

Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz cvijeta i lista gloga (*Crataegus monogyna*)

Vujanović, Tanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:631691>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Tanja Vujanović

6581/BT

**MIKROVALNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ
CVIJETA I LISTA GLOGA (*Crataegus monogyna*)**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Odabrana poglavlja zelene kemije

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Jukić

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

MIKROVALNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ CVIJETA I LISTA GLOGA (*Crataegus monogyna*)

Tanja Vujanović, 6581/BT

Sažetak: Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je ekološki prihvatljivija metoda izolacije polifenolnih spojeva iz prirodnih supstrata. Cilj istraživanja je bio odabir optimalnih ekstrakcijskih parametara (sastav otapala, temperatura, i vrijeme ekstrakcije) za izolaciju polifenola iz cvijeta i lista bijelog gloga (*Crataegus monogyna*). Koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva određena je Folin-Ciocalteu metodom. Na ekstrakcijski kapacitet izolacije svih polifenola značajno utječu polarnost ekstrakcijskog otapala pri kojem se provodi MAE. Rezultati su pokazali da je binarni sustav otapala 50%-tne vodene otopine etanola učinkovitiji od 30%-tne vodene otopine etanola u ekstrakciji polifenola. Optimalni uvjeti pri kojima su dobivene najveće koncentracije polifenolnih spojeva primjenom MAE su: snaga mikrovalova 300 W, temperatura 65 °C i vrijeme trajanja ekstrakcije 9 min.

Ključne riječi: polifenoli, glog, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 21 stranica, 6 slika, 3 tablice, 11 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:

Knjižnica Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr .sc. Marijana Jukić

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

MICROWAVE EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM HAWTHORN FLOWER AND LEAF (*Crataegus monogyna*)

Tanja Vujanović, 6581/BT

Abstract: Microwave assisted extraction (MAE) is ecologically more acceptable method of isolation of polyphenolic compounds from natural substrates. The objective was to select optimal extraction parameters (solvent composition, temperature and extraction time) for the isolation of polyphenols from Hawthorn (*Crataegus monogyna*) flowers and leaves. The concentrations of total polyphenols were determined by the Folin-Ciocalteu method. The extraction isolation capacity of total polyphenols was significantly influenced by polarity of extraction solvent used for MAE. Results showed that the binary solvent system with 50% aqueous ethanol solution is more efficient than that of 30% aqueous ethanol solution. The optimum conditions which resulted with the highest concentration of polyphenolic compounds using MAE were: microwave power 300 W, temperature 65° C and the duration of the extraction of 9 min.

Keywords: polyphenols, hawthorn, microwave extraction

Thesis contains: 20 pages, 6 figures, 3 tables, 11 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:

Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Marijana, Jukić, Ph.D.*

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Rod <i>Crataegus</i> – glogovi..... | 2 |
| 2.2. Polifenoli..... | 4 |
| 2.2.1. Definicija i klasifikacija polifenola | 4 |
| 2.2.2. Prisutnost u prirodi | 5 |
| 2.2.3. Utjecaj polifenola na zdravlje | 5 |
| 2.2.4. Polifenoli u glogu..... | 6 |
| 2.3. Mikrovalovi..... | 7 |
| 2.3.1. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja | 7 |
| 2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)..... | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 10 |
| 3.1. Materijal..... | 10 |
| 3.2. Metode rada | 11 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 15 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 19 |
| LITERATURA | 20 |

1. UVOD

Zanimanje farmaceutske i prehrambene industrije za aktivnim supstancijama iz biljaka u svrhu prevencije i liječenja raznih bolesti koje utječu na ljudsko zdravlje, ili kao prirodnog izvora dodataka prehrani je u porastu. Među važne biološki aktivne spojeve koji se proučavaju pripadaju i sekundarni biljni metaboliti, velika grupa polifenolnih spojeva. Pokazalo se da njihova uloga nije samo u zaštiti biljke od mikroorganizama i napada insekata, već sudjeluju i u obrambenim procesima kod oksidativnog stresa u ljudskim i životinjskim stanicama. Jedan od mogućih izvora polifenola je i list i cvijet bijelog gloga (*Crataegus monogyna*) radi niza ljekovitih djelovanja koja su potvrđena u pučkoj medicini, stoga je uporabljen kao sirovina za ovo istraživanje.

Izdvajanje polifenola iz lista i cvijeta vrši se procesom ekstrakcije. Kako je proces tradicionalne ekstrakcije ekonomski i ekološki neprihvatljiv zbog dugog vremena provođenja ekstrakcije i korištenja velikih količina otapala pokušavaju se koristiti nekonvencionalne metode ekstrakcije među kojima je i ekstrakcija aktivirana mikrovalovima. Proces ekstrakcije potpomognut mikrovalovima, kao „zeleni“ proces, pokazao je niz prednosti u odnosu na tradicionalnu ekstrakciju poput znatno skraćenog trajanja procesa, uštede energije i količine otapala, mogućnosti istovremene obrade više uzoraka, primjene povišenog tlaka radi postizanja temperatura viših od vrelišta otapala. Na taj način je postao dio procesa zelene kemije koji uključuju smanjenje ili čak uklanjanje opasnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih proizvoda uz ekonomičnost i ekološku prihvatljivost.

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati utjecaj ekstrakcijskog otapala (30% i 50%-tna vodena otopina etanola), temperature i vremena ekstrakcije na izolaciju polifenola iz cvijeta i lista bijelog gloga primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Istraživanjem je obuhvaćeno određivanje ukupnih polifenola spektrofotometrijski Folin – Ciocalteu metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Rod *Crataegus* – glogovi.

Rod *Crataegus* je vrlo bogat vrstama koje rastu u Sjevernoj Americi, i nešto manje u Europi i Aziji. Obuhvaćaju listopadne trnovite grmove ili niže drveće. U Hrvatskoj je nekoliko vrsta rašireno u šumama, šikarama i živicama. Kao samonikle ili uzgojene biljke najpoznatije su vrste: bijeli glog (*C. monogyna*), crveni ili obični glog (*C. oxyacantha*), obični crni glog (*C. pentagyna*), panonski crni glog (*C. nigra*) i dr.



Slika 1 – Različite boje plodova gloga (*C. monogyna*)

Ljekoviti dijelovi biljke su kora, listovi (slika 2), cvjetovi (slika 3) i plodovi (slika 1), te se u Europi i svijetu upotrebljavaju za različite pripravke u pučkoj medicini, ali i u farmaceutskoj industriji. Ti se pripravci koriste za liječenje pacijenata s crijevnim tegobama, za liječenje arterioskleroze (suženja krvnih žila zbog nakupljanja naslaga na stjenkama, a posebno kod nakupljanja kalcija), normaliziranje tlaka (posebno visokog krvnog tlaka), za liječenje srčanih bolesti (poput upale srčanog mišića, loše cirkulacije krvi zbog oslabljenog srca, prokrvljenost samog srčanog mišića) i za umirenje (razdražljivost, napetost, nesаница). (Hrvatska Enciklopedija (2002), Encyclopaedia Britannica Online (2015))



Slika 2. List bijelog gloga (*C. monogyna*). Preuzeto s www.naturala.hr

Mehanizam djelovanja ekstrakta gloga još nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da ovi antioksidansi smanjuju oksidativni stres uzrokovan slobodnim radikalima.

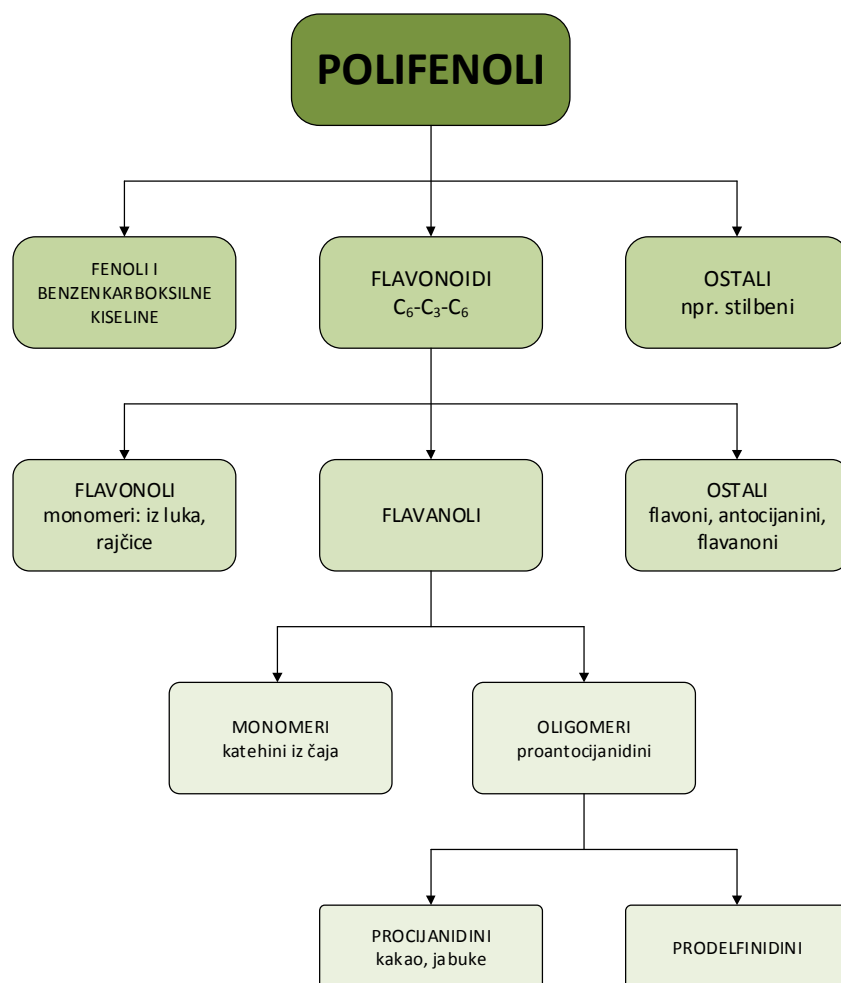


Slika 3. Cvijet bijelog gloga (*C. monogyna*). Preuzeto s www.naturala.hr

2.2. Polifenoli

2.2.1. Definicija i klasifikacija polifenola

Izraz polifenoli se odnosi na veliku skupinu kemijskih spojeva (molekula) koji se mogu podijeliti na mnogo različitih načina. Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova. Ti spojevi obuhvaćaju jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, ali i velike polimerizirane spojeve kao što su kondenzirani tanini. Najčešće se spominju kao spojevi s fenolnim prstenom, ali su zapravo veoma raznolika skupina spojeva, zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini klasifikacije, kao npr.: prema strukturi, prema broju C atoma u molekuli, prema biološkoj aktivnosti, po biosintetskom putu i slično (Manach i sur., 2004). Slika 4 prikazuje jedan primjer podjele polifenola. Prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide. (Berend i sur., 2013)



Slika 4. Primjer podjele polifenola

2.2.2. Prisutnost u prirodi

Polifenoli se u prirodi mogu pronaći najviše u biljkama i puno rjeđe u nekim životinjama (prvenstveno u ljušturama nekih vrsta člankonožaca – insekti i rakovi).

Polifenoli su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla, a spadaju u skupinu sekundarnih biljnih metabolita. U biljci sudjeluju u raznim biokemijskim procesima tijekom zrenja i dozrijevanja, a osim toga imaju i različite uloge. Primjerice polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjelovati u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štiti ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djelovati kao fotoreceptori ili kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlačiti oprašivače, pridonositi pigmentaciji biljaka. U namirnicama napravljenih od tih istih biljaka mogu pridonositi gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. (Berend i sur., 2013) (Pandey i sur. 2009)

Na sastav i količinu polifenolnih spojeva u biljkama utječu okolišni uvjeti kao što su količina dostupne svjetlosti, temperatura, količina vode, sastav tla, uvjeti dozrijevanja, a potom i uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Svedstrom i sur. 2006). Kod uzgojenih biljaka, postavljanjem biljke u stresne uvjete poput manjka vode ili manjka sunčeve svjetlosti, moguće je postići povećanje udjela polifenola, a isto tako povećanje udjela polifenola je moguće postići primjerice i izmjenom sastava tla. (Kirakosyan i sur., 2003)

U biljkama nastaju na raznim mjestima, primjerice u lišću, stabljici, cvjetovima, ili korijenu, no ujedno je važno napomenuti da mjesto njihove sinteze u biljci nije ujedno i mjesto njihova nakupljanja, pa tako neke biljke koje proizvode polifenole u svom korijenu kasnije te iste polifenole pohranjuju u cvjetovima. (Šamec, 2013)

Osim svega navedenog, sastav i razina polifenola u nekoj biljci ovisi i o porodici kojoj biljka pripada, iako utjecaj genetičke varijabilnosti na sintezu još nije u potpunosti razjašnjen. (Šamec, 2013)

2.2.3. Utjecaj polifenola na zdravlje

Literaturni podaci upućuju na to da važnu ulogu u prevenciji humanih bolesti, uz vitamine i minerale, imaju i polifenolni antioksidansi iz voća i povrća. Dokazana su protuupalna, protualergijska i protukancerogena djelovanja nekih polifenolnih spojeva, kao i namirnica

koje ih sadržavaju (npr. crno vino i zeleni čaj). Spojevi iz skupine flavonoida pokazali su se kao najjači antioksidansi. Do sada je otkriveno da barem osamnaest flavonoida ima veću antioksidativnu učinkovitost od vitamina C i E. Antioksidativna aktivnost polifenola očituje se u njihovoj sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i u inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres odnosno indukciji “antioksidativnih” enzima. (Berend i sur., 2013)

Rizik od kroničnih oboljenja i konzumacije namirnica bogatih polifenolima su obrnuto proporcionalni.

2.2.4. Polifenoli u glogu

Istraživanjima je potvrđeno da ekstrakti dobiveni iz gloga sadrže velike količine polifenola. To su većinom polifenoli iz grupe flavona i flavonoida, procijanidini i epikatehin. Sadržaj polifenola se u različitim vrstama gloga razlikuje po udjelima pojedine vrste polifenola, a osim toga postoje i kvalitativne i kvantitativne razlike u sadržaju u cvijetu, listu i plodovima iste biljke. (Tahirović i sur., 2014). U plodovima gloga ima procijanidina, dok list i plod gloga sadržavaju najviše flavonoida hiperozida, zatim rutina, viteksina, fenolne kiseline, te oligomernih proantocijanidina. (Kirakosyan i sur., 2003)

2.3. Mikrovalovi

Mikrovalovi su sveprisutni u današnjim komunikacijskim sustavima - u zračnim lukama za navigacijske sustave, policija za radarsko mjerenje brzine, za mobilno telefoniranje, koriste ga satelitski komunikacijski sustavi, bežične računalne mreže, sustavi za mjerenje onečišćenja zraka, kućni alarmni sustavi, automatski otvarač garažnih i automobilskih vrata.

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je gibanje energije i nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Elektromagnetski valovi su titraji međusobno povezanog električnog i magnetskog polja, koji se šire prostorom. Protok struje kroz žicu rezultira stvaranjem dva polja, električnog i magnetskog, koja okružuju vodič, a promjena smjera gibanja struje (elektrona) uzrokuje pulsiranje oba polja i stvaranje elektromagnetnih valova koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala (Veggi i sur., 2013)

2.3.1. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja

Mikrovalovi su oblik elektromagnetskog zračenja raspona valnih duljina od 1mm do 300mm, a frekvencija od 300GHz do 1GHz (Hrvatska enciklopedija IV, 2002). Mikrovalovi se ne ubrajaju u ionizirajuće zračenje, jer njihova energija nije dovoljna za ionizaciju atoma. Prodiru u dielektrične materijale, u koje pripadaju i ljudska, životinjska i biljna tkiva. Pod utjecajem mikrovalova molekule u tkivu titraju, a tkivo se zagrijava. U hrani, mikrovalovi utječu na molekule vode, masti, šećera, te nekih drugih molekula.

Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja djeluje na dva simultana načina. Prvi je rotacija dipola uslijed djelovanja elektromagnetskog zračenja, a drugi je ionska vodljivost, tj. zamjena iona između rastvorene tvari i otapala. (Favretto, 2004)

Rotacija dipola, tj. dipolnih molekula se dešava pod utjecajem elektromagnetskog zračenja, u ovom slučaju mikrovalova. Mikrovalovi svojim promjenjivim magnetskim svojstvima uzrokuju dipolno poravnanje, tj. zakretanje, a uslijed čega, zbog međusobnog trenja između molekula, dolazi do pretvaranja elektromagnetske energije u toplinsku. Ionska provodljivost je elektroforetska migracija iona pod djelovanjem elektromagnetskog polja, a otpor otopine tom toku iona uzrokuje trenje koje zagrijava otopinu. (Veggi i sur., 2013)

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Mikrovalovima olakšana ekstrakcija (Microwave-assisted extraction, MAE) je metoda koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s čvrstom tvari s ciljem izdvajanja komponenti uzorka u otapalo. Energija mikrovalova zagrije polarno otapalo u kontaktu s čvrstim uzorkom i na taj način smanjuje vrijeme ekstrakcije i količinu potrebnog otapala. (Veggi i sur., 2013)

Metoda se često upotrebljava za analizu izuzetno malih količina organskih spojeva u čvrstim materijalima, tj. za ekstrakciju prirodnih spojeva poput polifenola iz biljnih materijala. Pomoću MAE je moguće dobiti udjele ekstrahiranih tvari slične onima dobivenim tradicionalnim, standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme, što je zbog uštede na energiji (nema dodatnog zagrijavanja) ekonomski isplativo. MAE može i negativno djelovati na ekstrahirane tvari (bioaktivne spojeve uključujući polifenole) ako se temperatura otopine previše i/ili preneglo povisi. U tom slučaju može doći do razgradnje polifenola ili do njihovog onečišćenja drugim, neželjenim komponentama biljnog materijala. Mikrovalna ekstrakcija je alternativa tradicionalnoj kruto - tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju sekundarnih metabolita iz biljaka. (Veggi i sur., 2013)

Parametri ekstrakcije ovise o tipu i osobinama otapala te tvari koja se podvrgava ekstrakciji. Zagrijavanje otopine ovisi o sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Migracija otopljenih iona povećava prodiranje otapala u matriks čvrste tvari i tako potiče otapanje tvari koju želimo izolirati. (Favretto, 2004)

Za MAE su se u prvim danima primjene koristile obične mikrovalne pećnice, pećnice koje su se koristile i u kućanstvima. S vremenom se upotreba mikrovalova širila i obuhvatila je i lako hlapiva i zapaljiva otapala što je potaknulo razvoj komercijalnih sustava za mikrovalovima olakšanu ekstrakciju.

Dva su dostupna sustava. Prvi, za ekstrakciju pri kontroliranom tlaku i temperaturi koristi zatvorene posude (za niske ili visoke temperature ekstrakcije), a drugi mikrovalne ekstraktore pri atmosferskom tlaku. Tlak u ekstrakcijskim posudama ovisi o vrsti, količini i vrelištu otapala. (Favretto, 2004)

Na učinkovitost MAE utječe snaga mikrovalova, temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije i izbor otapala.

Što je snaga ekstraktora veća, veća je i dostavljena elektromagnetska energija, a snaga je povezana s vremenom trajanja ekstrakcije (niža snaga/duže vrijeme i obratno, viša snaga/kraće vrijeme ekstrakcije). Zbog tog razloga se biljni materijal ili dulje zrači mikrovalovima uz nisku do umjerenu snagu ili kratko vrijeme ako je snaga visoka. U slučaju kad je upotrijebljena snaga veća, postoji mogućnost pucanja biljnog materijala pa se željena tvar onečisti drugim komponentama. (Veggi i sur., 2013)

Viša temperatura poboljšava difuziju otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanje željenih komponenata. Tako se postiže bolji ekstrakcijski učinak, ali svaka tvar ima svoj gornju temperaturnu granicu. Ako se ta granica prekorači, dolazi do razgradnje. (Veggi i sur., 2013)

Odabir otapala ovisi o:

1. topljivosti tvari od interesa
2. selektivnosti otapala prema toj tvari (ali ne i za ostale komponente)
3. sposobnosti otapala da prodre u i da stupi u interakciju sa matriksom čvrste tvari
4. dielektričnoj konstanti otapala
5. mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova

Najčešće se koriste otapala za klasičnu ekstrakciju (npr. etanol, metanol, voda,...)

Duža ekstrakcija znači i veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje. Zato je bitno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije. Na trajanje ekstrahiranja, isto kao i na druge parametre, utječu osobine biljnog materijala, tvari koja se ekstrahira i otapala. (Favretto, 2004)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

Uzorci:

- Biljni materijal su osušeni i zdrobljeni listovi, cvjetovi i pupovi bijelog gloga.

Reagensi:

- Folin–Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina Na_2CO_3 (20%-tna otopina)
- Standard galne kiseline

Uređaji i pribor:

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

3.2. Metode rada

Priprema etanola odgovarajuće polarnosti:

U odmjerenu tikvicu od 1000mL za pripravu 30%-tnog etanola odmjereno je 312,5mL, a za istu količinu 50%-tnog etanola odmjereno je 520,83mL 96%-tnog etanola. Tikvice su nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

Postupak

Pripremljeno je 40 uzoraka bijelog gloga ($0,5 \text{ g} \pm 0,05$) u 25 mL etanola odgovarajuće polarnosti. Prije same ekstrakcije na ekstraktoru je potrebno postaviti opće parametre ekstrakcije:

- temperaturu ekstrakcije
- vrijeme postizanja temperature
- miješanje na 80%
- vrijeme. hlađenja (3 minute)

Ekstrakti su filtrirani i stavljeni u odmjerne tikvice. Odmjerne tikvice sa ekstraktima nadopunjene su etanolom odgovarajuće polarnosti do ukupno 25mL. Ekstrakti se čuvaju u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ do trenutka njihove upotrebe u postupku određivanja ukupnih polifenola.

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Fenolni spojevi mogu se analizirati spektrofotometrijskim i kromatografskim metodama. Spektrofotometrijske su jednostavnije i praktičnije. Spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih polifenola se temelji na njihovoj kolornoj reakciji s Folin – Ciocalteu reagensom i mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri svjetlosti valne duljine 765nm

Folin – Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline. Pri oksidaciji polifenola u blago alkalnim uvjetima te kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plave boje.

Nastajanje relativno stabilnog plavog kompleksa (redukcija kiseline) je intenzivnije što je više hidroksilnih skupina (oksidirajuće skupine) u polifenolnim spojevima.

Priprema zasićene otopine Na₂CO₃

U 800 mL vruće destilirane vode otopljeno je 200g anhidrida Na₂CO₃ i ohlađeno na sobnu temperaturu. Nakon toga dodano je nekoliko kristalića Na₂CO₃ i nadopunjeno u odmjernoj tikvici do 1000 mL, te ostavljeno da odstoji 24 sata, nakon čega je dobivena otopina profiltrirana.

Priprema standarda galne kiseline

Odvaganih 500 mg galne kiseline kvantitativno je preneseno pomoću 10mL 96%-tnog etanola u odmjernu tikvicu od 100mL, otopljeno, pa nadopunjeno destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se redom: 250 µL uzorka, 15 mL destilirane vode, 1,25 mL FC reagensa (FC reagens miješa se s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije mjerenja), nakon 3 minute 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se uzorci nadopune odgovarajućim otapalom do oznake. Tako pripremljeni uzorci stavljaju se u vodenu kupelj na termostatiranje pri 50°C, 30 minuta. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta stavi 250 µL otapala. Nakon termostatiranja, uzorci se ohlade pod vodom, te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca

Od otopine galne kiseline su napravljena razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100mL pipetiranjem 1, 2, 3, 5 i 10mL alikvota u svaku tikvicu i nadopunom do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama su iznosile 50, 100, 150, 250 i 500mg/L. Iz svake od njih je pomoću pipete prebačeno po 100µL u pet staklenih epruveta, pa u svaku redom dodano:

- 200µL Folin – Ciocalteu reagensa
- 2mL destilirane vode
- 1mL otopine Na₂CO₃

Otopina se zagrijava 25 min pri temperaturi 50°C , zatim hladi i mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Baždarni pravac se nacrtava pomoću računala pri čemu se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu vrijednosti apsorbancija mjerene pri 765 nm.

Tablica 1. Apsorbancija razrjeđenja galne kiseline za baždarni dijagram.

| c (mg / L) | A (765 nm) |
|------------|------------|
| 50 | 0,204 |
| 100 | 0,366 |
| 150 | 0,541 |
| 250 | 0,868 |
| 500 | 1,632 |

Koncentracija ukupnih polifenola izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Excel. Slika 5 prikazuje baždarni pravac, gdje je:

Jednadžba pravca: $Y = 0,0032X + 0,0564$ $R^2 = 0,99$

Y – apsorbancija pri 765nm

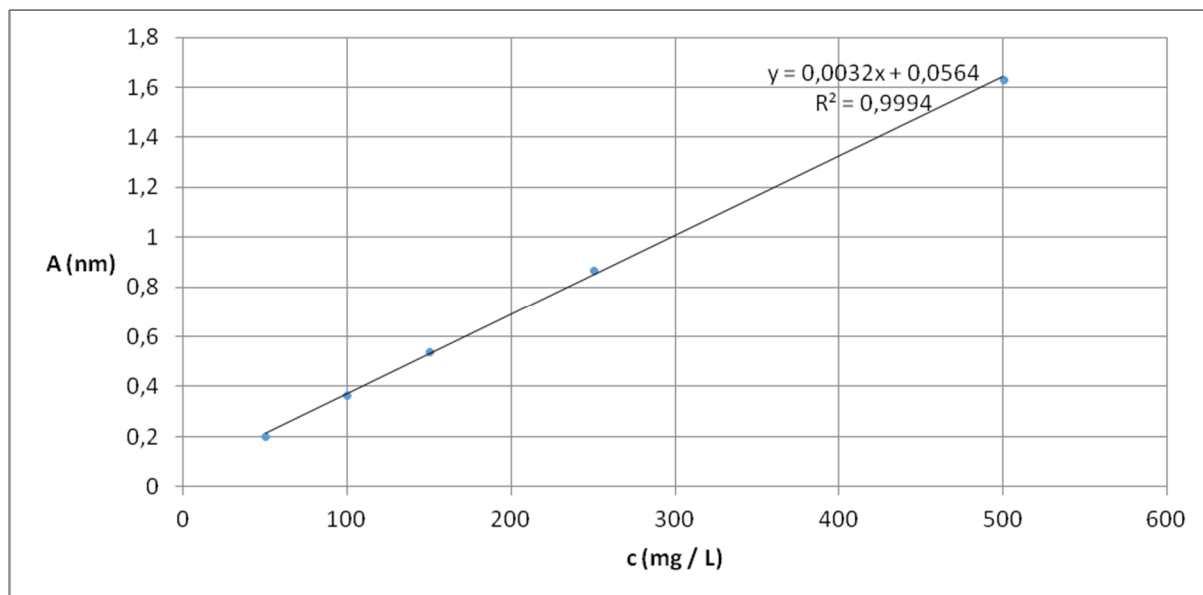
X – koncentracija galne kiseline (GAE; mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Račun:

$Y = 0,554 \text{ nm}$

$$X = \frac{0,554 - 0,0564}{0,0032} = 155,5 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$



Slika 5. Baždarni pravac galne kiseline

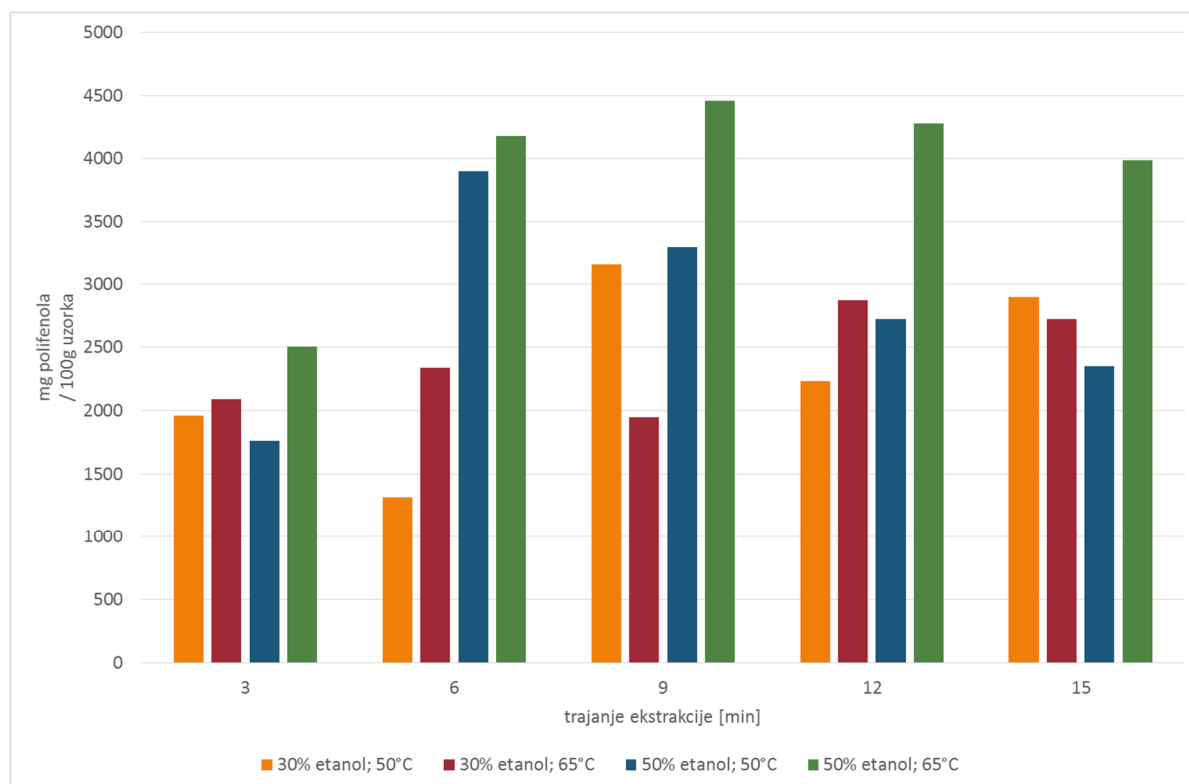
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja apsorbancije ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima ekstrakta dobivenih primjenom MAE (50°C i 65°C) sa 30% i 50% etanolom u vremenu od 3 do 15 min.

| | Vrijeme (min) | Masa uzorka (g) | Apsorbancija (nm) |
|----------------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| EtOH (30%) temperatura (50°C) | 3 | 0,5007 | 0,246 |
| | 3 | 0,5026 | 0,37 |
| | 6 | 0,5023 | 0,227 |
| | 6 | 0,5035 | 0,225 |
| | 9 | 0,5032 | 0,499 |
| | 9 | 0,5061 | 0,431 |
| | 12 | 0,5076 | 0,42 |
| | 12 | 0,5001 | 0,27 |
| | 15 | 0,5027 | 0,305 |
| EtOH (50%) temperatura (50°C) | 15 | 0,5032 | 0,554 |
| | 3 | 0,5041 | 0,378 |
| | 3 | 0,5005 | 0,189 |
| | 6 | 0,5054 | 0,601 |
| | 6 | 0,507 | 0,523 |
| | 9 | 0,5003 | 0,449 |
| | 9 | 0,5079 | 0,516 |
| | 12 | 0,5026 | 0,511 |
| | 12 | 0,5033 | 0,303 |
| EtOH (30%) temperatura (65°C) | 15 | 0,5027 | 0,361 |
| | 15 | 0,5055 | 0,358 |
| | 3 | 0,5075 | 0,382 |
| | 3 | 0,5031 | 0,272 |
| | 6 | 0,5094 | 0,379 |
| | 6 | 0,5089 | 0,343 |
| | 9 | 0,509 | 0,253 |
| | 9 | 0,5021 | 0,364 |
| | 12 | 0,5066 | 0,492 |
| EtOH (50%) temperatura (65°C) | 12 | 0,5076 | 0,366 |
| | 15 | 0,5 | 0,461 |
| | 15 | 0,5004 | 0,349 |
| | 3 | 0,5031 | 0,294 |
| | 3 | 0,5033 | 0,465 |
| | 6 | 0,5078 | 0,458 |
| | 6 | 0,5017 | 0,734 |
| | 9 | 0,502 | 0,809 |
| | 9 | 0,5054 | 0,453 |
| 12 | 0,5049 | 0,484 | |
| 12 | 0,5024 | 0,732 | |
| 15 | 0,5068 | 0,447 | |
| 15 | 0,5067 | 0,7 | |

Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ispitivanim ekstraktima (mg GAE/100 g) dobivenih primjenom MAE (50°C i 65°C) sa 30% i 50% etanolom u vremenu od 3 do 15 min.

| | Vrijeme (min) | Baždarna krivulja (mg/L) | Koncentracija (mg/L) * razrjeđenje | Koncentracija (mg/g) | Koncentracija (mg GAE/100g) |
|----------------------------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| EtOH (30%) temperatura (50°C) | 3 | 59,250 | 296,250 | 14,792 | 1479,179 |
| | 3 | 98,000 | 490,000 | 24,373 | 2437,326 |
| | 6 | 53,313 | 266,563 | 13,267 | 1326,710 |
| | 6 | 52,688 | 263,438 | 13,080 | 1308,031 |
| | 9 | 138,313 | 691,563 | 34,358 | 3435,823 |
| | 9 | 117,063 | 585,313 | 28,913 | 2891,289 |
| | 12 | 113,625 | 568,125 | 27,981 | 2798,094 |
| | 12 | 66,750 | 333,750 | 16,684 | 1668,416 |
| | 15 | 77,688 | 388,438 | 19,318 | 1931,756 |
| EtOH (50%) temperatura (50°C) | 3 | 100,500 | 502,500 | 24,921 | 2492,065 |
| | 3 | 41,438 | 207,188 | 10,349 | 1034,903 |
| | 6 | 170,188 | 850,938 | 42,092 | 4209,228 |
| | 6 | 145,813 | 729,063 | 35,950 | 3594,983 |
| | 9 | 122,688 | 613,438 | 30,653 | 3065,348 |
| | 9 | 143,625 | 718,125 | 35,348 | 3534,776 |
| | 12 | 142,063 | 710,313 | 35,332 | 3533,190 |
| | 12 | 77,063 | 385,313 | 19,139 | 1913,931 |
| | 15 | 95,188 | 475,938 | 23,669 | 2366,906 |
| EtOH (30%) temperatura (65°C) | 3 | 101,750 | 508,750 | 25,062 | 2506,158 |
| | 3 | 67,375 | 336,875 | 16,740 | 1673,996 |
| | 6 | 100,813 | 504,063 | 24,738 | 2473,805 |
| | 6 | 89,563 | 447,813 | 21,999 | 2199,904 |
| | 9 | 61,438 | 307,188 | 15,088 | 1508,779 |
| | 9 | 96,125 | 480,625 | 23,931 | 2393,074 |
| | 12 | 136,125 | 680,625 | 33,588 | 3358,789 |
| | 12 | 96,750 | 483,750 | 23,825 | 2382,535 |
| | 15 | 126,438 | 632,188 | 31,609 | 3160,938 |
| EtOH (50%) temperatura (65°C) | 3 | 74,250 | 371,250 | 18,448 | 1844,812 |
| | 3 | 127,688 | 638,438 | 31,713 | 3171,257 |
| | 6 | 125,500 | 627,500 | 30,893 | 3089,307 |
| | 6 | 211,750 | 1058,750 | 52,758 | 5275,812 |
| | 9 | 235,188 | 1175,938 | 58,563 | 5856,262 |
| | 9 | 123,938 | 619,688 | 30,653 | 3065,332 |
| | 12 | 133,625 | 668,125 | 33,082 | 3308,205 |
| | 12 | 211,125 | 1055,625 | 52,529 | 5252,911 |
| | 15 | 122,063 | 610,313 | 30,106 | 3010,618 |
| 15 | 201,125 | 1005,625 | 49,616 | 4961,639 | |



Slika 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ispitivanim ekstraktima (mg GAE/100 g) dobivenih primjenom MAE (50°C i 65°C) sa 30% i 50% etanolom u vremenu od 3 do 15 min.

Na osnovi rezultata dobivenih spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lišća i cvijeta bijelog gloga (*Crataegus monogyna*) mg GAE/100g dobivenim primjenom MAE (tablica 2, tablica 3 i slika 6) vidljivo je:

- u 30 %-tnom etanolu pri temperaturi od 50 °C, u vremenu trajanja 15min ekstrahirano je polifenola u koncentraciji od 3862,778 mg/100 g gloga
- u 30 %-tnom etanolu pri temperaturi od 65 °C, u vremenu trajanja 12 min ekstrahirano je polifenola u koncentraciji od 3358,789 mg/100 g gloga

- u 50 %-tnom etanolu pri temperaturi od 50 °C, u vremenu trajanja 6 min ekstrahirano je polifenola u koncentraciji od 4209,228 mg/100 g gloga
- u 50 %-tnom etanolu pri temperaturi od 65 °C, u vremenu trajanja 9 min ekstrahirano je najviše polifenola koncentracije 5856,262 mg/100 g gloga

- usporedba 30%-tne i 50%-tne vodene otopine etanola pri temperaturi 50 °C:
 - rezultati su pokazali da se u 50%-tnoj otopini ekstrahiralo najviše polifenola koncentracije 4209,228 mg/100 g gloga, a u 30%-tnoj otopini najviša koncentracija polifenola iznosi 3862,983 mg/100 g gloga

- usporedba 30%-tne i 50%-tne vodene otopine etanola pri temperaturi 65 °C:
 - rezultati su pokazali da se u 50%-tnoj otopini ekstrahiralo najviše polifenola koncentracije 5856.262 mg/100 g gloga, a u 30%-tnoj otopini najviša koncentracija polifenola iznosi 3358,789 mg/100 g gloga

Temperatura je malo utjecala na koncentraciju ukupnih polifenola u ekstraktima lišća i cvijeta gloga. Iz grafa se vidi da se najviša koncentracija polifenolnih spojeva postigla na 65 °C, a vrlo slične koncentracije ukupnih polifenola na temperaturi od 50 °C znače da promjena temperature nije značajno utjecala na ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenolnih spojeva. Povišenjem temperature ekstrakcije koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktima je rasla, ali vrlo malo. Koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenim pri 65 °C iznosile su od 1508,779 do 5856,262 mg GAE/100 g.

Osim polarnosti otapala, istraživana je utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenolnih spojeva iz lišća i cvijeta gloga primjenom MAE. Primjenom oba ekstrakcijska otapala već nakon 3 minute ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenolnih spojeva bio je visok. Daljnjim produženjem vremena ekstrakcije (6, 9, 12, 15 min) nije došlo do značajnijeg povećanja ekstrakcijskog kapaciteta, već je u nekim ekstraktima produženjem trajanja ekstrakcije došlo do smanjenja koncentracije polifenolnih spojeva

5. ZAKLJUČAK

1. Na ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih polifenola primjenom MAE statistički najveći utjecaj ima odabir ekstrakcijskog otapala, pa potom temperatura, a značajno utječe i polarnost ekstrakcijskog otapala pri kojem se provodi MAE.
2. Binarni sustavi otapala s većim udjelom etanola u ekstrakcijskom otapalu pokazali su se efikasnijim za izolaciju polifenolnih spojeva iz lišća i cvijeta gloga.
3. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenolnih spojeva ostvaren je pri sljedećim uvjetima: 65 °C i 9 min.

LITERATURA

1. Hrvatska enciklopedija IV. svezak Fr- Ht (2002) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb
2. Encyclopaedia Britannica Online – hawthorn (2015),
<<http://www.britannica.com/plant/hawthorn>>. Pristupljeno 23. kolovoza 2015.
3. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.
4. Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **59**, 205-212
5. Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2:5**, 270-278
6. Svedstrom, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Laakso, I., Hiltunen, R. (2006) Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* **1112**, 103-111
7. Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P.B., Warber, S., Bolling, S., Chang, S.C. (2003) Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3973-3976
8. Šamec, D. (2013) Doktorski rad – Fitokemijska i genetska istraživanja endemičnih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltingia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku – Institut Ruđer Bošković – Sveučilište u Dubrovniku – Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij *Molekularne bioznanosti*
9. Tahirović, A., Bašić, N. (2014) Sadržaj fenola i antioksidacijska aktivnost ekstrakata plodova *Crataegus monogyna* L. *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo* **2**, 29-40.

10. Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds Theory and Practice (Chemat, F., Cravotto G., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 15-52.
11. Favretto, L. (2004) Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications, Milestone, Bergamo