

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima ružmarina (*Rosmarinus officinalis*)

Buratović, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:344515>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Andrea Buratović
6817/PT

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U ACETONSKIM
EKSTRAKTIMA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima ružmarina
(*Rosmarinus officinalis*)

Andrea Buratović, 0058203875

Sažetak: Budući da je vrlo mali broj znanstvenih radova pokazao da se biljni ekstrakti mogu koristiti kao potencijalni inhibitori korozije metala i metalnih legura, cilj ovog rada bio je pripremiti acetonske ekstrakte lišća ružmarina, koji će se koristiti u daljnjim postupcima antikorozijskog testiranja. Dakle, u ovom radu su pripremljeni acetonski (30 i 70 % v/v) ekstrakti lišća ružmarina primjenom ultrazvučne ekstrakcije pri vremenu od 3, 6 i 9 min i amplitudi od 60, 80 i 100 %. Također, upotrijebljena je i ekstrakcija refluksiranjem pri vremenu od 1,5 i 3 h. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima određen je UV/Vis spektrofotometrijom. Na temelju dobivenih rezultata određeni su optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije (70 %-tni aceton, 100 %-tna amplituda i vrijeme od 9 min), koji će se koristiti u daljnjim pripravama ekstrakata pri ispitivanju njihova antikorozijskog djelovanja.

Ključne riječi: ekstrakcija, korozija, polifenoli, ružmarin, ultrazvuk

Rad sadrži: 31 stranica, 10 slika, 9 tablica, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Pomoć pri izradi: Darjan Pipić, tehnički suradnik

Datum obrane: 19. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food technology

Spectrofotometric determination of polyphenols from acetone extracts of rosemary
(*Rosmarinus officinalis*)

Andrea Buratović, 0058203875

Abstract: Due to the fact that few scientific papers have shown that plant extracts could be used as potential corrosion inhibitor, the object of this work was preparation of acetone rosemary extracts, which will be used in further process of anticorrosion testing. Therefore, in this work was prepared acetone (30 and 70 %, v/v) extracts of rosemary by ultrasound extraction, at time of 3,6 and 9 min and amplitude of 60, 80 and 100 %. The extraction by refluxing, at time of 1,5 and 3 h was applied, too. Mass fraction of total phenols and flavonoids in prepared extracts was determined by UV/Vis spectrophotometry. On the basis of obtained results, the optimal conditions of ultrasound extraction (70 % acetone, 100 % amplitude and time of 9 min) was determined, and will be used in further preparation of extracts for examination of theirs anticorrosion action.

Key words: corrosion, extraction, polyphenols, rosemary, ultrasound

Thesis contains: 31 pages, 10 figures, 9 tables, 32 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Technical support and assistance: Darjan Pipić, Technical Associate

Defence date: 19th September 2017.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.2.1. Bioaktivni spojevi u ružmarinu	2
2.3. Fenolni spojevi.....	3
2.3.1. Antioksidacijsko djelovanja polifenola	4
2.3.2. Flavonoidi	4
2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva	5
2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija	6
2.4.2. Ekstrakcija refluksiranjem.....	7
2.5. Analitičke metode određivanje polifenola.....	7
2.5.1. Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) spektrofotometrija	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijal.....	10
3.2. Kemikalije	10
3.3. Aparatura i pribor.....	10
3.4. Metode rada	11
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina ultrazvukom visokog intenziteta.....	11
3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina refluksiranjem.....	13
3.4.3. Princip UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola	13
3.4.4. Princip UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida.....	14
3.4.5. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola i flavonoida.....	14
3.4.6. Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida	15
3.4.6.1. Određivanje ukupnih fenola.....	15
3.4.6.2. Određivanje ukupnih flavonoida.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Određivanje boje u ekstraktima lišća ružmarina	17
4.2. Određivanje ukupnih fenola	199
4.3. Određivanje ukupnih flavonoida	23
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. POPIS LITERATURE	298

1. UVOD

Prirodna vrela ljekovitog bilja na hrvatskim prostorima bogata su i raznovrsna. Na njima postoji više od 500 ljekovitih biljaka koje se mogu koristiti u medicini, farmaciji, prehrambenoj industriji i sl. Ljekovito bilje sadrži mnoge aktivne supstance koje povoljno utječu na ljudsko zdravlje. Među njima su i polifenoli, najpoznatiji zbog svojih iznimnih antioksidacijskih svojstava, zahvaljujući kojima pomažu u prevenciji mnogih patoloških poremećaja u organizmu, kao što su ateroskleroza, disfunkcija moždanog tkiva i kancerogena stanja (Gordon, 1996). Polifenolni spojevi imaju različitu industrijsku primjenu, koriste se kao bojila, aditivi u hrani, sirovine u proizvodnji boja, papira i kozmetičkih proizvoda (Valenzuela i sur., 1992; Gordon, 1996). Pored navedenih karakteristika, polifenoli mogu pokazivati i antikorozijska svojstva (Deng i Li, 2012; Bouammali i sur., 2013; Fouda i sur., 2013; Okafor i Apebende, 2014), koja se temelje na interakcijama između nesparenih elektrona heteroatoma iz polifenola i prazne d orbitale metala, ili π -elektrona iz aromatskog prstena polifenola i prazne d orbitale metala (Fouda i sur., 2013). Budući da je vrlo mali broj znanstvenih radova pokazao da se polifenoli ekstrahirani iz biljnih materijala mogu koristiti kao efikasni, prirodni, netoksični i lako dostupni inhibitori korozije, cilj ovoga rada bio je pripremiti vodene acetonske ekstrakte lišća ružmarina, koji će se koristiti u daljnjim istraživanjima praćenja njihova antikorozijskog djelovanja na metale i metalne legure u sastavu ambalažnog materijala namijenjenog za konzerviranje prehrambenih proizvoda.

Provedeno istraživanje sastojalo se iz:

- pripreme acetonskih ($\rho = 30$ i 70 %) ekstrakata ružmarina primjenom ultrazvuka kao nekonvencionalne metode ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 min uz amplitudu od 60, 80 i 100 %).
- pripreme acetonskih ($\rho = 30$ i 70 %) ekstrakata ružmarina primjenom refluksiranja kao konvencionalne metode ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije od 1,5 i 3 h).
- određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima ružmarina upotrebom spektrofotometrije u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja (UV/Vis spektrofotometrija).
- odabira optimalnih uvjeta ekstrakcije koji će se koristiti tijekom daljnje pripreme ekstrakata i njihova ispitivanja kao prirodnih antikorozijskih sredstava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ružmarin

Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis*) je razgranati, zimzeleni grm koji može narasti i do dva metra visine. Postoje i puzajući, odnosno niski oblici koji se mogu saditi kao pokrivači tla (Schaffner, 1999). Listovi su naspramni, sjedeći, čvrsti, kožasti, vrlo uski a dugi 2-3 cm. Gornja strana listova je tamnozeleno a donja je sivobijele boje i lagano prstenasta. Između listova, na kratkim ograncima, razvijaju se maleni, dvousnati cvjetovi, svijetloplave do plavoljubičaste boje. Miris cvjetova i cvjetnih vrhova grančica je jak i nalik na kamfor, dok je okus ljut, pomalo gorak i aromatičan. Samonikla biljka raste na sunčanom kamenjaru, u makiji mediteranskog područja. Sadržaj ulja u cvjetovima, listovima i grančicama ovisi o klimi i o sunčanim i zaštićenim položajima (Willfort, 1989).

U srpnju i kolovozu se najčešće sakupljaju listići koji sadrže 0,5 do 3 % eteričnog ulja, ovisno o klimi. U prehrambenoj industriji se koristi kao začim u proizvodima od ribe i mesa, juhama i umacima, a naročito u proizvodima s puno masti. Koristi se i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Schaffner, 1999).

Carstvo: Plantae
Razred: Magnoliopsida
Red: Lamiales
Porodica: Lamiaceae
Rod: *Rosmarinus Linné*
Vrsta: *Rosmarinus officinalis*

2.2.1. Bioaktivni spojevi u ružmarinu

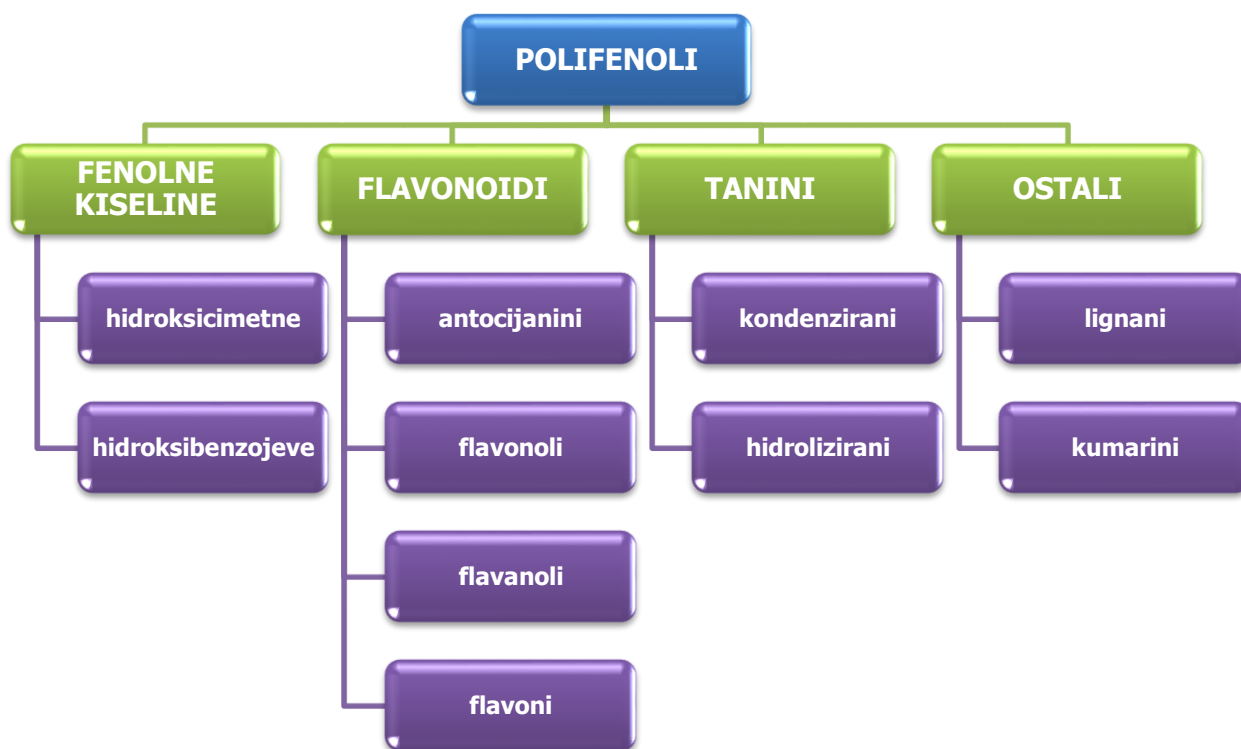
Ružmarinov list sadrži 1,2 - 2,5 % eteričnog ulja s glavnim sastavnicama: 15 - 30 % 1,8-cineola, 15-20 % kamfora, do 25 % α -pinena, 5 - 10 % kamfena, 10 - 20 % borneola, s bornil acetatom i limonenom te drugim monoterpenima (Kuštrak, 2005). Uz eterično ulje ružmarinovo lišće sadrži i ružmarinsku kiselinu, vrlo rasprostranjenu i kod drugih biljaka porodice Lamiaceae, te diterpenoide (karnozol i karnozolnu kiselinu), triterpenske kiseline i alkohole, flavonoide i njihove glikozide (Kuštrak, 2005).

Ružmarin i njegovi ekstrakti se odavno primjenjuju u prehrambenoj industriji kao antioksidansi, ali se i sve više istražuju u medicinskoj znanosti kao odlični "sakupljači" slobodnih radikala. Do sada je utvrđeno barem 12 diterpenskih fenola u ružmarinu (Wei i Ho, 2006), od čega je

karnozolna kiselina najzastupljenija, a zbog svog izraženog antioksidacijskog djelovanja predmet je mnogobrojnih znanstvenih istraživanja (Yesil Celiktas i sur., 2006).

2.3. Fenolni spojevi

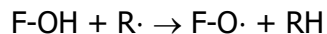
Fenolni spojevi ili polifenoli su dio jedne od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća, povrća i drugih biljnih vrsta (Lapornik i sur., 2005). Do sada je poznato više od 8000 fenolnih spojeva, a najbrojniju skupinu čine flavonoidi (Bravo, 1998). Osnovna strukturna formula polifenola je konjugirani oblik benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana hidroksilna skupina (Bravo, 1998). Prirodni fenolni spojevi mogu biti građeni od jednostavnijih molekula (fenolne kiseline, flavonoidi, ksantoni i dr.) pa sve do visokopolimeriziranih molekula (tanini, biflavonoidi, lignini) (Bravo, 1998; Naczki i Shahidi, 2006). Osnovna podjela polifenola prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Osnovna podjela polifenola (Bravo, 1998; Naczki i Shahidi, 2006).

2.3.1. Antioksidacijsko djelovanja polifenola

Polifenoli reagiraju kao antioksidansi zahvaljujući sposobnosti prelaska u fenoksil - radikale otpuštajući vodikov atom, koji se veže na slobodne radikale:

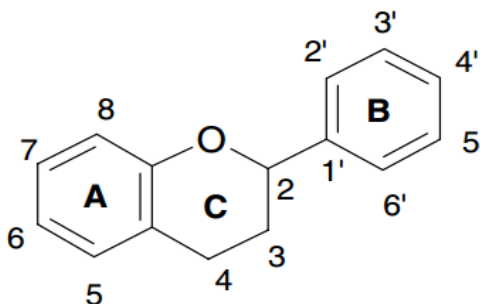


Antioksidansi su spojevi koji štite stanicu od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala na način da reagiraju s njima te ih uklanjaju iz organizma. Mehanizmom oksidacijsko - redukcijских reakcija, antioksidansi neutraliziraju reaktivne slobodne radikale, koji nastaju iz kisika vodikova peroksida u normalnim fiziološkim uvjetima. Antioksidansi doniranjem elektrona ne prelaze u slobodne radikale jer su stabilni u oba oblika (Kaur i Kapoor, 2001). Slobodni radikali su električni nabijene molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini vrlo reaktivnima. Slobodni radikali teže sparivanju nesparenih elektrona te zato lako reagiraju s drugim tvarima kako bi se neutralizirali. Prilikom neutralizacije slobodnog radikala dolazi do lančanih reakcija nastanka novih slobodnih radikala, pri čemu antioksidansi imaju ključnu ulogu u njihovom stabiliziranju ili deaktiviranju. Time se sprječavaju lančane reakcije nastanka slobodnih radikala i blokira oštećenje stanica. Zbog toga su antioksidansi izuzetno važni spojevi za optimalno funkcioniranje stanica i sveukupnog organizma (Percival, 1998).

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su kao najrasprostranjenija podskupina polifenolnih spojeva, prisutni u svim dijelovima zelene biljke: korijenu, lišću, stabljici i plodovima. Posebno su važni zbog svog antioksidacijskog djelovanja, a glavna odrednica njihove antioksidacijske sposobnosti je difenilpropanski kostur, građen od dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C). Njihova opća strukturna formula (Balasundram i sur., 2006) prikazana je na Slici 2.

Redovita konzumacija flavonoida povezuje se sa smanjenom učestalošću pojave kancerogenih stanja i srčanih bolesti (Cook i Samman, 1996; Beecher, 2003; Liu i sur., 2008), pa zbog navedenih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje postoji velik interes znanstvenika za njihovim izoliranjem iz različitih sirovina, biljnog podrijetla.



Slika 2. Opća strukturna formula flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija podrazumijeva postupak izdvajanja jednog ili većeg broja sastojaka (analiti) iz otopine, suspenzije ili čvrstog materijala pomoću otapala, tj. radi se o prijenosu tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo (Albu i sur., 2004). Da bi ekstrakcija bila što učinkovitija, potrebno je odabrati prikladno otapalo koje će uz ostale osnovne procesne parametre (temperatura, tlak i vrijeme) utjecati na selektivnu izolaciju analita. Njegov izbor ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju želimo izolirati, ali i drugim faktorima, poput polarosti, točke ključanja, reaktivnosti, viskozitetu, ekstrakcijskom kapacitetu, stabilnosti (utjecaj temperature, kisika i svjetlosti) i stupnju toksičnosti otapala na ljude i okoliš (Albu i sur., 2004). U usporedbi s čistim otapalima, osobito su se pokazale učinkovite vodene smjese etanola ili acetona kod ekstrakcije fenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala (Lapornik i sur., 2005; Sun i Ho, 2005; d'Alessandro i sur., 2012).

Osim odgovarajućeg otapala, za uspješno provođenje ekstrakcije treba uzeti u obzir i druge čimbenike poput molekularnog afiniteta otapala i otopljene tvari, prijenosa mase u odgovarajućem otapalu, sigurnosti okoliša, toksičnosti za ljude i financijskoj isplativosti. Također, važnu ulogu ima i primjena odgovarajuće metode ekstrakcije. One se dijele na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (nove, suvremene), a prikazane su na Slici 3 (Azmir i sur., 2013).

Klasične (konvencionalne) metode ekstrakcije

- soxhlet ekstrakcija
- ekstrakcija refluksiranjem
- maceracija
- destilacija

Suvremene (nekonvencionalne) metode ekstrakcije

- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
- ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima
- ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom
- ekstrakcija pomoću enzima
- ekstrakcija pomoću električnog polja
- ekstrakcija superkričnim fluidima

Slika 3. Ekstrakcijske metode (Azmir i sur., 2013).

2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz. Budući da ljudsko uho može čuti zvukove čija je frekvencija u rasponu od 16 Hz do 16 kHz, frekvencija ultrazvuka previsoka je za ljudsko slušno područje (Brnčić i sur., 2010). U prehrambenoj industriji primjenjuju se ultrazvučni valovi dvaju područja frekvencija. To su ultrazvučni valovi niskih intenziteta (manje od 1 W/cm²), frekvencija 5 do 10 MHz, te ultrazvučni valovi visokog intenziteta (10 do 1000 W/cm²) i frekvencija od 16 kHz do 100 kHz (ultrazvuk visoke snage). Vrijednosti frekvencija od 100 kHz do 2 MHz čine prijelazno područje. Za primjenu u prehrambenoj industriji najpovoljnije su frekvencije ultrazvuka više od 20 kHz.

Najraširenija upotreba ultrazvuka je u procesima ekstrakcije različitih organskih komponenti iz biljnih sirovina. Primjena metode sastoji se u tome što ultrazvučni valovi oštećuju stanične stijenke biljnih materijala čime se olakšava ulaz otapala u materijal te povećava efikasnost izmjene mase (Lelas, 2006). Kada zvučni val dođe do tekuće sredine, nastaju longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije. Ovo izmjenjivanje tlaka

izaziva kavitacije pri čemu se formiraju mjehurići plina u materijalu. Mjehurići imaju veću površinu tijekom ekspanzijskog ciklusa što povećava difuziju plina uzrokujući ekspanziju mjehurića. 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 šok valovi. Nastali šok valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa).

Važan dio ekstrakcije potpomognute ultrazvukom je optimizacija procesa. Frekvencija (kHz), amplituda (%), ciklus (%), nazivna izlazna energija (W) i geometrijski parametri sonde (dužina i promjer) moraju biti pravilno odabrani i uzeti u obzir (Brnčić i sur., 2010).

U usporedbi s klasičnom ekstrakcijom, mehaničko djelovanje ultrazvuka osigurava (Azmir i sur., 2013):

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

2.4.2. Ekstrakcija refleksiranjem

Refluksiranje je konvencionalna ekstrakcijska metoda koja se provodi zagrijavanjem čvrstog materijala na povišenoj temperaturi s otapalom u tikvici s povratnim hladilom. Pare otapala izlaze iz tikvice, kondenziraju se u hladilu i vraćaju u tikvicu. Postupak je najbolje izvoditi u otapalu s vrelištem otprilike jednakim optimalnoj temperaturi reakcije. Nakon toga vruća otopina se dekantira ili filtrira. Efikasnost ekstrakcije ovom metodom izrazito je velika ali s obzirom na upotrebu velikih količina otapala i dugotrajno vrijeme ekstrakcije sve se više zamjenjuje nekonvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama.

2.5. Analitičke metode određivanja polifenola

U cilju što lakše identifikacije i kvantifikacije polifenola ekstrahiranih iz različitih biljnih sirovina i proizvoda, razvijene su mnogobrojne analitičke metode (Ignat i sur., 2011).

Najčešće se primjenjuje spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja zbog svoje jednostavnosti i niskih troškova. Glavni nedostatak ove analitičke metode je što se njome mogu odrediti samo pojedine skupine polifenola, ali ne i udio pojedinačnih spojeva u istoj skupini. Iz tog razloga su razvijene različite visoko osjetljive i selektivne analitičke tehnike koje omogućavaju određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva (Liu i sur., 2008). Neke od njih su prikazane na Slici 4.



Slika 4. Prikaz nekih od analitičkih metoda korištenih pri određivanju polifenola.

2.5.1. Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) spektrofotometrija

Spektroskopske instrumentalne metode služe za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva. Baziraju se na interakciji elektromagnetskog zračenja sa uzorkom, pri čemu mjerena tvar emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se mjeri i interpretira.

Spektroskopija se može tradicionalno definirati kao grana znanosti koja se bavi proučavanjem interakcija između tvari i elektromagnetskog zračenja (EMZ). Apsorpcijska spektroskopija koja se temelji na ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) zračenju je tehnika koja se najčešće upotrebljava u kvantitativnoj kemijskoj analizi zbog svoje široke primjenjivosti, velike osjetljivosti, prihvatljive točnosti te jednostavnosti i brzine izvođenja. Područje ultraljubičastog dijela elektromagnetskog spektra odnosi se na valne duljine od 10 do otprilike 380 nm, dok se područje vidljivog dijela elektromagnetskog spektra odnosi na valne duljine od 380 do otprilike

780 nm. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka (analita) i njegove koncentracije daje Lambert - Beerov zakon:

$$A = \epsilon b c$$

pri čemu je A apsorbancija, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent, c množinska koncentracija i b debljina sloja otopine. Iz Lambert-Beerovog zakona proizlazi zaključak da je apsorbancija linearno proporcionalna koncentraciji analita što omogućuje jednostavno računanje koncentracije iz izmjerene apsorbancije.

Uređaj koji mjeri omjer snaga (intenziteta) upadnog i izlaznog elektromagnetskog zračenja u ovisnosti o valnoj duljini naziva se spektrofotometar (Slika 5) i sastoji se od: izvora zračenja, selektora valnih duljina (monokromator), spremnika za uzorak (kiveta), detektora i procesora signala.



Slika 5. UV/Vis spektrofotometar (vlastita fotografija).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Osušeno lišće ružmarina prikazano na Slici 6 prikupljeno je na području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska).



Slika 6. Osušeno lišće ružmarina.

3.2. Kemikalije

- Aceton (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijski klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)

- Infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Ultrazvuk (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda promjera 22 mm (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- UV/Vis Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Kivete za centrifugu, 12 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Tikvica s okruglim dnom od 250 mL
- Uljna kupelj

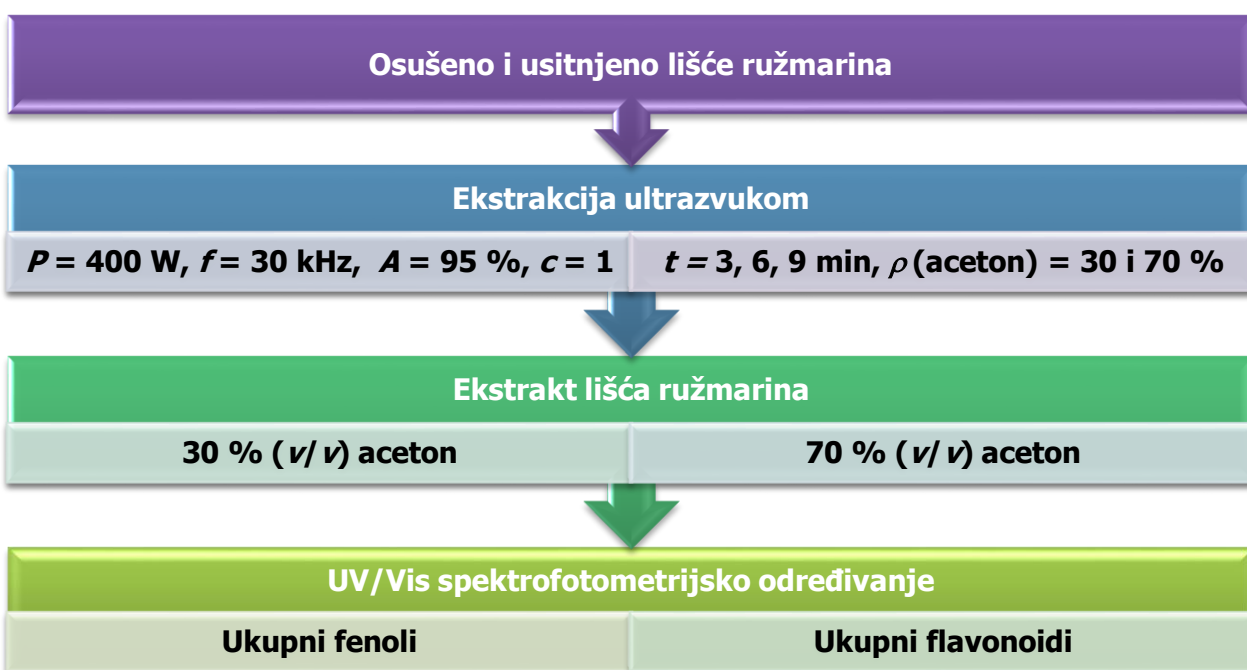
3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su sljedeće analitičke tehnike: ekstrakcija ultrazvukom i refluksiranjem, spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja i određivanje boje. Boja ekstrakata, odnosno L , a i b parametri boje određeni su pomoću kolorimetra CM-3500d prema CIE sustavu kojeg čine:

- L^* - svjetlina (0 - crna, 100 - bijela boja)
- a^* - udio crvene (+) odnosno zelene boje (-)
- b^* - udio žute (+) odnosno plave boje (-)

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina ultrazvukom visokog intenziteta

Ekstrakcija polifenola ultrazvukom visokog intenziteta provedena je na uzorcima osušenih listova ružmarina. 3,000 g usitnjenih listova ružmarina ekstrahirano je s 100 mL vodene otopine acetona ($\rho = 30$ i 70%), sondom promjera 22 mm pri sljedećim procesnim parametrima: maksimalna izlazna snaga 400 W, frekvencija 30 kHz, amplituda 60, 80 i 100 %, ciklus 1 i vrijeme 3, 6 i 9 min. Priređenim uzorcima izmjerena je temperatura prije i nakon ekstrakcije, pomoću infracrvenog termometra. Postupak ekstrakcije prikazan je i na Slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz ekstrakcije listova ružmarina ultrazvukom visokog intenziteta.

Nakon završene ekstrakcije, uzorci su filtrirani preko gaze, a potom su zaostali listovi ružmarina ručno stiješteni. Dobivene suspenzije uzoraka su procijeđene kroz cijedilo, filtrirane preko običnog filter papira u odmjerne tikvice od 100 mL, a zatim su tikvice nadopunjene otapalom korištenim za ekstrakciju (30 i 70 % acetona). Priređeni ekstrakti (Slika 8) čuvani su u hladnjaku na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do početka analize.



Slika 8. Ekstrakti lišća ružmarina u 30 i 70 %-tnom acetonu dobiveni ultrazvukom visokog intenziteta u vremenu od 3, 6 i 9 min i amplitudi od 60, 80 i 100 % (vlastita fotografija).

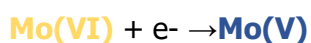
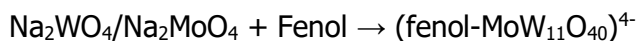
3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina refluksiranjem

Za ekstrakciju metodom refluksiranja uzorci su priređeni na isti način kao i kod ekstrakcije ultrazvukom (3,000 g uzorka/100 mL 30 ili 70 %-tnog acetona). Ekstrakcija je trajala 1,5 i 3 h, na povišenoj temperaturi (temperatura vrelišta otapala). Postupak obrade ekstrahiranih uzoraka za daljnja analitička određivanja identičan je postupku opisanom u poglavlju 3.4.1.

3.4.3. Princip UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ekstrahiranog lišća ružmarina određen je Folin-Ciocalteu metodom, koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s fenolima kao reducensima.

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfotungstične i fosfomolibdenične kiseline, koji reagira s fenoksidom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida.



Nakon dva sata reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na valnoj duljini od 760 nm

(Agbor i sur., 2014). Očitana apsorbancija je proporcionalna intenzitetu razvijene plave boje, odnosno koncentraciji fenola. Kao standard najčešće se koristi galna kiselina. Iz baždarne krivulje ovisnosti apsorbancije (A) o masenoj koncentraciji (γ) galne kiseline određuje se koncentracija, a potom i maseni udio ukupnih fenola u ispitivanom uzorku.

3.4.4. Princip UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima ekstrahiranog lišća ružmarina određen je aluminij-klorid spektrofotometrijskom metodom, koja se temelji na kemijskoj reakciji stvaranja stabilnih aluminij-flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola (Pallab i sur., 2013; Pekal i Pyrzynska, 2014). Vežanje aluminija na flavonoidne ligande (kelatni reagens) dovodi do stvaranja obojenih kompleksa, čiju apsorbanciju mjerimo na valnoj duljini od 510 nm. Iz baždarne krivulje ovisnosti apsorbancije (A) o masenoj koncentraciji (γ) rutina određuje se koncentracija, a potom i maseni udio ukupnih flavonoida u ispitivanom uzorku.

3.4.5. Priprava otopina za određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Sve otopine pripremljene su s kemikalijama *p.a.* čistoće u deioniziranoj vodi.

Otopine korištene pri određivanju ukupnih fenola su:

1) Folin-Ciocalteu (FC) reagens ($c = 0,2 \text{ M}$)

2,5 mL FC reagens ($c = 2 \text{ M}$) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

2) Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 ‰ , w/v)

200 g bezvodnog Na_2CO_3 otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića Na_2CO_3 i nadopuni destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Nakon 24 sata otopina se profiltrira.

3) Galna kiselina ($\gamma = 5 \text{ g/L}$)

Odvaži se 0,25 g galne kiseline te se pomoću 10 mL acetona kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL, a potom se tikvica nadopunirani deioniziranom vodom do oznake.

Otopine korištene pri određivanju ukupnih flavonoida su:

1) Natrijev nitrit (5 %, w/v)

Odvaži se 5 g NaNO_2 i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

2) Aluminijev klorid (10 %, w/v)

Odvaži se 10 g AlCl_3 i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

3) Natrijev hidroksid (c = 1 M)

Odvaži se 2 g NaOH i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

4) Rutin ($\gamma = 1 \text{ g/L}$)

Odvaži se 0,05 g rutina i otopi u 10 mL metanola, a potom se otopina nadopuni s deioniziranom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL do oznake.

3.4.6. Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida

Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida sastoji se iz dva dijela. U prvom dijelu eksperimenta izrađen je baždarni dijagram (a), a u drugom uzorci ekstrahiranog lišća ružmarina pripremljeni su za analizu (b) prema postupcima opisanim u nastavku.

3.4.6.1. Određivanje ukupnih fenola

a) Za pripremu baždarnog dijagrama iz ishodne otopine galne kiseline opisane u poglavlju 3.4.5. prirede se pojedinačne otopine tako da se u odmjernim tikvicama od 100 mL otpipetira 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 3,0 i 3,6 mL alikvota ishodne standardne otopine, a potom se tikvice nadopune deioniziranom vodom do oznake. Iz svake tikvice se otpipetira 1 mL pojedinačne otopine standarda u odmjerne tikvice od 25 mL, a zatim se doda 10 mL deionizirane vode, 1,25 mL 0,2 M FC reagensa i nakon 5 min 3,75 mL 20 % otopine Na_2CO_3 . Sadržaj se promiješa, ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu, nakon čega se izmjeri apsorbanca pri valnoj duljini od 760 nm. Na isti način se pripremi i slijeba proba, ali umjesto 1 mL otopine standarda uzima se deionizirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanca i masenih koncentracija galne kiseline nacrtava se baždarni dijagram, a potom se koncentracija ukupnih fenola izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

b) Uzorci ekstrahiranog lišća ružmarina (Slika 8) s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih fenola priređeni su za mjerenje apsorbancije na isti način kao i individualne standardne otopine, no umjesto 1 mL individualne standardne otopine uzeto je 0,05 mL ekstrahiranog lišća ružmarina. Za slijepu probu, upotrijebljeno je 0,05 mL deionizirane vode.

3.4.6.2. Određivanje ukupnih flavonoida

a) Od pripremljene otopine standarda rutina, masene koncentracije 1 g/L (poglavlje 3.4.5.) prirede se pojedinačne standardne otopine u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira 2, 4, 6, 8, 10, 15 i 20 mL alikvota standardne otopine rutina, a potom se svaka tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL pojedinačne otopine standarda, 2 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 . Nakon 5 min doda se 0,5 mL otopine AlCl_3 (10 %), a nakon 6 min 2 mL NaOH (1 M). Na isti način se pripremi i slijepa proba, no umjesto standarda koristi se deionizirana voda. Priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

c) Uzorci ekstrahiranog lišća ružmarina (Slika 8) s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih flavonoida priređeni su za mjerenje apsorbancije na isti način kao i individualne standardne otopine. Umjesto 1 mL individualne standardne otopine uzeto je 0,1 mL ekstrahiranog lišća ružmarina. Za slijepu probu, upotrijebljeno je 0,1 mL deionizirane vode.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lišća ružmarina dobivenih upotrebom dviju ekstrakcijskih metoda: ultrazvučna ekstrakcija i refluksiranje. Ultrazvučna, nekonvencionalna ekstrakcija provedena je u vremenu od 3, 6 i 9 min, pri amplitudi od 60, 80 i 100 %, a ekstrakcija refluksiranjem pri vremenu od 1,5 i 3 h.

4.1. Određivanje boje u ekstraktima lišća ružmarina

Prije određivanja ukupnih fenola i flavonoida, acetonskim ekstraktima lišća ružmarina, dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom i refluksiranjem određena je boja, odnosno L , a i b parametri (Tablice 1 i 2).

Dobiveni rezultati pokazuju (Tablica 1) da su 30 %-tni acetonski ekstrakti pripremljeni ultrazvukom tamniji ($L = 65,81 - 78,90$) u odnosu na 70 %-tne ekstrakte ($L = 84,87 - 87,18$), uz izuzetak koji predstavlja uzorak 3-AB kod kojeg L vrijednost iznosi 85,33. Dakle, veći volumni udio acetona u vodenoj fazi utječe na dobivanje svijetlih uzoraka. Kod ekstrakata dobivenih refluksiranjem (Tablica 2) L vrijednosti nisu značajno različite s obzirom na upotrijebljeno otapalo, odnosno volumni udio acetona u vodenoj fazi. Dobivene L vrijednosti kreću se u rasponu od 79,00 do 82,95 za 30 %-tne i 82,52 do 84,81 za 70 %-tne acetonske ekstrakte. Nadalje, jasno se vidi kako su a vrijednosti dobivene kod ultrazvukom obrađenih 30 %-tnih ekstrakata veće u odnosu na 70 %-tne ekstrakte. Za razliku od a vrijednosti, b su približno iste, što pogotovo vrijedi za 70 %-tne ekstrakte (62,40 do 69,13). Isti slučaj je i kod uzoraka dobivenih refluksiranjem gdje L vrijednosti između 58,27 i 67,76, te 57,13 i 61,57 su karakteristične za 30 %-tne, odnosno 70 %-tne acetonske ekstrakte.

Dakle, može se zaključiti kako volumni udio otapala u vodenoj fazi, metoda ekstrakcije, kao i procesni parametri utječu na različitu obojenost ekstrakata, odnosno njihove L , a i b vrijednosti. Sukladno tome, parametri ekstrakcije mogu se odabrati ovisno o željenoj boji ekstrakta i njegovoj krajnjoj upotrebi.

Tablica 1. Parametri boje određeni u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima ružmarina dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
30 % aceton (v/v)				
1-AB	3	65,81	22,13	70,01
2-AB	6	75,50	11,27	62,96
3-AB	9	85,33	1,31	52,17
4-AB	3	67,19	20,82	68,21
5-AB	6	75,99	10,95	59,94
6-AB	9	78,76	7,05	59,19
7-AB	3	72,71	15,44	60,67
8-AB	6	78,55	9,02	53,62
9-AB	9	78,90	8,55	59,09
70 % aceton (v/v)				
10-AB	3	85,81	-15,77	67,04
11-AB	6	85,26	-13,26	67,68
12-AB	9	85,16	-12,26	66,76
13-AB	3	85,14	-15,57	69,13
14-AB	6	84,87	-14,03	68,73
15-AB	9	85,31	-12,99	66,52
16-AB	3	86,04	-15,15	65,64
17-AB	6	85,85	-14,98	67,76
18-AB	9	87,18	-13,82	62,40

Tablica 2. Parametri boje određeni u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

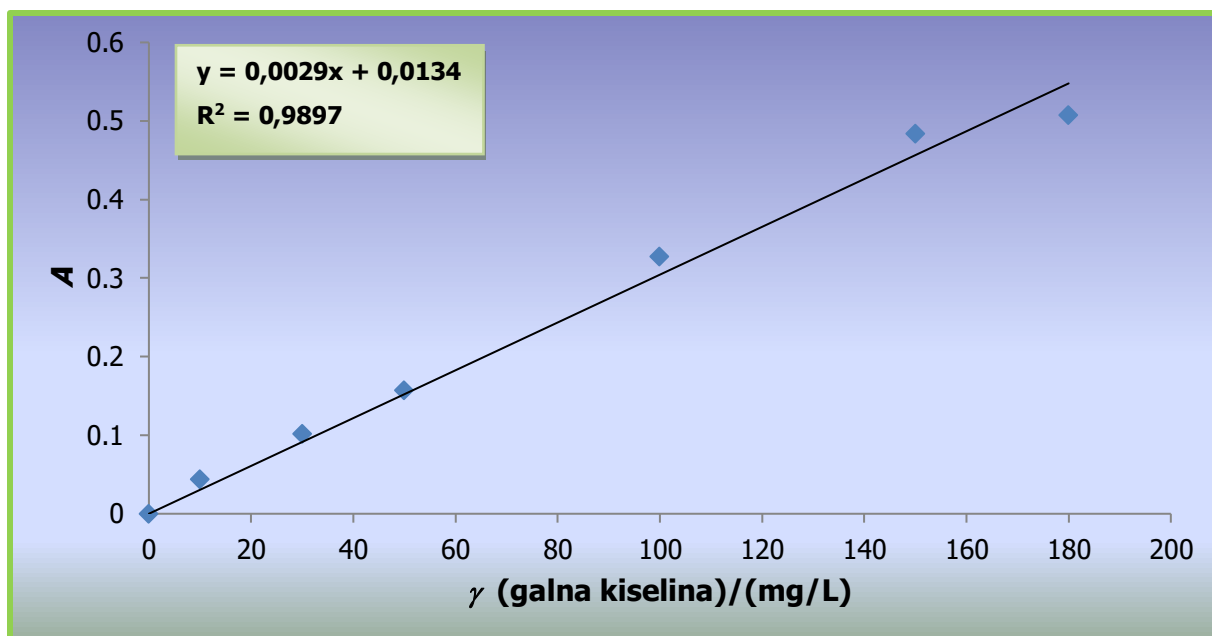
Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/h	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
30 % aceton (v/v)				
R17	3	82,95	2,78	58,27
R19	1,5	79,00	8,91	67,76
70 % aceton (v/v)				
R13	3	82,52	0,85	61,57
R16	1,5	84,81	-0,47	57,13

4.2. Određivanje ukupnih fenola

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola (UF) u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lišća ružmarina bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 3 prikazuje vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 9). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima (Tablice 4 i 5). Maseni udjeli UF izraženi su kao mg galne kiseline na g ekstrahiranog lišća ružmarina.

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 760 nm.

Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	A	\bar{A}
0A	0	0,000	0,000
0B		0,000	
1A	10	0,045	0,0445
1B		0,044	
2A	30	0,102	0,102
2B		0,102	
3A	50	0,158	0,1575
3B		0,157	
4A	100	0,327	0,3275
4B		0,328	
5A	150	0,485	0,484
5B		0,483	
6A	180	0,508	0,508
6B		0,508	



Slika 9. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima lišća ružmarina dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	<i>A</i> ± SD	<i>w</i> (mg/g) ± SD
30 % aceton (v/v)				
1-AB	3	100	0,173 ± 0,001	915,8 ± 6,3
2-AB	6		0,208 ± 0,001	1119,8 ± 7,5
3-AB	9		0,215 ± 0,002	1157,2 ± 13,7
4-AB	3	80	0,151 ± 0,004	789,4 ± 21,7
5-AB	6		0,172 ± 0,003	910,1 ± 15,9
6-AB	9		0,206 ± 0,007	1105,5 ± 38,8
7-AB	3	60	0,113 ± 0,006	573,8 ± 36,2
8-AB	6		0,131 ± 0,005	678,7 ± 29,4
9-AB	9		0,179 ± 0,004	954,6 ± 23,2
70 % aceton (v/v)				
10-AB	3	100	0,187 ± 0,007	996,3 ± 41,7
11-AB	6		0,211 ± 0,004	1134,2 ± 27,4
12-AB	9		0,241 ± 0,007	1306,6 ± 38,8
13-AB	3	80	0,187 ± 0,003	997,7 ± 20,3
14-AB	6		0,195 ± 0,005	1045,1 ± 27,4
15-AB	9		0,229 ± 0,000	1240,5 ± 2,5
16-AB	3	60	0,174 ± 0,003	924,4 ± 18,8
17-AB	6		0,179 ± 0,006	954,6 ± 34,6
18-AB	9		0,189 ± 0,001	1010,6 ± 8,5

N = 4

Iz Tablice 4 vidljivo je da se maseni udjeli ukupnih fenola kreću u rasponu od 910,1 - 1306,6 mg/g s obzirom na amplitudu, vrijeme i volumni udio otapala. Promatrajući utjecaj primjenjene amplitude od 100, 80 i 60 % na prinos ukupnih fenola, vidi se da 100 % amplituda pridonosi najvećoj ekstrakciji polifenola. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 915,8 do 1157,2 mg/g za 30 %-tne, te 996,3 do 1306,6 mg/g za 70 %-tne ekstrakte. Kod 80 %-tne amplitude maseni udjeli ukupnih fenola dobiveni su u rasponu od 789,4 do 1240,5 mg/g, a kod 60 %-tne od 573,8 do 1010,6 mg/g.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola može se zamijetiti da produljenjem vremena od 3 na 9 min dolazi i do povećanja masenog udjela ukupnih fenola. Tako se kombinacijom vremena od 9 min i 100 % amplitude dobije najveći prinos ukupnih

fenola. On iznosi 1157,2 mg/g za 30 %-tni (uzorak 3-AB), te 1306,6 mg/g za 70 %-tni (uzorak 12-AB) acetonski ekstrakt ružmarina.

Uspoređujući rezultate s obzirom na upotrijebljeno otapalo, odnosno volumni udio acetona u vodenoj fazi vidljivo je da 70 %-tni aceton utječe na povećanje prinosa ukupnih fenola u odnosu na 30 %-tni aceton.

Ako ove rezultate usporedimo s vrijednostima izmjerenih temperatura prije i nakon ekstrakcije (Tablica 5) lišća ružmarina vidimo da je promjena temperature (ΔT) u korelaciji s masenim udjelima ukupnih fenola. Drugim riječima, veća temperatura utječe na bolju ekstrakciju polifenola i obrnuto, niža temperatura dovodi do njihove slabije ekstrakcije. Dakle, možemo zaključiti da i temperatura ekstrakcije, osim otapala, vremena i amplitude predstavlja jedan od dodatno važnih parametara ultrazvučne ekstrakcije.

Tablica 5. Izmjerene vrijednosti temperatura prije (T_0) i nakon (T_k) ultrazvučne ekstrakcije acetonskih (30 i 70 %, v/v) ekstrakata ružmarina.

Uzorci	t (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	$T_0/^\circ\text{C}$	$T_k/^\circ\text{C}$	ΔT
30 % (v/v) etanol					
1-AB	3	100	22,8	32,5	9,7
2-AB	6		23,0	41,4	18,4
3-AB	9		23,0	45,0	22,0
4-AB	3	80	23,0	29,5	6,5
5-AB	6		22,7	36,8	14,1
6-AB	9		23,0	43,6	20,6
7-AB	3	60	23,1	26,1	3,0
8-AB	6		23,0	32,2	9,2
9-AB	9		23,2	38,8	15,6
70 % aceton (v/v)					
10-AB	3	100	23,0	33,8	10,8
11-AB	6		22,8	41,7	18,9
12-AB	9		22,7	43,4	20,7
13-AB	3	80	22,8	30,5	7,7
14-AB	6		22,9	36,7	13,8
15-AB	9		22,7	41,2	18,5
16-AB	3	60	22,8	27,5	4,7
17-AB	6		22,7	31,6	8,9
18-AB	9		22,9	35,2	12,3

U cilju praćenja efikasnosti ultrazvučne ekstrakcije, usitnjeno lišće ružmarina podvrgnuto je i ekstrakciji refluksiranjem. Tablica 6 prikazuje rezultate spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima primjenom metode refluksiranja kod vremena ekstrakcije od 1,5 i 3 h.

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima lišća ružmarina dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/h	<i>A</i> ± <i>SD</i>	<i>w</i> (mg/g) ± <i>SD</i>
30 % aceton (v/v)			
R17	3	0,242 ± 0,007	1312,3 ± 56,2
R19	1,5	0,241 ± 0,001	1310,9 ± 40,3
70 % aceton (v/v)			
R13	3	0,274 ± 0,010	1496,3 ± 38,8
R16	1,5	0,280 ± 0,007	1529,3 ± 4,8

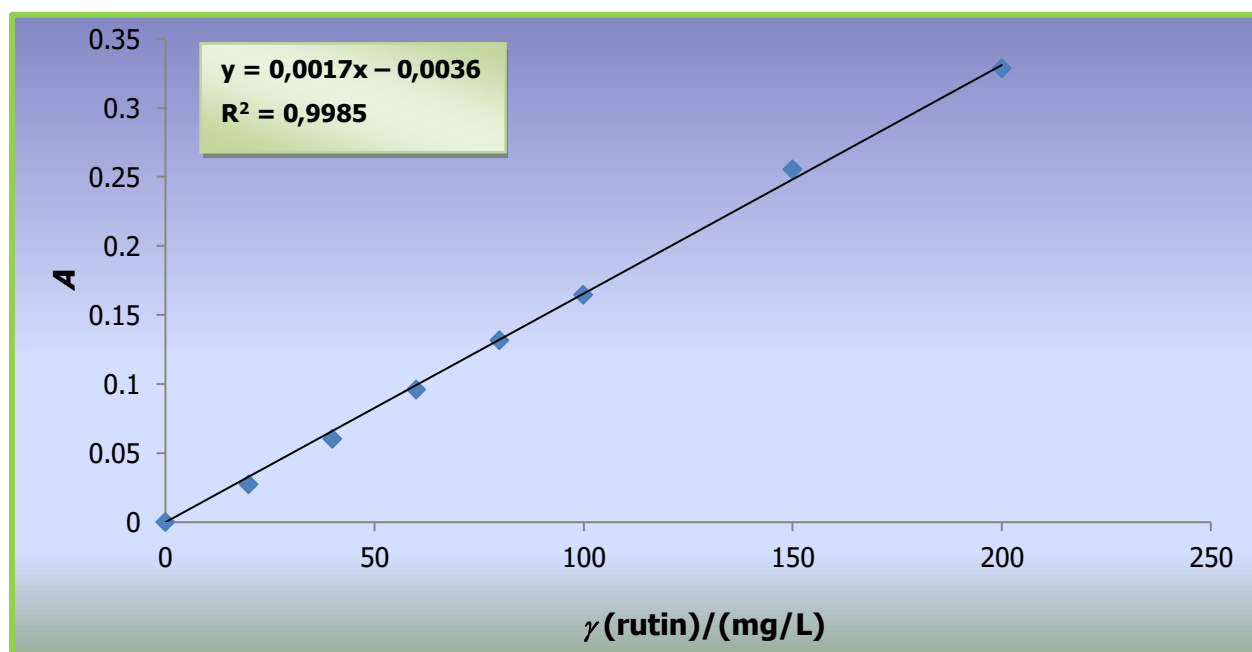
Iz priložene tablice vidi se da je 70 %-tni aceton efikasnije otapalo za ekstrakciju lišća ružmarina u odnosu na 30 %-tni aceton. Najveće vrijednosti dobivene su u vremenu od 1,5 h, pa se može zaključiti da refluksiranje nije potrebno provoditi pri većim vremenima jer one mogu utjecati na degradaciju polifenola, a time i smanjenje ukupne učinkovitosti ekstrakcije.

4.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije flavonoida (UFL) u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lišća ružmarina bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 6 prikazuje vrijednosti masenih koncentracija rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 10). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih flavonoida u ekstrahiranim uzorcima (Tablice 7 i 8). Maseni udjeli UFL izraženi su kao mg rutina na g ekstrahiranog lišća ružmarina.

Tablica 7. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{rutin})/(\text{mg/L})$	A	\bar{A}
0A	0	0,000	0,000
0B		0,000	
1A	20	0,028	0,0275
1B		0,027	
2A	40	0,061	0,0605
2B		0,060	
3A	60	0,096	0,096
3B		0,096	
4A	80	0,132	0,132
4B		0,132	
5A	100	0,165	0,1645
5B		0,164	
6A	150	0,256	0,2555
6B		0,255	
7A	200	0,329	0,329
7B		0,329	



Slika 10. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima lišća ružmarina dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	A ± SD	w (mg/g) ± SD
30 % aceton (v/v)				
1-AB	3	100	0,064 ± 0,003	330,1 ± 13,6
2-AB	6		0,105 ± 0,004	531,1 ± 20,9
3-AB	9		0,137 ± 0,003	688,0 ± 13,6
4-AB	3	80	0,049 ± 0,001	259,1 ± 6,4
5-AB	6		0,075 ± 0,003	386,5 ± 13,6
6-AB	9		0,113 ± 0,002	571,6 ± 12,5
7-AB	3	60	0,034 ± 0,001	184,3 ± 6,0
8-AB	6		0,044 ± 0,001	232,1 ± 5,3
9-AB	9		0,084 ± 0,002	426,2 ± 8,7
70 % aceton (v/v)				
10-AB	3	100	0,086 ± 0,005	438,0 ± 23,3
11-AB	6		0,100 ± 0,000	509,1 ± 2,1
12-AB	9		0,123 ± 0,004	619,4 ± 21,2
13-AB	3	80	0,095 ± 0,001	484,6 ± 6,4
14-AB	6		0,108 ± 0,002	545,8 ± 8,7
15-AB	9		0,118 ± 0,000	594,8 ± 2,1
16-AB	3	60	0,079 ± 0,003	403,7 ± 16,0
17-AB	6		0,091 ± 0,004	466,2 ± 19,8
18-AB	9		0,101 ± 0,001	514,0 ± 4,1

N = 4

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida prikazani u Tablici 7 pokazuju da se maseni udjeli ukupnih flavonoida kreću u rasponu od 184,3 do 688,0 mg/g s obzirom na amplitudu, vrijeme i volumni udio otapala.

Promatrajući utjecaj amplitude od 100, 80 i 60 % na ekstrakciju flavonoida vidi se da 100 %-tna amplituda daje najveće prinose UFL. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 330,1 - 688,0 mg/g za 30 %-tne, te 438,0 - 619,4 mg/g za 70 %-tne acetonske ekstrakte lišća ružmarina. Kod 80 %-tne amplitude dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 259,1 - 594,9 mg/g, a kod 60 %-tne amplitude od 184,3 - 514,0 mg/g, s obzirom na vrijeme i upotrijebljeno otapalo.

Promatrajući utjecaj vremena na prinos ukupnih flavonoida, vidljivo je da vrijeme od 9 min djeluje najučinkovitije na UFL ekstrakciju, kod svih primjenjenih amplitudama. No,

kombinacijom vremena od 9 min i 100 %-tne amplitude dobiju se najveći maseni udjeli ukupnih flavonoida. Oni iznose 688,0 mg/g za 30 %-tni (uzorak 3-AB), te 619,4 mg/g za 70 %-tni ekstrakt (uzorak 12-AB).

Uspoređujući utjecaj volumnog udjela acetona na ekstrakciju flavonoida, vidi se da 70 %-tni aceton pridonosi povećanju udjela UFL, u odnosu na 30 %-tni aceton. Izuzetak predstavljaju uzorci 2-AB i 3-AB kod kojih primjena 30 %-tnog acetona utječe na bolju ekstrakciju flavonoida u odnosu na uzorke 11-AB i 12-AB kod kojih je upotrijebljen 70 %-tni aceton.

U cilju praćenja efikasnosti ultrazvučne ekstrakcije, usitnjeni listovi ružmarina podvrgnuti su i ekstrakciji refluksiranjem u vremenu od 1,5 i 3 h, a Tablica 8 prikazuje rezultate određivanja ukupnih flavonoida u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima.

Tablica 9. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u acetonskim (30 i 70 %, v/v) ekstraktima lišća ružmarina dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/h	A ± SD	w (mg/g) ± SD
30 % aceton (v/v)			
R17	3	0,156 ± 0,001	781,1 ± 13,6
R19	1,5	0,173 ± 0,001	865,7 ± 12,5
70 % aceton (v/v)			
R13	3	0,122 ± 0,003	616,9 ± 4,1
R16	1,5	0,120 ± 0,003	607,1 ± 4,1

Najviše flavonoida dobije se ekstrakcijom koja je trajala 1,5 h uz 30 %-tni aceton. S obzirom na dobivene rezultate mjerenja proizlazi zaključak da kombinacija 30 %-tnog acetona i duljeg vremena ekstrakcije, kao i upotreba 70 %-tnog u odnosu na 30 %-tni aceton negativno utječe na prinos ukupnih flavonoida u ekstraktu lišća ružmarina.

Važno je naglasiti da gotovo i ne postoje znanstveni radovi koji se bave ekstrakcijom polifenola iz ružmarina, pa i usporedba ovih dobivenih rezultata s drugim vrijednostima nije bila moguća. Valja istaknuti rad Rodriguez - Rojo i sur. (2012) koji su uspoređivali učinak etanola i vode, kao i odgovarajuće metode (ekstrakcija otapalom u uvjetima povišene temperature, ekstrakcija mikrovalovima te ekstrakcija ultrazvukom) na ekstrakciju polifenola iz ružmarina.

Veći prinosi polifenola su se postigli ekstrakcijom etanolom, od čega se najviše ukupnih fenola i karnozolne kiseline dobilo ekstrakcijom otapalom u uvjetima povišene temperature, a najviše ružmarinske kiseline ekstrakcijom ultrazvukom.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti:

1. Produljenjem vremena od 3 na 6, odnosno 9 min ultrazvučne ekstrakcije, raste i maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u 30 i 70 %-tnim ekstraktima lišća ružmarina.
2. Najveći prinos ukupnih fenola dobiva se upotrebom 70 %-tnog acetona pri 100% amplitudi i trajanju ekstrakcije od 9 min.
3. Najveći prinos ukupnih flavonoida dobiva se upotrebom 30 %-tnog acetona pri 100% amplitudi i trajanju ekstrakcije od 9 min.
4. Metodom refluksiranja dobiju se veći prinosi polifenola u odnosu na ekstrakciju ultrazvukom, no njeno vrijeme trajanja je znatno duže.
5. Budući da je u kratkom vremenu potrebno pripremiti veći broj acetonskih ekstrakata za antikorozijska testiranja, u daljnjim istraživanjima će se primjenjivati ekstrakcija ultrazvukom uz 70 %-tni aceton, 100 %-tnu amplitudu i vrijeme od 9 min.

6. POPIS LITERATURE

Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science* **8**: 147-156.

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, *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 261-265.

Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426-436.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203.

Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *American Society for Nutritional Sciences* **133**: 3248-3254.

Bouammali H., Ousslim A., Bekkouch K., Bouammali B., Aouniti A., Al-Deyab S.S., Jama C., Bentiss F., Hammouti B. (2013) The Anti-Corrosion Behavior of *Lavandula dentata* Aqueous Extract on Mild Steel in 1M HCl. *International Journal of Electrochemical Science* **8**: 6005-6013.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333.

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**: 6907-6915.

Cook, N. C., Samman, S. (1996) Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **7**: 66-76.

d'Alessandro, L. G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. (2013) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification technology* **93**: 42-47.

Deng S., Li X. (2012) Inhibition by *Ginkgo* leaves extract of the corrosion of steel in HCl and H₂SO₄ solutions. *Corrosion Science* **55**: 407-415.

- Fouda A. S., Etai S. H., Elnggar W. (2014) Punica Plant extract as Green Corrosion inhibitor for C-steel in Hydrochloric Acid Solutions. *International Journal of Electrochemical Science* **9**: 4866-4883.
- Gordon, M. H. (1996) Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports* **13**: 265-273.
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.
- Kaur, C. & Kapoor, H. C. (2001) Antioxidants in fruit and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science & Techonology* **36**: 703-725.
- Kuštrak, D. (2005) Farmakognozija fitofarmacija. Golden marketing-Tehnička knjiga, str. 28.
- Lapornik, B., Prosek, M., Golc, Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**: 214-222.
- Las, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mjekarstvo* **56**: 311-330.
- Liu, Q., Cai, W., Shao, X. (2008) Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* **77**: 679-683.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523-1542.
- Okafor P.C., Apebende E.A. (2014) Corrosion inhibition characteristics of *Thymus vulgaris*, *Xylopiya aethiopyca* and *Zingiber officinale* extracts on mild steel in H₂SO₄ solutions. *Pigment & Resin Technology* **43**: 357-364.
- Pallab K., Tapan K. B., Tapas K. P., Ramen K. (2013) Estimation of total flavonoids content (TFC) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* **3**: 33-37.
- Pekal A., Pyrzynska K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analitical Methods* **7**: 1776-1782.
- Percival, M. (1998) Antioxydants. *Clinical Nutrition* **31**: 1-4.

Perez - Fons, L., Aranda, F. J., Guillen, J., Villalain, J., Micol, V. (2006) Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpens affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **453**: 224-236.

Rodríguez-Rojo S., Visentin A, Maestri D., Cocero M. J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering* **109**: 98-103.

Schaffner, W., Häfelfinger, B., Ernst, B. (1999) Ljekovito bilje: kompendij. Leo-commerce, str. 239.

Sun, T., Ho, C. (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* **90**: 743-749.

Valenzuela, A., Nieto, S., Cassels, B. K., Speisky, H. (1992) Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **68**: 935-937.

Wei, G. J., Ho, C. T. (2006) A stable quinone identified in the reaction of carnosol, a major antioxidant in rosemary, with 2,2-diphenyl-1-pyerylhzdrazil radical. *Food Chemistry* **96**: 471-476.

Willfort, R. (1989) Ljekovito bilje i njegova upotreba, 3. izd., Mladost, str. 331.

Yesil Celiktas, O., Bedir, E., Vardar Sukan, F. (2007) In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* **101**: 1457-1464.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A. Buratović

ime i prezime studenta