Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline

Jurković, Petra

Master's thesis / Diplomski 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:159:847484

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017

Petra Jurković
761/PI

IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINE EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Klare Kraljić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta br. 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Klari Kraljić na vrhunskoj i stručnoj pomoći uz puno razumijevanja, strpljenja i prijateljskih savjeta kod izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se prof.dr.sc. Dubravki Škevin koja me zainteresirala za područje ovog rada kroz svoja zanimljiva i stručna predavanja te izrazito topli pristup studentima.

Hvala Manueli Panić na pomoći kod izrade eksperimentalnog rada svojim stručnim i prijateljskim savjetima te prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković koja mi je ustupila mjesto u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kako bi odradila ekperimentalni dio ovog rada.

Naposljetku, veliko hvala mojim roditeljima, osobama bez kojih ne bi mogla započeti niti završiti ovaj studij, hvala im na podršci kao i mojim sestrama Ani i Ivi, dečku Antoniu, svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene kroz cijelo moje studiranje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE MASLINE

Petra Jurković 761/PI

Sažetak: Zadaća zelene kemije je zamijeniti konvencionalne metode ekstrakcije sa novim, ekološki prihvatljivijim metodama. Cilj ovog rada bio je odabrati otapalo i metodu te parametre (udio vode u otapalu, snaga mikrovalova, vrijeme trajanja ekstrakcije) za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine masline u skladu s principima zelene kemije. Korištena su eutektička otapala kao zamjena za metanol te metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom s ciljem ubrzavanja procesa ekstrakcije. Kao najpogodnije eutektičko otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine masline pokazao se kolin citrat. Najveći udio fenolnih spojeva ekstrahiran je metodom ekstrakcije potpomognutom djelovanjem mikrovalova. Optimalni parametri ekstrakcije su udio vode u otapalu 30%, vrijeme ekstrakcije 12 minuta te snaga mikrovalova od 300 W. Djelovanjem mikrovalova na ekstrakciju fenolih spojeva uz odabrane parametre, proces ekstrakcije je skraćen za 92% te je ekstrahirano 28% više fenolnih spojeva u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije metanolom.

Ključne riječi: eutektička otapala, fenolni spojevi, ekstrakcija, mikrovalovi, komina masline

Rad sadrži: 41 stranica, 10 slika, 14 tablica, 37 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. Klara Kraljić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. doc. dr. sc. Klara Kraljić
3. prof. dr. sc Dubravka Škevin
4. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM OLIVE POMACE

Petra Jurković 761/PI

Abstract: The task of green chemistry is to replace conventional extraction methods with new, environmentally acceptable methods. The aim of this paper was to determine the most suitable solvent and method parameters (solvent water content, microwave power, extraction time) for the extraction of phenolic compounds from olive pomace according to green chemistry. Eutectic solvents were used as substitution for methanol. Extraction by microwaves and ultrasonic were used to accelerate the extraction process. The most effective eutectic solvent for the extraction of phenolic compounds in olive pomace was choline citrate. The highest proportion of phenolic compounds was extracted by microwaves extraction. Specified extraction parameters include 30% water in the solvent, 12 minutes extraction time, and microwave power 300 W. Using microwave assisted extraction of phenolic compounds with selected parameters resulted in reduction of extraction time by 92% and increase of phenolic yield for 28% when compared to conventional methanol extraction method.

Keywords: eutectic solvents, phenolic compounds, extraction, microwaves, olive pomace

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 14 tables and 37 references

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. Klara Kraljić, Assistant professor

Reviewers:
1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
2. PhD. Klara Kraljić, Full professor
3. PhD. Dubravka Škevin, Associate professor
4. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor

Thesis defended: July 19, 2017

Sadržaj **stranica**

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Komina masline 2
2.2. Eutektička otapala 6
2.2.1. Fizikalno- kemijska svojstva eutektičkih otapala 8
2.2.2. Sinteza eutektičkih otapala 10
2.3. Upotreba novih tehnologija u ekstrakciji fenolnih spojeva 12
3. EKSPERIMENTALNI DIO 16
3.1. Materijali 16
3.1.1. Uzorak 16
3.1.2. Kemikalije 16
3.1.3. Standardi fenolnih spojeva 16
3.2. Metode rada 17
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva na tresilici 17
3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru/reaktoru 18
3.2.3. Dizajn eksperimenta 19
3.2.4. Određivanje sastava fenolnih spojeva komine maslina 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1. Odabir prirodnog eutektičkog otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva komine maslina 23
4.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva pomoću mikrovalno-ultrazvučnog ekstraktora 25
4.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom 26
4.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta mikrovalovima 28
4.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka 31
4.2.4. Odabir optimalnih uvjeta ekstrakcije fenolnih spojeva komine maslina 33
5. ZAKLJUČAK 36
6. LITERATURA 37

1. UVOD

Maslina (lat. *Olea europea*) je zimzelena suptropska biljka s jestivim plodom (maslina) od kojeg se proizvodi visokovrijedno maslinovo ulje. Kao nusprodukt u proizvodnji maslinovog ulja dobiva se komina masline. Komina se sastoji od mesnog tkiva i koštice. U svom sastavu sadrži fenolne spojeve, organske kiseline i lipide zbog čega kao otpad postaje fitotoksična i opasna za okoliš, no ti spojevi su visokovrijedni zbog antioksidacijskih, antimikrobnih, protuupalnih i drugih djelovanja. Zbog svog bogatog sastava korisno je kominu iskoristiti za dobivanje ulja komine, kao kompost, kao gorivo, za dobivanje aktivnog ugljena, kao stabilizator tla, za dobivanje visokovrijednih spojeva, ali ju prije upotrebe treba obraditi.

Vrijedni sastojci komine masline kao što su fenolni spojevi, mogu se izdvojiti postupkom ekstrakcije. Uobičajene metode ekstrakcije fenolnih spojeva su dugotrajne te zahtijevaju upotrebu organskih otapala koja su štetna za okoliš. Kako bi se sačuvao okoliš razvija se zelena kemija koja ima u cilju ponuditi ekološki prihvatljivija rješenja, između ostalog i otapala koja neće štetiti okolišu. Takva otapala su eutektička otapala. Eutektička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina. Kao supstrati za sintezu eutektičkih otapala koriste se lako dostupni, jeftini, sigurni, netoksični i biorazgradivi spojevi. Osim štetnosti otapala problem ekstrakcije je i dugotrajnost procesa. Kako bi se skratilo vrijeme ekstrakcije, uštedila energija i materijali potrebni za proces ekstrakcije sve se više razvija primjena novih tehnologija kao što su ultrazvuk i mikrovalovi.

Cilj ovoga rada biti će odabrati prirodno eutektičko otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva komine maslina te optimirati sam proces ekstrakcije koristeći mikrovalno ultrazvučni rekator/ekstraktor.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Komina masline

Maslina (lat. Olea europea) je zimzelena suptropska biljka s jestivim plodom (maslina) čije stablo naraste do visine 10 m. Botanički pripada porodici Oleaceae te rodu Olea. Najveći proizvođači maslina i maslinovog ulja su mediteranske zemlje (Španjolska, Italija) (Nogueria, 2015).

Dva su načina proizvodnje ulja: trofazni i dvofazni proces. Trofaznim procesom nastaje visokovrijedno ulje te komina i vegetabilna voda koje predstavljaju veliki problem onečišćenja. Dvofazni proces je rješenje kojim ne nastaje vegetabilna voda, ali nastane komina masline koja sadrži 52 – 64% vode i potrebna je velika količina energije kako bi se dobila osušena komina. Komina masline je nusprodukt u proizvodnji maslinovog ulja dobivena drobljenjem i cijeđenjem maslinovih plodova. Njezin sastav ovisi o sorti masline i metodi proizvodnje ulja. Komina se sastoji od mesnog tkiva ploda koji sadrži znatnu količinu hranidbenih komponenata kao što su bjelančevine, masti, mineralne tvari, vlakna te čvrstih dijelova koštica sastavljenih uglavnom od sirovih vlakana (Vega-Galvez i sur., 2010).

Komina u svom sastavu sadrži fenolne spojeve, organske kiseline i lipide zbog čega kao otpad postaje fitotoksična i opasna za okoliš, no ti spojevi su visokovrijedni zbog antioksidacijskih, antimikrobnih, protuupalnih i drugih djelovanja. Od šećera prisutni su manitol, saharoza i fruktoza koji stvaraju dobru osnovu za rast mikroorganizama. U komini se nalaze i ostaci stanica maslina s velikom količinom polisaharida pektina i hemiceluloznih polimera bogatih ksilenom i ksiloglutakanima. Fenolni spojevi, ulja i proteini čine mali dio ukupnog organskog sastava komine (Nogueria i sur., 2015). U slučaju ekstrakcije primjenom metoda koje mogu sačuvati njihova svojstva, mogu se iskoristiti za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju. Zbog svog bogatog sastava vrijedan je izvor organskih spojeva i hranjivih tvari pa je korisno kominu iskoristiti za dobivanje ulja komine, kao kompost, kao gorivo, za dobivanje aktivnog ugljena, kao stabilizator tla, za dobivanje visokovrijednih spojeva (Attom i Al-Shafir, 1998; El-Hamouz i sur., 2007; Gonzalez Paramas i sur., 2004; Roig i sur., 2006).

Komina sadrži oko 93 % organskih tvari što ju čini pogodnom kao dopuna za tla. Zbog zaostalog ulja u komini potrebna je prethodna obrada jer ulje negativno utječe na hidrataciju tla (Abu-Zreig i Al-Widyan, 2002). Sastav komine masline prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Organski sastav komine masline (Nogueria i sur., 2015)

SASTOJAK	UDIO
Lignin	32-55%
Hemiceluloza	27-41%
Celuloza	14-25%
Masti	7-19%
Proteini	4-11%
Topljivi ugljikohidrati	1-16%
Topljivi fenoli	0,6-2%

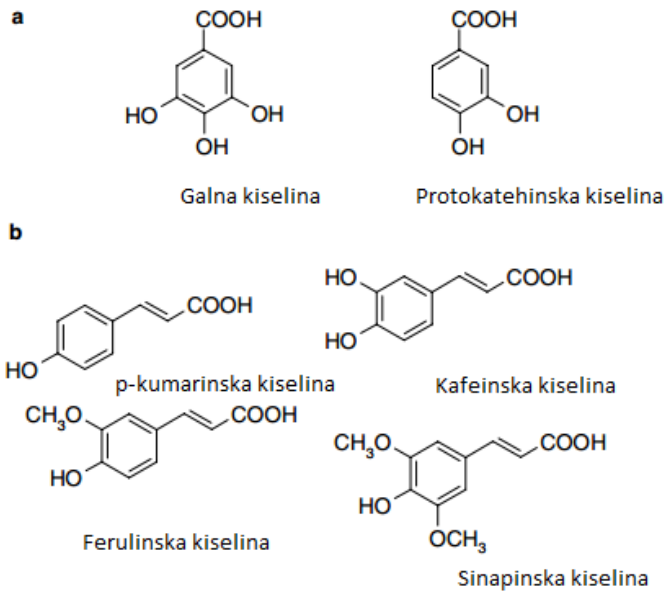
Neosapunjivi dio ploda masline čine ugljikovodici, tokoferoli, steroli, fenolni spojevi, klorofili, karotenoidi, alifatski alkoholi te spojevi arome. Ti spojevi su važni zbog svog terapeutskog značaja, doprinose aromi, a neki od njih imaju antioksidacijsko djelovanje čime povećavaju otpornost ulja na kvarenje. Fenolni spojevi su jedni od takvih, povećavaju oksidacijsku stabilnost maslinovog ulja (Žanetić i Gugić, 2006).

Fenolni spojevi sadrže aromatski prsten koji nosi jedan ili više hidroksilnih supstituenata te se kreću od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva. Usprkos strukturnoj raznolikosti, ova skupina spojeva se često naziva polifenoli. Fenolni spojevi prisutni su kao konjugati s mono- i polisaharidima, povezani s jednom ili više fenolnih skupina, a mogu se pojaviti i kao funkcionalni derivati kao što su esteri i metilni esteri (Balasundram i sur., 2006; Ignat i sur., 2011). Osnovna podjela fenolnih spojeva prema strukturi prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Klasifikacija fenolnih spojeva u biljkama (Balasundram i sur., 2006)

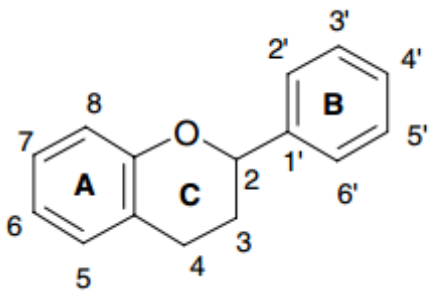
Kategorija	Struktura
Jednostavni fenoli, benzokinoni	C_6
Hidroksibenzojeva kiselina	C_6-C_1
Acetofenoni, feniloctene kiseline	C_6-C_2
Hidroksicinaminske kiseline, fenilpropanoidi (Kumarini, izokumarini, kromoni, kromeni)	C_6-C_3
Napokokinoni	C_6-C_4
Ksantoni	C_6-C_1-C_6
Stilbeni, antrakinoni	C_6-C_2-C_6
Flavonoidi, izoflavonoidi	C_6-C_3-C_6
Lignani, neoligani	$(C_6$-$C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$
Lignini	$(C_6$-$C_3)_n$
Kondenzirani tanini (proantocijanidini ili flavolani)	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$

Najvažniji fenolni spojevi zbog svoje nutritivne važnosti su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini. Fenolne kiseline se sastoje od dvije podskupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (slika 1). U hidroksibenzojeve kiseline spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina koje imaju zajedničku C6-C1 strukturu. S druge strane, hidroksicimetne kiseline su aromatski spojevi s bočnim lancima od tri ugljika (C6-C3). U hidroksicimetne kiseline spadaju kavska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina (Balasundram i sur., 2006).



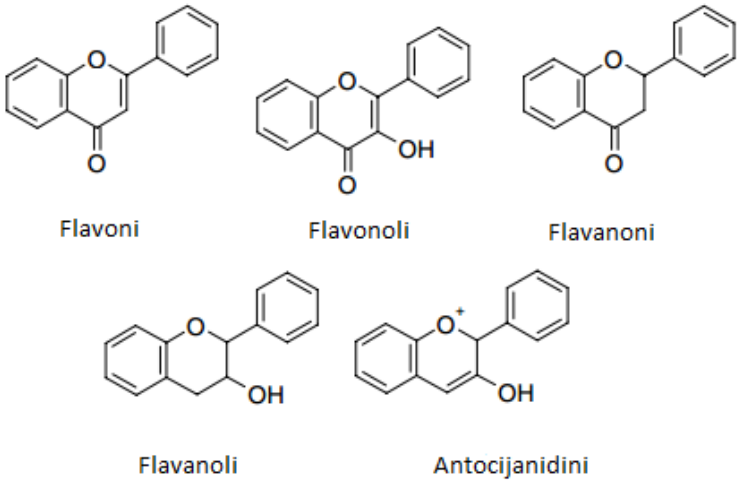
Slika 1. Primjeri hidroksibenzojevih (a) i hidroksicimetnih (b) kiselina (Balasundram i sur., 2006).

Flavonoidi čine najveću skupinu fenolnih spojeva biljaka. To su spojevi niske molekulske mase koji se sastoje od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličnim piranskim prstenom (C prsten) (slika 2) (Balasundram i sur., 2006).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

Flavonoidi se dijele na flavone, flavonole, flavanole, izoflavone i antocijane (slika 3).



Slika 3. Osnovne strukture glavnih flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

Flavonoidi se razlikuju po brojnim modifikacijama osnovne strukture kao što su reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi) (Balasundram i sur., 2006).

Tanini su relativno velike molekule koje čine treću važnu skupinu fenolnih spojeva. Mogu se podijeliti u hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Hidrolizirajući tanini su esteri galne kiseline (galotanini i elagotanini), dok su kondenzirani tanini, poznati kao proantocijanidini, polimeri polihidroksiflavan-3-ol monomera (Balasundram i sur., 2006).

Udio fenolnih spojeva u plodu masline ovisi o sorti masline, stupnju zrelosti i načinu prerade. Plod masline sadrži vrlo visoke koncentracije fenolnih spojeva, 1- 3% od ukupne mase. Fenolni spojevi prisutni u plodu masline su fenolne kiseline (vanilinska kiselina, vanilin), fenolni alkoholi (hidroksitirosol, tirosol), flavonoidi (luteolin, apigenin), sekoiridoidi (oleuropein), flavonol glukozidi (luteolin-7-glukozid ,rutin), antocijani (cijanidin, delfinidin glikozidi) (Servili i Montedoro, 2002; Suárez i sur., 2008). U tablici 3 prikazan je fenolni sastav ploda masline.

Tablica 3. Sastav fenolnih spojeva ploda masline (Balasundram i sur., 2006)

SKUPINA FENOLNIH SPOJEVA	FENOLNI SPOJ
Feniletanoidi	Oleuropein
	Tirosol
	Hidroksitirosol
Cimetne kiseline i derivati	Ferulinska kiselina
	Kavska kiselina
	p -kumarinska kiselina
Benzojeve kiseline i derivati	3,4-dihidroksifenilacetna kiselina
	4-hidroksibenzojeva kiselina
Benzendioli	Katehol (Benzen-1,2-diol)
	Metilkatehol
Antocijanini	Krisantemin (Cijanidin -3-glikozid)
	Antirinin (Cijanidin-3-rutinozid
Flavonoidi	Cinarozid (Luteolin-7-O-glukozid)
	Apigetrin (Apigenin-7-O-glukozid)
	Kvercetin
	Rutin (Kvercetin-3-O-rutinozid)

2.2. Eutektička otapala

U posljednje vrijeme pojačana je briga za okoliš zbog povećanog globalnog zatopljenja i nepovoljnih klimatskih promjena. Posljedica je to ljudskog razvoja nastala zagađenjem okoliša i iskorištavanjem prirodnih resursa kao što su nafta, voda, zrak, biljni i životinjski svijet. U svrhu održivog razvoja nastala je „Zelena kemija“ kao alat za smanjenja i/ili sprečavanja stresa na okoliš nastalog tehnoloških procesima. Postoji 12 načela Zelene kemije: zaštita okoliša, ekonomičnost tehnoloških procesa, manje opasne kemijske sinteze, dizajniranje sigurnijih kemikalija, upotreba sigurnijih otapala i drugih tvari, učinkovito korištenje energije, korištenje obnovljivih izvora energije, izbjegavanje deriviranih procesa, upotreba katalizatora i biokatalizatora, korištenje proizvoda koji se mogu razgraditi, praćenje tehnoloških procesa, osiguranje kemijske sigurnosti. Primjena ovih načela pruža rješenja globalnih pitanja zaštite

okoliša kao što su klimatske promjene, učinkovito upravljanje energijom i raspolaganje prirodnim resursima.

Upotreba sigurnijih otapala umjesto organskih otapala koja se koriste u brojnim istraživanjima i proizvodnim procesima sve se više uzima u obzir. Nastoji se ograničiti uporabu opasnih organskih otapala i zamijeniti ih novim, blažim, ekološki i ekonomski prihvatljivim otapalima (Kudlak i sur., 2015).

Takvo otapalo mora zadovoljiti određene kriterije kao što su dostupnost, niska cijena, ne-toksičnost, biorazgradivost i nezapaljivost. Prva istraživanja bila su usmjerena na primjenu ionskih tekućina (eng. Ionic Liquids, ILs) zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava kao što je niski tlak pare i visoka točka vrelišta. Problem je bio u visokoj cijeni sinteze takvih otapala te njihovoj toksičnosti prema okolišu, biljnom i životinjskom svijetu. Daljnja istraživanja bila su usmjerena na traženje alternative za ionske tekućine što je dovelo do razvoja otapala četvrte generacije, eutektičkih otapala. Zbog povoljnijih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava, te jednostavnije i ekonomičnije priprave, eutektička otapala imaju prednost pred ionskim tekućinama. Eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvente, DES) su smjese dvije ili tri komponente s točkom tališta nižom od točke tališta svake pojedine komponente zbog delokalizacije naboja (Zhang i sur., 2012; Kudlak i sur., 2015).

Takve smjese najčešće nastaju povezivanjem vodikovim vezama. Povezuju se kvaterne amonijeve soli koje predstavljaju akceptor vodika s donorom vodika kao što su karboksilne kiseline, alkoholi, šećeri, amini, amidi i vitamini (Zhang i sur., 2012.; Paiva i sur., 2014). U tablici 4 su prikazane vrste eutektičkih otapala.

Tablica 4. Vrste eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

Vrsta	Opis	Primjer
Tip I	metalna sol + organska sol	$ZnCl_2$ + kolin-klorid
Tip II	hidrat metalne soli + organska sol	$CoCl_2*6H_2O$ + kolin-klorid
Tip III	organska sol + donor vodikove veze	kolin-klorid + urea
Tip IV	metalna sol + donor vodikove veze	$ZnCl_2$ + urea

U slučaju kada su spojevi koji tvore DES primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, ugljikohidrati ili derivati kolina), takve smjese nazivaju se prirodnim eutektičkim

smjesama (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Te smjese spojeva prisutnih kao metaboliti u živim stanicama i imaju različita fizička svojstva od bilo koje njihove pojedinačne komponente. Eutektička otapala primjenjuju se u organskoj sintezi, katalizi, biokatalizi, proizvodnji polimera i nanomaterijala, elektrokemiji, separacijskim procesima, analizi, biomedicini i ekstrakciji biološki aktivnih komponenti iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Paradiso i sur., 2016).

2.2.1. Fizikalno- kemijska svojstva eutektičkih otapala

Svojstva eutektičkih otapala ovise o njihovom sastavu. Ovisno o odabiru donora i akceptora vodika, njihovom molarnom omjeru, molekulskoj masi, promjeni entropije, načinu povezivanja i energiji nastale rešetke, razlikuje se točka tališta, gustoća, viskoznost, polaritet, ionska vodljivost, pH (Zhang i sur., 2012).

Miješanjem dviju krutih tvari nastaje tekuća faza čija je točka tališta puno niža u odnosu na svaku tvar zasebno. Najčešći primjer eutektičkih otapala je smjesa kolin klorida (ChCl) i uree. Kada se miješaju zajedno u molarnom omjeru 1: 2, točka očvrščivanja smjese je 12 °C što je znatno niže od temperature tališta zasebnih komponenta ChCl (T_t = 302 °C) i uree (T_t = 133 °C). Sniženje točke smrzavanja proizlazi iz interakcije između halogenog aniona (ChCl) i donora vodika (uree). Općenito, točke očvrščivanja eutektičkih smjesa su ispod 150 °C (Zhang i sur., 2012).

Većina eutektičkih otapala pokazuju veću gustoću od gustoće vode te svakih komponenta zasebno. Razlika u gustoći se može pripisati različitoj molekularnoj organizaciji što se može pojasniti teorijom rupa ili praznog mjesta. Molarni omjer donora i akceptora vodika također ima utjecaj na gustoću. Primjerice u smjesi glicerola i ChCl, što je veći udio ChCl to je gustoća manja, što se može objasniti u obliku slobodnog volumena (Zhang i sur., 2012).

Viskoznost smjesa predstavlja veliki problem. Eutektičke smjese pokazuju relativno visoku viskoznost (> 100 cP) na sobnoj temperaturi. Visoke vrijednosti viskoznosti pripisuju se intermolekularnim interakcijama pojedinih komponenata smjese, veličini molekula te malom volumenu smjese. Mreža vodikovih veza, Van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija smanjuje pokretljivost slobodnih molekula unutar smjese što rezultira visokom viskoznošću. Na viskoznost utječe i temperatura, molarni omjer te udio vode. Povećanjem temperature viskoznost pada zbog povećanog gibanja molekula u otapalu čime se smanjuju intermolekularne sile te dolazi do pucanja vodikovih veza. Dodatkom vode također se smanjuje

viskoznost zbog postupnog slabljenja vodikovih veza (Aroso i sur., 2017; Dai i sur., 2015; Zhang i sur., 2012).

Smjese na bazi organskih kiselina imaju najveću polarnost, zatim slijede smjese na bazi aminokiselina s polarnošću sličnom vodi, a najmanju polarnost imaju NADES-ovi na bazi šećera i polialkohola. Dodatkom vode može se smanjiti polaritet.

Većina eutektičkih smjesa ima slabu sposobnost ionske vodljivosti zbog visoke vrijednosti viskoznosti. Na povećanje vodljivosti se može utjecati smanjenjem viskoznosti povišenjem temperature i povećanjem udjela soli u smjesi (Dai i sur., 2013; Kudlak i sur., 2015; Zhang i sur., 2012).

Svojstvo kiselosti i bazičnosti važno je kod ekstrakcijskih procesa. Na pH utjecaj ima promjena temperature i kemijska priroda donora vodika. Smjese koje sadrže ChCl i šećerne alkohole, pokazuju neutralni pH dok smjese koje sadrže organske kiseline imaju niske vrijednosti pH. Takve smjese zbog kiselih svojstva su poželjne u ekstrakcijskim procesima. Postupno povećanje temperature uzrokuje smanjivanje pH (Dai i sur., 2013; Milešević, 2016; Zhang i sur., 2012). Fizikalno-kemijska svojstva NADES korištenih u ovom radu koja su određena, prikazana su u tablici 5.

Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva pripravljenih prirodnih eutektičkih otapala na sobonoj temperaturi (25°C) (Dai i sur., 2010; Milešević, 2016)

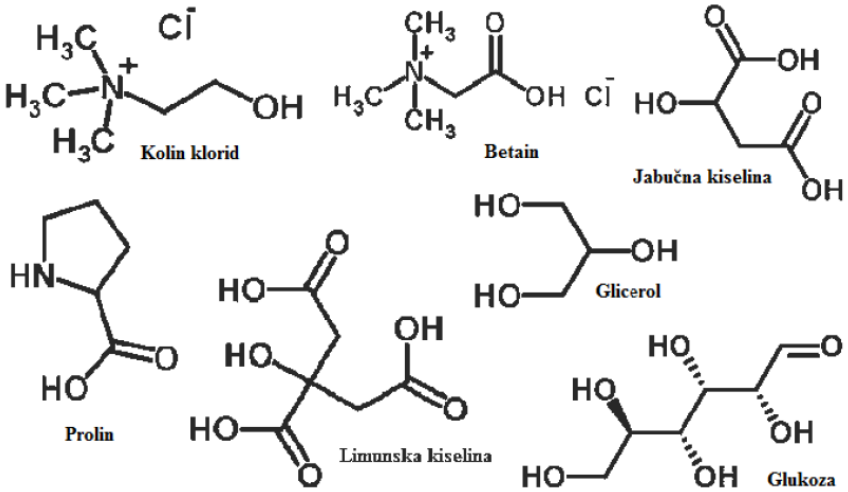
NADES	UDIO VODE (%)	GUSTOĆA (g*cm-3)	VISKOZNOST (Pa*s)	ELEKTRIČNA VODLJIVOST (mS*cm-3)	INDEKS LOMA	pH
ChCl:Ma[1]	30	1,2	0,02	19,2	1,4	0,7
B:Ma[2]	30	1,2	0,05	1,5	1,4	3,3
ChCl:Cit[3]	30	Ne može se izmjeriti	Ne može se izmjeriti	23,9	1,4	0,9
B:Cit[4]	30	1,2	0,06	2,2	1,4	2,6
Ch:Fru[5]	7,8	1,2	0,03	NIJE ODREĐENO		
Ch:X[6]	7,7	1,2	0,03			
Ch:Xlt[7]	11,2	1,2	0,01			
Ch:Sor[8]	9,2	1,2	0,01			

- [1]kolin malat; [2]betain malat; [3]kolin citrat; [4]betain citrat; [5]kolin fruktoza; [6]kolin ksiloza; [7]kolin ksilitol; [8]kolin sorbitol

2.2.2. Sinteza eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala se mogu pripremiti iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014). Određena masa komponenata se izvaže, pomiješa s vodom te se zagrijava uz miješanje na temperaturi do 100 °C, 30 do 90 minuta do formiranja tekućine. Otapala se mogu dobiti i vakuum uparavanjem gdje se komponente otope u vodi, a potom uparavaju na 50 °C pomoću rotacijskog uparivača do postizanja konstantne mase (Abbott i sur., 2004; Dai i sur., 2013; Milešević, 2016).

Različite vrste prirodnih tvari kao što su organske kiseline, šećeri, polialkoholi, amini i aminokiseline upotrijebljene su za pripremu prirodnih eutektičkih otapala. Metode pripreme su jednostavne, budući da uključuju samo miješanje na sobnoj temperaturi ili grijanje do 100 °C. Temperatura pripreme i temperatura tališta ovisi o sastavu smjese. Mješavina uree ili organskih kiselina s kvaternim amonijevim solima mogu postati tekućine kada se smjesa zagrije na 80-100 °C. U različitim znanstvenim radovima su dani primjeri mogućih kombinacija donora i akceptora vodika koji zajedno tvore eutektičke smjese. Neki od primjera su: šećer urea / dimetil urea, polialkohol-dimetil urea, organska kiselina-dimetil urea, L-karnitin-urea, šećer-kolin klorid, šećer-malonska kiselina. Navedene smjese mogu također uključivati soli s kloridnim ionom kao što su $CaCl_2$, NH_4C1 i NaCl. Takve smjese imaju točku taljenja u rasponu 50-100 °C, uglavnom oko 70 °C, a neke su stabilne na 95 °C tijekom 4 h bez vidljive razgradnje što podržava njihovo korištenje kao ekstrakcijskog otapala. Prirodna eutektička otapala se također mogu formirati između alkohola glicerola i kolin klorida u različitim molarnim omjerima. Otapala se mogu pripraviti sušenjem smrzavanjem vodenih otopina kao što su urea-kolin klorid u omjeru 2:1 i glicerol- kolin klorid u omjeru 2:1. Metoda liofilizacije omogućuje ugradnju bakterija u otapalo u čistom stanju i njihovu primjenu u biotransformacijama. Prirodni spojevi su idealan izvor komponenata za pripremu eutektičkih otapala zbog njihove kemijske raznolikosti, biorazgradivost, održivosti i netoksičnosti (Dai i sur., 2013). Strukture nekih komponenata koje mogu tvori eutektička otapala prikazane su na slici 4.



Slika 4. Strukturne formule komponenata koje tvore prirodna eutektička otapala (Milešević, 2016)

2.3. Upotreba novih tehnologija u ekstrakciji fenolnih spojeva

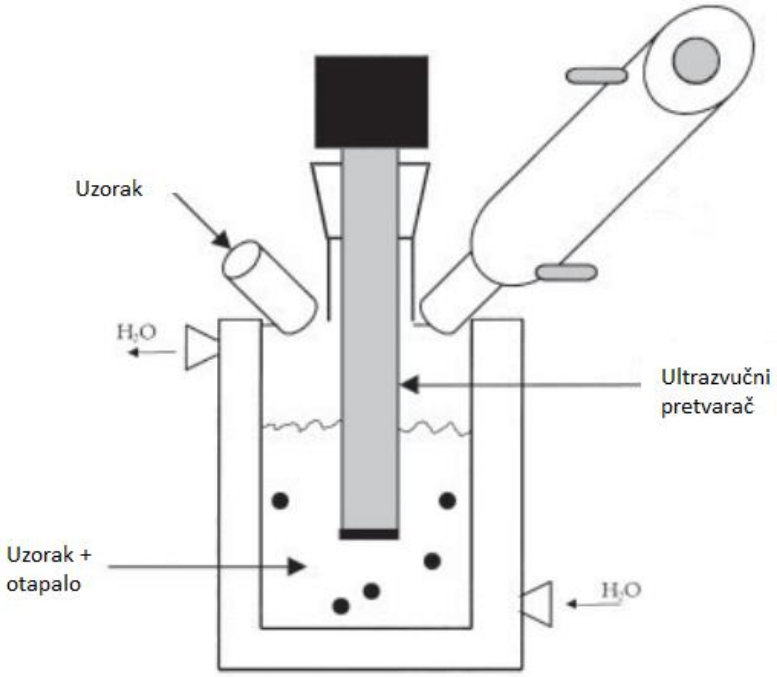
S ciljem smanjenja potrošnje energije, povećanja iskorištenja procesa, povećanja kvalitete proizvoda kao i smanjenje vremena ekstrakcije, sve je veća primjena inovativnih tehnologija kao što su ultrazvuk i mikrovalovi koje su izvanredna energija za procese ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Primjena ultrazvuka u procesiranju hrane spada u novije metode obrade hrane. U današnje vrijeme istraživanje ultrazvuka se višestruko povećalo zbog njegove široke primjene kao metode ne-toplinske obrade. Metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju, poput ekstrakcije otapalima, vrućom vodom, lužinama i sl., mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti zbog visokih temperatura, dugog vremena ekstrakcije ili loše određenih sigurnosnih kriterija tijekom zračenja. Primjena ultrazvuka ranije je bila uglavnom ograničena na čišćenje i emulgiranje dok se danas otkrivaju prednosti uporabe ultrazvuka na različitim područjima, poput kristalizacije, sušenja, ekstrakcije, filtracije, zamrzavanja, homogenizacije, sterilizacije, degradacije itd.

Ultrazvuk je zvučni val čija je frekvencija veća od gornje granice osjetljivosti čovjekovog uha, iznad 20 kHz. Ovisno o frekvenciji razlikujemo ultrazvuk visokog intenziteta i ultrazvuk niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta se nalazi u rasponu frekvencije od 2 MHz na više. Takav ultrazvuk ne uzrokuje kemijske promjene na hrani te se koristi kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, mjerenje teksture, sastava, viskoznosti, brzine protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanje razine tekućine u bačvama ili tankovima. Ultrazvuk visokog intenziteta se nalazi u rasponu frekvencije 20 – 100 kHz te uzrokuje fizičke promjene na hrani te određene kemijske reakcije. Primjenjuje se za čišćenje, emulgiranje, kristalizaciju, sušenje, ekstrakciju, filtraciju, zamrzavanje, homogenizaciju, sterilizaciju, degradaciju (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Cilj upotrebe ultrazvuka u procesu ekstrakcije je smanjiti upotrebu otapala, povećati prinos željenih supstanci te skratiti vrijeme ekstrakcije. Prijenos akustične energije kroz medij je brz i cjelovit čime se skraćuje vrijeme obrade i smanjuje se potrošnja energije. Ultrazvuk se može stvoriti pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne energije. U prehrambenoj industriji se najčešće ultrazvuk stvara pomoću električne energije preko generatora. Generator je uređaj koji pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije električne energije čime nastane energija zvuka. Nastali valovi se sondama emitiraju u medij kojim prolaze i stvaraju longitudinalne valove koji izmjenjuju cikluse ekspanzije i kontrakcije. Dolazi do formiranja mjehurića i njihovog rasta do kritične veličine. Kada energija ultrazvuka

više nije dovoljna da zadrži plinsku fazu u mjehuriću, dolazi do brze kondenzacije i međusobnog sudaranja kondenziranih molekula pri čemu dolazi do udarnih valova. Udarni valovi uzrokuju eksploziju, kavitaciju, pri čemu nastaju visoke temperature do 5500 K i visoki tlakovi do 100 MPa. Intenzitet kavitacije ovisi o frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, tlaku pare, temperaturi, površinskoj napetosti medija, viskoznosti, gustoći. Djelovanjem kavitacije na staničnu stjenku materijala omogućen je direktan kontakt otapala sa sadržajem stanice namirnice. Prodiranje otapala u materijal je bolje te je tako povećan prijenos otopljene tvari iz namirnice u otapalo, ubrzava se ekstrakcija te je povećana njezina efikasnost (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Na slici 5 je prikazan sustav za ekstrakciju ultrazvukom.



Slika 5. Sustav za ekstrakciju ultrazvukom (Chemat i sur. 2004a)

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja čija je frekvencija u rasponu 1 – 300 GHz. Prenose se kao valovi koji mogu prodrijeti u materijal koji se tretira i reagirati s polarnim molekulama kao što je voda. Dolazi do gibanja polarnih molekula čime dolazi do oslobađanja topline te tako mikrovalovi mogu zagrijati cijeli materijal. Mikrovalovi brzo prodiru kroz cijeli volumen otapala i krute tvari iz koje se ekstrahiraju tvari te zagrijavaju cijeli uzorak jednako i učinkovito. Voda unutar biljnog materijala apsorbira energiju mikrovalova, dolazi do pregrijavanja stanica što olakšava desorpciju tvari iz uzorka (Wang i Weller, 2006).

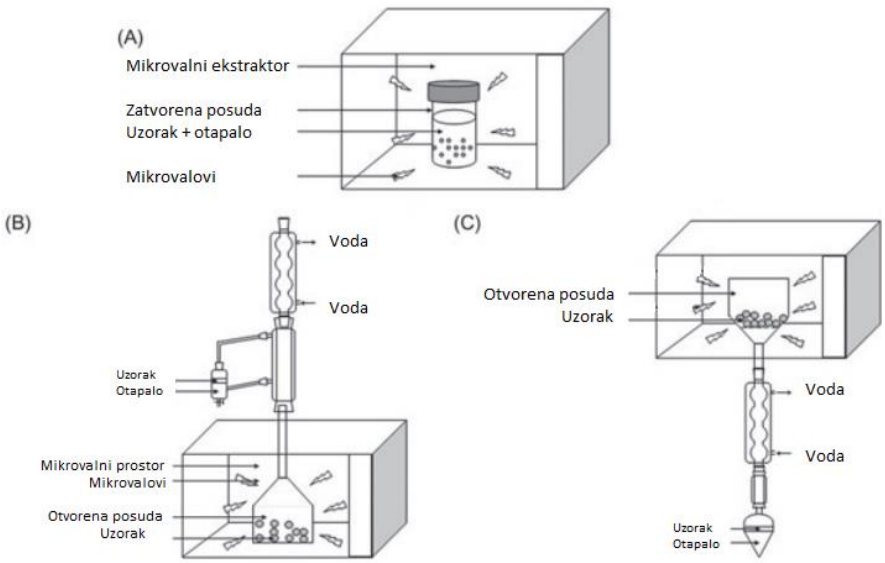
Prolaskom struje kroz žicu nastaju električno i magnetsko polje koja promjenom smjera struje počinju pulsirati i stvarati elektromagnetske valove. Mikrovalovi spadaju u ne-ionizirajuće zračenje, uzrokuju povišenje temperature tvari, ali ne uzrokuju strukturne promjene (Blekić i sur., 2011). Tehnologija mikrovalova je pronašla primjenu u ekstrakciji esencijalnih ulja, aroma, pigmenata, antioksidanasa i organskih spojeva. Istraživanje mikrovalova izazvalo je razvoj tri vrste tehnika: ekstrakcija otapalom uz pomoć mikrovalova (slika 6 A), ekstrakcija bez otapala uz pomoć mikrovalova (slika 6 C) i kombinacija hidrodifuzije i gravitacije uz pomoć mikrovalova (slika 6B) (Rombaut i sur., 2014).

Dva su načina provođenja ekstrakcije mikrovalovima: ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. U sustavu s otvorenim posudama maksimalna temperatura postignuta u posudi određena je vrelištem otapala pri atmosferskom tlaku. Zbog isparavanja otapala, općenito je sustav refluksa povezan s posudom. U usporedbi s zatvorenim sustavom, ekstrakcija u otvorenim posude je sigurnija za rukovanje i omogućuje obradu veće količine uzoraka. U zatvorenom sustavu tlak u posudi ovisi o volumenu i vrelištu otapala. Takav način ekstrakcije se koristi kod ekstremnih uvjeta kao što je visoka temperatura ekstrakcije (Wang i Weller, 2006).

Za ekstrakciju uz pomoć mikrovalova uzorak se potopi u otapalo koje ne apsorbira mikrovalove. Propuštanjem mikrovalova kroz uzorak, mikrovalovi izravno utječu na staničnu strukturu i vaskularni sustav uzorka. Kada se uljne žlijezde biljke podvrgavaju jakoj toplini, stres i lokalizirani visoki tlak povećava pritisak unutar žlijezda, premašuje njegov kapacitet za ekspanziju te uzrokuje njihovo puknuće. Oslobođeni metaboliti se otope u organskom otapalu i dalje se odvoje tekućinskom ekstrakcijom (Rombaut i sur., 2014).

Izbor otapala koji se koristi za ekstrakciju ovisi o topljivosti željene tvari, interakciji između matriksa i otapala te o svojstvima otapala da upijaju mikrovalove što je određeno dielektričnom konstantom. Otapala pogodna za ekstrakciju su polarna otapala kao što su metanol, etanol i voda. Temperatura pogoduje povećanju učinka ekstrakcije, ali kod ekstrakcije termolabilnih spojeva može uzrokovati njihovu razgradnju (Bousbia i sur., 2009).

Prednosti mikrovalova uključuju smanjenje potrošnje otapala, kraće trajanje ekstrakcije, brži prijenos energije, visoka reproducibilnost i primjenjivost za različite uzorke (Rombaut i sur., 2014).



Slika 6. Postrojenja za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (Rombaut i sur., 2014)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorak

Komina masline proizvedena je u istarskoj uljari Agrolaguna d.d., Poreč. Industrijski proizvedena, osušena i samljevena komina masline korištena je kao uzorak za izvođenje eksperimenata. Uzorak komine čuvan je u zamrzivaču na -18°C do provođenja eksperimenta.

3.1.2. Kemikalije

Otapala korištena za izvođenje eksperimenata su sljedeća:

- metanol
- kolin ksiloza
- kolin sorbitol
- kolin ksilitol
- kolin fruktoza
- kolin malat
- kolin citrat
- betain malat
- betain citrat
- mravlja kiselina

3.1.3. Standardi fenolnih spojeva

Standardi fenolnih spojeva korišteni su:

- galna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- siringaldehid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *trans*-cimetna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

- 4-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- kavska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- sinapinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- siringinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- tirosol (Extrasyntheses, Genay, Francuska)
- oleuropein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- kvercetin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- pinoresinol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva na tresilici

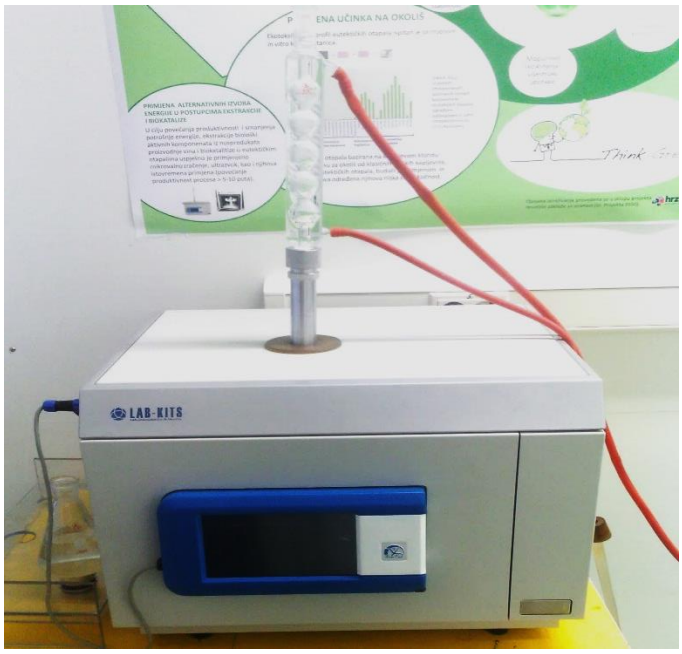
Za ekstrakciju fenolnih spojeva korištena je otopina eutektičkih otapala i vode. Uspoređena je sposobnost ekstrakcije otopina kolin ksiloze, kolin sorbitola, kolin ksilitola, kolin fruktoze, kolin malata, kolin citrata, betain malata, betain citrata s otopinom metanola. Odvagano je 1,25 g komine u plastičnu epruvetu s čepom od 50 mL te dodano 25 mL odgovarajućeg otapala. Epruveta je horizontalno postavljena na plansku tresilicu (slika 7). Ekstrakcija je trajala 5 sati na 150 okretaja min^{-1} pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije ekstrakt je odvojen od komine centrifugiranjem pri 5000 okretaja min^{-1} kroz 15 min. Ekstrakt je prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjen do oznake destiliranom vodom.

Slika 7. Planska tresilica (Vlastita fotografija)

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru/reaktoru

0,5 g komine odvagano je u specijalnu epruvetu za mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor i pomiješan s 10 mL odgovarajućeg otapala. Epruveta s uzorkom i otapalom postavljena je u ultrazvučnu kupelj napravljenu dodatkom vode u posebnu Erlenmayer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova. Ekstrakcija je provedena kombinirajući različite vrijednosti snage mikrovalova, udjela otapala i vremena trajanja ekstrakcije s ili bez ultrazvuka prema parametrima određenim dizajnom eksperimenta (tablice 6 - 8).

Nakon provedene ekstrakcije u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru (slika 8), ekstrakt fenolnih spojeva odvojen je od ostatka komine na centrifugi kroz 15 minuta na 5000 okretaja min^{-1}. Ekstrakt je prenesen u odmjernu tikvicu od 10 ml te nadopunjen do oznake destiliranom vodom. 2 mL takvog uzorka profiltrirano je u vijalicu, specijalnu bočicu za HPLC uređaj. U pripremljenim ekstraktima odmah je određen sastav i koncentracija fenolnih spojeva HPLC metodom.



Slika 8. Mikrovalno-ulrazvučni ekstraktor (Vlastita fotografija)

3.2.3. Dizajn eksperimenta

Dizajn eksperimenta korišten je za izrađivanje plana izvođenja eksperimenata ekstrakcije fenolnih spojeva. Korištena su dva različita dizajna eksperimenta - Box-Benhken i Full Factorial eksperimentalni dizajn. Planovi pokusa izrađeni su u programu Statistica 8 (StatSoft Inc., 2007).

Full Factorial eksperimentalni dizajn korišten je za izradu plana eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline potpomognute ultrazvukom. Pomoću Full-Factorial eksperimentalnog dizajna izrađen je plan eksperimenata kombinacijom kritičnih parametara: udio kolin citrata u otapalu za estrakciju i vrijeme djelovanja ultrazvuka na uzorak komine masline. Redoslijed izvođenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Redoslijed izvođenja ekstrakcije djelovanjem ultrazvuka

Redni broj pokusa	Udio kolin citrata (%)	Vrijeme (min)
U1	50	3
U2	70	3
U3	90	3
U4	50	6
U5	70	6
U6	70	6
U7	70	6
U8	90	6
U9	50	9
U10	70	9
U11	90	9

Kombinacijom snage mikrovalova s i bez ultrazvuka, Box-Benhken dizajnom kreiran je plan izvođenja eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline potpomognute mikrovalovima (Tablica 7.) te za izradu plana eksperimenta ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline potpomognute kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka (Tablica 8.)

Tablica 7. Redoslijed izvođenja eksperimenata ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Udio kolin citrata (%)	Vrijeme (min)
M1	100	50	6
M2	300	50	6
M3	100	90	6
M4	300	90	3
M5	100	70	9
M6	300	70	6
M7	100	70	6
M8	300	70	9
M9	200	50	3
M10	200	90	9
M11	200	50	9
M12	200	90	3
M13	200	70	3
M14	200	70	6
M15	200	70	6

Tablica 8. Redoslijed izvođenja eksperimenta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Udio kolin citrata (%)	Vrijeme (min)
M+U-1	100	50	6
M+U-2	300	50	6
M+U-3	100	90	6
M+U-4	300	90	6
M+U-5	100	70	3
M+U-6	300	70	3
M+U-7	100	70	9
M+U-8	300	70	9
M+U-9	200	50	3
M+U-10	200	90	3
M+U-11	200	50	9
M+U-12	200	90	9
M+U-13	200	70	6
M+U-14	200	70	6
M+U-15	200	70	6

3.2.4. Određivanje sastava fenolnih spojeva komine maslina

Ekstrakti fenolnih spojeva pripremljeni prema metodi opisanoj u podpoglavlju 3.2.3. analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koristeći Agilent Technologies HPLC uređaj serije 1200 s DAD detektorom. Korištena je Phenomenax C18 nepolarna kolona (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å). Mobilne faze korištene za analizu su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). DAD detektorom snimljeni su kromatogrami fenolnih spojeva pri valnoj duljini 280 i 330 nm.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva korištena je metoda razvijena i validirana u diplomskom radu Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline (Cvitanić, 2015). U sklopu tog rada optimirani su parametri metode: brzina protoka otapala, temperatura kolone, količina injektiranog uzorka (Tablica 9) i gradijent (Tablica 10).

Tablica 9. Optimirani parametri metode za razdvajanje fenolnih spojeva komine maslina (Cvitanić, 2015)

PARAMETAR	
Protok otapala	0,9 ml/min
Temperatura kolone	30°C
Količina injektiranog uzorka	5 µl

Tablica 10. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu (Cvitanić, 2015)

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

Usporedbom vremena zadržavanja ekstrahiranih fenolnih spojeva s vremenima zadržavanja korištenih standarada te usporedbom spektara dobivenih ekstrakcijom sa spektrima standarada, identificirani su fenolni spojevi. Za kvantifikaciju fenolnih spojeva komine masline korištene su baždarne krivulje standarada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odabrati prirodno eutektičko otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine maslina. Takva su otapala sigurnija i ekološki prihvatljivija u odnosu na organska otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju (Kudlak i sur., 2015). Osim toga cilj ovog rada također je bio optimirati uvjete ekstrakcije koristeći nove, brze metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i/ili ultrazvukom. Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je na ekstraktoru koji se nalazi na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Optimirani su parametri ekstrakcije, udio vode, vrijeme ekstrakcije, djelovanje ultrazvuka te snaga mikrovalova. Efikasnost procesa ekstrakcija utvrđena je određivanjem koncentracije i sastava fenolnih spojeva u proizvedenim ekstraktima.

4.1. Odabir prirodnog eutektičkog otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva komine maslina

Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine masline uspoređeno je 8 različitih prirodnih eutektičkih otapala metanolom kao konvencionalnim otapalom za ekstrakciju polifenola. Korištena su prirodna eutektička otapala na bazi šećera (kolin ksiloza, kolin fruktoza), na bazi šećernih alkohola (kolin ksilitol, kolin sorbitol) te na bazi organskih kiselina (betain citrat, betain malat, kolin citrat, kolin malat). Cilj ovog dijela eksperimenta bio je odabrati najpogodnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva koje će zamijeniti metanol kao otapalo. Ekstrakcija je provedena na planskoj tresilici kroz 5 sati. U proizvedenim ekstraktima određen je udio i sastav fenolnih spojeva HPLC metodom. Koncentracije identificiranih fenolnih spojeva, neidentificiranih fenolnih spojeva te ukupne koncentracije fenolnih spojeva prisutnih u pripremljenim uzorcima prikazane su u tablici 11.

Otapalima koja su manje polarna i nižeg su pH, bazirana na šećerima fruktozi i ksilozi te na alkoholnim šećerima ksilitolu i sorbitolu, ekstrahirano je gotovo 20 % manje fenolnih spojeva nego otapalima koja su polarnija i sličnije polarnosti fenolnih spojeva, višeg su pH i bazirana na organskim kiselinama (malat i citrat) kako je opisano u radu Kudlak i suradnici (2015). Najvećim udjelom u uzorku od fenolnih spojeva je zastupljen oleuropein ekstrahiran otapalima na bazi organskih kiselina i to kolin citratom u najvećoj koncentraciji 818,89 mg kg^{-1}.

Tablica 11. Rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline na planskoj tresilici

Otapalo	Fenolni spoj (mg kg^{-1})									
	Tirosol	Vanilinska kiselina	Vanilin	Siringinska kiselina	Siringaldehid	SDG	Oleuropein	Pinoresinol	n.i.*	Ukupni fenoli
Kolin ksiloza	94,0	147,5	159,7	89,9	n.d.**	193,0	n.d.	140,5	2987,9	3879,1
Kolin sorbitol	90,1	134,2	166,7	92,8	n.d.	219,0	n.d.	164,0	3026,4	3998,9
Kolin ksilitol	83,4	131,7	125,4	94,6	n.d.	204,0	n.d.	176,0	2804,9	3770,2
Kolin fruktoza	87,3	113,9	148,1	87,4	22,1	186,1	n.d.	154,4	2791,4	3731,4
Betain malat	128,5	169,8	221,7	113,3	n.d.	265,2	n.d.	260,8	3615,7	4923,4
Betain citrat	231,4	215,2	268,6	178,6	n.d.	264,5	512,4	155,1	4062,0	6070,2
Kolin malat	132,0	217,2	201,6	225,7	n.d.	295,8	441,5	124,7	3893,0	5375,4
Kolin citrat	250,6	234,4	200,8	267,0	n.d.	257,9	818,9	115,5	4244,9	6158,1
70% Metanol	132,4	187,3	310,3	143,6	n.d.	261,2	1283,1	367,2	3904,2	6094,3

* suma neidentificiranih fenolnih spojeva

** neidentificirani spojevi

Osim oleuropeina, konvencionalnom metodom ekstrakcije na tresilici identificirani fenolni spojevi u komini masline su tirosol, vanilinska kiselina, vanilin, siringinska kiselina, siringaldehid, sekoizolaricirezinol diglukozid (SDG), pinoresinol. Otapalima na bazi citrata (kolin citrat, betain citrat) ekstrahirano je 10 % više fenolnih spojeva u odnosu na otapala betain malat i kolin malat. Uspoređujući otapala kolin citrat i betain citrat, veći udio fenolnih spojeva ektrahiran je kolin citratom. Na temelju dobivenih rezultata najbolju učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva ima otapalo kolin citrat kojim je ekstrahirano 6158,11 mg kg^{-1} ukupnih fenola.

U radu koji su objavili Garcia i suradnici (2016) opisana je upotreba različitih eutektičkih otapala za ekstrakciju polifenola iz djevičanskog maslinovog ulja u usporedbi s komercijalnom metodom ekstrakcije otopinom metanola i vode. U navedenom radu su korištene eutektičke otopine, mješavine kolin klorida s različitim omjerima šećera, alkohola, organskih kiselina i uree te mješavina tri različita šećera. Rezultati su pokazali da je veći udio oleaceina i oleacentala, derivata sekoiridoida, ekstrahiran eutektičkim otapalima. Otopinom kolin klorid/ksilitol ekstrahirano je 20-33% više oleaceina i oleacentala te 67,9 – 68,3 % više oleaceina i oleacentala otopinom kolin klorid/1,2 propandiol u odnosu na ekstrakciju otopinom metanol/voda.

U ovom diplomskom radu, otopinom metanola ekstrahirano 6094,29 mg kg^{-1} ukupnih fenola što je približno jednako ekstrakciji eutektičkim otapalom kolin citrat (6158,11 mg kg^{-1}) čime je dokazano da su prirodna eutektička otapala adekvatna zamjena za organska otapala. Esktraktibilnost korištenih otapala od najučikovitijeg prema najmanje učinkovitom slijedi sljedeći niz: kolin citrat > metanol > betain citrat > kolin malat > betain malat > kolin sorbitol > kolin ksiloza > kolin ksilitol > kolin fruktoza.

4.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva pomoću mikrovalno-ultrazvučnog ekstraktora

Odabrano otapalo, kolin citrat, korišteno je u daljnjim eksperimentima ekstrakcije fenolnih spojeva u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru. Cilj ekstrakcije u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru bio je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije, a to su vrijeme, snaga mikrovalova i volumni udio kolin citrata u otapalu te odabir vrste ekstrakcije: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom ili ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Koncentracija izoliranih fenolnih spojeva također je

određena HPLC uređajem i metodom za određivanje sastava i koncentracije fenolnih spojeva u komini masline.

4.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom provedena je u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru. Plan pokusa izrađen je Full-Factorial eksperimentalnim dizajnom. Full Factorial eksperimentalni dizajn koristi se kod izrade plana eksperimenata čiji se skup podataka opisuje linearnim funkcijama (Bezerra i sur., 2008).

Rezultati ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prikazani su u tablici 12 iz koje je vidljivo kako je ekstrakcija ultrazvukom puno bolja s manjim udjelom prirodnog eutektičkog otapala (50%). Povećanjem udjela vode slabe vodikove veze. Molekule vode su male molekule i imaju veliku sposobnost stvaranja vodikovih veza, vežu se sa komponentama otapala i ugrađuju u mrežu. To je razlog smanjenja viskoznosti eutektičkih otapala (Aroso i sur., 2017).

Bolja ekstrakcija fenolnih spojeva sa više razrijeđenim otapalom je vjerojatno zbog manje viskoznosti jer ultrazvukom ne dolazi do značajnog zagrijavanja i ne dolazi do smanjenja viskoznosti otapala tijekom ekstrakcije. Produljenjem vremena ekstrakcije (6 i 9 minuta) kod otapala sa 50% i 70% kolin citrata, povećala se ekstraktibilnost za više od 40%. Kod otapala sa 90% kolin citrata vrijeme nema utjecaja na ekstraktibilnosti fenolnih spojeva vjerojatno zbog velike viskoznosti same otopine pa je otežan kontakt otapala i materijala tj. komine.

Isto se pokazalo u radu Park i suradnika (2014) gdje je opisana kombinacija upotrebe ultrazvuka i eutektičkih otapala različitih omjera kod ekstrakcije fenolnih spojeva iz *Herba Artemisia Scopariaa.* Autori su opisali da viskoznost otapala otežava ekstrakciju tvari te prema dobivenim rezultatima zaključili da je najbolji omjer za ekstrakciju 50%-tno otapalo kolin klora/urea.

Iz dobivenih rezultata zaključeno je da su najbolji uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prirodnim eutektičkim otapalom koncentracije 50% kolin citrata kroz 9 minuta.

Tablica 12. Rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute ultrazvukom

UZORCI Udio kolin citrata (%)/ vrijeme (min)	Fenolni spoj (mg kg^{-1})						
	Tirosol	Vanilinska kiselina	Vanilin	Siringinska kiselina	Pinoresinol	n.i.*	Ukupni fenoli
50%/3'	100,4	63,3	42,7	30,1	18,6	393,2	648,3
50%/6'	117,8	84,9	46,8	n.d.	30,9	466,2	793,3
50%/9'	125,9	88,1	98,3	n.d.	44,8	604,1	961,2
70%/3'	104,9	76,5	80,3	n.d.	11,5	312,9	586,1
70%/6'	111,2	77,8	81,2	26,5	49,2	319,9	610,4
70%/9'	123,1	80,9	43,6	43,2	30,0	482,8	803,6
90%/3'	n.d.**	n.d.	n.d.	n.d.	29,3	95,2	124,5
90%/6'	n.d.	n.d.	60,0	n.d.	n.d.	63,5	123,5
90%/9'	n.d.	n.d.	61,1	n.d.	n.d.	65,4	126,5

* suma neidentificiranih fenolnih spojeva

** neidentificirani spojevi

4.2.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta mikrovalovima

Prema planu pokusa određenim Box-Benhken eksperimentalnim dizajnom provedeno je 15 različitih eksperimenata kombinacijom tri različita parametra: snaga mikrovalova, udio kolin citrata u otapalu i vrijeme provođenja ekstrakcije. Svrha dizajna eksperimenta bila je definirati plan izvođenja eksperimenta s ciljem optimiranja procesa uz smanjenje broja pokusa i da se postigne najbolji sustav izvođenja eksperimenata.

Najpogodnija tehnika optimiranja nekog procesa je metoda odzivnih površina. Metoda odzivnih površina je skup matematičkih i statističkih tehnika temeljenih na polinomnim jednadžbama koje opisuju ponašanje skupa podataka (Bezerra i sur., 2008).

Box-Benhken eksperimentalni dizajn je vrsta eksperimentalnog dizajna čija je svrha uspostaviti vezu između zavisnih i nezavisnih varijabla te dobiti što više informacija iz minimalnog broja provedenih eksperimenata (Khajek, 2011). Ovaj tip dizajna pokusa koristi se kod odabira plana eksperimenata čiji se opis skupa podataka opisuje kvadratnim funkcijama (Bezerra i sur., 2008). Temelji se na kombinaciji tri različita parametra, a to u ovom slučaju su snaga mikrovalova, udio kolin citrata i vrijeme.

Epruveta s uzorkom i otapalom stavljena je u vodenu kupelj jer je preliminarnim testovima pokazano kako dolazi do preburne reakcije, odnosno prebrzog zagrijavanja otapala direktnim djelovanjem mikrovalova na otapalo pa se ekstrakcija ne bi mogla provesti. Preliminarnim je istraživanjima također određena maksimalna snaga mikrovalova koja se može sigurno koristiti uz odabrano otapalo. Pokazalo se kako korištenjem mikrovalova snage veće od 300 W dolazi do preburne reakcije, tj. dolazi do brzog zagrijavanja na temperature više od 100°C i postoji velika opasnosti od puknuća dijelova instrumenta.

U proizvedenim ekstraktima određen je udio i sastav fenolnih spojeva HPLC metodom. Dobivene koncentracije ekstrahiranih fenolnih spojeva u uzorcima prikazane su u tablici 13. Iz rezultata je vidljivo kako se povećanjem snage mikrovalova povećava i udio ekstrahiranih fenolnih spojeva što dokazuje da povećanje snage mikrovalova ima pozitivan utjecaj na ekstraktibilnost fenolnih spojeva. Vrijeme ekstrakcije također ima pozitivni utjecaj na ekstraktibilnost fenola jer je kroz 9 minuta ekstrahirano 60 % više fenolnih spojeva u odnosu na 3 minute te 20 % više u odnosu na 6 minuta. Kod snage 300 W ekstrahirano je 86% više fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju kod snage mikrovalova 100 W te gotovo 80% više u odnosu na ekstrakciju kod 200 W. Udio vode u otapalima korištenim za ekstrakciju bio je 50%, 30% i 10%. Najboljim se pokazao omjer vode i otapala 30/70 što su pokazala i prethodna istraživanja (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Nam i sur., 2015). U navedenim istraživanjima

dokazano je da količina vode utječe na uspješnost ekstrakcije te je utvrđeno da je optimalna količinu vode u otapalu prilikom izolacije fenolnih spojeva iz biljaka 20-30%. Osim uspješnosti ekstrakcije, 70%-tno otapalo omogućava i lakšu manipulaciju otapalom zbog manje viskoznosti u odnosu na koncentriranije otopine prirodnih eutektičkih otapala. Rezultati ovog diplomskog rada u skladu su s navedenim istraživanjima. Otapalom s udjelom 90% kolin citrata ekstrahira se najmanji udio fenolnih spojeva upravo zbog velike viskoznosti i teške manipulacije otapalom koja dovodi do gubitaka dijela uzorka s otapalom tijekom provođenja eksperimenata. Veće razrjeđenje, 50/50 je također pokazalo manju ekstraktibilnost u odnosu na otapalo sa 70% kolin citrata. Iz dobivenih rezultata određeno je otapalo razrjeđenja 70/30 najpogodnije za ekstrakciju fenolnih spojeva komine masline.

Kako je u radu Suarez i suradnika (2008) opisano da su najvećim udjelom u djevičanskom maslinovom ulju zastupljeni sekoiridoidi, vjerojatno su najvećim udjelom od neidentificiranih spojeva u komini masline upravo oni. Razlog nemogućnosti identifikacije sekoiridoida je taj što smo koristili metodu za identifikaciju fenolnih spojeva u kojoj nemamo standarde za njihovu identifikaciju.

Kombinacijom snage mikrovalova 300 W, udio kolin citrata u otapalu 70% i vremena 9 minuta, ekstrahiran je najveći udio fenolnih spojeva uz djelovanje mikrovalova. Smanjenjem snage mikrovalova i kraćim vremenom odvijanja eksperimenta smanjuje se i udio ekstrahiranih fenolnih spojeva.

Tablica 13. Rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute mikrovalovima

UZORCI Snaga(W)/ udio kolin citrata(%)/ vrijeme(min)	Fenolni spojevi (mg kg^{-1})										
	Galna kiselina	Protokatehinska kiselina	Malvidin-3-glukozid	Tirosol	Vanilinska kiselina	Vanilin	Siringinska kiselina	SDG	Pinore-sinol	n.i.*	Ukupni fenoli
100W/50%/6'	n.d.**	n.d.	n.d.	n.d.	70,5	74,5	n.d.	n.d.	18,2	228,1	246,8
100W/70%/9'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,8
100W/90%/6'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,4	31,4
200W/50%/3'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42,3	n.d.	n.d.	n.d.	105,6	147,8
200W/50%/9'	n.d.	n.d.	n.d.	119,2	87,2	110,1	n.d.	n.d.	92,1	654,1	1062,6
200W/70%/6'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58,6	58,6
200W/90%/3'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	118,7	118,7
200W/90%/9'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
300W/50%/6'	n.d.	134,5	64,3	156,0	186,3	235,0	95,1	316,7	292,4	3519,6	4951,9
300W/70%/3'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
300W/70%/9'	134,3	n.d.	98,7	208,5	274,6	230,4	174,5	334,2	496,6	5109	6989,9
300W/90%/6'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	251,6	n.d.	n.d.	n.d.	435,0	502,0

* suma neidentificiranih fenolnih spojeva

** neidentificirani spojevi

4.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka

Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka provedena je u mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru unutar ultrazvučne kupelji. Plan pokusa ekstrakcije izrađen je Box-Benhken ekperimentalnim dizajnom (tablica 14).

Kao i kod ekstrakcije mikrovalovima, zbog ograničenja samog uređaja, epruveta s uzorkom i otapalom stavljena je u vodenu kupelj koja je u ovom slučaju služila kao ultrazvučna kupelj. Također određena je maksimalna snaga mikrovalova koja se može sigurno koristiti u kombinaciji s ultrazvukom. I u ovom slučaju se pokazalo kako je maksimalna snaga mikrovalova koja se sigurno može koristiti za ekstrakciju kolin citratom 300 W.

Pri djelovanju snage mikrovalova 100 i 200 W na ekstrakciju polifenola, ekstraktibilnost fenolnih spojeva se povećava dužim vremenom djelovanja te smanjenjem udjela kolin citrata u otapalu. Djelovanjem snage mikrovalova 300 W najveća je ekstraktibilnost fenolnih spojeva kod manjeg razrjeđenja otapala (70/30). Razlog je vjerojatno povećanje temperature ekstrakcije zbog čega se smanjuje viskoznost otapala i povećava sposobnost ekstrakcije. Kombinacijom snage mikrovalova 300 W, otapala sa 70% udjela kolin citrata te djelovanjem mikrovalova i ultrazvuka kroz 9 minuta ekstrahiran je najveći udio fenolnih spojeva. Rezultati dobiveni ekstrakcijom prikazani su u tablici 15.

U radu Chemat i suradnika (2004b) opisana je ekstrakcija fenolnih spojeva kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova. Kao razloge upotrebe ultrazvuka i mikrovalova za ekstrakciju autori su naveli kraće vrijeme analize 1,3 – 2 puta, pojednostavljena manipulacija i obrada uzorka, veća čistoća gotovog proizvoda, smanjenje količine otapala, smanjenje kontaminacije, automatizacija procesa i više sigurnosti. Autori su također naveli da se kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova povećava površina prijenosa topline i mase što je razlog bolje ekstrakcije fenolnih spojeva (karvona i limonena), dolazi do oštećenja stanica i oslobađanja fenolnih spojeva ubrzavajući proces ekstrakcije.

Kao i kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, najviše je neidentificiranih fenolnih spojeva koji vjerojatno uključuju sekoiridoide.

Tablica 14. Rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

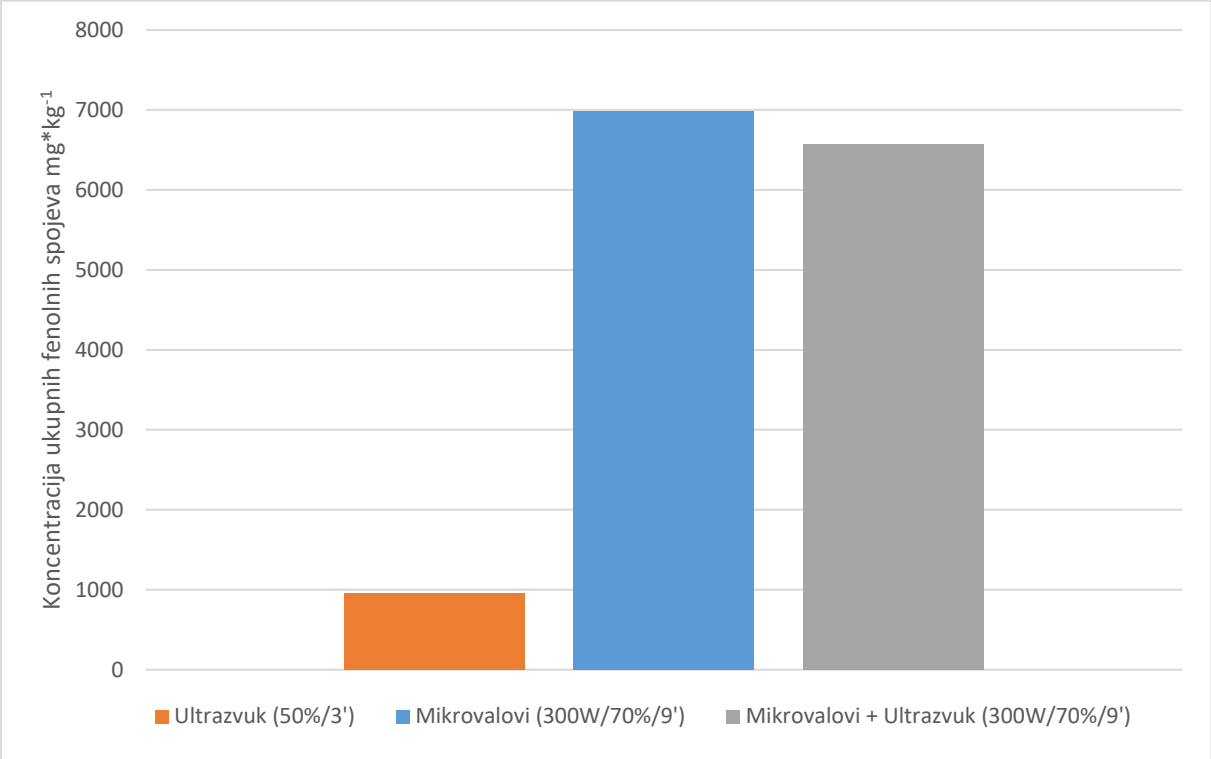
UZORCI Snaga (W)/ udio kolin citrata (%)/ vrijeme (min)	Fenolni spojevi (mg kg^{-1})											
	Malvidin -3- glukozid	Tirosol	Katehin	Vanilinska kiselina	Vanilin	Siringinska kiselina	p-kumarinska	Siring-aldehid	SDG	Pino-resinol	Neident. spoj	Ukupni fenoli
100/50/6'	n.d.	107,2	n.d.	89,7	107,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44,2	654,3	1002,7
100/70/3'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	68,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	183,0	251,9
100/70/9'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	72,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	186,2	258,3
100/90/6'	n.d.	n.d.	30,5	n.d.	68,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	125,8	193,9
200/50/3'	n.d.	94,0	n.d.	81,9	100,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86,0	611,6	973,6
200/50/9'	n.d.	140,9	33,0	158,4	188,6	n.d.	46,5	n.d.	67,3	140,8	1861,4	2636,7
200/70/6'	n.d.	73,5	n.d.	78,5	114,6	129,4	6,1	n.d.	n.d.	37,3	629,9	962,7
200/90/3'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	61,8	61,8
200/90/9'	n.d.	112,9	n.d.	n.d.	95,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	403,5	612,0
300/50/6'	74,5	114,0	30,5	82,6	152,5	0,00	26,1	0,00	91,2	353,7	2248,7	3173,8
300/70/3'	n.d.	129,3	n.d.	103,5	116,5	0,00	18,1	0,00	0,00	49,2	1049,0	1465,5
300/70/9'	163,3	252,0	n.d.	221,9	212,3	36,0	33,3	63,3	49,2	396,8	5147,3	6575,4
300/90/6'	n.d.	152,8	n.d.	77,3	45,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26,2	769,3	1115,6

* suma neidentificiranih fenolnih spojeva

** neidentificirani spojevi

4.2.4. Odabir optimalnih uvjeta ekstrakcije fenolnih spojeva komine maslina

Usporedbom ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute mikrovalovima, ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom te ekstrakcije fenolnih spojeva potpomognute ultrazvukom, određena je vrsta ekstrakcije najpogodnija za ekstrakciju prema udjelu ekstrahiranih fenolnih spojeva. Odabrana vrsta ekstrakcije je ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta mikrovalovima jer je ekstrahiran najveći udio fenolnih spojeva. Pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ekstrahira se 70% manje fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i ekstrakciju potpomognutu kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Usporedba ekstrakcija ukupnih fenolnih spojeva prikazana je na slici 9.



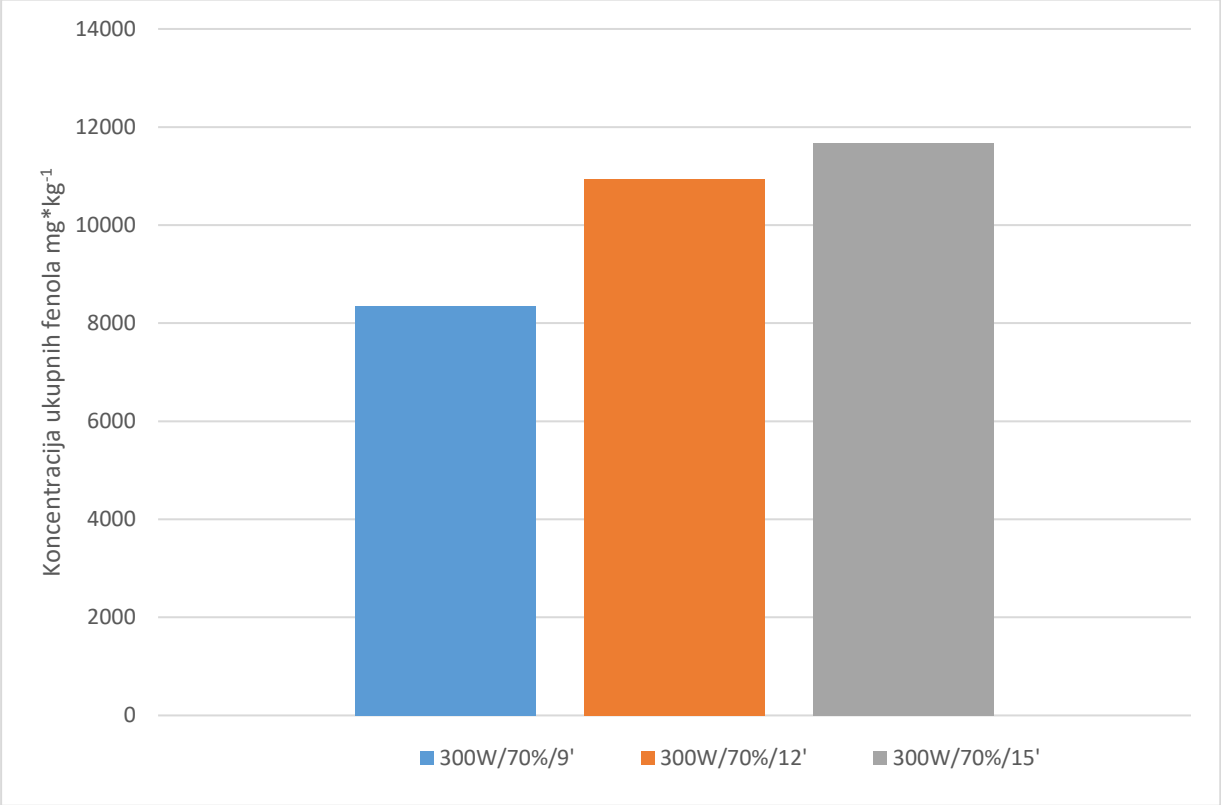
Slika 9. Usporedba koncentracije ukupnih fenola ekstrahiranih iz komine masline ultrazvukom, mikrovalovima i kombinacijom ultrazvuka i mikrovalova

Ovi su zaključci potvrđeni i ranijim istraživanjima. U radu Peng i suradnika (2015) istraživana je ekstrakcija fenolnih kiselina iz cvijeta biljke *Lonicerae japonicae* Flos eutektičkim otapalima. Uspoređivane su tri metode ekstrakcije: konvencionalna metoda ekstrakcije toplinskog refluksa, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Pokazalo se da su eutektička otapala idealna za ekstrakciju

fenolnih kiselina povećavajući njihovu topljivost u otapalu. Ultrazvuk i mikrovalovi su se pokazali efikasniji u odnosu na konvencionalnu metodu, te ekstrakcija mikrovalovima daje veći prinos fenolnih kiselina i kraće vrijeme ekstrakcije u odnosu na ultrazvuk.

S obzirom da se kao najbolja tehnika za ekstrakciju fenolnih spojeva komine maslina prirodnim eutektičkim otapalima pokazala ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, daljnji su pokusi bili usmjereni optimiranju samog procesa. S obzirom na to da su rezultati pokazali kako produljenjem vremena procesa dolazi do bolje ekstrakcije fenolnih spojeva (tablica 12, 13, 14), proces ekstrakcije sa snagom mikrovalova od 300 W i 70% kolin citratom produžen je na 12 i 15 minuta.

Ekstrakcija se nije provodila kroz duže vrijeme jer dolazi do preburne reakcije i mogućnosti puknuća staklenih dijelova instrumenta. Dobiveni rezultati ekstrakcija uspoređeni su međusobno i prikazani grafički na slici 10. Ekstrakcijom kroz 12 minuta ekstrahirano je 10 % više fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju mikrovalovima kroz 9 minuta, no samo 2 % više fenolnih spojeva je izdvojeno ekstrakcijom provedenom kroz 15 minuta u odnosu na ekstrakciju provedenu kroz 12 minuta.



Slika 10. Prikaz koncentracije ukupnih fenolnih spojeva ekstrahiranih mikrovalovima kroz 9, 12, 15 minuta

Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da su optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva komine maslina pomoću prirodnih eutektičkih snaga mikrovalova od 300 W, kroz 12 minuta uz pomoć 70%tne otopine kolin citrata. Iako je najveći udio fenolnih spojeva ekstrahiran 15 minutnim procesom taj proces nije isplativ jer se 2 %-tno povećanje udjela polifenola ne može se opravdati 25 %-tnim produljenjem vremena.

5. ZAKLJUČAK

1. Kolin citrat je prikladno otapalo za zamjenu metanola za ekstrakciju fenolnih spojeva komine masline.

2. Udio ekstrahiranih fenolnih spojeva ekstrakcijom pomoću ultrazvuka povećava se snižavanjem udjela kolin citrata u otapalu te povećanjem vremena djelovanja ultrazvuka.

3. Povećanjem snage i vremena uz eutektičko otapalo sa udjelom kolin citrata 70% povećava se udio ekstrahiranih fenolnih spojeva djelovanjem mikrovalova.

4. Povećanjem snage i vremena uz eutektičko otapalo sa udjelo kolin citrata 70% povećava se udio ekstrahiranih fenolnih spojeva djelovanjem kombinacije ultrazvuka i mikrovalova.

5. Ekstrakcijom kroz 15 minuta ekstrahirano je 12 % više fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju mikrovalovima kroz 9 mimnuta, no samo 2 % više u odnosu na ekstrakciju provedenu kroz 12 minuta. Zbog ekonomičnosti procesa optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva su djelovanjem mikrovalova kroz 12 minuta pri snazi 300 W i udjelu kolin citrata 70 %.

6. LITERATURA

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 9142–9147.

Abu-Zreig, M., Al-Widyan, M. (2002) Influence of olive mills solid waste on soil hydraulic properties. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **33**, 505-517.

Aroso, I. M., Paiva, A., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2017) Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties. J. Mol. Liq. **241,** 645-661.

Attom, M. F., Al-Shafir, M. M. (1998) Soil stabilization with burned olive waste. *Appl. Clay Sci.* [online] **13**, 219–230, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131798000076>. Pristupljeno 4. listopada 2017.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

Bezerraa, M. A., Erthal Santelli, R., Padua Oliveiraa, E., Silveira Villar, L., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965–977.

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.

Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355-362.

Chemat, S., Lagha, A., Amar, H.A., Bartels, P.V., Chemat, F. (2004a) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Frag. J.* **19**, 188–195.

Chemat, S., Lagha, A., Amar, H.A., Chemat F. (2004b) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason. Sonochem*. **11**, 5-8.

Cvitanić, M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* **200**, 159-166.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **187**, 14-19.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2,** 22-33, <http://www.academia.edu/1087546/Ultrazvu%C4%8Dna_ekstrakcija_bioaktivnih_spojeva>. Pristupljeno 4. listopada 2016.

El-Hamouza, A., Hilal, H. S., Nassar, N., Mardawi, Z. (2007) Solid olive waste in environmental cleanup: Oil recovery and carbon production for water purification. *J. Environ. Manage.* **84**, 83–92.

García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., Fernández-Bolaños, J. (2016) Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chem.* **197**, 554–561.

Gonzalez-Paramas, A., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S., RivasGonzalo, J. (2004) Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 234–238.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.

Khajeh, M. (2011) Optimization of process variables for essential oil components from Satureja hortensis by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design. *J. Supercrit. Fluid* **55**, 944–948.

Kudłak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **22**, 11975– 11992.

Milešević, M. (2016) Priprava i karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Nam, M. W., Zhao, J., Lee, M. S., Jeong, J. H., Lee J. (2015). Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from. *Flos sophorae*. *Green Chem.* **17**, 1718-1727.

Nogueira, F. (2015) Valorization of olive pomace through combination of biocatalysis with supercritical fluid technology, Fakultet znanosti i tehnologije Sveučilišta u Lisabonu, Lisabon.

Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents − Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng*. **2**, 1063–1071.

Paradiso, V. M., Clemente, A., Summo, C., Pasqualone, A., Caponio, F. (2016) Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. *Food Chem.* **212**, 43-47.

Park, E. H.,Tang, B., Kyung, H. R. (2014) Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from Herba Artemisiae Scopariae. *Anal. Lett.* **47**, 1476-1484.

Peng, X., Duan, M. H., Yao, X. H., Zhang, Y. H., Zhao, C. J., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2016) Green extraction of five target phenolic acids from Lonicerae japonicae Flos with deep eutectic solvent. *Sep. Purif. Technol*. **157**, 249-257.

Roig, A., Cayuela, M. L., Sánchez-Monedero, M. A. (2006) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manage.* **26,** 960-969.

Rombaut, N., Tixier, A. S., Bily. A., Chemat, F. (2014) Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuel Bioprod. Bior.* **8**, 530-544.

Servili, M., Montedoro, G. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *J. Lipid Sci. Technol*. [online] **104**, 602–613, <https://www.google.hr/search?q=Servili+i+motedoro+2002&oq=Servili+i+motedoro+2002&aqs=chrome..69i57.4486j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8#>. Pristupljeno 26. lipnja 2017.

StatSoft Inc. (2007) STATISTICA (data analysis software system), verzija 8. http://www.statsoft.com/.

Suárez, M., Macià, A., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2008) Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A* **1214**, 90-99.

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Puente Díaz, L., Lopez, L., Rodriguez, K., Di Scala, K. (2010) Effective moisture diffusivity determination and mathematical modelling of the drying curves of the olive-waste cake. *Bioresource Technol.* **101**, 7265–7270.

Wang, L.,Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech*. **17**, 300-312.

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev*. **41,** 7108-7146.

Žanetić, M., Gugić, M. (2006) Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica* [online] **12**, 159-173, <http://hrcak.srce.hr/4509>. Pristupljeno 4. listopada 2017.