

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima kore mandarine (*Citrus reticulata*)

Johman, Karla

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:159:059094>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Karla Johman

7046/BT

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U ACETONSKIM
EKSTRAKTIMA KORE MANDARINE (*Citrus reticulata*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTCIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima kore
mandarine (*Citrus reticulata*)**

Karla Johman, 0058206312

Sažetak: U ovom radu proučavana je efikasnost ekstrakcije polifenola iz kore mandarinke, nusproizvoda nastalog tijekom postupka obrade mandarinke. Ekstrakcija je provedena refluksiranjem (1,5 h) na uzorcima usitnjene, svježe kore mandarinke primjenom vode, vodenih otopina acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v) i 99% -tnog acetona. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstrahiranim uzorcima kore mandarinke određen je UV/Vis spektrofotometrijskom metodom. Dobiveni rezultati su pokazali da je maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarinke pripremljenih s 50 i 70% -tnim otopinama acetona veći u odnosu na vodu, 25% -tnu otopinu acetona i 99% -tni aceton. Zaključno, provedeno istraživanje je pokazalo da se kora mandarinke može koristiti za relativno brzu i jednostavnu ekstrakciju polifenola, primjenom 50 i 70% -tnih vodenih otopina acetona.

Ključne riječi: biootpad, kora mandarine, polifenoli, refluksiranje, UV/Vis spektrofotometrija

Rad sadrži: 21 stranice, 11 slika, 8 tablica, 11 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Pomoć pri izradi: Darjan Pipić, tehnički suradnik

Datum obrane: 18. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Spectrophotometric determination of polyphenols from acetone extracts of
tangerine peel (*Citrus reticulata*)**

Karla Johman, 0058206312

Abstract: In this work was determined the efficiency of polyphenols extraction from tangerine peel, by-product produced during the tangerine processing. Extraction was performed by refluxing (1,5 h) on samples of grinded, fresh tangerine using water, water solution of acetone ($\rho = 25, 50$ and 70% , v/v) and 99% acetone. The content of total phenols and flavonoids in tangerine peel extracts was determined by UV/Vis spectrophotometric method. The obtained results showed that the mass fraction of total phenols and favonoids in tangerine peel extracts prepared with 50 and 70% solutions of acetone was higher compared with water, 25% acetone solution and 99% acetone. In conclusion, this study has shown that the tangerine peel can be used for relatively quick and easy polyphenols extraction by applying 50 and 70% acetone solutions.

Keywords: bio-waste, polyphenols, refluxing, tangerina peel, UV/Vis spectrophotometry

Thesis contains: 21 pages, 11 figures, 8 tables, 11 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Technical support and assistance: Darjan Pipić, Technical Associate

Defence date: 18th of September, 2017.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kora mandarine.....	2
2.2. Polifenoli.....	3
2.3. Ekstrakcija polifenola	5
2.4. Ekstrakcija refluksiranjem.....	6
2.5. UV/Vis spektrofotometrija.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. Materijal	7
3.2. Kemikalije.....	7
3.3. Aparatura i pribor	8
3.4. Metode rada	8
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka kore mandarinke refluksiranjem	9
3.4.2. Određivanje sadržaja vlage u kori mandarine	9
3.4.3. Određivanje boje acetonskih ekstrakata kore mandarine	10
3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida	10
3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola.....	10
3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola.....	11
3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida.....	12
3.4.4.4. Postupak određivanje ukupnih flavonoida.....	12
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	13
4.1. Određivanje sadržaja vlage u kori mandarine.....	13
4.2. Određivanje boje uacetonskih ekstrakata kore mandarinke.....	13
4.3. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida.....	14
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. POPIS LITERATURE.....	21

1. UVOD

Polifenoli su biološki aktivne tvari vrlo rasprostranjene u prirodi i značajno prisutne u ljudskoj prehrani. Po strukturi to su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku u prirodi, uglavnom su u esterificiranom ili konjugiranom obliku (Čović i sur, 2009.).

Polifenoli imaju jaka antioksidacijska svojstva pa stoga štite stanice od oštećenja uzrokovanog oksidacijskim stresom, čime se smanjuje rizik od bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, raka i neurodegenerativnih bolesti.

Postoji više od 8000 različitih vrsta polifenolnih spojeva koji su široko rasprostranjeni u ljudskoj prehrani. Prisutni su u biljnoj hrani kao što je voće, povrće, žitarice, čokolada te u napicima poput čaja, kave i vina. U ovom radu su opisane strukturne karakteristike polifenola s glavnim podskupinama, flavonoidima i fenolnim kiselinama.

Cilj eksperimentalnog dijela rada bila je izolacija polifenola iz kore mandarinke primjenom metode refluksiranja, kao konvencionalne tehnike ekstrakcije. Provedene su dvije ekstrakcije uzoraka, a potom su spektrofotometrijskim testom izmjerene apsorbancije, određene masene koncentracije, odnosno maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarinke.

Provedeno istraživanje sastojalo se iz:

- pripreve ekstrakata kore mandarine metodom refluksiranja (1,5 h) s vodom, vodenim otapinama acetona ($\rho = 25, 50$ i 70%) i 99% -tnim acetonom.
- određivanja ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima kore mandarine, upotrebom spektrofotometrije u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja.
- određivanja boje ekstrakata
- odabira optimalnih uvjeta ekstrakcije koji će se koristiti tijekom budućih priprema ekstrakata kore mandarine, biootpada nastalog tijekom industrijske proizvodnje sokova.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kora mandarine

Mandarina ili mandarinka (lat. *Citrus reticulata*) je biljka iz porodice Rutaceae, a pripada rodu Citrusa (Slika 1). Mandarine su zimzelene biljke, narastu do oko 3 metra visine, sa širim listovima od ostalih citrusa. Najbolje uspijeva u suptropskim krajevima jer je posebno osjetljiva na niske temperature. U Hrvatskoj se uzgaja u dolini rijeke Neretve. Mandarina pripada grupi zimskog sezonskog voća. Kao takva, vrlo je cijenjena zbog svojih hranjivih sastojaka i antioksidacijskih svojstava. Cijeli se plod može preraditi u visokovrijedne namirnice, a kora mandarine, koja je u središtu razmatranja u ovome radu, može poslužiti kao sirovina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Razlog koji bi čovjeka ponukao da ne odbacuje koru mandarine je svjesnost o hranjivoj vrijednosti te sadržaju kemijskih spojeva koji povoljno utječu na zdravlje čovjeka. Kora kao sirovina najviše služi za dobivanje esencijalnog ulja. Odlikuje se bogatstvom različitih kemijskih spojeva: proteina, vitamina, minerala, karotenoida, polifenola (Rincón, 2005.).

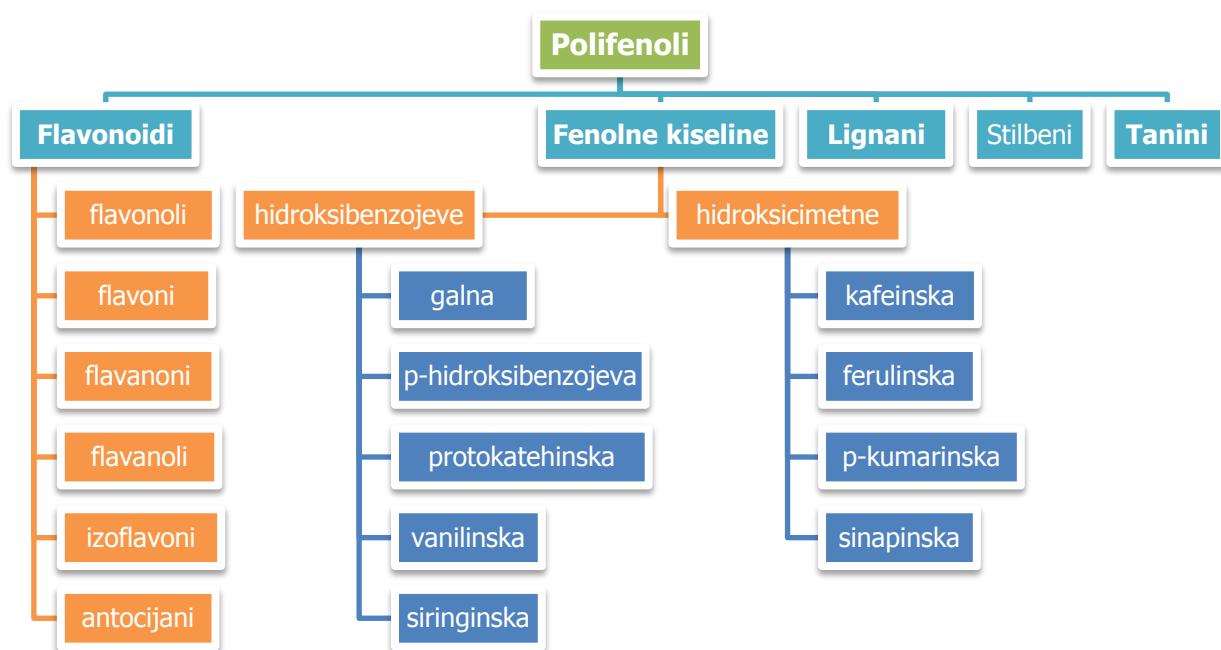


Slika 1. Sistematika mandarinke ili mandarine.

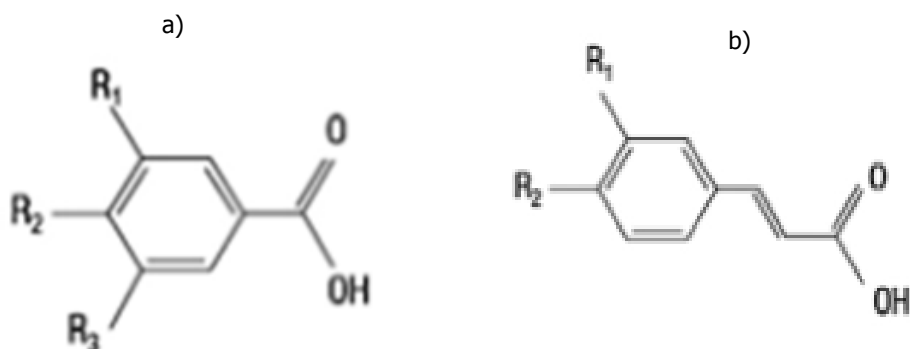
2.2. Polifenoli

Polifenoli predstavljaju skupinu molekula biljnog podrijetla. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina. (Dai i Mumper, 2010). Biosintetski put fenolnih spojeva u biljci uključuje putove šikiminske kiseline, fenilpropanoida i flavonoida. Polifenoli podrazumijevaju veliku skupinu sekundarnih metabolita. Obuhvaćaju jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, ali i velike polimerizirane spojeve (Ignat i sur., 2011).

Polifenoli se mogu klasificirati u nekoliko skupina (Slika 2.). Polifenole sačinjavaju: fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni, lignani i tanini. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline imaju C_6-C_1 strukturu, a čine ih galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Hidroksicinaminske kiseline sa pobočnim lancem od tri ugljika (C_6-C_3), najčešće su kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina. Osnovne strukture fenolnih kiselina prikazane su na Slici 3.

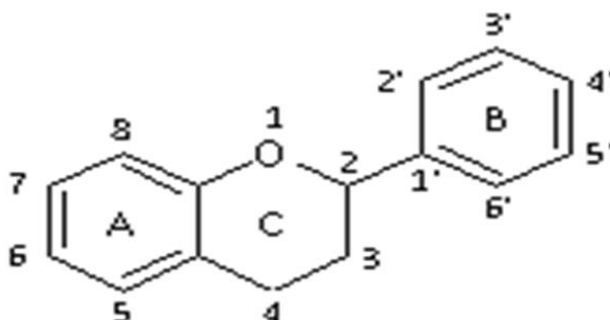


Slika 2. Shematski prikaz podjele fenola.



Slika 3. Hhidroksibenzojeve (a) i hidroksicinaminske (b) kiseline (Ignat i sur., 2011).

Flavonoidi čine najveću skupinu biljnih fenola. Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličnim piranskim prstenom (C prsten) (Slika 4). Danas je identificirano više od 6000 flavonoida. Flavonoidi se mogu podijeliti u različite kategorije kao što su flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, antocijani. Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Oko 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3, a manje u položaju 7. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).

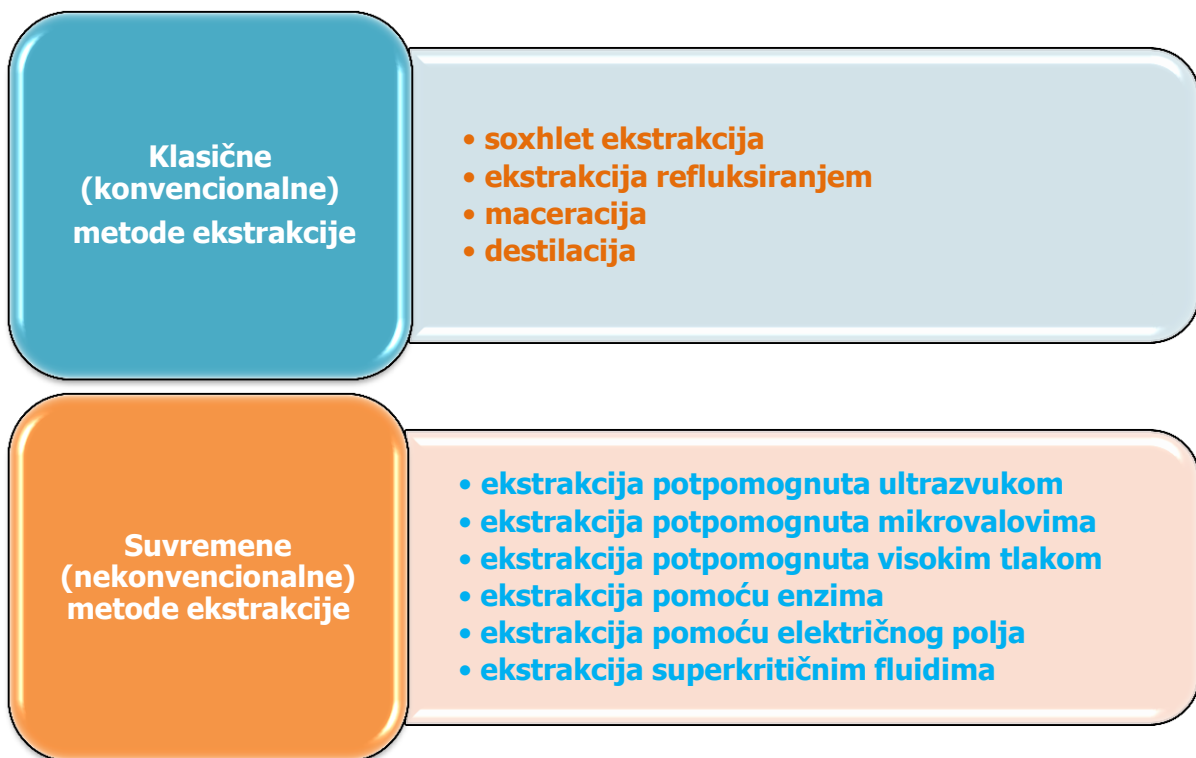


Slika 4. Opća strukturalna formula flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

2.3. Ekstrakcija polifenola

Postoje različite metode ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala (Slika 5.). Na njihovu uspješnost utječu čimbenici kao što su: vrsta otapala, temperatura, omjer otapala i uzorka, trajanje ekstrakcije te broj ponavljanja ekstrakcije. Važno je poznavanje svojstava polifenolnih spojeva prisutnih u biljnom materijalu, kako bi se navedeni čimbenici mogli optimalno odabrati i primijeniti u postupku.

Ekstrakcijske metode možemo podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne. Klasične metode kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i destilacija, temelje se na topljivosti tvari u različitim otapalima (Azmir i sur., 2013). Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije karakterizira kraće vrijeme ekstrakcije i niže temperature, smanjenje korištenja otapala štetnih za okoliš, manji troškovi procesa i postizanje veće efikasnosti ekstrakcije (Khoddami i sur., 2013). Za ekstrakciju polifenola primjenjuju se različita otapala i to voda, aceton, etil-acetat, alkoholi (metanol, etanol, propanol). Odabir otapala, kao i volumnog udjela otapala u vodenoj fazi može utjecati na prinos polifenola. No, važno je uzeti u obzir i utjecaj temperature i vremena. Naime, povećanjem temperature može doći do degradacije polifenola i nepoželjnih reakcija (npr. enzimski oksidacija).



Slika 5. Shematski prikaz metoda ekstrakcije.

2.4. Ekstrakcija refluksiranjem

Refluksiranje je konvencionalna metoda ekstrakcije, koja se provodi pri povišenoj temperaturi pri čemu se materijal zagrijava s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom. Uključuje kondenzaciju para i povrat tog kondenzata u sustav iz kojeg potječe. Koristi se u industriji i laboratorijima. Prednost refluksiranja je velika uspješnost ekstrakcije, a njeni nedostaci su: dugo vrijeme ekstrakcije, primjena velikih količina otapala te mogućnost ekstrahiranja interferenata, pa je takve ekstrakte potrebno dodatno pročititi. Ekstrahirani materijal se mora odvojiti od otopine s analitom te je kod ove tehnike potrebno provesti i filtriranje ili dekantiranje.

2.5. UV/Vis spektrofotometrija

Spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja je jedna je od najčešće korištenih metoda u analitičkoj kemiji. Prikladna je za identifikaciju i određivanje kemijskih vrsta (organske i anorganske), koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama 200-400 nm (UV područje), odnosno od 400-800 nm (Vis područje). Kemijske vrste koje ne apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje mogu se određivati nakon kemijske reakcije kojom se prevode u derivate koji apsorbiraju. Apsorpcija zračenja je definirana Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \varepsilon b c$$

gdje je A - apsorbancija, ε - molarni apsorpcijski koeficijent, c - množinska koncentracija i b - debljina sloja otopine. Iz zakona je vidljivo da je apsorbancija linearno ovisna o koncentraciji analita, što omogućuje jednostavno računanje koncentracije iz izmjerene apsorbancije. Pri određivanju je potrebno imati baždarni dijagram (ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda). Za mjerenje apsorbancije se koristi spektrofotometar, uređaj koji se sastoji od: izvora svjetlosti, selektora valnih duljina (monokromatora), kiveta za uzorak, detektora (fotoćelije koja mjeri intenzitet zrake svjetlosti) i procesora signala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Mandarinka sakupljena u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska). Svježa, oguljena kora mandarinke je isjeckana, usitnjena u blenderu, te smrznuta do početka provođenja ekstrakcije.



Slika 5. Svježa kora mandarinke.

3.2. Kemikalije

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

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 40 – 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Boce za čuvanje otopina od 300 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Povratno hladilo
- Propipeta
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Uljna kupelj

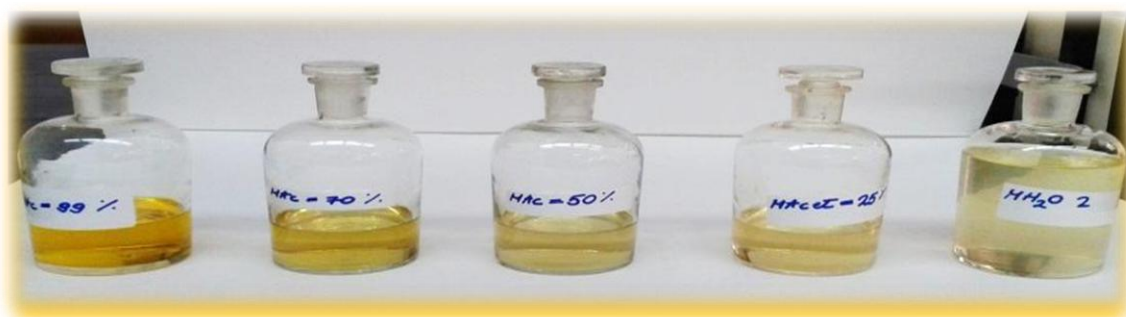
3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su slijedeće analitičke tehnike: gravimetrijsko određivanje udjela vlage u kori mandarinke, ekstrakcija refluksiranjem, određivanje boje (L , a i b parametara) u ekstraktima kore mandarinke, te udjela ukupnih fenola i flavonoida UV/Vis spektrofotometrijom. Određivanje masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida temelji se na:

- kolornoj reakciji fenolnih spojeva sa smjesom fosforvolframove i fosfomolibdenske kiseline tj. s Folin-Ciocalteu reagensom (Agbor i sur., 2014.)
- formiranju stabilnog aluminijsko-flavonoid kompleksa između aluminijske i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola (Pekal i Pyrzyńska, 2014).

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka kore mandarine refluksiranjem

Provedena je ekstrakcija polifenola metodom refluksiranja na uzorcima usitnjene, svježe kore mandarine. 5,000 g samljevenog uzorka ekstrahirana su s 100 mL vode, vodenih otopina acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v) i 99% -tnim acetonom. Ekstrakcija je trajala 1,5 h, na povišenoj temperaturi (temperatura vrelišta otapala). Nakon provedene ekstrakcije uzorci su ručno stiješteni kroz gazu, a potom su ekstrakti dodatno procijeđeni kroz cijedilo, filtrirani kroz obični filter papir u odmjernu tikvicu od 100 mL, te do oznake nadopunjeni otapalom korištenim za ekstrakciju. Tako pripremljeni ekstrakti su do početka analize čuvani u hladnjaku, u staklenim bocama na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Slika 7).



Slika 7. Ekstrakti kore mandarine dobiveni metodom refluksiranja (vlastita fotografija).

3.4.2. Određivanje sadržaja vlage u kori mandarinke

Usitljeni uzorci svježe kore mandarinke odvagani u suhe aluminijske posudice stavljeni su u sušionik na $105 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 h. Nakon sušenja posudice s uzorkom su ohlađene u eksikatoru 1 h, a zatim su ponovno vagane. Postupak sušenja i vaganja ponavljan je više puta, sve dok nije dobivena konstantna, nepromijenjena masa (m_3). Udio vlage u uzorku izračunat je prema:

$$w(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

gdje je m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g), m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.4.3. Određivanje boje ekstrakata kore mandarinke

Boja ekstrakata kore mandarinke dobivena refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama acetona ($\rho = 25, 50, 70$) i čistom 99 %-tnom acetonu određena je CM-3500d kolorimetrom po CIE L, a, b sistemu, razrađenom po uputama CIELab-a (Commission Internationale de L'Eclairage - Međunarodna komisija za regulaciju svjetla). Metoda se zasniva na kolorimetrijskom, kvantitativnom određivanju vrijednosti svjetline (L), udjela crvene (a) i udjela žute boje (b). L, a i b vrijednosti podudaraju se sa sljedećim rasponima boja:

- a^* vrijednost: zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$)
- b^* vrijednost: plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$)
- L^* vrijednost: svjetlo -bijelo ($L^* = 100$) ili tamno-crno ($L^* = 0$)

Dobivene vrijednosti acetonskih ekstrakata kore mandarinke uspoređene su s vrijednostima izmjerenim za vodeni ekstrakt kore mandarinke (referentni uzorak). Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka ($L^* a^* b$) prema:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

$$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}}$$

$$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}}$$

$$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}}$$

$$\Delta E = E_{\text{uzorak}} - E_{\text{standard}}$$

3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida

3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu reagensa ($c = 0,2 \text{ M}$)

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL, 2 M Folin-Ciocalteu (FC) reagensa i do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v)

200 g Na_2CO_3 otopljeno je u 800 mL ključale destilirane vode i nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 1000 mL, te je dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Otopina je nakon 24 h profiltrirana.

3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Postupak određivanja ukupnih fenola sastojao se od izrade baždarnog dijagrama i određivanja masenog udjela fenola u ekstraktima kore mandarinke priređenih s vodom, vodenim otopinama acetona (25, 50, 70 %) i 99 %-tnim acetonom. Za izradu baždarnog dijagrama priređena je ishodna standardna otopina galne kiseline tako da je odvagano 0,25 g galne kiseline i otopljeno u 10 mL acetona nakon čega je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL, koja je potom nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Iz ishodne otopine galne kiseline, pripremljen je niz pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L (Slika 6). Pojedinoj standardnoj otopini izmjerena je apsorbancija nakon što je otpipetiran 1,0 mL pojedine standardne otopine u odmjernu tikvicu od 25 mL, dodano 10 mL destilirane vode i 1,3 mL 0,2 M otopine FC reagensa (žuto obojan). Nakon 5 minuta dodano je 3,75 mL 20%-tne otopine Na_2CO_3 i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Tako priređene otopine su čuvane 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, a potom im je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm.

Za analizu uzoraka otopine su pripremljene na isti način kao i za mjerenje apsorbancije standardnih otopina, ali umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,4 mL uzorka. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 ili 0,4 mL).



Slika 8. Standardne otopine pripremljene za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (vlastita fotografija).

3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- Otopina natrijeva nitrita (5 %, w/v)
Odvagano je 5 g NaNO₂ i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijska klorida (10 %, w/v)
Odvagano je 10 g AlCl₃ i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida (c = 1 M)
Odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

3.4.4.4. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida također je bilo potrebno izraditi baždarni dijagram. U tu svrhu 0,1000 g rutina je otopljeno u 10 mL metanola, a zatim je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja je potom nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Ovako priređena ishodna otopina rutina služila je za pripremu 6 individualnih standardnih otopina masenih koncentracija 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L (Slika 8.). Za određivanje njihove apsorbancije, otpipetirano je 2 mL pojedine standardne otopine u staklene kivete, dodano je 2 mL destilirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO₂ i 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl₃ (nakon 5 minuta). Nakon sljedećih 6 minuta dodano je 2 mL 1 M otopine NaOH, pri čemu dolazi do stvaranja stabilnih, obojanih aluminijsko-flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 510 nm. Za mjerenje apsorbancije uzoraka otopine su pripravljene na isti način kao i standardi, ali umjesto 2 mL standarda otpipetirano je 0,4 mL otopine acetonskih ekstrakata kore mandarinke (Slika 7) i 5 ml destilirane vode. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (2 i 0,4 mL).



Slika 9. Standardne otopine pripremljene za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida (vlastita fotografija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati:

- gravimetrijskog određivanja sadržaja vlage u svježoj, usitnjenoj kori mandarine.
- UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarinke dobivenih refluksiranjem (1,5 h) s vodom, vodenim otopinama acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v) i 99% -tnom acetonu.
- određivanja L , a i b parametara boje u gore navedenim ekstraktima kore mandarinke.

4.1. Određivanje sadržaja vlage u kori mandarinke

Gravimetrijskom analitičkom metodom određen je sadržaj vlage u uzorcima svježe, usitnjene kore mandarinke. Nakon učestalog sušenja (4 h) i hlađenja u eksikatoru (1 h) konačna dobivena vrijednost udjela vlage za četiri paralelna (Tablica 1) određivanja iznosi $72,469 \%$.

Tablica 1. Rezultati određivanje sadržaja vlage u uzorcima kore mandarinke.

Uzorak kore mandarinke	w (vlage)/(%)	w (vlage)/(%) \pm SD*
1-KJ	72,3207	72,469 \pm 0,074
2-KJ	72,5019	
3-KJ	72,5774	
4-KJ	72,4750	

* $N = 4$

4.2. Određivanje boje u ekstraktima kore mandarinke

Prije određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) određena je boja, odnosno L , a i b parametri, a zatim je ΔE vrijednost izračunata korištenjem vodenog ekstrakta kore mandarinke kao referentnog uzorka.

Tablica 2. Parametri boje određeni u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) dobivenih refluksiranjem.

Uzorak	Otapalo	ρ (otapalo)/%	L^*	a^*	b^*	ΔE
1-KJ	H ₂ O	/	96,43	-1,09	6,47	0
2-KJ	Aceton	25	98,29	-3,19	11,04	5,36
3-KJ		50	97,93	-3,19	11,52	5,67
4-KJ		70	97,68	-3,19	18,77	12,54
5-KJ		99	96,46	-3,19	44,59	38,18

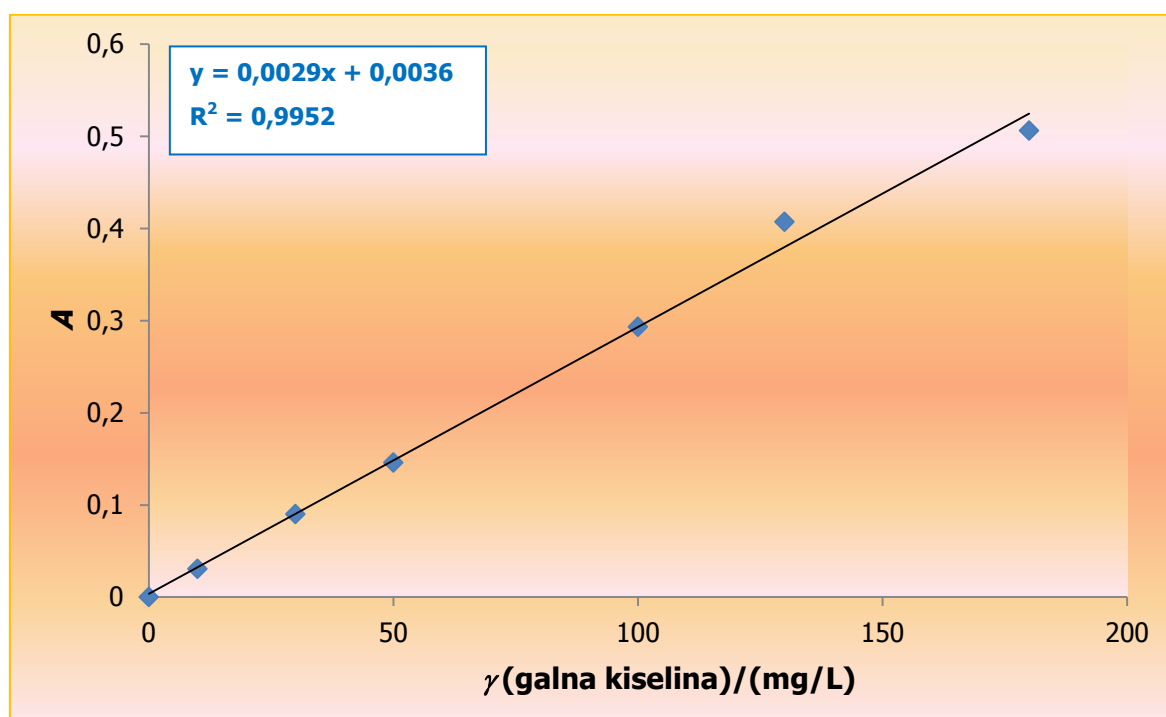
Dobiveni rezultati pokazuju da se L^* vrijednosti smanjuju (od 98,29 do 96,46) povećanjem volumnog udjela korištenog otapala (od 25 do 99 %) u odnosu na referenti uzorak (voda). Izmjerene a vrijednosti su jednake kod svih acetonskih ekstrakata, dok se b vrijednosti povećavaju, što znači da se s povećanjem volumnog udjela otapala, povećava i obojenost ekstrakata. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da otapalo, odnosno volumni udio otapala u vodenoj fazi ili čisto otapalo utječe na parametre boje, a time i na primjenu pripremljenih ekstrakata u različite svrhe.

4.3. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u ekstraktima kore mandarine pripremljenih refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama acetona ($\rho = 25, 50$ i 70 %, v/v) i 99 %-tnom acetonu bilo je potrebno izraditi baždarne dijagrame. Tablice 3 i 4 prikazuju vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline, odnosno rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih su izrađeni baždarni dijagrami. Iz regresijskih pravaca (Slike 10 i 11) izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli UF i UFL izraženi su kao mg galne kiseline, odnosno mg rutina na g ekstrahirane kore mandarine.

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

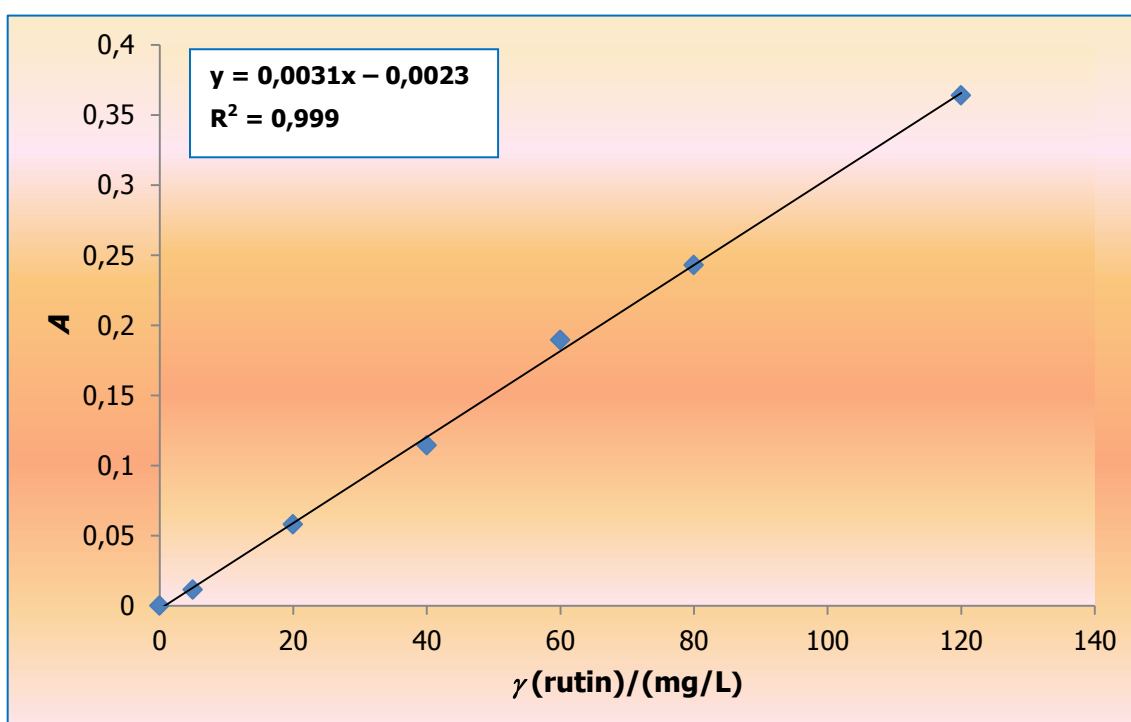
Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	A
0	0	0
1	10	0,031
2	30	0,090
3	50	0,146
4	100	0,293
5	130	0,407
6	180	0,506



Slika 10. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	γ (rutin)/(mg/L)	A
0	0	0
1	5	0,012
2	20	0,058
3	40	0,115
4	60	0,190
5	80	0,243
6	120	0,364



Slika 11. Baždarni dijagram rutina.

U Tablicama 5 i 6 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine pripremljenih refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v) i 99% -tnom acetonu dobivenih nakon dvije paralelno provedene ekstrakcije refluksiranjem.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) dobivenih nakon prve ekstrakcije refluksiranjem.

Uzorak	ρ (otapalo)/%	A \pm SD	γ (UF)/(mg/L) \pm SD	w(UF)/(mg/g) \pm SD	
1-KJ	H ₂ O	/	0,152 \pm 0,002	320,7 \pm 4,1	64,1 \pm 0,8
2-KJ		25	0,267 \pm 0,003	566,6 \pm 7,5	113,3 \pm 1,5
3-KJ	Aceton	50	0,458 \pm 0,007	978,8 \pm 14,6	195,7 \pm 2,9
4-KJ		70	0,480 \pm 0,002	1026,0 \pm 3,8	205,2 \pm 0,8
5-KJ		99	0,208 \pm 0,001	439,4 \pm 1,1	87,9 \pm 0,2

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) dobivenih nakon druge ekstrakcije refluksiranjem.

Uzorak	ρ (otapalo)/%	A \pm SD	γ (UF)/(mg/L) \pm SD	w(UF)/(mg/g) \pm SD	
6-KJ	H ₂ O	/	0,159 \pm 0,001	335,5 \pm 1,6	67,1 \pm 0,3
7-KJ		25	0,265 \pm 0,001	562,6 \pm 1,9	112,5 \pm 0,4
8-KJ	Aceton	50	0,462 \pm 0,002	988,5 \pm 3,8	197,7 \pm 0,8
9-KJ		70	0,501 \pm 0,003	1071,4 \pm 7,0	214,3 \pm 1,4
10-KJ		99	0,319 \pm 0,001	678,7 \pm 1,1	135,7 \pm 0,2

Kod obje ekstrakcije refluksiranjem (provedene pri istim ekstrakcijskim parametrima) može se uočiti da je topljivost fenola najveća u ekstraktima kore mandarinke (uzorci 3-KJ, 4-KJ, 8-KJ i 9-KJ) pripremljenih s acetonom volumnih udjela od 50 i 70 %. Topljivost fenola je najmanja u vodi, a niski prinosi se dobivaju i kod 25 i 99 %-tnih ekstrakata kore mandarinke. Maseni udjeli ukupnih fenola kod 99 %-tnih ekstrakata variraju između dvije paralelno provedene ekstrakcije. Razlozi tako dobivenih vrijednosti se mogu potkrijepiti činjenicom da je tijekom određivanja ukupnih fenola došlo do zamućenja (stvaranja bijelog taloga), pa spektrofotometrijsko određivanje nije ni moglo biti točno. Dakle, 99 %-tni aceton nije pogodno primjenjivati za ekstrakciju fenola iz kore mandarinke.

I istraživanje Do i sur. (2014) na biljci *Limnophila aromatica* je pokazalo da prinos ekstrakcije značajno ovisi o izboru otapala kao i volumnom udjelu otapala u vodenoj fazi. Tako se

najbolji rezultati dobivaju upotrebom 50 %-tnog, u odnosu na 75 %-tni aceton, etanol i metanol, te čisto organsko otapalo.

Očito je da vodene otopine organskih otapala osiguravaju efikasniju ekstrakciju, što je potvrđeno i u ovom radu.

U Tablicama 7 i 8 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarine pripremljenih refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v) i 99 %-tnim acetonom dobivenih nakon dvije paralelno provedene ekstrakcije refluksiranjem.

Tablica 7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) dobivenih nakon prve ekstrakcije refluksiranjem.

Uzorak	ρ (otapalo)/%	A \pm SD	γ (UFL)/(mg/L) \pm SD	w(UFL)/(mg/g) \pm SD	
1-KJ	H ₂ O	/	0,028 \pm 0,001	20,3 \pm 0,6	4,1 \pm 0,1
2-KJ	Aceton	25	0,051 \pm 0,001	35,1 \pm 0,5	7,0 \pm 0,1
3-KJ		50	0,087 \pm 0,000	58,8 \pm 0,3	11,7 \pm 0,1
4-KJ		70	0,089 \pm 0,001	60,2 \pm 0,6	12,0 \pm 0,1
5-KJ		99	0,046 \pm 0,000	31,8 \pm 0,2	6,4 \pm 0,1

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine acetona i aceton) dobivenih nakon druge ekstrakcije refluksiranjem.

Uzorak	ρ (otapalo)/%	A \pm SD	γ (UFL)/(mg/L) \pm SD	w(UFL)/(mg/g) \pm SD	
6-KJ	H ₂ O	/	0,03 \pm 0,001	21,4 \pm 0,3	4,3 \pm 0,1
7-KJ	Aceton	25	0,056 \pm 0,001	38,4 \pm 0,5	7,7 \pm 0,1
8-KJ		50	0,081 \pm 0,001	54,9 \pm 0,8	11,0 \pm 0,2
9-KJ		70	0,086 \pm 0,001	58,4 \pm 0,7	11,7 \pm 0,1
10-KJ		99	0,049 \pm 0,004	33,8 \pm 2,5	6,8 \pm 0,5

Kao i kod ukupnih fenola, rezultati određivanja flavonoida ponovno pokazuju da 50 i 70 %-tni acetonski ekstrakti daju najveće masene udjele UFL, pa su otapala tih volumnih udjela najprikladnija za daljnju ekstrakciju uzoraka kore mandarinke. Vodeni ekstrakti daju najmanje flavonoida, što vodu čini lošijim ekstrakcijskim sredstvom. Slično se ponašaju 25 i 99 %-tni ekstrakti u kojima prinosi UFL iznose 7,4 mg/g, odnosno 6,6 mg/g.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je predložena mogućnost upotrebe kore mandarinke, biootpada nastalog u procesima obrade mandarinke, pri izolaciji polifenola metodom refluksiranja (1,5 h).

Određivanjem masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine, primjenom konvencionalne ekstrakcijske metode, te vode, 99 %-tnog acetona i vodenih otopina acetona ($\rho = 25, 50$ i 70% , v/v), utvrđena su otapala, odnosno volumni udjeli otapala u kojima je topljivost polifenola najveća.

Najveći udjeli su dobiveni upotrebom 50 i 70 %-tnih vodenih otopina acetona, što znači da bi se navedeni volumni udjeli mogli koristiti u daljnjim postupcima ekstrakcije kore mandarinke, primjenom nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika.

6. POPIS LITERATURE

- Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science* **8**: 147-156.
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426-436.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Polyphenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203.
- Čović D., Bojić M., Medić-Šarić M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik*. **65**: 693-704.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and the antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**: 7313-7352.
- Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E., Ismadji S., Ju Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* **22**: 296-302.
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.
- Kazazić, S. P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada toksikologiju* **55**: 279-290.
- Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **15**: 3378-3390.
- Pekal A., Pyrzynska K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* **7**: 1776-1782.
- Rincon, A. M., Vasquez, A. M., and Padilla, F. C. (2005) Chemical composition and bioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **55**: 305-310.

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.

Karla Jchuau

ime i prezime studenta