

Utjecaj temperature, vremena i volumnog udjela acetona na prinos polifenola ekstrahiranih iz kore mandarine pomoću mikrovalova

Barić, Darja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:888678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Darja Barić

7133/BT

**UTJECAJ TEMPERATURE, VREMENA I VOLUMNOG UDJELA
ACETONA NA PRINOS POLIFENOLA EKSTRAHIRANIH IZ KORE
MANDARINE POMOĆU MIKROVALOVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj temperature, vremena i volumnog udjela acetona na prinos polifenola
ekstrahiranih iz kore mandarine pomoću mikrovalova**

Darja Barić, 0058207026

Sažetak: S porastom zanimanja za aspekte zelene kemije sve više pažnje se posvećuje pronalasku ekološki prihvatljivijih metoda ekstrakcije, a jedna od takvih je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima jer značajno skraćuje vrijeme tretiranja uzoraka uz upotrebu malih volumena otapala.

Tako je i u ovom radu ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima upotrebljena pri izolaciji polifenola iz kore mandarine, nusproizvoda prehrambene industrije, važnog izvora nutrijenata, bioaktivnih komponenti, ali i biotehnološke proizvodnje bioetanol i enzima pektinaze.

Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine je određen UV/Vis spektrofotometrijom u ovisnosti o primijenjenim procesnim parametrima ($T = 30$ i 50 °C, $t = 3, 7, 11$ i 22 min, uz $25, 50$ i 70 % aceton). Rezultati su pokazali da temperatura od 30 °C, vrijeme od 11 min i 70 % aceton omogućuju optimalnu ekstrakciju fenola i flavonoida, pa bi se navedeni parametri mogli primjenjivati i u daljnjim postupcima obrade kore mandarine pri izolaciji polifenola ovom ekološki prihvatljivom metodom.

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, kora mandarine, polifenoli, UV/Vis spektrofotometrija

Rad sadrži: 25 stranica, 8 slika, 5 tablica, 29 literaturnih 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

Datum obrane: 18.9.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Influence of temperature, time and volume fractions of acetone on polyphenols
yield extracted from mandarin peel by microwave**

Darja Barić, 0058207026

Abstract: With increasing of interest in green chemistry, a more attention is being devoted to finding environmentally-friendly extraction methods, and one of such is microwave-assisted extraction, which significantly reduced the time of sample treatment with uses of low volume of solvents.

Therefore, in this work microwave-assisted extraction is used for polyphenols extraction from mandarin peel, a by-product of the food industry, an important source of various nutrients, bioactive components, and also of biotechnological production of bio-ethanol and enzyme pectinases.

The content of phenols and flavonoids is determined by UV/Vis spectrophotometry, depending on used processing parameters ($T = 30$ i 50 °C, $t = 3, 7, 11$ i 22 min, with volume fractions of acetone of 25, 50 i 70 %). The results have shown that temperature of 30 °C, time of 11 min and 70 % acetone assured optimal extraction of phenols and flavonoids, thus, the mentioned parameters could be applied in further treatments of mandarin peel for polyphenols isolation by this environmentally accepted method.

Keywords: microwave-assisted extraction, mandarine peel, polyphenols, UV/Vis spectrophotometry

Thesis contains: 25 pages, 8 figures, 5 tables, 29 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

Defence date: 18.9.2019.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Mandarina i kora mandarine.....	2
2.2. Polifenoli.....	2
2.2.1. Fenoli.....	3
2.2.2. Flavonoidi.....	4
2.2.3. Polifenoli u kori mandarine.....	5
2.3. Metode ekstrakcije polifenola.....	5
2.3.1. Konvencionalne metode.....	6
2.3.1.1. Maceracija.....	6
2.3.1.2. Destilacija.....	6
2.3.1.3. Refluksiranje.....	7
2.3.1.4. Soxhlet ekstrakcija.....	7
2.3.2. Nekonvencionalne metode.....	7
2.3.2.1. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta.....	8
2.3.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima.....	8
2.3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	8
2.4. Određivanje polifenola UV/Vis spektrofotometrijom.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijal.....	10
3.2. Kemikalije.....	10
3.3. Aparatura i pribor.....	10
3.4. Metode rada.....	11
3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine pomoću mikrovalova.....	11
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	12
3.4.2.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola.....	13
3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline za određivanje baždarnog dijagrama.....	13
3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola.....	13
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.....	14
3.4.3.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida.....	14
3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina.....	14
3.4.3.3. Postupak određivanja ukupnih flavonoida.....	14

4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Određivanje ukupnih fenola	15
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida	18
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA.....	23

1. UVOD

Zbog lake dostupnosti i ekonomske isplativosti, danas se sve više istražuju različiti biljni materijali. Oni su nosioci mnoštva bioaktivnih sastojaka, pa zbog izrazite koristi za ljudski organizam nalaze sve češću primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Al-Otaibi i sur., 2012).

Najznačajnije bioaktivne komponente biljaka jesu polifenoli s izraženom antioksidativnom aktivnošću (mogućnost hvatanja slobodnih radikala, doniranja elektrona ili vodikovog atoma te keliranja kationa metala). Osim antioksidativne aktivnosti, polifenoli pokazuju i antibakterijsko, antiviralno, sedativno, antialergijsko te antimutageno djelovanje.

Prisutni su u hrani biljnog porijekla poput voća, povrća i začinskih biljaka, kao i različitim bio-supstratima nastalim tijekom industrijske prerade namirnica. Tako primjerice za vrijeme proizvodnje sokova (oko 44 %) iz citrusa (oko 33 %) dolazi do prikupljanja znatnih količina kore (oko 15 milijuna tona godišnje) (Putnik i sur., 2017). Ona se može koristiti kao stočna hrana, no, istraživanja su pokazala da ovaj nusproizvod sadržava i različite bio-organske molekule, poput vlakana, polifenola, karotenoida i esencijalnih ulja (Putnik i sur., 2017). Također, otpad citrusa može se iskoristiti i za izolaciju bojila i aditiva. Među citrusima i kora mandarine (*Citrus reticulata*) predstavlja jedan od jeftinih bio-supstrata za njihovu ekstrakciju. Pored navedenog kora mandarine se koristi i u proizvodnji bio-goriva (bio-etanol), pektina i limonena (Pourbafrani i sur., 2010).

Tako i ovaj rad predstavlja jedan od znanstvenih doprinosa u skladu s aktualnim trendovima iskorištavanja otpada prehrambene industrije (Ninčević Grassino i sur., 2016a; Ninčević Grassino i sur., 2016b; Ninčević Grassino i sur., 2018; Tranfić Bakić i sur., 2019).

Primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (*engl.* microwave-assisted extraction, MAE) kao ekološki prihvatljive i brze metode ekstrakcije, ispitan je utjecaj procesnih parametara (temperature, vremena i volumnog udjela acetona) na prinos fenola i flavonoida izoliranih iz kore mandarine. Istraživanje je provedeno kroz nekoliko niže navedenih faza:

- ekstrakcija uzoraka uz volumni udio acetona od 25, 50 i 70 %, pri temperaturi od 30 i 50 °C i vremenu od 3, 7, 11 i 22 minute,
- određivanje sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktima, odnosno uzorcima kore mandarine primjenom UV/Vis spektrofotometrije, i
- određivanja optimalnih parametara ekstrakcije koji će se koristiti kao baza u daljnjim postupcima obrade kore mandarine primjenom MAE kao ekološki prihvatljive, nekonvencionalne ekstrakcijske tehnike.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mandarina i kora mandarine

Mandarina (*Citrus reticulata*) je biljka iz porodice agruma porijeklom iz Kine. Drvo može narasti i do 7,5 metara, deblo i glavne grane imaju trnje, listovi su zeleni i sjajni, a peteljke kratke, dok cvjetove formiraju pojedinačno ili u manjim grupama.

Plodovi mandarine relativno su maleni (promjera oko 8 cm), narančaste ili narančasto-žute boje. Endokarp ploda podijeljen je u segmente, bez ili s manjim brojem koštica, sočan je i slatkastog okusa, bogat vitaminom C.

Kora mandarine je tanka i lako se oguli što predstavlja glavnu prednost u odnosu na druge citrusne. Narančaste je ili žuto-narančaste boje, bogata brojnim nutrijentima pogodnim za ljudsko zdravlje. Kora mandarine se najčešće odbacuje kao otpad pri preradi i korištenju ploda, no ona predstavlja jeftin i lako dostupan izvor nutrijenata i bioaktivnih spojeva, pogotovo polifenola, dijetalnih vlakana i vitamina skupine C (Rafiq i sur., 2016). Iz tog razloga se sve učestalije primjenjuje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, te u biotehnološkoj proizvodnji biogoriva (bioetanol), limonena i bioplina (saharifikacijom i fermentacijom pomoću *Saccharomyces cerevisiae* pri 37 °C) (Pourbafrani i sur., 2010), te u proizvodnji pektinaza pomoću *Aspergillus niger* pri 30 °C (Dhillon i sur., 2004).

2.2. Polifenoli

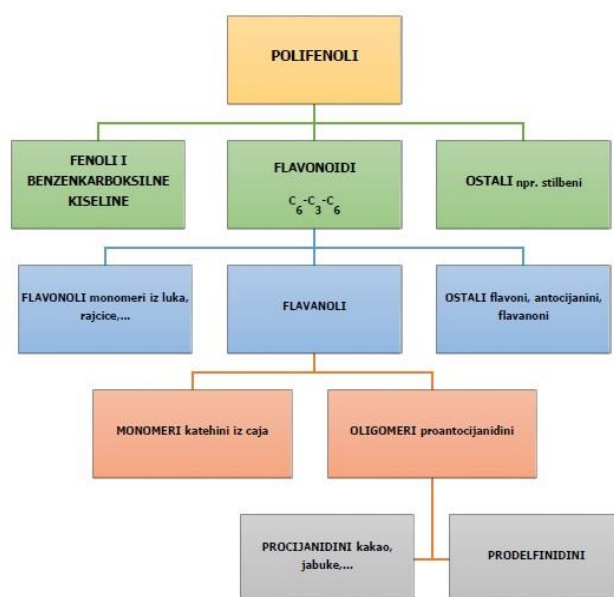
Polifenoli su fitokemikalije, prirodno prisutne kod biljaka, a pokazuju značajna antioksidativna svojstva - mogućnost hvatanja slobodnih radikala, doniranje elektrona ili vodikovog atoma te keliranje kationa metala, što ih čini značajnim čimbenicima u borbi protiv oštećenja stanica. Osim antioksidativne aktivnosti, polifenoli mogu djelovati i na gene i ekspresiju gena, a njihov utjecaj na organizam nije jednak kod svake osobe. Tako specifični geni pojedine osobe mogu utjecati na reakcije tijela na pojedine vrste polifenola (Ware, 2017).

Istraživanja pokazuju da fenolni spojevi mogu inhibirati replikaciju virusa humane imunodeficijencije (HIV) i humani simpleks virus (HSV), inhibirati glukozil transferazu *Streptococcus mutans* (nastanak karijesa), ksantin i monoamin oksidaze, tumorske promotore i neke citotoksine (Nayak i sur., 2015).

Polifenoli pokazuju i značajna protuupalna, antialergijska i antikancerogena svojstva, a ujedno mogu poboljšati kvalitetu i svojstva hrane u koju se dodaju (Nayak i sur., 2015).

Postoji više od 500 različitih polifenola, heterogenih struktura i svojstva (Slika 1), od kojih su najznačajnije skupine fenoli i flavonoidi (Berend i Grabarić, 2008). Iako se polifenoli međusobno razlikuju u molekulskim masama i strukturi, ipak svi sadrže aromatsku jezgru s jednom ili više hidroksilnih skupina (Khoddami i sur., 2013).

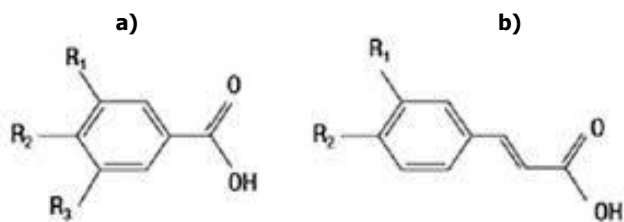
Polifenoli su najčešće prisutni u biljkama u obliku estera ili konjugiranih oblika različitih saharida. Njihova koncentracija ovisi o uvjetima kultivacije i skladištenja biljke, kao i njenoj zrelosti (Brglez Mojzer i sur., 2016).



Slika 1. Opća podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

2.2.1. Fenoli

Fenoli, tj. fenolne kiseline aromatski su sekundarni metaboliti koji se u prirodi najčešće pojavljuju u dva oblika, kao hidrokisbenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Slika 2) (Ignat i sur., 2011). Prisutni su u obliku glikozida, etera ili estera, a male količine i u slobodnom obliku.

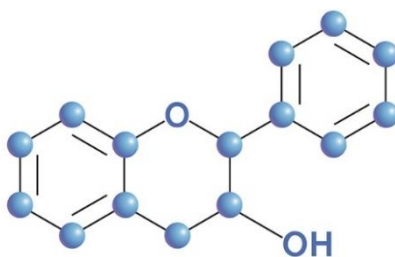


Slika 2. Strukturna formula hidroksibenzojeve (a) i hidroksicimetne (b) kiseline (Ignat i sur., 2011).

Fenolne kiseline pokazuju značajno antikancerogeno, antiviralno i antibakterijsko djelovanje, a ujedno i poboljšavaju imunosti sustav i smanjuju alergijske reakcije. Zbog izrazitog antioksidacijskog djelovanja provode se brojna istraživanja primjene fenola pri tretiranju Alzheimerove bolesti (Li i sur., 2018). Primjenjuju se kao hepatoprotektivni lijekovi, protuupalni agensi i antioksidansi (Brglez Mojzer i sur., 2016).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su derivati aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina karakteristični po svojoj konfiguraciji od 15 ugljikovih atoma u obliku difenilpropanskog kostura (Slika 3), građenog od dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom (Balasundram i sur., 2006). Flavonoidi se dijele na 7 podgrupa, a čine ih flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijani, procijanidi, flavan-3-oli i flavan-3,4-dioli.

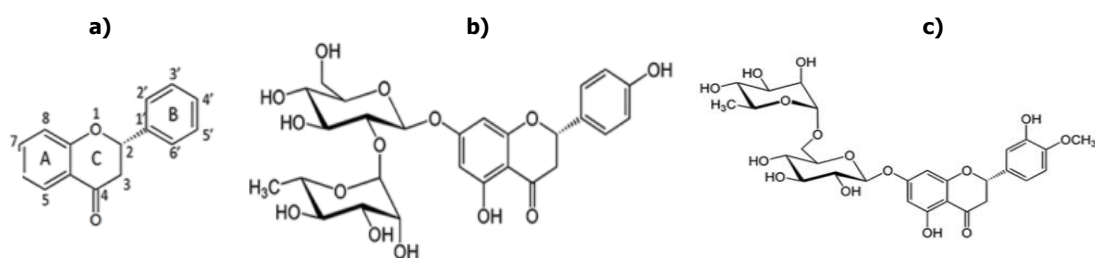


Slika 3. Strukturna formula flavonoida (Robinson, 2017).

Flavonoidi pokazuju izrazito antioksidacijsko, antialergijsko, antitumorsko, antiviralno i protuupalno djelovanje. Kvercetin, jedan od flavonoida, učestalo se primjenjuju pri liječenju astme, visoke temperature i sinusivitisa, a flavonoidi su se pokazali izvrsni i u borbi protiv osipa i ekcema na koži te dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti budući da smanjuju razinu triglicerida i kolesterola u krvi (Robinson, 2017.)

2.2.3. Polifenoli u kori mandarine

Najčešće prisutni polifenoli u kori mandarine se flavonoidi. Iako su prisutniji u drugim dijelovima mandarine (plod, koštice i lišće), u kori se mogu naći neki od flavonoida karakteristični isključivo za citruse (Karsheva i sur., 2013). To su polimetoksilirani flavoni, flavanoni te flavanon glikozidi kao najzastupljeniji. Od flavanon glikozida (Slika 4), u kori mandarine ima najviše naringina, hesperidina, narirutina i neohesperidina (Karsheva i sur., 2013).



Slika 4. Strukturne formule flavanon glikozida: a) opća strukturna formula, b) naringin i c) hesperidin (Remya i sur., 2014).

2.3. Metode ekstrakcije polifenola

Prije same ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala, potrebno je provesti usitnjavanje uzoraka bilo svježeg (npr. pomoću blendera) ili prethodno osušenog (npr. pomoću kugličnih mlinova).

Ekstrakcija se najčešće vrši pomoću vode ili nekog od polarnih otapala, poput metanola, acetonitrila, etanola, acetona te njihovih vodenih otopina, pri niskom pH budući pa kiseli pH utječe na neutralnost polifenola i njihovu lakšu ekstrakciju u organska otapala (Rajbhar i sur., 2015).

Metode ekstrakcije polifenola su mnogobrojne, a mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: konvencionalne i nekonvencionalne (Azmir i sur., 2013).

2.3.1. Konvencionalne metode

Konvencionalne metode ekstrakcije temelje se na primjeni selektivnih otapala i/ili povišene temperature, a njihova efikasnost se poboljšava miješanjem reakcijske smjese kako bi se osigurao brži prijenos mase ciljanih spojeva u otapalo.

Prva korištena konvencionalna metoda bila je maceracija, ali zbog niskih prinosa i pretjeranog utroška vremena težilo se njenom poboljšanju ili pronalasku efikasnije metode. Tako se uz prethodno spomenutu maceraciju, od konvencionalnih metoda ekstrakcije, najčešće koriste destilacija, refluksiranje i Soxhlet ekstrakcija.

2.3.1.1. Maceracija

Maceracija je postupak ekstrakcije bioaktivnih tvari iz usitnjenog biljnog materijala. Kako bi maceracija bila što uspješnija biljni materijal je potrebno usitniti do adekvatne granulacije čime se povećava kontaktna površina između biljnog materijala i otapala te time osigurava efikasnija ekstrakcija. Važnu ulogu kod povećanja efikasnosti maceracije ima i odabir odgovarajućeg otapala, te vrijeme trajanja maceracije, koji se određuju eksperimentalno i optimiraju za svaki biljni materijal.

U postupku maceracije usitnjeni biljni materijal se dodaje u otapalo i ostavi kroz određeno vrijeme kako bi se bioaktivne komponente ekstrahirale. Nakon ekstrakcije potrebno je provesti filtraciju kako bi se macerirani biljni materijal odvojio od tekućine (ekstrakta) koji sadrži bioaktivne sastojke. Maceracija se provodi pri sobnoj temperaturi, a difuzija bioaktivnih tvari u otapalo dodatno se pospješuje miješanjem. Ova metoda može se primijeniti za ekstrakciju polifenola, ali kao što je već spomenuto, zbog niske efikasnosti i dugog vremena trajanja rijetko se primjenjuje.

2.3.1.2. Destilacija

Destilacija je postupak ekstrakcije bioaktivnih spojeva zagrijavanjem usitnjenog biljnog materijala, vodom ili vodenom parom, pri čemu se lako hlapljivi sastojci prenose parom u kondenzator gdje se dalje odjeljuju dekantiranjem.

Kod vodene destilacije materijal je potpuno uronjen u vodu koja se zatim zagrijava pri čemu dolazi do direktnog kontakta između kipuće vode i biljnog materijala. Kod destilacije vodenom parom, biljni materijal se postavi iznad vode koja se zagrijava, a biljni materijal dolazi u kontakt isključivo s vodenom parom, a ne i kipućom vodom. Glavni nedostatak

ekstrakcije destilacijom jest razgradnja termolabilnih spojeva uslijed zagrijavanja pa se ova metoda rijetko koristi kod ekstrakcije polifenola (Herrero i sur., 2010).

2.3.1.3. Refluksiranje

Kod ekstrakcije uz refluks, tikvica koja sadrži biljni materijal uronjen u odgovarajuće otapalo zagrijava se do vrenja. Otapalo isparava, prolazi kroz povratno (Liebigovo) hladilo, kondenzira se i sakuplja u tikvicu. Ekstrakcija traje nekoliko sati, a prije samog postupka refluksiranja, usitnjeni biljni materijal može se macerirati u otapalu tijekom određenog vremenskog perioda. Ova metoda se koristi za ekstrakciju termostabilnih sastojaka u malim (nekoliko grama) i velikim (desetak kilograma) količinama (Lui, 2011). Prednosti ove metode su što povišena temperatura utječe na poboljšanje ekstrakcije, bez potrebe za dodatkom novih volumena otapala budući da se ono kondenzira i time regenerira. Unatoč navedenim prednostima, ni ova metoda nije pogodna za ekstrakciju polifenola zbog njihove termolabilnosti.

2.3.1.4. Soxhlet ekstrakcija

Komercijalno dostupan Soxhlet uređaj sastoji se od ekstrakcijske komore s refluksnim kondenzatorom i sabirnom tikvicom. Biljni materijal stavi se u celulozni tuljac, a prikladno otapalo se zatim doda u posudu i zagrijava uz refluks. Otapalo prvo ispari u kondenzator, a zatim se upari u ekstrakcijsku komoru (Liu, 2011). Glavni nedostaci ove metode su dugo vrijeme trajanja ekstrakcije, veliki volumeni otapala i degradacija termolabilnih spojeva zbog čega ni ova metoda nije pogodna za ekstrakciju polifenola.

2.3.2. Nekonvencionalne metode

Nekonvencionalne metode ekstrakcije razvijene su kako bi se prevladali nedostaci konvencionalnih metoda, tj. kako bi se smanjilo vrijeme ekstrakcije i upotreba otapala visoke čistoće, povećala selektivnost analita i omogućila ekstrakcija termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013). Neke od najznačajnijih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije su ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

2.3.2.1. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta

Metoda se bazira na propuštanju ultrazvučnog vala (20 kHz do 100 MHz) kroz smjesu usitnjenog biljnog materijala i odgovarajućeg otapala, smještenih u zatvorenom spremniku. Ultrazvuk prenosi mehaničku snagu na biljni materijal što dovodi do pucanja stanične stijenke biljke te povećanja topljivosti metabolita u otapalu. Na prinos ekstrakcije uglavnom utječu frekvencija i valna duljina zvuka (Liu, 2011). Ova metoda pogodna je za ekstrakciju termolabilnih spojeva, pa prema tome i polifenola, te se često upotrebljava u laboratorijima (Liu, 2011).

2.3.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Superkritični fluid je tvar koja se nalazi pri temperaturi i tlaku višim od njegove termodinamičke kritične točke pa pokazuje svojstva i tekućina (otapa tvari) i plinova (penetrira u svaku poru). Najčešće korišteni superkritični fluidi su CO₂ i voda (Liu, 2011). Topljivost bioaktivnih spojeva u superkritičnom fluidu raste s porastom tlaka, dok brzom ekspanzijom superkritičnog fluida dolazi do taloženja bioaktivnih tvari. Ova metoda ekološki je prihvatljiva i primjenjuje se pri ekstrakciji raznih polifenola, posebice flavonoida (Liu, 2011).

2.3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima počinje se razvijati 1980-ih godina, a danas predstavlja jednu od najpopularnijih i najekonomičnijih, nekonvencionalnih metoda ekstrakcije. Pogodna je za ekstrakciju biljnih materijala s visokim udjelom vode, dok oni s niskim sadržajem vode zahtijevaju dulje vrijeme zagrijavanja u mikrovalnom reaktoru.

Kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima korištene frekvencije moraju se nalaziti u području prirodne frekvencije molekula vode, a temperatura biljnog materijala zagrijanog u mikrovalnom reaktoru ne smije prelaziti temperaturu vrenja vode, tj. 100 °C (Rajbhar i sur., 2015). Metoda se bazira na interakcijama električnog polja mikrovalova s dipolnim molekulama otapala, pri čemu dolazi do zakretanja dipola u skladu s oscilirajućim električnim poljem mikrovalova. U trenutku kad se dipolne molekule ne mogu dovoljno brzo zakretati u električnom polju mikrovalova, dolazi do njihova sudaranja i zagrijavanja (Burkert i sur., 1993). Prednosti ove metode su to što omogućava nekoliko kvantitativnih ekstrakcija u svega

par minuta, uz upotrebu malih volumena otapala te odlične kontrole temperature tijekom ekstrakcije (Rajbhar i sur., 2015), pa je povoljna i za ekstrakciju termolabilnih spojeva kao što su polifenoli.

2.4. Određivanje polifenola UV/Vis spektrofotometrijom

UV/Vis spektrofotometrija je analitička metoda koja se koristi za kvantitativno određivanje analita koji apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u ultraljubičastom (200 - 400 nm) ili vidljivom (400 - 00 nm) dijelu spektra. Tijekom izlaganja tvari UV/Vis elektromagnetnom zračenju dolazi do pobuđivanja elektrona (prelaska elektrona u više energetske stanje). Elektroni koji apsorbiraju energiju i prelaze u pobuđeno stanje su nevezni elektroni i π -elektroni karakteristični za nezasićene molekule, konjugirane sustave sa heteroatomima te ione prijelaznih metala.

Spojeve koji ne apsorbiraju UV/Vis zračenje potrebno je prevesti u oblike koji u ovom dijelu spektra apsorbiraju zračenje, što se postiže dodatkom kromogenih reagenasa. Instrument koji se koristi u UV/Vis spektrofotometriji naziva se spektrofotometrom, a mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz uzorak (I) te ga uspoređuje s intenzitetom ulaznog svjetla (I_0). Svaki UV/Vis spektrofotometar sastoji se od izvora svjetlosti, utora za umetanje kivete s uzorkom, monokromatora te detektora.

Koncentracija analita u uzorku određuje se pomoću Lambert-Beerovog zakona (1):

$$A = \log_{10} (I_0/I) = \varepsilon b c \quad (1)$$

pri čemu I_0 predstavlja intenzitet ulazne zrake, I intenzitet izlazne zrake, A apsorbanciju, ε molarni apsorpcijski koeficijent, b debljinu sloja otopine, a c množinsku koncentraciju analita.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

Kora mandarine iz područja Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska), dopremljena svježa, ručno oguljena, narezana na komadiće i zamrznuta. Prije same pripreme uzorka za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, kora je odmrznuta i usitnjena ručnim blenderom.

3.2. Kemikalije

Pri pripremi uzoraka, njihovoj ekstrakciji i kvantitativnoj analizi korištene su sljedeće kemikalije:

- Aceton 99 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96% (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Folin-Ciocalteu (FC) reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb Hrvatska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Metanol 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

3.3. Aparatura i pribor

Tijekom rada korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- UV/Vis spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, START S Microwave Labstation for Synthesis, Bergamo, Italija)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Boce za čuvanje otopina od 50 i 500 mL
- Cjedilo

- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka od 25 mL
- Filter papiri
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Gaza
- Menzure od 10 i 100 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25 i 100 mL
- Propipete
- Ručni blender
- Staklene čaše od 50, 100 i 250 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Tikvice s okruglim dnom od 50 mL

3.4. Metode rada

Tijekom rada korištene su sljedeće metode:

- Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine pomoću mikrovalova
- UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine

3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine pomoću mikrovalova

Oko 1,3 g usitnjene kore mandarine je odvagano i preneseno u tikvicu s okruglim dnom. U svaku pojedinu tikvicu je dodano 25 mL odgovarajućeg otapala s volumnim udjelom acetona od 25, 50 i 70 % (priprema iz čistog, 99 %-tnog acetona uz razrjeđenje s deioniziranom vodom u odmjernim tikvicama od 500 mL do oznake).

Svi pripremljeni uzorci su ekstrahirani u mikrovalnom reaktoru (princip objašnjen u poglavlju 2.3.2.3.) na temperaturi od 30 i 50 °C, u vremenu od 3, 7, 11 i 22 minute. Parametri ekstrakcije prikazani su u Tablici 1.

Nakon završene ekstrakcije otopine su procijeđene kroz gazu i cjedilo te profiltrirane u odmjerne tikvice od 25 mL koje su zatim do oznake nadopunjene odgovarajućim vodenim otopinama acetona. Ovako pripremljene otopine su prebačene u Falcon kivete od 25 mL, te čuvane u hladnjaku do UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja fenola i flavonoida.

Tablica 1. Parametri primijenjeni pri ekstrakciji polifenola iz uzorka kore mandarine pomoću mikrovalova.

UZORAK	φ (acetona)/%	T (ekstrakcije)/°C	t (ekstrakcije)/min
1 DB	25	30	3
2 DB			7
3 DB			11
4 DB			22
5 DB	50		3
6 DB			7
7 DB			11
8 DB			22
9 DB	70		3
10 DB			7
11 DB			11
12 DB			22
13 DB	25	50	3
14 DB			7
15 DB			11
16 DB			22
17 DB	50		3
18 DB			7
19 DB			11
20 DB			22
21 DB	70		3
22 DB			7
23 DB			11
24 DB			22

3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja ukupnih fenola opisan je u poglavlju 2.4. Metoda je bazirana na kolorimetrijskoj reakciji fenola i Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (sastoji se od fosfomolibdenove i fosfomolibdenove kiseline) u kojoj dolazi do oksidacije fenola i redukcije FC reagensa do volfram i molibden oksida (daju plavo obojenje i apsorbiraju u UV/Vis dijelu spektra). Intenzitet nastalog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 760 nm (Ough i Amerine, 1998).

3.4.2.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa množinske koncentracije 0,2 mol/L pripremljena je pipetiranjem 2,5 mL FC reagensa ($c = 2$ mol/L) u odmjerne tikvici od 25 mL i nadopunjavanjem s deioniziranom vodom do oznake.
- Otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v) pripremljena je vaganjem 100 g krutog Na_2CO_3 i otapanjem u 400 mL vruće, proključale deionizirane vode. Ovako pripremljenoj i na sobnoj temperaturi ohlađenoj otopini dodano je još nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Nakon 24 h otopina je profiltrirana.

3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline za određivanje baždarnog dijagrama

Ishodna otopina galne kiseline ($\gamma = 5$ g/L) pripremljena je vaganjem i otapanjem 0,5 g galne kiseline u 10 mL 96 %-tne otopine etanola, nakon čega je odmjerne tikvica od 100 mL do oznake nadopunjena deioniziranom vodom.

Pojedinačne standardne otopine galne kiseline masenih koncentracija 10, 30, 50, 100 i 130 mg/L pripremljene su pipetiranjem 0,2, 0,6, 1,0, 2,0 i 2,6 mL alikvota ishodne otopine u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 1 mL otopine standarda ($\gamma = 10, 30, 50, 100$ i 130 mg/L) ili 1 mL deionizirane vode za slijepu probu. Potom se doda 10 mL deionizirane vode i 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2$ mol/L). Nakon 5 minuta u otopinu se doda 3,75 mL otopine Na_2CO_3 (20 %, w/v), a zatim se tikvice nadopune deioniziranom vodom do oznake. Priređene otopine čuvaju se 2 h na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu, nakon čega im se izmjeri apsorbanacija pri $\lambda = 760$ nm.

Otopine uzoraka (ekstrakata kore mandarine) pripreme se na jednak način kao i otopine standarda, no umjesto 1 mL standarda korišteno je 0,4 mL uzorka (ekstrakta), odnosno 0,4 mL deionizirane vode (slijepa proba).

3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi se određuju UV/Vis spektrofotometrijom prema principu opisanom u poglavlju 2.4. Metoda se temelji na nastanku stabilnog aluminij-flavonoid kompleksa između aluminija i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola, koji apsorbira u UV/Vis zračenje pri valnoj duljini od 510 nm (de Rijke i sur., 2006).

3.4.3.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- Otopina NaNO_2 (5 %, *w/v*) pripravljena je vaganjem i otapanjem 5 g krutog NaNO_2 u 100 mL deionizirane vode.
- Otopina AlCl_3 (10 %, *w/v*) pripravljena je vaganjem i otapanjem 10 g krutog AlCl_3 u 100 mL deionizirane vode.
- Otopina NaOH ($c = 1$ mol/L) pripravljena je vaganjem i otapanjem 8 g krutog NaOH u 200 mL deionizirane vode.

3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina

Polazna otopina rutina ($\gamma = 1$ g/L) pripravljena je vaganjem 0,1000 g rutina i njegovim otapanjem s 96 %-tnim metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

Pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L pripravljene su pipetiranjem 0,5, 2, 4, 6, 8 i 12 mL alikvota polazne otopine rutina u odmjerne tikvice od 100 mL, a zatim su tikvice nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

3.4.3.3. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Flavonoidi se određuju pipetiranjem 1 mL standarda ili deionizirane vode (slijepa proba) u odmjerne tikvice od 10 mL. Zatim se doda 2 mL deionizirane vode, 0,3 mL NaNO_2 (5 %), a nakon 5 min i 0,5 mL otopine AlCl_3 (10 %). Nakon 6 min u tikvice se doda još i 2 mL otopine NaOH ($c = 1$ mol/L), te se tikvice nadopune deioniziranom vodom do oznaka. Ovako priredjenim otopinama izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

Na isti način pripreme se i otopine uzoraka, no umjesto 1 mL standarda u uzorak se stavi 1 mL ekstrakta mandarine.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu opisan je postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i spektrofotometrijskog određivanja polifenola (ukupnih fenola i flavonoida) iz kore mandarine. Ispitan je utjecaj volumnog udjela otapala (25, 50 i 70 % aceton), temperature (30 i 50 °C) te vremena ekstrakcije (3, 7, 11 i 22 min) na efikasnost ekstrakcije polifenola. Iz dobivenih rezultata određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije fenola i flavonoida.

4.1. Određivanje ukupnih fenola

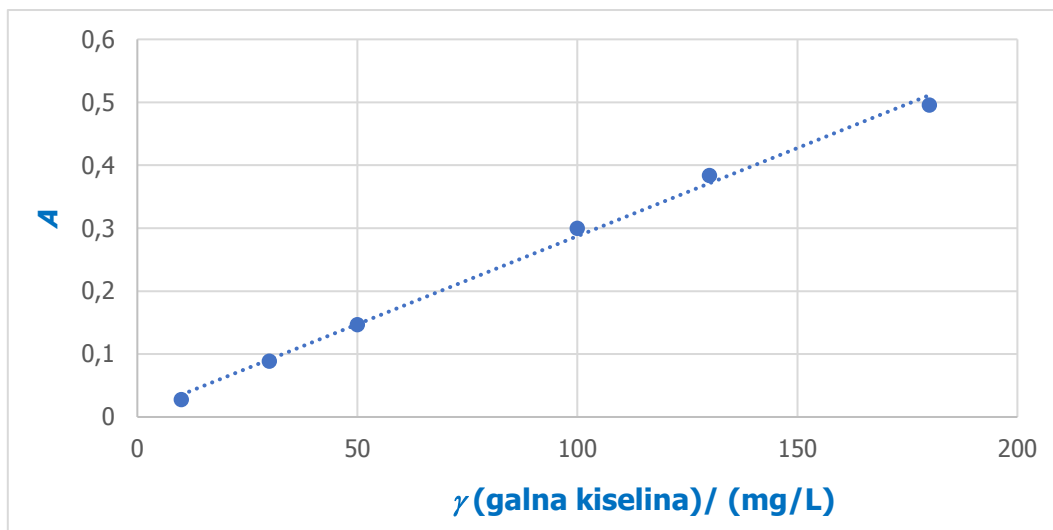
U Tablici 2 prikazane su vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline (postupak opisan u poglavlju 3.4.2.) izmjerenih spektrofotometrom s pripadajućim masenim koncentracijama. Na temelju dobivenih vrijednosti konstruiran je baždarni dijagram (Slika 5), a iz dobivene jednadžbe pravca ($y=0,0028x + 0,0074$) izračunate su masene koncentracije fenola u alikvotima ekstrakata kore mandarine, a potom su konačne vrijednosti izražene kao mg galne kiseline po g ekstrahirane kore mandarine (Tablica 3).

Slika 6 prikazuje utjecaj procesnih parametara (Tablica 1) na prinos ukupnih fenola nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na uzorcima kore mandarine.

Tablica 2. Izmjerene vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline.

γ (galna kiselina)/(mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{sr.} \pm SD$
0	0,000	0,000	0,000	0,000 \pm 0,000
10	0,030	0,029	0,026	0,028 \pm 0,002
30	0,089	0,089	0,088	0,089 \pm 0,001
50	0,151	0,145	0,146	0,147 \pm 0,003
100	0,299	0,300	0,300	0,300 \pm 0,001
130	0,382	0,386	0,384	0,384 \pm 0,002
180	0,495	0,496	0,496	0,496 \pm 0,001

$N = 3$, SD = standardna devijacija



Slika 5. Baždarni dijagram galne kiseline.

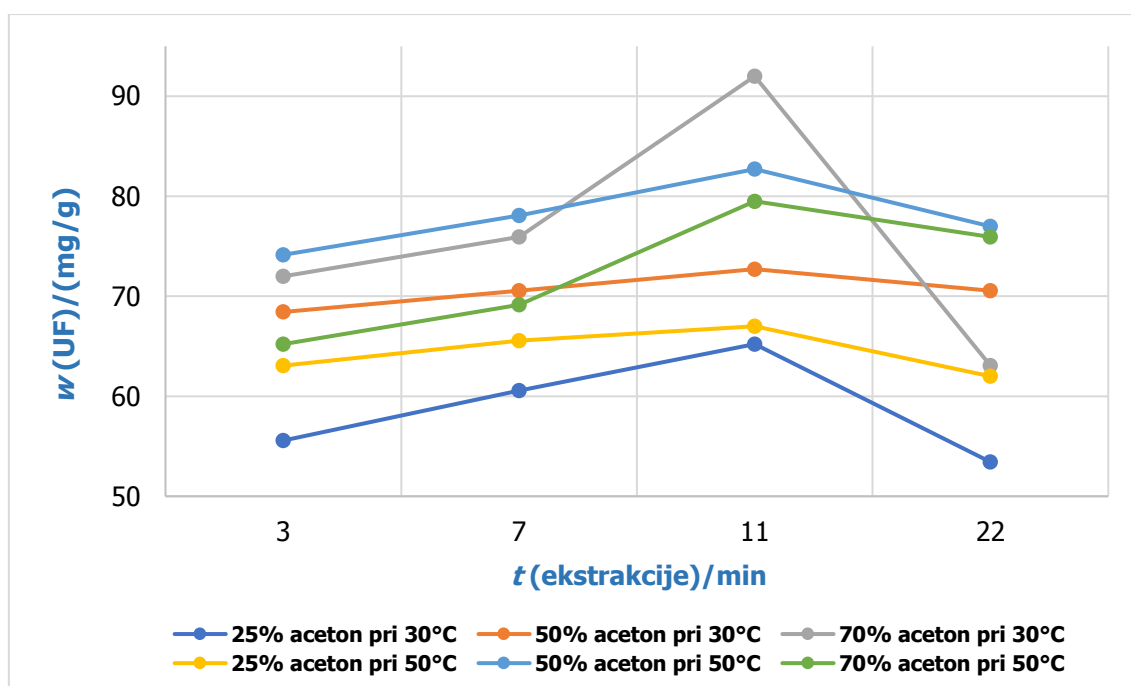
Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

UZORAK	Parametri ekstrakcije			$A_{sr.} \pm SD$	$w(UF)/(mg/g) \pm SD$
	φ (acetone)/%	$T/^\circ C$	t/min		
1 DB	25	30	3	0,163 ± 0,000	66,79 ± 0,00
2 DB			7	0,177 ± 0,001	72,80 ± 0,30
3 DB			11	0,190 ± 0,001	78,38 ± 0,61
4 DB			22	0,157 ± 0,000	63,73 ± 0,00
5 DB	50		3	0,199 ± 0,000	82,25 ± 0,44
6 DB			7	0,205 ± 0,001	84,82 ± 0,30
7 DB			11	0,211 ± 0,000	87,40 ± 0,00
8 DB			22	0,205 ± 0,001	84,17 ± 0,76
9 DB	70	3	0,209 ± 0,006	86,54 ± 2,73	
10 DB		7	0,220 ± 0,000	92,69 ± 1,01	
11 DB		11	0,265 ± 0,001	110,58 ± 0,30	
12 DB		22	0,184 ± 0,001	75,81 ± 0,61	
13 DB	25	50	3	0,184 ± 0,000	74,10 ± 1,21
14 DB			7	0,191 ± 0,000	78,21 ± 0,43
15 DB			11	0,195 ± 0,000	78,71 ± 1,28
16 DB			22	0,181 ± 0,000	74,52 ± 0,40
17 DB	50		3	0,215 ± 0,001	87,76 ± 1,25
18 DB			7	0,226 ± 0,000	93,84 ± 0,00
19 DB			11	0,239 ± 0,001	99,42 ± 0,30
20 DB			22	0,223 ± 0,000	92,55 ± 0,00
21 DB	70	3	0,190 ± 0,000	78,99 ± 0,43	
22 DB		7	0,201 ± 0,001	83,10 ± 0,30	
23 DB		11	0,230 ± 0,000	95,55 ± 0,00	
24 DB		22	0,220 ± 0,000	91,26 ± 0,00	

$N = 3$, SD = standardna devijacija

Iz priložene slike vidi se da u vremenskom rasponu od 3 do 11 min dolazi do porasta masenih udjela ukupnih fenola, a potom vrijednosti naglo opadaju. Dakle, može se zaključiti da povećanjem vremena ekstrakcije na 22 min dolazi do razgradnje fenola, pa se ovo vrijeme ne bi trebalo upotrebljavati u daljnjim postupcima ekstrakcije fenola pomoću mikrovalova. Najviše fenola je ekstrahirano u vremenu od 11 min, pri 30 i 50 °C, uz volumne udjele acetona od 25, 50 i 70 %.

Najslabijim otapalom pokazao se 25 %-tni aceton u odnosu na ostala upotrijebljena otapala neovisno o temperaturi i vremenu ekstrakcije. Tako je upotrebom 25 %-tnog acetona pri temperaturi od 30 °C i vremenu ekstrakcije od 22 min dobiven najmanji prinos fenola (63,73 mg/g). Uz 50 i 70 %-tni aceton pri temperaturama od 30 i 50 °C postignuti su znatno viši prinosi, pa se navedeni parametri mogu smatrati vrlo učinkovitim pri ekstrakciji fenola iz kore mandarine u vremenskom rasponu od 3 do 11 min. Ipak, valja naglasiti da je najviše fenola s masenim udjelom od 110,58 mg/g ekstrahirano u vremenu od 11 min pri 30 °C uz 70 % aceton.



Slika 6. Ovisnost masenih udjela ukupnih fenola (UF) o vremenu ekstrakcije.

U istraživanju koje su proveli Nayak i sur. (2015) pokazano je da količina ekstrahiranih fenola raste s porastom volumnog udjela acetona od 20 do 50 %, dok ekstrakcijom uz 80 %-tni aceton njihova količina opada. Rezultati dobiveni u istraživanju

Nayak i sur. (2015) se djelomično slažu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Naime, s porastom udjela acetona od 25 do 50 % raste i udio ekstrahiranih fenola. Uz 70 %-tni aceton, kod temperature od 50 °C vrijednosti fenola opadaju, dok kod temperature od 30 °C rastu. Nadalje, u istraživanju Nayak i sur. (2015) 50 %-tni aceton se pokazao najefikasnijim ekstrakcijskim sredstvom, dok u ovom radu i 50 i 70 % aceton daju visoke udjele fenola, ovisno o temperaturi ekstrakcije. Oba istraživanja su pokazala da s porastom vremena ekstrakcije raste i udio fenola, a zatim se naglo smanjuje (Slika 6). Tako je optimalno vrijeme ekstrakcije u radu Nayak i sur. (2015) 120 s, a u ovom istraživanju 11 min.

Promatrajući utjecaj temperature ekstrakcije na prinos ukupnih fenola vidi se (Slika 6) da je pri temperaturi od 50 °C, u vremenskom rasponu od 3 do 22 min, uz volumne udjele acetona od 25, 50 i 70 % ekstrahirano više fenola u odnosu na iste ekstrakcijske parametre kod temperature od 30 °C. Izuzetak čini uzorak 11 DB kod kojeg je pri temperaturi od 30 °C, tijekom 11 min ekstrakcije uz 70 %-tni aceton ostvaren najbolji prinos fenola, pa se ovi ekstrakcijski parametri mogu upotrijebiti i kod daljnjih priprava ekstrakata kore mandarine.

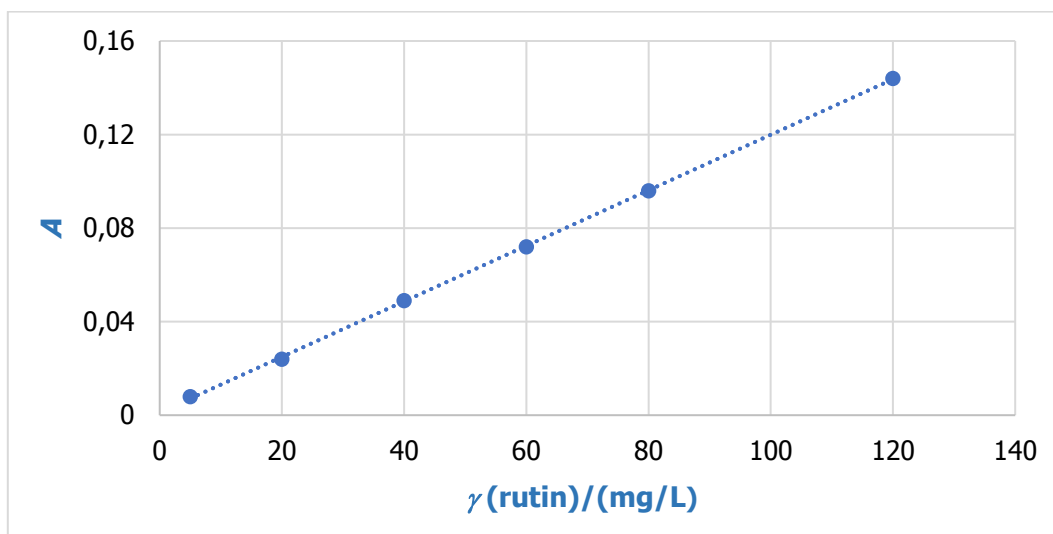
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida

U Tablici 4 prikazane su vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom za pojedinačne standardne otopine rutina (postupak opisan u poglavlju 3.4.3.). Na temelju prikazanih vrijednosti konstruiran je baždarni dijagram (A vs γ , Slika 7), a iz dobivene jednadžbe pravca ($y=0,0012x + 0,0012$) izračunate su masene koncentracije flavonoida u alikvotima ekstrakata kore mandarine, a potom i u početnom uzorku. U konačnici rezultati su prikazani kao mg rutina po g ekstrahirane kore mandarine (Tablica 5).

Tablica 4. Izmjerene vrijednosti apsorbancija standardnih otopina rutina.

γ (rutin)/(mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{sr.} \pm SD$
0	0	0	0	0,000 \pm 0,000
5	0,008	0,008	0,008	0,008 \pm 0,000
20	0,024	0,023	0,024	0,024 \pm 0,001
40	0,050	0,048	0,049	0,049 \pm 0,001
60	0,073	0,070	0,072	0,072 \pm 0,002
80	0,095	0,096	0,096	0,096 \pm 0,001
120	0,144	0,143	0,144	0,144 \pm 0,001

$N = 3$, SD = standardna devijacija



Slika 7. Baždarni dijagram rutina.

Utjecaj procesnih parametara (Tablica 1) na prinos ukupnih flavonoida nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na uzorcima kore mandarine upotpunjuje i Slika 8.

Kao i kod fenola, tako i kod flavonoida, vidljivo je da s porastom vremena ekstrakcije u rasponu od 3 do 11 min raste i udio flavonoida. Upotrebom 25 %-tnog acetona dobivene vrijednosti se kreću u rasponu od 11,03 do 12,39 mg/g ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), te 9,95 do 11,62 mg/g ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kod istog vremenskog raspona, uz 50 %-tni aceton udio flavonoida ponovo raste, a nađene vrijednosti nalaze se u rasponu od 12,74 do 13,51 mg/g ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), te 9,39 do 12,39 mg/g ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uz 70 %-tni aceton dobiveni su najveći udjeli flavonoida, a vrijednosti se kreću od 14,23 do 17,92 mg/g ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), te 10,34 do 12,79 mg/g ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dakle, može se zaključiti da porastom volumnog udjela acetona raste i udio ekstrahiranih flavonoida, pa se 70 %-tni aceton pokazao najefikasnijim otapalom kod obje upotrijebljene temperature.

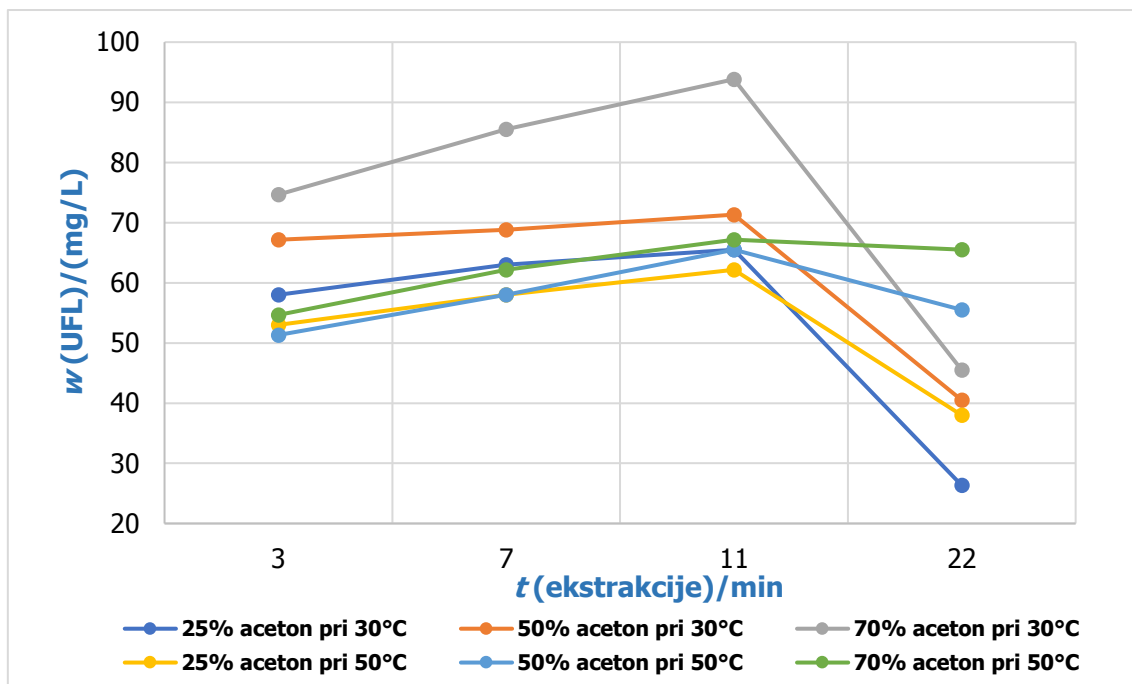
U vremenu od 22 min uz 25 %-tni aceton dolazi do pada udjela UFL za 4,94 mg/g, odnosno 7,07 mg/g pri temperaturama od 30 i 50 $^{\circ}\text{C}$. Nešto veće smanjenje sadržaja flavonoida može se zabilježiti upotrebom 50 i 70 %-tnog acetona. Tako se primjerice kod 50 %-tnog acetona vrijednosti smanjuju na 7,63 mg/g ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) i 10,46 mg/g ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), a kod 70 %-tnog na 8,62 mg/g ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) i 12,47 mg/g ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Dakle, vrijeme od 11 min dovodi do najefikasnije ekstrakcije flavonoida, bilo da se radi o tretmanima uzoraka kore mandarine pri temperaturama od 30 ili 50 $^{\circ}\text{C}$, i udjelima acetona od 25 do 70 %.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UFL) u uzorcima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

UZORAK	Parametri ekstrakcije			$A_{sr.} \pm SD$	$w(UFL)/(mg/g) \pm SD$
	φ (acetone)/%	$T/^\circ C$	t/min		
1 DB	25	30	3	$0,070 \pm 0,000$	$11,03 \pm 0,00$
2 DB			7	$0,076 \pm 0,000$	$11,99 \pm 0,00$
3 DB			11	$0,079 \pm 0,001$	$12,39 \pm 0,11$
4 DB			22	$0,032 \pm 0,000$	$4,94 \pm 0,00$
5 DB	50		3	$0,081 \pm 0,000$	$12,74 \pm 0,07$
6 DB			7	$0,083 \pm 0,000$	$13,11 \pm 0,00$
7 DB			11	$0,086 \pm 0,001$	$13,51 \pm 0,11$
8 DB			22	$0,049 \pm 0,000$	$7,63 \pm 0,04$
9 DB	70		3	$0,090 \pm 0,000$	$14,23 \pm 0,00$
10 DB			7	$0,103 \pm 0,000$	$16,44 \pm 0,18$
11 DB			11	$0,113 \pm 0,000$	$17,92 \pm 0,00$
12 DB			22	$0,055 \pm 0,001$	$8,62 \pm 0,23$
13 DB	25	50	3	$0,064 \pm 0,000$	$9,95 \pm 0,16$
14 DB			7	$0,070 \pm 0,001$	$10,90 \pm 0,05$
15 DB			11	$0,075 \pm 0,001$	$11,62 \pm 0,30$
16 DB			22	$0,046 \pm 0,001$	$7,07 \pm 0,15$
17 DB	50		3	$0,062 \pm 0,001$	$9,59 \pm 0,01$
18 DB			7	$0,070 \pm 0,001$	$10,95 \pm 0,11$
19 DB			11	$0,079 \pm 0,001$	$12,39 \pm 0,11$
20 DB			22	$0,067 \pm 0,001$	$10,46 \pm 0,11$
21 DB	70		3	$0,066 \pm 0,001$	$10,34 \pm 0,06$
22 DB			7	$0,075 \pm 0,001$	$11,91 \pm 0,11$
23 DB			11	$0,081 \pm 0,000$	$12,79 \pm 0,00$
24 DB			22	$0,079 \pm 0,000$	$12,47 \pm 0,00$

$N = 3$, SD = standardna devijacija



Slika 8. Ovisnost masenih udjela ukupnih flavonoida (UFL) o vremenu ekstrakcije.

Ovi dobiveni rezultati slažu se s onima dobivenim u istraživanju Hayat i sur. (2010), koji su također pokazali da udio flavonoida ekstrahiranih pomoću MAE najprije raste, a potom opada s povećanjem vremena (od 5 do 15 min).

Promatrajući utjecaj temperature na prinos flavonoida uočljivo je (Slika 8) da ovaj parametar značajno utječe na njihovu izolaciju. Tako je pri temperaturi od 30 °C neovisno o vremenu ekstrakcije i volumnom udjelu acetona ekstrahirano više flavonoida nego pri 50 °C. Slične rezultate su dobili i Xu i sur. (2008), kojima su pokazali da udio flavonoida opada s porastom temperature ekstrakcije s 40 na 100 °C, uz vodu kao ekstrakcijsko sredstvo.

Zaključno, najviše flavonoida (17,92 mg/g) je ekstrahirano u vremenu od 11 min pri 30 °C uz 70 %-tni aceton, a najmanje (4,94 mg/g) u vremenu od 22 min pri 30 °C uz 25 %-tni aceton.

5. ZAKLJUČAK

Nakon ispitivanja utjecaja temperature (30 i 50 °C), vremena (3, 7, 11 i 22 min) i volumnog udjela acetona (25, 50 i 70 %) na prinos fenola i flavonoida ekstrahiranih iz kore mandarine pomoću mikrovalova mogu se donijeti sljedeći niže navedeni zaključci:

- kod temperature od 30 °C, vremena od 11 min uz 70 %-tni aceton ekstrahirano je najviše fenola s udjelom od 110,58 mg/g,
- kod temperature od 50 °C, vremena od 11 minuta, uz 50 %-tni aceton dobiven je nešto niži udio fenola, a iznosi 99,42 mg/g,
- kod temperature od 30 °C, vremena od 11 min uz 70 %-tni aceton ekstrahirano je najviše flavonoida s udjelom od 18,04 mg/g
- kod temperature od 50 °C, vremena od 11 min uz 70 %-tni aceton dobivena je nešto niža vrijednost flavonoida od 12,92 mg/g

U zaključku, optimalni uvjeti ekstrakcije fenola i flavonoida su: $T = 30\text{ °C}$, $t = 11\text{ min}$ i φ (aceton) = 70 %. Navedeni parametri mogli bi se upotrebljavati u daljnjim postupcima obrade kore mandarine pri dobivanju polifenolnih ekstrakata primjenom mikrovalova kao ekološki prihvatljive, brze i efikasne ekstrakcijske metode.

6. LITERARURA

1. Al - Otaibi M. S., Al - Mayouf A. M., Khan M., Mousa A. A., Al - Mazroa S. A., Alkathlan H. Z. (2012) Corrosion inhibitory action of some plant extracts on the corrosion of mild steel in acidic media. *Arabian Journal of Chemistry* **7**: 340 - 346.
2. 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.
3. Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 - 203.
4. Berend S., Grabarić Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**: 205 - 212.
5. Brglez Mojzer E., Knez Hrnčić M., Škerget M., Knez Ž., Bren U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**: 1 - 38.
6. Burkert R., Helberg H. W., von Schiitz J. U. (1993) Longitudinal and transverse conductivity in (2,5-Me 2-DCNQI) Cu fibres. *Synthetic Metals* **56**: 2519 - 2524.
7. de Rijke E., Out P., Niessen W. M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A* **1112**: 31 - 63.
8. Dhillon S. S., Gill R. K., Gill S. S., Singh M. (2004) Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *International Journal of Environmental Studies* **61**: 199 - 210.
9. Hayat K., Zhang X., Chen H., Xia S., Jia C., Zhong F. (2010) Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effects on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology* **73**: 371 - 376.
10. Herrero M, Plazab M., Cifuentesb A., Ibanez E. (2010) Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A* **1217**: 2512 - 2520.
11. 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.
12. Karsheva M., Kirova E., Alexandrova S. (2013) Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols; effect of operational conditions on total polyphenols

- contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **48**: 35 - 41.
13. Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.
 14. Li G., Hong G., Li X., Zhang Y., Xu Z., Mao L., Feng X., Liu T. (2018) Synthesis and activity towards Alzheimer's disease in vitro: Tacrine, phenolic acid and ligustrazine hybrids. *European Food Chemistry Journal of Medicinal Chemistry* **148**: 238 - 254.
 15. Liu H. W. (2011) Extraction and Isolation of Compounds from Herbal Medicines. U: Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies, Willow J. H. Liu, ur., John Wiley and Sons, Inc. str. 81 - 138.
 16. Nayak B., Dahmoune F., Moussi K., Remini H., Dairi S., Aoun O., Khodir M. (2015) Comparison of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from Citrus Sinensis Peels. *Food Chemistry* **187**: 1 - 39.
 17. Ninčević Grassino A., Halambek S., Djaković S., Rimac Brnčić S., Dent M., Grabarić Z. (2016) Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids* **52**: 265 - 274.
 18. Ninčević Grassino A., Brnčić M., Vikić-Topić D., Roca S., Dent M., Rimac Brnčić S. (2016) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chemistry* **198**: 93 - 100.
 19. Ninčević Grassino A., Barba F. J., Brnčić M., Lorenzo J. M., Lucini L., Rimac Brnčić S. (2018) Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. *Food Chemistry* **266**: 47 - 55.
 20. Tranfić Bakić M., Pedisić S., Zorić Z., Dragović-Uzelac V., Ninčević Grassino A. (2019) Effect of Microwave-Assisted Extraction on Polyphenols Recovery from Tomato Peel Waste *Acta Chimica Slovenica* **66**: 367 - 377.
 21. Ough C. S., Amerine M. A. (1998) Methods Analysis of Musts and Wines, 1. izd., John Wiley and Sons, Inc. str. 221 - 250.
 22. Pourbafrani M., Forgács G., Sárvári Horváth I., Niklasson C. (2010) Production of Biofuels, Limonene and Pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology* **101**: 4246 - 4259.
 23. Putnik P., Busać Kovečević D., Režek Jambrak A., Barba F. J., Cravotto G., Binello A., Lorenzo J. M., Shpigelman A. (2017) Innovative "Green" and Novel Strategies for the

- Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes- A Review. *Molecules* **22**: 1 - 24.
24. Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik G. A. (2016) Citrus peel as a source of functional ingredient- A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **17**: 351 - 358.
25. Rajbhar K., Dawda H., Mukundan U. (2015) Polyphenols: Methods and extraction. *Scientific Reviews & Chemical Communications* **5**: 1 - 6.
26. Remya C., Dileep K. V., Tintu I., Variyar E. J., Sadasivan C. (2014) Flavanone Glycosides as Acetylcholinesterase Inhibitors: Computational and Experimental Evidence. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **76**: 567 - 570.
27. Robinson J. (2017) Flavonoids sources, health benefits and uses. Naturalpedia. Natural news Network <<https://www.naturalpedia.com/flavonoids-sources-health-benefits-and-uses.html>> Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
28. Ware M., (2017) Why are polyphenols good for you? Medical news today <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/319728.php>> Pristupljeno 7. kolovoza 2019.
29. Xu G. H., Chen J. C., Liu D. H., Zhang Y. H., Jiang P., Ye X. Q. (2008) Mineral, Phenolic Compounds, and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract by Hot Water. *Journal of Food Sciences* **73**: 11 - 18.

Izjava o izvornosti

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

Abrija Bović

ime i prezime studenta