

Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na izolaciju polifenola iz kore mandarine

Štefanac, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:792210>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Katarina Štefanac

7134/BT

**UTJECAJ EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE MIKROVALOVIMA NA
IZOLACIJU POLIFENOLA IZ KORE MANDARINE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

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

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na izolaciju polifenola iz kore mandarine

Katarina Štefanac, 0058207089

Sažetak: U ovom radu je ispitana efikasnost ekstrakcije fenola i flavonoida iz kore mandarine, nusproizvoda nastalog tijekom postupka njene obrade. Ekstrakcija je provedena primjenom mikrovalova na uzorcima prethodno usitnjene kore mandarine pri temperaturi od 80 °C, uz vodene otopine etanola i acetona volumnih udjela 25, 50 i 70 % i vremena od 3, 7, 11 i 22 min. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstrahiranim uzorcima određen je UV/Vis spektrofotometrijom, a dobiveni rezultati su pokazali da volumni udio otapala i vrijeme ekstrakcije značajnoutječu na prinos fenola i flavonoida. Tako se 50 %-tna vodena otopina acetona pokazala najefikasnijim ekstrakcijskim sredstvom pri izolaciji fenola kod vremena od 22 min, a 70 %-tna vodena otopina etanola pri izolaciji flavonoida kod vremena od 7 min. Budući da je najučinkovitija ekstrakcija fenola i flavonoida postignuta pri navedenim parametrima, oni bi se mogli primjenjivati i u daljnjim postupcima njihove izolacije ovom nekonvencionalnom, ekološki prihvatljivom metodom.

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, kora mandarine, polifenoli, UV/Vis spektrofotometrija

Rad sadrži: 26 stranica, 12 slika, 5 tablica, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Datum obrane: 9. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Effect of microwave assisted extraction on the isolation of polyphenols from
mandarine peel**

Katarina Štefanac, 0058207089

Abstract: In this work was determined the extraction efficiency of phenols and flavonoids from mandarine peel, by-product produced during the mandarine processing. Extraction was performed using microwaves on samples of grinded mandarine peel at temperature of 80°C using water solutions of ethanol and acetone with volume fractions of 25, 50 and 70 % and times of 3, 7, 11 and 22 min. Mass fractions of total phenols and flavonoids in extracted samples was determined by UV/Vis spectrophotometry, and the obtained results showed that the volume fraction of the solvents and extraction times significantly affected on the yield of phenols and flavonoids. Thus, a 50% water solution of acetone proved to be the most effective extraction medium for the isolation of phenols at time of 22 min, and 70% water solution of ethanol for isolation of flavonoids at time of 7 min. Since the most effective extraction of phenols and flavonoids was achieved at the above mentioned parameters, they could be also used in further isolation procedures using this unconventional, environmentally acceptable method.

Keywords: microwave assisted extraction, mandarine peel, polyphenols, UV/Vis spectrophotometry

Thesis contains: 26 pages, 12 figures, 5 tables, 26 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: 9th September, 2019.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Mandarina	2
2.2. Polifenoli	3
2.2.1. Fenolne kiseline	4
2.2.2. Flavonoidi.....	4
2.3. Ekstrakcija.....	5
2.3.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija	6
2.4. UV/Vis spektrofotometrija	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijal	8
3.2. Kemikalije.....	8
3.3. Aparatura i pribor	9
3.4. Metode rada	9
3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine mikrovalnim zračenjem	9
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarine	10
3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola.....	10
3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline.....	10
3.4.2.3. Postupak određivanja ukupnih fenola	11
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida u ekstraktima kore mandarine.....	12
3.4.3.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih flavonoida.....	12
3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina.....	12
3.4.3.3. Postupak određivanja flavonoida	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine.....	14
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine.....	18
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

Zanimanje prehrambene i farmaceutske industrije za aktivnim supstancama iz biljaka u svrhu prevencije i liječenja raznih bolesti koje utječu na ljudsko zdravlje ili kao prirodnog izvora dodataka prehrani sve je veće. Sekundarni biljni metaboliti su jedna od važnijih biološki aktivnih skupina koje se proučavaju, a njima pripadaju fenolni spojevi. Uloga polifenolani je samo u zaštiti biljke već i u obrambenim procesima, kod oksidativnog stresa u ljudskim i životinjskim stanicama, pa se zbog toga interes za ove biološki aktivne spojeve i njihovu ekstrakciju iz biljaka sve više povećava (Ignat i sur., 2011).

Za izdvajanje polifenola, odnosno fenolnih kiselina i flavonoida, koriste se različite ekstrakcijske tehnike, kojima pripadaju konvencionalne (tradicionalne) i nekonvencionalne (suvremene) metode (Azmir i sur., 2013). U odnosu na tradicionalne metode, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*engl.* microwave-assisted extraction, MAE) nalazi sve veću primjenu u istraživanjima jer pokazuje niz prednosti, poput uštede znatnih količina energije i otapala, ubrzanja procesa i očuvanja termolabilnih komponenti tijekom izolacije ciljanog/ih analita.

Imajući u vidu prednosti MAE kao nekonvencionalne, ekološki prihvatljive ekstrakcijske tehnike, i u ovom radu je također našla primjenu pri izolaciji fenola i flavonoida iz kore mandarine (*lat. Citrus reticulata*), najčešćeg nusproizvoda prehrambene industrije, izrazito bogatog bioaktivnim spojevima (Hayat i sur., 2009).

Dakle, osnovni cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj volumnog udjela etanola i acetona, te vremena ekstrakcije pri konstantnoj temperaturi od 80 °C na prinos fenola i flavonoida nakon provedbe MAE iz kore mandarine. Istraživanje se sastojalo od sljedećih faza:

- pripreme 25, 50 i 70 %-tnih vodenih otopina etanola i acetona, te njihova primjena pri ekstrakciji kore mandarine pomoću mikrovalova u vremenu od 3, 7, 11 i 22 min na temperaturi od 80°C,
- određivanja masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida u dobivenim etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine primjenom spektrofotometrije u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja i
- određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koji će se koristiti tijekom budućih priprava ekstrakata kore mandarine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mandarina

Mandarina ili mandarinka (lat. *Citrus reticulata*) je biljka iz porodice Rutaceae, a pripada rodu Citrusa. Goldenberg (2015) navodi kako postoji nekoliko različitih varijeteta mandarine, kao što su: obična (*C. reticulata Blanco*), kraljevska (*C. nobilis Loureiro*), mediteranska (*C. deliciosa Tenore*), satsuma (*C. Unshiu Marcovitch*) i druge. Uz te vrste poznate su i brojne hibridne sorte. Najbolje uspijeva u tropskim, suptropskim i mediteranskim krajevima jer je osjetljiva na hladnoću, posebno na temperature ispod nule. U Hrvatskoj se uzgaja u dolini rijeke Neretve (Kaleb, 2014).

Mandarine su zimzelene biljke, narastu do oko 3 metra visine, sa širim listovima od ostalih citrusa, koje može biti okruglo i široko ili tanko i zašiljeno na vrhu (Bakarić, 1983). Plod mandarine je okruglast, malo spljošten, mesnat i sočan, narančaste i tanke kore, a mogu sadržavati sjemenke koje su svijetle i duguljaste (Šimić, 1980). Prema kemijskom sastavu (Tablica 1, Šatalić i sur., 2013), mandarine su bogate vitaminom C, kalijem, natrijem i kalcijem koji mogu povoljno utjecati na ljudsko zdravlje. Plodovi citrusa, pa tako i mandarine su bogati fenolima, flavonoidima, aminokiselinama, esencijalnim uljima, dijetalnim vlaknima, pektinom i karotenoidima koji djeluju blagotvorno na prevenciju degenerativnih bolesti (Wang i sur., 2014).

Tablica 1. Kemijski sastav mandarine (Šatalić i sur., 2013).

Sastojak	Masa
Voda	91 g
Ugljikohidrati	3 g
Prehrambena vlakna	1,8 g
Vitamin C	40 mg
Ca	10 mg
Fe	0,1 mg
Na	5 mg
K	150 g

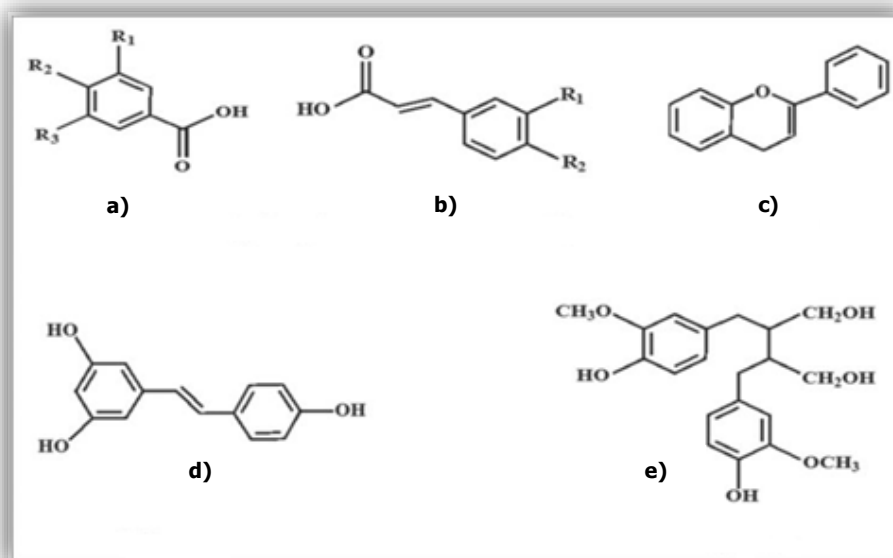
Citrusi se najčešće koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju voćnih sokova, pa kora mandarine, kao glavni nusprodukt te proizvodnje je predmet mnogih istraživanja jer sadrži veliki broj biološki aktivnih komponenti, uključujući prirodne antioksidanse, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi (Hayat i sur., 2009).

2.2. Polifenoli

Polifenoli ili fenolni spojevi, su sekundarni biljni metaboliti koji imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke te zaštiti od UV zračenja i napada patogena (Manach i sur.,2004). Na količinu i sastav polifenolnih spojeva u biljkama utječu okolišni uvjeti kao što su količina dostupne svjetlosti, sastav tla, temperatura, količina vode, uvjeti dozrijevanja, a time i uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Svedstrom i sur., 2006). Najčešće su prisutni u voću (citrusi, grožđe i trešnje), povrću (špinat, brokula i rajčica) te u raznim pićima kao što su crni i zeleni čaj, kava, crveno vino i dr.

U proteklih desetak godina, zapažen je velik interes za potencijalne zdravstvene prednosti polifenola. Glavni razlog tog interesa je prepoznavanje antioksidativnih svojstava polifenola, njihova velika potrošnja i važna uloga u liječenju i prevenciji raznih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, kao što su karcinom, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

Zajedničko obilježje svih polifenola je postojanje aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih grupa koje utječu na molekularnu masu polimera (Khoddami i sur, 2013). Polifenoli obuhvaćaju veliku skupinu organskih spojeva koja se može podijeliti u nekoliko podskupina, a to su fenolne kiseline, flavonoidi, lignani i stilbeni i drugi fenoli (Manach i sur., 2004). Slika 1 pokazuje neke od osnovnih skupina fenolnih spojeva: fenolne kiseline (a) hidroksibenzojeva kiselina, (b) hidroksicimetna kiselina, (c) flavonoidi, (d) stilbeni i (e) lignani. U poglavljima 2.2.1. i 2.2.2. biti će pobliže opisane fenole kiseline i flavonoidi, koji su ujedno predmet ovog rada.



Slika 1. Osnovna struktura različitih skupina polifenola (Pandey i Rivzi,2009).

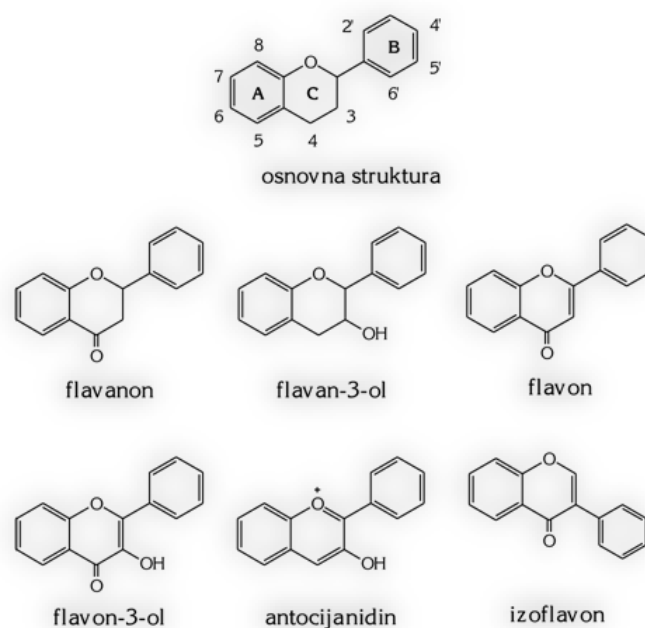
2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dijele na dvije osnovne grupe koju tvore derivati hidroksibenzojeve i derivati hidroksicimetne kiseline (Manach i sur.,2004). Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u biljkama je relativno nizak, s iznimkom u određenom crvenom voću i luku. Hidroksibenzojeve kiseline imaju C₆-C₁ strukturu, a čine ih galna, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline se sastoje od pobočnih lanaca od tri ugljika (C₆-C₃) i najčešće su kafeinska, ferulinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina. Derivati hidroksicimetne kiseline su u hrani prisutni u slobodnom i vezanom obliku, s time da se rijeđe nalaze u slobodnom obliku (osim u procesiranoj hrani). U vezanom obliku su uglavnom glikozilirani ili se pojavljuju kao esteri kvininske, šikiminske i tartarne kiseline. Hidroksicimetne kiseline su puno češće od hidroksibenzojevih i voće, poput borovnice, kivia, šljive, višnje i jabuke ih sadrži najviše (Pandey i Rizvi, 2009).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi tvore najveću, a ujedno i najviše proučavanu skupinu polifenola. Flavonoidi se ubrajaju u sekundarne metabolite malih molekulskih masa te su široko rasprostranjeni u sjemenju, lišću, kori i cvjetovima biljaka. Najviše ih nalazimo u voću, povrću, zelenom i crnom čaju, čokoladi, crnom vinu i bobičastom voću (Manach i sur.,2004). Njihovo djelovanje očituje se u antialergijskom, antibakterijskom i protuupalnom učinku.

Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C₆-C₃-C₆) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg se odvodi određeni broj osnovnih struktura, flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijani i izoflavoni (Slika 2).Svi oni mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela (Kazazić, 2004).



Slika 2. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004).

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak odjeljivanja biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, a temelji se na različitoj topljivosti tvari u ekstrakcijskom sredstvu, odnosno otapalu. Za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete same ekstrakcije, a da bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet potrebno je uzeti u obzir prirodu biljnog materijala i ciljanih skupina spojeva. Biljni materijal za ekstrakciju fenolnih spojeva može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli. Nekoliko parametara može utjecati na prinos fenola, uključujući vrijeme ekstrakcije, temperaturu, otapalo, omjer otapala i uzorka te broj ponovljenih ekstrakcija (Naczki i Shadidi, 2006). Otapala koja se najčešće koriste prilikom ekstrakcije su metanol, etanol, aceton, etil-acetat, propanol i njihove kombinacije koje se najčešće miješaju s vodom (Khoddami i sur., 2013).

Ekstrakcijske metode se mogu podijeliti na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (suvremene). U konvencionalne metode ubrajaju se Soxhlet ekstrakcija, maceracija, destilacija i ekstrakcija refluksiranjem, koje se temelje na topljivosti tvari u različitim otapalima (Azmir i sur.,2013). Klasične metode ekstrakcije su dugotrajne i potencijalno štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te niske učinkovitosti (Khoddami i sur.,2013). Stoga se sve više istražuju novije metode ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima i visokim tlakom, ekstrakcija pomoću enzima i električnog polja te ekstrakcija superkritičnim fluidima (Azmir i sur.,2013).

Za potrebe ovog rada, korištena je jedna od suvremenih metoda, točnije mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija, opisana u sljedećem poglavlju.

2.3.1. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi građeni od dva oscilirajuća polja: električnog i magnetskog polja. Pripadaju dijelu neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja smještenom između X-zraka i infracrvenog zračenja s valnim duljinama u rasponu od 1 m pa do 1 mm i frekvencijama između 300 MHz i 300 GHz (Khoddami i sur., 2013, Azmir i sur., 2013). U znanstvenim, industrijskim i medicinskim istraživanjima najčešće korištene frekvencije mikrovalova su 0,915 i 2,45 GHz (Blekić i sur., 2011).

Mikrovalovi se mogu koristiti kao nosioci informacija ili kao energetske vektore. Uloga energetskih vektora je zapravo direktna uloga valova na materiju, koje apsorbira dio elektromagnetske energije i transformira ju u toplinu (Wong i Weller, 2006). Pretvorba elektromagnetske u toplinsku energiju se odvija kroz dva mehanizma: ionskom kondukcijom i rotacijom molekula dipola u otapalu. Dipolna rotacija označava pojavu prestrojavanja dipolnih iona u promjenjivom električnom polju, te posljedično smanjenju električnog polja dolazi do povećanja entropije sustava što rezultira oslobađanjem topline (Destandeu i sur., 2013). Ionska kondukcija predstavlja migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Ako otopina pruža otpor migraciji iona dolazi do trenja i zagrijavanja iste otopine (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima smatra se novijom metodom za ekstrakciju topljivih produkata u tekućinu iz širokog raspona materijala upotrebom mikrovalne energije (Pare i sur., 1994). Danas je jedna od najčešće korištenih metoda zbog značajne redukcije vremena ekstrakcije i otapala, te dokazane efikasnosti.

Princip ove nekonvencionalne metode zasniva se na činjenici da prirodno prisutna voda u stanicama tretiranog biljnog materijala te otapalo za ekstrakciju preuzimaju energiju mikrovalova uslijed čega dolazi do intenzivnijeg gibanja molekula, rotacije dipola polarnih komponenti, sve većeg zagrijavanja i povećanja pritiska na staničnu stjenku stanica. Sukladno tome, dolazi do isparavanja vode koja se nalazi unutar biljne stanice, pucanja stanične stjenke biljke uslijed čega je olakšan prodor otapala unutar stanice i povećan kontakt između otapala i željenih komponenti (Mandal i sur., 2007).

Na djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima utječu mnogi čimbenici. Neki od njih su snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije, odabir otapala, svojstva uzorka,

temperatura i tlak (Mandal i sur., 2007; Hayat i sur., 2010; Blekić i sur., 2011). Snaga mikrovalova mora biti pravilno podešena kako ne bi došlo do pregrijavanja sustava, produljenja vremena ekstrakcije, a time i isparavanja otapala. Na prinose ekstrakcije pozitivno utječe jačina od 30 do 150 W. Izbor otapala ovisi o interakciji između analita i otapala, topljivosti analita i sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalove. Kratko vrijeme ekstrakcije je glavna prednost ovog tipa ekstrakcije u usporedbi sa ostalim metodama. Vrijeme ekstrakcije ovisi o interakcijama između mikrovalova i materijala kao što su biljne stanice i ciljne komponente. Predugo vrijeme ekstrakcije može dovesti do degradacije termolabilnih komponenti, razgradnje ekstrakta i smanjenja prinosa, što također može proizvesti prevelika temperatura ekstrakcije i povećanje tlaka unutar stanice (Mandal i sur., 2007).

2.4. UV/Vis spektrofotometrija

Spektrofotometrija je grana analitičke kemije koja proučava djelovanje elektromagnetskog zračenja na kemijski sastav i strukturu tvari te spektre nastale interakcijom zračenja i tvari. Jedna od najčešće korištenih metoda u analitičkoj kemiji je UV/Vis spektrofotometrija koja se koristi za identifikaciju i određivanje organskih i anorganskih molekula koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 200 do 400 nm za UV (ultraljubičasto) područje, odnosno od 400 do 800 nm za Vis (vidljivo) područje (Pine, 1994).

Analiza spektra elektromagnetskog zračenja se provodi spektrofotometrom koji mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, selektor valnih duljina (monokromatora), kiveta za uzorak, detektor (fotoćelija koja mjeri intenzitet zrake svjetlosti) i procesor signala.

Odnos apsorbancije i koncentracije analizirane vrste povezuje Lambert - Beerov zakon (1):

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon bc \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija, I_0 intenzitet ulaznog svjetla, I intenzitet svjetla propuštenog kroz uzorak, ε molarni apsorpcijski kapacitet, c množinska koncentracija analita i b debljina sloja otopine. Iz zakona je vidljivo da je apsorbancija proporcionalna množinskoj koncentraciji analita što omogućuje jednostavno računanje nepoznate koncentracije analita na temelju izmjerene apsorbancije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Mandarine, sakupljene na području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska) su dopremljene u svježem stanju i oguljene (Slika 3), a isjeckana kora je zamrznuta do provedbe istraživanja. Kod pripreme uzoraka za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, kora je odmrznuta i usitnjena ručnim mikserom.



Slika 3. Svježa kora mandarine.

3.2. Kemikalije

Prilikom provedbe pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

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

3.3. Aparatura i pribor

Tijekom provedbe pokusa korištene su sljedeće aparature i pribor:

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Mikrovalni reaktor (MILESTON, START S Microwave Labstation for Synthesis)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 100 - 1000 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Boce za čuvanje otopina od 50 i 500 mL
- Cjedilo
- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka od 25 mL
- Filter papir
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10 i 100 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25 i 100 mL
- Propipeta
- Staklene čaše od 50, 100 i 250 mL
- Staklene kapaljke
- Stakleni lijevci
- Sterilna gaza
- Tikvice s okruglim dnom od 50 mL

3.4. Metode rada

Metode rada korištene u ovom radu su:

- ekstrakcija kore mandarine pomoću mikrovalnog zračenja i
- UV/Vis spektrofotometrija određivanja masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine.

3.4.1. Ekstrakcija polifenola iz kore mandarine mikrovalnim zračenjem

U tikvice sa okruglim dnom od 50 mL odvagano je oko 1,3 g prethodno usitnjene kore mandarine. Nakon toga je dodano 25 mL odgovarajuće vodene otopine etanola ili acetona volumnog udjela 25, 50 i 70 %. Ekstrakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru u trajanju od 3, 7, 11 i 22 min pri temperaturi od 80 °C. Uzorci dobiveni ekstrakcijom podvrgnuti su

ručnom tiještenju kroz gazu, a potom su procijeđeni kroz cjedilo. Dobiveni ekstrakti su zatim profiltrirani kroz obični filter papir u odmjerne tikvice od 25 mL koje su potom nadopunjene odgovarajućom vodenom otopinom etanola ili acetona do oznake. Tako 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 u ekstraktima kore mandarine

Princip spektrofotometrijskog određivanja upotrebom UV/Vis zračenja opisan je 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.

3.4.2.1. Priprema pomoćnih otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa ($c=0,2$ mol/L): u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL FC reagensa ($c = 2$ mol/L), a potom je tikvica do oznake nadopunjena deioniziranom vodom.
- Otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v): odvagano je 200 g krutog natrijeva karbonata te otopljeno u 800 g vruće, proključale destilirane vode. Nakon hlađenja dodano je nekoliko kristalića Na_2CO_3 , a zatim nakon 24 h sadržaj profiltriran.

3.4.2.2. Priprema standardnih otopina galne kiseline

Za određivanje nepoznatih masenih udjela ukupnih fenola u uzorcima dobivenih ekstrakcijom mikrovalovima potrebno je izraditi baždarni dijagram upotrebom galne kiseline kao standarda. U tu svrhu odvagano je 0,5 g galne kiseline te otopljeno u 10 mL etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL, nakon čega se sadržaj u tikvici nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ovako priređena polazna otopina galne kiseline poslužila je za pripremu pojedinačnih standardnih otopina točno poznatih masenih koncentracija od 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L. Pojedinačne otopine su pripremljene pipetiranjem 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 2,6 te 3,6 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

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetiran je 1 mL odgovarajuće standardne otopine masenih koncentracija od 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L, a potom je dodano 10 mL deionizirane vode i 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2$ mol/L). Nakon 5 min dodano je 3,75 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 te je sadržaj u tikvici nadopunjen deioniziranom vodom do oznake. Ovako priređene otopine čuvane su na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata, nakon čega im se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm. Na temelju dobivenih podataka konstruiran je baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije o apsorbanciji na temelju kojeg su određene nepoznate koncentracije ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima kore mandarine.

Otopine uzoraka (ekstrakata kore mandarine) pripremljene su na isti način, ali je umjesto 1 mL standarda otpipetiran alikvot odgovarajućeg uzorka od 0,4 mL (Slika 4). Za slijepu probu je upotrebljen 1 mL, odnosno 0,4 mL deionizirane vode, umjesto 1 mL standarda ili 0,4 mL uzorka.



Slika 4. Uzorci ekstrakata kore mandarine priređeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.¹

¹Slike nastale izvorno u Laboratoriju za analitičku kemiju

3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida u ekstraktima kore mandarine

Metoda se temelji na formiranju stabilnog aluminijsko-flavonoid kompleksa između aluminija i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola. Intenzitet obojenja formiranog kompleksa mjeri se 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 NaNO₂ i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijska klorida (10 % *w/v*): odvagano je 10 g krutog AlCl₃ i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida (*c* = 1 mol/L): odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u deioniziranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL.

3.4.3.2. Priprema standardnih otopina rutina

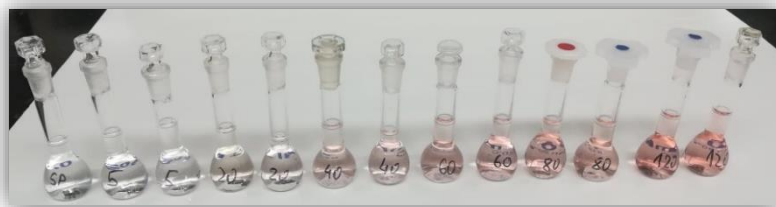
Kao i kod određivanja ukupnih fenola, tako je i kod određivanja ukupnih flavonoida bilo potrebno izraditi baždarni dijagram ovisnosti masenih koncentracija standarda o izmjerenim apsorbancijama na temelju kojeg su izračunati maseni udjeli flavonoida u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine.

Kao standardna otopina korištena je otopina rutina masene koncentracije 1 g/L, pripremljena vaganjem (0,1 g) i otapanjem rutina u 10 mL 96%-tnog metanola u čaši od 50 mL. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je potom nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Tako pripremljena ishodna otopina rutina služila je za pripremu pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija od 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L. U tu svrhu otpipetirano je 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

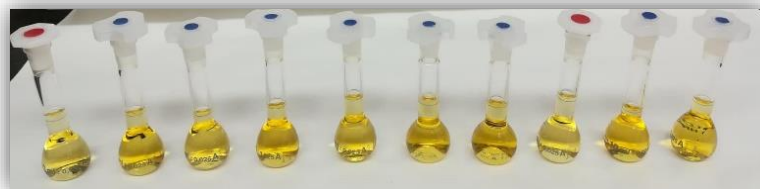
U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetiran je 1 mL prethodno opisanih otopina standarda, dodano je 2 mL deionizirane vode te 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO₂. Nakon 5 min u otopinu

je dodano 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 , a nakon sljedećih 6 min stajanja i 2 mL otopine NaOH ($c = 1 \text{ mol/L}$). Ovako priređenim otopinama, razrijeđenim deioniziranom vodom do oznake, izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm (Slika 5).



Slika 5. Uzorci standardnih otopina rutina priređeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.¹

Određivanje flavonoida u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine sastojalo se od istih postupaka kao i kod pripreme standarada, no umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,4 mL otopine uzorka (Slika 6). Za slijepu probu upotrebljena je deionizirana voda, volumena od 1 ili 0,4 mL, ovisno da li se o radi o mjerenju apsorbancije standarda ili uzorka.



Slika 6. Uzorci ekstrakata kore mandarine priređeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.¹

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određen je sadržaj fenola i flavonoida u 25, 50 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine dobivenih primjenom mikrovalova. Ispitan je utjecaja volumnih udjela etanola i acetona, temperature (80 °C) i vremena (3, 7, 11 i 22 min) na efikasnost njihove ekstrakcije. Potom su utvrđeni optimalni procesni parametri koji bi se mogli primijeniti u daljnjim postupcima izolacije fenola i flavonoida iz kore mandarine, primjenom mikrovalova kao ekološki prihvatljive ekstrakcijske tehnike. U nastavku se nalaze rezultati i zaključci provedenog istraživanja.

4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine

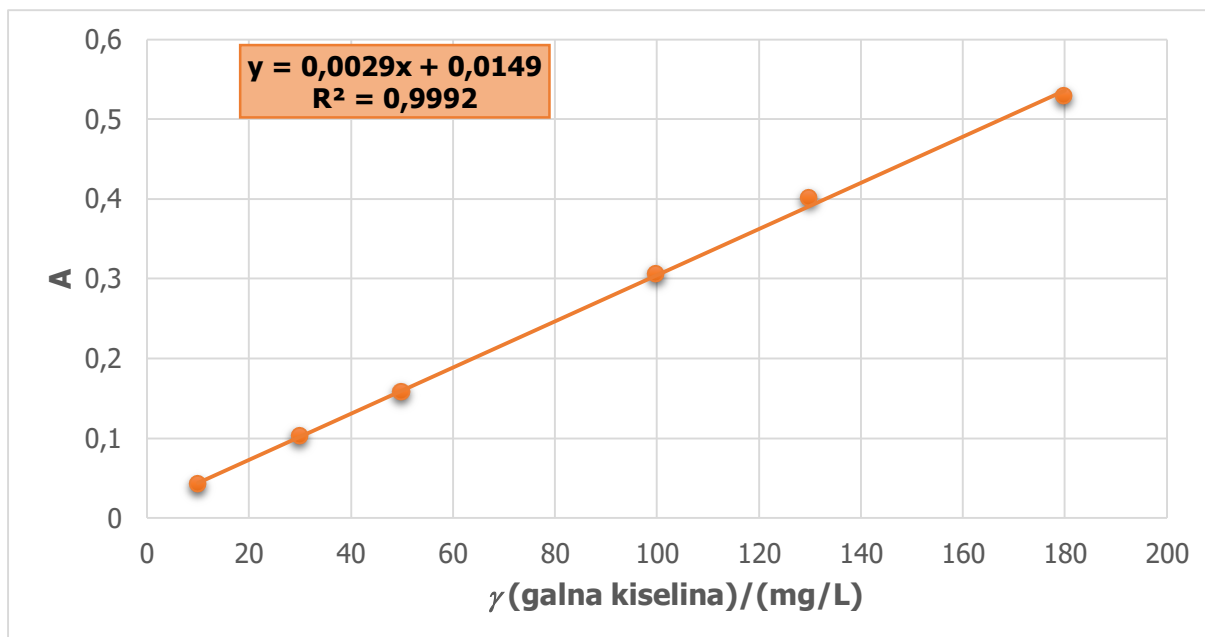
Postupak određivanja ukupnih fenola opisan je u poglavlju 3.4.2., a u Tablici 2 su prikazane srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina galne kiseline izmjerene UV/Vis spektrofotometrom.

Tablica 2. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline s pripadajućim vrijednostima apsorbancija izmjerenih pri valnoj duljini od 760 nm.

γ (galna kiselina)/(mg/L)	A \pm SD
10	0,0416 \pm 0,0000
30	0,1021 \pm 0,0000
50	0,1577 \pm 0,0005
100	0,3057 \pm 0,0010
130	0,4006 \pm 0,0000
180	0,5292 \pm 0,0010

N = 3, SD = standardna devijacija

Iz navedenih podataka konstruiran je baždarni dijagram (Slika 7), a iz dobivene jednadžbe pravca ($y = 0,0029x + 0,0149$) izračunate su masene koncentracije, a zatim i maseni udjeli ukupnih fenola u uzorcima kore mandarine (Tablica 3). Dobivene vrijednosti izražene kao mg galne kiseline po g ekstrahirane kore mandarine prikazane su s obzirom na primjenjenu ekstrakcijsku parametre, tj. volumni udio etanola i acetona i vrijeme, pri temperaturi od 80 °C.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije galne kiseline o vrijednosti apsorbanције.

Rezultati u Tablici 3 pokazuju da vrijeme ekstrakcije (3, 7, 11 i 22 min) i volumni udio etanola i acetona (25, 50 i 70 %) pri konstantnoj temperaturi ekstrakcije od 80 °C značajno utječu na ekstrakciju fenola iz kore mandarine.

I kod 25, 50 i 70 %-tnih etanolnih ekstrakata (Slika 8) može se uočiti da povećanje vremena ekstrakcije, od 3 na 22 min, uglavnom utječe na povećanje prinosa fenola, pa se najveći maseni udio dobiva ekstrakcijom od 22 min, a najmanji pri 3 min (ovisno o udjelu etanola). Međutim, kod ekstrakcije provedene u vremenu od 22 min uz 70 %-tni etanol može se primjetiti pad vrijednosti, što znači da je za to ekstrakcijsko vrijeme najbolje upotrijebiti 50 %-tni etanol.

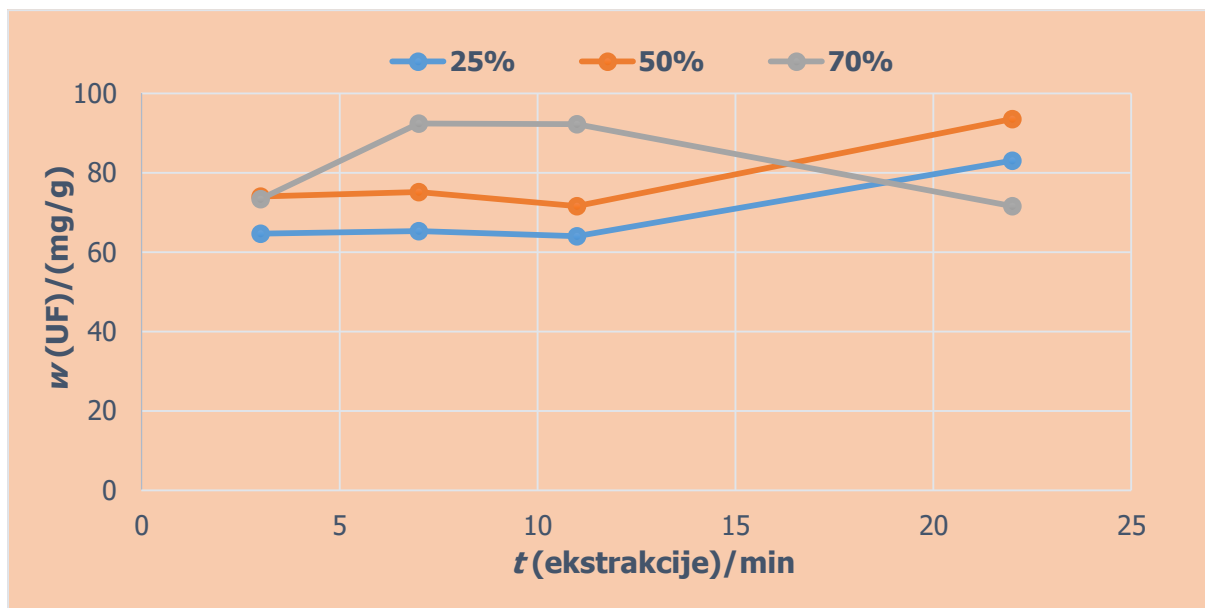
Najniži maseni udjeli ukupnih fenola dobiveni su kod uzoraka ekstrahiranih 25 %-tnim etanolom u vremenu od 3 do 11 min, dok je najviši maseni udjel izmjeren u uzorku 8 KŠ pri volumnom udjelu etanola od 50 % i temperaturi od 22 min.

Dakle, kako bi se dobio veći prinos fenola ekstrakcijom kore mandarine pomoću mikrovalova potrebno je primjeniti duže vrijeme uz manje volumne udjele etanola.

Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri temperaturi od 80 °C.

Oznaka	Parametri ekstrakcije		$A \pm SD$	$w(UF)/(mg/g) \pm SD$
	φ (etanol)/%	t/min		
1 KŠ	25	3	0,171±0,004	64,70±0,19
2 KŠ		7	0,172±0,001	65,28±0,50
3 KŠ		11	0,171±0,000	63,00±0,00
4 KŠ		22	0,215±0,000	83,06±0,00
5 KŠ	50	3	0,193±0,002	73,98±0,35
6 KŠ		7	0,196±0,000	75,14±0,00
7 KŠ		11	0,188±0,000	71,66±0,00
8 KŠ		22	0,241±0,005	93,58±0,38
9 KŠ	70	3	0,192±0,001	73,40±0,17
10 KŠ		7	0,238±0,002	92,47±0,42
11 KŠ		11	0,239±0,000	92,29±0,39
12 KŠ		22	0,189±0,000	71,52±0,38
	φ (acetone)/%	t/min		
13 KŠ	25	3	0,155±0,003	58,07±0,00
14 KŠ		7	0,155±0,001	58,07±0,25
15 KŠ		11	0,157±0,003	58,89±0,28
16 KŠ		22	0,217±0,018	84,41±0,35
17 KŠ	50	3	0,194±0,002	73,66±0,40
18 KŠ		7	0,182±0,002	69,79±0,77
19 KŠ		11	0,218±0,001	84,83±0,38
20 KŠ		22	0,249±0,001	96,28±0,48
21 KŠ	70	3	0,200±0,001	76,13±0,27
22 KŠ		7	0,212±0,002	81,69±0,36
23 KŠ		11	0,244±0,018	94,95±0,42
24 KŠ		22	0,235±0,122	91,22±0,40

$N = 3$, SD = standardna devijacija

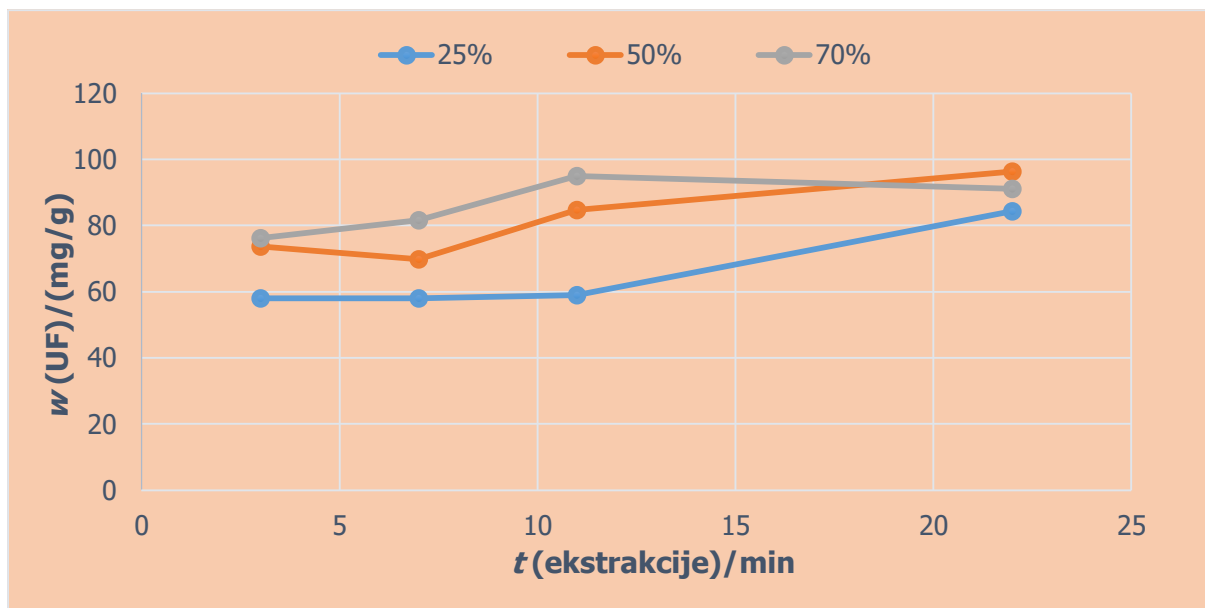


Slika 8. Maseni udjeli ukupnih fenola (UF) u etanolnim ekstraktima kore mandarine dobiveni nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Nadalje, u Tablici 3 i na Slici 9 prikazani su rezultati utjecaja volumnog udjela acetona na efikasnost izolacije fenola iz kore mandarine. Kao i kod etanolnih ekstrakata, tako i kod acetonskih, povećanje vremena ekstrakcije od 3 na 22 min utječe i na povećanje sadržaja fenola. Izuzetak je 70%-tni aceton koji najbolji rezultat daje pri nešto kraćem vremenu od 11 min.

U usporedbi s 50 i 70 %-tnim volumnim udjelima acetona, uzorci ekstrahirani s 25 %-tnim acetonom daju najniže masene udjele fenola pri vremenu od 3 do 11 min. Nešto veće vrijednosti dobivene su pri vremenu od 22 min. Najveći prinos fenola ostvaren je kod uzorka ekstrahiranog tijekom 22 min u 50 %-tnom acetonu, što ujedno predstavlja i najbolji rezultat ekstrakcije kore mandarine pomoću mikrovalovima.

Uspoređujući utjecaj volumnih udjela etanola i acetona na prinos fenola vidljivo je da pri volumnom udjelu od 25 % najbolje rezultate daje etanol i to pri vremenima ekstrakcije od 3 do 11 min. Budući da se pri volumnom udjelu acetona i etanola od 50 % i ekstrakcijskom vremenu od 22 min postižu najveći prinosi fenola, ova kombinacija otapala i vremena mogla bi se koristiti i u daljnjim postupcima obrade kore mandarine pomoću mikrovalova. Visoki udjeli fenola se dobivaju i upotrebom 70 %-tnog acetona i etanola, s tim da su nešto veće vrijednosti izmjerene kod acetonskog (91,22 mg/g) u odnosu na etanolni ekstrakt (71,52 mg/g, kod vremena od 22 min (Tablica 3).



Slika 9. Maseni udjeli ukupnih fenola (UF) u acetonskim ekstraktima kore mandarinedobiveni nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

U istraživanju koje su proveli Karsheva i sur. (2013) ispitan je utjecaj volumnog udjela etanola (20, 50 i 70 %) na prinos ukupnih fenola iz kore mandarine, nakon provedbe ekstrakcije pomoću mikrovalova. Najmanje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola pronađene su kod 20 %-tnog etanola, što je u skladu i s rezultatima vidljivim u ovom radu. Karasheva i sur. (2013) navode da 50 i 70 %-tne vodene otopine etanola daju bolje prinose fenola, što također potvrđuje i ovo istraživanje.

Hayat i sur. (2010) su pokazali da je najveći prinos fenola iz kore mandarine nakon mikrovalne ekstrakcije u 80 %-tnom metanolu postignut pri vremenu od 5 min, što nije slučaj i ovog istraživanja, u kojem su najveći prinosi postignuti sa gotovo pet puta duljim vremenom ekstrakcije. Dakle, može se zaključiti da odabir otapala, ali i temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija značajno utječu na konačan prinos fenola.

4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine

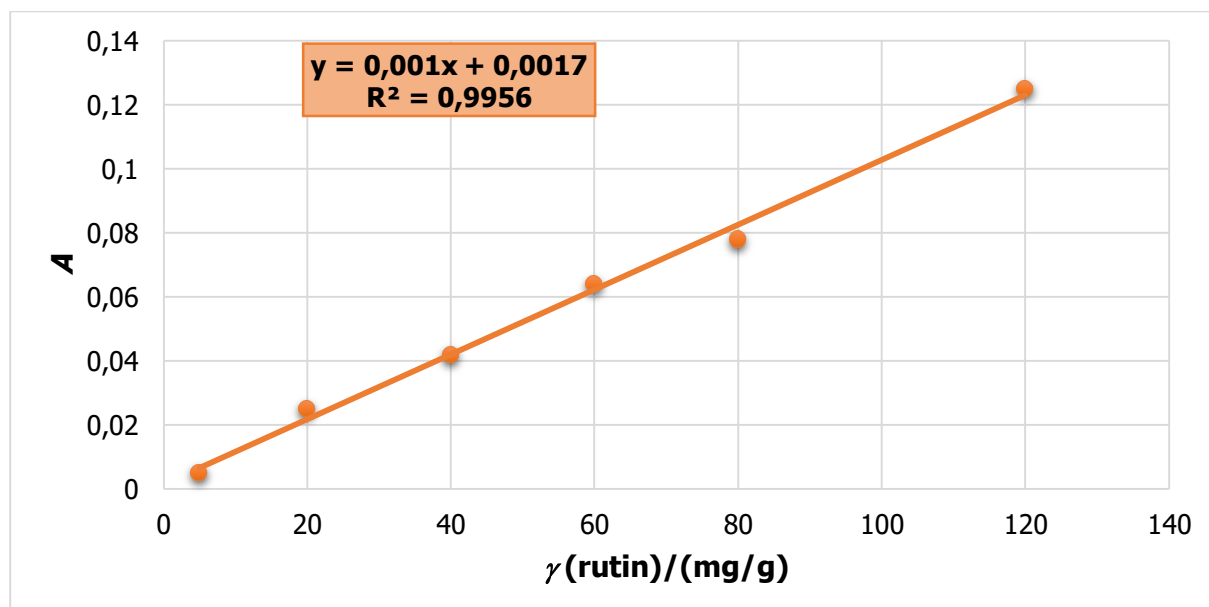
Postupak određivanja ukupnih flavonoida opisan je u poglavlju 3.4.3., a u Tablici 4 su prikazane srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina rutina izmjerene UV/Vis spektrofotometrom. Na temelju baždarnog dijagrama koji prikazuje ovisnost apsorbancija o masenoj koncentraciji pojedinačnih standardnih otopina rutina (Tablica 4) i pripadajućeg

regresijskog pravca (Slika 10) određene su masene koncentracije ukupnih flavonoida u 25, 50 i 70 %-tnim etanolnim i acetonskim ekstraktima kore mandarine. Dobivene vrijednosti su izražene kao mg rutina po g ekstrahirane kore mandarine, dakle kao maseni udio (w).

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina s pripadajućim vrijednostima apsorbancija izmjerenih pri valnoj duljini od 510 nm.

$\gamma(\text{rutin}) / (\text{mg/L})$	$A \pm \text{SD}$
5	0,005 \pm 0,000
20	0,025 \pm 0,001
40	0,042 \pm 0,000
60	0,064 \pm 0,000
80	0,078 \pm 0,001
120	0,125 \pm 0,001

$N = 3$, SD = standardna devijacija



Slika 10. Baždarni dijagram ovisnosti masene koncentracije rutina o vrijednosti apsorbancije.

U Tablici 5 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u 25, 50 i 70 %-tnim ekstraktima kore mandarine nakom provedbe mikrovalovima

potpomognute ekstrakcije u vremenu od 3, 7, 11 i 22 min, pri konstantnoj temperaturi od 80 °C.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri temperaturi od 80 °C.

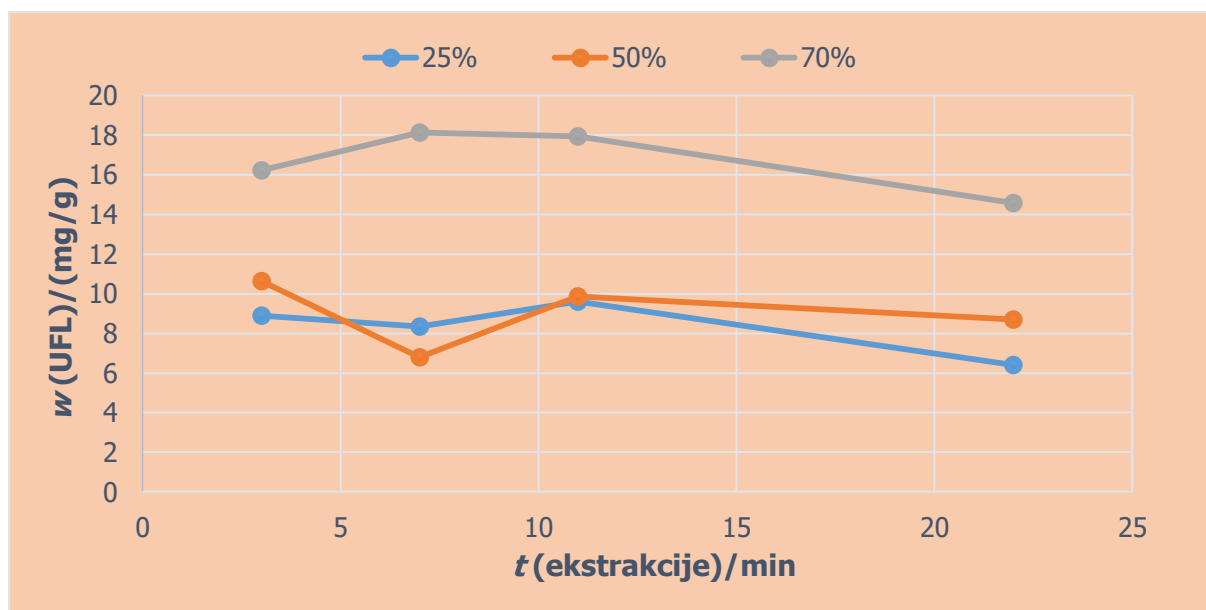
Oznaka	Parametri ekstrakcije		A±SD	w (UFL)/(mg/g)±SD
	φ (etanol)/%	t/min		
1 KŠ	25	3	0,048±0,001	8,90±0,09
2 KŠ		7	0,045±0,001	8,33±0,05
3 KŠ		11	0,052±0,000	9,59±0,00
4 KŠ		22	0,035±0,009	6,40±0,10
5 KŠ	50	3	0,057±0,000	10,63±0,00
6 KŠ		7	0,037±0,001	6,79±0,05
7 KŠ		11	0,053±0,000	9,87±0,00
8 KŠ		22	0,047±0,000	8,71±0,00
9 KŠ	70	3	0,086±0,002	16,21±0,05
10 KŠ		7	0,096±0,000	18,13±0,00
11 KŠ		11	0,095±0,002	17,94±0,25
12 KŠ		22	0,078±0,001	14,56±0,18
	φ (aceton)/%	t/min		
13 KŠ	25	3	0,048±0,000	8,90±0,00
14 KŠ		7	0,035±0,001	6,40±0,26
15 KŠ		11	0,034±0,000	6,21±0,00
16 KŠ		22	0,023±0,001	4,13±0,12
17 KŠ	50	3	0,057±0,000	10,55±0,00
18 KŠ		7	0,042±0,001	7,81±0,05
19 KŠ		11	0,064±0,002	12,07±0,10
20 KŠ		22	0,061±0,001	11,32±0,20
21 KŠ	70	3	0,053±0,000	9,79±0,00
22 KŠ		7	0,058±0,001	10,83±0,14
23 KŠ		11	0,065±0,001	12,17±0,09
24 KŠ		22	0,056±0,000	10,44±0,00

N = 3, SD = standardna devijacija

Dobiveni rezultati pokazuju da se maseni udjeli flavonoida mijenjaju u ovisnosti o vremenu ekstrakcije (Slika 11), što je bio slučaj i kod određivanja fenola. U odnosu na 25 i 50 %-tne etanolne ekstrakte, kod uzoraka tretiranih s 70%-tnim etanolom tijekom 3, 7, 11 i 22 min nađeni su najveći udjeli ukupnih flavonoida. Najbolji rezultat daje 10 KŠ uzorak ekstrahiran pri vremenu od 7 min. Upotrebom 25 %-tnog etanola dobivene su najniže vrijednosti

flavonoida i to pri vremenu od 22 min. S druge pak strane 50 %-tni etanol daje najveći prinos flavonoida tijekom 3 min ekstrakcije (uzorak 5 KŠ), a nakon ovog vremena dolazi do smanjenja njihova udjela.

Na temelju navedenog, može se zaključiti da primjenom većih volumnih udjela etanola moguće je postići veće prinose flavonoida, neovisno o vremenu ekstrakcije.



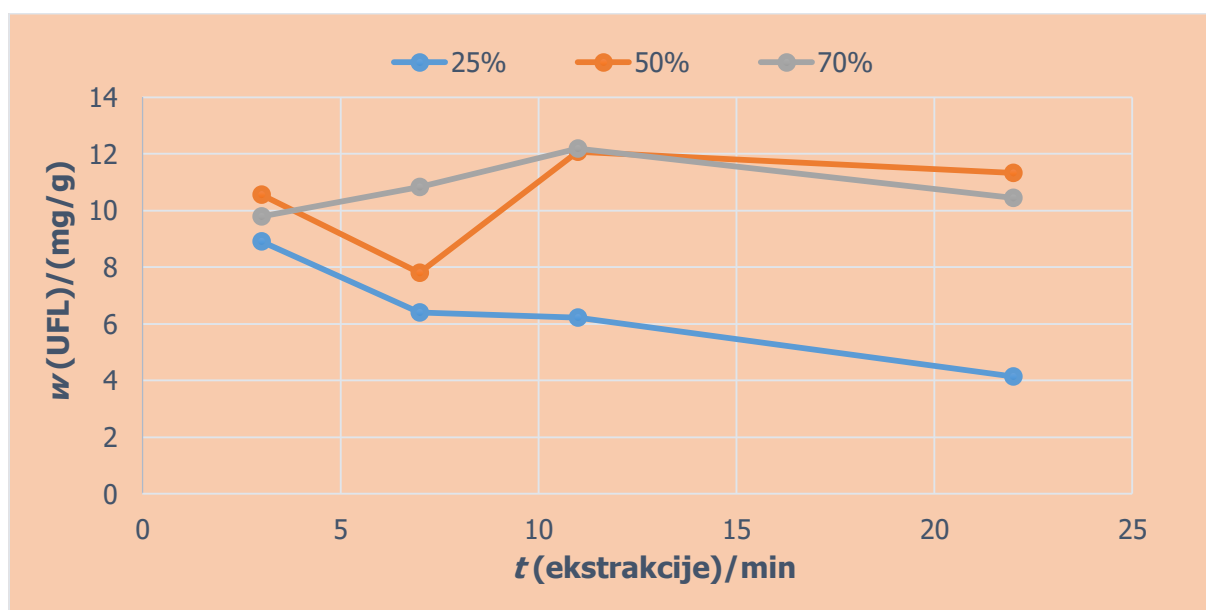
Slika 11. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) u etanolnim ekstraktima kore mandarine dobiveni nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

Usporedbom masenih udjela ukupnih flavonoida sa vrijednostima ukupnih fenola dobivenim za etanolne ekstrakte kore mandarine (poglavlje 4.1.) može se zaključiti da uvjeti koji pogoduju povećanju prinosa ukupnih fenola ne pogoduju i prinosu flavonoida. Točnije, najveći udio ukupnih flavonoida pronađen je u ekstraktima kore mandarine kod najvećeg volumnog udjela etanola (70 %), dok je najveći maseni udio ukupnih fenola uočen kod 50 %-tnog etanola. Kombinirana upotreba vode i organskog otapala može olakšati ekstrakciju spojeva topivih u vodi i/ili organskom otapalu, jer zbog dodane vode otopina se lakše zagrijava, te dolazi do prodora otapala u unutrašnjost stanica i posljedično bolje ekstrakcije (Mandal i sur., 2007). Flavonoidi u svojoj strukturi mogu sadržavati veći broj benzenskih prstenova te su time i manje polarniji spojevi pa su im potrebni veći volumni udjeli otapala za uspješniju ekstrakciju, za razliku od fenola koji sadrže jedan benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više OH-skupina (Manach i sur., 2004).

Tako su kod 25 %-tnih acetonskih ekstrakata kore mandarine (Tablica 5 i Slika 12) zabilježeni najniži maseni udjeli flavonoida u odnosu na druga dva upotrebljena volumna udjela otapala. S druge pak strane, pri vremenu ekstrakcije od 11 min uz volumni udio acetona od 70 % ostvaren je najveći prinos flavonoida. I vrijeme od 11 min uz 50%-tni aceton također pogoduje njihovoj učinkovitoj ekstrakciji, tako da je visoki prinos postignuti kod 19 KŠ uzorka. Nakon 3 min ekstrakcije uočen je pad vrijednosti, odnosno prinosa flavonoida kod 25 i 50 %-tnih volumnih udjela acetona, što znači da s povećanjem vremena ekstrakcije dolazi i do njihove degradacije.

Uspoređujući vrijednosti ukupnih flavonoida sa onima ukupnih fenola (poglavlje 4.1.) može se uočiti da nakon vremena ekstrakcije od 11 min dolazi do povećanja prinosa fenola, te smanjenja udjela flavonoida, pa valja zaključiti da je vrijeme od 11 min optimalno za ekstrakciju fenola, ali ne i flavonoida.

Primjena dužeg vremena ekstrakcije i posljedično smanjenje udjela flavonoida je uočena i u istraživanju koje su proveli Hayat i sur. (2010), gdje je najveći udjel UFL postignut kod vremena ekstrakcije od 10 min. U istraživanju koje su proveli Do i sur. (2014) je pokazano da prinos ekstrakcije značajno ovisi o izboru otapala kao i volumnom udjelu otapala u vodenoj fazi, pa je tako i kod drugih biljnih materijala (*Limnophila aromatica*) najveći prinos flavonoida postignut primjenom čistog etanola i acetona ili njihovih 75 %-tnih vodenih otopina. To potvrđuju i ovaj rad, gdje su primjenom 70 %-tnih vodenih otopina acetona i etanola dobiveni najveći udjeli flavonoida.



Slika 12. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (UFL) u acetonskim ekstraktima kore mandarine dobiveni nakon provedbe ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedbe mikrovalovima potpomognute ekstrakcije fenola i flavonoida iz kore mandarine upotrebom 25, 50 i 70 %-tnih vodenih otopina etanola i acetona uz vrijeme od 3, 7, 11 i 22 min i konstantnu temperaturu od 80 °C mogu se izvući sljedeći zaključci ovog istraživanja.

Upotrebom manjih volumnih udjela dvaju organskih otapala uz duže vrijeme ekstrakcije, dobivaju se i veći prinosi fenola. Tako su najveći maseni udjeli nađeni kod uzoraka ekstrahiranih uporabom 50 %-tnog acetona (96,28 mg/g) i etanola (93,58 mg/g) uz vrijeme od 22 min.

Najveći prinosi flavonoida postignuti su primjenom 70 %-tnog etanola i acetona, i to u vremenu od 7 min za etanolni ekstrakt ($w = 18,13$ mg/g) i 11 min za acetonski ekstrakt ($w = 12,17$ mg/g).

Dakle, dulje vrijeme izlaganja uzoraka ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima utječe na smanjenja prinosa flavonoida, a nakon vremena od 3 minute uz 25 i 50 %-tni etanol i aceton, te 11 min uz 70 %-tni etanol i aceton dolazi i do njihove razgradnje.

U zaključku, 50%-tna vodena otopina acetona i vrijeme od 22 min, te 70 %-tna vodena otopina etanola i vrijeme od 7 min pokazali su se optimalnim parametrima pri izolaciji fenola, odnosno flavonoida i kao takvi mogli bi se koristiti u daljnjim postupcima obrade kore mandarinke, primjenom ove nekonvencionalne, ekološki prihvatljive ekstrakcijske tehnike.

6. LITERATURA

- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering***117**: 426- 436.
- Bakarić P. (1983) Uzgoj mandarine u Nišu, Stanica za južne kulture, Dubrovnik, str. 7 - 41.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology***3**, 32-47.
- Destandau, E., Michel, T., Elfakir, C. (2013) Microwave - assisted Extraction, U: Natural Product Extraction: Principles and Applications, Rostagno M. A., Prado, J.M., ur., The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, str. 113 - 135.
- Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E. , Ismadji S., Ju Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis***22**: 296-302.
- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000) Analytical Scale Microwave Assisted Extraction. *Journal of Chromatography***902**:227-250.
- 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., Hussain S., Abbas S., Farooq U., Ding B., Xia S., Jia C., Zhang X., Xia W. (2009) Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology* **70**: 63 - 70.
- Hayat K., Zhang X., Farooq U., Abbas S., 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.
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables. *Food Chemistry***126**: 1821 - 1835.
- Kaleb M. (2014) Razvoj uzgoja mandarina i ostalih agruma u dolini Neretve. Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva, Metković, str. 219-238

- Karsheva M., Kirova E., Alexandrova S. (2013) Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols: Effects of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy***48**: 35 - 41.
- Kazazić, S. P. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada toksikologiju* **55**: 279 - 290.
- Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **5**: 727 - 47.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews* **1**:7 - 18.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***41**: 1523 - 1542.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity***5**: 270 - 278.
- Pare J. R. J., Belanger J. M. R., Stafford S. S. (1994) Microwave-assisted Process (MAP™)¹: a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry* **13**: 176 - 184.
- Pine S. H. (prijevod I. Bregovec i V. Rapić) (1994) *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb* str. 1062 - 1138.
- Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik G. A. (2018) Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences***232**: 351 - 358.
- Svedstrom U., Vuorela H., Kostianen R., Laakso I., Hiltunen R. (2006) Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* **1112**: 103 - 111.
- Šatalić Z. (2013) 100 (i pokoja više) iz znanosti o prehrani, Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Kačićeva 23, Zagreb, str. 246.
- Šimić F. (1980), *Naše medonosno bilje, Znanje, Zagreb*.

- Wang L., Wang J., Fang L., Zheng Z., Dexian Z., Wang S., Li S., Ho C. T., Zhao H. (2014) Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and other. *BioMed Research International* 2014: 1 - 10.
- Wong L., Weller C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food science and Technology* **17**: 300 – 312

Izjava o izvornosti

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

Katarina Stefanac