

# Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva iz ploda trnine

---

Vulić, Tamara

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:295896>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Nutricionizam**

**Tamara Vulić**

6624/N

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA FENOLNIH SPOJEVA  
IZ PLODA TRNINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Organska kemija**

**Mentor: Doc. dr. sc. Jasmina Lapić**

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ PLODA TRNINE

*Tamara Vulić, 0058202217*

**Sažetak:** Trnina (*Prunus spinosa L.*) pripada rodu *Prunus*, podporodici *Prunoideae*, porodici *Rosaceae*. Plod trnine sadrži značajan udio bioaktivnih spojeva među kojima značajno mjesto zauzimaju fenoli. Stoga je cilj ovog završnog rada bio iz uzoraka ploda trnine izolirati bioaktivne komponente klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat te ekstrakcijom po Soxhletu uz 50%-tni etanol otapalo. Dominantne komponente karakterizirane su pomoću FTIR–spektroskopije, pri čemu je dokazana prisutnost fenolnih spojeva. Određena masena koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom klasičnom ekstrakcijom iznosi 29,16 mg GAE/100 g trnina, a za ekstrakt dobiven ekstrakcijom po Soxhletu 7,12 mg GAE/100 g trnina.

**Ključne riječi:** trnina, bioaktivne komponente, ekstrakcija, ukupni fenoli

**Rad sadrži:** 27 stranica, 11 slika, 4 tablica, 27 literaturnih navoda, 0 priloga

**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. *Jasmina Lapić*

**Datum obrane:** rujan 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Nutrition science**

**Department of of chemistry and biochemistry**  
**Laboratory for organic chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Nutrition**

### **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLACKTHORN FRUIT**

***Tamara Vulić, 0058202217***

**Abstract:** Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) is a species of *Prunus*, genus of *Prunoideae*, family of *Rosaceae*. Fruit of blackthorn contain a significant proportion of bioactive compounds, among them significant place have phenols. The purpose of this study was isolation of bioactive components from fruit samples of blackthorn classical extraction and extracted using extraction by Soxhlet with 50% ethanol. Main components were identified FTIR-spectroscopy and the presence of the phenolic compounds was shown. Certain mass concentration of total phenolics in the extracts obtained by classical extraction is 29.16 mg GAE / 100 g of blackthorn, and the extract obtained by extraction by Soxhlet 7.12 mg GAE / 100 g of blackthorn.

**Keywords:** *blackthorn, bioactive components, isolation, total phenolics*

**Thesis contains:** 27 pages, 11 figures, 4 tables, 27 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Jasmina Lapić, Assistant Professor*

**Thesis defended:** September, 2017

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Trnina.....	2
2.1.1. Rasprostranjenost.....	3
2.1.2. Kemijski sastav.....	3
2.1.3. Uporaba i ljekovita svojstva.....	4
2.2. Bioaktivne komponente hrane.....	5
2.2.1. Fenoli.....	5
2.2.1.1. Fenolne kiseline.....	6
2.2.1.2. Flavonoidi.....	6
2.2.1.3. Antocijanidini.....	8
2.3. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva.....	9
2.3.1. Klasična ekstrakcija otapalima.....	10
2.3.1.1. Soxhlet ekstrakcija.....	10
2.3.2. Infracrvena spektroskopija.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponentata.....	14
3.2.1.1. Metoda A: Ekstrakcija po Soxhletu iz praha sušenog ploda trnine uz etanol kao otapalo.....	14
3.2.1.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija iz praha sušenog ploda trnine grijanjem povrat uz etanol kao otapalo.....	15
3.2.2. Tankoslojna kromatografija.....	16
3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1. Uvod.....	20
4.2. Izolacija fenolnih spojeva.....	20
4.2.1. METODA A: Ekstrakcija po Soxhletu iz praha sušenog ploda trnine uz etanol kao otapalo.....	21
4.2.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija iz praha sušenog ploda trnine grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo.....	21
4.3. Određivanje ukupnih fenola.....	22
4.4. IR- spektroskopija.....	22
4.4.1. IR-spektar uzoraka TV1E i TV2E.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	25
6. LITERATURA.....	26

## 1. UVOD

Ovaj završni rad sastavni je dio istraživanja na području bioaktivnih komponenata u biljnim ekstraktima, koja se provode u okviru HRZZ projekta: Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF), koji se izvode i u Laboratoriju za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Svakodnevnim korištenjem bilja u prehrani, čovjek postupno uočava njihov ljekoviti učinak. Zbog takvih empirijskih spoznaja, koje su s vremenom i znanstveno potvrđene, biljke imaju vrlo široku primjenu u svim aspektima ljudskog života. Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samo jedna od tisuću različitih vrsta samoniklog bilja koje su široko rasprostranjene u Republici Hrvatskoj, te se koristi u prehrambene svrhe. Prednost uporabe trnine i ostalog samoniklog bilja u prehrambene svrhe je u tome što raste u prirodnim i optimalnim uvjetima bez neposredne ljudske intervencije. Plodovi trnine sadrže značajnu količinu biološki aktivnih spojeva, posebno vitamina, fenolnih spojeva te minerala. [1] Uz tanine, koji su nosioci trpkog okusa i predstavljaju značajnu količinu fenolnih spojeva, u trnini su prisutni i antocijani (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glucozid) flavonol glikozidi (kvercetin, kamferol, mercitin), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivati kumarina, te proantocijanidini tipa A. [2]

Cilj ovog završnog rada je odrediti koncentraciju ukupnih fenola u osušenom plodu trnine primjenom ekstrakcije po Soxhletu te klasične ekstrakcije u povrat uz 50%-tni etanol kao otapalo. Ukupni fenoli određuju se spektrofotometrijski primjenom Folin-Ciocalteu metode, a karakterizacija IR-spektroskopijom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Trnina

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka. Raste kao trnovit, listopadni grm na padinama neobrađenih područja. Formira gustu nadstrešnicu sa zamršenim granama i brojnim izdancima te može narasti i do 5 metara u visinu. Pupoljci trnina su okruglo-ovalnog oblika, crveno-smeđe boje sa više ili manje dlačica, a kora je tamno sive boje. Listovi su zelene boje, naizmjenično dugi 2–5 te 1–2 cm, obrnuto su jajoliki ili su oblika elipse, s fino nazubljenim lisnim rubovima te s dlačicama obično na donjoj strani lista. Peteljke su duge 0.2–1 cm i također sadrže dlačice. Palistići (stipule) su izduženi i nazubljeni te su obično duži od peteljki. Cvjetovi su bijele boje, širine 1–1.7 cm te su najčešće osamljeni i pojavljuju se na drškama koje su duge oko 0.5 cm. Lapovi su trokutasto-jajoliki i često nazubljeni. Svaki cvijet sadrži oko 20 prašnika žute ili crvene boje koji su dugi do 0.5 cm. Plod je koštunjičav, veličine 1–1.5 cm, okruglast i ljubičaste boje sa zelenom pulpom te se teško odvaja od endokarpa. Vrlo se čvrsto drže grana pa na njima ostaju do proljeća. Meso im je zelenkasto, trpko i kiselo, te se teško odvaja od koštice, a okus kiseo i trpak, te steže. Mirisom i okusom najbliži su gorkom bademu. Trnina cvjeta od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasno ljeto i jesen te se ponekad mogu naći na biljci i tijekom zimskog razdoblja. Cvjeta najranije među domaćim grmljem. [3]



**Slika 1.** Plod trnina [3]

### 2.1.1. Rasprostranjenost

Ova biljka raste u većini južno-srednje Europe, osim na donjoj polovici Pirinejskog poluotoka, a širi se sjeverno sve do južnog dijela Skandinavskog poluotoka. Istočno doseže Malu Aziju, Kavkaz i Kaspijsko jezero. Također se može pronaći i na izoliranim područjima u Tunisu i Alžiru, a uvedena je i lokalno uzgajana i u Sjevernoj Americi te na Novom Zelandu. Trnina se može naći na šumskim rubovima i otvorima, na sunčanim i kamenitim padinama, jarugama, riječnim dolinama, livadama i pašnjacima, na niskim nadmorskim visinama, ali također i u planinama (švicarske Alpe). U Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena, većinom uz rubove šuma, na neplodnom tlu i pašnjacima, najčešće na vapnenačkom tlu. [3]

Trnina se nalazi u pojasu grmlja blizu šuma, odnosno ekotonu između šumovitih područja i travnjaka. Ta područja su uglavnom dio sekundarne vegetacije koja se razvija na napuštenim mjestima ili su faza sekundarne sukcesije livada i pašnjaka koji se nalaze u blizini obrađenih poljoprivrednih područja. Trnina se često u prirodi može pronaći zajedno s ostalim vrstama grmovitih biljaka iz roda *Rosa*, *Rubus*, *Prunus* i *Cornus*, ali i kurikom (*Euonymus europaeus*), glogom (*Crataegus monogyna*) i divljom kalinom (*Ligustrum vulgare*). [3]

### 2.1.2. Kemijski sastav

Cvjetovi i listovi trnine bogati su flavonoidima, derivatima flavonola: kampferol, kvercetin te njihovi glikozidi sa arabinozom, ramnozom i ksilozom. Štoviše, cvjetovi sadrže proantocijanidine tipa A, lišće karotenoide i norizoprenoide, a oba dijela biljke sadrže fenolnu kiselinu.

Osim flavonoida, listovi i cvjetovi trnine sadrže i sterole te triterpene. U cvjetovima se mogu naći i alkoholi triterpena koji su identificirani  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirini te je zastupljeniji  $\beta$ -amirin. Također, iz smjese triterpenskih kiselina identificirane su oleinska i ursolična, s većom koncentracijom potonje kiseline. Od sterola je u najvećoj koncentraciji identificiran  $\beta$ -sitosterol, a u malim količinama potvrđena je i prisutnost  $\gamma$ -sitosterola, stigmasterola i sterol glikozida. [4]

Plod trnine sadrži značajan udio ukupnih fenola. Po koncentraciji najviše se ističu antocijani, (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glukozid) flavonol glikozidi (kvercetin, kamferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivati kumarina, te proantocijanidini tipa A. [2]

Govoreći o makronutrijentima ploda trnine najveći udio čine ugljikohidrati i to 88.5%



(od monosaharida prevladava glukoza, a od polisaharida celuloza i škrob). Udio proteina iznosi 3,4%, a udio masti svega 1,2-1,6% gdje prevladavaju nezasićene masne kiseline nad zasićenim masnim kiselinama te su najzastupljenije oleinska i linolenska masna kiselina. Od vitamina, najzastupljenija je askorbinska kiselina, također sadrži  $\alpha$  i  $\delta$ - tokoferole te malu količinu  $\beta$ -karotena. [2]

### **2.1.3. Uporaba i ljekovita svojstva**

Za gotovo sve dijelove trnine postoji primjena u medicini i prehrambenoj tehnologiji. Potpuno zreli plodovi se zbog specifičnog astringentnog svojstva većinom koriste za izradu džemova, želea, vina, octa i destiliranih alkoholnih pića. U medicinske svrhe, za pripremu čajeva, sirupa, svježih sokova ili tinktura koriste se cvjetovi, latice i listovi koji smanjuju simptome anemije te dijareje i drugih gastrointestinalnih tegoba. Budući da plodovi sadrže visoke koncentracije askorbinske i fenolnih kiselina, oni se mogu koristiti kao vrijedan izvor prirodnih antioksidansa. Kao dekorativna biljka može tvoriti prirodnu ogradu ili granicu. Za životinjski svijet trnina je od velike važnosti jer rani cvjetovi predstavljaju izvor nektara za oprašivače, a trnovite grane pružaju sigurnost gnijezdima ptica te štite manje sisavce od predatora. [3]

Budući da djeluje kao odličan astringent, plod trnine se može koristiti kao lijek protiv dijareje. Pektin iz ploda trnine djeluje umirujuće i opuštajuće na upalu želuca. Infuzija biljke može se koristiti kao blagi laksativ u liječenju opstipacije i konstipacije. Budući da stimuliraju ljudski metabolizam, plodovi se mogu koristiti za uklanjanje tegoba i u liječenju prehlade, dermatitisa, herpesa, bubrežnih kamenaca, alergije, i poremećaja mokraćnog mjehura. [5] Plodovi, također imaju antiseptičko djelovanje zbog prisutnosti tanina (polihidroksiflavan-3-ola) pa se može djelotvorno koristiti i kod upala sluznice probavnog trakta. [6]

Kemopreventivan učinak bioaktivnih komponenata trnine često je povezan sa njihovom antioksidativnom aktivnošću. Na primjer, klorogenske kiseline i njihovi derivati mnogih ljekovitih bilja mogu se smatrati odgovornima za blagotvorne učinke u prevenciji nekih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom. Kvercetin je također vrlo učinkovit antioksidans te se čini da djeluje protektivno na mnoga stanja kao što su rak, kardiovaskularne bolesti te neurodegenerativne poremećaje. Bez obzira što su flavan-3-oli zastupljeni u tek malim koncentracijama u trnini (ali su prisutni u obliku procijanidina), oni također pokazuju niz pozitivnih učinaka na zdravlje i to antiviralno, inzulinu slično, antioksidativno i protuupalno djelovanje. Uspoređujući s resveratolom i askorbinskom kiselinom dimeri i trimeri procijanidina tipa A imaju jednaku ili bolju sposobnost hvatanja

slobodnih radikala. Spojevi koji pridonose boji plodova trnine, antocijani, također imaju pozitivne terapijske učinke uglavnom zbog njihovih jakih antioksidativnih svojstava. [7]

## **2.2. Bioaktivne komponente hrane**

U bioaktivne komponente hrane ubrajaju se esencijalni ili neesencijalni spojevi (npr. vitamini, polifenoli) koji se pojavljuju u prirodi, dio su hranidbenog lanca te imaju potencijalno pozitivno djelovanje na zdravlje čovjeka. [8]

Kako bi se spriječio deficit esencijalnih bioaktivnih komponenata potrebno ih je unositi hranom. Na taj se način prevenira razvoj kroničnih bolesti. Za razliku od njih, fitokemikalije se definiraju kao sekundarni biljni metaboliti za koje ne postoje preporuke jer ne može doći do njihovog nedostatka u organizmu čovjeka. Najveća skupina bioaktivnih komponenti prisutnih u cvijetu, listu i plodu trnine su upravo fenolni spojevi. [9]

### **2.2.1. Fenoli**

Prehrambeni fenoli i polifenoli čine jednu od najbrojnije i najrasprostranjenije skupine prirodnih supstanci u carstvu bilja. Trenutno je poznato više od 8000 fenolnih struktura. Posljednjih godina istraživanja potvrđuju ulogu polifenola u prevenciji degenerativnih oboljenja, osobito karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Snažni su antioksidansi te nadopunjuju funkcije vitamina te enzima koji su aktivni u obrani od oksidativnog stresa najčešće uzrokovanog reaktivnim kisikovim vrstama. [9]

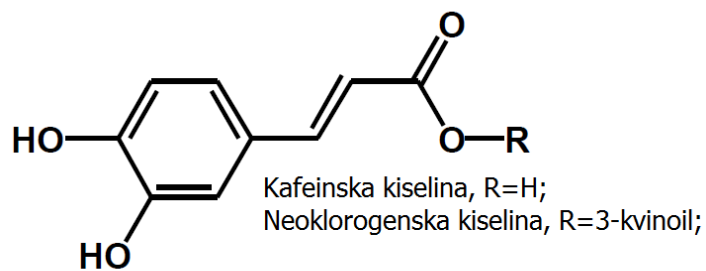
Ova skupina je vrlo raznovrsna te obuhvaća nekoliko pod-grupa fenolnih spojeva. Bogati izvori su voće i povrće, cjelovite žitarice te druge vrste hrane kao što su čaj, čokolada, kava i vino. Takva raznolikost i široka rasprostranjenost dovela je do različitih kategorizacija ovih prirodnih spojeva. Polifenoli se mogu klasificirati s obzirom na izvor podrijetla, biološku funkciju te kemijsku strukturu. Kategorizacija polifenola koja slijedi je ona prema kemijskoj strukturi. [9]

- (1) *fenolne kiseline* (derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline);
- (2) *flavonoidi* (izoflavoni, neoflavonoidi, čalkoni, flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli, proantocijanidini, antocijanidini);
- (3) *polifenolni amidi* (avenantramidi i kapsaicinoidi);
- (4) *ostali polifenolni spojevi* (resveratol, kurkumin, elaginska kiselina itd.).

### 2.2.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine otprilike trećinu fenolnih spojeva prisutnih u biljkama, a prisutne su u slobodnom ili vezanom obliku. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku, najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri. [10]

Spadaju u neflavonoidne polifenolne spojeve koji se s obzirom na strukturu mogu podijeliti na dva glavna razreda: derivate hidroksibenzojeve ( $C_1-C_6$ ) i hidroksicimetne ( $C_3-C_6$ ) kiseline. U derivate hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se galna, *p*-hidroksibenzojeva, siriginska i vanilinska kiselina, a u derivate hidroksicimetne *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Derivati hidroksicimetne kiseline imaju veći antioksidacijski kapacitet od hidroksibenzojevih zbog toga što  $CH=CH-COOH$  skupina doprinosi boljoj stabilizaciji slobodnih radikala za razliku od  $COOH$  skupine kod hidroksibenzojevih kiselina. [8] U plodu trnine u većim koncentracijama su zastupljene neoklorogenska i kafeinske kiseline (Slika 2). [9]



**Slika 2.**Struktura klorogenske i kafeinske kiseline [9]

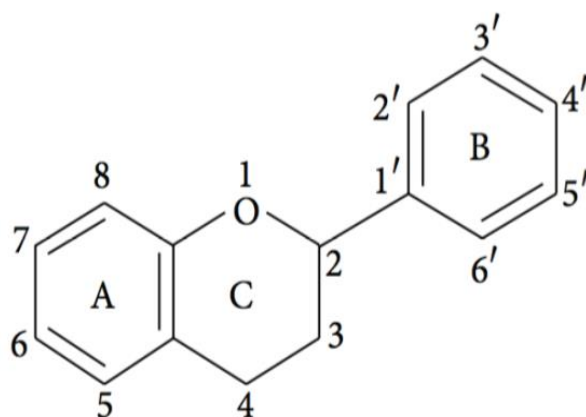
### 2.2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina prirodnih spojeva koji se nalaze u raznim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću s varijabilnom fenolnom strukturom. U 1930. iz naranče je izoliran novi spoj. Tada se vjerovalo da je to novi razred vitamina koji je imenovan vitamin P. Kasnije se ispostavilo da je taj spoj flavonoid (rutin) i od tada je identificirano više od njih 4000. [11] Pripisuju im se mnoga terapijska svojstva od kojih se ističu antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno. Također spomenuti spojevi znatno utječu na boju i okus hrane. Prema nomenklaturi, osnova strukture flavonoida je kemijski spoj difenilpropan iz

kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C prstena nastaje flavan, a iz njega se izvodi određeni broj osnovnih struktura flavonoida: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni. Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- $\gamma$ -pirona ili benzo- $\gamma$ -pirana.

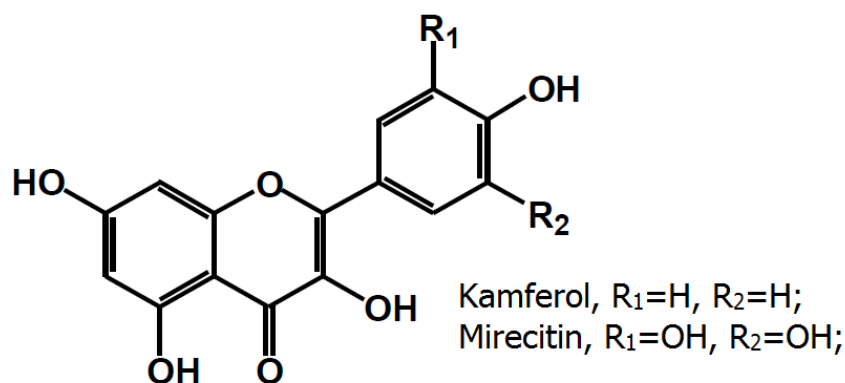
Navedeni spojevi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela. Kod flavonoida također postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini). [12]

Osnovnu strukturu flavonoida čini  $C_6-C_3-C_6$  strukturni kostur u kojem su dva benzenska prstena (**A** i **B**) povezana piranskim prstenom **C** koji sadrži kisik. Različiti razredi flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i supstituciji **C** prstena, dok se pojedinačni spojevi u razredu razlikuju prema supstituciji prstenova **A** i **B** (Slika 3). [11]



**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida [12]

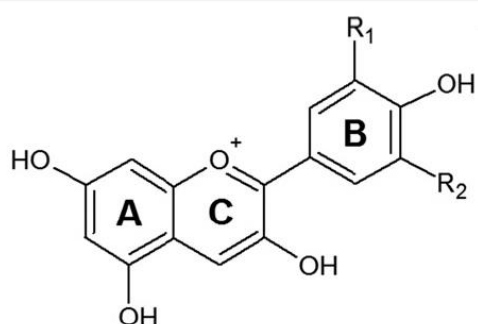
Flavonoli se u prirodi uglavnom pojavljuju u obliku flavonol glikozida, kod kojih je šećer povezan s aglikonom na C3 i/ili C7 poziciji. Listovi i cvjetovi trnine sadrže značajne koncentracije kampferola, kvercetina te njihovih glikozida. Cvjetovi sadržavaju flavonoide najviše u formi monosaharida vezanih na aglikon, uglavnom kampferol- i kvercetin 3-*O* arabinozide. [13] Također, potvrđena je prisutnost kampferola i kvercetina u obliku kampferol- i kvercetin 3-*O*-arabinofuranozida te kampferol 3-*O*-raminopiranozida. [14] Listovi su bogati disaharidima vezanim na aglikon, uglavnom kampferol 3,7-diraminozidom. [13] Plodovi trnine sadrže značajne količine fenolnih antioksidansa, od kojih se po koncentraciji najviše ističu flavonol glikozidi među kojima su mirecetin, kvercetin i kamferol (Slika 4). [15]



**Slika 4.** Strukture kamferola i mirecitina [9]

### 2.2.1.3. Antocijanidini

Antocijani ( iz grčkog (antos) - cvijet + (cijanos) - plavo) su polifenolni pigmenti koji se ubrajaju u skupinu flavonoida te daju mnoga crveno-narančasta do plavo-ljubičasta obojenja prisutna u raznim biljnim dijelovima kao što su voće, cvijeće i lišće. Do danas, identificirano je 700 strukturno različitih antocijana derivate 27 aglikona antocijanidina. U prirodi se antocijani rijetko nalaze u obliku aglikona. [16] Šest je široko rasprostranjenih antocijanidina: cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin (Slika 5). Najčešće se pojavljuju u obliku glikozida svojih antocijanidin-kromofora. Glukoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, ramnoza i ksiloza su najčešći šećeri vezani na antocijanidine kao mono-, di-, ili trisaharidi. Šećeri se obično vežu na mjesto 3 C-prstena ili poziciju 5,7 A-prstena. [17]



Naziv	$R_1$	$R_2$
Pelargonidin (Pg)	H	H
Cijanidin (Cy)	OH	H
Delfinidin (De)	OH	OH
Peonidin (Pn)	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin (Pt)	OH	OCH <sub>3</sub>
Malvidin (Ma)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Slika 5./Tablica 1.** Struktura antocijanidina [16]

Pokazalo se da se učestalom konzumacijom antocijana i/ili hrane bogate antocijanima postiže niz zdravstvenih benefita, uključujući zaštitu od kardiovaskularnih bolesti, neuroprotektivne benefite, poboljšanje vida, antidijabetološke, antiupalne i kemoprotektivne

učinke. [16] Najznačajniji antocijani u plodu trnina su cijanidin-2-*O*-glikozid, cijanidin-3-*O*-rutenozid i peonidin-3-*O*-glikozid. [2]

### 2.3. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva

Ekstrakcija je opisana kao prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo koje se ne smije miješati s tom fazom, odnosno željena tvar treba u njemu biti više topljiva nego u polaznoj fazi. Ekstrakcije su prilično jednostavni postupci i imaju vrlo široku primjenu u laboratoriju. Obrada produkata većine organsko-kemijskih reakcija zahtjeva ekstrakciju kao postupak njihova pročišćavanja. Pritom se nekim pogodnim otapalom iz sirova produkta selektivno uklanja nusprodukti ili se vrši ekstrakcija produkta, a nečistoće ostaju u polaznoj fazi. Organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- (1) *kemijska indiferentnost* prema prisutnim tvarima;
- (2) što bolja *topljivost* željene organske tvari u otapalu;
- (3) što veća razlika *gustoća* dvaju upotrijebljenih otapala;
- (4) ne previsoko *vrelište* kako bi se otapalo moglo lako upariti;
- (5) nestvaranje *emulzije* tijekom ekstrakcije.

Ekstrakcija se temelji na razdjeljenju, odnosno particiji tvari između dvije faze koje se uzajamno ne miješaju. Većinom su te dvije faze voda i organsko otapalo koje se s njom ne miješa. Omjer koncentracija tvari u dva takva otapala dan je *Nernstovim zakonom razdjeljenja*:

$$K = c_1 / c_2$$

pri čemu je *K* koeficijent razdjeljenja, a  $c_1$ ,  $c_2$  su ravnotežne koncentracije tvari u dva otapala. Koeficijent razdjeljenja je jednak omjeru topljivosti tvari u oba otapala te je pri određenoj temperaturi konstantan. [18]

Prije daljnje upotrebe ili analize biljnog materijala, ekstrakcija je prvi važan korak izolacije fenolnih spojeva. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimizirati uvjete ekstrakcije. Koju od metode ekstrakcije fenolnih spojeva ćemo izabrati, ovisi o njihovoj strukturi i obliku u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Ekstrakcija fenolnih spojeva se može provoditi iz svježeg, suhog ili materijala u zamrznutom stanju, usitnjenog ili cijelog materijala koji,

međutim najčešće se ekstrahira u stanju u kojem se koristi za upotrebu. Pri odabiru prikladne metode ekstrakcije fenolnih spojeva treba uzeti u obzir topljivost spojeva koje želimo ekstrahirati te odabrati najpogodnije otapalo. [19]

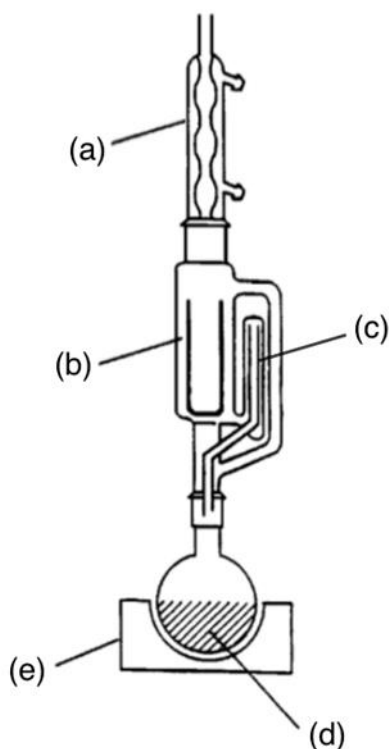
### **2.3.1. Klasična ekstrakcija otapalima**

Zbog njezine efikasnosti i široke primjenjivosti, ekstrakcija različitim vrstama otapala je najčešće upotrebljavana tehnika pripreme ekstrakta iz biljnog materijala. Udio fenolnih spojeva koji se ekstrahirani ovisi o kemijskoj strukturi spojeva koji se ekstrahiraju iz biljnog materijala, polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, te o fizikalno-kemijskim karakteristikama ekstrahiranog uzorka. [18]

Najčešće upotrebljavana otapala su metanol i etanol s različitim udjelima vode. Budući da voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala, prisutnost i udio vode u organskoj fazi otapala ima veoma značajnu ulogu. Primjenom metanola kao otapala moguće je ekstrahirati oko 20% više fenolnih spojeva nego Etanolom. [20] Također, metanol je učinkovitiji i za ekstrakciju fenolnih spojeva nižih molekularnih masa. Ekstrakcija fenolnih kiselina koje su prisutne u netopljivom obliku, vezane kao esteri ili glikozidni kompleksi se vrlo često, osim primjenom organskih otapala, provodi i u kombinaciji s kiselim ili baznom hidrolizom. Dodatkom baze ovisi o kemijskoj strukturi spojeva koji se ekstrahiraju iz biljnog materijala i/ili kiseline dovodi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina. [21] Budući da je metanol toksičan, u industrijskim razmjerima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodena otopina etanola. [18]

#### **2.3.1.1. Soxhlet ekstrakcija**

Franz von Soxhlet 1879. Je razvio novi sustav za ekstrakciju tvari. Prvotno ga je koristio za određivanje lipida u mlijeku. Ova ekstrakcija se provodi u situacijama kada slabo topljiv spoj treba ekstrahirati iz čvrste smjese. [22] Refluksiranjem otapala dolazi do ispiranja krutog materijala pri čemu dolazi do ekstrakcije željenog spoja u tikvicu.



**Slika 6.** Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu [23]

Uzorak se u papirnatou čahuri sa slojem suhe odmašćene vate stavlja u srednji dio Soxhletove aparature (Slika 6); ekstraktor **(b)** koji se zatim postupno, preko hladila **(a)**, napuni otapalom koje se koristi za ekstrakciju te se pomoću kapilarne cjevčice **(c)** isprazni u tikvicu. Zatim se doda još toliko otapala da se napuni do otprilike polovice ekstraktora. Kroz hladilo se pusti jaki mlaz vode te se počne sa zagrijavanjem destilacijske tikvice **(d)** u vodenoj ili pješčanoj kupelji **(e)**. Ekstrakcija može trajati nekoliko sati (najčešće 4-6 h), ovisno o vrsti uzorka. Treba je prekinuti u onom trenutku kada se otapalo iz ekstraktora prelije u tikvicu, a čahura u ekstraktoru bude bez otapala. [24]

### 2.3.2. Infracrvena spektroskopija

Zračenje u infracrvenom području odgovara energiji koja izaziva molekulske vibracije. Uzorak izložen infracrvenom zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine ( $\lambda$ ), apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskih vibracijama. Energije rastezних vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 4000 i 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Taj dio spektra vrlo je koristan za određivanje funkcionalnih skupina organskih spojeva te se često naziva *područje*



*funkcionalnih skupina*, zbog toga što su položaj i karakteristike apsorpcijskih vrpca većine funkcionalnih organskih spojeva pri tim valnim duljinama razmjerno nepromjenjive.

Područje frekvencije u IR-spektru ispod  $1600\text{ cm}^{-1}$  sadrži velik broj vrpca. Uz malo karakterističnih rastezних vibracija pojedinih veza, tu se nalaze brojne vrpce koje odgovaraju deformacijskim vibracijama molekule kao i nekim složenim vibracijama i vibracijama gornjeg tona. Oblik koji ocrtavaju sve vrpce zajedno karakterističan je za određeni spoj, pa se taj dio spektra zove *područje "otiska prsta"*.

Karakteristične vrpce za organske molekule javljaju se u području od  $3300$  do  $2800\text{ cm}^{-1}$  što se pripisuje rasteznim frekvencijama C-H veza. Vrpce koje se javljaju u području od  $3600$  do  $3200\text{ cm}^{-1}$  karakteristične su za hidroksilne skupine alkohola, a ukoliko je hidroksil dio karboksilne skupine javlja se kao vrlo široka vrpca u području od  $3600$  do  $2500\text{ cm}^{-1}$ . Ta vrpca zajedno s rasteznom frekvencijom karbonila pri  $1710\text{ cm}^{-1}$  karakterizira karboksilne kiseline. Aromatski spojevi obično daju niz vrpca između  $1600$  i  $1400\text{ cm}^{-1}$ , a vrpce u području od  $900$  do  $700\text{ cm}^{-1}$  se često primjenjuju za utvrđivanje načina supstitucije na aromatskom prstenu. [25]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

U istraživanju je korišten sušeni plod trnine pribavljen od društva Suban® (Strmec, Hrvatska) koji je neposredno prije izolacije usitnjen na kugličnim mlinovima.

Otapala i reagensi

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 50 %-tni  
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 520,8 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Etil-acetat (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Lach-Ner, Neratovice Češka)
- Zasićena topina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
  - Priprema: 200 g natrijevog karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.
- Galna kiselina,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$  (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

#### 3.2. Metode

Uzorci usitnjenog sušenog ploda trnine podvrgnuti su ekstrakciji po Soxhletu uz 50%-tni etanol kao otapalo te klasičnoj ekstrakciji kruto – tekuće grijanjem u povrat uz 50%-tni etanol kao otapalo.

**Metoda A:** Ekstrakcija po Soxhlet uz 50%-tni etanol kao otapalo iz praha sušenog ploda trnine, nakon čega slijedi ekstrakcija tekuće-tekuće uz etil-acetat kao otapalo.

**Metoda B:** Klasična ekstrakcija kruto-tekuće grijanjem u povrat ili refluks uz 50%-tnu otopinu etanola, nakon čega slijedi ekstrakcija tekuće-tekuće uz etil-acetat kao otapalo.

Za utvrđivanje sastojaka smjese biljnih ekstrakata korištena je metoda tankoslojne kromatografije presvučenim slojem silika gela (60F–254) Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-lampa pri valnoj duljini od 254 nm.

Koncentracija ukupnih fenola određena je na spektrofotometru UV UNICAM Helios  $\beta$ . FTIR spektri uzoraka snimljeni su u kalijevu bromidu na Bomem MB 100 Mid FTIR–spektrofotometru.

### **3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata**

#### **3.2.1.1. Metoda A: Ekstrakcija po Soxhletu iz praha sušenog ploda trnine uz etanol kao otapalo**

Na kugličnim mlinovima plod trnine samelje se u prah smeđe boje. Odvažuje se 3,0 g praha s točnošću  $\pm 0.1$ . Sastavi se aparatura za ekstrakciju po Soxhletu (Slika 7.) te se u ekstraktor postavi sloj odmašćene vate na koji se stavi uzorak. U tikvici s okruglim dnom nalazi se 150 mL 50%-tne otopine etanola koji se zagrijava do temperature refluksa. Ekstrakcija se provodi 2 sata, a dobiveni ekstrakt je žuto – zelene boje. Izuzme se 10 ml ekstrakta **TV1** za određivanje ukupnih fenola, a 50 mL filtrata se uparava na rotacijskom uparivaču do suha, pri čemu je dobiveno 450 mg suhe tvari zelene boje i ugodne mirisa.



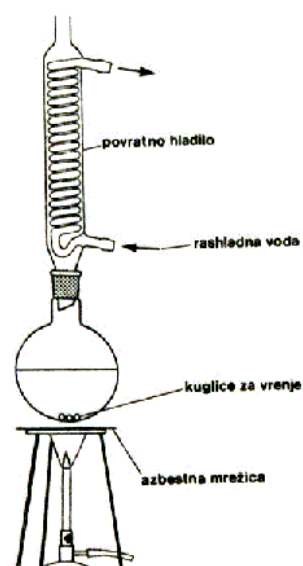
**Slika 7.** Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu

Dio od 30 mL ekstrakta pročišćava se ekstrakcijom tekuće-tekuće, odnosno izmućkivanje u lijevku za odjeljivanje, uz etil-acetat kao otapalo. Postupak izmućkivanja ponavlja se 3 puta pri čemu su izdvojeni vodeni i organski slojevi. Etil-acetat je osušen na natrijevom sulfatu i uparen je o suha pri čemu je dobivena masa **TV1 EtAc=** 9,9 mg. Ekstrakt je ugodnog mirisa te karakteristične zelene boje.

**IR-spektar TV1 EtAc:**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3679, 3384 (š. j., O-H), 3070 (sl., C-H, aromatski), 2927, (sr., C-H), 2844 (sr., C=C), 1724, 1710 (j., C=O), 1600 (sl., C=C), 1440, 1186 (sr., C-OH), 1103, 894 (sr., C-O, C-C), 619 (sr, glikozid).

### 3.2.1.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija iz praha sušenog ploda trnine grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo

Sastavi se aparatura za refluks (slika 8). U tikvicu se stavi odvagana masa s točnošću  $\pm 0.1$  od 3 g praha sušenog ploda trnine i 50%-tni etanol volumena 150 mL te se zagrije do temperature vrelišta otapala. Kada sadržaj tikvice počne refluksirati, odnosno otapalo kondenzira te počne kapati natrag u tikvicu, mjeri se vrijeme refluksa. Nakon 2 sata ekstrakcije rastavi se aparatura, a dobivena se smjesa profiltrira pri čemu je dobiven ekstrakt bakreno-smeđe boje ugodnog mirisa **TV2** iz kojeg se izuzme 10 mL ekstrakta za određivanje ukupnih fenola.



**Slika 8.** Grijanje u povrat

Dio filtrata volumena 50 mL se upari na rotacijskom otparivaču do suha, pri čemu je dobiveno 548,4 mg biljnog ekstrakta bakreno-smeđe boje i ugodnog slatkastog mirisa. Dio

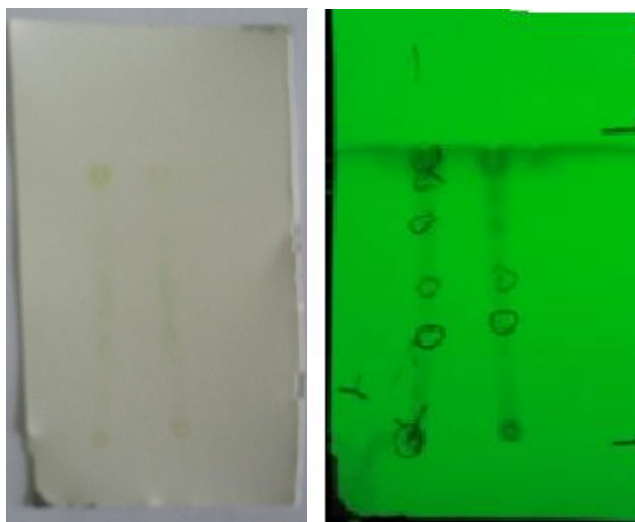
od 30 mL ekstrakta pročišćava se ekstrakcijom tekuće-tekuće, odnosno izmućkivanjem u lijevku za odjeljivanje, uz etil-acetat kao otapalo. Postupak izmućkivanja ponavlja se 3 puta pri čemu su izdvojeni vodeni i organski slojevi. Etil-acetat je osušen na natrijevom sulfatu i uparen je o suha pri čemu je dobivena masa **TV2 EtAc** = 33.4 mg.

**IR-spektar TV2 EtAc:**  $\nu$  max/  $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3679, 3384 (š. j., O-H), 3070 (sl., C-H, aromatski), 2927, (sr., C-H), 2844 (sr., C=C), 1724, 1710 (j., C=O), 1600 (sl., C=C), 1440, 1186 (sr., C-OH), 1103, 894 (sr., C-O, C-C), 619 (sr, glikozid).

### 3.2.2. Tankoslojna kromatografija

U svrhu identifikacije uzorka provodi se tankoslojna kromatografija kod koje se odvajanje komponente smjese temelji na adsorpcijskim ili razdjelnim procesima. Najčešće se koristi varijanta adsorpcijske kromatografije na tankom sloju adsorbensa (stacionarne faze) nanesenom na staklenu ploču ili foliju. Kao adsorbensi pretežno se upotrebljavaju silika gel (silicijska kiselina) i aluminijev oksid.

Tvar se otopi u minimalnoj količini etil-acetata te se kapilarnom nanese na startnu liniju koja je udaljena 1.5–2 cm od ruba pločice i osuši. Pločica se stavi u kadu u kojoj se nalazi pogodan eluens (mobilna faza) koji se zbog kapilarnih sila diže uz pločicu i eluira sastojke smjese. Osnovni kriterij za identifikaciju pojedinog spoja je njegova pokretljivost na tankom sloju, što se izražava pomoću  $R_f$ -vrijednosti. Retencijski faktor predstavlja omjer udaljenosti koju je prošla mrlja (b) i udaljenosti do koje je stigla fronta otapala (a).



**Slika 9.** Tankoslojna kromatografija

**Tablica 2.**  $R_f$  vrijednosti komponenti smjese iz uzorka

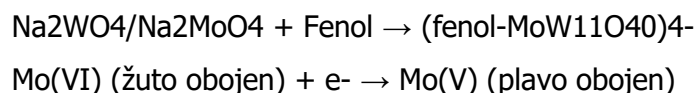
Komponente uzorka TV1 EtAc	$R_f$
1.	0.88
2.	0.79
3.	0.64
4.	0.45
5.	0.29

Komponente uzorka TV2 EtAc	$R_f$
1.	0.88
2.	0.79
3.	0.64
4.	0.48
5.	0.33

### 3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolornoj reakciji fenola s Folin – Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 760 nm određuju se ukupni fenoli u etanolnom ekstraktu uzorka.

Folin-Ciocalteureagens je smjesa fosforvolframove i fosfomolibdenske kiseline te pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni.

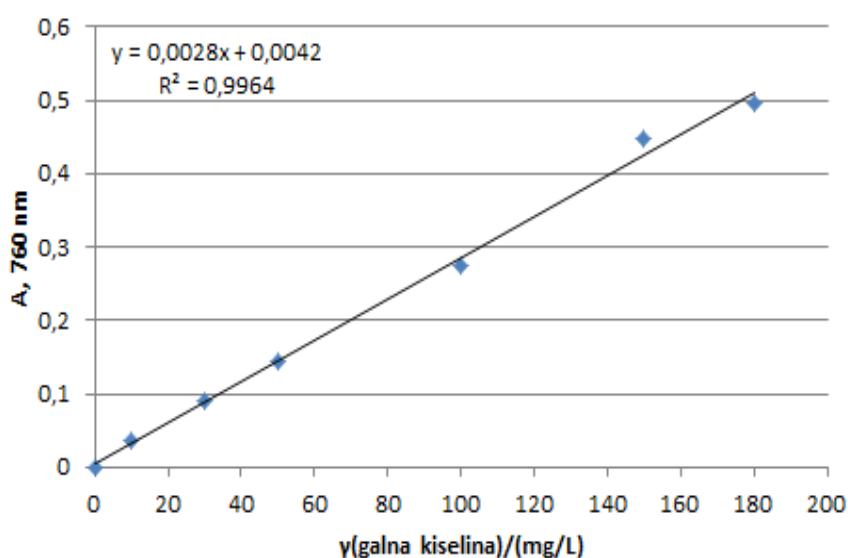


Proporcionalno povećanju broja hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima povećava se intenzitet redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa.

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se redom 1 mL ekstrakta, 1,25 mL Folin Ciocalteu reagensa i 10 mL destilirane vode. Nakon 5 min doda se 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Priređene tikvice čuvaju se 2 h na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 760 nm.

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0.5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 0, 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 3,0 i 3,6 mL alikvota standardne otopine

galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 30, 50, 100, 150 i 180 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 1mL otopine standarda u odmjerne tikvice . Potom se dodaje 1,25 mL 0,2 M Folin Ciocalteu reagensa i 10 mL destilirane vode. Nakon 5 min doda se 3,75 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata te se odmjerne tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Kao i kod pripreme uzorka tikvice se čuvaju 2 h na tamnome mjestu pri sobnoj temperaturi. Također, apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 760 nm. Baždarni pravac se napravi u Microsoft Excel programu iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija te sadrži 7 točaka od kojih je prva slijepa proba, a ostalih 6 se odnose na svaku pojedinu tikvicu razrjeđenja standarda galne kiseline. Na osi apscisa prikazane su koncentracije galne kiseline u mg/L, a na osi ordinata izmjerene vrijednosti apsorbancija svake pojedine tikvice razrjeđenja pri valnoj duljini 760 nm.



Y (mg/L)	A,760 nm
<b>10</b>	<b>0,035</b>
<b>30</b>	<b>0,091</b>
<b>50</b>	<b>0,1445</b>
<b>100</b>	<b>0,275</b>
<b>150</b>	<b>0,448</b>
<b>180</b>	<b>0,4955</b>

**Slika 10./ Tablica 3.** Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednačba pravca glasi:  $y = 0,0028 \cdot x + 0,0042$ , gdje je:

y – apsorbancija pri 760 nm,

x – koncentracija galne kiseline (mg/L).

Mjerenje apsorbancije ekstrakata za **ukupne fenole** provedeno je u dvije paralele.

**Uzorak Metode A:**

Apsorbancija ekstrakta **TV1** iznosi:

A760nm = 0,4000

A760nm = 0,4060

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **Asr = 0,403 nm**.

**Uzorak Metode B:**

Apsorbancija ekstrakta **TV2** iznosi nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosi:

A760nm = 0,3315

A760nm = 0,3410

Što daje srednju vrijednost apsorbancije **Asr = 0,33625 nm**.

**Tablica 4.** Koncentracija ukupnih fenola

	<b>Apsorbancija</b>		<b>Razrjeđenje</b>	<b>mg GAE/g</b>
<b>Metoda A</b>	0,400	0,403	1	7,12
	0,406		1	
<b>Metoda B</b>	0,3315	0,33625	5	29,64
	0,3410		5	

GAE-ekvivalent galne kiseline



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Cilj ovog završnog rada je odrediti koncentraciju ukupnih fenola u osušenom plodu trnine uspoređujući dva oblika ekstrakcija. Razlog tome je što različite vrste ekstrakcije zbog različitih uvjeta (npr. temperatura, vrijeme ekstrakcije, mikrovalovi ili ultrazvuk) utječu na koncentraciju i udio bioaktivnih spojeva u ekstraktu. [26] Najčešća metoda izolacije fenolnih spojeva iz prirodnih materijala je ekstrakcija uz pogodno otapalo, a u ovom radu korištene su metoda ekstrakcije po Soxhletu te klasična ekstrakcija u povrat. Tankoslojna kromatografija i IR spektroskopija korištene su za identifikaciju i karakterizaciju izoliranih bioaktivnih komponenata.

Plod trnine sadrži značajan udio ukupnih fenola. Po koncentraciji najviše se ističu antocijani (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glukozid) flavonol glikozidi (kvercetin, kamferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivati kumarina, te proantocijanidini tipa A. [2]

Od makronutrijenata, plod trnine najvećim dijelom čine ugljikohidrati i to 88.5% (od monosaharida prevladava glukoza, a od polisaharida celuloza i škrob). Udio proteina iznosi 3,4%, a udio masti svega 1,2-1,6% gdje prevladavaju nezasićene masne kiseline nad zasićenim masnim kiselinama te su najzastupljenije oleinska i linolenska masna kiselina. Od vitamina, najzastupljenija je askorbinska kiselina, također sadrži  $\alpha$  i  $\delta$ - tokoferole te malu količinu  $\beta$ -karotena. [2]

Prvi dio završnog rada odnosi se na izolaciju fenolnih spojeva iz usitnjenog sušenog ploda trnine Soxhlet ekstrakcijom te klasičnom ekstrakcijom u povrat s 50%-tnim etanolom kao otapalom, drugi dio se odnosi na pročišćavanje dobivene smjese fenolnih spojeva ekstrakcijom tekuće-tekuće uz etil-acetat kao otapalo i karakterizacije dobivenih ekstrakta IR spektroskopijom, a u trećem dijelu određena je koncentracija ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu.

### 4.2. Izolacija fenolnih spojeva

Biljni ekstrakt je vrlo komplicirana smjesa nekoliko spojeva različitih kemijskih i fizikalnih svojstava, a razdvajanje tih spojeva temelji se upravo na tim svojstvima. Za izolaciju fenolnih spojeva u ovom je završnom radu korišten osušeni plod trnine koji je

neposredno prije ekstrakcije usitnjen na kugličnim mlinovima. Postupak izolacije proveden je konvencionalnim ekstrakcijama uz 50 %-tni etanol kao otapalo (**Metoda A i Metoda B**).

#### **4.2.1. Metoda A: Ekstrakcija po Soxhletu iz praha sušenog ploda trnine uz etanol kao otapalo**

Soxhlet ekstrakcijom uz 50%-tni etanol kao otapalo dobiven je filtrat žuto-zelene boje ugodnog mirisa. Iz 50 mL ekstrakta koji je uparen na otparivaču do suha dobiveno je 450 mg uzorka biljnog ekstrakta ugodnog mirisa. Nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće 30 ml **TV1** ekstrakta s etil-acetatom kao otapalom dobivena je masa suhe tvari **TV1 EtAc** 9,9 mg karakteristične zelene boje.

Za utvrđivanje sastojaka smjese biljnih ekstrakata **TV1 EtAc** korištena je metoda tankoslojne kromatografije uz etil-acetat kao eluens pri čemu je vidljivo pet dominantnih komponenta (Tablica 2., Slika 9.) te više komponenata slabijeg intenziteta bliskih  $R_f$  vrijednosti, čime se može potvrditi da je ovim postupkom izolacije dobivena smjesa fenolnih spojeva.

#### **4.2.2. Metoda B: Klasična ekstrakcija iz praha sušenog ploda trnine grijanjem u povrat uz etanol kao otapalo**

Klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat uz 50%-tni etanol kao otapalo dobiven je filtrat bakreno-smeđe boje ugodnog mirisa. Iz 50 mL ekstrakta kojeg uparavamo na otparivaču do suha, dobiveno je 548,4 mg uzorka biljnog ekstrakta ugodnog mirisa. Nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće 30 mL **TV2** ekstrakta s etil-acetatom kao otapalom dobivena je masa suhe tvari **TV2 EtAc** od 33,4 mg karakteristične zelene boje.

Tankoslojna kromatografija, biljnog ekstrakata **TV2 EtAc**, uz etil-acetat kao eluens, dobivenog ekstrakta potvrđuje prisutnost komponenti istih  $R_f$  vrijednosti međutim različitog intenziteta.

Usporedbe masa izoliranih bioaktivnih komponenata iz oba ekstrakta vidljivo je da se povećava prinos izoliranih bioaktivnih komponenti iz ploda trnine uporabom klasične ekstrakcije grijanjem u povrat. Tankoslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens u oba ekstrakta potvrđuje se prisutnost komponente istih  $R_f$  vrijednosti (Tablica 2., Slika 9.)

međutim različitog intenziteta što ukazuje na isti kemijski sastav u biljnim ekstraktima s različitim udjelom pojedinih komponenata.

### 4.3. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su primjenom spektrofotometrijske metode koja se bazira na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenju nastalog intenziteta obojenja pri 760 nm. Postupak pripreme uzoraka proveden je prema protokolu za određivanja fenola (odjeljak **3.2.1.**). Kao usporedbu uspješnosti primijenjenih metoda ekstrakcije (metoda A i B) provedeno je i određivanje ukupnih fenola u uzorcima **TV1** i **TV2**. Masena koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema jednadžbi pravaca i izražena u mg GAE/g trnine. Masena koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom klasičnom ekstrakcijom iznosila je 29.64 mg GAE/g ploda trnine, dok u ekstraktu dobivenog ekstrakcijom u Soxhletu iznosila je 7.12 mg GAE/g ploda trnine što je u suglasju s rezultatima koji ukazuju da je masom izoliranih bioaktivnih spojeva veća uporabom klasične ekstrakcije. Dobiveni rezultati masenih koncentracija ukupnih fenola u plodu trnine, slažu se s rezultatima masenim koncentracijama ukupnih fenola u cvijetu trnine dobivenim u prijašnjim istraživanjima pri istim uvjetima (klasična ekstrakcija: 51,85 mg GAE/g cvijeta, ekstrakcija po Soxhletu 46.7 mg GAE/g cvijeta). Usporedbom s literaturnim navodima za koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima iz cvijeta odnosno ploda dobivenom uporabom ultrazvuka koji ukazuje da plod trnine ima manji udio bioaktivnih spojeva može se zaključiti da su dobivene masene koncentracije u skladu s literaturom. [27]

### 4.4. IR spektroskopija

#### 4.4.1. IR-spektar uzoraka **TV1E** i **TV2E**

Snimljeni su IR spektri biljnih ekstrakata dobivenih nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće u KBr pastilama, a u spektrima su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce funkcijske skupine svih komponenata smjese.

Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području 3200 do 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Slobodna hidroksilna skupina registrira se kao uska vrpca pri 3600  $\text{cm}^{-1}$ , a obično se uočava širok signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. U IR spektrima **TV1 EtAc** i **TV2 EtAc** prisutna je uska apsorpcijska vrpca pri 3648  $\text{cm}^{-1}$  koja se prepisuje slobodnoj hidroksilnoj skupini i

široka apsorpcijska vrpca oko  $3420\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje hidroksilnoj skupini koja je uključena u vodikove veze, a intenzitet te apsorpcijske vrpce je izrazito jak što ukazuje na prisutnost velikog udjela hidroksilnih skupina u spojevima prisutnim u smjesi. U dijelu spektra koji karakterizira vibracije istezanja C-H kod zasićenih, nezasićenih veza i aromatskih spojeva ( $2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ ), asignirana je apsorpcijska vrpca pri  $3057\text{ cm}^{-1}$  koja se može pripisati rasteznoj vibraciji etenske veze  $=\text{C-H}$ , dok se vrpca pri  $2914$  i  $2844\text{ cm}^{-1}$  pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C-H (Slika 11). Navedene apsorpcijske vrpce su srednjeg intenziteta. Prisutnost C=C veze u svim snimljenim IR spektrima dodatno je potvrđena apsorpcijskom vrpcom u području  $1620\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ . U području od  $1650$  do  $1850\text{ cm}^{-1}$ , koje se pripisuje frekvenciji rastezanja svih karbonilnih skupina, asignirane su apsorpcijska vrpca pri  $1722$  i  $1710\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisutnost karbonilne skupine flavonskih derivata dok asignirane apsorpcijske vrpce pri  $1186$  i  $1103\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju istezanjima C-O i C-C veze etera koja potvrđuje prisutnost metoksi skupine prstena B flavonoida. Na osnovu asigniranih apsorpcijskih vrpca, može se potvrditi prisutnost hidroksilne i karbonilne skupine koje su karakteristične upravo za fenolne spojeve.



valni broj ( $\text{cm}^{-1}$ )

**Slika 11.** FTIR-spektar etil-acetatnih ekstrakata dobivenih klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat (—) i Soxhlet ekstrakcijom (—).

Usporedbom inteziteta u asigniranih apsorpcijskih vrpca ekstrakata **TV1 EtAc** i **TV2 EtAc** ukazuje na sličnu kemijsku strukturu izoliranih bioaktivnih spojeva s različitim udjelom pojedinih komponenata što je u suglasju s TLC-kromatografijom. Na osnovu asigniranih apsorpcijskih vrpca, može se potvrditi prisutnost funkcijskih skupina koje su karakteristične za fenolne spojeve prisutne u plodu trine, a primarno se to odnosi antocijane (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glucozid), flavonol glikozide (kvercetin, kamferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), te proantocijanidini tipa A koji su zastupljeni u ispitivanom materijalu.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Izolacija fenolnih spojeva provedena je ekstrakcijom po Soxhletu (metoda A) i klasičnom ekstrakcijom grijanjem u povrat uz 50%-tni etanol kao otapalo (metoda B) pri čemu je veći prinos bioaktivnih komponenata dobiven uporabom klasične ekstrakcije.
2. Masene koncentracije ukupnih fenola u biljnim ekstraktima ukazuju na veći udio spojeva dobiven klasičnom ekstrakcijom koja je iznosila 29,64 mg GAE/100 g trnine, u odnosu na ekstrakciju po Soxhletu koja je iznosila 7,12 mg GAE/100 g trnine, što je u skladu s literaturnim navodima.
3. Izolirane bioaktivne komponente karakterizirane su pomoću IR-spektroskopije. U snimljenim spektrima vidljive su apsorpcijske vrpce koje se pripisuju hidroksilnoj, esterskoj i karbonilnoj skupini što je karakteristično za fenolne spojeve, dok apsorpcijska vrpca pri  $619\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara glikozidnoj vezi dokazuje prisutnost flavonol glikozida. Na osnovu asigniranih apsorpcijskih vrpca može se potvrditi prisutnost funkcijskih skupina koje su karakteristične za fenolne spojeve prisutne u plodu trnine, a primarno se to odnosi na antocijane (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glukozid) flavonol glikozide (kvercetin, kamferol, mercitin), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivate kumarina, te proantocijanidini tipa A.
4. Nakon provedenih izolacija može se zaključiti da se u plodu trnine nalaze spojevi koji potencijalno mogu imati biološku aktivnost za što je potrebno provesti dodatne analize i ispitivanja.

## 6. LITERATURA

- [1] Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) *Methods for analysis of musts and wines*, 2.izd., John Wiley & sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- [2] Barros, L., Carvalho A. M., Sá Morais, J., Ferreira, I. C. F. R. (2001) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* **120** (1): 247-254.
- [3] Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: *European Atlas of Forest Tree Species*, (San-Miguel-Ayaz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), Luxembourg, str. 145.
- [4] Wolbiś, M., Olszewska, M., Wesołowski, W. J. (2001) Triterpenes and sterols in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **58** (6): 459-462.
- [5] Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Ranđelović, S. S., Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijska Industrija* **68**: 297-303.
- [6] Radovanović, B. C., Milenković Anđelković, A. S., Radovanović, A. B., Anđelković, M. Z. (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Trop J Pharmaceutical Research*. **12** (5): 813-819.
- [7] Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013) Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry* **141** (4): 3721-3730.
- [8] Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**: 1201-1205.
- [9] Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2** (12): 1231-1246.
- [10] Zacheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- [11] Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal* **2013**: 1-16.
- [12] Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279-290.
- [13] Olszewska, M., Głowacki, R., Wolbiś, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. **58** (3): 199-203.

- [14] Olszewska, M., Wolbís, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **58** (5): 367-372.
- [15] Pinacho, R., Caverro, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods* **19**: 49-62.
- [16] Wallace, T. C., Giusti, M. M. (2015) Anthocyanins. *Advances in Nutrition* **6**: 620-622.
- [17] Fang, J. (2014) Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews* **46** (4): 508–520.
- [18] Rapić, V. (2008) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, 2. izd., Školska knjiga, Zagreb
- [19] Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioprocess Processing* **89**: 67-72.
- [20] Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A., Gordon, M.H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4016-4021.
- [21] Tabaraki, R., Heidarizadi, E, Benvidi, A. (2012) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology* **98**: 16–23.
- [22] Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* **1217** (16): 2383-2389.
- [23] Reeves, R. N. (1994) Environmental analysis, 1. izd., John Wiley, New York
- [24] James, C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods, 1. izd., Blackie Academic & Professional, Glasgow
- [25] Pine, S. H. (1994) Organska kemija, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb
- [26] Galić, A., Dragović – Uzelac, V., Levaj, B., Bursać Kovačević, D., Plietić, S., Arnautović, S. (2009) The Polyphenols Stability, Enzyme Activity and Physico –Chemical Parameters During Producing Wild Elderberry Concentrated Juice. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **74**
- [27] Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, N. M., Ranđelović, S. S., Đorđević A. S., (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. Fruit. *Hemijska Industrija* **68** (3): 297–303.



## Izjava o izvornosti

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

Tamara Vulić