

# Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz kore mandarine

---

**Rajković, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:159:268012>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ana Rajković**

7215/PT

**MIKROVALOVIMA POTPOMOŽNUTA EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ  
KORE MANDARINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitička kemija

**Mentor:** Doc. dr. sc. *Antonela Ninčević Grassino*

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija polifenola iz kore mandarine**

***Ana Rajković, 0058208455***

**Sažetak:** Svrha ovog istraživanja bila je određivanje optimalnih parametara ekstrakcije polifenola pomoću mikrovalova iz kore mandarine, nusproizvoda nastalog tijekom postupka obrade mandarine i proizvodnje voćnih sokova. Ispitan je utjecaj temperature (30 i 50 °C), vremena (3, 7, 11 i 22 min) ekstrakcije te volumnog udjela etanola (25, 50 i 70 %, v/v) na prinos polifenola. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine određen je primjenom UV/Vis spektrofotometrije.

Rezultati su pokazali da najveći prinos fenola ( $w = 64,17 \text{ mg g}^{-1}$ ) daju uzorci ekstrahirani tijekom 7 min uz volumni udio etanola od 50 %, na temperaturi od 30 °C. Kod ekstrakcije provedene na 50 °C dobivene su nešto više vrijednosti, tijekom 7 i 11 min ekstrakcije s 50 i 70 %-tnim etanolom. Zaključno, za postizanje optimalnih prinosa polifenola kod daljnjih priprava i primjena ekstrakata kore mandarine bili bi:  $\varphi$  (etanol) = 50 %,  $t = 7 \text{ min}$  i  $T = 50 \text{ °C}$ .

**Ključne riječi:** ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenoli, flavonoidi, kora mandarine, UV/Vis spektrofotometrija

**Rad sadrži:** 31 stranica, 13 slika, 5 tablica, 39 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

**Datum obrane:** 20. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### Microwave assisted extraction of polyphenols from mandarine peel

*Ana Rajković, 0058208455*

**Abstract:** The purpose of this investigation was determination of optimal parameters of microwave assisted extraction of polyphenols from mandarine peel, main by-product of mandarine processing and manufacture of fruit juices. Influence of temperature (30 and 50 °C), time (3, 5, 7 and 11 min) of extraction and volume fraction of ethanol (25, 50 and 70 %,  $v/v$ ) was examined. Contents of total phenols and flavonoids was determined using UV/Vis spectrophotometry.

The results have shown that the highest recovery of phenols ( $w = 64,17 \text{ mg g}^{-1}$ ) give samples extracted 7 min with volume fractions of ethanol 50 %, at temperature of 30 °C. For extraction performed at 50 °C are obtained somewhat higher values, during 7 and 11 min by 50 and 70 % ethanol. In conclusion, for achievement of optimal recovery of polyphenols for further preparation and application of mandarine peel extracts would be:  $\varphi$  (etanol) = 50 %,  $t = 7 \text{ min}$  i  $T = 50 \text{ °C}$ .

**Keywords:** microwave assisted extraction, phenols, flavonoids, mandarine peel, UV/Vis spectrophotometry

**Thesis contains:** 31 pages, 13 figures, 5 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

**Defence date:** 20. rujna 2018.

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Mandarina.....	2
2.2. Fenolni spojevi .....	3
2.2.1. Fenolne kiseline.....	4
2.2.2. Flavonoidi .....	5
2.3. Mikrovalno zračenje .....	6
2.3.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija.....	7
2.4. UV/Vis spektrofotometrija.....	8
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>9</b>
3.1. Materijal .....	9
3.2. Kemikalije .....	9
3.3. Aparatura i pribor .....	9
3.4. Metode rada .....	10
3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine mikrovalnim zračenjem .....	10
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	11
3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola .....	11
3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline .....	11
3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola.....	12
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida.....	13
3.4.3.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih flavonoida .....	13
3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina .....	13
3.4.3.3. Postupak određivanja flavonoida .....	13
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>15</b>
4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	15
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	20

<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>28</b>

# 1. UVOD

U posljednje vrijeme sve je veća primjena bioloških materijala, osobito biljnih ekstrakata u različitim industrijama. Jedna od glavnih skupina bioloških materijala su fitokemikalije gdje se posebno ističu fenolni spojevi. Prisutni su u hrani biljnog porijekla poput voća, povrća i začinskih biljaka, a nalaze se ne samo u jestivim, nego i u nejestivim dijelovima biljaka (Shadidi, 1997). Zbog svog antioksidativnog djelovanja doprinose očuvanju zdravlja i sprječavanju bolesti (Shadidi, 1997) pa imaju široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kao i u industriji papira, boja i lakova (Liu i sur., 2008).

Njihova izrazito široka primjena i nastojanje da se štetni, sintetički antioksidansi zamijene onim prirodnim i jestivim dovela je do razvoja novih, inovativnih ekstrakcijskih metoda kojima bi se skratilo ne samo vrijeme, već i potrošnja velikih volumena otapala, karakterističnim za nekonvencionalne ekstrakcijske metode.

Stoga je, u ovom radu, pri izolaciji polifenola iz kore mandarine primijenjena ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima kao jedna od mnogobrojnih nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika (Huie, 2002).

Ispitan je utjecaj volumnog udjela etanola, temperature i vremena ekstrakcije na prinos fenola i flavonoida iz kore mandarine (lat. *Citrus reticulata*), nusproizvoda nastalog tijekom proizvodnje voćnih sokova. Iako nejestiva, izrazito je bogata bioaktivnim spojevima, osobito polifenolima, što upućuje na mogućost njezine bioiskoristivosti (Li i sur., 2006).

Provedeno istraživanje sastojalo se od:

- pripreme 25, 50 i 70 %-tnih etanolnih ekstrakata kore mandarine primjenom mikrovalova u vremenu od 3, 7, 11 i 22 min pri temperaturi od 30 i 50 °C
- određivanja masenog udjela ukupnih fenola i flavonoida u dobivenim ekstraktima primjenom UV/Vis spektrofotometrijskog testa
- određivanja optimalnih parametara mikrovalovima potpomognute ekstrakcije polifenola iz kore mandarine koji bi se koristili u daljnjim pripravama i primjenama ekstrakata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Mandarina

Mandarina (lat. *Citrus reticulata*) je zimzeleno drvo srednje veličine (Slika 1) iz porodice *Rutaceae*. Smatra se jednim od predaka vrsta iz roda *Citrus* (Barkley i sur., 2006). Razlikuje se više varijeteta mandarine, kao što su: obična (*C. reticulata Bianco*), mediteranska (*C. deliciosa Tenore*), kraljevska (*C. nobilis Loureiro*), itd. Poznate su i brojne hibridne sorte (Tanaka, 1977).



**Slika 1.** Mandarina (Anonimus 1).

Listovi su sjajni, zeleni i relativno mali, a plodovi su veličine od 4 do 8 cm. Za razliku od naranči, oblik im je sferičan ili plosnat, imaju tanju koru koja se lakše guli, a osim toga odlikuju se osebnim okusom i aromom karakterističnom za mandarine. Manje su gorke i kisele, a do izražaja osobito dolazi slatkasti voćni okus (Goldenberg i sur., 2015). Boja im varira, ovisno o varijetetima, od žuto-zelene do karakteristične narančasto-crvene boje.

Prema podacima u Tablici 1 (USDA 2018), mandarine su izrazito bogate vitaminom C te mineralima kalcijem i kalijem. Mandarine sadrže i polifenole, dijetalna vlakana, esencijalna ulja te karotenoidne spojeve (Magiorkinis i sur., 2011) zbog čega one kao i drugo citrusno voće i njihovi ekstrakti povoljno djeluju na ljudsko zdravlje (Montanari i sur., 1998).

Mandarine i drugi citrusi se konzumiraju svježi ili se koriste u industriji, osobito proizvodnji voćnih sokova, gdje se kao glavni nusprodukt izdvaja kora. Prema USDA (2017) godišnja proizvodnja i distribucija mandarina na tržište iznosi 28.4 milijuna tona, pri čemu prednjači Kina sa 19.3 milijuna tona, a slijede ju Europska Unija, Maroko, Turska i Japan. Ukupno gledano, posljednjih 5 godina svjetska proizvodnja mandarina je porasla za više od 25% (USDA, 2017).

Osim pulpe, i kora citrusa, a time i mandarine, predstavlja supstrat iznimno bogat bioaktivnim komponentama od kojih su najznačajniji fenolni spojevi. To su uglavnom flavanoni, flavanon glikozidi i polimetoksilirani flavoni, jedinstveni za citruse i relativno rijetki kod drugih biljaka (Asami i sur., 2003).



**Tablica 1.** Kemijski sastav mandarine (USDA, 2018).

<b>Nutritijenti</b>	<b>Mjerna jedinica</b>	<b>Količina u 100g</b>
Energija	kcal	53,00
Proteini	g	1,32
Masti	g	0,00
Ugljikohidrati	g	13,16
Vlakna	g	1,30
Šećeri	g	10,53
Kalcij	mg	26,00
Željezo	mg	0,00
Kalij	mg	164,00
Natrij	mg	0,00
Vitamin C	mg	27,60
Vitamin A	IU	658,00

## **2.2. Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji nastaju u biljkama kao odgovor na biotički i abiotički stres. To su biološki aktivni spojevi koji služe biljkama kao zaštita od različitih stresnih čimbenika kao što su UV zračenje, napadi patogena i biljojeda. Utječu na otpornost biljaka prema bolestima i različitim mikroorganizmima, rast i razmnožavanje, kao i na senzorske osobine, aromu, boju i okus biljnih plodova i proizvoda biljnog porijekla (Rasoli, 2011).

Biološka aktivnost fenolnih spojeva ogleda se u njihovoj sposobnosti vezanja slobodnih radikala i inhibiranja oksidacijskih procesa te vezanja teških metala u organske komplekse i time njihova uklanjanja iz organizma.

Način djelovanja fenolnih spojeva povezan je sa mehanizmom zaštite i popravka DNA, inhibicijom kancerogenih tvari i diferencijacijom stanica (Shadidi, 1997) pa fenolni spojevi imaju važnu ulogu u liječenju i prevenciji bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom, kao što su rak (Huang i sur., 2001) i dijabetes (Boynes, 1991), te različitih neurodegenerativnih (Perry i sur., 2000) i kardiovaskularnih bolesti (Hool, 2006). Osim toga, uočena je i njihova antibakterijska, antiupalna, antitumorska i protualergena aktivnost (Cook i Sammon, 1996).

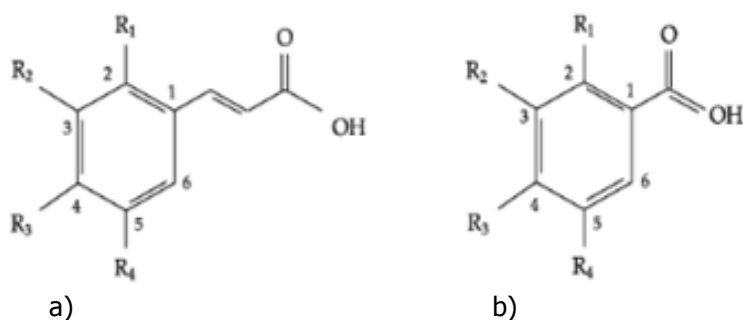
Fenolni spojevi se dijele u nekoliko velikih skupina (Rasoli, 2011):

- fenolne kiseline
- flavonoidi
- lignani
- stilbeni
- drugi fenoli

### 2.2.1. Fenolne kiseline

Razlikuju se dvije osnovne skupine fenolnih kiselina (Slika 2) (Manach i sur., 2004):

- derivati hidroksicimetne kiseline
- derivati hidroksibenzojeve kiseline



**Slika 2.** Osnovna struktura derivata: a) hidroksicimetne i b) hidroksibenzojeve kiseline (Manach i sur., 2004).

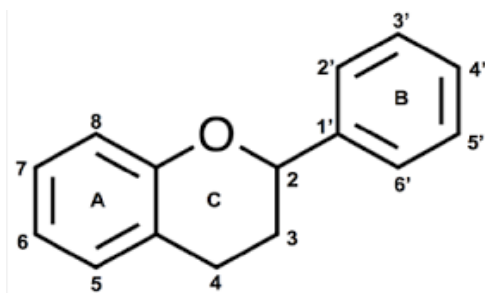
Derivati hidroksicimetne kiseline u biljkama su puno češći, a to su uglavnom o- i p-kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapinska kiselina (Andres-Lacueva i sur., 2010). Rijetko se nalaze u slobodnom obliku i obično su glikozilirani, a najviše ih ima u borovnicama, kiviju, šljivama, višnjama i jabukama.

Nasuprot tome, derivati hidroksibenzojeve kiseline se obično nalaze u relativno niskim koncentracijama u jestivim biljkama, osim u određenom crvenom voću i luku. Najčešći derivati su vanilinska, galna, m- i p-hidroksibenzojeva kiselina (Pandey i sur., 2009).

Od navedenih fenolnih kiselina u kori madarine u najvećem udjelu su pronađene: galna, vanilinska, ferulična, p-kumarinska i p-hidroksibenzojeva kiselina (Hayat i sur., 2010).

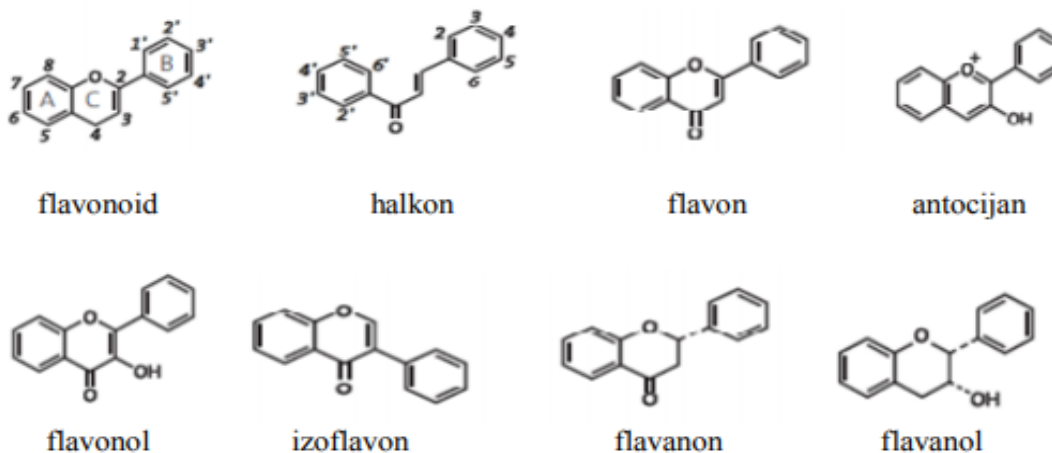
### 2.2.2. Flavonoidi

Jedna su od najvažnijih skupina fenolnih spojeva. Osnovna karakteristična struktura (Slika 3) flavonoida jest fenilbenzopiranska struktura. Sastoji se od dva aromatska prstena povezana s 3 ugljikova atoma koji sa kisikom tvore heterocikličku strukturu (Manach i sur., 2004).



**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida (Manach i sur., 2004).

Flavonoidi su podijeljeni na nekoliko podgrupa: halkoni, flavani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli te antocijani čije su osnovne strukturne formule dane na Slici 4 (Brand, 2010).



**Slika 4.** Osnovna struktura različitih skupina flavonoida (Brand, 2010).

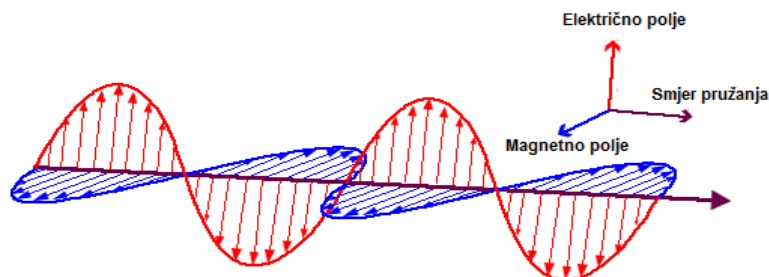
U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, povezani s različitim šećerima. Osim šećera, na osnovnoj jezgri mogu se još nalaziti hidroksilne i metilne grupe. Bogati izvori flavonoida su voće i povrće, zeleni i crni čaj, čokolada, crna vina i bobičasto voće. Značajne

količine se nalaze u cvijeću, čajevima, sjemenkama, medu i propolisu. Flavonoidi porijeklom iz citrusa imaju antikancerogena, antivirusna i antiupalna svojstva, inhibiraju trombozu krvi kod ljudi (Huet, 1982) te imaju povoljan učinak na sprječavanje razvoja arteroskleroze (Mulvihill i Huff, 2012).

U kori mandarine su pronađeni osobito vrijedni spojevi iz skupine flavonoida kao što su: hesperidin, naringin, naringenin, katehin, rutin i kemferol (Hayat i sur., 2010).

### 2.3. Mikrovalno zračenje

Elektromagnetno zračenje je zračenje nastalo kao posljedica sinkroniziranog transverzalnog osciliranja električnog i magnetnog polja čiji se valovi u prostoru kreću brzinom svjetlosti okomito jedan na drugi (Slika 5). Elektromagnetno zračenje se može opisati kao valno zračenje, ali nositelji energije su čestice koje se nazivaju fotoni pa prema tome elektromagnetno zračenje ima i valna i čestična svojstva (Cloude, 1995).



**Slika 5.** Shema elektromagnetnog vala (Anonimus 2).

Mikrovalovi pripadaju dijelu neionizirajućeg elektromagnetnog zračenja. Frekvencijom koja iznosi od 300 MHz do 300 GHz smješteni su između radiovalova i infracrvenog zračenja. Mikrovalno zračenje u dodiru sa tvarima uzrokuje dvije pojave: rotaciju molekula dipola i kondukciju iona. Te dvije pojave, zajedno ili odvojeno, ovisno o prirodi tvari, uzrokuju zagrijavanje tvari.

Djelovanjem elektromagnetnog zračenja dolazi do migriranja iona u skladu sa električnim poljem, a ako otapalo pruža otpor kretanju onda dolazi do trenja, i posljedično, zagrijavanja (Anastasiades i sur., 1992). Molekule koje su dipoli će se pod djelovanjem elektromagnetnog zračenja nastojati okretati u skladu sa oscilirajućim električnim poljem, a u trenutku kad se

molekule ne mogu dovoljno brzo uskladiti sa električnim poljem dolazi do sudara molekula te zagrijavanja (Burkert i sur., 1993).

Primijećeno je da do zagrijavanja dolazi pri frekvenciji zračenja od 2450 MHz, dok pri nižim, odnosno višim frekvencijama, ne dolazi do zagrijavanja. Također, da bi se tvar mogla zagrijati mikrovalovima mora imati ili dielektrična svojstva ili sadržavati trajne dipole.

Na osnovu svojstva mikrovalova da zagrijavaju dielektrike i otapala sa trajnim dipolima temelji se primjena mikrovalova u kućanstvima i prehrambenoj industriji za sušenje, zagrijavanje i pečenje namirnica u mikrovalnim pećnicama.

### **2.3.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija**

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija je najširu primjenu našla pri obradi biljnih materijala i dobivanju biljnih ekstrakata. To je jedna od relativno novijih metoda, razvijena u skladu s načelima Zelene kemije u cilju smanjenja uporabe otapala i utroška energije (Tsao i Deng, 2004).

Tijekom izlaganja biljnog materijala mikrovalovima dolazi do rotacije molekula vode i drugih prisutnih dipola unutar uzorka. Pri određenoj frekvenciji, kada se dipolne molekule više ne uspijevaju organizirati dovoljno brzo, dolazi do zagrijavanja i povišenja temperature. Povišenjem temperature dolazi do isparavanja vode što će uzrokovati povišenje tlaka unutar biljnih stanica, pucanje stanične stijenke i oslobađanje staničnog sadržaja.

Osim toga, zbog rotacije molekula dipola dolazi do pucanja vodikovih veza kojima su vezani bioaktivni spojevi, a prisutni ioni migriraju unutar uzorka što posljedično olakšava prodor otapala i interakciju oslobođenih bioaktivnih tvari s molekulama otapala (Kaufmann i Christen, 2002). Također, do povećanja iskorištenja procesa dolazi i uslijed zagrijavanja odgovarajućeg otapala iz pripremljenih suspenzija uzoraka što će ubrzati prodor otapala u uzorak i značajno ubrzati ekstrakciju u odnosu na konvencionalne metode (Jassie i sur., 1997).

Stoga je, prilikom provođenja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, potrebno obratiti pozornost na temperaturu, vrijeme trajanja procesa, omjer uzorak/otapalo, polarnost otapala te snagu mikrovalova.

U pravilu, viša temperatura, osim kod termoosjetljivih spojeva, pozitivno utječe na iskorištenje procesa zbog čega je potrebno poznavati prirodu uzorka i spojeva koji se žele ekstrahirati. Međutim, primjenom viših temperatura i veće snage mikrovalova dolazi do naglog

pucanja stanične stijenke pa se oslobađaju nečistoće i druge primjese iz staničnog materijala uz tvari koje se žele ekstrahirati. Zbog toga je, u nekim slučajevima, pogodnije koristiti niže temperature radi sporijeg pucanja i razgradnje stanične stijenke, a mikrovalna ekstrakcija u tom slučaju je selektivnija (Font i sur., 1998). Također, dužim vremenom ekstrakcije povećava se efikasnost izolacije ciljanog analita, no predugo vrijeme trajanja procesa može dovesti do razgradnje termoosjetljivih spojeva, a time i do smanjenja prinosa (Camel, 2000).

## 2.4. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je instrumentalna analitička metoda koja se koristi pri identifikaciji i određivanju različitih organskih i anorganskih kemijskih vrsta koje apsorbiraju ili emitiraju elektromagnetno zračenje u UV/Vis području. Ultraljubičasto zračenje (UV) se nalazi u području valnih duljina od 200 - 400 nm, a vidljivo (Vis) zračenje od 400 - 800 nm.

Tijekom izlaganja tvari UV/Vis elektromagnetnom zračenju dolazi do pobuđivanja elektrona, tj. prelaska elektrona u više energetske stanje. Elektroni koji su sposobni apsorbirati energiju i prijeći u pobuđeno stanje su nevezni elektroni i  $\pi$ -elektroni, što je karakteristično za nezasićene molekule ili konjugirane sustave sa heteroatomima te ione prijelaznih metala. Određivanje onih analita koji ne apsorbiraju UV/Vis zračenje se odvija preko njihovih derivata koji nastaju u reakcijama s određenim kromogenim reagensima (Klein, 2015).

Detekcija se provodi pomoću UV/Vis spektrofotometara, a odnos između apsorbiranog elektromagnetnog zračenja i koncentracije analizirane vrste daje Lambert - Beerov zakon (1):

$$A = \log_{10} (I_0/I) = \varepsilon b c \quad (1)$$

pri čemu  $I_0$  predstavlja intenzitet ulazne zrake,  $I$  intenzitet izlazne zrake,  $A$  apsorbanciju,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent,  $b$  debljinu sloja otopine, a  $c$  množinsku koncentraciju analita. Iz zakona proizlazi zaključak da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji analita što omogućuje vrlo jednostavno računanje nepoznate koncentracije analita u uzorcima.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijal**

Kora mandarine, skupljena u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska), dopremljena u svježem stanju, oguljena, isjeckana i zamrznuta do provedbe istraživanja. Prilikom priprema uzoraka za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, kora je odmrznuta i usitnjena ručnim blenderom.

### **3.2. Kemikalije**

Prilikom provedbe pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

- Deionizirana voda
- Etanol 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Folin-Ciocalteu (FC) reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb Hrvatska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Metanol 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

### **3.3. Aparatura i pribor**

Korištena aparatura i pribor tijekom provedbe pokusa:

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000  $\mu$ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, START S Microwave Labstation for Synthesis)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- Boce za čuvanje otopina od 50 i 500 mL

- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka od 25 mL
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Tikvice s okruglim dnom od 50 mL
- Menzure od 10 i 100 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25 i 100 mL
- Propipeta
- Staklene čaše od 50, 100 i 250 mL
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Staklene kapaljke
- Gaza
- Cjedilo

### **3.4. Metode rada**

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće metode:

- ekstrakcija polifenola pomoću mikrovalnog zračenja
- UV/Vis spektrofotometrija pri određivanju masenog udjela ukupnih fenola i flavonoida

#### **3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine mikrovalnim zračenjem**

Oko 1,3 g blenderom usitnjene kore mandarine je odvagano u tikvice s okruglim dnom od 50 mL. Potom je dodano 20 mL odgovarajuće vodene otopine etanola volumnog udjela 25, 50 i 70 %. Ekstrakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru (princip ekstrakcije opisan je u poglavlju 2.3.1.) u trajanju od 3, 7, 11 i 22 min pri temperaturama od 30 i 50 °C.

Nakon obrade mikrovalovima suspenzija je ručno protiještena kroz gazu te procijeđena na cjedilu. Dobiveni ekstrakti uzoraka su zatim profiltrirani kroz filter papir u odmjerne tikvice od 25 mL koje su potom nadopunjene odgovarajućom vodenom otopinom etanola do oznake. Ovako priređene otopine uzoraka prebačene su u Falcon kivete od 25 mL te čuvane u hladnjaku do početka analize.



### 3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip spektrofotometrijskog određivanja upotrebom UV/Vis zračenja je opisan u poglavlju 2.4. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline. U spomenutoj reakciji dolazi do oksidacije fenola i redukcije FC reagensa do volfram i molibden oksida koji daju plavo obojenje. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 760 nm (Ough i Amerine, 1998).

#### 3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa ( $c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ): u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL FC reagensa ( $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ ) i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.
- Otopina natrijeva karbonata (20 %, *w/v*): odvagano je 200 g krutog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  koji je otopljen u 800 g vruće, proključale deionizirane vode. Nakon hlađenja dodano je nekoliko kristalića  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a sadržaj je profiltriran nakon 24 sata.

#### 3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline

Za izradu baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji fenola pripremljene su pojedinačne standardne otopine galne kiseline.

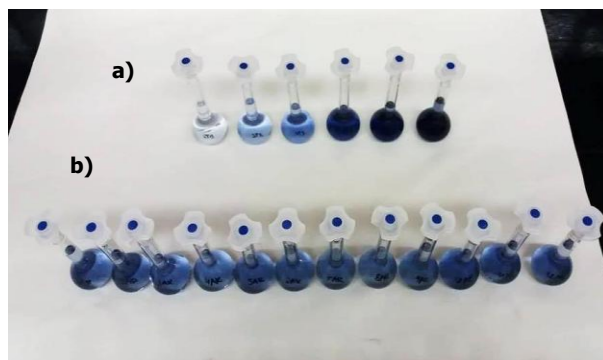
Ishodna otopina galne kiseline koncentracije  $5 \text{ g L}^{-1}$ , pripremljena je vaganjem 0,5 g galne kiseline, njenim otapanjem u 10 mL 96 % etanola, kvantitativnim prenošenjem u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjavanjem deioniziranom vodom do oznake. Pojedinačne standardne otopine galne kiseline koncentracija 10, 30, 50, 100 i  $130 \text{ mg L}^{-1}$  pripremljene su pipetiranjem 0,2, 0,6, 1,0, 2,0 te 2,6 mL alikvota ishodne otopine u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

### 3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola

Prethodno opisanim standardnim otopinama galne kiseline i ekstraktima kore mandarine određen je maseni udio ukupnih fenola.

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetiran je 1 mL odgovarajuće standardne otopine ( $\gamma = 10, 30, 50, 100$  i  $130 \text{ mg L}^{-1}$ ). Dodano je 10 mL deionizirane vode i 1,25 mL pripremljene otopine FC reagensa ( $c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), a zatim je nakon točno 5 minuta dodano 3,75 mL 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Tikvice su nadopunjene deioniziranom vodom do oznake i čuvane na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Tako priređenim otopinama izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm (Slika 6) te je na temelju dobivenih podataka o apsorbanaciji i poznatih masenih koncentracija standarda konstruiran baždarni dijagram.

Otopine uzoraka (ekstrakata kore mandarine) pripremljene su identičnim postupkom (Slika 6), ali je umjesto 1 mL standarda pipetiran alikvot od 0,4 mL odgovarajućeg uzorka. Pripremljena je i slijepa proba gdje je umjesto uzorka i standarda upotrijebljena deionizirana voda.



**Slika 6.** Uzorci standardnih otopina (a) i ekstrakata kore mandarine (b) kod određivanja ukupnih fenola.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju

### 3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Princip na kojem se zasniva metoda je opisan u poglavlju 2.4. Metoda se temelji na formiranju stabilnog aluminijsko-flavonoid kompleksa između aluminijske i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola (de Rijke i sur., 2006). Intenzitet obojenja formiranog kompleksa se mjeri pri valnoj duljini od 510 nm.

#### 3.4.3.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- Otopina natrijeva nitrita (5 % *w/v*): odvagano je 5 g krutog NaNO<sub>2</sub> i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijske klorida (10 % *w/v*): odvagano je 10 g krutog AlCl<sub>3</sub> i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ): odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.

#### 3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina

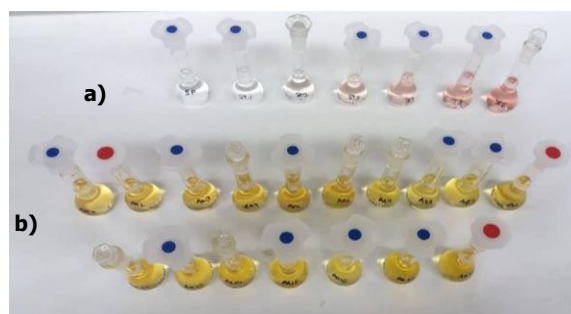
Prilikom izrade baždarnog dijagrama pripremljena je ishodna otopina rutina masene koncentracije 1 g L<sup>-1</sup> vaganjem 0,1 g rutina u čaši od 50 mL te otapanjem u 10 mL 96 % metanola. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je do oznake nadopunjena metanolom. Iz ishodne otopine pripremljene su pojedinačne standardne otopine, koncentracija 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg L<sup>-1</sup>, pipetiranjem 0,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 12,0 mL alikvota ishodne otopine u odmjerne tikvice od 100 mL koje su potom nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

#### 3.4.3.3. Postupak određivanja flavonoida

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetiran je 1 mL prethodno opisanih otopina standarda, dodano je 2 mL deionizirane vode te 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO<sub>2</sub>. Nakon 5 min stajanja dodano je 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl<sub>3</sub>. Reakcijska smjesa je stajala još 6 minuta nakon čega je dodano 2 mL otopine NaOH ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Odmjerne tikvice su nadopunjene destiliranom

vodom do oznake (Slika 7), a potom im je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm. Iz dobivenih podataka konstruiran je baždarni dijagram.

Postupak određivanja uzoraka (ekstrakti kore mandarine) identičan je onom kod određivanja standarda (Slika 7). Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda.



**Slika 7.** Uzorci standardnih otopina (a) i ekstrakata kore mandarine (b) pri određivanju flavonoida.<sup>1</sup>

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu opisan je postupak izolacije polifenola iz kore mandarine primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, umjesto uobičajene ekstrakcije refluksiranjem. Ispitan je utjecaj temperature (30 i 50 °C) i vremena ekstrakcije (3, 7, 11 i 22 min) te volumnog udjela etanola (25, 50 i 70 %) na efikasnost ekstrakcije polifenola. Potom su, analizom dobivenih vrijednosti ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL), utvrđeni optimalni procesni parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

### 4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

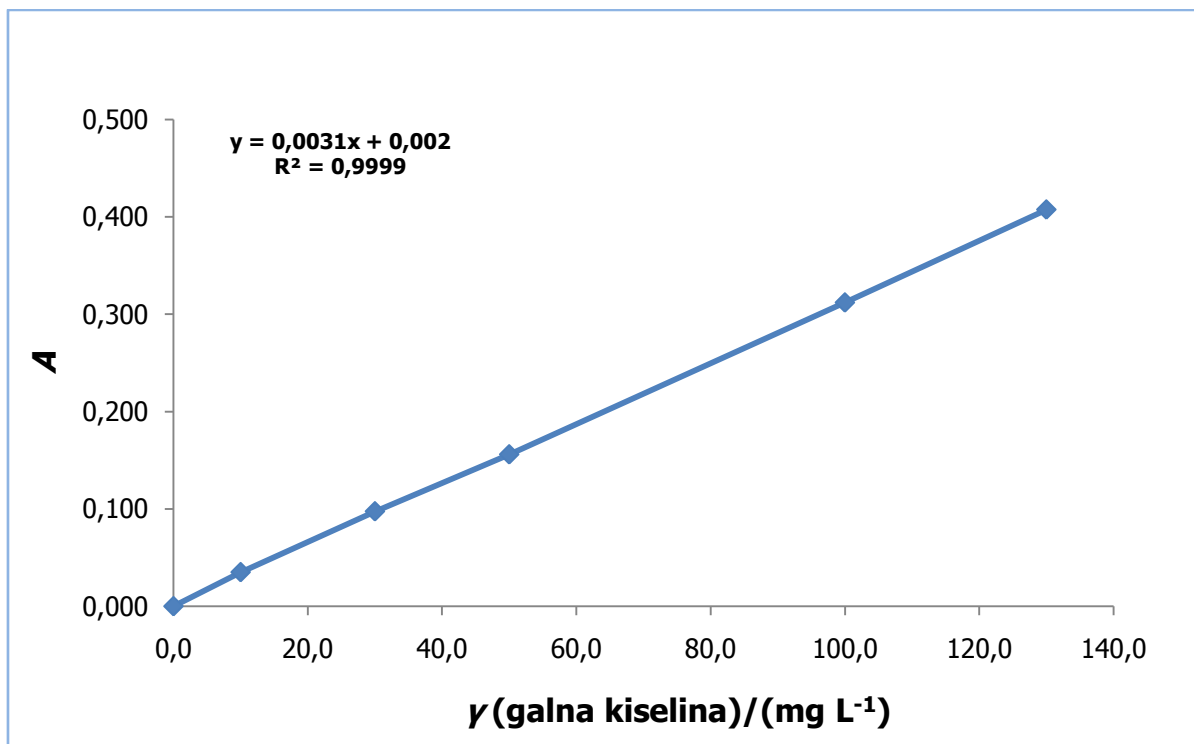
U Tablici 2 prikazane su srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline (vidi poglavlje 3.4.2.) izmjerene UV/Vis spektrofotometrom.

**Tablica 1.** Prikaz masenih koncentracija pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline s pripadajućim vrijednostima apsorbancija.

$\gamma$ (galnakiselina) / (mg L <sup>-1</sup> )	A±SD
0	0,0000±0,0000
10	0,0350±0,0010
30	0,0975±0,0015
50	0,1560±0,0000
100	0,3120±0,0010
130	0,4075±0,0015

Iz navedenih podataka (Tablica 2) konstruiran je baždarni dijagram (Slika 8), a iz dobivene jednadžbe pravca (2) izračunate su masene koncentracije, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola u uzorcima kore mandarine (Tablica 3). U Tablici 3 se nalaze i ekstrakcijski parametri (volumni udio etanola, temperatura i vrijeme ekstrakcije) te izračunata srednja vrijednost apsorbancije nakon provedbe tri paralelna mjerenja.

$$y = 0,0031 x + 0,0020 \quad (2)$$



**Slika 8.** Baždarni dijagram galne kiseline.

**Tablica 3.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

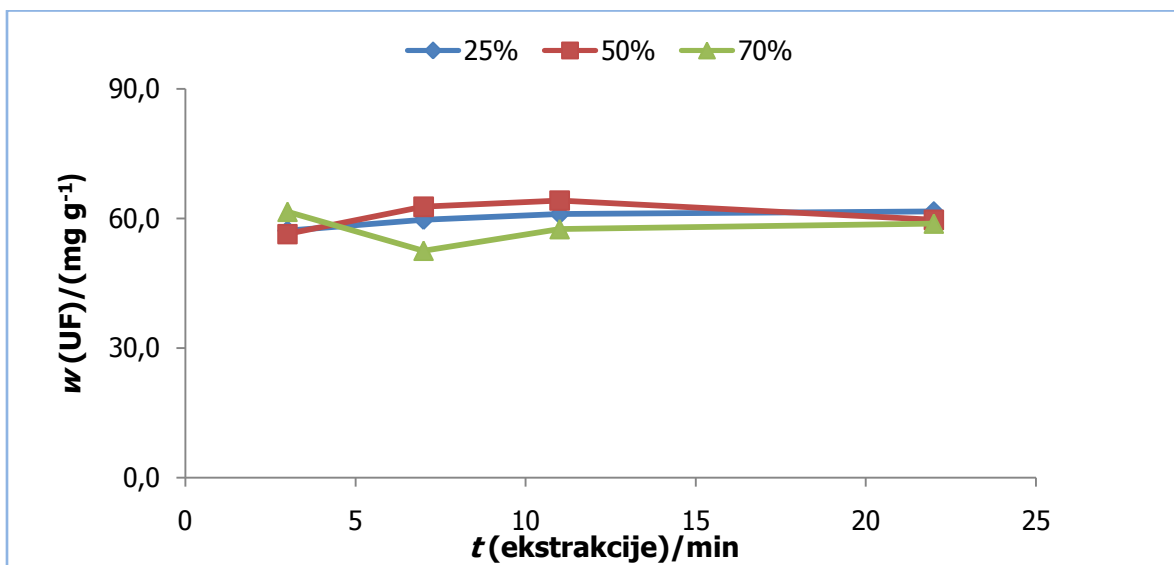
Uzorak		Parametri ekstrakcije			A±SD	w(UF)±SD /(mg g <sup>-1</sup> )
Oznaka	m /g	φ (etanol)/%	t /min	T /°C		
1 AR	1,34	25	3	30	0,1530±0,0010	56,80±0,38
2 AR	1,30		7		0,1560±0,0010	59,71±0,39
3 AR	1,28		11		0,1570±0,0010	61,04±0,39
4 AR	1,3		22		0,1610±0,0000	61,65±0,00
5 AR	1,34	50	3		0,1520±0,0010	56,42±0,38
6 AR	1,35		7		0,1700±0,0010	62,72±0,37
7 AR	1,30		11		0,1675±0,0005	64,17±0,19
8 AR	1,30		22		0,1560±0,0000	59,71±0,00
9 AR	1,29	70	3		0,1595±0,0005	61,54±0,20
10 AR	1,31		7		0,1385±0,0015	52,52±0,58
11 AR	1,31		11		0,1515±0,0005	57,52±0,19
12 AR	1,32		22		0,1560±0,0000	58,80±0,00
13 AR	1,31	25	3	50	0,1850±0,0010	70,41±0,38
14 AR	1,30		7		0,1900±0,0010	72,89±0,39
15 AR	1,31		11		0,1740±0,0020	66,18±0,77
16 AR	1,33		22		0,1530±0,0010	64,05±0,38
17 AR	1,31	50	3		0,1500±0,0000	57,01±0,00
18 AR	1,32		7		0,2020±0,0010	76,37±0,38
19 AR	1,31		11		0,1995±0,0015	75,99±0,58
20 AR	1,31		22		0,1840±0,0000	70,03±0,00
21 AR	1,31	70	3		0,1615±0,0005	61,37±0,19
22 AR	1,32		7		0,2010±0,0010	75,96±0,38
23 AR	1,32		11		0,1980±0,0000	74,96±0,00
24 AR	1,31		22		0,1780±0,0020	67,72±0,77

Promatrajući utjecaj volumnog udjela etanola (25, 50 i 70 %) na ekstrakciju fenola može se uočiti da ovaj parametar značajno utječe na dobivene vrijednosti masenih udjela (Tablica 3). Naime, kod temperature od 30 °C (Slika 9) najbolje rezultate daje 50 %-tna otopina etanola, dok su nešto niže vrijednosti ukupnih fenola nađene upotrebom 25 %-tnog etanola.

Međutim, gledajući uzorke koji su ekstrahirani tijekom 22 min može se primijetiti da je u slučaju 50 %-tnog etanola došlo do blagog pada krivulje pa je za to ekstrakcijsko vrijeme bolje upotrijebiti 25 %-tni etanol.

Najniži maseni udjeli ukupnih fenola nađeni su kod uzoraka ekstrahiranih 70 %-tnim etanolom. Izuzetak čini uzorak ekstrahiran u vremenu od 3 min, gdje je izmjereni udio ukupnih fenola viši u usporedbi s 25 i 50 %-tnim etanolom (Slika 9). Najviši udio ukupnih fenola uporabom 25 %-tnog etanola je dobiven u vremenu od 22 min, kod 50 %-tnog etanola uz 11 min što je ujedno i najbolji rezultat ekstrakcije provedene na 30 °C. Primjenom 70 %-tnog etanola najbolja vrijednost je postignuta u vremenu od 3 min.

Dakle, može se zaključiti da je uz veće volumne udjele etanola potrebno kraće vrijeme ekstrakcije. U suprotnom, dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola (kod 50 %-tnog etanola nakon 22 min, kod 70 %-tnog etanola već nakon 3 min, dok kod 25 %-tnog etanola nije zabilježeno smanjenje njihova udjela).



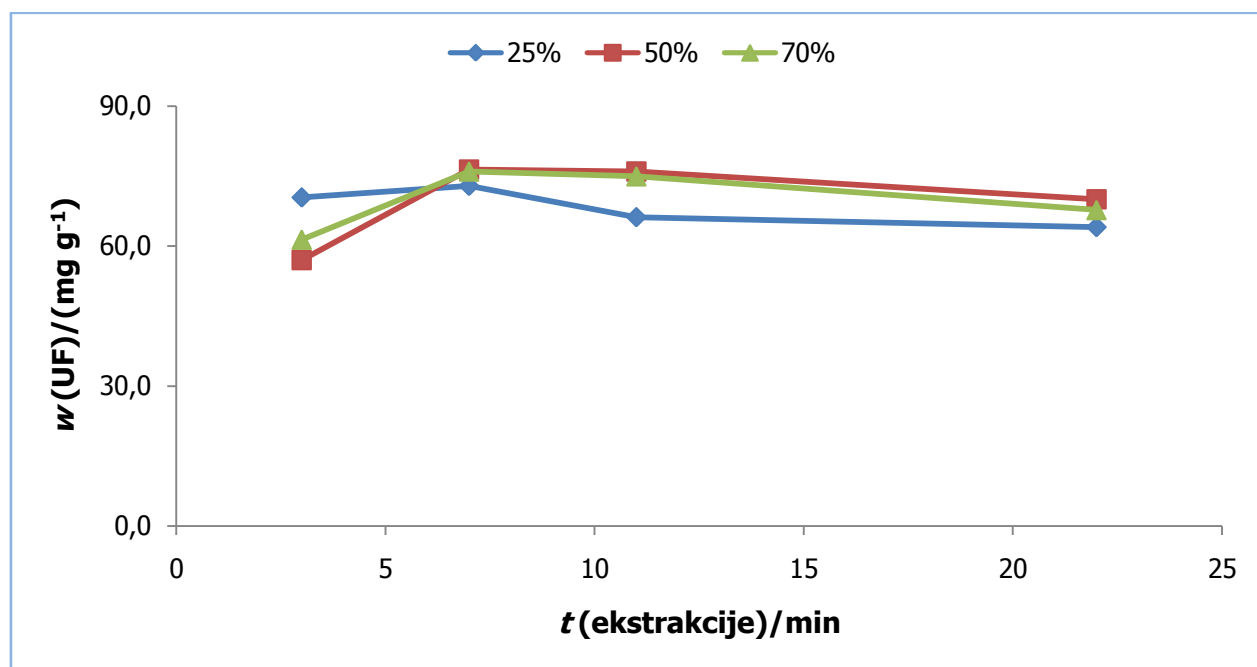
**Slika 9.** Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na 30 °C.

Nadalje, iz Tablice 3 i Slike 10 može se pratiti utjecaj volumnog udjela etanola nakon provedbe ekstrakcije na temperaturi od 50 °C. Vidljivo je da su najveći udjeli ukupnih fenola postignuti upotrebom 50 i 70 %-tnog etanola, gdje se iznosi masenih udjela uzoraka gotovo podudaraju. Kod uzoraka ekstrahiranih s 25 %-tnim etanolom maseni udjeli su manji, osim u



slučaju ekstrakcije u trajanju od 3 min, gdje je postignut najbolji rezultat u odnosu na druga dva upotrijebljena otapala. Nadalje, najviše vrijednosti UF su dobivene ekstrakcijom u vremenu od 7 min primjenom 25, 50 i 70 %-tnog etanola. Duljim vremenom ekstrakcije (11 i 22 min) dolazi do smanjenja sadržaja fenola pa se može zaključiti da je pri povišenim temperaturama neovisno o volumnom udjelu etanola potrebno primjeniti kraće vrijeme.

Maseni udio ukupnih fenola kod uzorka ekstrahiranog tijekom 7 min u 50 %-tnom etanolu je nešto viši nego kod uzoraka tretiranih sa 25 i 70 %-tnim etanolom pa je to ujedno i najbolji rezultat ekstrakcije mikrovalovima provedene na 50 °C.



**Slika 10.** Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na 50 °C.

Promatrajući utjecaj temperature na efikasnost ekstrakcije fenola vidi se da su pri višoj temperaturi, tj. temperaturi od 50 °C, maseni udjeli UF veći nego pri temperaturi od 30 °C za iste volumne udjele etanola i isto vrijeme ekstrakcije. Prema tome, kako je u teorijskoj obradi metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima navedeno (poglavlje 2.3.1.), viša temperatura povoljno utječe na efikasnost ekstrakcije analita.

Tako je uzorak sa najviše ekstrahiranih fenola 18 AR upravo dobiven ekstrakcijom kore mandarine na 50 °C tijekom 7 min u 50 %-tnom etanolu.

Uspoređujući rezultate ukupnih fenola dobivenih u ovom istraživanju s rezultatima Karsheva i sur. (2013) može se zaključiti da se ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima postiže veća efikasnost ekstrakcije fenola u odnosu na konvencionalne ekstrakcijske metode što je posebno istaknuto i u poglavlju 2.3.1. Naime, maseni udio ukupnih fenola u istraživanju Karasheva i sur. (2013) je 4,32 % uporabom 50 %-tnog etanola, što je mnogo manje u odnosu na uzorak 18 AR u kojem je nađeno 76,37 mg g<sup>-1</sup> UF.

Hayat i sur. (2010) su, također, proveli ispitivanja utjecaja tretiranja kore mandarine mikrovalovima na prinos fenola, tijekom 5, 10 i 15 min uz 80 %-tni metanol. Prema tim rezultatima najbolje iskorištenje daje ekstrakcija provedena na 5 min, što je primijećeno i u ovom radu. Dakle, povećanjem vremena tretiranja uzoraka kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima dolazi do razgradnje polifenola uslijed temperaturne nestabilnosti što je detaljnije opisano u poglavlju 2.3.1.

#### 4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Postupak određivanja ukupnih flavonoida opisan je u poglavlju 3.4.3. Pripremljenim otopinama standarda i uzoraka izmjerena je apsorbancija (tri paralelna mjerenja) pomoću UV/Vis spektrofotometra. Srednje vrijednosti apsorbancija i pripadajuće masene koncentracije otopina standarda dane su u Tablici 4.

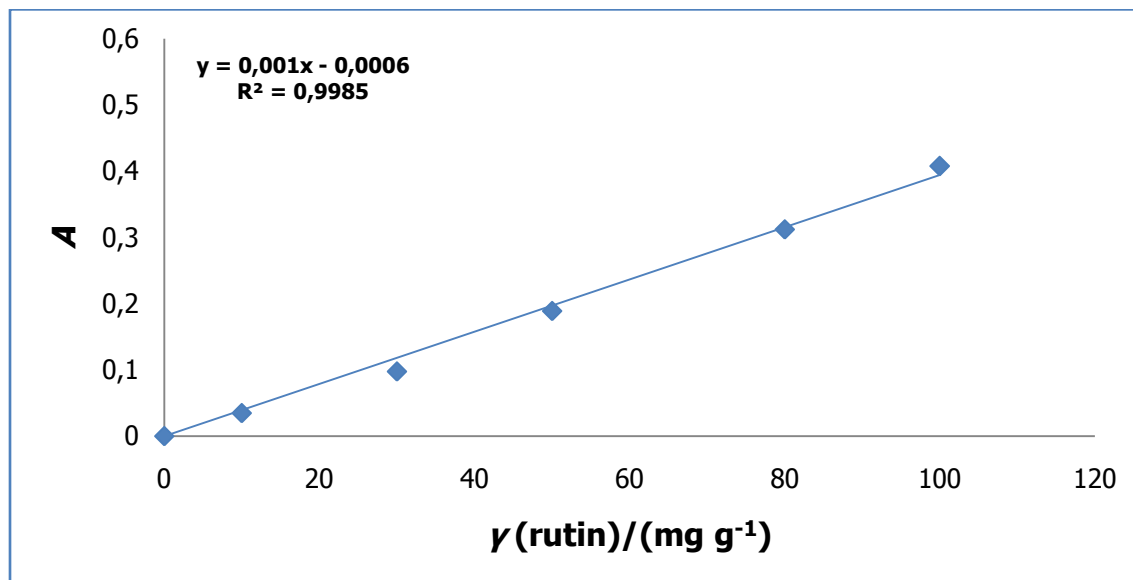
**Tablica 2.** Prikaz masenih koncentracija pojedinačnih standardnih otopina rutina s pripadajućim vrijednostima apsorbancija.

$\gamma$ (rutin) / (mg L <sup>-1</sup> )	A±SD
0	0,0000±0,0000
5	0,0050±0,0010
20	0,0195±0,0005
40	0,0370±0,0010
60	0,0595±0,0005
80	0,0805±0,0005

Na osnovu poznatih masenih koncentracija otopina standarda i njihovih vrijednosti apsorbancija konstruiran je baždarni dijagram (Slika 11). Pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (3) i srednjih vrijednosti izmjerenih apsorbancija uzoraka izračunate su masene

koncentracije, a potom i maseni udjeli ukupnih flavonoida u uzorcima kore mandarine (Tablica 5).

$$y = 0,0010 x - 0,008 \quad (3)$$



**Slika 11.** Baždarni dijagram rutina.

**Tablica 5.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Uzorak		Parametri ekstrakcije			A ± SD	w (UFL)±SD / (mg g <sup>-1</sup> )
Oznaka	m / g	φ (etanol)/%	t / min	T / °C		
1 AR	1,34	25	3	30	0,0735±0,0005	13,86±0,09
2 AR	1,30		7		0,0685±0,0005	13,33±0,10
3 AR	1,28		11		0,0620±0,0000	12,27±0,00
4 AR	1,3		22		0,0395±0,0005	7,75±0,10
5 AR	1,34	50	3		0,0600±0,001	11,34±0,19
6 AR	1,35		7		0,0660±0,001	12,37±0,19
7 AR	1,30		11		0,0595±0,0005	11,60±0,10
8 AR	1,30		22		0,0530±0,002	10,35±0,38
9 AR	1,29	70	3		0,0450±0,0000	8,88±0,00
10 AR	1,31		7		0,0425±0,0005	8,26±0,10
11 AR	1,31		11		0,0565±0,0005	10,94±0,10
12 AR	1,32		22		0,0645±0,0005	12,37±0,10
13 AR	1,31	25	3	50	0,0480±0,001	9,31±0,19
14 AR	1,30		7		0,0570±0,002	11,12±0,38
15 AR	1,31		11		0,0425±0,0015	11,03±0,29
16 AR	1,33		22		0,0510±0,001	9,74±0,19
17 AR	1,31	50	3		0,0600±0,001	11,60±0,19
18 AR	1,32		7		0,0765±0,0015	14,66±0,28
19 AR	1,31		11		0,0805±0,0005	15,52±0,10
20 AR	1,31		22		0,0755±0,0005	14,56±0,10
21 AR	1,31	70	3		0,0480±0,001	9,31±0,19
22 AR	1,32		7		0,0735±0,0005	14,07±0,09
23 AR	1,32		11		0,0800±0,0000	15,26±0,00
24 AR	1,31		22		0,0815±0,0005	15,71±0,10

Na Slici 12 prikazane su vrijednosti masenih udjela flavonoida nakon ekstrakcije provedene na 30 °C. Prema dobivenim krivuljama može se uočiti da su najveći maseni udjeli ukupnih flavonoida nađeni kod uzoraka tretiranih sa 25 %-tnim etanolom u vremenu od 3, 7 i 11 min u odnosu na one tretirane sa 50 i 70 %-tnim etanolom, pri istim vremenima. Najniži maseni

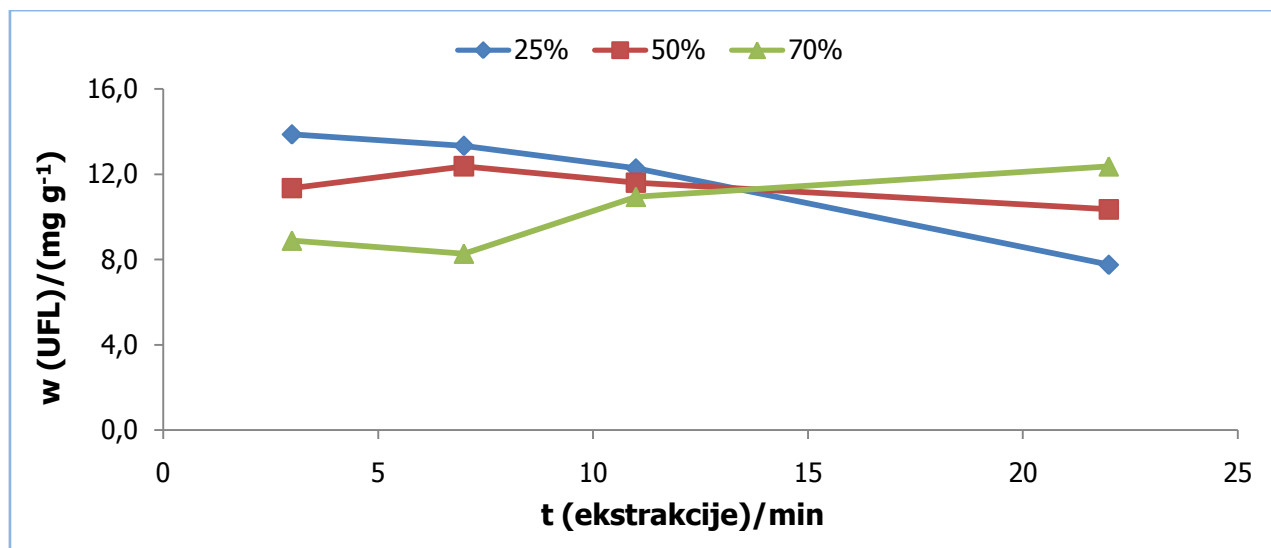
udjeli nađeni su kod uzoraka ekstrahiranih sa 70 %-tnim etanolom, no može se uočiti da porastom vremena ekstrakcije raste i udio UFL.

Dakle, kombinacijom 25 %-tnog etanola i vremena ekstrakcije od 3 min dobiven je najveći prinos ukupnih flavonoida što ujedno predstavlja i najbolji rezultat ekstrakcije provedene na 30 °C. Daljnjim produženjem vremena (> 3 min) uočeno je i smanjenje masenog udjela flavonoida, tako da je pri vremenu od 22 min udio UFL najniži u odnosu na druga dva upotrijebljena otapala.

Kod 50 %-tnog etanola najviši udio ukupnih flavonoida je dobiven u vremenu od 7 min, nakon čega, također, dolazi do smanjenja prinosa flavonoida, no gubitak je manje izražen u usporedbi sa 25 %-tnim etanolom.

Na temelju navedenog, može se zaključiti da je kod ekstrakcije provedene na 30 °C, za manje volumne udjele etanola potrebno kraće vrijeme ekstrakcije u cilju postizanja maksimalnih vrijednosti flavonoida. S druge pak strane, povećanjem volumnog udjela etanola potrebno je i duže vrijeme ekstrakcije.

Usporedbom masenih udjela ukupnih flavonoida sa vrijednostima ukupnih fenola (poglavlje 4.1.) može se zaključiti da uvjeti koji pogoduju povećanju prinosa fenola ne pogoduju i prinosu flavonoida. Drugim riječima, najveći udio flavonoida nađen je u ekstraktima kore mandarine s najnižim udjelom ukupnih fenola, osobito ako se uspoređuju vrijednosti dobivene sa 25 i 70 %-tnim etanolom.

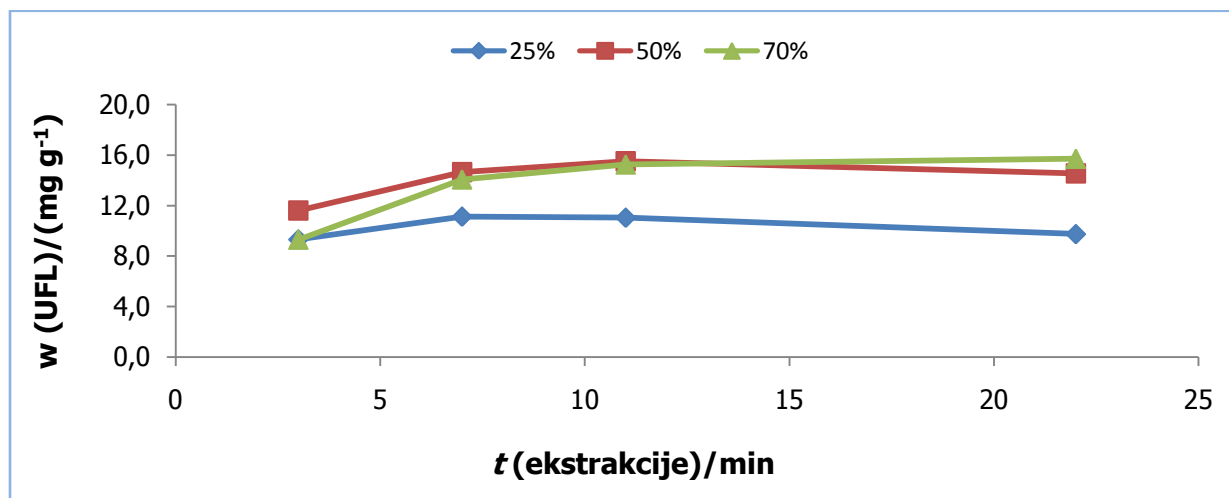


**Slika 12.** Maseni udio ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na 30 °C.

Promatrajući rezultate određivanja masenih udjela flavonoida u uzorcima kore mandarine (Tablica 5) ekstrahiranim na temperaturi od 50 °C (Slika 13) može se uočiti da je najniži udio flavonoida određen u uzorcima ekstrahiranim sa 25 %-tnim etanolom u odnosu na druga dva upotrijebljena otapala.

Uzorci ekstrahirani sa 50 %-tnim etanolom u vremenu od 3, 7 i 11 min daju najbolje rezultate u usporedbi s druga dva otapala. Međutim, tijekom 22 min ekstrakcije dolazi do blagog pada vrijednosti flavonoida. Vrlo slični rezultati dobiveni su uporabom 70 %-tnog etanola, iako nešto niži nego kod 50 %-tnog. Uporabom 70 %-tnog etanola nije zabilježeno smanjenje vrijednosti flavonoida, tako da se pri vremenu od 22 min dobivaju najviši udjeli u odnosu na druga dva otapala. Primjenom 25 %-tnog etanola najbolji rezultat je ostvaren kod 14 AR uzorka u vremenu od 7 min.

Usporedbom vrijednosti ukupnih flavonoida sa vrijednostima ukupnih fenola (poglavlje 4.1.) može se uočiti da je povećanje/smanjenje udjela flavonoida u korelaciji s povećanjem/smanjenjem udjela fenola što nije zamijećeno kod ekstrakcije provedene na 30 °C. Izuzetak predstavlja uzorak ekstrahiran sa 25 %-tnim etanolom tijekom 3 min u kojem je uočen najmanji udio flavonoida u odnosu na najveći ukupnih fenola.



**Slika 13.** Maseni udio ukupnih flavonoida u uzorcima kore mandarine nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na 50 °C.

Uspoređujući utjecaj temperature na ekstrakciju flavonoida može se uočiti da su maseni udjeli UFL veći kod uzoraka ekstrahiranim na temperaturi od 50 °C, osim u slučaju primjene 25

%-tnog etanola gdje je prinos flavonoida u uzorcima ekstrahiranim tijekom 3, 7 i 11 min veći pri 30 °C nego na 50 °C.

Usporedbom ovih dobivenih vrijednosti s onima objavljenim u radu Hayat i sur. (2010) može se zaključiti da produljenjem vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih flavonoida pa se kao optimalno vrijeme u daljnjim postupcima ekstrakcije može koristiti 11 min.

## 5. ZAKLJUČAK

S obzirom na postavljene ciljeve ovog istraživanja, koji se u konačnici odnose na određivanje optimalnih procesnih parametara pri izolaciji polifenola iz kore mandarine pomoću ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na temperaturama od 30 i 50 °C, mogu se izvući sljedeći niže navedeni zaključci.

Kod ekstrakcije provedene na 30 °C:

- Visoki udjeli ukupnih fenola dobiveni su kombinacijom većih volumnih udjela etanola pri kraćem vremenu ekstrakcije, odnosno manjih volumnih udjela etanola i dužeg vremena ekstrakcije.
- Najveći maseni udio ukupnih fenola ( $w = 64,17 \text{ mg g}^{-1}$ ) dobiven je uporabom 50 %-tnog etanola uz vrijeme od 11 min.
- S obzirom na dobivene vrijednosti ukupnih flavonoida može se uočiti da uporabom manjih volumnih udjela etanola i kraćeg vremena ekstrakcije raste i maseni udio flavonoida. S povećanjem udjela etanola produžuje se i vrijeme ekstrakcije potrebno za postizanje većih prinosa flavonoida.
- Najbolje rezultate daje ekstrakcija provedena 3 min sa 25 %-tnim etanolom. Nešto niži, no približno jednaki rezultati, postignuti su kombinacijom 50 %-tnog etanola i 7 min te 70 %-tnog etanola i 22 min.

Kod ekstrakcije provedene na 50 °C:

- Najbolji rezultati ukupnih fenola uočeni su kod uzoraka ekstrahiranih tijekom 7 min, uporabom sva tri volumna udjela etanola, s tim da je nešto veći udio ukupnih fenola dobiven ekstrakcijom sa 50 %-tnim etanolom, u odnosu na 25 i 70 %-tni etanol.
- Nešto niži, ali zadovoljavajući udio fenola nađen je kod uzoraka ekstrahiranih sa 50 i 70 %-tnim etanolom u vremenu od 11 min.
- Dobivene vrijednosti ukupnih flavonoida slijede trend uočen kod određivanja fenola, pa se može se primijetiti da uzorci sa najvećim udjelima flavonoida odgovaraju uzorcima s najvećim udjelima ukupnih fenola (7 i 11 min).

Zaključno, za postizanje najboljih prinosa ukupnih fenola i flavonoida kod ekstrakcije provedene na 30 °C optimalni parametri bili bi:  $\varphi$  (etanol) = 50 % i  $t = 7$  min. Kod ekstrakcije na 50 °C mogu se izabrati volumni udjeli etanola od 50 i 70 % kod vremena od 7 i 11 min. S obzirom na



utjecaj dvaju odabranih temperatura ekstrakcije vidi se da veći prinosi i fenola i flavonoida nastaju na temperaturi od 50 °C.

Dakle, navedeni procesni parametri bi se mogli koristiti u daljnjim pripravama i primjenama ekstrakata kore mandarine ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima.

## 6. POPIS LITERATURE

- Anonimus 1. <<http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/mandarina-lijecenje>> Pristupljeno 2. rujna 2018.
- Anonimus 2. <<https://physics.stackexchange.com/questions/171144/do-electromagnetic-waves-occupy-varying-amounts-of-space-or-do-they-simply-vary>> Pristupljeno 2. rujna 2018.
- Anastassiades J., Kaminsky D., Perea E. H., Poezevara A. (1992) Solid-State Microwave Generation, Microwave Technology Series, 4. izd., Chapman and Hall, London.
- Andrés-Lacueva C., Medina-Remon A., Llorach R., Urpi-Sarda M., Khan N., Chiva-Blanch G., Zamora-Ros R., Rotches-Ribalta M., Lamuela-Raventos R. M. (2010) Phenolic compounds: Chemistry and occurrence in fruits and vegetables. *Fruit and vegetable photochemistry: Chemistry, nutritional value and stability* (de la Rosa L. A., Alvarez-Pamilla E., Gonzalez-Aguilar G. A., ured). Wiley-Blackwell, Ames, 53 - 88.
- Asami D. K., Hong Y. J., Barrett D. M., Mitchell A. E. (2003) Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 1237 - 1241.
- Barkley N. A., Roose M. L., Krueger R. R., Federici C. T. (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1519 - 1531.
- Boynes J. W. (1991) Role of oxidative stress in the development of complication in diabetes. *Diabetes* **40**: 405 - 411.
- Brand W. (2010) Increasing hesperetin bioavailability by modulating intestinal metabolism and transport. Doctoral Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands
- Burkert R., Helberg H. W., von Schiitz J. U. (1993) Longitudinal and transverse conductivity in (2,5-Me 2-DCNQI) Cu fibres. *Synthetic Metals* **56**: 2519 - 2524.
- Camel V. (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **19**: 229 - 248.
- Cloude S. (1995). An Introduction to Electromagnetic Wave Propagation and Antennas. Springer Science and Business Media. str. 28 - 33.
- Cook N. C., Sammon S. (1996) Flavanoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The journal of nutritive Biochemistry* **7**: 66 - 76.

- de Rijke E., Out P., Niessen W. M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A* **1112**: 31 - 63.
- Font N., Hernandez F., Hogendoorn E. A., Baumann R. A., van Zoonen P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *Journal of Chromatography A* **798**: 179 - 186.
- Goldenberg L., Yaniv Y., Doron-Faigenboim A., Carmi N., Porat R. (2015) Diversity among mandarin varieties and natural sub-groups in aroma volatiles compositions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**: 57 - 65.
- Hayat K., Zhang X., Farooq U., Abbas S., Ding B., Xia S., Jia C., Zhong F., Zhang J. (2010) Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry* **123**: 423 - 429.
- Hool L. C. (2006) Reactive oxygen species in cardiac signaling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**: 146 - 151.
- Huang R. P., Golard A., Hossain M. Z., Huang R., Liu Y. G., Boynton A. L. (2001) Hydrogen peroxide promotes transformation of rat liver non-neoplastic epithelial cells through activation of epidermal growth factor receptor. *Molecular Carcinogenesis* **30**: 209 - 217.
- Huet R. (1982) Constituents des agrumes a effet pharmacodynamique: les citroflavonoides (Constituents of citrus fruits with pharmacodynamic effect: citroflavonoids). *Fruits* **37**: 267 - 271.
- Huie C. W. (2002) A review of modern sample preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**: 23 - 30.
- Jassie L. R., Kierstead R. T., Hasty E. (1997) Microwave-Enhanced Chemistry. U: Fundamentals, Sample Preparation and Applications, Kingston H. M., Haswell S. J., ur., American Chemical Society, str. 569.
- Karsheva M., Kirova E., Alexandrova S. (2013) Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols; effect of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **48**: 35 - 41.

- Kaufmann B., Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**: 105 - 113.
- Klein D. (2015) *Organic Chemistry*, 2. izd., John Wiley & Sons, str. 692.
- Li S., Lo C. Y., Ho C. T. (2006) Hydroxylated polymethoxy-flavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4176 - 4185.
- Liu Q., Cai W., Shao X. (2008) Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration, *Talanta* **77**: 679 - 683.
- Magiorkinis E., Beloukas A., Diamantis A. (2011) Scurvy: past, present and future. *European Journal of Medicine* **22**: 147 - 152.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesey C., Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* **5**: 727 - 747.
- Montanari A., Chen J., Widmer W. (1998) Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease. U: Manthey J. A., Buslig B. S., ur., *Flavonoids in the Living System*. Plenum Press, New York, 103 - 113.
- Mulvihill E. E., Huff M. W (2012) Citrus flavonoids and the prevention of atherosclerosis. *Cardiovascular and Hematological Disorders-Drug Targets* **12**: 84 - 91.
- Ough C. S., Amerine M. A. (1998) *Methods Analysis of Musts and Wines*, 1. izd. John Wiley and Sons, New York. 221 – 250.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 270 - 278.
- Perry G., Raine K. A., Nunomura A., Wataye T., Sayre L. M., Smith M. A. (2000) How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 831 - 834.
- Rasoli I. (2011) *Phytochemicals - Bioactives and Bioavailability and Impact of Health*. U: *Oral Bioavailability and Disposition of Phytochemicals.*, Yan Li, Paxton J. W., ur., Intech. Shanghai, Rijeka, pogl. 5.
- Shahidi F. (1997) *Natural antioxidants an over view*. U: *Natural Antioxidants.*, Shahidi F., ur., AOCS Press, Illinois, 1 - 11.
- Tanaka T. (1997) Fundamental discussion of citrus classification. *Studia Citrologica* **14**: 1 - 6.

- Tsao R., Deng Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidants phytochemicals. *Journal of Chromatography* **812**: 85 - 99.
- USDA (2017) Citrus: World Markets and Trade. USDA - United States Department of Agriculture <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/citruswm//2010s/2017/citruswm-01-25-2017.pdf>> Pristupljeno 2. rujna 2018.
- USDA (2018) Branded Food Products Database. USDA - United States Department of Agriculture<<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/45362206?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=mandarin&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>> Pristupljeno 2. rujna 2018.

## Izjava o izvornosti

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

*stjepan Rojevarić*

ime i prezime studenta