

# Karakterizacija polifenola iz ljuske luka i kore banane primjenom postupka frakcioniranja

---

**Antolić, Mihaela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:158477>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Mihaela Antolić**

7390/PT

**KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA IZ LJUSKE LUKA I KORE BANANE PRIMJENOM  
POSTUPKA FRAKCIONIRANJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

**Mentor:** dr.sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

**Zagreb, rujan 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### Karakterizacija polifenola iz ljuske luka i kore banane primjenom postupka frakcioniranja

Mihaela Antolić, 0058210460

**Sažetak:** Povećana industrijska proizvodnja hrane, uslijed rasta svjetske populacije, rezultira velikom količinom agro-industrijskog otpada koji predstavlja ekološki rizik i ekonomske gubitke. S toga se danas intenzivno istražuju novi načini valorizacije otpadnih materijala. Biljni agro-industrijski otpad čine uglavnom tkiva vanjskih slojeva različitog voća, povrća i žitarica, te su prirodno bogat, neprehrambeni i inovativan izvor polifenola. Luk i banana su namirnice iznimno široke globalne potrošnje čijom preradom zaostaje značajna količina otpada čiji puni potencijal nije dovoljno iskorišten u konvencionalnim načinima primjene. Cilj ovog rada bio je detaljno karakterizirati polifenole u ljusci luka i kori banane primjenom postupka njihovog frakcioniranja, uz analizu izdvojenih polifenolnih frakcija tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-DAD). Kao dominantni spojevi u ljusci luka određeni su kvercetin i njegovi glikozidi: kvercetin-4'-glukozid ( $7,40 \text{ mg g}^{-1}$ ), kvercetin-3,4'-diglukozid ( $5,82 \text{ mg g}^{-1}$ ), kvercetin ( $4,33 \text{ mg g}^{-1}$ ) te protokatehinska kiselina ( $1,03 \text{ mg g}^{-1}$ ), a izdvajaju se jednostavnom ekstrakcijom kombinacijom organskih otapala i vode. Kao dominantni spojevi u kori banane određene su *l*-ferulinska ( $2,02 \text{ mg g}^{-1}$ ) i *p*-kumarinska kiselina ( $0,08 \text{ mg g}^{-1}$ ), a izdvajaju se alkalnom hidrolizom budući da se nalaze u netopljivom vezanom obliku. Ljuska luka i kora banane vrijedan su izvor polifenola koji se mogu izdvojiti odgovarajućim postupcima i iskoristiti u kreiranju funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

**Ključne riječi:** ekstrakcija, kora banane, ljuska luka, polifenoli, valorizacija

**Rad sadrži:** 35 stranica, 12 slika, 3 tablice, 63 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:** dr.sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

**Datum obrane:** 15. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **Characterization of polyphenols from onion peel and banana peel by employing the fractionation procedure**

Mihaela Antolić, 0058210460

**Abstract:** The increased industrial production of food, due to the rising world's population, results with a large amount of agro-industrial wastes that represent environmental risk and economic losses. Therefore, nowadays, new ways of waste materials' valorization are investigated. Plant agro-industrial wastes consists mainly of outer layers of various fruits, vegetables and cereals, and are naturally rich, non-food innovative source of polyphenols. Onions and bananas are foods of extremely wide global consumption and their processing generates a significant amount of waste, the potential of which is not sufficiently exploited by the conventional methods of usage. The aim of this study was to characterize in detail the polyphenols in onion peel and banana peel by using polyphenol fractionation procedure, followed by the analysis of the isolated polyphenolic fractions using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). Quercetin and its glycosides have been identified as dominant compounds in onion peel: quercetin-4'-glucoside ( $7.40 \text{ mg g}^{-1}$ ), quercetin-3,4'-diglucoside ( $5.82 \text{ mg g}^{-1}$ ), quercetin ( $4.33 \text{ mg g}^{-1}$ ) and protocatechinic acid ( $1.03 \text{ mg g}^{-1}$ ), which are easily recovered by simple extraction using a combination of organic solvents and water. In banana peel, *t*-ferulic ( $2.02 \text{ mg g}^{-1}$ ) and *p*-coumaric acid ( $0.08 \text{ mg g}^{-1}$ ) were determined as dominant compounds, which can be recovered by alkaline hydrolysis since they are present in insoluble bound form. Onion peel and banana peel are valuable sources of polyphenols that can be recovered by appropriate procedures and used in creating functional food products.

**Keywords:** extraction, banana peel, onion peel, polyphenols, valorization

**Thesis contains:** 35 pages, 12 figures, 3 tables, 63 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:** PhD Aleksandra Vojvodić Cebin

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Agroindustrijski otpad</b> .....	2
2.1.1. Kora banane.....	4
2.1.2. Ljuska luka.....	5
<b>2.2. Polifenoli</b> .....	6
2.2.1. Polifenoli u kori banane .....	7
2.2.1.1. <i>Ferulinska kiselina</i> .....	8
2.2.1.2. <i>Rutin</i> .....	8
2.2.2. Mogućnosti korištenja polifenolnih ekstrakata kore banane u prehrambenim proizvodima .....	9
2.2.3. Polifenoli u ljuski crvenog luka.....	10
2.2.3.1. <i>Kvercetin</i> .....	10
2.2.4. Mogućnosti korištenja polifenolnih ekstrakata ljuske crvenog luka u prehrambenim proizvodima .....	11
2.2.5. Metode ekstrakcije polifenolnih spojeva .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
<b>3.1. Materijal</b> .....	13
3.1.1. Uzorci .....	13
3.1.2. Kemikalije .....	13
3.1.3. Aparatura i pribor.....	14
<b>3.2. Metode</b> .....	15
3.2.1. Frakcijsko izdvajanje polifenolnih spojeva.....	15
3.2.1.1 <i>Priprema osnovnog ekstrakta</i> .....	17
3.2.1.2 <i>Izdvajanje frakcije slobodnih polifenola</i> .....	17
3.2.1.3 <i>Izdvajanje frakcije esterificiranih polifenola</i> .....	18

<i>3.2.1.4 Izdvajanje frakcije glikoziliranih polifenola</i> .....	18
<i>3.2.1.5 Izdvajanje frakcije netopljivih vezanih polifenola</i> .....	18
3.2.2. Određivanje polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD) .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
<b>4.1 Analiza polifenolnih spojeva u frakcijama izdvojenima iz ljuske luka</b> .....	21
<b>4.2 Analiza polifenolnih spojeva u frakcijama izdvojenima iz kore banane</b> .....	26
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	29
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	30

## 1. UVOD

Godišnje se u Europskoj uniji (EU) proizvede oko 90 milijuna tona agro-industrijskog otpada u prehrambenoj industriji (Ravindran i Jaiswal, 2016). Nekontrolirano i neprikladno odlaganje takvog otpada može doprinijeti zagađenju okoliša, a također može imati i štetan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja (Sadh i sur., 2018). Na svjetskoj razini se godišnje generira oko 36 milijuna tona otpada kore banane, dok se u EU godišnje proizvede približno 450 000 tona otpada luka (Salak i sur., 2013; Vu i sur., 2018). Otpadni biljni materijali danas se sve više istražuju kao bogat izvor polifenola, budući da su polifenoli u biljkama najviše lokalizirani upravo u tkivima vanjskih slojeva, gdje imaju zaštitnu ulogu od različitih čimbenika biotičkog i abiotičkog stresa (Rasouli i sur., 2017), a upravo ti dijelovi biljnih sirovina se najčešće odbacuju prilikom industrijske prerade. Polifenoli u prehrani ljudi su iznimno važni zbog svojih antioksidacijskih svojstava te rezultirajućih pozitivnih učinaka na zdravlje. Konzumacijom hrane bogate polifenolima može se smanjiti mogućnost obolijevanja od različitih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, rak debelog crijeva, pretilost, dijabetes, poremećaji u radu jetre, itd. (Rasouli i sur., 2017). Agro-industrijski otpad može se smatrati vrlo vrijednim izvorom polifenola, ali i ostalih funkcionalnih komponenata i stoga su istraživanja vezana uz identifikaciju i izdvajanje bioaktivnih spojeva iz agro-industrijskog otpada, kao i njihovu implementaciju u nove funkcionalne proizvode danas sve intenzivnije zastupljena (Pérez-Chabela i Hernández-Alcántara, 2018).

Cilj ovog rada bio je kvalitativno i kvantitativno karakterizirati polifenolne spojeve iz ljuske luka i kore banane primjenom postupka frakcioniranja kojim se izdvajaju frakcije slobodnih, konjugiranih i netopljivih vezanih polifenola. Ovaj rad omogućit će bolji uvid u polifenolni sastav navedenih sekundarnih biljnih sirovina te preciznije definirati parametre ekstrakcije u svrhu učinkovitog izdvajanja polifenola kao potencijalno preferabilne mogućnosti valorizacije ljuske luka i kore banane.

## **2. TEORIJSKI DIO**

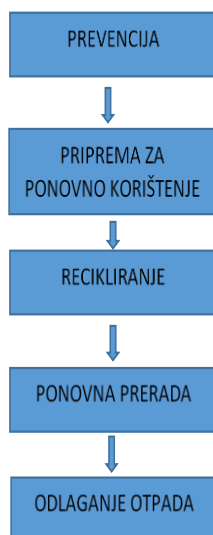
### **2.1. Agroindustrijski otpad**

Uslijed kontinuiranog porasta brojnosti ljudske populacije, dolazi i do povećane potrebe za proizvodnjom hrane, a posljedično i do povećanja količine agro-industrijskog otpada koji nastaje preradom osnovnih sirovina (Ravindran i Jaiswal, 2016). Neprikladno i nekontrolirano zbrinjavanje takvog otpada može značajno doprinijeti zagađenju okoliša, ponajprije u smislu porasta količine stakleničkih plinova, uslijed njegove razgradnje, a također može imati štetan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja (Sadh i sur., 2018). Agro-industrijski otpad je povoljan medij za rast različitih mikroorganizama, pa i onih patogenih (Ravindran i Jaiswal, 2016). Biljni agro-industrijski otpad bogat je različitim makrokomponentama, poput proteina, vlakana i masti, ovisno o biljnome podrijetlu, ali i manje zastupljenim spojevima velike funkcionalne važnosti, poput polifenolnih antioksidansa, koji mogu biti ekstrahirani, pročišćeni te valorizirani putem iskorištavanja u različitim industrijskim nišama - prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Socaci i sur., 2017). Agro-industrijski otpad se može koristiti za proizvodnju limunske kiseline, enzima, biogoriva, pigmenata, biorazgradivih polimera, bioaktivnih komponenata, aromatskih sastojaka i komposta (Slika 1) (Yusuf, 2017). Istraživanje Europske unije (EU) 2010. godine otkrilo je kako skoro 90 milijuna tona agro-industrijskog otpada nastaje prilikom prerade sirovina u prehrambenoj industriji (Ravindran i Jaiswal, 2016). Nadalje, prema Organizaciji za prehranu i poljoprivredu (FAO) otprilike 1/3 proizvedene hrane za ljudsku konzumaciju se baca, pri čemu 40 - 50 % dijelova voća i povrća također završi nezbrinuto u otpadu (Socaci i sur., 2017). Neke zemlje su donijele određene zakonske legislative kojima su regulirale dozvoljenu količinu i način odlaganja agro-industrijskog otpada kako bi se smanjili negativni učinci na okoliš (Yusuf, 2017). Ponovno korištenje agro-industrijskog otpada prehrambene industrije može znatno smanjiti količinu otpada te stvoriti nove prilike i prednosti za sve koji sudjeluju u lancu proizvodnje hrane. Iz toga razloga u zemljama EU definirana je hijerarhija gospodarenja otpadom, kako je prikazano na Slici 2 (Otles i sur., 2015).





Slika 1. Prikaz mogućnosti korištenja agro-industrijskog otpada (Yusuf, 2017)



Slika 2. Prikaz hijerarhije gospodarenja otpadom u EU (Otles i sur., 2015)

### **2.1.1. Kora banane**

Banana (*Musa* spp.) (Slika 3a) je široko konzumirana namirnica u svijetu i njezino tržište je jedno od najznačajnijih (Martins i sur., 2019). Obično se konzumira u svježem stanju ili se procesira u različite proizvode, kao što je čips od banane, te se koristi kao sastojak za smoothieje i sladolede te u raznim funkcionalnim proizvodima (Vu i sur., 2018.). Banana je visoko hranjiva i lako probavljiva namirnica, primjerice vrijeme probavljanja banane u ljudskom organizmu iznosi 105 minuta, a jabuke čak dvostruko više, 210 minuta (Mohapatra i sur., 2010). U 2009. godini najveći proizvođači banana bile su: Indija, Filipini, Kina, Ekvador i Brazil, sa 61% udjela u ukupnoj količini proizvedenih banana u svijetu (Evans i Ballen, 2012). U svijetu se godišnje proizvodi velika količina banana, čak 102 milijuna tona (Vu i sur., 2018). Oko 35 % mase ploda banane odnosi se na koru te se konzumacijom i preradom banane generira oko 36 milijuna tona agro-industrijskog otpada (kore) svake godine. Kora banane (Slika 3b) se tradicionalno koristi u medicinske svrhe za liječenje mnogih ozljeda i bolesti kao što su opekline, anemija, proljev, dijabetes, razne upale, kašalj te čak i kao pomoć kod ugriza zmija (Vu i sur., 2018). S obzirom na osnovni makrokomponentni sastav kora banane bogat je izvor škroba (3%), proteina (6-9%), prehrambenih vlakana (43,2-49,7%) te masti (3,8-11%), u kojima dominiraju polinezasićene masne kiseline, naročito linolenska kiselina, zatim pektina, esencijalnih aminokiselina, polifenola i mikronutrijenata (K, P, Ca, Mg). Količina svih esencijalnih aminokiselina u kori banane, osim za lizin, je veća od FAO standarda za preporučeni dnevni unos (Mohapatra i sur., 2010). Za koru banane je određen i visoki antioksidacijski kapacitet, antimikrobna i antibiotska svojstva te s obzirom na to potencijalno predstavlja vrijednu sirovinu za daljnju primjenu i iskorištavanje u prehrambenim, farmaceutskim i sličnim industrijama, za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti (Vu i sur., 2018).



Slika 3. a) Banana (*Musa* spp.) (Anonymous 1, 2020); b) Kora banane (Anonymous 2, 2020)

### **2.1.2. Ljuska luka**

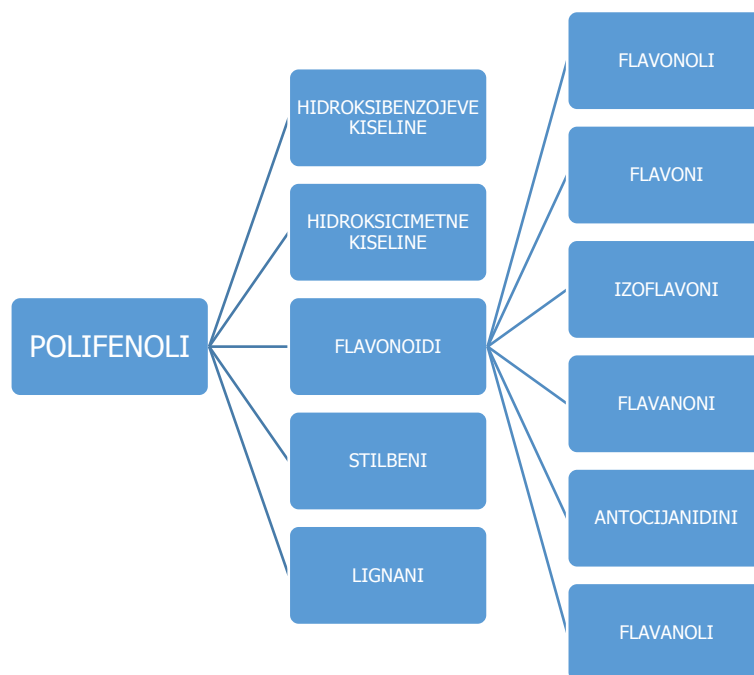
Luk (*Allium cepa* L.) (Slika 4a) je povrće koje se često koristi u prehrani ljudi, a konzumira se u svježem, termički obrađenom ili konzerviranom obliku, ili pak kao dio različitih procesiranih prehrambenih proizvoda (Singh i sur., 2009). Prema podacima za 2012. godinu, najveći proizvođač luka bila je Kina (20 507 759 tona), a zatim Indija (13 372 100 tona), Sjedinjene Američke Države (3 320 870 tona) i Egipat (2 208 080 tona ) (Kuete, 2017). Luk se najčešće koristi u svom izvornom svježem obliku, međutim, na globalnoj razini fokus je na trajnim proizvodima poput dehidriranog luka u obliku kolutova, granula ili praha, zatim smrznutog luka ili konzerviranog luka u octu ili salamuri (Lawande, 2012). Prilikom procesiranja luka zaostaje značajna količina otpadnog materijala koji najviše čine vanjska suha ljuska te vanjski mesnati listovi (Slika 4b), a prema dostupnim podacima, godišnje se u EU proizvede i do 450 000 tona otpada luka (Salak i sur., 2013), što predstavlja veliki izazov i potencijalni problem za prerađivačku industriju. Ljuska luka kao otpad predstavlja problem zbog svog izraženog mirisa, podložnosti rastu fitopatogena te velikog udjela vlage. Zbog toga se danas sve više istražuju strategije iskorištavanja otpadne mase luka, s ciljem smanjenje količine otpada. U tom kontekstu se sve češće govori o valorizaciji, odnosno dodavanju vrijednosti otpadnim biljnim materijalima, pa tako i otpadu luka, kroz identifikaciju i izdvajanje vrijednih komponenata (Salak i sur., 2013). Mnoge vrste luka se tradicionalno koriste u terapijske i medicinske svrhe te su se pokazale učinkovite u tretiranju raznih bolesti kao što je zaraza crijevnim parazitima, čir na želudcu, infekcije oka, hipertenzija i groznica uzrokovana malarijom (Khokar i Fenwick, 2003), dok se sama ljuska luka tradicionalno koristi kao bojilo.



Slika 4 a) Luk (*Allium cepa* L.) (Anonymous 3, 2020); b) Otpadna masa luka (Anonymous 4, 2020)

## 2.2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se u biljkama sintetiziraju kao obrambene komponente protiv fizioloških i okolišnih čimbenika (Rasouli i sur., 2017). Zbog njihove biološke uloge u biljkama, uglavnom se nalaze u tkivima vanjskih slojeva, pr. voća i povrća, te u sjemenkama. Tijekom procesiranja prehrambenih sirovina biljnoga podrijetla, upravo se odbacuju vanjski dijelovi, primjerice guljenjem ili pak zaostaju na prešama, koji se danas intenzivno razmatraju kao inovativni izvori polifenola. Iz tog razloga potrebno je na globalnoj razini poticati istraživanja vezana uz karakterizaciju polifenola, ali i drugih bioaktivnih spojeva iz agro-industrijskog otpada, kao i implementaciju istih u nove funkcionalne proizvode, s konačnim ciljem smanjenja količine otpada iz proizvodnje hrane i dobivanja proizvoda dodane vrijednosti (Pérez-Chabela i Hernández-Alcántara, 2018). Polifenoli su izrazito brojna skupina prirodnih spojeva. Zajednička strukturna značajka im je prisustvo aromatskog prstena s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina (Balasundram i sur., 2006), a s obzirom na specifičnosti u kemijskoj strukturi najčešće se dijele na hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane, kao što je prikazano na Slici 5 (Hardman, 2014). Istraživanja pokazuju kako brojne molekule polifenola imaju antibakterijska, antigljivična, protuupalna i antitumorska svojstva (Rasouli i sur., 2017). Konzumacijom hrane bogate polifenolima može se poboljšati ljudsko zdravlje te smanjiti mogućnost obolijevanja od raznih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, rak debelog crijeva, pretilost, dijabetes, poremećaji u radu jetre, itd. (Rasouli i sur., 2017). Glavni prehrambeni izvori polifenola su voće, s udjelom polifenola i do 200-300 mg/100g, te napitci kao što su vino, kava i čaj, s udjelom oko 100 mg/100 g (Scalbert i sur., 2005). Polifenoli se u voću i povrću obično nalaze u slobodnom obliku ili u obliku topljivih konjugata. Vezani polifenoli predstavljaju oko 24 % od ukupno prisutnih polifenola u voću i povrću. Netopljivi vezani polifenoli kovalentno su vezani na strukturne elemente poput celuloze, hemiceluloze, lignina, pektina i proteina (Acosta-Estrada i sur., 2014). Polifenole konzumiramo najčešće kao sastavni dio neke namirnice biljnoga podrijetla, međutim, mnogi prehrambeni proizvodi koji ih ne sadrže ili ih sadrže vrlo malo mogu se obogatiti polifenolima dodavanjem polifenolnih ekstrakata iz drugih biljnih izvora. Dodavanje polifenolnih ekstrakata može povećati funkcionalne značajke proizvoda (nutraceutici), a kod prehrambenih proizvoda mogu imati ulogu prirodnih konzervansa te tako produžiti rok trajanja proizvoda u koje se dodaju (Vu i sur., 2018). U tom kontekstu, agro-industrijski otpad sve više se promatra kao obnovljivi neprehrambeni izvor polifenola.



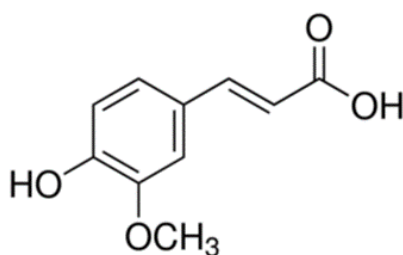
Slika 5. Podjela polifenolnih spojeva (Hardman, 2014)

### **2.2.1. Polifenoli u kori banane**

Kora banane je bogat izvor polifenolnih spojeva, s prosječnim ukupnim udjelom od 4,95 do 47 mg ekvivalenata galne kiseline/g s.tv. (Vu i sur., 2018). Više od 40 polifenolnih komponenata je identificirano u kori banane, a mogu se klasificirati u 4 podskupine: hidroksicimetne kiseline, flavonoli, flavan-3-oli i kateholamini. U identificiranim flavonolima, rutin i njegovi konjugati predstavljaju dominantne komponente, dok od hidroksicimetnih kiselina najzastupljenija je ferulinska kiselina (Vu i sur., 2018). Iz skupine flavan-3-ola, najviše je identificirano proantocijanidina – polimernih oblika flavan-3-ola (3952 mg kg<sup>-1</sup> ekvivalenata (+)-katehina), dok od jednostavnijih flavan-3-ola, najviše galokatehina (158 mg/100 g s.tv.), što je 5 puta više od zastupljenosti u pulpi banane (Vu i sur., 2018). U nekoliko istraživanja određena je i prisutnost dopamina u kori banane, pri čemu njegova koncentracija iznosi između 80 i 560 mg/100 g, daleko više nego u pulpi banane (2,5 do 10 mg/100 g) (Vu i sur., 2018).

### **2.2.1.1. Ferulinska kiselina**

Ferulinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksi cimetna kiselina) (Slika 6) je polifenolni spoj koji pripada skupini hidroksicimetnih kiselina (derivati hidroksicimetne kiseline) te u biljnom materijalu može biti prisutna u slobodnom obliku ili vezana u različite konjugate (Chandrasekara, 2018). Široko je rasprostranjen i sveprisutan polifenolni spoj u biljnim tkivima te kao takva se nalazi u mnogim prehrambenim proizvodima, predstavljajući bioaktivnu komponentu (Zhao i Moghadasian, 2008). Neke od namirnica u kojima se ferulinska kiselina nalazi u vrlo visokom udjelu su: prehrambeni proizvodi sa cjelovitim žitaricama, citrusi, banane, kava, patlidžan, cikla, kupus, špinat i brokula (Zhao i Moghadasian, 2008). Ferulinska kiselina se u najvišem udjelu nalazi u posijama žitarica, kori voća i povrća te korijenju biljaka (Zhao i Moghadasian, 2008). U većini vrsta voća i povrća, ferulinska kiselina se nalazi vezana s različitim kiselinama (glukonska, vinska, jabučna) ili vezana na različite mono- i disaharide te polisaharide koji su sastavni dio stanične stijenke biljnih materijala (Zhao i Moghadasian, 2008; Çelik i Gökmen, 2020). Provode se mnoga istraživanja kako bi se istražile potencijalne mogućnosti korištenja ferulinske kiseline, te su utvrđeni pozitivni učinci kod njezine primjene u prevenciji ili liječenju različitih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, maligni tumori, kardiovaskularne bolesti i dijabetes (Mancuso i Santangelo, 2014). Ovisno u kojem obliku se ferulinska kiselina nalazi u biljnom materijalu, koriste se različite metode ekstrakcije. U slobodnom obliku se ferulinska kiselina dobro ekstrahira smjesom vode i organskih otapala poput acetona, metanola ili etanola. Za određivanje vezane ferulinske kiseline, biljni materijal je potrebno kiselinski ili alkalno hidrolizirati (Bonoli i sur., 2004).

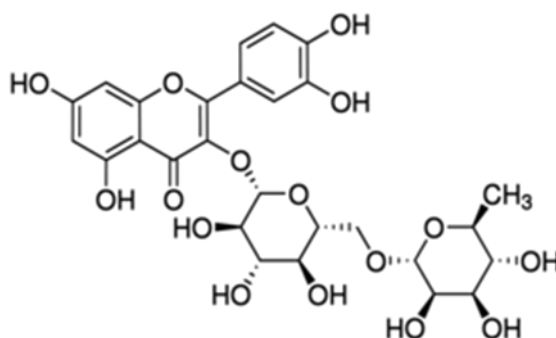


Slika 6. Kemijska struktura ferulinske kiseline (Anonymous 5, 2020)

### **2.2.1.2. Rutin**

Rutin (kvercetin-3-ramnozil glukozid) (Slika 7), predstavlja prirodni derivat flavonola, a prvi put je izoliran u 19. st. iz heljde (Yang i sur., 2008; Gullon i sur., 2017). Osim heljde, rutinom bogati prirodni izvori su marelice, višnje, grožđe, grejp, šljive i naranče (Romm i sur., 2010).

Rutin predstavlja polifenolni spoj niske molekularne mase široko rasprostranjen u povrću i voću te ima jaka antioksidacijska svojstva (Yang i sur., 2008; Gullon i sur., 2017). Poznat je i kao vitamin P i ima antitrombotska i antihipertenzivna svojstva te pomaže pri jačanju stijenki kapilara i krvnih žila. Rutin se smatra potencijalno korisnim u prevenciji raznih bolesti, ali i u zaštiti genoma (Yang i sur., 2008). Glavni nedostatak rutina je njegova slaba biološka raspoloživost koja je uzrokovana njegovom slabom topljivosti. Taj nedostatak se pokušava otkloniti raznim laboratorijskim postupcima kao što su kompleksiranje rutina i ciklodekstrina, enzimatska oligomerizacija te kemijska transformacija (Gullon i sur., 2017). U svrhu ekstrakcije rutina iz različitih biljnih materijala se istražuju brojne metode, među kojima tradicionalne tehnike ekstrakcije otapalom, ali i inovativne metode, poput ekstrakcije superkritičnim fluidima, tekućinske ekstrakcije pod povišenim tlakom, mikroekstrakcije iz čvrste faze te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili mikrovalovima (Chua, 2013). Sve ove metode se sastoje od dvije faze, pri čemu u prvoj fazi dolazi do bubrenja biljnog matriksa, a drugoj fazi do prijenosa mase ciljanih spojeva iz uzorka u otapalo pomoću procesa difuzije i osmoze (Chua, 2013).



Slika 7. Kemijska struktura rutina (Anonymous 6, 2020)

### **2.2.2. Mogućnosti korištenja polifenolnih ekstrakata kore banane u prehrambenim proizvodima**

Zbog svojih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava, ekstrakti kore banane mogu se potencijalno iskoristiti u prehrambenim proizvodima kao prirodni konzervansi, kako bi se poboljšala kvaliteta hrane te produžio rok trajanja (Vu i sur., 2018). Ortiz i suradnici (2016) su zaključili da dodatak ekstrakta kore banane u svježije iscijeđen sok ili koncentrirani sok naranče u koncentraciji  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  značajno povećava antioksidacijski kapacitet ispitivanih sokova. Ipak, dodatak ekstrakta kore banane nije rezultiralo inhibicijom enzima lipidne peroksidaze. Obogaćeni sokovi (pri navedenoj koncentraciji) bili su senzorski izrazito prihvatljivi. Istraživanje

koje su proveli Martins i suradnici (2019) pokazalo je kako korištenjem kore banane u proizvodnji različitih praškastih mješavina liofilizacijom, može uvelike povećati njihovu antioksidacijsku aktivnost. Takve praškaste mješavine se mogu koristiti u prehrambenoj industriji za proizvodnju keksa, kolača i desertnih proizvoda pri čemu su takvi proizvod bogatiji funkcionalnim sastojcima kao što su polifenoli i dijetalna vlakna koji se nalaze u kori banane (Martins i sur., 2019).

### **2.2.3. Polifenoli u ljuski crvenog luka**

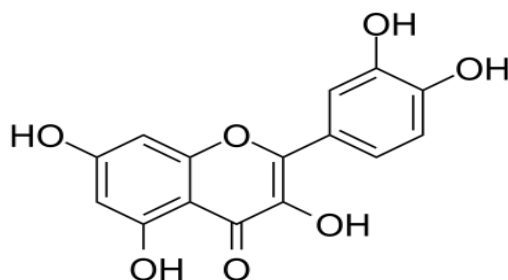
Oko 90% svih polifenolnih komponenata prisutnih u ljuski luka čine kvercetin i njegovi glukozidi, kao što su kvercetin-3,4'-diglukozid, kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3-glukozid (Nile i sur., 2017). Prema Ren-u i suradnicima (2019) količina flavonoida u jestivim dijelovima luka kreće se od 0,03 do 1 g kg<sup>-1</sup>, dok je ta brojka znatno veća kod ljuske luka i kreće se od 2 do 10 g kg<sup>-1</sup>. Flavonoida (uglavnom kvercetina i njegovih glikozida) u luku ima 250 mg kg<sup>-1</sup> što je više nego u brokuli (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili jabuci (50 mg kg<sup>-1</sup>) (Ren i sur., 2019). Osim flavonola, u nekim varijetetima luka (ljubičasti luk) su značajno prisutni i antocijani, podskupina flavonoida koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra i stoga su nosioci boje biljnih tkiva u nijansama crvene, ljubičaste ili plave (Ren i sur., 2019). U varijetetima ljubičastog luka određeno je i do 25 tipova antocijana, s prosječnim ukupnim udjelom od 250 mg kg<sup>-1</sup>, dok u nekim varijetetima ljubičastog luka ukupni udio antocijana doseže i do 10 % ukupnog udjela flavonoida (Ren i sur., 2019).

#### **2.2.3.1. Kvercetin**

Kvercetin (Slika 8) je polifenolni spoj iz podskupine flavonola (Singh i sur., 2009). Kvercetin se nalazi u mnogim biljnim vrstama, posebice u njihovim vanjskim dijelovima kao što su ljuska ili kora, što je vrlo vjerojatno posljedica izloženosti suncu (Albishi i sur., 2013). Biljni izvori kvercetina su citrusi, bobičasto voće, lisnato povrće, mahunarke, čaj, kakaovi proizvodi te razno bilje i začini (Gwaltney-Brant, 2016). Kvercetin se u ljudskom tijelu brzo metabolizira pomoću enzima u jetri, ali i u drugim organima i tkivima (Obloh i sur., 2018). Uz izrazitu antioksidacijsku aktivnost, koja proizlazi iz njegove brze apsorpcije i spore eliminacije iz ljudskog organizma, istraživanjima je utvrđeno protuupalno djelovanje kvercetina, kao i preventivno djelovanje na sprječavanje koronarnih bolesti (Schieber i sur., 2001; Pandey i Rizvi, 2009; Li i sur., 2018). Kvercetin je u vodi slabo topljiv (0,00215 g L<sup>-1</sup> pri 25 °C; 0,665 g L<sup>-1</sup> pri 140 °C), dok u organskim otapalima pokazuje visoku topljivost. Primjerice, topljivost kvercetina u etanolu je približno 2 g L<sup>-1</sup>, pri 25 °C, a u dimetil sulfoksidu čak 30 g L<sup>-1</sup>, pri istoj temperaturi



(Oboh i sur., 2018). Kao i za ostale polifenolne spojeve, tako se i za ekstrakciju kvercetina primjenjuju različite metode. Ako se želi odrediti udio kvercetina u konjugiranom obliku potrebno je provesti kiselinsku hidrolizu, primjerice klorovodičnom kiselinom, te se onda kvercetin ekstrahira pomoću nekog organskog otapala u kojem je dobro topljiv, primjerice etanola (Dmitrienko i sur., 2012). U ljusci luka, kvercetin se nalazi u obliku glukozida (kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3,4'-glukozid) (Nile i sur., 2017).



Slika 8. Kemijska struktura kvercetina (Anonymous 7, 2020)

#### **2.2.4. Mogućnosti korištenja polifenolnih ekstrakata ljuske crvenog luka u prehrambenim proizvodima**

Prema Shim-u i suradnicima (2012), ekstrakti ljuske luka pripremljeni u 50 % etanolu pokazali su veći udio ukupnih polifenola i veću DPPH aktivnost gašenja slobodnih radikala od ekstrakata pripremljenih u vodi ili 70 % te 95 % etanolu. Takav ekstrakt pokazao se djelotvornim za inhibiciju lipidne oksidacije prilikom primjene kao prirodni antioksidans za sirovu mljevenu svinjetinu skladištenu u hladnom skladištu tijekom 16 dana (Shim i sur., 2012). Nadalje, Mourtzinis i suradnici (2018) istraživali su mogućnost ekstrakcije polifenola i pigmenata iz ljuske luka primjenom ekološki prihvatljivih otapala kao što su voda i glicerol. Tako dobiveni ekstrakti su dalje uspješno implementirani u proizvodnji crveno obojanih jogurta (Mourtzinis i sur., 2018). Kruh i ostali pekarski proizvodi dobar su kandidat za obogaćivanje dodatkom polifenolnih ekstrakata ljuske luka budući da se pri visokim temperaturama pečenja prirodno prisutni polifenoli iz žitarica degradiraju (Piechowiak i sur., 2020). Prilikom obogaćivanja bezglutenskog kruha, Bedrníček i suradnici (2020) koristili su dodatak luka u 3 oblika (prženi i sušeni luk te ljusku luka). Istraživanje je pokazalo kako je do najvećeg povećanja antioksidacijskog kapaciteta došlo upravo dodatkom ljuske luka (Bedrníček i sur., 2020).

### **2.2.5. Metode ekstrakcije polifenolnih spojeva**

Polifenoli su u biljnim materijalima prisutni u različitim oblicima i mogu se odrediti različitim metodama. Ovisno o vrsti uzorka, izabire se optimalna metoda ekstrakcije polifenola, ali jednako tako je važno dobro pripremiti i biljni uzorak za analizu, najčešće sušenjem, usitnjavanjem i razrjeđivanjem (Herrero i sur., 2012). Ekstrakcija je postupak koji omogućuje pročišćavanje i koncentriranje, u ovom slučaju, polifenola u tekućem mediju (Sharma i sur., 2016). Konvencionalne tehnike ekstrakcije uključuju maceraciju, Soxhlet ekstrakciju, destilaciju parom i temelje se na primjeni odabranog otapala i zagrijavanja u različitim vremenskim intervalima (Sharma i sur., 2016). Najčešće se za ekstrakciju polifenola koriste organska otapala, a jedno od najučinkovitijih je metanol, koji ima nisku točku vrelišta te ga je vrlo jednostavno ukloniti iz ekstrakta (Santiago i sur., 2019; Piechowiak i sur., 2020). Ipak, zbog toksičnosti organskih otapala sve više se konvencionalne metode nastoje zamijeniti alternativnim, ekološki prihvatljivim metodama (Santiago i sur., 2019). Alternativne metode ekstrakcije karakterizira kraće vrijeme ekstrakcije te smanjena potrošnja otapala u odnosu na konvencionalne te ih to čini prihvatljivijima (Sharma i sur., 2016). U ove metode ubrajaju se ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, tekućinska ekstrakcija pod tlakom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom te hidrodifuzijska ekstrakcija (Sharma i sur., 2016). U ekstrakciji superkričnim fluidima koriste se posebni termodinamički uvjeti kako bi se postigli uvjeti u kojima plinovi imitiraju učinkovitost organskih otapala. Superkrični fluidi (pr. CO<sub>2</sub>) se uglavnom koriste za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz sjemenki, lišća, korijenja, kore, plodova i cvjetova biljaka. Većina provedenih istraživanja je pokazala kako povišenje tlaka superkričnih fluida prilikom provođenja ekstrakcije dovodi do povećanja količine ekstrahiranih bioaktivnih komponenata (Maroun i sur., 2018). Subkrična ekstrakcija vodom je također alternativna metoda kojom se polifenolni spojevi ekstrahiraju iz voća ili visoko pigmentiranog povrća. Kao otapalo se koristi voda pri povišenim temperaturama i tlaku (subkrično područje). Prednosti ove metode su sigurnost, isplativost, ekološka prihvatljivost te mogućnost ekstrakcije i nepolarnih spojeva potizanjem određenih uvjeta temperature i tlaka (100–374 °C, >50 bar) (Maroun i sur., 2018). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (sa frekvencijama višim od 20 kHz) se danas široko koristi kao zamjena za konvencionalne ekstrakcijske metode kako bi se bioaktivne komponente iz biljnih materijala ili njihovih nusproizvoda što bolje izdvojile. Takvu metodu ekstrakcije karakteriziraju viši ekstrakcijski prinosi, smanjenje trajanja ekstrakcije i količine potrošnje otapala (Maroun i sur., 2018).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijal**

##### **3.1.1. Uzorci**

U ovome radu korištene su suha otpadna masa crvenog luka (*Allium cepa* L.; engl. onion peel - oznaka uzorka **OP**) i liofilizirana kora banane (*Musa* sp., var. Cavendish; engl. banana peel - oznaka **BP**). Oba materijala pripremljena su u laboratorijskim uvjetima, čišćenjem primarnih sirovina, tj. odvajanjem jestivih od nejestivih dijelova. Otpadna masa luka (ljuska luka) je sadržavala vanjsku suhu smeđu ljusku, vanjske mesnate listove, vršak glavice i korjenčiće te je stabilizirana sušenjem u laboratorijskom sušioniku pri 50 °C do udjela vode od približno 10 %. Kora banane (banane stupnja zrelosti 5 – žute s tragovima zelenog (Tapre i Jain, 2012)) je blanširana vrućom vodom (100 °C) tijekom 7 min, u svrhu inaktivacije enzima polifenol oksidaze, a nakon toga je ocijeđena na kuhinjskom ubrusu, narezana na manje komade, zamrznuta pri -20 °C i osušena liofilizacijom. Osušeni materijal usitnjen je pomoću električnog mlinca za kavu (za domaćinstvo), a zatim i prosijan kroz sito veličina pora 450 µm. Opisanim postupkom dobivena su homogene frakcije suhe ljuske luka i suhe kore banane, koje su čuvane u zatvorenim plastičnim posudama na suhom i tamnom mjestu.

##### **3.1.2. Kemikalije**

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) ili HPLC čistoće.

##### Priprema ekstrakata i polifenolnih frakcija

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- L-askorbinska kiselina, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Dietileter, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Etilacetat, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- n-heksan, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Kompleksal III (etilendiaminotetraoctena kiselina, dinatrijeva sol, dihidrat), T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev hidroksid, u zrcima, T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev sulfat, bezvodni, Gram-mol (Zagreb, Hrvatska)

### Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- Acetonitril, HPLC kvaliteta, Fischer Scientific (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Analitički standardi polifenolnih spojeva:
  - Hidroksibenzojeve kiseline :
    - protokatehinska kiselina (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
  - Hidroksicimetne kiseline :
    - *p*-kumarinska kiselina (98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
    - *trans*-ferulinska kiselina (99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
  - Flavanoli:
    - (-)-epikatehin (>90 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
  - Flavonoli:
    - kvercetin (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
    - kvercetin-3-glukozid, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
    - kvercetin-4'-glukozid (spireozid) (>95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
    - kvercetin-3,4'-diglukozid (>85 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
    - rutin trihidrat (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Mravlja kiselina, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Voda HPLC kvalitete

### **3.1.3. Aparatura i pribor**

#### Priprema biljnog materijala

- Laboratorijski sušionik, Instrumentaria (Zagreb, Hrvatska)
- Metalno sito

#### Priprema ekstrakata i frakcija polifenolnih spojeva

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga (SL 8R) s rotorom s utorima pod fiksnim kutom (HIGHConic™ III ), Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijska vaga (GF-3000 EC), A&D Instruments (Japan)
- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, propipete, željezni stalak

- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (15 i 50 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, reagens boce, tikvice s okruglim dnom (50 i 100 mL), štapići, epruvete s navojnim čepom s PTFE septom
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg (Wertheim, Njemačka)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Francuska)
- pH metar (FiveEasy FE20), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Rotacijski vakuum uparivač Buchi R-205 (Flawil, Švicarska) s vakuum pumpom Buchi V-700 (Flawil, Švicarska)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)

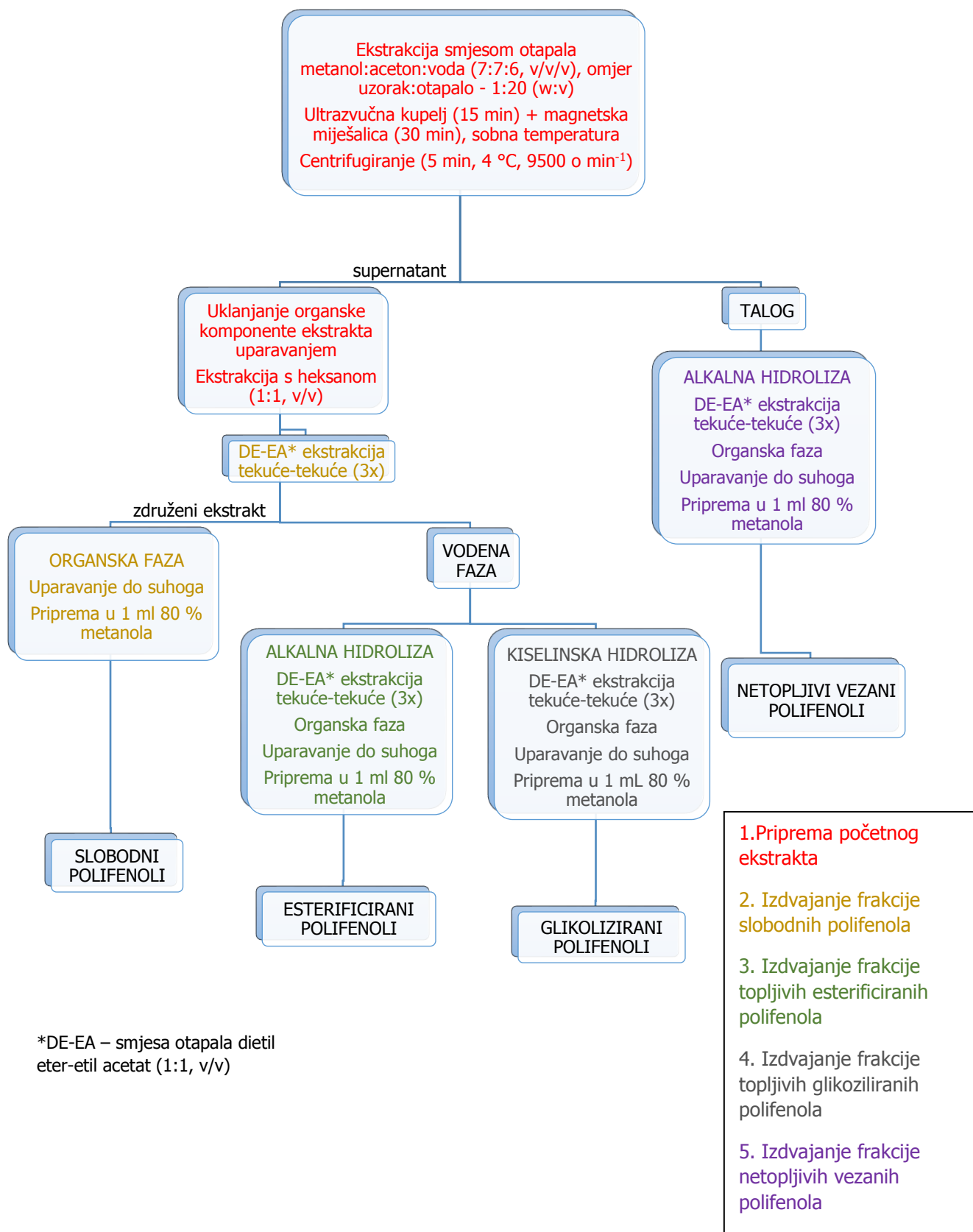
#### Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,45 µm (13/45), HPLC posude za uzorke (vials) s čepovima
- Ultrazvučna kupelj S 60 H Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od vakuum otplinjača, kvarterne pumpe, automatskog uzorkivača s injektorom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Frakcijsko izdvajanje polifenolnih spojeva**

Inicijalna ekstrakcija (osnovni ekstrakt), a zatim i izdvajanje polifenolnih frakcija iz izvornog ekstrakta te čvrstog ostatka nakon ekstrakcije provedeni su prema radu Arrude i suradnika (2018), uz modifikacije, kako je objašnjeno u daljnjem tekstu. Shematski prikaz postupka izdvajanja polifenolnih frakcija prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz postupka izdvajanja polifenolnih frakcija (Arruda i sur., 2018)

### **3.2.1.1 Priprema osnovnog ekstrakta**

Uzorci ljuske luka ( $0,4 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ ; OP) i kore banane ( $0,8 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ ; BP) pomiješani su u omjeru 1:20 (w/v), za OP, i 1:10 (w/v), za BP, sa smjesom otapala metanol:acetona:voda (7:7:6, v:v:v) u plastičnim Falcon epruvetama od 15 mL. Uzorci su zatim ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji (kontinuirani način rada) tijekom 15 min u zatvorenim epruvetama, a zatim i uz miješanje pomoću magnetske miješalice, pri sobnoj temperaturi i tijekom 30 min. Centrifugiranjem ( $9500 \text{ o min}^{-1}$ , 5 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) uzoraka odvoji se talog od supernatanta koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL. Opisani postupak ekstrakcije proveden je još 2 puta, a supernatant se ponovno kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL te se nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Iz dobivenog ukupnog ekstrakta je izuzet alikvot od 1 mL, a ostatak je kvantitativno prenesen u tikvicu s okruglim dnom i uparen do malog volumena (približno 3 mL) pomoću rotacijskog vakuum uparivača. Uparenom ekstraktu definiran je konačni volumen od 5 mL u odmjernoj tikvici, a zatim je ukupni volumen ekstrakta ekstrahiran s n-heksanom u omjeru 1:1 (v/v), uz homogenizaciju faza tijekom 2 min (vorteks) i kratko centrifugiranje kako bi se faze bolje odvojile. Ekstrakcija s heksanom provedena je ukupno 3 puta; ukupni heksanski ekstrakt je odbačen, dok je preostala vodena faza korištena za izdvajanje frakcija slobodnih i konjugiranih polifenolnih spojeva (esteri i glikozidi). Priprema osnovnog ekstrakta, tj. ekstrakcija ukupnih topljivih polifenola provedena je u duplikatu.

### **3.2.1.2 Izdvajanje frakcije slobodnih polifenola**

Za izdvajanje slobodnih polifenolnih spojeva izuzet je alikvot od 2,5 mL uparenog osnovnog ekstrakta u staklenu epruvetu s navojnim čepom. Alikvotu se dodaje 2 mL 5 M otopine natrijevog klorida, 0,25 mL 4 M otopine klorovodične kiseline (HCl) i 0,25 mL demineralizirane vode (konačni volumen iznosi 5 mL). Otopina se dobro promiješa na vorteksu, a zatim se ekstrahira smjesom otapala dietil eter-etil acetat (1:1, v/v) u omjeru 1:1. Ekstrakcija se provodi intenzivnim miješanjem pomoću vorteksa, u čvrsto zatvorenim epruvetama, tijekom 1 minute, a odvajanje faza nakon ekstrakcije pospješuje se kratkim centrifugiranjem ( $2000 \text{ o min}^{-1}$ , 1 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Gornja organska faza se prebaci u čistu epruvetu, a preostala vodena faza se ekstrahira još 2 puta kako je navedeno. U združene organske ekstrakte nakon svake ekstrakcije se dodaje malo (na vrhu špatule) bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se vezala rezidualna voda, a nakon miješanja se ekstrakt odvaja centrifugiranjem ( $2000 \text{ o min}^{-1}$ , 5 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i prebacuje u tikvicu s okruglim dnom. Ekstrakt se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača pri  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , a suhi talog se potom resuspendira u 1 mL 80 % metanola, što predstavlja uzorak za analizu. Iz preostale vodene faze nakon izdvajanja slobodnih polifenolnih spojeva, izdvajaju se frakcije esterificiranih i glikoziliranih polifenola. Izdvajanje frakcije slobodnih polifenola provedeno je u duplikatu.

### **3.2.1.3 Izdvajanje frakcije esterificiranih polifenola**

Frakcija esterificiranih polifenola izdvojena je iz vodene faze preostale nakon izdvajanja slobodnih polifenola. U alikvot od 1 mL vodene faze dodaje se 0,05 mL 4 M otopine natrijevog hidroksida (NaOH), a zatim i 1,25 mL 4 M otopine NaOH u kojoj su otopljeni etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA, 20 mM) i askorbinska kiselina (2 %, w/v), te 0,2 mL vode. Otopina se dobro promiješa i ostavi pri sobnoj temperaturi tijekom 2 h. Po isteku vremena potrebno je provesti neutralizaciju polaganim dodatkom 1,5 mL 4 M otopine HCl, uz hlađenje, a zatim se dodaje i 1 mL 5 M otopine NaCl. Ovako pripremljena otopina se ekstrahira smjesom otapala dietil eter-etil acetat, kako je opisano u prethodnom poglavlju (3.2.1.2). Organski ekstrakt se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a suhi talog se potom resuspendira u 1 mL 80% metanola, što predstavlja uzorak za analizu. Izdvajanje frakcije esterificiranih polifenola provedeno je u duplikatu.

### **3.2.1.4 Izdvajanje frakcije glikoziliranih polifenola**

Frakcija glikoziliranih polifenola izdvojena je iz vodene faze preostale nakon izdvajanja slobodnih polifenola. U alikvot od 1 mL vodene faze dodaje se 1 mL 4 M otopine HCl, otopina se promiješa te se zagrijava pri 80 °C tijekom 1 h. Po isteku vremena se otopina ohladi u hladnoj vodi i nadopuni s 2 mL 5 M otopine NaCl te 1 mL vode i dobro promiješa pomoću vorteksa. Ovako pripremljena otopina se ekstrahira smjesom otapala dietil eter-etil acetat, kako je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Ukupni organski ekstrakt se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a suhi talog se potom resuspendira u 1 mL 80 % metanola, što predstavlja uzorak za analizu. Izdvajanje frakcije glikoziliranih polifenola provedeno je u duplikatu.

### **3.2.1.5 Izdvajanje frakcije netopljivih vezanih polifenola**

Frakcija netopljivih vezanih polifenola izdvaja se iz taloga preostalog nakon pripreme osnovnog ekstrakta, primjenom alkalne hidrolize. Talog se prvo ispiri s 5 mL acetona (ukupno 2 puta), a aceton se odvoji centrifugiranjem (9500 o min<sup>-1</sup>, 5 min, 4 °C). Isprani talog suši se u digestoru. Ovako pripremljen talog se kvantitativno prebaci u plastičnu Falcon epruvetu te mu se doda 5 mL 2 M otopine NaOH u kojoj su otopljeni EDTA (10 mM) i askorbinska kiselina (1 %, w/v). Smjesa se postavi na magnetsku miješalicu gdje se provodi ekstrakcija tijekom 2 h i pri sobnoj temperaturi, uz kontinuirano miješanje (homogeno raspoređen biljni materijal u cijelom volumenu otapala). Po isteku vremena se provede neutralizacija smjese polaganim dodatkom 3 mL 4 M otopine HCl, a zatim se dodaje i 2 mL 5 M otopine NaCl. Smjesa se dobro promiješa, a ekstrakt se izdvoji centrifugiranjem (9500 o min<sup>-1</sup>, 5 min, 25 °C). Iz supernatanta se izdvoji alikvot od 2 mL te se ekstrahira jednakim volumenom smjese otapala dietil eter-etil acetat (1:1, v/v), kako je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Ukupni organski ekstrakt se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a suhi talog se potom resuspendira u 1 mL 80



% metanola, što predstavlja uzorak za analizu. Izdvajanje frakcije netopljivih vezanih polifenola provedeno je u duplikatu.

### **3.2.2. Određivanje polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD)**

Pojedinačni polifenolni spojevi u osnovnom ekstraktu te izdvojenim polifenolnim frakcijama određeni su primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD) prema razvijenoj metodi na predlošku metode objavljene u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2011). U analizi je korištena kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) (Agilent Technologies, SAD). Uzorak je injektiran u sustav automatskim injektorom u volumenu od 5  $\mu$ L, a elucija je provedena gradijentno dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 1 % (v/v) mravlja kiselina u vodi, B - 1 % (v/v) mravlja kiselina u acetonitrilu) i pri protoku od 1 mL min<sup>-1</sup>. Gradijent je uspostavljen kako slijedi: 0. min – 7 % B, 5. min – 7 % B, 45. min – 40 % B, 47. min - 70% B, 52. min - 70% B + 10 min ekvilibracije na početne uvjete analize. Temperatura kolone iznosila je 25 °C. Detekcija analita omogućena je primjenom detektora s nizom fotodioda (engl. diode array detector, DAD), snimanjem pri valnim duljinama 260, 278, 320, 350 i 370 nm, što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara različitih polifenolnih spojeva koji su analizirani ovom metodom.

Identifikacija pikova na kromatogramima uzoraka provedena je usporedbom retencijskih vremena s poznatim čistim standardima, kao i usporedbom apsorpcijskih spektara snimljenih u valnom području 190-600 nm.

Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je korištenjem konstruiranih baždarnih pravaca za pojedini standard. Jednadžbe baždarnih pravaca s koeficijentima determinacije te valne duljine detekcije pojedinih standarada i koncentracijski raspon u kojem baždarni pravci vrijede, prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Jednadžbe baždarnih pravaca za odabrane standarde, koncentracijski raspon u kojem vrijede te valne duljine detekcije pojedinih standarada

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	R <sup>2</sup>	Valna duljina (nm)	Koncentracijski raspon (µg mL <sup>-1</sup> )
<b>protokatehinska kiselina</b>	$y = 16,717x + 0,8176$	1,0000	260	2 - 100
<b><i>p</i>-kumarinska kiselina</b>	$y = 27,378x + 4,1293$	0,9998	320	1 - 100
<b><i>t</i>-ferulinska kiselina</b>	$y = 21,978x + 0,5963$	1,0000	320	1 - 100
<b>kvercetin</b>	$y = 19,316x - 1,9533$	1,0000	370	2 - 100
<b>kvercetin-3-glukozid</b>	$y = 11,88x - 0,2151$	1,0000	350	2 - 100
<b>kvercetin-4'-glukozid</b>	$y = 11,21x - 3,2939$	0,9997	370	2 - 100
<b>kvercetin-3,4'-diglukozid</b>	$y = 4,1242x + 0,116$	1,0000	375	2 - 100
<b>rutin</b>	$y = 8,3119x + 0,2238$	1,000	350	2 - 100

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

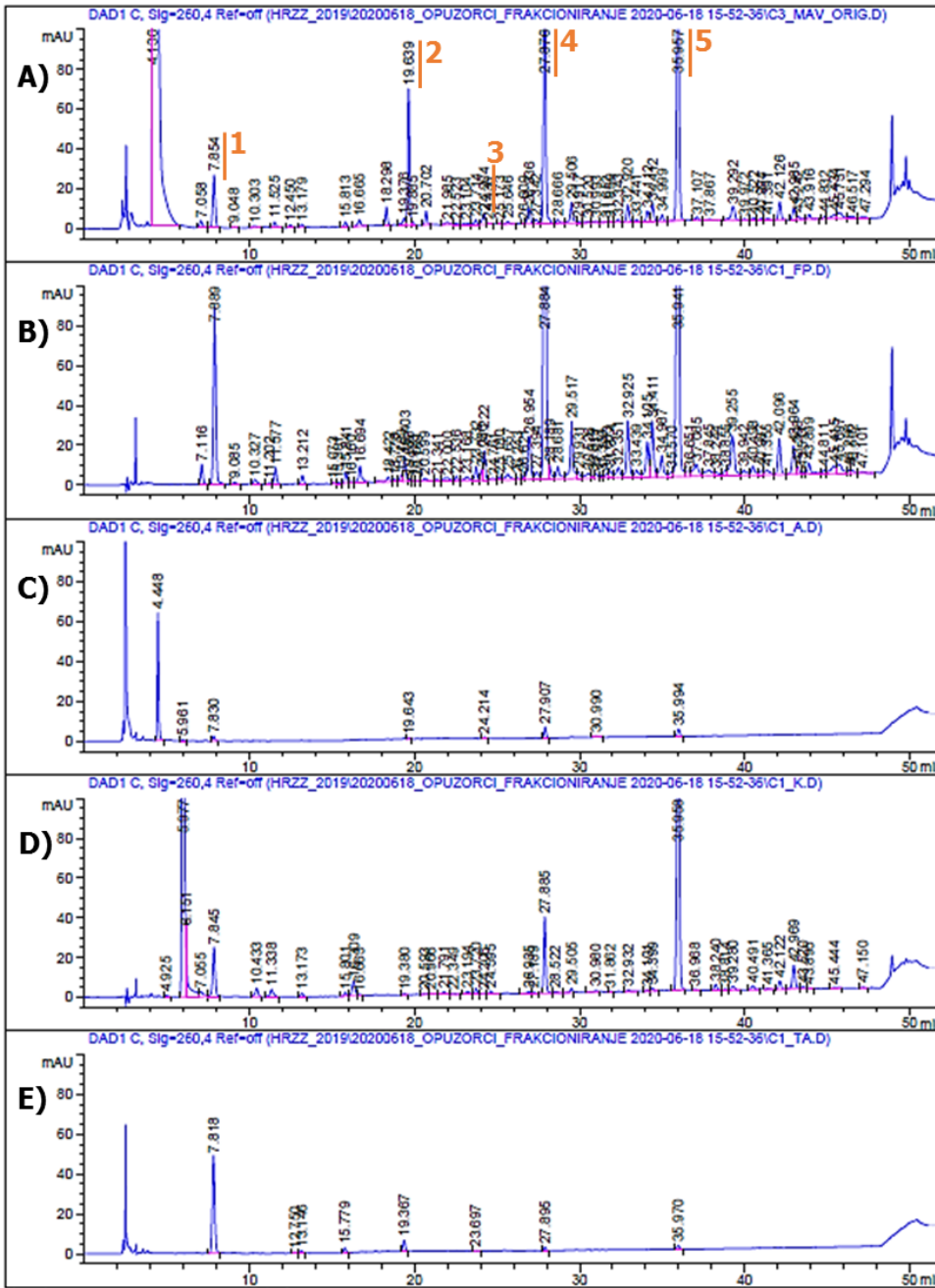
Otpadni biljni materijali koji se u velikim količinama generiraju preradom osnovnih sirovina u prehrambenoj industriji danas privlače veliku pozornost znanstvene zajednice zbog svog bogatog kemijskog sastava i potencijala ponovne primjene u prehrani ljudi. U tom kontekstu, među najzanimljivijim sastojcima takvih materijala su polifenolni spojevi koji se ističu svojim antioksidacijskim i drugim vezanim pozitivnim učincima na zdravlje. Stoga se danas potiču istraživanja sastava i udjela polifenola iz različitog agro-industrijskog otpada, kao i adekvatnih tehnika njihove ekstrakcije i stabilizacije, s ciljem predstavljanja takvih materijala kao inovativnih izvora polifenola koji se mogu primijeniti u kreiranju novih funkcionalnih proizvoda.

S obzirom na velik broj različitih oblika polifenolnih spojeva, a time i različitosti u fizikalno-kemijskim svojstvima, njihovo određivanje zahtijeva različite ekstrakcijske pristupe. Cilj ovoga rada bio je primijeniti postupak frakcioniranja polifenolnih spojeva na ljusku luka i koru banane te odrediti slobodne, konjugirane (esterificirane i glikozilirane) i vezane polifenolne spojeve u navedenim otpadnim biljnim materijalima.

### 4.1 Analiza polifenolnih spojeva u frakcijama izdvojenima iz ljuske luka

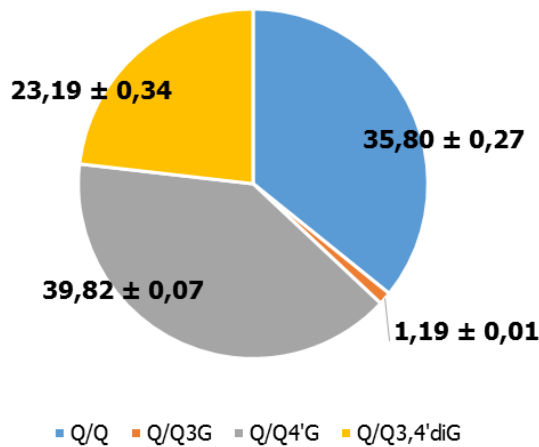
Primijenjenim postupkom ekstrakcije i frakcioniranja, iz ljuske luka izdvojene su 4 frakcije: slobodni polifenoli (SP), esterificirani polifenoli, glikozilirani polifenoli i netopljivi vezani polifenoli (NVP).

Osnovni ekstrakt pripremljen je primjenom smjese otapala metanol:aceton:voda (7:7:6, v/v/v) (MAV) kombinacijom ultrazvučne ekstrakcije i miješanja pri sobnoj temperaturi. Analizom osnovnog ekstrakta, a s obzirom na dostupne standarde, određena je prisutnost 5 polifenolnih spojeva: protokatehinske kiseline, kao predstavnika skupine derivata hidroksibenzojeve kiseline, te flavonola kvercetina i njegovih glikoziliranih derivata (kvercetin-3-glukozid, kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3,4'-diglukozid) (Slika 10 A). U Tablici 2 prikazani su udjeli određenih spojeva u osnovnom ekstraktu ljuske luka te izdvojenim frakcijama. U osnovnom ekstraktu ljuske luka dominantno su zastupljeni flavonoli – kvercetin i glikozidi kvercetina, redosljedno: kvercetin-4'-glukozid (7,40 mg g<sup>-1</sup>), kvercetin-3,4'-diglukozid (5,82 mg g<sup>-1</sup>), kvercetin aglikon (4,33 mg g<sup>-1</sup>), kvercetin-3-glukozid (0,22 mg g<sup>-1</sup>). S obzirom da se kvercetin u ljusci luka nalazi u slobodnom i konjugiranom obliku, zanimljivo je promotriti doprinos pojedinog spoja ukupnom udjelu kvercetin aglikona koji se nalazi (u slobodnom i konjugiranom obliku) u osnovnom ekstraktu ljuske luka (Slika 11). Relativni udio slobodnog kvercetina je približno 36 %, dok se gotovo 2/3 ukupnog kvercetin aglikona nalaze u konjugiranom obliku, najviše kao 4'-monoglukozid (približno 40 % relativnog udjela). Osim kvercetina i njegovih derivata, u osnovnom ekstraktu ljuske luka u značajnijem udjelu je i protokatehinska kiselina (1,03 mg g<sup>-1</sup>).



- 1 – protocatehinska kiselina
- 2 – kvercetin-3,4'-diglukozid
- 3 – kvercetin-3-glukozid
- 4 – kvercetin-4'-glukozid
- 5 – kvercetin

Slika 10. Kromatogrami izvornog ekstrakta i izdvojenih polifenolnih frakcija ljuske luka, snimljeni pri ; A) izvorni ekstrakt (MAV), B) frakcija slobodnih polifenola (SP), C) frakcija esterificiranih polifenola (E), (D) frakcija glikoziliranih polifenola (GP), (E) frakcija netopljivih vezanih polifenola (NVP)



Slika 11. Relativni udio kvercetin aglikona iz identificiranih spojeva, s obzirom na ukupni prinos kvercetin aglikona; Q – kvercetin, Q3G – kvercetin-3-glukozid, Q4'G – kvercetin-4'-glukozid, Q3,4'diG – kvercetin-3,4'-diglukozid

Izdvajanju slobodnih polifenola, prema predloženom postupku frakcioniranja, prethodi uklanjanje organske faze ekstrakta (metanol, aceton) kako bi particioniranje spojeva prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće u sljedećoj fazi bilo uspješnije. Prilikom uparavanja osnovnog ekstrakta ljuske luka moglo se primijetiti zamućenje koje potječe od precipitacije određenih spojeva uslijed promjene sastava otapala. Iz rezultata udjela identificiranih spojeva u uparenom ekstraktu (OP\_U, Tablica 2), vidljivo je da je uparavanjem došlo do značajnih gubitaka identificiranih flavonola, posebice kvercetina, u slučaju kojeg je gubitak, odnosno količina precipitiranog kvercetina iznosila gotovo 80 %. Glikozilirani oblici kvercetina pokazali su veću topljivost u vodi te je najveće iskorištenje određeno za kvercetin-3,4'-diglukozid (75,13 %) i kvercetin-3-glukozid (70,25 %), dok je iskorištenje kvercetin-4'-glukozida, ujedno i najzastupljenijeg flavonola u ljusci luka iznosilo tek približno 49 %. Sukladno gubicima pojedinih flavonola, i udio ukupnog kvercetin aglikona bio je dvostruko niži nego u osnovnom ekstraktu. S druge strane, protokatehinska kiselina nije se u značajnoj mjeri precipitirala prilikom uparavanja osnovnog ekstrakta (Tablica 2). U postupku frakcioniranja, izdvajanje slobodnih polifenola provodi se ekstrakcijom tekuće-tekuće smjesom nepolarnih otapala dietil etera i etil acetata (1:1, v/v). Prethodno je koncentrirani vodeni ekstrakt potrebno zakiseliti (do pH 2) kako bi se polifenolni spojevi nalazili u protoniranim oblicima, a time imali i veći afinitet za ekstrakciju u nepolarno organsko otapalo (Stalikas, 2017). Pretpostavka ovog koraka u postupku frakcioniranja je da će u vodenoj fazi nakon ekstrakcije tekuće-tekuće zaostati konjugirani polifenolni spojevi poput estera i glikozida. S obzirom na precipitaciju dijela flavonola prilikom uparavanja osnovnog ekstrakta prije ekstrakcije tekuće-tekuće, izuzet je homogeni alikvot koncentriranog ekstrakta te je ispitana učinkovitost ekstrakcije tekuće-tekuće u uvjetima kada je prisutan precipitat u uzorku. Iskorištenje kvercetina u ekstrakciji tekuće-tekuće bilo je visoko (88,71 %), odnosno velika većina kvercetina, koji je u uparenom ekstraktu bio uglavnom precipitiran, se uspješno otopila u organskoj fazi. Najmanje iskorištenje određeno je za kvercetin-3,4'-diglukozid (7,05 %), što je u kvalitativnom smislu vidljivo i iz kromatograma frakcije slobodnih polifenola (Slika 10 B). S obzirom na visoko iskorištenje ovog spoja u koncentriranom ekstraktu, nisko iskorištenje u frakciji slobodnih polifenola posljedica je visoke topljivosti u vodi te smanjene topljivosti u nepolarnim organskim otapalima. S druge strane, monoglukozidi su pokazali relativno visoka i visoka iskorištenja u ekstrakciji tekuće-tekuće. Za protokatehinsku kiselinu je određeno vrlo visoko iskorištenje u ekstrakciji tekuće-tekuće (99,38 %). Uspješna ekstrakcija jednostavnijih konjugata u obliku monoglikozida u frakciju slobodnih polifenola upućuje na potrebu za korekcijom primijenjenog postupka frakcioniranja, budući da se u frakciji ne izdvajaju isključivo slobodni polifenolni spojevi. Drugi problem je, svakako, i precipitacija dijela spojeva prilikom uparavanja osnovnog ekstrakta, odnosno otežano izuzimanje potpuno homogenog uzorka (aliquota) za daljnju obradu. S obzirom na nepotpuno razdvajanje slobodnih polifenola i konjugata prilikom frakcioniranja, određivanje glikoziliranih spojeva u zasebnoj frakciji nije relevantno prikazati. Ipak, ispitan je utjecaj kiselinske hidrolize na prinos ukupnog kvercetin aglikona.

Tablica 2. Udjeli i iskorištenja identificiranih polifenolnih spojeva u ljusci luka kroz različite faze postupka frakcioniranja.

uzorak/frakcija	kvercetin	kvercetin-3-glukozid	kvercetin-4'-glukozid	kvercetin-3,4'-diglukozid	ukupno kvercetin aglikona	protokatehinska kiselina
	mg g <sup>-1</sup>					
<b>OP_MAV</b>	4,33 ± 0,06	0,22 ± 0,00	7,40 ± 0,06	5,82 ± 0,05	12,1 ± 0,07	1,03 ± 0,02
OP_U	0,83 ± 0,13	0,15 ± 0,00	3,60 ± 0,11	4,37 ± 0,06	5,38 ± 0,23	0,96 ± 0,01
<b>iskorištenje (%)</b>	19,11 ± 2,74	70,25 ± 0,10	48,66 ± 1,12	75,13 ± 1,66	44,48 ± 1,64	93,29 ± 2,39
OP_SP	3,84 ± 0,06	0,14 ± 0,01	6,34 ± 0,15	0,41 ± 0,01	8,26 ± 0,17	1,03 ± 0,02
<b>iskorištenje (%)</b>	88,71 ± 0,08	63,59 ± 2,42	85,58 ± 1,44	7,05 ± 0,27	68,23 ± 0,97	99,38 ± 0,61
OP_MAV_kh	11,01 ± 0,45	-	-	-	11,01 ± 0,45	5,52 ± 0,00
<b>iskorištenje (%)</b>	254 ± 13,91	-	-	-	90,82 ± 4,28	534,79 ± 7,84
OP_hk_1M	7,51 ± 0,31	-	2,74 ± 0,13	-	9,29 ± 0,40	2,84 ± 0,10
<b>iskorištenje (%)</b>	173,32 ± 4,90	-	36,97 ± 1,51	-	76,78 ± 2,85	275,11 ± 5,74
OP_kh_2M	8,69 ± 0,01	-	0,54 ± 0,09	-	9,04 ± 0,07	3,58 ± 0,06
<b>iskorištenje (%)</b>	200,59 ± 5,54	-	7,24 ± 1,21	-	74,69 ± 0,13	346,55 ± 1,07
OP_NVP	-	-	-	-	-	0,29 ± 0,02
<b>iskorištenje (%)</b>	-	-	-	-	-	28,22 ± 1,27

MAV – osnovni ekstrakt, SP – frakcija slobodnih polifenola, MAV\_kh – kiselinški hidroliziran osnovni ekstrakt, kh (1M i 2M) – kiselinška hidroliza 1M ili 2M HCl uparenog ekstrakta, NVP – frakcija netopljivih vezanih polifenola.

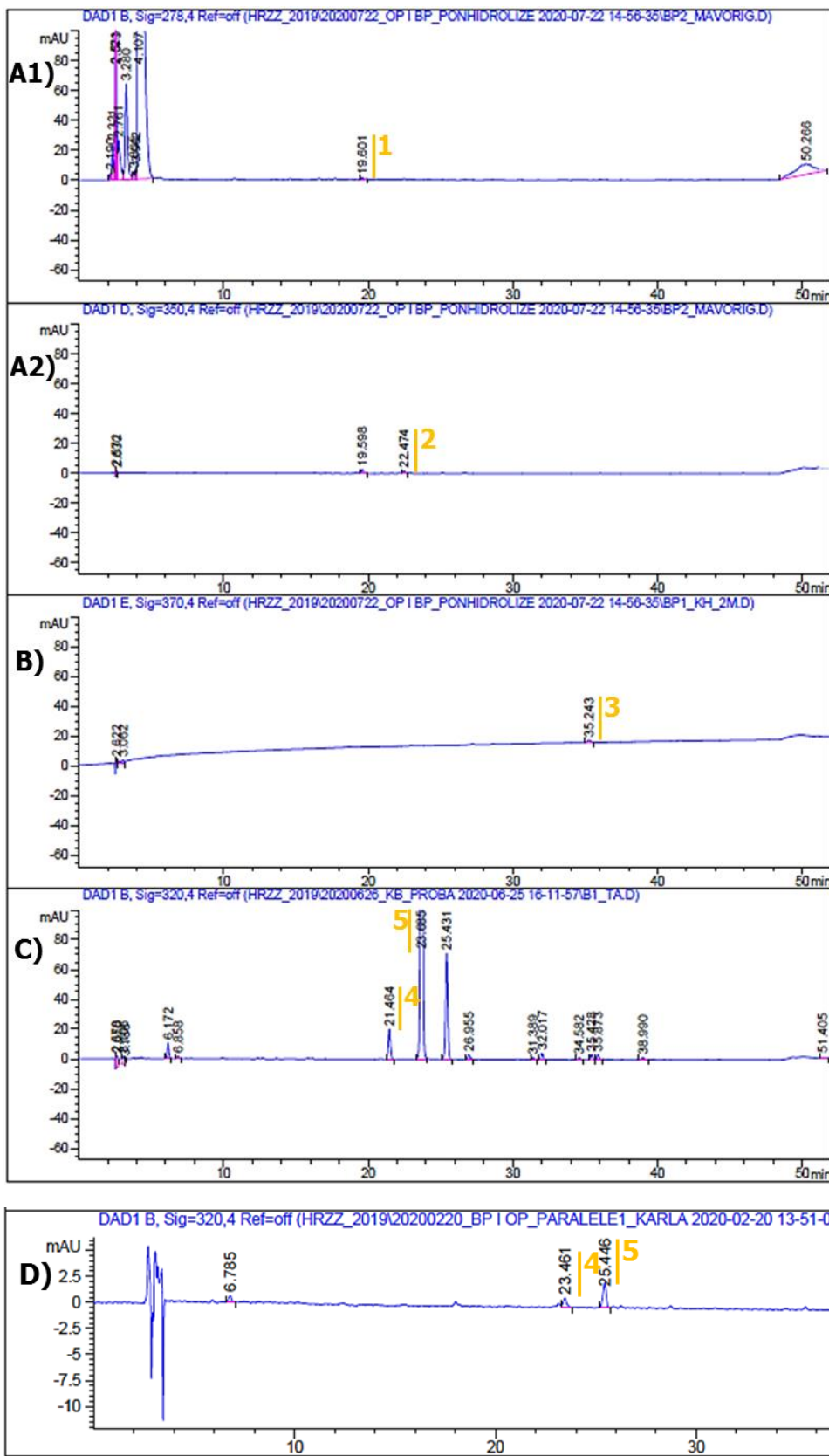
Primjenom kiseline pri povišenoj temperaturi (kiselinska hidroliza) dolazi do cijepanja glikozidne veze i oslobađanja aglikona i šećera. Kiselinska hidroliza prvo je provedena na uparenom osnovnom ekstraktu uz promjenu parametra konačne koncentracije kiseline: 1 M i 2 M. Analizom hidrolizata uz primjenu 1 M HCl određeno je iskorištenje kvercetina od 173,32 %, tj. povećanje udjela kvercetin aglikona od približno 1,7 puta na račun hidrolize njegovih glikozida, dok je iskorištenje ukupnog kvercetin aglikona u hidrolizatu (slobodni kvercetin + kvercetin iz nehidroliziranih glikozida), a s obzirom na osnovni ekstrakt, iznosilo približno 77 % (Tablica 2). U ovom slučaju, nešto više od 1/3 najzastupljenijeg glikozida (4'-glikozid) je ostalo nehidrolizirano. Kromatogram hidrolizata prikazan je na Slici 10 D, gdje se vidi dominantan pik kvercetina, uz prisutnost pika kvercetin-4'-glikozida. Primjenom 2 M HCl došlo je do porasta prinosa kvercetina (200,6 %, Tablica 2), dvostruko u odnosu na početnu koncentraciju u osnovnom ekstraktu, uz značajno smanjenje udjela nehidroliziranog kvercetin-4'-glukozida, dok je iskorištenje ukupnog kvercetin aglikona (slobodni kvercetin + kvercetin iz nehidroliziranih glikozida) bilo vrlo slično kao za hidrolizu primjenom 1 M otopine HCl (Tablica 2). Hidroliza primjenom 2 M otopine HCl primijenjena je i na osnovnom ekstraktu (uzorak MAV\_kh) nakon čega je određeno iskorištenje kvercetina od približno 250 %, odnosno povećanje udjela kvercetina od približno 2,5 puta u odnosu na inicijalni udio u osnovnom ekstraktu. Iskorištenje ukupnog aglikona kvercetina u hidrolizatu, u odnosu na osnovni ekstrakt, iznosilo je visokih 91 % (Tablica 2). Niža iskorištenja za hidrolizate pripremljene iz uparenog ekstrakta, u odnosu na osnovni ekstrakt, mogu se pripisati relativnoj nehomogenosti uzroka, a s obzirom na pojavu precipitacije tijekom uparavanja. Zanimljivo je promotriti i prinose (iskorištenja) protokatehinske kiseline za provedene kiselinske hidrolize. Prinosi protokatehinske kiseline višestruko su bili veći od početnog udjela u osnovnom ekstraktu, redosljedno: 2,8 puta veći za hidrolizu uparenog osnovnog ekstrakta 1 M HCl, 3,5 puta veći za hidrolizu uparenog osnovnog ekstrakta 2 M HCl i 5,3 puta veći za izravnu hidrolizu osnovnog ekstrakta 2 M HCl. Pretpostavlja se da protokatehinska kiselina u ljusci luka nastaje oksidacijom kvercetina (Takahama i Hirota, 2000), a također je zabilježeno formiranje protokatehinske kiseline kao jednog od produkata degradacije kvercetina i rutina pod utjecajem visoke temperature (Buchner i sur., 2006) ili pak oksidacijom kvercetina u prisutnosti zraka (Zenkevich i sur., 2007), tako da postoji mogućnost da je tijekom hidrolize došlo do degradacije dijela kvercetina i nastanka protokatehinske kiseline. S obzirom da je povećanje iskorištenja ukupnog aglikona kvercetina praćeno povećanjem iskorištenja protokatehinske kiseline, može se pretpostaviti da je došlo do degradacije drugih neidentificiranih glikozida kvercetina. Jednako tako, ne može se isključiti prisustvo i derivatiziranih oblika same protokatehinske kiseline. Prema raspoloživim rezultatima, nije moguće u potpunosti objasniti veliko povećanje prinosa protokatehinske kiseline te je potrebno provesti dodatna istraživanja u tom smjeru. Esterificirani polifenolni spojevi u ljusci luka nisu određeni (Slika 10 C). U frakciji netopljivih vezanih polifenola ljuske luka, određena je samo protokatehinska kiselina u udjelu od približno 28 % udjela u osnovnom ekstraktu.

## 4.2 Analiza polifenolnih spojeva u frakcijama izdvojenima iz kore banane

Primijenjenim postupkom ekstrakcije i frakcioniranja, iz kore banane također su izdvojene 4 frakcije: slobodni polifenoli (SP), esterificirani polifenoli (E), glikozilirani polifenoli (GP) i netopljivi vezani polifenoli (NVP). HPLC-PDA analizom je u osnovnom ekstraktu bilo moguće identificirati samo epikatehin i rutin (Slika 12 A1 i A2), pri čemu se epikatehin nije mogao precizno kvantificirati zbog vrlo male površine pika. Rutin je također bio određen u vrlo malom udjelu (Tablica 3). Frakcija slobodnih polifenola nije prikazana s obzirom da je sadržavala vrlo malo pikova koji odgovaraju profilu osnovnog ekstrakta, osim rutina koji prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće zaostaje u vodenoj fazi. U frakciji glikoziliranih polifenola (Slika 12 B) određen je relativno mali udio kvercetina (Tablica 3) što odgovara hidrolizi zaostalog rutina u vodenoj fazi koja je podvrgnuta kiselinskoj hidrolizi nakon izdvajanja slobodnih polifenola. U frakciji esterificiranih polifenola kore banane, identificirane su *p*-kumarinska i *t*-ferulinska kiselina (Slika 12 C) u vrlo malim udjelima koji se nisu mogli precizno kvantificirati. U frakciji netopljivih vezanih polifenola (Slika 12 E) također su određene *p*-kumarinska i *t*-ferulinska kiselina, ali u puno većim udjelima (Tablica 3). Udio *p*-kumarinske kiseline iznosio je 77,23  $\mu\text{g g}^{-1}$ , a *t*-ferulinske kiseline čak 2021,23  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se najveći dio polifenola kore banane nalazi u vezanom obliku te je za njihovu ekstrakciju potrebno primijeniti alkalnu hidrolizu. Pritom je važno dodati EDTA i askorbinsku kiselinu tijekom hidrolize kako bi se spriječila degradacija oslobođenih vezanih polifenola u lužnatom mediju (Nardini i sur., 2002).

Identifikacija ukupnih polifenola u nekom biljnom materijalu zahtijeva različite ekstrakcijske pristupe, kao što je vidljivo iz primjera ljuske luka i kore banane. U konvencionalnom smislu se ekstrakcija polifenola najčešće provodi organskim otapalima poput metanola i acetona ili kombinacijom istih s vodom, što je dovoljno ako su dominantni polifenoli topljivi; međutim, za neke biljne supstrate rezultira zanemarivanjem vezanih polifenolnih spojeva koji mogu biti zastupljeni u značajnom mjeri. Stoga, postupke ekstrakcije potrebno je prilagoditi biljnom materijalu, a pritom, upravo postupak frakcioniranja omogućuje lakše definiranje ekstrakcijskih parametara.





- 1 – epikatehin
- 2 – rutin
- 3 – kvercetin
- 4 – p-kumarinska kiselina
- 5 – t-ferulinska kiselina

Slika 12. Kromatogrami izvornog ekstrakta i izdvojenih polifenolnih frakcija ljuske luka; A1) izvorni ekstrakt (MAV) (278 nm), A2) izvorni ekstrakt (MAV) (350 nm), B) frakcija glikoziliranih polifenola (GP), (D) frakcija netopljivih vezanih polifenola (NVP), E) frakcija esterificiranih polifenola

Tablica 3. Udjeli identificiranih polifenolnih spojeva u kori banane kroz različite faze postupka frakcioniranja.

uzorak/frakcija	rutin	kvercetin	<i>p</i> -kumarinska $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>t</i> -ferulinska
<b>BP_MAV</b>	9,40 ± 0,14	-	-	-
BP_KH	-	16,87 ± 5,52	-	-
BP_AH	-	-	+	+
BP_NVP	-	-	77,23 ± 8,01	2021,23 ± 167,01

## 5. ZAKLJUČCI

- Polifenoli u ljusci luka su dominantno topljivi konjugirani (glikozilirani) spojevi iz skupine flavonola, koji se jednostavno ekstrahiraju primjenom metanola, acetona i vode s pretežnom organskom komponentom.
- Najzastupljeniji pojedinačni flavonoli u ljusci luka su: kvercetin-4'-glukozid ( $7,40 \text{ mg g}^{-1}$ ), kvercetin-3,4'-diglukozid ( $5,82 \text{ mg g}^{-1}$ ) i kvercetin ( $4,33 \text{ mg g}^{-1}$ ), a također je značajnije zastupljena i protokatehinska kiselina ( $1,03 \text{ mg g}^{-1}$ ) iz skupine derivata hidroksibenzojeve kiseline.
- Kiselinskom hidrolizom ekstrakta ljuske luka dolazi do oslobađanja kvercetin aglikona i povećanja njegovog početnog udjela od 2,5 puta, pri čemu se gotovo kvantitativno smanjenje udjela najzastupljenijeg glikozida kvercetina (kvercetin-4'-glukozida) postiže primjenom 2 M otopine klorovodične kiseline uz zagrijavanje pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 1 h.
- Polifenole u kori banane dominantno čine hidroksicimetne kiseline koje se nalaze u vezanom obliku i stoga su netopljive te je za njihovu ekstrakciju potrebno primijeniti alkalnu hidrolizu otopinom natrijevog hidroksida (2 M) uz dodatak EDTA (10 mM) i askorbinske kiseline (1 %, w/v).
- Kao najzastupljeniji pojedinačni polifenolni spojevi u kori banane, s obzirom na dostupne standarde, određene su: *t*-ferulinska kiselina ( $2,02 \text{ mg g}^{-1}$ ) i *p*-kumarinska kiselina ( $0,08 \text{ mg g}^{-1}$ ).
- Primijenjeni postupak frakcioniranja polifenolnih spojeva pokazao se učinkovitim za lakšu identifikaciju polifenolnih spojeva i definiranje parametara njihove ekstrakcije, a pritom je važno naglasiti da postupak nije strogo selektivan prilikom izdvajanja nativno prisutnih slobodnih polifenola te ga je potrebno prilagoditi pojedinom biljnom materijalu.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Acosta-Estrada, B. A., Gutierrez-Uribe, J.A., Serna-Saldivar, S. O. (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* **152**: 46-55.
2. Albishi, T., John, J. A., Al-Khalifa, A. S., Shahidi, F. (2013) Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods* **5**: 1191-1203.
3. Anonymous 2 (2020) <<https://www.plantlife.ie/how-to-make-fertiliser-from-banana-peels/>> pristupljeno 10.09.2020.
4. Anonymous 1 (2020) <<https://www.livescience.com/45005-banana-nutrition-facts.html>> pristupljeno 10.09.2020.
5. Anonymous 3 (2020) <<http://ljekovitobilje.weebly.com/crveni-luk-allium-cepa.html>> pristupljeno 10.09.2020.
6. Anonymous 4 (2020) <<https://www.colubriscleantech.com/int/cases/onions-processing-factory>> pristupljeno 10.09.2020.
7. Anonymous 5 (2020) <[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001013?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caContent\\_prodMerch\\_gruCrossEntropy-\\_-prodMerch10-2](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001013?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-2)> pristupljeno 10.09.2020.
8. Anonymous 6 (2020) <[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phl89270?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caContent\\_prodMerch\\_gruCrossEntropy-\\_-prodMerch10-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phl89270?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-1)> pristupljeno 10.09.2020.
9. Anonymous 7 (2020) <<https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>> pristupljeno 10.09.2020.
10. Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., Pastore, G. M. (2018) Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry* **245**: 738-749.
11. 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.
12. Bedrníček, J., Jirotkova, D., Kadlec, J., Laknerová, I., Vrchotová, N., Tríska, J., Samková, E., Smetana, P. (2020) Thermal stability and bioavailability of bioactive

- compounds after baking of bread enriched with different onion by-products. *Food Chemistry* **319**: 126562.
13. Belščak-Cvitanović, A., Stanojević, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* **44**: 1094-1101.
  14. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., & Caboni, M. F. (2004) Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(16): 5195–5200.
  15. Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. Kroh, L. W. (2006) Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**: 3229–3235.
  16. Çelik, E. E., Gökmen, V. (2020) Effects of fermentation and heat treatments on bound-ferulic acid content and total antioxidant capacity of bread crust-like systems made of different whole grain flours. *Journal of Cereal Science* **93**: 102978.
  17. Chandrasekara, A. (2018) Phenolic Acids. Reference Module in Food Science. U: *Encyclopedia of Food Chemistry*, vol. 3, 1. izd., Varelis, P., Melton, L., Shahidi, F., ur., Elsevier, str. 535-545.
  18. Chua, L. S. (2013) A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* **150**(3): 805–817.
  19. Mohapatra D., Mishra S., Sutar N. (2010) Banana and its by-product utilisation: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* **69**: 323-329.
  20. Dmitrienko, S. G., Kudrinskaya, V. A., & Apyari, V. V. (2012). Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *Journal of Analytical Chemistry*, **67**(4): 299–311.
  21. Evans, E. A., Ballen, F. H., & Siddiq, M. (2020). Banana Production, Global Trade, Consumption Trends, Postharvest Handling, and Processing. U: *Handbook of Banana Production, Postharvest Science, Processing Technology, and Nutrition*, Siddiq, M., Ahmed, J., Lobo, M., G., ur., str. 1–18.
  22. Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. (2002) Onions: A global benefit to health. *Phytotherapy Research*, **16**(7): 603-615.
  23. Gullon, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J.M., Eibes, G. (2017) Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and

- approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology* **67**: 220-235.
24. Gwaltney-Brant, S. M. (2016). Nutraceuticals in Renal Diseases. U: *Nutraceuticals : Efficacy, Safety and Toxicity*, Gupta R., C., ur., Academic Press, str. 101–108.
  25. Hardman, W.E. (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* **8**(3): 233–240.
  26. Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2012). Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food. U: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, vol. 4., izd. 1., Pawliszyn, J., ur., Academic Press, str. 159-180.
  27. Khokar, S., Fenwick, G. R. (2003). Onions and related crops. U: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. izd., Caballero, B., ur., Academic Press, str. 4267-4272.
  28. Kuete, V. (2017). Allium cepa. U: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa, Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, Kuete, V., ur., Academic Press, str. 353-361.
  29. Lawande, K. E. (2012). Onion. U: *Handbook of Herbs and Spices*, vol. 1., 2. izd, K.V. Peter, ur., Woodhead Publishing, str. 417–429.
  30. Li, D., Sun-Waterhouse, D., Wang, Y., Qiao, X., Chen, Y., Li, F. (2018). Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. *Reference Module in Food Science*.
  31. Mancuso, C., Santangelo, R. (2014) Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology* **65**: 185-195.
  32. Maroun, R. G., Rajha, H. N., El Darra, N., El Kantar, S., Chacar, S., Debs, E., Vorobiev, E., Louka, N. (2018). Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, Galanakis, 1. izd., C., M., ur., Woodhead Publishing, str. 265–293.
  33. Martins, A. N. A., Pasquali, M. A. de B., Schnorr, C. E., Martins, J. J. A., de Araujo, G. T., Rocha, A. P. T. (2019) Development and characterization of blends formulated with banana peel and banana pulp for the production of blends powders rich in antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology* **56**: 5289–5297.
  34. Mourtzinos, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D. P., Biliaderis, C. G., Moschakis, T. (2018) Natural food colorants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. *Electrophoresis* **39**(15): 1975-1983.
  35. Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D, Comisso, A., Scaccini, C. (2002) Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry* **79**(1): 119–124.

36. Nile, S. H., Nile, A. S., Keum, Y. S., Sharma, K. (2017) Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chemistry* **235**: 119-126.
37. Oboh, G., Oyeleye, S. I., Ogunsuyi, O. B., Adebayo, A. A. (2018). Phytochemicals and Hormonal Effects. *Reference Module in Food Science*, U: *Encyclopedia of Food Chemistry*, vol. 3., Melton, L., Shahidi, V., Varelis, P., ur., Elsevier, str. 550-560.
38. Ortiz, L., Dorta, E., Gloria Lobo, M., González-Mendoza, L. A., Díaz, C., González, M. (2016) Use of banana (*Musa acuminata* Colla AAA) peel extract as an antioxidant source in orange juices. *Plant Foods for Human Nutrition* **72**(1): 60-66.
39. Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C., Kartal, C. (2015). Food waste management, valorization and sustainability in the food industry. U: *Food Waste Recovery, Processing Technologies and Industrial Techniques*, 1. izd., Galanakis, C., M., ur., Academic Press, str. 3-23.
40. Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 270-278.
41. Pérez-Chabela, M. L., Hernández-Alcántara, A. M. (2018). Agroindustrial Coproducts as Sources of Novel Functional Ingredients. U: *Food Processing for Increased Quality and Consumption*, vol. 18., Grumezescu A., M., Holban, A., M., ur., Academic Press, str. 219-250.
42. Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczak, K., Bonikowski, R., Balawejder, M. (2020) Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *LWT-Food Science and Technology* **117**, 108614.
43. Rasouli, H., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties* **20**: S1700–S1741.
44. Ravindran, R., Jaiswal, A.K. (2016) Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology* **34**(1): 58-69.
45. Ren, F., Nian, Y., Perussello, C. A. (2019) Effect of storage, food processing and novel extraction technologies on onions flavonoid content: A review. *Food Research International* **132**: 108953.
46. Romm, A., Lee, L., Hobbs, C. (2010) Botanical Medicine for Women's Health, Churchill Livingstone, str. 370–397.
47. Sadh, P.K., Duhan, S. & Duhan, J.S. (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* **5**: 1.

48. Salak, F., Daneshvar, S., Abedi, J., Furukawa, K. (2013) Adding value to onion (*Allium cepa* L.) waste by subcritical water treatment. *Fuel Processing Technology* **112**: 86-92.
49. Santiago, B., Arias Calvo, A., Gullón, B., Feijoo, G., Teresa Moreira, M., González-García, S. (2019) Production of flavonol quercetin and fructooligosaccharides from onion (*Allium cepa* L.) waste: An environmental life cycle approach. *Chemical Engineering Journal* **392**: 123772.
50. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005) Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**(4): 287-306.
51. Schieber, A., Stintzing, F., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds —recent developments. *Trends in Food Science & Technology* **12**(11): 401-413.
52. Sharma, K., Mahato, N., Nile, S.H., Lee, Y. R. (2016) Economical and environment-friendly approaches for usage of onion (*Allium cepa* L.) wastes. *Food & Function* **8**: 3354-3369.
53. Shim, S. Y., Choi, Y. S., Kim, H.-Y., Kim, H.-W., Hwang, K.-E., Song, D.-H., Kim, C.-J. (2012) Antioxidative properties of onion peel extracts against lipid oxidation in raw ground pork. *Food Science and Biotechnology* **21**(2): 565-572.
54. Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Singh, D. P., Sarma, B. K., Singh, H. B. (2009). Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology* **47**(6): 1161-1167.
55. Socaci, S. A., Rugină, D.O., Diaconeasa, Z.M., Pop O. L., Fărcaș, A.C., Păucean, A., Tofană, M., Pinteș A. (2017). Antioxidant Compounds Recovered from Food Wastes, U: *Functional Food: Improve Health through Adequate Food*, Chávarri Hueda, M., ur., IntechOpen, str. 3-23.
56. Stalikas, C. D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**: 3268-3295.
57. Takahama, U., Hirota, S. (2000) Deglucosylation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant Cell Physiology* **41**: 1021-1029.
58. Tapre, A. R., Jain, R. K. (2012) Study of advanced maturity stages of banana. *International Journal of Advanced Engineering Research and Studies* **1**:272-274.



59. Vu, H. T., Scarlett, C. J., Vuong, Q. V. (2018) Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods* **40**: 238-248.
60. Yang, J., Guo, J., Yuan, J. (2008) In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT- Food Science and Technology* **41**(6): 1060-1066.
61. Yusuf, M. (2017). Agro-Industrial Waste Materials and their Recycled Value-Added Applications: Review. U: *Handbook of Ecomaterials*, Martínez L., Kharissova O., Kharisov B., ur., Springer, str. 1–11.
62. Zenkevich, I. G., Eshchenko , A. Y., Makarova, S. V., Vitenberg, A. G., Dobryakov, Y. G., Utsal, V. A. (2007) Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules* **12**: 654-672.
63. Zhao, Z., Moghadasian, M. H. (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* **109**(4): 691–702.

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.*

*Mihada Antolić*

ime i prezime studenta