

Priprava, karakterizacija i primjena ekstrakata ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) na inhibiranje korozije kositra

Iličić, Lea

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:159:407632>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2017.

Lea Iličić
0058199093

**PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA
I PRIMJENA EKSTRAKATA
RUŽMARINA (*Rosmarinus
officinalis*) NA INHIBIRANJE
KOROZIJE KOSITRA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonele Ninčević Grassino, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ponajprije se želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Antoneli Ninčević Grassino koja mi je svojim vodstvom i savjetima pomogla u izradi diplomskoga rada te što je imala strpljenja i vremena za moje brojne upite. Također se želim zahvaliti svim djelatnicima Laboratorija za tehnološke operacije koji su osigurali opremu potrebnu za izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskoga rada kao i njihovim korisnim savjetima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA EKSTRAKATA RUŽMARINA (*Rosmarinus officinalis*) NA INHIBIRANJE KOROZIJE KOSITRA

Lea Iličić, 0058199093

Sažetak: Primjena biljnih ekstrakata pri inhibiciji korozije metala i metalnih legura je predmet mnogobrojnih znanstvenih istraživanja.

U ovom radu je istražena mogućnost primjene ekstrakta ružmarina pri inhibiciji korozije kositra, metala u sastavu bijelog lima, najčešće korištenog ambalažnog materijala pri procesu konzerviranja prehrambenih proizvoda.

Ekstrakcija ružmarina je provedena visokim tlakom (400 MPa, 3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min) upotrebom vodenih otopina etanola i acetona.

U pripremljenim ekstraktima su određeni ukupni fenoli i flavonoidi, te antioksidacijska aktivnost primjenom UV/Vis spektrofotometrije. Antikorozijsko djelovanje etanolnog ($\varphi = 70\%$) ekstrakta ružmarina je određeno gravimetrijskom metodom na pločicama kositra.

Efikasnost inhibicije od 75,04 % u otopini natrijeva acetata/octene kiseline i 90,63 % u otopini natrijeva acetata/natrijeva klorida je pokazala da se ružmarin može koristiti ne samo kao efikasan, već i jeftin, jestiv i ekološki prihvatljiv inhibitor korozije kositra.

Ključne riječi: ekstrakcija visokim tlakom, inhibitori korozije, kositar, polifenoli, ružmarin

Rad sadrži: 53 stranice, 23 slike, 9 tablica, 53 literaturna 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. Antonela Ninčević Grassino

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Senka Djaković
2. Doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino
3. Doc.dr.sc. Tomislav Bosiljkov
4. Doc.dr.sc. Jasmina Lapić (zamjena)

Datum obrane: 30. listopada 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF ROSEMARY EXTRACTS (*Rosmarinus officinalis*) ON TIN CORROSION INHIBITION

Lea Iličić, 0058199093

Abstract: *Application of plant extracts for corrosion inhibition of metals and metal alloys has become the subject of many scientific studies.*

In this work was investigated the application of rosemary extract for tin corrosion inhibition, metal in tinplate composition, most frequently used packaging material in the food canning.

Extraction of rosemary was performed by high pressure (400 MPa 3, 6 and 9 min) and refluxing (90 and 180 min) applying water solution of ethanol and acetone.

In prepared extracts were determined the total phenols and flavonoids and antioxidative activity by UV/Vis spectrophotometry. Anticorrosion action of ethanolic ($\varphi = 70\%$) rosemary extracts was determined by gravimetric method on tin specimens.

Inhibition efficiency of 75.04 % in sodium acetate/acetic acid solution and 90.63 % in sodium acetate/sodium chloride solution showed that rosemary plant could be used not only as efficient, but also as cheap, edible and ecologically acceptable corrosion inhibitor of tin.

Keywords: *high pressure extraction, corrosion inhibitor, tin, polyphenols, rosemary*

Thesis contains: 53 pages, 23 figures, 9 tables, 53 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 Antonela Ninčević Grassino, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor
2. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
3. PhD. *Tomislav Bosiljkov*, Assistant professor
4. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 30 October 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Ružmarin	3
2.2. Fenolni spojevi	4
2.2.1. Fenolne kiseline	5
2.2.2. Flavonoidi	6
2.2.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva	7
2.2.4. Fenolni spojevi u ružmarinu	8
2.3. Metode ekstrakcije	10
2.3.1. Ekstrakcija refluksiranjem	11
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom	11
2.4. Kositar	12
2.5. Korozija metalne ambalaže	13
2.5.1. Inhibitori korozije	15
2.6. UV/Vis spektrofotometrija	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijal	17
3.2. Kemikalije	17
3.3. Aparatura i pribor	18
3.4. Metode rada	19
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina potpomognuta visokim tlakom	19
3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina refluksiranjem	20
3.4.3. Određivanje boje ekstrakata	20
3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lišća ružmarina	22
3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola	22
3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola	22
3.4.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ružmarina	23
3.4.5.1. Priprema otopina za određivanja ukupnih flavonoida	23
3.4.5.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida	23
3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lišća ružmarina DPPH metodom	24
3.4.6.1. Priprema otopina za određivanje antioksidacijske aktivnosti	24
3.4.6.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti	24
3.4.7. Priprema otopina za antikorozijska testiranja	25
3.4.8. Antikorozijski test	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Određivanje boje ekstrakata lišća ružmarina	27
4.2. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lišća ružmarina	31
4.3. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ružmarina	35
4.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lišća ružmarina	38
4.5. Antikorozijsko djelovanje ekstrakata lišća ružmarina	43
5. ZAKLJUČAK	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je biljka mediteranskog podneblja, izražajnog aromatičnog mirisa i okusa. Zbog svog kemijskog sastava upotrijebljava se u mnogim industrijskim granama, pa tako i prehrambenoj. Koristi se i u medicini jer djeluje protuupalno, kemoprotektivno, antiproliferativno i antimikrobno (del Pilar Sanchez-Camargo i Herrero, 2016).

Kemijski sastav ružmarina je kompleksan, a najzastupljeniji su fenolni spojevi, koje čine fenolni diterpeni (karnosolna kiselina, karnosol i rozmanol), flavonoidi (genkvanin, cirsimaritin i homoplantagin), te fenolni triterpeni kao što je urosolna kiselina (Borrás-Linares i sur., 2014).

Pored navedenih bioloških funkcija valja istaknuti da zbog svog sastava ružmarin pokazuje i potencijal za inhibiciju korozije metala i metalnih legura. Naime, pokazalo se da organski spojevi koji sadrže heteroatome kao što su fosfor, sumpor, dušik ili kisik i dvostruke ili trostruke veze u svojoj strukturi, imaju i tendenciju adsorpcije na metalne površine, stvarajući zaštitni sloj koji može usporiti razvoj korozije (Khan i sur., 2015).

Spoznaja o antikorozivnom djelovanju različitih biljnih ekstrakata, te sve veća osviještenost o aspektima koji utječu na ljudsko zdravlje i sigurnost okoliša privukla je pažnju znanstvenika da ispituju učinak različitih biljaka kao antikorozijskih sredstava (Kliškić i sur., 2000; Vrsalović i sur., 2009; Rani i Basu, 2011; Devarayan i sur., 2012; Khadraoui i sur., 2014a i 2014b; Khan i sur., 2015).

Njihova upotreba postaje sve veći trend u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog svoje prirode, lake dostupnosti i ekonomske isplativosti.

Zeleni inhibitori korozije su biorazgradivi, ne sadrže teške metale ili druge toksične komponente u svom sastavu, pa se sve više primjenjuju umjesto kemijski sintetiziranih, toksičnih inhibitora.

Ekstrakti biljaka *Ginko biloba* (Deng i Li, 2011), *Laurus nobilis* (Gülşen, 2011), *Lavandula dentata* (Bouammali i sur., 2013), *Ruta chalepensis* (Khadraoui i sur., 20014a), *Mentha pulegium* (Khadraoui i sur., 2014b), *Rosmarinus officinalis* (Baendahou i sur., 2006; Velázquez-González i sur., 2014; Ćatić i sur. 2016) su samo neki od primjera vrlo efikasnih inhibitora korozije čelika u korozivnim otopinama klorovodične i sumporne kiseline.

Pored navedenih ekstrakti kane i ružmarina (Pourriahi i sur., 2014), te meda i rotkvinog soka (Radojčić i sur., 2008) su se pokazali učinkovitim inhibitorima korozije nehrđajućeg čelika i kositra.

Osim nehrđajućeg čelika i drugim materijalima, poput aluminijske i magnezijске je ispitana korozivna aktivnost djelovanjem vodenog ekstrakta ružmarina kao i čistih fenolnih kiselina, sinapinske i gensitinske kiseline u otopini natrijeva klorida (Vrsalović i sur., 2009).

Budući da postoji vrlo mali broj znanstvenih radova (Ninčević Grassino i sur., 2009a; Ninčević Grassino i sur., 2009b; Ninčević Grassino i sur., 2010; Ninčević Grassino i sur., 2012) vezanih uz antikorozivnu aktivnost biljnih ekstrakata na inhibiranje korozije metala i metalnih legura u sastavu ambalažnog materijala za potrebe prehrambene industrije, cilj ovog rada bio je pripremiti 30 i 70 %-tne etanolne i acetonske ekstrakte ružmarina koji će se koristiti u istraživanjima praćenja inhibicije korozije kositra, metala u sastavu bijelog lima.

Iz tog razloga u ovom radu su pripremljeni ekstrakti ružmarina primjenom ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (HHP) kao suvremene, nekonvencionalne metode, kojom bi se dobili zadovoljavajući prinosi polifenola uz istovremeno smanjivanje vremena tretiranja uzoraka. Radi usporedbe efikasnosti ekstrakcije visokim tlakom, u ovom radu je provedena i klasična ekstrakcija refluksiranjem.

Dakle, provedeno istraživanje se sastojalo iz nekoliko faza:

- ekstrakcije uzoraka ružmarina HHP metodom (400 MPa, sobna temperatura i vrijeme od 3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min) upotrebom 30 i 70 %-tnog etanola i acetona.
- karakterizacije etanolnih i acetonskih ekstrakata ružmarina određivanjem boje, te sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti primjenom spektrofotometrije u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja.
- ispitivanja antikorozivnog djelovanja ekstrakata ružmarina na pločicama kositra gravimetrijskom metodom uz upotrebu natrijeva acetata/natrijeva klorida i natrijeva acetata/octene kiseline, otopina koje simuliraju hranu pH vrijednosti 3 i 4.

Zaključno, ovim istraživanjem bi se pokazalo da li ekstrakti ružmarina čine učinkovite inhibitore korozije, čime bi se znatno doprinijelo razvoju ideja o potencijalnim mogućnostima upotrebe i drugih biljnih ekstrakata kao prirodnih i jestivih inhibitora korozije metalne ambalaže.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je biljka koja potječe iz mediteranskih krajeva. Pripada porodici usnača - *Lamiaceae* (Slika 1).

Ružmarin je gust, zimzelen višegodišnji aromatični grm koji može narasti od 90 do 200 cm visine. Listovi su nasuprotni, sjedeći, čvrsti, kožasti, vrlo uski i duljine od 2-3 cm. Gornja strana lista je tamnozeleno, dok je donja sivo-bijele boje, a rubovi listova savijaju se prema dolje. Stabljika je drvenasta i raspucane kore. Između listova, na krajevima ogranaka razvijaju se pršljenasto, na maloj peteljci, maleni ljubičasto plavi cvjetovi (Slika 2).



Slika 1. Taksonomska klasifikacija ružmarina (Begum i sur., 2013).



Slika 2. Ružmarin (Hernández i sur., 2016).

Biljka cvate od ožujka do svibnja no ponekad i po drugi put cvate u rujnu. Listovi, grančice i cvjetovi imaju ekonomsku važnost jer sadrže eterično ulje čiji udio i kvaliteta ovise o klimatskim uvjetima i području uzgoja (Sasikumar, 2012; Hernández i sur., 2016). Uobičajeno je da se prikupljeni dijelovi biljke procesiraju bez prethodnog sušenja, no za ekstrakciju ulja mogu se koristiti osušeni listovi i grančice.

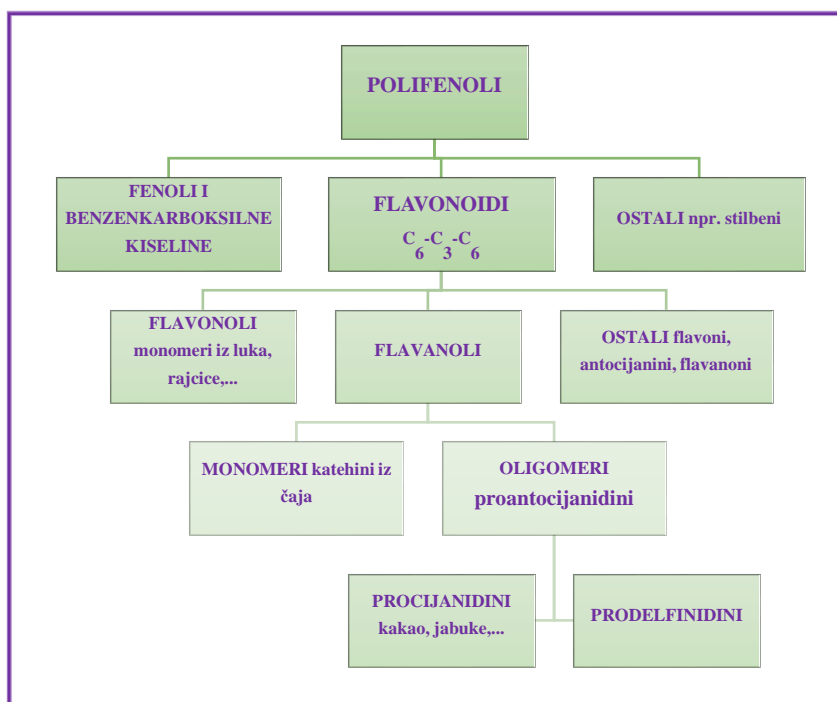
Ekstrakti i eterično ulje ružmarina mogu se koristiti u prehrambenoj industriji za stabilizaciju masti, ulja i njihovih proizvoda, te u fermentiranim mesnim proizvodima jer

usporavaju oksidaciju i pojavu užeglosti (Sasikumar, 2012). Zahvaljujući osebujnoj aromi i okusu ima važnu ulogu i u kulinarstvu (Sasikumar, 2012). Osim u prehrambenoj industriji, ružmarin ima široku primjenu i u medicini. Zbog sadržaja flavonoida pomaže protiv nadutosti i grčeva, a ima i protuupalni, antidepresivni, antimikrobni i antikancerogeni učinak (del Pilar Sánchez-Camargo i Herrero, 2016). Ružmarin je sastojak raznih kozmetičkih pripravaka kao što su šamponi za kosu, sapuni, losioni i parfemi, a neizostavan je sastojak i u aromaterapiji. Može se primjeniti i kao biljni pesticid, odnosno kao repelent za insekte.

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji imaju važnu ulogu kako u biljkama tako i u prehrambenim proizvodima. Ponajviše se primjenjuju kao prehrambene boje i antioksidansi. Dodaju se prehrambenim proizvodima radi produljivanja roka trajanja i smanjivanja rizika izlaganja ljudskog zdravlja slobodnim radikalima.

Nekoliko tisuća fenolnih spojeva, a prema Berend i Grabarić (2008) polifenola razvrstano je u nekoliko kategorija (Slika 3), koje se ponajprije međusobno razlikuju s obzirom na broj ugljikovih atoma te na osnovnu strukturu. Najvažnija podjela fenolnih spojeva je na fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline), te na flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoni, flavan-3-oli, izoflavoni i antocijanidini) (Hogervorst Cvejić i sur., 2016).

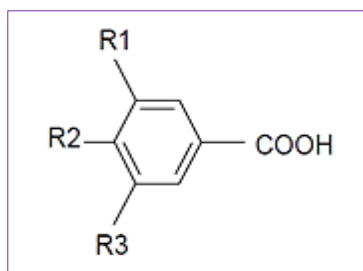


Slika 3. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Razlike u strukturi između pojedinačnih hidroksicimetnih ili hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Murković, 2003).

Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (C₆-C₁) je prikazana na Slici 4 (Balasundram i sur., 2006).



Slika 4. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (Balasundram i sur., 2006).

Ovom skupinom dominiraju galna, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina (Tablica 1.) (Stalikas, 2007).

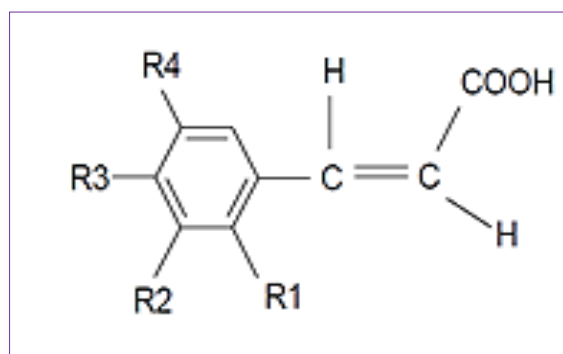
Hidroksibenzojeve kiseline mogu biti prisutne u slobodnom obliku ili konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama. Mogu biti dio kompleksnih struktura kao što su lignin ili hidrolizirani tanini (Murković, 2003).

Udio hidroksibenzojevih kiselina u namirnicama biljnog podrijetla je dosta nizak, no u bobičastom voću, luku i hrenu, nađene su i značajne količine (Murković, 2003).

Tablica 1. Najvažniji predstavnici hidroksibenzojevih kiselina (Stalikas, 2007).

Galna kiselina	$R_1=R_2=R_3=OH$
Protokatehinska kiselina	$R_1=H, R_2=R_3=OH$
Vanilinska kiselina	$R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3$
Siringinska kiselina	$R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$

Voće obiluje različitim derivatima hidroksicimetne kiseline čija je osnovna struktura C₆-C₃ (Slika 5) (Balasundram i sur., 2006). Svi pripadnici ove skupine derivati su cimetne kiseline, a prisutni su uglavnom kao kompleksni oblici četiri osnovne molekule: *p*-kumarinske, kafeinske, ferulinske i sinapinske kiseline (Tablica 2) (Stalikas, 2007).



Slika 5. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (Balasundram i sur., 2006).

Slobodni oblici ovih kiselina vrlo su rijetki, uglavnom se pojavljuju u različitim konjugiranim oblicima, kao amidi i esteri (Murković, 2003).

Identificirana su dva osnovna tipa topljivih derivata hidroksicimetne kiseline. Kod prvog tipa dolazi do stvaranja esterske veze između karboksilne skupine fenolne kiseline i alkoholne skupine organskog spoja. Primjer je klorogenska kiselina pronađena u jabukama, breskvama, kruškama, šljivama, avokadu i mrkvi (Murković, 2003). Drugi tip podrazumijeva stvaranje glikozidne veze sa jednom od fenolnih skupina molekule, a primjer je O-glikozid *p*-kumarinske kiseline (Murković, 2003).

U mnogim vrstama voća i povrća prevladava kafeinska kiselina, a čini preko 75 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina u šljivama, jabukama, marelicama, borovnicama i rajčici. U citrusnim vrstama i ananasu prevladava *p*-kumarinska kiselina (Murković, 2003).

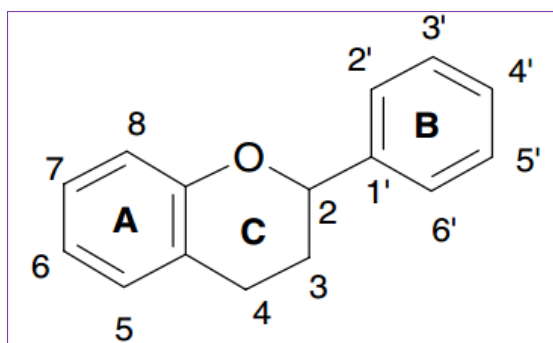
Tablica 2. Najznačajniji predstavnici hidroksicimetnih kiselina (Stalikas, 2007).

Ferulinska kiselina	$R_1=R_2=H, R_3=OH, R_4=OCH_3$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$
<i>o</i> -kumarinska kiselina	$R_2=R_3=R_4=H, R_1=OH$
Kafeinska kiselina	$R_1=R_2=H, R_3=R_4=OH$
Sinapinska kiselina	$R_1=H, R_3=OH, R_2=R_4=OCH_3$

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi sa osnovnom flavanskom strukturom koju čini difenilpropanski kostur sa C_{15} atoma ($C_6-C_3-C_6$), građen od dva benzenska prstena A i B koji su povezani piranskim prstenom C koji sadrži kisik (Slika 6). Do danas je identificirano preko 4000 različitih flavonoida (Balasundram i sur., 2006), a razlike između pojedinih flavonoidnih

podskupina proizlaze iz razlike u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije (Murković, 2003).



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

Spojevi ove skupine pokazali se se kao jakim antioksidansima (Berend i Grabarić, 2008), a njihov mehanizam opisan je u poglavlju 2.2.3.

2.2.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva

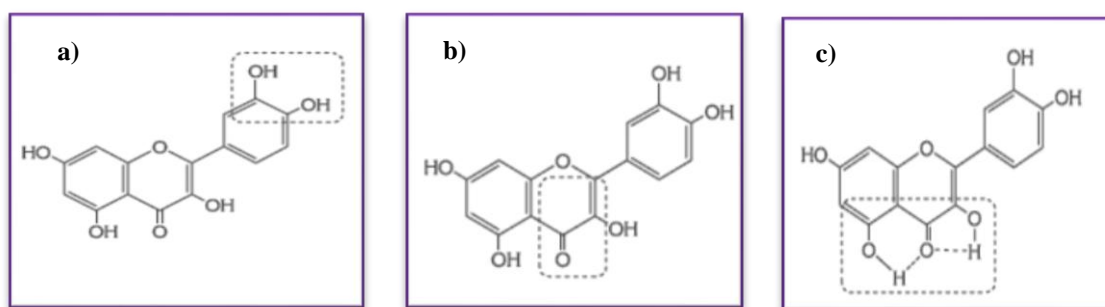
Odavno je poznato da dodatak antioksidanasa u prehrambene proizvode utječe na poboljšanje njihovih nutritivnih svojstava kao i na sprječavanje degradacije istih djelovanjem slobodnih radikala (Rice Evans i sur., 1996).

Djelovanje nekog spoja kao antioksidansa određeno je njegovom sposobnosti stabilizacije slobodnih radikala, a time i sprječavanja lančanih reakcija radikala s drugim molekulama u reaktivnom mediju. Do stabilizacije radikala obično dolazi delokalizacijom nesparenog elektrona i stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza te posljedično tome radikal više nema dovoljno energije za nastavak oksidacijskih reakcija (Kazazić, 2004). Peroksidni radikal - anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\bullet}) i vodikov peroksid (H_2O_2), te dušikov monoksid (NO^{\bullet}), peroksinitrit ($^{\bullet}ONOO$) i dušikov dioksid (NO_2) predstavljaju neke od slobodnih radikala kisika, odnosno dušika izrazite reaktivnosti (Kazazić, 2004).

Zahvaljujući svojoj kemijskoj strukturi fenolne spojeve, posebice flavonoide možemo smatrati vrlo učinkovitim antioksidansima. Razlog tomu je njihova sposobnost „hvatanja“ elektrona slobodnih radikala, keliranja metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i

inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004). Za „hvatanje“ radikala odgovorne su tri strukturne skupine flavonoida, a to su (Slika 7):

- kateholna (*o* - dihidroksilna) struktura u B prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućava delokalizaciju elektrona
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B prstena
- prisutnost hidroksilnih skupina na položajima 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto skupinom

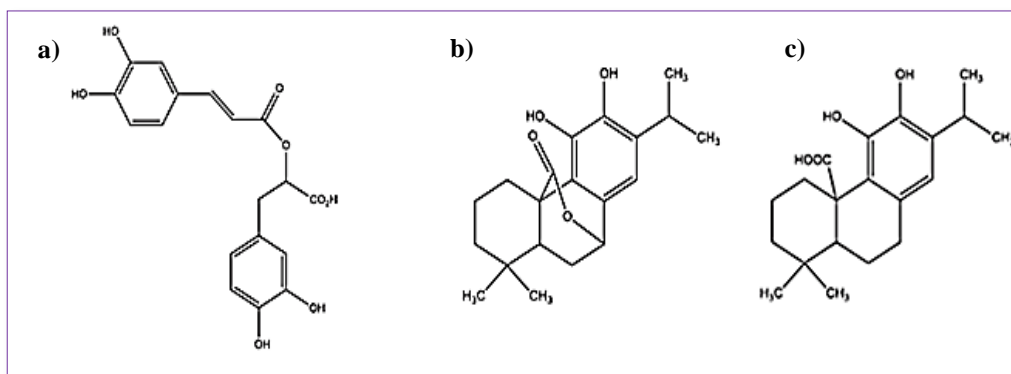


Slika 7. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

2.2.4. Fenolni spojevi u ružmarinu

Fenolne spojeve u ružmarinu predstavljaju flavonoidi (genkvanin, cirsimaritin i homoplantagin), fenolne kiseline (ružmarinska, klorogenska i kafeinska kiselina) i fenolni diterpeni (karnosol, karnosolna kiselina i rozmanol) (Begum i sur., 2013).

Ružmarinska kiselina, karnosol i karnosolna kiselina (Slika 8) predstavljaju najznačajnije fenolne spojeve ružmarina, izraženih antioksidacijskih svojstava (Erkan i sur., 2008; Borrás-Linares i sur., 2014). Karnosolna kiselina ima lipofilna, a ružmarinska hidrofilna svojstva, pa se ekstrakti ružmarina mogu koristiti pri spriječavanju oksidacije kako polarnih tako i nepolarnih prehrambenih proizvoda (Berdahl i McKeague, 2015).



Slika 8. Kemijska struktura: a) ružmarinske kiseline, b) karnosola i c) karnosolne kiseline (Berdahl i McKegaue, 2015).

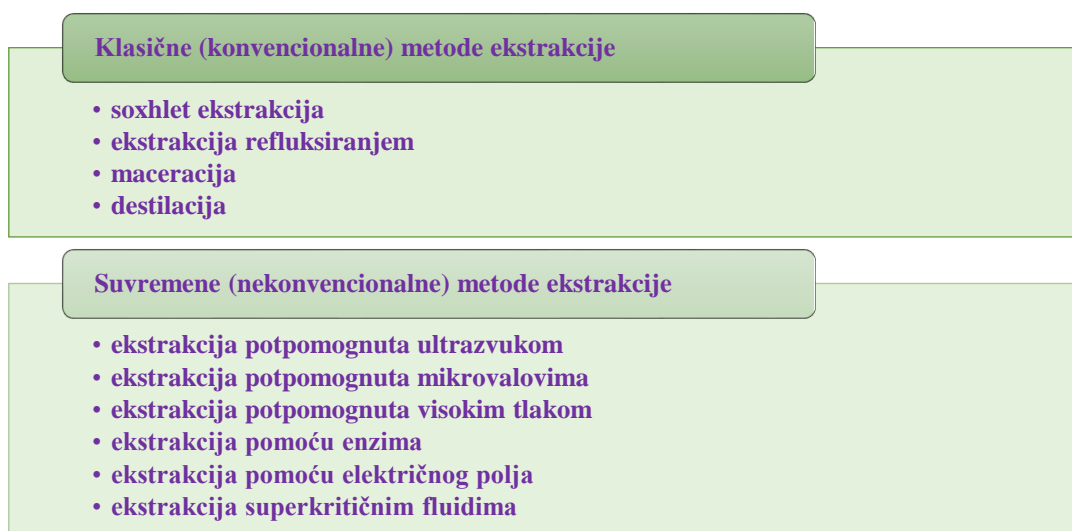
Sadržaj fenolnih spojeva u ružmarinu može varirati ovisno o varijetetu biljke, području i uvjetima uzgoja (nadmorska visina, vrsta tla i klimatski uvjeti), vremenu berbe i postupcima obrade uzorka (sušenje, smrzavanje i skladištenje), metodama ekstrakcije i primjenjenim ekstrakcijskim parametrima (otapalo, tlak, temperatura i vrijeme). S obzirom na navedeno neki fenolni spojevi su nađeni u većim, a neki u manjim koncentracijama.

Tako su Mulinacci i sur. (2011) utvrdili da svježi listovi ružmarina sadrže 12349,83 $\mu\text{g g}^{-1}$ ružmarinske kiseline, 11283,96 $\mu\text{g g}^{-1}$ karnosola i 14240,19 $\mu\text{g g}^{-1}$ karnosolne kiseline, dok prethodno zamrznuti uzorci 3520,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ ružmarinske kiseline, 12894,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ karnosola i 14562,51 $\mu\text{g g}^{-1}$ karnosolne kiseline. U istraživanju Herrero i sur. (2010) nađene su vrijednosti u rasponu od 8,597 - 16,781 μg za ružmarinsku kiselinu, 7,798 - 226,392 μg za karnosol i 0,03 - 151,554 μg za karnosolnu kiselinu po mg ekstrakta ružmarina, ovisno o metodi ekstrakcije, upotrebljenom otapalu, vremenu, tlaku i temperaturi. Istraživanje Rodríguez-Rojo i sur. (2011) je pokazalo da ekstrakti ružmarina sadrže od 0,014 - 0,62 mg mL^{-1} ružmarinske i 0,0035 - 0,36 mg mL^{-1} karnosolne kiseline, ovisno o metodi ekstrakcije i upotrebljenom otapalu.

Prema Borrás - Linares i sur. (2014) ružmarin prikupljen na području Srbije, na različitim nadmorskim visinama (72 - 764 m) sadrži visoke udjele fenolnih diterpena i triterpenskih kiselina, a ponajviše karnosolne kiseline, karnosola te betulinske i urosolne kiseline. U nekim uzorcima su zabilježeni i visoki udjeli kininske i siringinske kiseline kao i flavonoida nepetrina i galokatehina.

2.3. Metode ekstrakcije

Glavni cilj u proizvodnji biljnih ekstrakata je dobivanje proizvoda ujednačene kvalitete, sa visokim udjelom antioksidansa koji će se moći primjenjivati u raznim prehrambenim proizvodima te čija će cijena, s obzirom na kvalitetu biti prihvatljiva. To podrazumijeva i odabir odgovarajuće metode ekstrakcije. One se mogu podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne metode (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz metoda ekstrakcije.

Iako klasične (konvencionalne) metode daju zadovoljavajuće rezultate s obzirom na prinos bioaktivnih spojeva, danas sve veću važnost imaju suvremene, nekonvencionalne, ekološki prihvatljive metode (Herrero i sur., 2010). Razlozi njihove primjene se temelje na izbjegavanju termalne degradacije biološki aktivnih spojeva, većoj efikasnosti ekstrakcije, skraćivanju vremena tretiranja uzoraka, te smanjivanju upotrebe štetnih organskih otapala (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Kod odabira odgovarajuće metode ekstrakcije valja uzeti u obzir sve čimbenike koji utječu na sam proces izolacije željenog analita: kemijski sastav uzorka, stupanj usitnjenosti (veličina čestica), prisutnost interferirajućih sastojaka u uzorku, vrijeme ekstrakcije, temperaturu, otapalo, omjer otapala i uzorka, te broj ponavljanja ekstrakcije.

Ekstrakcijsko vrijeme i temperatura uvelike utječu na topljivost sastojaka uzorka, pri čemu s porastom temperature rastu topljivost i brzina prijenosa mase, a smanjuje se viskoznost i površinska napetost otapala (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Budući da fenolni spojevi pokazuju više hidrofilna nego lipofilna svojstva njihova ekstrakcija se uglavnom provodi primjenom metanola, etanola, acetonitrila i acetona ili

kombinacijom ovih otapala sa vodom (Borrás-Linares i sur., 2014; Velázquez-González i sur., 2014; Berdahl i McKeague, 2015; Brglez Mojzer i sur., 2016) gdje se slobodni fenolni spojevi zajedno sa aglikonima, glikozidima i oligomerima lako ekstrahiraju iz različitih biljnih materijala.

S obzirom na razliku u polarnosti i topljivosti različitih komponenata u nekom uzorku, ne postoji jedno otapalo, odnosno jedna metoda kojom bi se mogle izdvojiti sve biološki važne komponente. Osim toga, na udio fenolnih spojeva u ekstraktu utječu i metode obrade sirovine, prije same ekstrakcije. Tako su Berdahl i McKeague (2015) pokazali da uslijed pohranjivanja svježih listova ružmarina u zamrzivač može doći do brze razgradnje ružmarinske kiseline, a ukoliko se koriste osušeni umjesto svježih listova dolazi i do smanjivanja sadržaja flavonoida.

2.3.1. Ekstrakcija refluksiranjem

Refluksiranje (grijanje uz povrat) je postupak prevođenja otapala u paru i ponovno kondenziranje nastalih para u tekućinu koja se vraća u reakcijsku smjesu. Obično se primjenjuje kod ekstrakcije čvrstog materijala tekućim otapalom (ekstrakcija čvrsto - tekuće) pri čemu se tvori iz čvrste faze izdvajaju i prelaze u tekuću fazu odnosno u otapalo. Metoda podrazumijeva zagrijavanje uzorka sa otapalom u aparaturi sa povratnim hladilom. Iako je efikasnost ekstrakcije ovom metodom izrazito velika, njeni osnovni nedostaci su upotreba velikih količina otapala, dugo vrijeme ekstrakcije i mogućnost ekstrahiranja interferenata koje je potrebno dodatno ukloniti. Budući da se ekstrahirani materijal mora odvojiti od otopine s analitom, kod ove ekstrakcijske tehnike potrebno je provesti i postupak filtriranja (Rapić, 1994).

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom

Jedna od novijih metoda ekstrakcije je ona potpomognuta visokim tlakom. U usporedbi sa konvencionalnim metodama ekstrakcije, ova metoda je brža, daje veće prinose i čišće ekstrakte. Budući da se može provoditi pri sobnoj temperaturi i tlakovima od 100 do 1000 MPa ne dolazi do toplinske razgradnje, niti gubitka bioaktivnih svojstava ekstrakta (Bosiljkov i sur., 2010; Huang i sur., 2013).

Prije podvrgavanja ekstrakciji, sirovi biljni materijal se miješa sa odgovarajućim otapalom, a zatim se pripremljeni uzorak stavlja u komoru uređaja za visoki tlak te podvrgava

ekstrakciji pri određenim parametrima. U komori, tlak se brzo povećava sa atmosferskog na odabranu vrijednost (od 100 do 1000 MPa). Na početku procesa ekstrakcije, tlak unutar biljne stanice relativno je nizak, porastom tlaka u komori, naglo raste i tlak unutar stanica. Razlika tlakova sa vanjske i unutarnje strane stanične stijenke je velika i posljedično dovodi do deformacije i oštećenja stijenke. Uslijed ovih promjena otapalo vrlo brzo prodire kroz oštećenu stijenkicu, ulazi u stanice i dolazi u kontakt sa staničnim materijalom pri čemu, ovisno o otapalu, odgovarajuće aktivne komponente prelaze u otapalo (Huang i sur., 2013). Po završetku procesa uzorak se filtrira kako bi se odvojio čvrsti ekstrahirani materijal od ekstrakta koji se može dalje koncentrirati, sušiti ili pročišćavati (Shouqin i sur., 2004).

Pored vremena tretiranja uzorka visokim tlakom, na samu ekstrakciju, odnosno prinos ekstrahiranih željenih sastojaka, utječu vrsta i volumni udio upotrijebljenog otapala.

2.4. Kositar

Kositar je esencijalni element, prisutan u tragovima kod ljudi, životinja i biljaka. U ljudski organizam dolazi u anorganskom ili organskom obliku kozumiranjem svježe hrane. Povrće, voće, voćni sokovi, mliječni proizvodi, meso, riba, jaja, pivo i ostali neprerađeni prehrambeni proizvodi sadrže ga u količinama ispod 2 mg kg^{-1} (WHO, 2005).

Najveći izvori kositra nalaze se u konzerviranoj hrani, od $1 - 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ (WHO, 2005). Prema istraživanju Blunden i Wallace (2003) sokovi od grejpa, naranče, ananasa i rajčice mogu sadržavati od $51 - 150 \text{ mg kg}^{-1}$ kositra. U nekim ekstremnijim slučajevima pronađene su količine od $100-500 \text{ mg kg}^{-1}$ za konzervirane voćne sokove i $140 - 400 \text{ mg kg}^{-1}$ za konzervirani sok od rajčice (Boogaard i sur., 2003). Također, pokazano je da proizvodi konzervirani u nelakiranoj metalnoj ambalaži sadrže kositar u količini od $24 - 156 \text{ mg kg}^{-1}$, dok u lakiranoj metalnoj ambalaži u količinama nižim od 10 mg kg^{-1} kositra (npr. $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ pronađena je u konzerviranim trešnjama), pa do $13,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (konzervirane gljive) (WHO, 2005).

Iako kositar predstavlja važan element u ljudskoj prehrani jer utječe na metabolizam drugih kemijskih elemenata, poput željeza, bakra, cinka, selena i kalcija, njegov unos u organizam putem konzervirane hrane treba biti kontroliran. Naime, previsoke količine kositra mogu dovesti do trovanja organizma jer se kositar apsorbira u probavnom traktu (od toga $2,8\%$ čine Sn^{2+} spojevi i $0,64\%$ Sn^{4+} spojevi), a zatim i konačno nakuplja u kostima, mišićima, srcu, slezeni i bubrezima. Uglavnom izaziva probavne smetnje, dok po život opasna trovanja nisu pronađena.

Da bi se izbjegao neželjeni učinak kositra na ljudski organizam, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, 2005) predložila je maksimalnu dopuštenu količinu kositra u konzerviranoj hrani (250 mg kg^{-1}) i piću (200 mg kg^{-1}). Posebnu kategoriju predstavlja dječja konzervirana hrana, čije su maksimalne dopuštene doze 50 mg kg^{-1} .

Unutar Europske unije postoji niz proturječnosti s obzirom na propisane količine, pa tako svaka država ima svoje maksimalno dopuštene vrijednosti, koje se kreću unutar WHO normi. Naš pravilnik (Narodne novine, 2005) o najvišoj dopuštenoj količini metala i metaloida u metalnoj ambalaži propisuje sljedeće količine kositra: dječja hrana do 50 mg kg^{-1} , hrana do 200 mg kg^{-1} , te pića, uključujući i sokove 100 mg kg^{-1} .

2.5. Korozija metalne ambalaže

Metalna ambalaža za potrebe prehrambene industrije ima odlična svojstva u očuvanju kvalitete brojnih namirnica jer je nepropusna za plinove, tekućinu, svjetlost, ima veliku mehaničku čvrstoću, a zbog dobre toplinske vodljivosti ovaj oblik ambalaže pogodan je i za sterilizaciju. Danas se u metalnu ambalažu pakira više od 1500 različitih prehrambenih proizvoda (Simić, 2013), a jedan od najčešće korištenih materijala je bijeli lim (engl. *tinplate*). Premda ga danas zamjenjuju drugi materijali poput čelika bez kositra (engl. *tin free steel*) i aluminijski, njegovo mjesto ostaje i dalje nezaobilazno u prehrambenoj konzervnoj industriji.

Bijeli lim je nehomogeni materijal slojevite strukture, a čini ga čelična ploha (baza), legura željezo-kositar, slobodni (nevezani) kositar, pasivirani sloj i sloj ulja.

Čisti kositar (99,95 %) nanosi se na čeličnu bazu elektrolitičkim postupkom, pri čemu masa kositra nanosena po površini čelične baze može biti od $1,0 - 15,0 \text{ g m}^{-2}$. Poznato je da veća masa kositra doprinosi boljoj zaštiti od korozije.

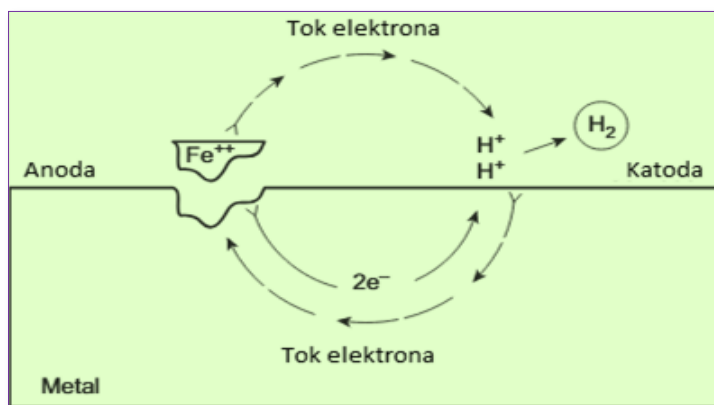
Osnovni nedostatak metalne ambalaže, pa tako i bijelog lima je podložnost metala koroziji. Korozija je prirodni fenomen koji se odnosi na kemijske ili elektrokemijske procese razaranja površine metala i legura (Marsal, 2003).

Kemijska korozija metala, sa stajališta ambalaže za prehrambenu industriju, nije toliko zastupljena. Zapravo, ona predstavlja oksidaciju metala molekulskim kisikom, odvija se sporo i bez prisutnosti elektrolita, te se uglavnom može zamijetiti sa vanjske strane limenke.

U slučaju elektrokemijske korozije, proces je sličan reakcijama u galvanskom članku. Razlika potencijala između dva metala u otopini elektrolita je pokretač toka elektrona. Korodirat će onaj metal sa negativnijim elektrokemijskim potencijalom. Pozitivniji metal

ponaša se kao katoda i zapravo je zaštićen prisustvom negativnijeg metala koji se tada ponaša kao anoda (Popov, 2015a).

Na Slici 10 vidimo ilustraciju korozije željeza u kiselom mediju. Uslijed razlike potencijala dolazi do gubitka elektrona sa anode i njihova primanja na strani katode (vodikovi ioni) uz formiranja vodika. Reakcija teče toliko dugo dok akceptori elektrona primaju, odnosno uklanjaju elektrone iz materijala (Featherstone, 2015).



Slika 10. Korozija željeza u kiselom mediju (Featherstone, 2015).

Prehrambeni proizvodi koji se pakiraju u metalnu ambalažu uglavnom sadrže i vodeni medij koji može djelovati kao otopina elektrolita (Marsal, 2003). Ukoliko postoje oštećenja na metalnoj ambalaži, primjerice ukoliko je oštećen zaštitni sloj kositra na čeliku, otopina elektrolita (namirnica) dopire do čelične osnove limenke i dolazi do pojave korozije (kositar se ponaša kao anoda, odnosno otpušta svoje elektrone) [1]:



U dvovalentnom oksidacijskom stanju kositar može biti prisutan kao kompleksni ion, poput SnCl_4^{2-} , $[\text{Sn}(\text{OH})_3]$, $[\text{Sn}(\text{OH})_4]^{2-}$ i SnO_2^{2-} , ali i kao neutralna molekula. Koji od oblika će prevladavati ovisi o tipu hrane koja reagira s materijalom limenke.

Tako hrana s pH-vrijednosti većom od 2 utječe na stvaranje dvovalentnog kositra u formi hidroksida ($\text{Sn}(\text{OH})_2$). Ovaj spoj ima vrlo nisku topljivost (Blunden i Wallace, 2003).

Također i organske kiseline u hrani (npr. voće i voćni sokovi), poput limunske, vinske, jabučne, octene i oksalne mogu izazvati reakcije stvaranja stabilnih stanatnih kompleksa (Blunden i Wallace, 2003). Sposobnost stvaranja kompleksa s kositrom pokazuju i drugi kemijski spojevi kao alkoholi, esteri i više masne kiseline (Blunden i Wallace, 2003).

I hrana bogata sumporom, nitratima i kisikom reagira s kositrom, utječući na njegovu ubrzanu oksidaciju. Sličan učinak imaju i antocijani, a prisutni su u visokim koncentracijama u crvenom voću i povrću, te njihovim sokovima (npr. malina, ribiz, trešnja, rajčica).

Korozija je stvaran problem koji se ne može u potpunosti izbjeći, no moguće ga je usporiti, primjenom inhibitora korozije.

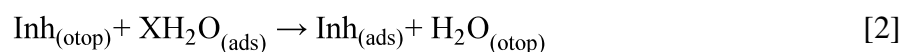
2.5.1. Inhibitori korozije

Inhibitori korozije su tvari koje učinkovito smanjuju ili u potpunosti spriječavaju koroziju metala izloženog korozivnom mediju (Popov, 2015b). Dije se prema mehanizmu inibicije, primjeni ili kemijskoj strukturi. Tako se u literaturi (Popov, 2015b) mogu pronaći pod nazivom anodni ili pasivirajući, katodni, adsorpcijski ili organski inhibitori, inhibitori koji uzrokuju taloženje i dr. Čak i male koncentracije dodanih inhibitora mogu rezultirati smanjenjem brzine korozije, a kod njihova odabira valja zadovoljiti određene uvjete, poput prihvatljive cijene, lake dostupnosti, netoksičnosti za okoliš i žive organizme u njemu (Khan i sur., 2015).

Pokazalo se da određeni organski spojevi mogu biti vrlo učinkoviti inhibitori korozije (Khan i sur., 2015) jer u svojoj strukturi sadrže heteroatome (fosfor, dušik, sumpor ili kisik) sa velikom gustoćom elektrona, te dvostrukim ili trostrukim vezama. Takva kemijska struktura im osigurava veliku moć adsorpcije na površinu metala koji se štiti od korozivnog djelovanja. Adsorpcija se može postići na nekoliko načina:

1. Adsorpcija uslijed elektrostatskog privlačenja nabijenih molekula inhibitora i nabijene metalne površine
2. Adsorpcija uslijed interakcije nesparenog para elektrona molekule sa metalnom površinom
3. Adsorpcija kao rezultat prisutnosti konjugiranih veza (π elektron) u spoju s metalom
4. Adsorpcija uslijed kombinacije uvjeta opisanih pod brojem 1 i 3.

Adsorpcijom inhibitora, blokiraju se aktivna mjesta na površini metala, a korozija se usporava uslijed smanjene brzine reakcija na katodi i/ili anodi, smanjene brzine difuzije elektrona na površinu te smanjene električne otpornosti metalne površine. Mehanizam adsorpcije organskih inhibitora odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak je zamjena jedne ili više molekula vode koje su inicijalno vezane za površinu meala, molekulom inhibitora [2]:



Na površini metala nastaju metalni ioni kao rezultat oksidacije ili procesa raspada [3]. Posljedično tome, inhibitor može ući u reakciju sa novonastalim ionima metala na površini tvoreći kompleks metal - inhibitor [4]:



Iako različiti sintetski organski spojevi djeluju kao izvrsni inhibitori korozije, većina njih je toksična za ljude i okoliš. Osim toga, njihova sinteza je skupa, a nisu ni biorazgradivi (Khan i sur., 2015).

Iz tog razloga današnja istraživanja su sve više usmjerena k pronalasku novih, jeftinih, prirodnih i za okoliš prihvatljivih inhibitora. Pri tome značajno mjesto u suzbijanju korozije metala i njihovih legura zauzimaju biljni ekstrakti (Kliškić i sur., 2000; Vrsalovic i sur., 2009; Deng i Li, 2011; Gülşen, 2012; Rani i Basu, 2012; Khadraoui i sur., 2014; Bouammali i sur., 2013; Khan i sur., 2015).

2.6. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je analitička metoda koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu velikog broja anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) dijelu spektra. Mnoge kemijske vrste koje ne apsorbiraju UV ($\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$) ili Vis ($\lambda = 400\text{-}800\text{ nm}$) zračenje mogu se kemijskom reakcijom prevesti u derivate koji apsorbiraju. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka (analita) i njegove koncentracije pri odabranoj valnoj duljini (λ) daje Lambert-Beerov zakon [5]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l \quad [5]$$

gdje je A apsorbancija, I_0 intenzitet ulazne zrake, I intenzitet zrake nakon prolaska kroz uzorak, ε molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), c množinska koncentracija (mol L^{-1}) i l duljina puta svjetlosti kroz uzorak (promjer kivete, cm).

Uređaj za mjerenje naziva se spektrofotometar, a sastoji se od: izvora zračenja, selektora valnih duljina (monokromator), spremnika za uzorak (kiveta), detektora i procesora signala.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

Osušeni listovi ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) prikupljeni na području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska). Na Slici 11. prikazani su osušeni i usitnjeni listovi ružmarina.



Slika 11 *. Osušeni i usitnjeni listovi ružmarina.

Pločice kositra (99,9 %) za korozijska ispitivanja su pribavljene u Primet d.o.o. - International metal trader, Slovenija.

3.2. Kemikalije

- Aceton (99 %, Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Etanol (96 %, Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Metanol (95 %, Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev acetat trihidrat (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

* Slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju i Laboratoriju za tehnološke operacije.

- Natrijev klorid (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italija)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Octena kiselina (99,5 %, Kemika, Zagreb, 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 mješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- pH metar Lab 860 (Schott Instruments, Mainz, Njemačka)
- Uređaj za visoki tlak (Stansted Fluid Power LTD, Stanford, Velika Britanija)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1, Massachusetts, SAD)
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Filter papir, obični
- 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
- Plastične boce od 100 mL za ekstrakciju visokim tlakom
- Propipeta
- Staklene boce za čuvanje uzoraka
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Uljna kupelj

3.4. Metode rada

- ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (engl. *high hydrostatic pressure extraction*, HHP) i refluksiranjem
- kolorimetrijsko određivanje boje ekstrakata dobivenih ekstrakcijom visokim tlakom i refluksiranjem
- UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima, te njihove antioksidacijske aktivnosti
- gravimetrijsko određivanje antikorozijske aktivnosti ekstrakata ružmarina na uzorcima kositrenih pločica

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina potpomognuta visokim tlakom

Ekstrakcija fenola provedena je na uzorcima osušenih i usitnjenih listova ružmarina primjenom visokog hidrostatskog tlaka (Slika 12, Stansted Fluid Power LTD, Velika Britanija), na sobnoj temperaturi, pri tlaku od 400 MPa i vremenu od 3, 6 i 9 min.

Točno 3,00 g uzorka je ekstrahirano sa 100 mL vodenih otopina acetona i etanola. Volumni udjeli (φ) organskih otapala u vodenoj fazi iznosili su 30 i 70 %.

Nakon završene ekstrakcije uzorci su ručno stiješteni kroz gazu, procijeđeni kroz cijedilo, te filtrirani preko običnog filter papira u odmjerne tikvice od 100 mL. Potom su profiltrirani ekstrakti nadopunjeni otapalom korištenim za ekstrakciju. Ovako pripremljeni uzorci (Slika 13) skladišteni su u hladnjaku, na temperaturi od +4°C.



Slika 12* . Uređaj za visoki hidrostatski tlak (Stansted Fluid Power, Velika Britanija).



Slika 13*. Ekstrakti lišća ružmarina dobiveni ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom.

3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lišća ružmarina refluksiranjem

Za ekstrakciju metodom refluksiranja uzorci su priređeni na isti način kao i kod ekstrakcije visokim hidrostatskim tlakom (3,00 g uzorka/100 mL 30 ili 70 %-tnog acetona i etanola). Ekstrakcija je trajala 90 i 180 min, na povišenoj temperaturi (temperatura vrelišta otapala). Postupak obrade ekstrahiranih uzoraka za daljnja analitička određivanja identičan je postupku opisanom u poglavlju 3.4.1. Pripremljeni uzorci (Slika 14) skladišteni su u hladnjaku, na temperaturi od +4°C.



Slika 14*. Ekstrakti lišća ružmarina dobiveni ekstrakcijom refluksiranjem.

3.4.3. Određivanje boje ekstrakata

Boja 30 i 70 %-tnih acetonskih i etanolnih ekstrakata ružmarina određena je kolorimetrom CM - 3500d (Slika 15, Konica - Minolta, Japan) po CIE L , a , b sistemu. Hunter-ove 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 ekstrakata ružmarina uspoređene su sa vrijednostima izmjerenim za vodeni ekstrakt ružmarina dobiven refluksiranjem (referentni uzorak, R2). Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka (L^*a^*b) prema:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [6]$$

gdje je:

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

$-\Delta L$ - uzorak je tamniji od standarda

$+\Delta L$ - uzorak je svjetliji od standarda

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

$-\Delta a$ - uzorak je zeleniji od standarda

$+\Delta a$ - uzorak je crveniji od standarda

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

$-\Delta b$ - uzorak je plaviji od standarda

$+\Delta b$ - uzorak je žući od standarda



Slika 15*. Kolorimetar CM-3500d (Konica-Minolta, Japan).

3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lišća ružmarina

Sadržaj ukupnih fenola određen je u etanolnim i acetonskim ekstraktima lišća ružmarina primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom, u blago alkalnim uvjetima. Tijekom reakcije fenolni spojevi se oksidiraju i pri tome reduciraju FC reagens (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) u molibdenov i volframov oksid koji su plavo obojeni. Intenzitet obojenja ovisan o koncentraciji fenolnih spojeva u ekstraktu mjeri se pri valnoj duljini od 760 nm.

3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$)

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetirano je 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa množinske koncentracije 2 mol L^{-1} i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.

- Otopina bezvodnog 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

Postupku određivanja ukupnih fenola u acetonskim i etanolnim ekstraktima lišća ružmarina prethodila je izrada baždarnog dijagrama.

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljena je standardna otopina galne kiseline tako da je 0,5 g galne kiseline odvagano i otopljeno u 10 mL etanola. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL, te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Iz ishodne standardne otopine galne kiseline pripremljen je niz pojedinačnih standardnih otopina poznatih masenih koncentracija od 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg L^{-1} . Zatim je otpipetiran 1,0 mL svake pojedine standardne otopine u odmjernu tikvicu od 25 mL, dodano 10 mL destilirane vode i 1,3 mL FC otopine ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Nakon 5 minuta dodano je 3,75 mL 20 %- tne otopine Na_2CO_3 i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljene otopine čuvane su 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, a zatim im je izmjerena apsorbancija pri 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 0,1 mL uzorka. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 ili 0,1 mL).

3.4.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ružmarina

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je u etanolnim i acetonskim ekstraktima lišća ružmarina primjenom spektrofotometrijske metode. Dodatkom aluminijskoga klorida dolazi do formiranja stabilnih aluminijskih kompleksa sa keto skupinom na C-4 atomu ili hidroksilnom skupinom na C-3 ili C-5 atomu flavona ili flavanola.

3.4.5.1. Priprema otopina za određivanja ukupnih flavonoida

- Otopina natrijskoga nitrita (5 %, w/v)
Odvagano je 5 g NaNO_2 i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijskoga klorida (10 %, w/v)
Odvagano je 10 g AlCl_3 i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijskoga hidroksida ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$)
Odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.

3.4.5.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida također je bilo potrebno izraditi baždarni dijagram. U tu svrhu 0,1 g rutina je otopljen 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^{-1} . Za određivanje njihove apsorbancije, otpipetiran je 1,0 mL pojedine standardne otopine, dodano je 2 mL destilirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 i 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 (nakon 5 min). Nakon sljedećih 6 min dodano je 2 mL otopine NaOH , množinske koncentracije 1 mol L^{-1} , pri čemu dolazi do stvaranja ružičasto obojanih, stabilnih aluminij - flavonoidnih kompleksa. Njihova apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 510 nm.

Za mjerenje apsorbancije uzoraka otopine su pripravljene na isti način kao i standardi, ali umjesto 1,0 mL standarda otpipetirano je 0,2 mL otopine uzorka u odmjernim tikvicama

od 25 mL, koje su nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 i 0,2 mL).

3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lišća ružmarina DPPH metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti acetonskih i etanolnih ekstrakata ružmarina primjenjena je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ili DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) metoda. Temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira aktivnost DPPH radikala, a popraćena je gubitkom boje otopine, tj. sniženjem apsorbancije, koja se prati promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm u odnosu na kontrolni uzorak. Antioksidansi u uzorku reduciraju DPPH radikal prema reakcijama [7] i [8]:



3.4.6.1. Priprema otopina za određivanje antioksidacijske aktivnosti

- Otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$)
Odvagano je 3,9 mg DPPH i otopljeno u 100 mL 96 %-tnog etanola.

3.4.6.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

Provođenju DPPH metode prethodila je izrada baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama korištena je otopina galne kiseline, $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$. Iz ishodne otopine galne kiseline pripremljen je niz pojedinačnih standardnih otopina poznatih množinskih koncentracija od 0,005; 0,08; 0,16; 0,28; 0,36; 0,4 i 0,48 mmol L^{-1} . Zatim je otpipetirano po 2,0 mL svake pojedine standardne otopine poznate koncentracije u epruvetu, dodana su po 2,0 mL destilirane vode i 1,0 mL DPPH. Kontrolni uzorak je pripremljen s 4,0 mL destilirane vode i 1,0 mL DPPH, a slijepa proba s 5,0 mL destilirane vode.

Za analizu uzoraka otopine su pripremljene na isti način kao i za mjerenje apsorbancije standardnih otopina, ali umjesto 2,0 mL standarda otpipetirano je 2,0 mL uzorka. Za slijepu probu upotrijebljena je destilirana voda. Pripremljene otopine čuvane su na tamnom mjestu, 30 minuta, pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od

517 nm. Iz dobivenih vrijednosti izračunat je postotak antioksidacijske aktivnosti (AA) pojedinog uzorka prema formuli [9]:

$$AA \% = 1 - \frac{A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{kontrolni uzorak}}} \cdot 100 \quad [9]$$

3.4.7. Priprema otopina za antikorozijska testiranja

- **Test otopina 1:** 100 mL otopine natrijeva acetata (3 %, w/v) pomiješano je s 100 mL otopine octene kiseline (3 %, v/v). pH-vrijednost ovako pripremljene otopine, izmjerena pH-metrom je 4.

Otopina natrijeva acetata (NaAc) je pripremljena vaganjem 3 g NaAc i otapanjem u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

Otopina octene kiseline (HAc) pripremljena je pipetiranjem 3 mL koncentrirane HAc i razrjeđivanjem s destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.

- **Test otopina 2:** 100 mL otopine natrijeva acetata (3 %, w/v) pomiješano je s 100 mL otopine natrijeva klorida (3 %, w/v). pH-vrijednost ovako priređene test otopine 2 izmjerena pH-metrom je 3.

Otopina natrijeva acetata (NaAc) je pripremljena vaganjem 3 g NaAc i otapanjem u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

Otopina natrijeva klorida (NaCl) je pripremljena vaganjem 3 g NaCl i otapanjem u destiliranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

3.4.8. Antikorozijski test

Antikorozijska aktivnost ekstrakta ružmarina (70 %-tni etanolni ekstrakt) ispitana je na uzorcima čistih kositrenih pločica (99,95 %), uronjenih 24 h u dvije test otopine: a) NaAc/HAc (Otopina 1) i b) NaAc/NaCl (Otopina 2).

Prije postupka testiranja pločice kositra su mehanički obrađene brusnim papirom finoće 400, 600 i 800. Zatim su pločice isprane destiliranom vodom, ispolirane na naboranom filter papiru, te isprane 96 %-tnim etanolom. Nakon sušenja, ovako pripremljenim pločicama kositra određena je masa i površina.

Potom su pločice uronjene u 50 mL pripremljenih test otopina (1 i 2) uz dodatak 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 i 11,0 % (v/v) etanolnog ekstrakta ružmarina (70 %). Kao slijepa proba, korištena je pločica kositra uronjena u test otopinu 1, odnosno 2.

Nakon 24 h pločice se izvade iz otopina, ispoliraju na filter papiru, osuše i važu. Na temelju podataka vezanih uz promjenu mase i površinu pločica, te vrijeme izlaganja korozivnoj otopini izračuna se brzina korozije [10] i efikasnost inhibicije (IE) ekstrakta ružmarina [11]:

$$v = \frac{\Delta m}{P \cdot \Delta t} \quad [10]$$

gdje je:

v - brzina korozije ($\text{mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)

P - slobodna površina uzorka (cm^2)

Δt - vrijeme izlaganja uzoraka djelovanju ispitivanih otopina (h)

$$\text{IE \%} = v_{\text{slijepa proba}} - \frac{v_{\text{ekstrakt}}}{v_{\text{slijepa proba}}} \cdot 100 \quad [11]$$

3.5. Statistička analiza

Statistička analiza je napravljena pomoću programskog paketa Statistika 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Određena je aritmetička sredina, standardna devijacija i značajnost utjecaja vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijsku aktivnost t -testom nezavisnih uzoraka, a statistička značajnost je prikazana p vrijednostima ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje boje ekstrakata lišća ružmarina

Svojstvo obojenosti biljaka i biljnih ekstrakata u velikoj mjeri može utjecati na prihvatljivost hrane od strane potrošača i njene tržišne vrijednosti. Ružmarin se kao začinska biljka može dodavati različitim vrstama prehrambenih proizvoda, u svježem ili sušenom obliku, ali i u obliku ekstrakata. Budući da dodatak ekstrakta ružmarina u konzervirani ili ne konzervirani proizvod može utjecati na miris, okus, ali i boju namirnice, u ovom radu su određeni L , a i b parametri boje 30 i 70 %-tnih etanolnih i acetonskih ekstrakata ružmarina.

Tablice 3 i 4 prikazuju dobivene vrijednosti svjetline (L), te udjela crveno-zelene (a) i žuto-plave (b) boje u uzorcima ružmarina ekstrahiranih visokim tlakom i refluksiranjem. Vrijednosti Δa , Δb , ΔL i ΔE su izračunate prema opisu danom u poglavlju 3.4.3.

Tablica 3. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom visokim tlakom.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Parametri boje*						
		<i>L</i> ± SD	<i>a</i> ± SD	<i>b</i> ± SD	ΔL ± SD	Δa ± SD	Δb ± SD	ΔE ± SD
ETANOL ($\varphi = 30\%$)								
1-LI	3	38,8±1,8	31,6±0,6	62,3±1,8	-42,0±1,8	23,2±0,6	4,4±1,8	49,1±1,6
2-LI	6	43,5±0,5	29,2±0,5	66,0±0,4	-37,0±0,5	22,6±0,5	-8,1±0,4	44,0±0,8
3-LI	9	46,8±3,7	28,5±1,5	67,5±0,8	-34,0±3,7	4,3±1,5	9,6±0,8	41,6±3,6
ETANOL ($\varphi = 70\%$)								
4-LI	3	88,7±0,0	-7,7±0,0	50,8±0,1	7,9±0,0	-14,9±0,0	-7,1±0,1	18,1±0,1
5-LI	6	89,3±0,7	-8,4±0,1	49,0±2,5	8,3±0,7	-15,0±0,1	-8,9±2,5	19,5±1,3
6-LI	9	85,7±0,1	-8,1±0,0	58,2±0,4	4,9±0,1	5,1±0,0	0,3±0,4	15,6±0,0
ACETON ($\varphi = 30\%$)								
7-LI	3	56,1±1,2	32,1±0,6	84,9±0,6	-24,7±1,2	26,2±0,6	27,0±0,6	44,5±0,6
8-LI	6	54,3±0,8	33,5±0,6	84,5±0,2	-26,5±0,8	25,0±0,6	26,6±0,2	46,1±0,7
9-LI	9	66,9±7,4	22±7,3	79,6±5,6	-13,9±7,4	2,8±7,3	21,7±5,6	30,3±11,1
ACETON ($\varphi = 70\%$)								
10-LI	3	83,4±1,3	-9,0±1,4	70,7±2,2	2,6±1,3	-16,6±1,4	12,8±2,2	20,7±0,2
11-LI	6	83,6±0,3	-9,2±0,3	70,0±0,5	2,8±0,3	-16,3±0,3	12,1±0,5	20,2±0,0
12-LI	9	82,9±0,1	-9,5±0,3	71,7±1,2	2,1±0,1	-8,2±0,3	13,8±1,2	21,3±1,0

**N* = 2

Tablica 4. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima ružmarina dobivenim refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Parametri boje*						
		<i>L</i> ± SD	<i>a</i> ± SD	<i>b</i> ± SD	ΔL ± SD	Δa ± SD	Δb ± SD	ΔE ± SD
		ETANOL ($\varphi = 30\%$)						
R-12	90	84,2±0,0	5,0±0,0	50,9±0,0	3,4±0,0	1,3±0,0	-7,0±0,0	8,0±0,0
R-10	180	74,1±0,0	11,0±0,0	60,8±0,0	-6,7±0,0	1,8±0,0	-2,9±0,0	8,5±0,0
		ETANOL ($\varphi = 70\%$)						
R-8	90	80,7±0,0	6±0,0	60,8±0,0	-0,1±0,0	-3,9±0,0	2,9±0,0	3,0±0,0
R-6	180	87,2±0,0	-0,5±0,0	50,0±0,0	6,4±0,0	-3,6±0,0	-7,9±0,0	12,4±0,0
		ACETON ($\varphi = 30\%$)						
R-19	90	79±0,0	8,9±0,0	67,8±0,0	-1,8±0,0	2,2±0,0	9,9±0,0	10,3±0,0
R-17	180	83±0,0	2,8±0,0	58,3±0,0	2,2±0,0	-3,9±0,0	0,4±0,0	4,5±0,0
		ACETON ($\varphi = 70\%$)						
R-15	90	84,8±0,0	-0,5±0,0	57,1±0,0	4,0±0,0	-7,1±0,0	-0,8±0,0	8,2±0,0
R-13	180	82,5±0,0	0,9±0,0	61,6±0,0	1,7±0,0	-5,8±0,0	3,7±0,0	7,1±0,0
		DESTILIRANA VODA						
R-1	90	87,2±0,0	0,7±0,0	43,5±0,0	6,4±0,0	-6,0±0,0	-14,3±0,0	-16,7±0,0
R-2	180	80,8±0,0	6,7±0,0	57,9±0,0	/	/	/	/

* $N = 2$

Prema podacima dobivenim kod uzoraka ekstrahiranih visokim tlakom može se zaključiti da otapalo, odnosno njihovi volumni udjeli utječu na intenzitet obojenja ekstrakata. Naime, vrijednosti svjetline ($L = 38,8 - 46,8$) kod 30 %-tnih etanolnih ekstrakata ružmarina su dvostruko niže u odnosu na 70 %-tne ekstrakte ($L = 85,7 - 89,1$). Niže vrijednosti su dobivene i upotrebom 30 %-tnog acetona ($L = 56,1 - 66,9$) u odnosu na one nađene kod 70 %-tnog acetona ($L = 82,9 - 83,4$).

Ako L vrijednosti 70 %-tnih etanolnih i acetonskih ekstrakata nađenih kod metode refluksiranja usporedimo s L vrijednostima 70 %-tnih ekstrakata dobivenih kod ekstrakcije potpomognute visokim tlakom možemo primjetiti da su one vrlo slične. Kreću se u intervalu od 80,7 - 87,2 za etanol i 82,5 - 84,8 za aceton, ovisno o vremenu ekstrakcije (90 i 180 min). Nešto niže vrijednosti su dobivene za 30 %-tne ekstrakte, od 74,1 - 84,2 (etanol) i 79,0 - 83,0 (aceton), pa se može zaključiti da otapalo, odnosno njegov volumni udio nema značajnu ulogu na L parametar boje ekstrakata lišća ružmarina kod metode refluksiranja.

Promatrajući utjecaj vremena kod ekstrakcije potpomognute visokim tlakom i refluksiranjem može se primjetiti da povećanje vremena od 3, 6 i 9 min na 90, odnosno 180 min značajno utječe na intenzitet boje 30 %-tnih etanolnih i acetonskih ekstrakata ružmarina.

Nadalje, vidi se da postoji negativna korelacija između L i a , odnosno b vrijednosti. Naime može se uočiti da su u ekstraktima s većom L , nađene niže a i b vrijednosti i obrnuto.

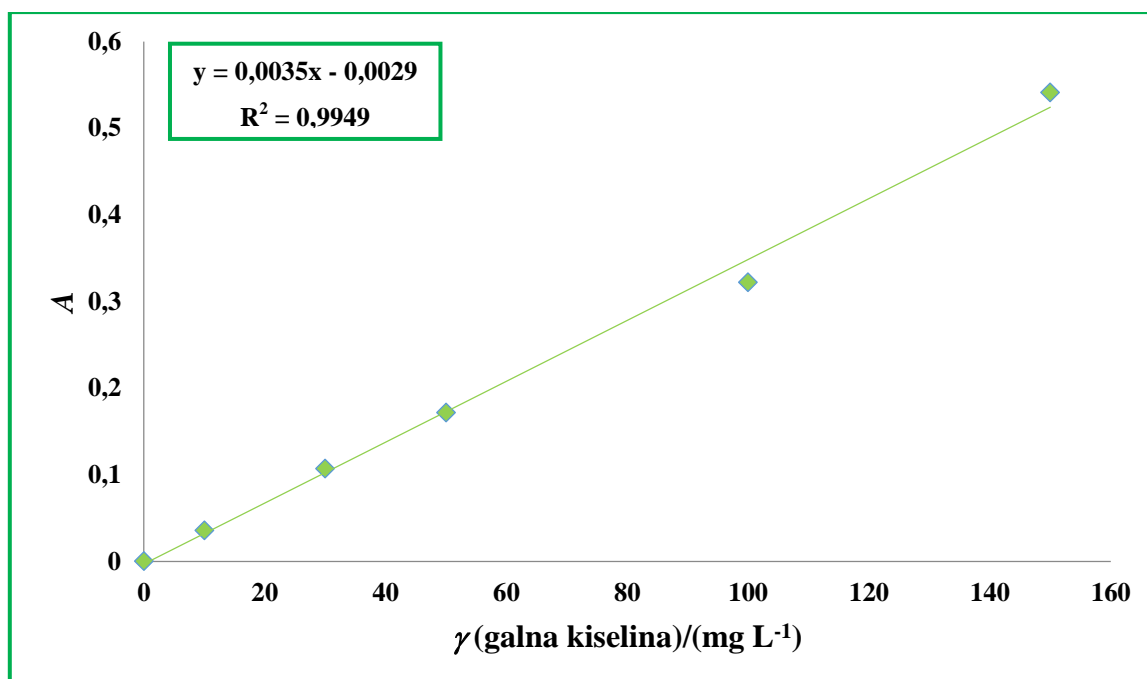
Zaključno odabir otapala, volumni udio otapala u vodenoj fazi, metoda ekstrakcije, odnosno vrijeme utječu na različitu obojenost ekstrakata, odnosno njihove L , a i b vrijednosti. Sukladno tome, parametri ekstrakcije mogu se odabrati ovisno o željenoj boji ekstrakta i njegovoj krajnjoj upotrebi.

4.2. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lišća ružmarina

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima ružmarina dobivenih upotrebom dviju ekstrakcijskih tehnika:

- ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (400 MPa) u vremenu od 3, 6 i 9 min,
- ekstrakcija refluksiranjem u vremenu od 90 i 180 min.

Određivanju ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima ružmarina prethodila je izrada baždarnog dijagrama, koji prikazuje ovisnost masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline o izmjenjenim vrijednostima apsorbanacija (Slika 16). Nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola (UF) u ekstrahiranim uzorcima ružmarina određene su iz regresijskog pravca prikazanog na Slici 16, a potom su masene koncentracije pretvorene u masene udjele uzimajući u obzir razrijeđenje i odvagu uzorka (Tablica 5).



Slika 16. Baždarni dijagram galne kiseline

Tablica 5. Masena koncentracija i maseni udio ukupnih fenola (UF) u 30 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom i refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	γ (UF)/(mg L ⁻¹) ± SD*	w (UF)/(mg g ⁻¹) ± SD*
EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA VISOKIM TLAKOM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
1-LI	3	57,29±3,32	477,44±27,68
2-LI	6	55,61±1,00	463,45±8,33
3-LI	9	68,22±0,18	568,51±1,49
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
4-LI	3	78,51±1,61	654,23±13,39
5-LI	6	69,22±4,04	576,85±33,63
6-LI	9	79,26±2,93	660,48±24,40
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
7-LI	3	48,40±0,36	403,33±2,98
8-LI	6	51,47±1,71	428,93±14,29
9-LI	9	50,19±3,71	418,21±30,95
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
10-LI	3	72,54±1,21	604,52±10,12
11-LI	6	78,58±1,75	654,82±14,58
12-LI	9	82,51±1,25	687,56±10,42
EKSTRAKCIJA REFLUKSIRANJEM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
R-12	90	109,04±0,37	908,69±3,09
R-10	180	112,33±0,96	936,07±7,96
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
R-8	90	127,40±2,00	1061,67±16,67
R-6	180	134,97±2,43	1124,76±20,24
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
R-19	90	119,76±1,66	997,98±13,82
R-17	180	119,69±0,35	997,38±2,92
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
R-15	90	97,19±0,93	809,88±7,78
R-13	180	110,61±1,22	921,79±10,15

*N = 4

Rezultati određivanja ukupnih fenola (Slika 17) su pokazali da ekstrakti ružmarina dobiveni ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom sadrže manje količine UF u odnosu na ekstrakte dobivene refluksiranjem. Vrijednosti masenih udjela (Tablica 5) se kreću u rasponu od 403,33 - 687,56 mg g⁻¹ za etanolne i acetonске ekstrakte ružmarina dobivene

visokim tlakom pri vremenu od 3, 6 i 9 min. Za ekstrakte dobivene metodom refluksiranja (90 i 180 min) vrijednosti masenih udjela se kreću u rasponu od 809,88 - 1124,76 mg g⁻¹ (Tablica 5).

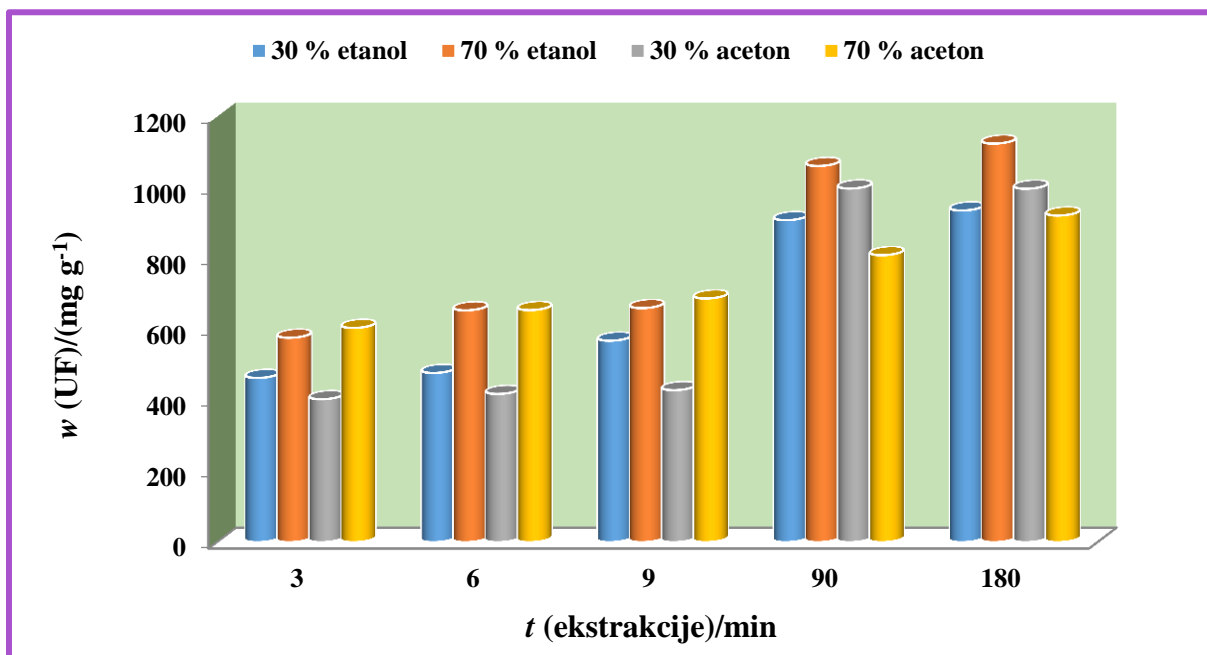
Budući da uzorci ružmarina ekstrahirani visokim tlakom daju niže masene udjele ukupnih fenola u usporedbi s metodom refluksiranja, može se zaključiti da metoda ekstrakcije značajno utječe na efikasnost izolacije ukupnih fenola. U prilog ovoj tezi ide činjenica da povećanjem vremena ekstrakcije od 3, 6 i 9 min na 90, odnosno 180 min dolazi do značajnog ($p < 0,05$) povećanja masenih udjela ukupnih fenola.

Kod ekstrakcije potpomognute visokim tlakom povećanje vremena s 3 na 9 min ne dovodi do značajnog porasta ($p > 0,05$) masenih udjela ukupnih fenola, a dobivene p vrijednosti iznose 0,4616 i 0,1593 (3 min vs 6 i 9 min), te 0,5410 (6 min vs 9 min). Isto vrijedi i za ekstrakciju refluksiranjem, gdje povećanje vremena od 90 na 180 min ne dovodi do značajnijeg povećanja udjela ukupnih fenola ($p = 0,3006$).

Proučavajući utjecaj otapala (Slika 17) i njihovih volumnih udjela ($\varphi = 30$ i 70 %) na prinos ukupnih fenola u ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom može se uočiti da su veći maseni udjeli ukupnih fenola ostvareni upotrebom otapala većih volumnih udjela ($\varphi = 70$ %). Pri tome su neznatno veće, ali statistički ne značajne ($p > 0,05$) vrijednosti dobivene upotrebom 70 % acetona (604,52 - 687,56 mg g⁻¹) u odnosu na 70 %-tni etanol (576,85 - 660,48 mg g⁻¹).

Upotrebom 30 % vodenih otopina etanola i acetona, veći maseni udjeli ukupnih fenola su dobiveni s etanolom (463,45 - 568,51 mg g⁻¹) u odnosu na aceton (403,33 - 428,93 mg g⁻¹).

Kod metode refluksiranja najboljim ekstrakcijskim sredstvom pokazala se vodena otopina 70 %-tnog etanola, dok druga upotrebljena otapala ne sljede trend karakterističan za ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom (30 % aceton < 30 % etanol < 70 % etanol < 70 % aceton), pa se ponovo može zaključiti kako metoda ekstrakcije, odnosno vremena karakteristična za svaku pojedinu imaju značajan učinak na prinos ukupnih fenola.



Slika 17. Maseni udio ukupnih fenola (UF) u ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min).

U odnosu na ovo istraživanje, Huang i sur. (2013) su pokazali da ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom u vremenu od 1 min omogućava vrlo učinkovitu izolaciju polifenola (77 %) iz svježeg zelenog čaja, u usporedbi s drugim ekstrakcijskim tehnikama koje traju 45 (refluksiranje, 85 °C), odnosno 90 (ultrazvučna ekstrakcija, 20 - 40 °C) min.

Osim ekstrakcije potpomognute visokim tlakom i refluksiranjem korištenim u ovom radu, i druge ekstrakcijske tehnike su se pokazale učinkovitima pri izolaciji polifenola iz ružmarina. Tako Rodríguez-Rojo i sur. (2011) dobivaju vrijednosti ukupnih fenola od 92 - 550 ppm, ovisno o metodi ekstrakcije (ekstrakcija otapalima, mikrovalovima i ultrazvukom) i upotrijebljenom otapalu (etanol, voda).

Iako se ekstrakcija refluksiranjem pokazala učinkovitijom metodom izolacije UF u odnosu na ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom, ipak treba naglasiti neke od prednosti HHP metode primjenjene u ovom radu. U prvom redu treba istaknuti zadovoljavajući prinos ukupnih fenola u vrlo kratkom vremenu (3, 6 i 9 min), u odnosu na vrijeme ekstrakcije od 90, odnosno 180 min primjenjeno kod ekstrakcije refluksiranjem. S obzirom da je cilj ovog rada bio upotrijebiti metodu koja će u kratkom vremenu ekstrakcije dati zadovoljavajuću kvalitetu ekstrakata, produljenje vremena ekstrakcije ne bi bila preporučljiva promjena, no primjena višeg tlaka (> 400 MPa), kao i temperature (> 20 °C) mogle bi se uzeti u obzir. Naime, možemo prepostaviti da tlak od 400 MPa primjenjen pri tretiranju uzoraka lišća ružmarina, te

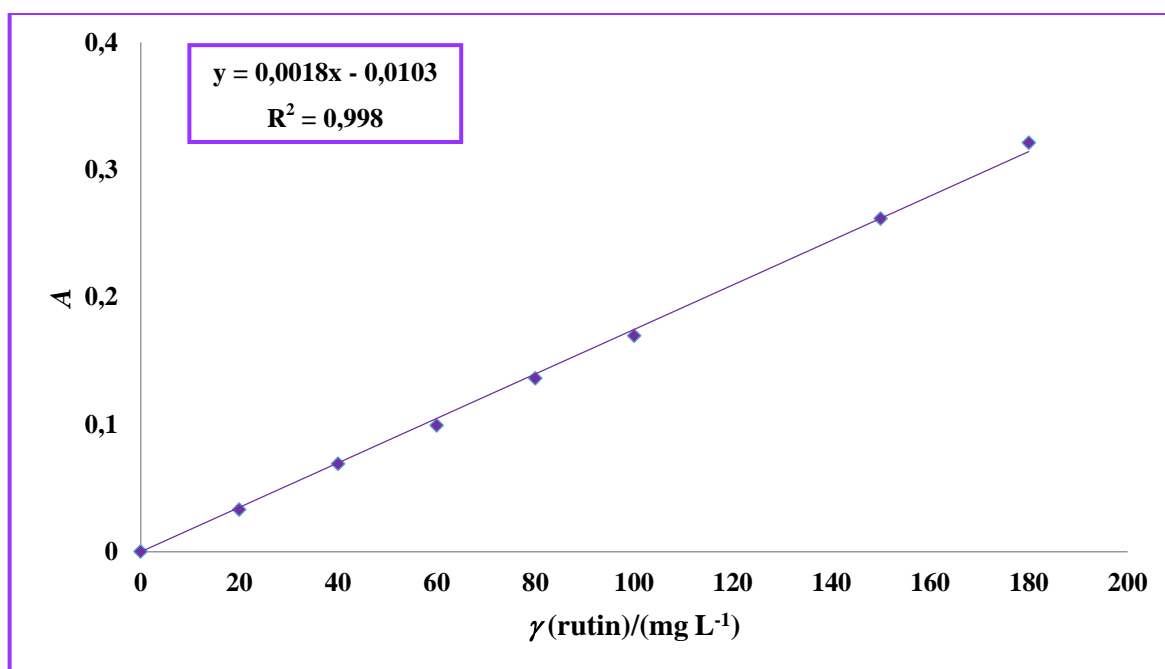
temperatura koja je u uređaju postizala vrijednost od 35 °C nisu bili dovoljni za ostvarivanje efikasnosti jednake kod i kod metode refluksiranja.

Osim tlaka, nešto niži prinosi kod HHP metode mogli bi se objasniti upotrebom otapala, odnosno njihovih volumnih udjela.

Uporište za ove tvrdnje pronađene su u istraživanju Shouqin i sur. (2004) koji smatraju da tlak od 400 MPa, φ (etanol) = 50 % i vrijeme ekstrakcije kraće od 10 min nisu dovoljni za efikasno razaranje membrane kloroplasta u biljci *Epimedium*, pa u dobivenim ekstraktima ni nema klorofila. Sukladno tome i u ovom radu su niži volumni udjeli organskih otapala utjecali na slabiju ekstrakciju ukupnih fenola.

4.3. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ružmarina

U poglavlju 3.4.5. opisana je izrada baždarnog dijagrama koja je prethodila određivanju ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ružmarina. Na Slici 18 prikazan je baždarni dijagram dobiven nakon mjerenja apsorbancija poznatih masenih koncentracija standardnih otopina rutina. Iz regresijskog pravca (Slika 18) izračunate su nepoznate masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom i refluksiranjem. Potom su masene koncentracije pretvorene u masene udjele uzimajući u obzir razrijeđenje i odvagu uzorka (Tablica 6).



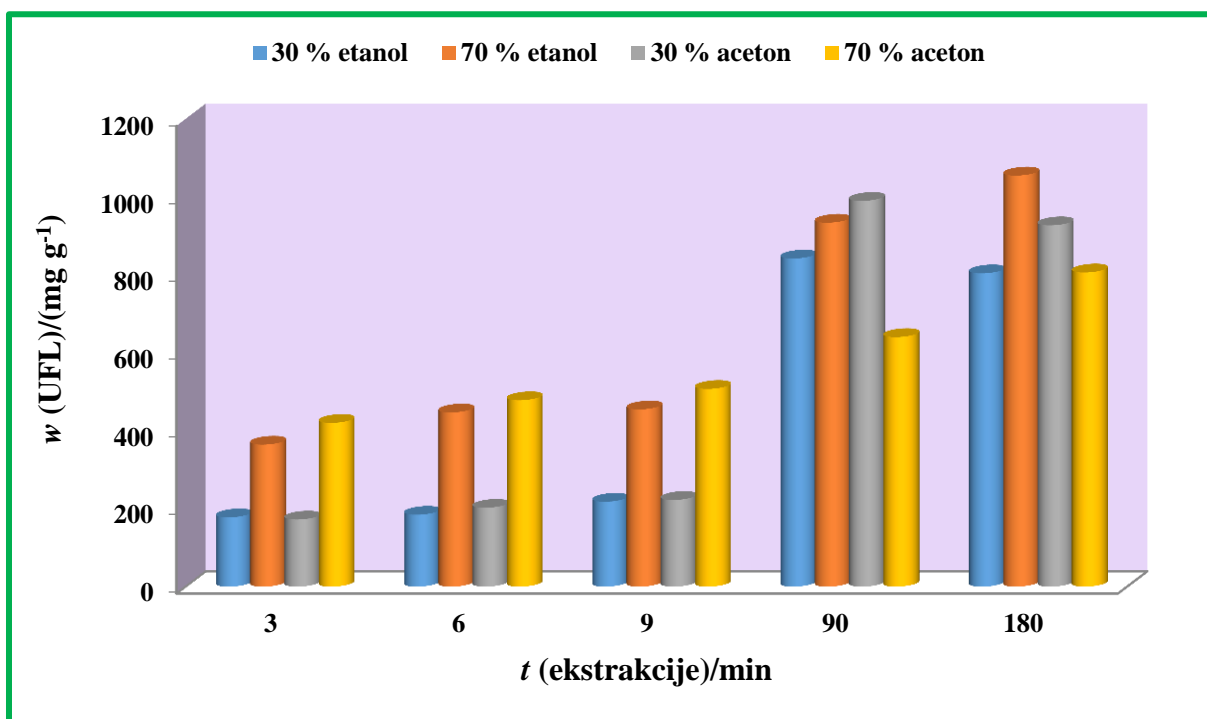
Slika 18. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 6. Masena koncentracija i maseni udio ukupnih flavonoida (UFL) u 30 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom visokim tlakom i refluksiranjem.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	γ (UFL)/(mg L ⁻¹) ± SD*	w (UFL)/(mg g ⁻¹) ± SD*
EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA VISOKIM TLAKOM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
1-LI	3	22,11±0,83	178,12±6,71
2-LI	6	22,94±1,39	184,83±11,19
3-LI	9	27,11±0,00	218,40±0,00
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
4-LI	3	55,58±0,14	447,75±1,12
5-LI	6	45,31±4,58	364,96±36,92
6-LI	9	56,56±1,11	455,59±8,95
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
7-LI	3	21,42±0,69	172,52±5,59
8-LI	6	25,17±0,83	202,73±6,71
9-LI	9	27,67±1,67	222,87±13,43
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
10-LI	3	52,25±3,47	420,90±27,97
11-LI	6	59,47±0,14	479,08±1,12
12-LI	9	63,08±0,69	508,17±5,59
EKSTRAKCIJA REFLUKSIRANJEM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
R-12	90	104,61±0,00	842,70±0,00
R-10	180	99,89±0,83	804,66±6,71
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
R-8	90	116,00±0,83	934,44±6,71
R-6	180	131,00±0,28	1055,28±2,24
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
R-19	90	122,94±0,56	990,39±4,48
R-17	180	115,17±0,56	927,73±4,48
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
R-15	90	79,61±0,00	641,31±0,00
R-13	180	100,17±1,11	806,90±8,95

*N = 4

Vrijednosti masenih udjela ukupnih flavonoida (UFL) za ekstrakte ružmarina dobivene ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom u vremenu od 3, 6 i 9 min i refluksiranjem u vremenu od 90 i 180 min prikazane su na Slici 19.



Slika 19. Maseni udio ukupnih flavonoida (UFL) u ekstraktima ružmarina dobivenim ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min).

Usporedbom metoda ekstrakcije uočava se da su veće vrijednosti masenih udjela UFL nađene u ekstraktima dobivenima refluksiranjem ($641,31 - 1055,28 \text{ mg g}^{-1}$) u odnosu na one dobivene visokim tlakom ($172,52 - 508,17 \text{ mg g}^{-1}$).

Na temelju navedenog može se zaključiti da metoda ekstrakcije značajno ($p < 0,05$) utječe i na izolaciju ukupnih flavonoida iz lišća ružmarina, što je u skladu sa rezultatima određivanja ukupnih fenola opisanim u poglavlju 4.2.

Dakle, opet se može zaključiti da povećanjem vremena ekstrakcije karakterističnog za HHP metodu s 3, 6 i 9 min na 90, odnosno 180 min (refluksiranje) značajno utječe ($p < 0,05$) na izolaciju ukupnih flavonoida.

Proučavajući utjecaj vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 min) na efikasnost izolacije ukupnih flavonoida kod pojedine primjenjene metode, može se uočiti da povećanje vremena ne utječe značajno ($p > 0,05$) na povećanje njihovih masenih udjela. Kod ekstrakcije potpomognute visokim tlakom dobivene p vrijednosti iznose 0,5159 i 0,3245 (3 min vs 6 i 9 min) i 0,7563 (6 min vs 9 min).

Isto vrijedi i za ekstrakciju refluksiranjem, gdje povećanje vremena s 90 na 180 min ne dovodi do statistički značajnog porasta ($p = 0,4770$) masenih udjela UFL.

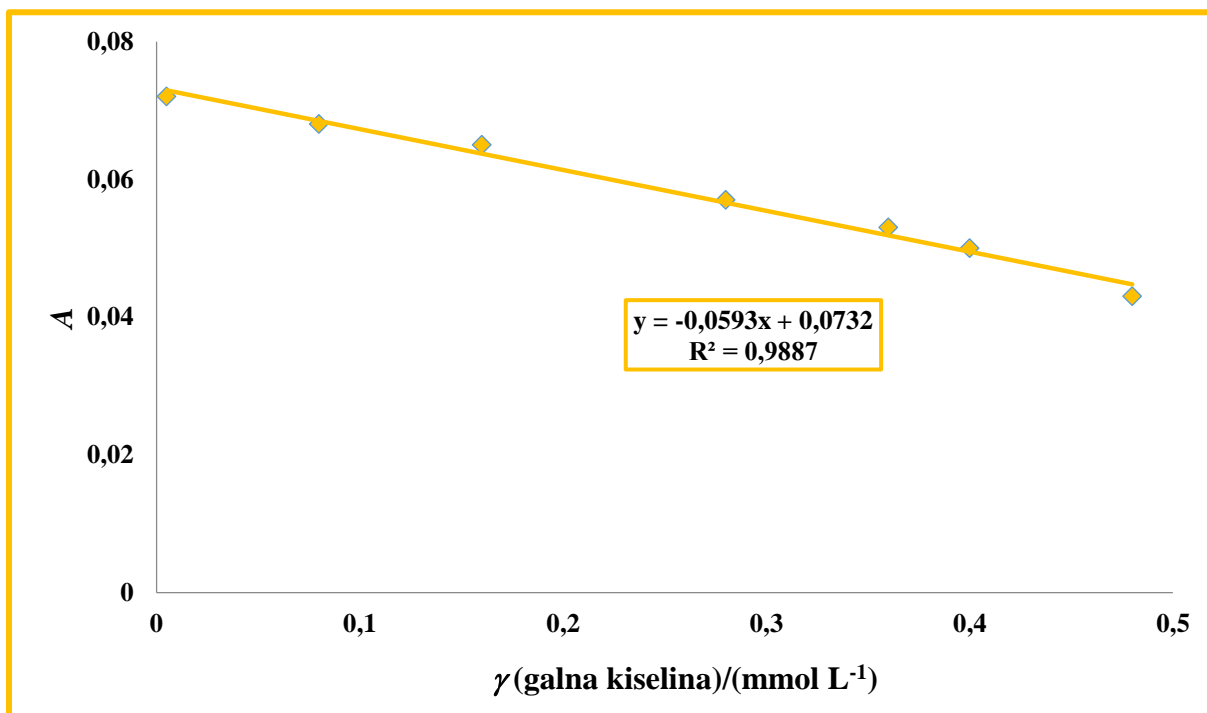
S obzirom na odabir otapala, odnosno njihove volumne udjele (30 i 70 %) najveće vrijednosti UFL nađene su kod uzoraka ružmarina ekstrahiranih s 70 %-tnim etanolom i acetonom, ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom. Dobiveni maseni udjeli se kreću u rasponu od 364,96 - 455,59 mg g⁻¹ i 420,90 - 508,17 mg g⁻¹ za etanol, odnosno aceton (Tablica 6). Niže vrijednosti ukupnih flavonoida zabilježene su kod 30 %-tnih ekstrakata, od 178,12 - 218,4 mg g⁻¹ za etanol i 172,52 - 222,87 mg g⁻¹ za aceton (Tablica 6). Dobiveni raspon vrijednosti je vrlo sličan za oba upotrijebljena otapala, što nije bio slučaj kod određivanja ukupnih fenola gdje je bolja efikasnost ekstrakcije ostvarena s 30 % etanolom. S obzirom na strukturu flavonoida (poglavlje 2.2.2.) možemo i očekivati da je aceton kao nepolarnije organsko otapalo primjerenije za ekstrakciju ukupnih flavonoida.

Iako se 70 %-tni aceton pokazao najboljim otapalom kod ekstrakcije flavonoida visokim tlakom, kod ekstrakcije refluksiranjem ne bi ga mogli smatrati efikasnim jer njegova upotreba u kombinaciji s 90, odnosno 180 min ekstrakcije dovodi do degradacije flavonoida. Dakle, zadovoljavajući udjeli dobivaju se 30 %-tnim aceton i 70 %-tnim etanolom pa se ova otapala mogu preporučiti kod ekstrakcije metodom refluksiranja.

4.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lišća ružmarina

Među mnogobrojnim metodama određivanja antioksidacijske aktivnosti polifenola u ovom radu je korištena brza i jednostavna 2,2 -difetil-1-pikrilhidrazil ili DPPH metoda. Mjerenju apsorbancija uzoraka prethodila je izrada baždarnog dijagrama ovisnosti množinskih koncentracija standardne otopine galne kiseline o izmjerenim vrijednostima apsorbancija (Slika 20). Iz regresijskog pravca određene su nepoznate masene koncentracije uzoraka, izražene kao ekvivalent galne kiseline, a pri tome je uzet u obzir volumen polaznog uzorka i njegovo razrijeđenje.

Budući da se antioksidacijska aktivnost ekstrakata ružmarina može izračunati (poglavlje 3.4.6.2.) na temelju vrijednosti apsorbancije kontrolnog uzorka ($A = 0,151$) i apsorbancija ekstrakata ružmarina izmjerenih u intervalu od 0,044 do 0,071 u Tablici 7 prikazane su i vrijednosti masene koncentracije i % antioksidacijske aktivnosti.



Slika 20. Baždarni dijagram galne kiseline za određivanje AA.

Prema rezultatima prikazanim na Slici 21 može se uočiti da nema značajnih razlika ($p > 0,05$) u antioksidativnom djelovanju ekstrakata ružmarina dobivenih pomoću visokog tlaka i refluksiranja. Dobivene AA vrijednosti nađene su u vrlo uskom rasponu, od 53,97 do 69,87 % za ekstrakciju provedenu visokim tlakom i 56,95 do 66,23 % za ekstrakciju refluksiranjem.

Ako promatramo utjecaj otapala na antioksidacijsku aktivnost uzoraka ružmarina dobivenih ekstrakcijom visokim tlakom vidimo da je AA manja kod otapala nižih volumnih udjela (30 %-tni etanol ili aceton). Najbolju antioksidativnu aktivnost pokazuju uzorci kod kojih je korišten 70 % etanol (62,75 - 69,87 %) i aceton (64,73 - 66,69 %).

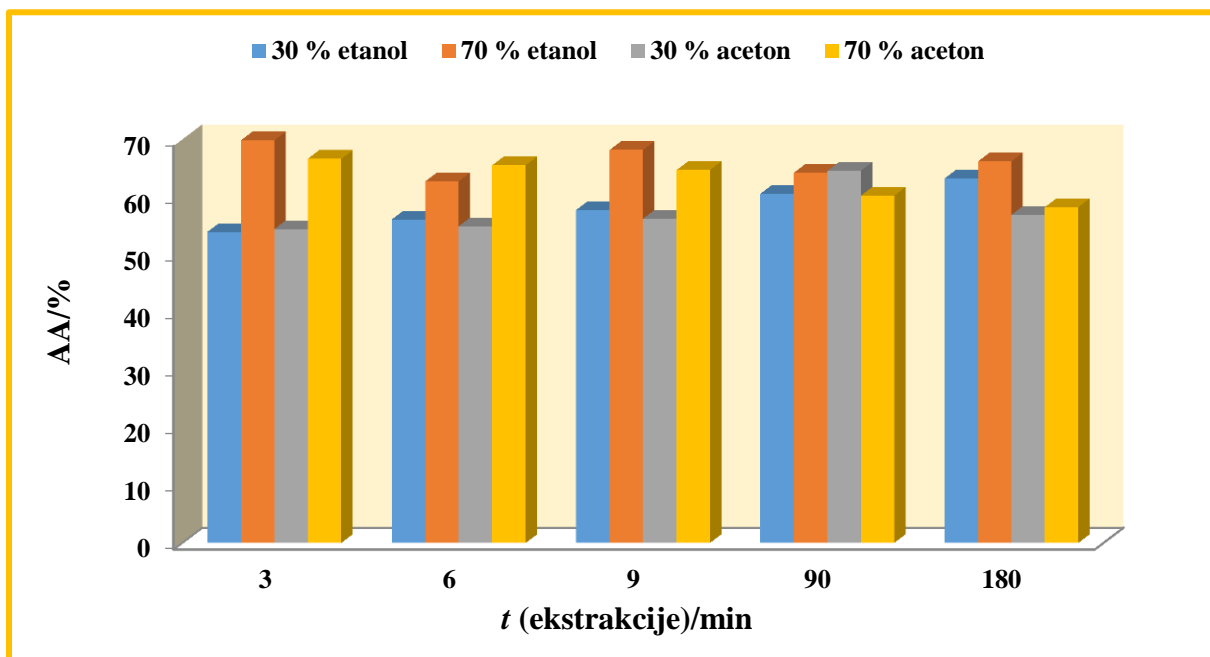
Kod uzoraka dobivenih refluksiranjem 70 %-tni etanol se ponovo pokazao najboljim ekstrakcijskim sredstvom.

Ako promatramo utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost, vidi se da ovaj parametar ne utječe značajno ($p > 0,05$) na AA. No, kod ekstrakcije refluksiranjem pri dužem vremenu dolazi do neznatnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 7. Masena koncentracija i antioksidacijska aktivnost (AA) 30 i 70 %-tnih etanolnih i acetonskih ekstrakata ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom i refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/min	γ (ekstrakt)/(mg L ⁻¹) ± SD*	AA (ekstrak)/% ± SD*
EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA VISOKIM TLAKOM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
1-LI	3	13,0±3,51	53,97±0,66
2-LI	6	24,42±2,63	56,13±0,50
3-LI	9	16,60±1,32	57,78±0,50
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
4-LI	3	48,66±2,63	69,87±0,99
5-LI	6	59,55±7,90	62,75±1,49
6-LI	9	44,27±1,76	68,21±0,66
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
7-LI	3	15,63±7,90	54,47±1,49
8-LI	6	18,27±1,76	54,97±0,33
9-LI	9	25,30±10,54	56,29±1,99
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
10-LI	3	40,75±9,66	66,89±3,64
11-LI	6	37,24±7,03	65,56±2,65
12-LI	9	35,04±1,32	64,74±0,50
EKSTRAKCIJA REFLUKSIRANJEM			
ETANOL ($\varphi = 30\%$)			
R-12	90	48,13±1,76	60,60±0,33
R-10	180	62,18±1,76	63,25±0,33
ETANOL ($\varphi = 70\%$)			
R-8	90	67,45±0,00	64,24±0,00
R-6	180	77,99±0,00	66,23±0,00
ACETON ($\varphi = 30\%$)			
R-19	90	69,21±1,76	64,53±0,33
R-17	180	28,81±0,00	56,95±0,00
ACETON ($\varphi = 70\%$)			
R-15	90	46,37±0,00	60,26±0,00
R-13	180	35,83±0,00	58,28±0,00

*N = 4



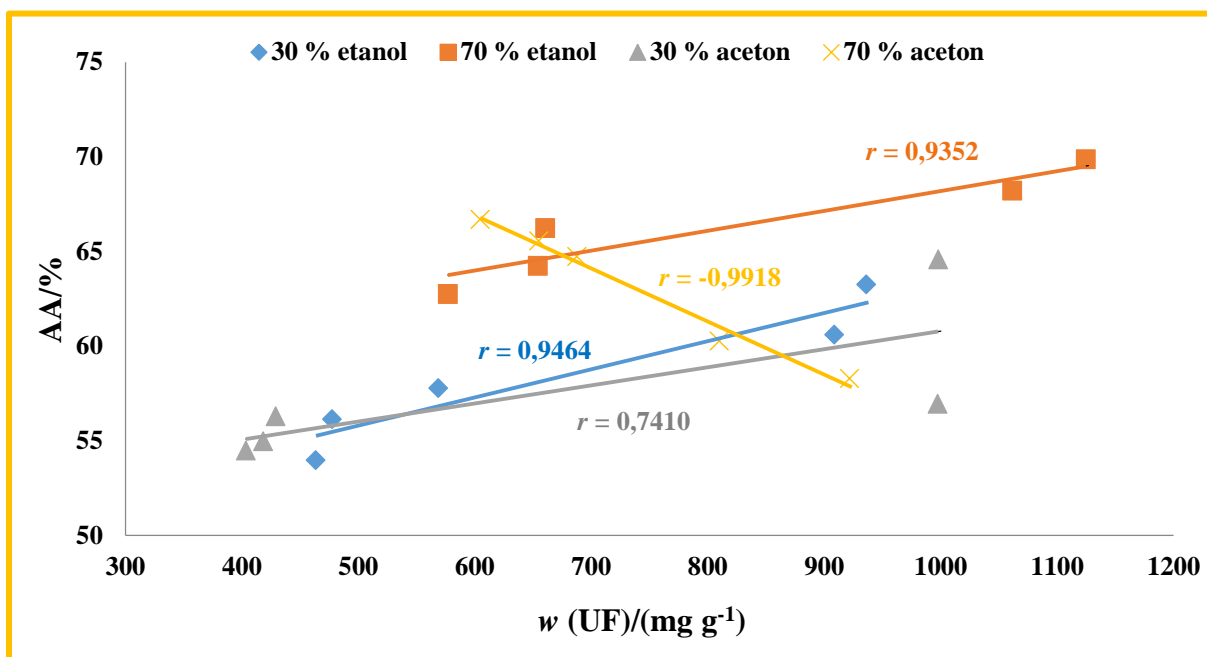
Slika 21. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min).

Ako uspoređujemo rezultate antioksidacijske aktivnosti sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida primjetit ćemo da su vrijednosti za ukupne fenole i flavonoide bile značajno niže za ekstrakte dobivene visokim tlakom u odnosu na one dobivene refluksiranjem. Nasuprot tome, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti relativno su bliske za ekstrakte dobivene i visokim tlakom i refluksiranjem.

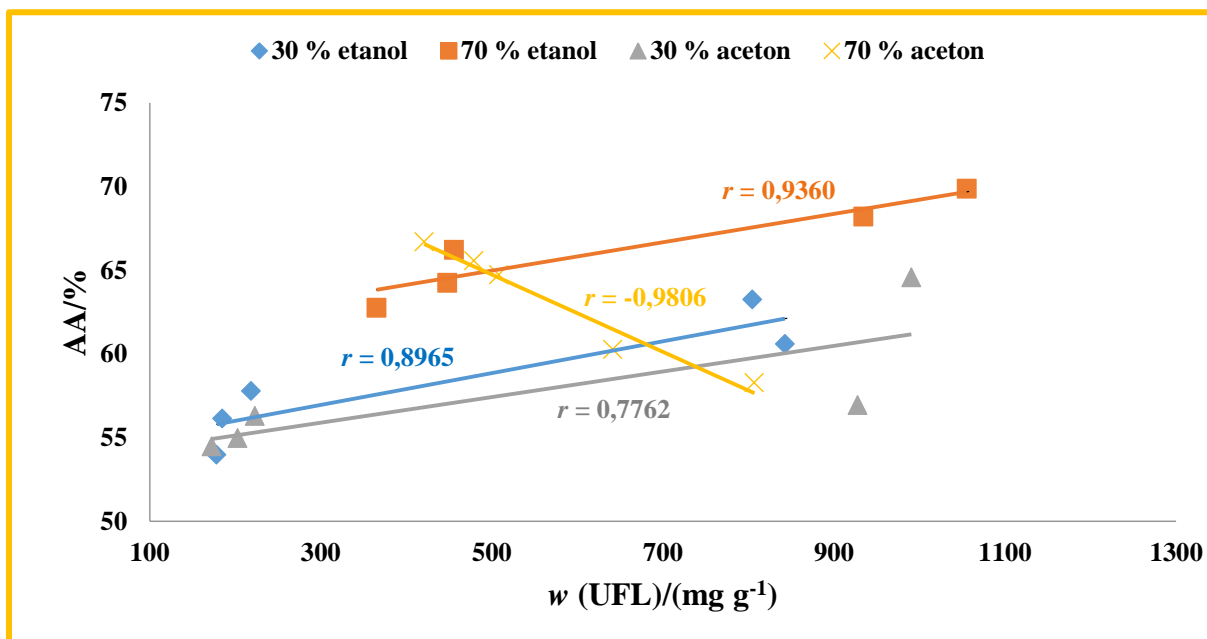
Važno je naglasiti da neki fenolni spojevi pokazuju jače antioksidativno djelovanje od drugih, pa možemo pretpostaviti da iako je kod uzoraka dobivenih refluksiranjem udio fenolnih spojeva veći, visoki tlak ipak osigurava ekstrakciju spojeva veće antioksidacijske aktivnosti. No, da bismo zaista bili sigurni u navedenu pretpostavku valjalo bi provesti dodatne analize te identificirati pojedinačne fenolne spojeve prisutne u ekstraktima ružmarina dobivenih i ekstrakcijom visokim tlakom i refluksiranjem.

Na Slikama 22 i 23 prikazane su usporedbe rezultata određivanja masenih udjela ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) s antioksidacijskom aktivnosti (AA) u uzorcima ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom i refluksiranjem. Uspoređujući podatke vezane uz upotrijebljena otapala i njihove volumne udjele, kao i vremena trajanja ekstrakcije vidljivo je da maseni udio ukupnih fenola (Slika 17), odnosno ukupnih flavonoida (Slika 19) i antioksidacijske aktivnosti (Slika 21) ekstrakata pokazuju

zadovoljavajuće slaganje. To potvrđuju i podaci koeficijenta korelacije, a iznose 0,9464 (30 % etanol), 0,9352 (70 % etanol), 0,7410 (30 % aceton) i -0,9918 (70 % aceton) za UF/AA i 0,8965 30 % (etanol), 0,9360 (70 % etanol), 0,7762 (30 % aceton) i -0,9806 (70 % aceton) za UFL/AA.



Slika 22. Korelacija masenih udjela ukupnih fenola (UF) i antioksidacijske aktivnosti (AA) u ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min) s 30 i 70 %-tnim otopinama etanola i acetona.



Slika 23. Korelacija masenih udjela ukupnih fenola (UFL) i antioksidacijske aktivnosti (AA) u ekstraktima ružmarina dobivenih ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (3, 6 i 9 min) i refluksiranjem (90 i 180 min) s 30 i 70 %-tnim otopinama etanola i acetona.

4.5. Antikorozijsko djelovanje ekstrakata lišća ružmarina

Među mnogobrojnim metodama određivanja antikorozijske aktivnosti biljnih ekstrakata, u ovom radu je primjenjena gravimetrijska metoda. Zbog svoje jednostavnosti obično se koristi kao metoda preliminarnog testiranja antikorozijske aktivnosti. Temelji se na gravimetrijskom određivanju mase pločica prije i nakon uranjanja u korozivno sredstvo (otopinu) te određivanja brzine korozije na temelju dobivenih odvaga pločica, a potom i efikasnosti inhibicije (IE).

Budući da su 70 %-tni etanolni ekstrakti ružmarina dobiveni ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom (9 min) dali zadovoljavajuće masene udjele ukupnih fenola (660,48 mg g⁻¹) i flavonoida (455,59 mg g⁻¹) kao i antioksidacijske aktivnosti, ovaj biljni ekstrakt je upotrebljen i u antikorozijskim testiranjima na pločicama čistog kositra (99,95 %), metala u sastavu bijelog lima. Iako su u 70 %-tnim acetonskim ekstraktima nađeni nešto viši maseni udjeli ukupnih fenola (687,56 mg g⁻¹) i flavonoida (503,17 mg g⁻¹), u ovom radu je upotrebljen etanolni ekstrakt s obzirom na širu primjenu etanola u prehrambenoj industriji.

Premda su metodom refluksiranja dobiveni veći maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom je odabrana kod pripreve ekstrakata za

korozijska testiranja jer je u kratkom vremenu od 9 min bilo moguće pripremiti znatan broj ekstrakata.

U Tablici 8 prikazani su rezultati promjene mase pločica kositra (Δm), prije i nakon njihova uranjanja u otopinu 3 %-tnog natrijeva acetata i 3 %-tne octene kiseline, bez i s dodatkom 70 %-tnog etanolnog ekstrakta ružmarina, volumnih udjela od 0,5 do 8,0 %.

Tablica 8. Vrijednosti promjene mase (Δm), brzine korozije (v) i efikasnosti inhibicije (IE) dobivene nakon uranjanja kositrenih pločica 24 h u otopinu NaAc/HAc (pH=4) uz dodatak 70 %-tnog ekstrakta ružmarina, volumnih udjela od 0,5 do 8,0 %.

φ (ekstrakta)/%	Δm /mg	P /cm ²	v (korozije)/(mg cm ⁻² h ⁻¹)	IE/%
0,0	3,1	1,04	0,124	-
0,5	2,7	1,08	0,104	16,26
2,0	2,6	1,17	0,093	25,12
3,5	2,3	1,08	0,089	28,34
5,0	1,5	1,08	0,058	53,30
6,5	0,9	1,17	0,032	74,24
8,0	0,9	1,2	0,031	75,04

S obzirom da je kositar postojan prema koroziji, kako bi došlo do njegovog otapanja u namirnicama, a u ekstremnim slučajevima i do pojave korozije, potrebna je vrlo kisela sredina, kao i prisutnost različitih akceleratora korozije.

Iz toga razloga, u ovom radu je upotrijebljena otopina natrijeva acetata (3 %) i octene kiseline (3 %), pH vrijednosti 4. Agresivno, korozivno djelovanje priređene otopine na pločice kositra praćeno je prije i nakon dodatka različitih volumnih udjela 70 %-tnog ekstrakta ružmarina u vremenu od 24 h.

Na temelju dobivenih podataka promjene mase pločica kositra prije i nakon 24 h izlaganja korozivnom mediju izračunata je brzina korozije te efikasnost inhibicije.

Brzina korozije na čistim pločicama kositra, bez ekstrakta ružmarina je iznosila 0,124 mg cm⁻² h⁻¹ (Tablica 8). No, s dodatkom i povećanjem volumnih udjela 70 %-tnog ekstrakta

ružmarina dolazi do smanjenja brzine korozije s 0,124 na 0,031 mg cm⁻² h⁻¹. Time je potvrđeno da ekstrakt ružmarina ima inhibitorno djelovanje, odnosno da djeluje kao antikorozijsko sredstvo. Efikasnost inhibicije raste s povećanjem volumnih udjela etanolnog ekstrakta ružmarina, a maksimalna vrijednost iznosi 75 %. Dodatak većih volumnih udjela ekstrakta ružmarina (> 8,0 %) nije ukazao na značajne promjene u masi, a time niti u brzini korozije, pa daljnja mjerenja s otopinom NaAc/HAc nisu nastavljena.

Kako bi utvrdili da ekstrakt ružmarina zaista posjeduje inhibitorna svojstva pločice kositra su testirane primjenom otopine niže pH vrijednosti (3 %-tni natrijev acetat i 3 %-tni natrijev, pH = 3).

Načini određivanja brzine korozije i efikasnosti inhibicije bili su isti kao i kod prethodno opisane otopine. Dakle, pločicama kositra izloženim agresivnom djelovanju otopine NaAc/NaCl dodani su različiti volumni udjeli etanolnog ekstrakta ružmarina (0,5 - 11 %), te je nakon 24 h izmjerena promjena mase pločica kositra. Vrijednosti dobivene ovim testiranjem prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Vrijednosti promjene mase (Δm), brzine korozije (v) i efikasnosti inhibicije (IE) dobivene nakon uranjanja kositrenih pločica 24 h u otopinu NaAc/NaCl (pH = 3) uz dodatak 70 %-tnog ekstrakta ružmarina, volumnih udjela od 0,5 do 11,0 %.

φ (ekstrakta)/%	Δm /mg	P /cm ²	v (korozije)/(mg cm ⁻² h ⁻¹)	IE/%
0,0	4,1	1,08	0,158	-
0,5	4,3	1,12	0,153	3,16
2,0	3,2	1,17	0,114	27,85
3,5	3,3	1,26	0,109	31,01
5,0	3,0	1,17	0,107	32,28
6,5	2,1	1,04	0,084	46,84
8,0	1,9	0,96	0,082	48,10
9,5	1,8	0,96	0,078	50,57
11,0	0,3	0,84	0,015	90,63

Otopina NaAc/NaCl je djelovala korozivno na pločice kositra bez ekstrakta ružmarina na što upućuje i vrijednost brzine od $0,158 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Ako usporedimo brzine korozije (Tablice 8 i 9) bez dodatka ekstrakta ružmarina u otopini NaAc/HAc ($0,124 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) i NaAc/NaCl ($0,158 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) možemo primjetiti da je kod niže pH vrijednosti brzina korozije veća.

Vidi se da je kod otopine pH vrijednosti 4, stupanj inhibicije od 53,30 % postignut već nakon dodatka volumnog udjela ekstrakta ružmarina od 5 %, dok je pri pH vrijednosti 3, 50,57 %-tni inhibicijski učinak ostvaren tek s 9,5 %-tnim volumnim udjelom.

Stoga je u otopinu pH vrijednosti 3 dodano do 11 % ekstrakta ružmarina, a postignuta efikasnost inhibicije iznosila je čak 90,63 %. Ako promatramo ostale dobivene vrijednosti primjetit ćemo isti trend kao i kod otopine NaAc/HAc. Dakle, povećanjem volumnog udjela ekstrakta ružmarina dolazi do smanjivanja brzine korozije, odnosno povećanja efikasnosti inhibicije pločica kositra.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se 70 %-tni ekstrakt ružmarina pokazao vrlo učinkovitim inhibitorom korozije. S obzirom da se dodatkom većeg volumnog udjela ekstrakta ružmarina ujedno i adsorbira veća količina inhibitora na površinu kositra očekivano je da dolazi do opadanja brzine korozije i povećanja efikasnosti inhibicije.

Potvrda antikorozijskog djelovanja ekstrakta ružmarina mogla bi se provesti i nekim drugim testovima, poput elektrokemijskog polarizacijskog mjerenja što će biti predmet daljnjih istraživanja vezanih uz tematiku antikorozijskog djelovanja biljnih ekstrakata.

U zaključku ovim radom je pokazano da se i ekstrakti ružmarina mogu koristiti kao vrlo efikasna antikorozijska sredstva, poput različitih drugih biljnih ekstrakata.

Tako je Gülşen (2012) ispitao inhibitorni učinak ekstrakta lovora (*Laurus nobilis*), a Deng i Li (2011), Bouammali i sur. (2013) Khadraoui i sur. (2014a i 2014b) ekstrakata ginka (*Ginko biloba*), lavande (*Lavandula dentata*), rute (*Ruta chalepensis*) i mente (*Mentha pulegium*) na koroziju čelika, u otopinama klorovodične ili sumporne kiseline. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da upotrebljeni biljni ekstrakti djeluju kao učinkoviti inhibitori korozije čelika.

Utjecaj ekstrakta ružmarina na inhibiciju korozije ispitan je uglavnom na čeliku (Bendahou i sur. 2006) i legurama aluminija i magnezija (Kliškić i sur. 2000; Vrsalovic i sur. 2009), dok literaturni podaci vezani uz inhibiranje korozije kositra biljnim ekstraktima nisu pronađeni.

Budući da prehrambena industrija koristi bijeli lim (čelicna baza s slojem kositra) za izradu limenki i konzerviranje različitih namirnica, važno je ispitati koliko učinkovito može biti usporena ili u potpunosti spriječena korozija kositra.

5. ZAKLJUČAK

Prema rezultatima dobivenim u ovom radu možemo zaključiti:

- Refluksiranje je metoda ekstrakcije koja u usporedbi s ekstrakcijom potpomognutom visokim tlakom pokazuje veću efikasnost ekstrakcije fenolnih spojeva. Naime ovom metodom su nađeni veći maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida iz uzoraka lišća ružmarina.
- Ekstrakcija uzoraka ružmarina potpomognuta visokim tlakom pogoduje ekstrakciji fenolnih spojeva s jačim antioksidacijskim djelovanjem.
- Vrijeme trajanja ekstrakcije visokim tlakom ne utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva iz uzoraka ružmarina.
- Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lišća ružmarina je učinkovitija upotrebom 70 %-tnog etanola i acetona, u odnosu na ista otapala 30 %-tnih volumnih udjela.
- Ekstrakt ružmarina (70 %-tni etanol) smanjuje brzinu korozije kositra u kiselom mediju (NaAc/HAc i NaAc/NaCl).
- S većim volumnim udjelima ekstrakta ružmarina postiže se veća efikasnost inhibicije korozije kositra (75 i 90,63 %).

U zaključku, ovim radom je pokazano da ekstrakt ružmarina nedvojbeno pokazuje svojstva inhibiranja korozije kositra. No, kako bi imali bolji uvid u njegovu antikorozijsku aktivnost potrebno je provesti dodatna istraživanja kojima bi se mogao utvrditi točan mehanizam djelovanja ekstrakta. Prije svega, potrebno je upotrijebiti i druge metode ispitivanja korozije kositra (npr. elektrokemijske), te ostalih analitičkih metoda važnih za identifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva.

6. LITERATURA

- 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.
- Begum, A. (2011) Rosmarinus officinalis L. Herb as corrosion inhibitor for mild steel in sulphuric acid medium. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **10**, 168-169.
- Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Ravindran Vinod, K., Reddy, S., Banji, D. (2013) An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **12**, 61-73.
- Bendahou, M., Benabdellah, M., Hammouti, B. (2006) A study of rosemary oil as a green corrosion inhibitor for steel in 2M H₃PO₄. *Pigm. Resin. Technol.* **35**, 95-100.
- Berdahl, D. R., McKeague, J. (2015) Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation. U: Handbook of antioxidants for food preservation. (Shahidi, F., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 117-217.
- Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **59**, 205-212.
- Blunden, S., Wallace, T. (2003) Tin in canned food: a review and undersanding of occurence and effect. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1651-1662.
- Boogaard, P. J., Boisset, M., Blunden, S., Davies, S., Ong, T. J., Taverne, J. P. (2003) Comparative assessment of gastrointestinal irritant potency in man of tin(II) chloride and tin migrated from packaging. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1663-1670.
- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2014) *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 20585-20606.
- Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M., Karlović, S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji. *Kem. Ind.* **11**, 539-544.
- Bouammali, H., Ousslim, A., Bekkouch, K., Bouammali, B., Aouniti, A., Al-Deyab, S. S., Jama, C., Bentiss, F., Hammouti, B. (2013) The anti-corrosion behaviour of *Lavandula dentata* aqueous extract on mild steel in 1 M HCl. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 6005-6013.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčić, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules.* **21**, 1-38.

- Čatić, S., Obralić, E., Bratovčić, A. (2016) Rosemary as ecologically acceptable corrosion inhibitor of steel. *Glas. hem. tehnol. Bosne Herceg.* **40**, 47-50.
- Deng, S. i Li, X. (2012) Inhibition by *Ginkgo* leaves extract of the corrosion of the steel in HCl and H₂SO₄ solutions. *Corros. Sci.* **55**, 407-415.
- Devarayan, K., Mayakrishnana, G., Sulochana, N. (2012) Green inhibitors for corrosion of metals: A review. *Che. Sci. Rev. Lett.* **1**, 1-8.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnolic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* **110**, 76-82.
- Featherstone, S. (2015) Metal containers for canned foods. U: A complete course in canning and related processes, (Featherstone, S., ured.), 14. izd., Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 75-117.
- Gülşen, A. (2012) Corrosion inhibition of mild steel by *Laurus nobilis* leaves extract as green inhibitor. *Res. Chem. Intermed.* **38**, 1311-1321.
- Hernández, M.D., Sotomayor, J.A., Hernández, Á., Jordán, M.J. (2016) Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) oils. U: Essential oils in food preservation, flavor and safety. (Preedy, V.R., ured.), Academic Press, London/San Diego/Waltham/Kidlington, str. 677-686.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010) Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in vitro assays. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 2512-2520.
- Hogervorst Cvejić, J., Atanacković Krstonošić, M., Bursać, M., Miljić, U. (2017) Polyphenols. U: Nutraceutical and functional food components: Effects of innovative processing techniques. (Galanakis, C. M., ured.) Academic press. Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str. 203-237.
- Huang, H. W., Hsu, C. P., Yang, B. B., Wang, C. Y. (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends. Food Sci. Tech.* **33**, 54-62.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **55**, 279-290.
- Khadraoui, A., Khelifa, A., Boutoumi, H., Hamitouche, H., Mehdaoui, R., Hammouti, B., Al-Deyab, S. S. (2014a) Adsorption and inhibitive properties of *Ruta chalepensis L.*

- Oil as a green inhibitor of steel in 1 M hydrochloric acid medium. *Int. J. Electrochem. Sci.* **9**, 3334-3348.
- Khadraoui, A., Khelifa, A., Boutoumi, H., Hammouti, B. (2014b) *Mentha pulegium* extract as a natural product for the inhibition of corrosion. Part I: electrochemical studies. *Nat. Prod. Res.* **28**, 1206-1209.
 - Khan, G., Salim Newaz, K. M., Basirun, W. J., Mohd Ali, H. B., Lafta Faraj, F., Khan, G. M. (2015) Application of natural products extracts as green corrosion inhibitors for metals and alloys in acid pickling processes - a review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 6120-6134.
 - Kliškić, M., Radošević, J., Gudić, S., Katalinić, V. (2000) Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. as inhibitor of Al-Mg alloy corrosion in chloride solution. *J. Appl. Electrochem.* **30**, 823-830.
 - Marsal, P. (2003) Corrosion chemistry. U: Encyclopedia of food sciences and nutrition, (Caballero, B., Fingla, P., Toldra, F., ured.), 2. izd., Academic Press, Baltimore, str. 1675-1682.
 - Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., Michelozzi, M. (2011) Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta.* **85**, 167-176.
 - Murković, M. (2003) Phenolic compounds. U: Encyclopedia of food sciences and nutrition, (Caballero, B., Fingla, P., Toldra, F., ured.), 2. izd., Academic Press, Baltimore, str. 4507-4513.
 - Ninčević Grassino, A., Grabarić, Z., Pezzani, A., Fasanaro, G., Lo Voi, A. (2009a) Influence of essential onion oil on tin and chromium dissolution from tinfoil, *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1556-1561.
 - Ninčević Grassino, A., Grabarić, Z., Pezzani, A., Squitieri, G., Fasanaro, G., Impembo, M. (2009b). Corrosion behaviour of tinfoil cans in contact with tomato purée and protective (inhibiting) substances, *Food Addit Contam.* **26**, 1488-1494.
 - Ninčević Grassino, A., Grabarić, Z., Pezzani, A., Squitieri, G., Berković, A. (2010) Corrosion inhibition with different protective layers in tinfoil cans for food preserving, *J. Sci. Food Agric.* **90**, 2419-2426.
 - Ninčević Grassino, A., Grabarić, Z., De Sio, F., Cacace, D., Pezzani, A., Squitieri, G. (2012) Effect of storage time and natural corrosion inhibitor on carbohydrate and carboxylic acids content in canned tomato purée, *Food. Sci. Technol. Int.* **18**, 219-228.

- del Pilar S´anchez-Camargo, A., Herrero, M. (2016) Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.12.003>>.
- Popov, B .N. (2015a) Galvanic Corrosion. U: Corrosion Engineering: Principles and Solved Problems. (Popov, B. N., ured.), Elsevier, Amsterdam/Kidlington/Waltham, str. 239-287.
- Popov, B .N. (2015b) Corrosion inhibitors. U: Corrosion Engineering: Principles and Solved Problems. (Popov, B. N., ured.), Elsevier, Amsterdam/Kidlington/Waltham, str. 581-597.
- Pourriahi, M., Nasr-Esfahani, M., Motalebi, A. (2014) Effect of henna and rosemary extracts on the corrosion od 304L stainless steel in 3,5% NaCl solution. *Surf. Eng. Appl. Electrochem.* **6**, 525-533.
- Pravilnik o toksinima, metalima, metaloidima, te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani (2005) *Narodne novine* **16**, Zagreb.
- Radojčić, I., Berković, K., Kovač, S., Vorkapić-Furač, J. (2008) Natural honey and black radish juice as tin corrosion inhibitors. *Corros. Sci.* **50**, 1498-1504.
- Rani, B. A. E., Basu, B. B. J. (2012) Green inhibitors for corrosion protection of metals and alloys: an overview. *Int. J. Corros.* **2012**, 1-15.
- Rapić, V. (1994) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb, str. 56 - 58.
- Rice - Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **2**, 152-159.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* 109, 98-103.
- Sasikumar, B. (2012) Rosemary. U: Handbook of herbs and spices. (Peter, K. V., ured.), Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge/Boca Raton, str. 243-252.
- Shouqin, Z., Junjie, Z., Changzen, W. (2004) Novel high pressure extraction technology. *Int. J. Pharm.* **278**, 471-474.
- Simić, I. (2013) Metalna amabalaža za prehrambenu industriju - trendovi i održivost. Ambalaža. [online] 2, < <http://www.ambalaza.hr/hr/casopis/2013/6/metalna-ambalaza-za-prehrambenu-industriju-trendovi-i-odrzivost,337,11124.html>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

- Stalikas, C.D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **30**, 3268-3295.
- Toribara, T. Y. (2003) Tin. U: Encyclopedia of food sciences and nutrition. (Caballero, B., Fingla, P., Toldra, F., ured.), Academic Press, Baltimore, str. 5785-5788.
- Velázquez-González, M. A., Gonzalez-Rodriguez, J. G., Valladares-Cisneros, M. G., Hermoso-Diaz, I. A. (2014) Use of *Rosmarinus officinalis* as green corrosion inhibitor for carbon steel in acid medium. *Am. J. Analyt. Chem.* **5**, 55-64.
- Vrsalović, L., Kliškić, M., Gudić, S. (2009) Application of phenolic acids in the corrosion protection of Al-0,8Mg alloy in chloride solution. *Int. J. Electrochem. Sci.* **4**, 1568-1582.
- WHO (2005) Tin and inorganic tin compounds, WHO - World Health Organization, Geneve, <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43223/1/9241530650_eng.pdf>. Pristupljeno 11. listopada 2017.