amplitude povećao učinak ekstrakcije flavonola iz lista maslačka.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos flavonola u listu maslačka dobiven pri amplitudi od 100%, primjenom 70% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Istraživan je učinak ultrazvuka na različitim frekvencijama u rasponu od 40 do 120 kHz, snage od 50 do 150 W i vremenu trajanja od 5 do 25 min, korištenjem vode kao otapala na udio ukupnih flavonola u komini grožđa (Gonzalez-Centeno i sur., 2014). Prema rezultatima, najniže frekvencije (40 kHz), a najviša snaga (150 W) pri vremenu od 25 minuta dala je najbolje rezultate ekstrakcije. Kao što je vidljivo, u njihovom kao i u našem istraživanju najveći prinos flavonola ostvaren je najdužim vremenom ekstrakcije.

Uspoređivani su učinci različitih ekstrakcijskih tehnika (konveacionalna i ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija) na sadržaj polifenola u ekstraktima dobivenih od komine jabuka (Pingret i sur., 2012.). Uzorci podvrgnuti ekstrakciji sadržavali su 5 do 35 g suhe tvari, voda je korištena kao otapalo. Značajan porast (30%) u sadržaja polifenola (procijanidini, flavonoli) pronađen nakon UAE u usporedbi s konveacionalnom ekstrakcijom. Optimalni uvjeti su 25 kHz / 150 W / 30-55 min pri 23°C.



Slika 24. Grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonola u korijenu maslačka (mg GAEg^{-1}) dobivenih metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Rezultati su srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm SD.

Udio ukupnih flavonola u ekstraktu dobivenih nakon 3 minute u prosjeku je iznosio $0,895 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Nakon 6 minuta u prosjeku je iznosio $0,891 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je nakon 9 minuta u prosjeku iznosio $0,991 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na masene udjele flavonola.

Primjenom 50% vodene otopine MeOH ostvaren je prinos ukupnih flavonola u prosjeku $0,891 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je kod primjene 70% vodene otopine MeOH ostvaren prinos ukupnih flavonola u prosjeku od $0,961 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da povećanje udjela MeOH ne utječe na prinos ukupnih flavonola ekstrahiranih iz korijena maslačka.

Rezultati pokazuju da je maseni udio ukupnih flavonola ostvaren primjenom amplitude od 50% u prosjeku iznosio $0,865 \text{ mgGAE g}^{-1}$, primjenom amplitude 75% iznosio je $0,979 \text{ mgGAE g}^{-1}$, dok je primjenom amplitude 100% u prosjeku iznosio $0,933 \text{ mgGAE g}^{-1}$. Na temelju rezultata može se zaključiti da povećanje amplitude sa 50% na 75% nije drastično utjecalo na veću

učinkovitost ekstrakcije flavonola iz korijena maslačka, između amplituda od 75% i 100% nema razlike.

Na temelju grafičkog prikaza rezultata možemo zaključiti da je najveći prinos flavonola u korijenu maslačka dobiven pri amplitudi od 75%, primjenom 50% vodene otopine MeOH, te pri vremenu trajanja ekstrakcije od 9 min.

Otpad od luka je jedan od najbogatijih izvora kvercetina (flavonol). Jang i suradnici (2013) su proveli istraživanje u kojem su izolirali kvercetin iz otpada luka pomoću UAE. Korišten je 40% -80% etanol, pri temperaturi od 40°C-60°C i vremenu trajanja od 15 min do 35 min. U ovom istraživanju, autori su dobili najveći prinos polifenola (11,08 mg g⁻¹ suhe mase) pomoću 59% etanola pri 49°C, 40 kHz, 469 W i 25 min. U našem istraživanju veći prinos flavonola ostvaren je primjenom otapala manje polarosti.

5. ZAKLJUČCI

- Povećanjem vremena trajanja (3, 6 i 9 minuta) ekstrakcije potpomognute ultrazvukom došlo je do povećanja prinosa ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola te ukupnih hidroksicimetnih kiselina ekstrahiranih iz lista i korijena maslačka (*Taraxacum officinale*). Najveći prinos ostvaren je u vremenu trajanja ekstrakcije od 9 minuta.
- Bolja učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenola, flavonola, te hidroksicimetnih kiselina kod lista maslačka postignuta je primjenom otapala sa većim udjelom metanola, 70%, dok je kod ekstrakcije ukupnih flavonoida iz lista maslačka veću učinkovitost imao 50% metanol. Kod korijena maslačka ekstrakcija fenola i HCK je bila bolja primjenom 70% metanola, dok je ekstrakcija flavonoida, samim time i flavonola bila bolja primjenom 50% metanola.
- Bolja učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina iz lista i korijena maslačka ostvareni su povećanjem amplitude (50%, 75% i 100%). Kod lista i korijena maslačka bolje iskorištenje ekstrakcije ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina je ostvareno primjenom amplitude od 100%, dok je ekstrakcija ukupnih flavonoida bila bolja primjenom amplitude od 75%. Ukupni flavonoli u listu bolje su se ekstrahirali primjenom amplitude od 100%, dok su ukupni flavonoli u korijenu bolje ekstrahirani primjenom amplitude od 75%.
- Iz ovog istraživanja vidljivo je da je maseni udio ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina, te ukupnih flavonoida i flavonola do 10 puta veći u listu nego u korijenu maslačka.
- Novije metode ekstrakcije, kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom imaju veliki potencijal primjene u ekstrakciji fenolnih spojeva i to uz kraće vrijeme ekstrakcije, uštedu energije, smanjenje količine primijenjenog organskog otapala, te korištenje ekološki prihvatljivijih otapala.

6. LITERATURA

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261-265.
- Anonymus 1. <http://ifood.tv> Pristupljeno 09. srpnja 2016
- Anonymus 2. <http://www.dragonflyherbals.com> Pristupljeno 09. Srpnja 2016
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.
- Barbosa-Canovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (2005)/Novel Food Processing Technologies, CRC Press, Boca Raton.
- Bosiljkov, T., Brnčić, M., Tripalo, B., Karlović, S., Ukrainczyk, M., Ježek, D., Rimac Brnčić, S. (2009) Impact of ultrasound-enhanced homogenization on physical properties of soybean milk, Chemical Engineering Transactions Proceedings of the 9th International Conference on Chemical and Process Engineering, May 10-13, Rome, Italy, **17**, 1029-1034.
- Brnčić, M., Herceg Ljubić, I., Šubarić, D., Badanjak, M., Rimac Brnčić, S., Tripalo, B., Ježek, D., Cerovec, P., Herceg, Z. (2009) Influence of power ultrasound on textural properties of corn starch gels. Proceedings of the 5th ISFRS-International Symposium on Food Rheology and Structure, June 15-18, Zürich, Switzerland.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Ježek, D., Semenski, D., Drvar, N., Ukrainczyk, M. (2006) Effect of twin-screw extrusion parameters on mechanical hardness of direct-expanded extrudates, *Sadhana-Acad.P.Eng.S.* **31**(5), 527-536.
- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment, *African Journal of Biotechnology*, **9**, (41), 6907-6915.
- Brnčić, M., Markučić, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009a) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* **4**, 18-22.

- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009b) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* **4** (1-2), 32-37.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**(3), 178-182.
- Chemat, F., Grondin, I., Shum Cheong Sing, A., Smadja, J. (2004) Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* **11**, 13–15.
- Chen, H.J., Inbaraj, B.S., Chen, B.H. (2012) Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(1), 260-285.
- Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **6**(3): 89-99.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., Mofardin, I., (2013) Ultrasound-assisted infrared drying of pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.* **36**, 397–406.
- Eskilsson, S., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A.* **902**, 227-250.
- Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**, 1039-1053.
- Fennema, O.R. (1996) *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc. , New York
- Fruhbeck, G. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality. *Br. Med. J.* **312**, 1479.
- González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado, A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Int. Life Sci. Inst.* **70**(9), 534-547.
- Gonzalez-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rossello, C., & Femenia, A. (2014) Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) e a response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, **21**(6), 2176-2184.

- Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, C. S. (2004) Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass. *J. Supercrit. Fluids.* **33**, 223-233.
- Grlić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb
- Harborne, J.J., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chichester.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59** (1), 65-69.
- Herceg, Z., Lelas, V., Brnčić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2004) Fine Milling and Micronization of Organic and Inorganic Materials Under Dynamic Conditions, *Powder Technology* **139**, 111-117.
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**(12), 1238-1247.
- Jang, M., Asnin, L., Nile, S. H., Keum, Y. S., Kim, H. Y., & Park, S. W. (2013) Ultrasound-assisted extraction of quercetin from onion solid wastes. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**(2), 246-252.
- Jeličić, R., Lisak, K., Božanić, R. (2012) Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja na sastojke i svojstva mlijeka. *Mljekarstvo* 62 (1), 3-13.
- Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea Europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* **123**, 175-182.
- Kuijpers, W.A., van Eck, D., Kemmere, M.F., Keurentjes, J.T.F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide, *Science* 298 (5600), 1969-1971.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731-737.
- Luque de Castro, M. D.; Luque Garcia, J. L. (2003) Automation of sample preparation. *Comprehensive Analytical Chemistry* **41**, 649-680.

- Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., & Ye, X.-Q. (2008) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, **16**(1), 57-62.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jime´nez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–747.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* **3**, 253.
- McClements, D.J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293-299.
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. (2012) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem.* **19**, 486-490.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 270-278.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Bourvellec, C. L., Renard, C. M. G. C., & Chemat, F. (2012) Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, **111**(1), 73-81.
- Popescu, M. L., Mihaela, D., Ursache, D. D. (2010) Contributions to the Pharmacognostical and Phytobiological Study on *Taraxacum officinale* (L.) Weber, 45. *Farmacia*, **58** (5), 646-653.
- Povey, M., Mason, T.J. (1995) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London.
- Raso, J., Manas, P., Pagan, R., Sala, F. J. (1999) Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **5**, 157- 162.
- Robards K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401-436.

- Rodrigues, S., & Pinto, G. A. S. (2007) Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *Journal of Food Engineering*, **80**(3), 869-872.
- Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G. (2003) Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A*. **1012**, 119-128.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**(4), 828-834.
- Stylianou, N., Gekas, V., Anghel, A.I., Istudor, V. (2014) Optimum extraction parameters of caffeic acid derivatives using ultrasound-assisted extraction. *Farmacia* **62** (6), 1223-1229.
- Sun, Z., Su, R., Qiao, J., Zhao, Z., Wang, X. (2014) Flavonoids Extraction from *Taraxacum officinale* (Dandelion): Optimisation Using Response Surface Methodology and Antioxidant Activity. *Journal of Chemistry*, 2014, 1-7.
- Willfort, R. (2002): *Ljekovito bilje i njegova upotreba*, Erudit, Zagreb
- Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2001) Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **1**, 211-218.
- Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008) ultrasound assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, **62**, 192-198.

