

Ekstrakcija polifenola iz šparoga (*Asparagus officinalis*) potpomognuta mikrovalovima

Svetličić, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:703937>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ema Svetličić

6830/BT

**EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ ŠPAROGA (*Asparagus officinalis*)
POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Zelena kemija

Mentor: doc.dr. sc. Marijana Jukić

Zagreb, 2016

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za fizikalnu kemiju i koroziju

EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ ŠPAROGA (*Asparagus officinalis*) POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Ema Svetličić, 6830/BT

Sažetak: U ovom radu je ispitan utjecaj ekstrakcije aktivirane mikrovalovima na sastav i koncentraciju polifenolnih spojeva iz uzorka šparoga različitog geografskog podrijetla. Ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije, vrste otapala te temperature na efikasnost ekstrakcije. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva određena je Folin-Ciocalteu metodom. Provedena je ekstrakcija u 40%, 60% i 80%- tnoj otopini etanola pri temperaturi od 50°C i 65°C te u vremenskom periodu od 10 i 15 min. Najbolji ekstrakcijski kapacitet se postiže primjenom 80% vodene otopine etanola pri 50°C u vremenu od 15 min.

Ključne riječi: šparoga, polifenoli, mikrovalna ekstrakcija, zelena kemija, antioksidansi

Rad sadrži: 22 stranice, 8 slika, 8 tablica, 30 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektronskom (pdf oblik) obliku pohranjen u : knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Marijana Jukić

Rad predan: Rujan 2016

DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department for Physical Chemistry and Corrosion

MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM ASPARGUS (*Asparagus officinalis*)

Ema Svetličić, 6830/BT

Abstract: This study describes the impact of microwave assisted extraction on composition and concentration of polyphenols from asparagus samples originated from different geographical area. The effects of extraction time, solvent and temperature on the extraction efficiency was tested. The concentration of total phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method. Extraction was conducted in a 40%, 60% and 80% aqueous ethanol at a temperature of 50 ° C and 65 ° C and in a time period of 10 and 15 min. Best extraction capacity is achieved by using 80% aqueous ethanol at 50 ° C for 15 min.

Keywords: asparagus, polyphenols, microwave extraction, green chemistry, antioxidants

Thesis contains: 22 pages, 8 figures, 8 tables, 30 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

Mentor: PhD Marijana Jukić

Thesis defended: September 2016

Sadržaj

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2. 1. Polifenoli	2
2. 2. Divlja šparoga	5
2. 3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	6
3. EKPERIMENTALNI DIO.....	8
3. 1. MATERIJAL.....	8
3. 1. 1. Kemikalije.....	8
3. 1. 2. Oprema.....	8
3. 2. Metode rada.....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA :.....	21

1. UVOD

Zanimanje farmaceutske i prehrambene industrije za aktivnim supstancijama iz biljaka u svrhu prevencije i liječenja raznih bolesti koje utječu na ljudsko zdravlje ili kao prirodnog izvora dodataka prehrani sve je veće. Među važne biološki aktivne spojeve koji se proučavaju pripadaju i sekundarni biljni metaboliti a među njima je i velika grupa polifenolnih spojeva. Pokazalo se da njihova uloga nije samo u zaštiti biljke već da sudjeluju i u obrambenim procesima kod oksidativnog stresa u ljudskim i životinjskim stanicama. To je razlog velikog interesa za polifenole i njihovu ekstrakciju iz biljaka,

Izdvajanje polifenola iz biljnog materijala vrši se procesom ekstrakcije. Kako je proces tradicionalne ekstrakcije ekonomski i ekološki neprihvatljiv zbog dugog vremena provođenja ekstrakcije i uporabe velikih količina otapala sve više se rabe nekonvencionalne metode ekstrakcije među koje pripada i ekstrakcija aktivirana mikrovalovima koja pripada u „zelene“ procese. Proces ekstrakcije potpomognut mikrovalovima kao „ zeleni“ proces pokazao je niz prednosti u odnosu na tradicionalnu ekstrakciju poput značajnog ubrzanja procesa, uštede energije i količine otapala, te je na taj način postao ekonomski i ekološki prihvatljiv proces zelene kemije.

Šparoga (*Asparagus officinalis*) je višegodišnja biljka koja sadrži brojne bioaktivne komponente od kojih su najvažniji polifenoli. U ovom radu je opisano dobivanje polifenolih ekstrakta iz šparoge. Cilj istraživanja bio utvrditi utjecaj geografskog položaja (uzorci šparoge iz Rijeke, Solina i Svetog Ivana Zeline), ekstrakcijskog otapala (40%, 60%, 80% etanol), ekstrakcijskog vremena i temperature na ekstrakcijski kapacitet polifenola. Ukupna količina polifenola utvrđena je spektrometrijski metodom s Folin-Ciocalteu reagensom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenoli

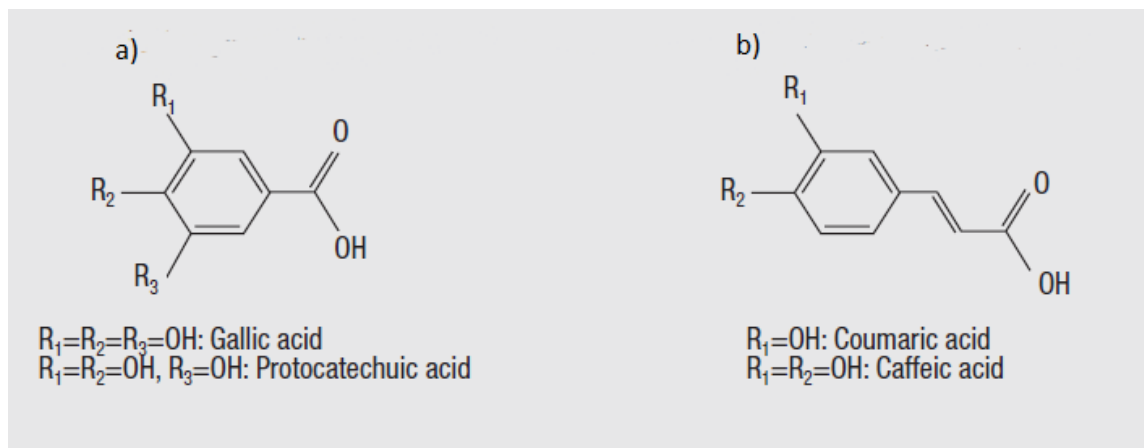
Uloga sekundarnih biljnih metabolita-polifenola u prevenciji od kroničnih bolesti istražuje se već niz godina (Lattanzio, V., i sur. 2008), (Pathak, D., Pathak, K., Singla, A.K. 1991) Pozitivni učinci biljnih polifenola na ljudsko zdravlje su povezani s njihovom *in vitro* antioksidativnom (Burda, S., Olsezek, W. 2001), (Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. 2000) antimutagenom i antimikrobnom aktivnosti (Quideau S. P., i sur. 2011). Također, objavljeni rezultati znanstvenih radova snažno podržavaju preventivno djelovanje biljnih polifenola kod razvoja različitih patoloških stanja: kardiovaskularnih bolesti i raka (Manach, C., Scalbert, A., i sur. 2005), (Havsteen, B., 1983), (Dillard, C.J., Bruce German, J. 2000).

Bogati izvori polifenola su voće, povrće, cjelovite žitarice, čaj, čokolada i vino. Poznato je više od 8000 fenolnih struktura te se oni klasificiraju prema izvoru, biološkom putu i kemijskoj strukturi (Tsao, R., Deng, Z. 2004).

U ovom radu razmotrit će se klasifikacija polifenola prema kemijskoj strukturi:

Fenolne kiseline

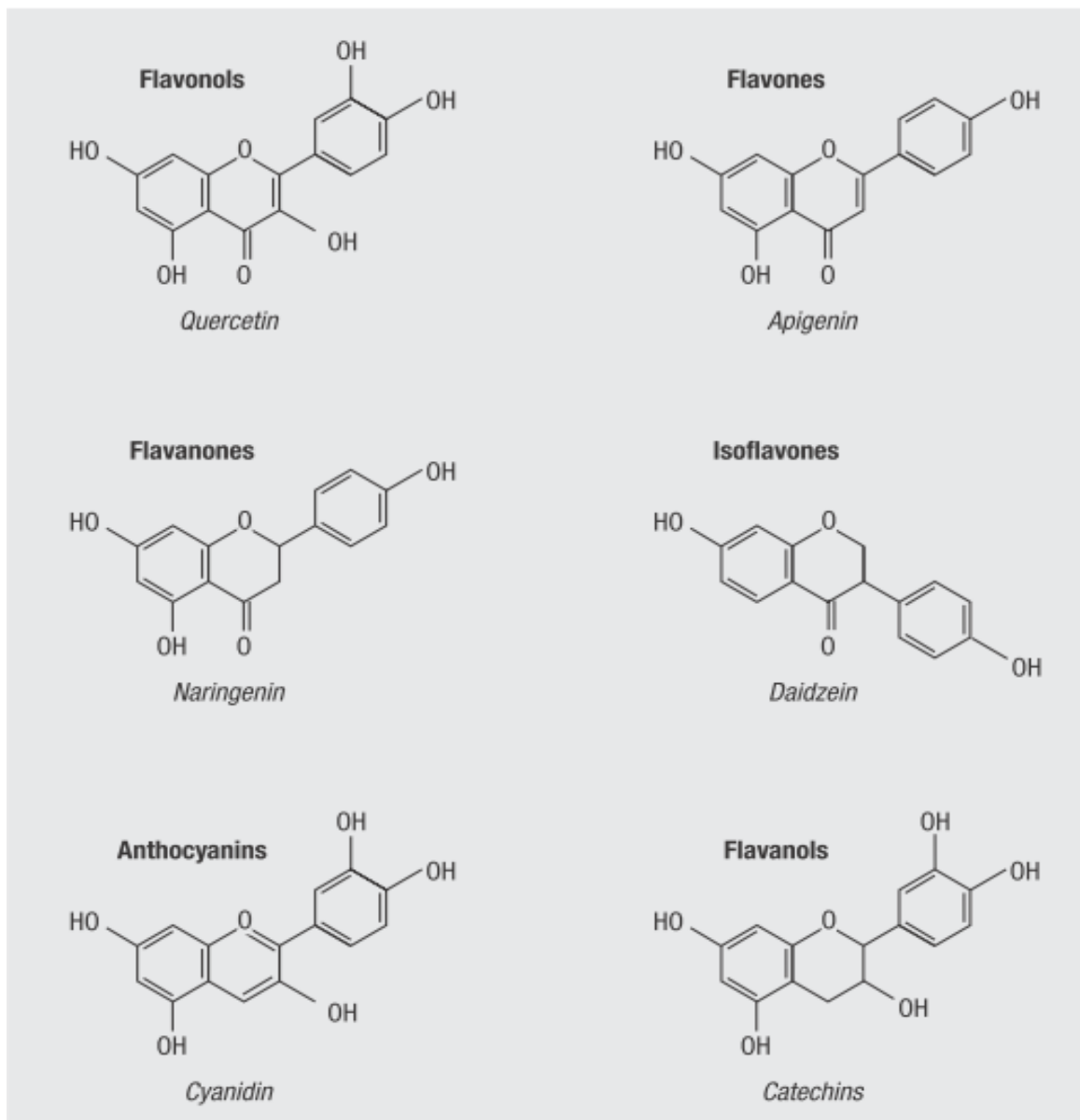
Fenolne kiseline su neflavonoidne komponente koje su podjeljene u dvije grupe: Derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu, protocatehinsku, vanilinsku, siriginsku, p-hidroksibenzojevu kiselinu te se nalaze u maloj koncentraciji u jestivim biljkama. U većoj koncentraciji nalaze se u luku, crvenom voću i radiću. Hidroksicimetine kiseline uključuju p-kumaroilnu kiselinu, 3'-kafeoilnu kiselinu, 4'-kafeoilnu kiselinu, p-kumarinsku, feruličnu, sinapinsku kiselinu koje se rijetko nalaze u slobodnom obliku. Najčešći oblici u kojima hidroksicimetine kiseline dolaze su glikolizirani esteri. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u voću je kafeinska, dok se u žitaricama najčešće nalazi ferulična kiselina (Manach, C., i sur. 2004).



Slika 1. Kemijska struktura a) hidroksibenzojeve i b) hidroksicimetne kiseline (D' Archivio, M. i sur. 2007)

Flavonoidi

Flavonodi imaju C6-C3-C6 osnovnu kemijsku strukturu koju čine dva benzenska prstena povezana lancem od tri ugljikova atoma koji može tvoriti zatvoreni piranski prsten. S obzirom na oksidacijsko stanje središnjeg piranskog prstena flavonodi se dijele na 6 podgrupa: flavonoli, flavoni, flavononi, flavanoli, antocijani i izoflavini. Identificirano je više od 4000 flavonoidnih struktura, njihov broj je i veći zbog primarnog supstituenta-hidroksilne grupe koji se može zamijeniti glukozom, ramnozom, ksilozom, galaktozom ili arabinozom. Flavonoli imaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma s hidroksilnom skupinom na C3 atomu. Glavni izvori flavonola su luk, poriluk, brokula i borovnice. Čaj i crno vino također sadrže značajnu količinu flavonola. Flavoni imaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma. Značajnije količine nalaze se u peršinu i celeru. Flavononi su karakterizirani zasićenim lancem od tri ugljikova atoma i kisikovim atomom na C4 atomu. Uglavnom su glikolizirani disaharidom na C7 atomu. U većoj koncentraciji se nalaze u agrumima, no prisutni i su i u rajčici i nekom aromatičnom bilju kao što je metvica. izoflavini su strukturno slični estrogenu te se mogu vezati na receptore estrogena stoga su klasificirani kao biljni estrogene. Glavni izvor izoflavina je soja. Antocijanini su u vodi topljivi pigmenti odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju većine voća, povrća i cvjetova. Pojavljuju se kao glikolizirani oblici aglikonskog antocijanidina. Flavanoli sadrže zasićenu vezu koja se sastoji od tri ugljikova atoma sa hidroksilnom skupinom na C3 atomu. Za razliku od ostalih flavonoida nisu glikolizirani u hrani, a nalaze se u marelicama, trešnjama, čokoladi i čaju (Manach, C., i sur. 2004).



Slika 2: kemijska struktura glavnih predstavnika flavonoida (D'Archivio, C. i sur. 2007)

Stilbeni

Stilbeni su manja grupa flavonoida koju karakterizira 1,2-difeniletilen okosnica. Većina stilbena koji potječu iz biljaka su derivati trans resveratrola iako su pronađene i druge strukture u biljkama. Resveratrol koji postoji u cis i trans obliku, uglavnom u glikoliziranom obliku, se proizvodi u biljkama kao odgovor na infekciju patogenim organizmima ili stres. Nalazi se u više od 70 biljnih vrsta uključujući grožđe, bobičasto voće i kikiriki. Znanstvena istraživanja su pokazala

učinkovitost resveratrola u prevenciji i usporavanju progresije raznih bolesti kao što su rak i kardiovaskularne bolesti (Chong, J., i sur. 2009).

Lignani

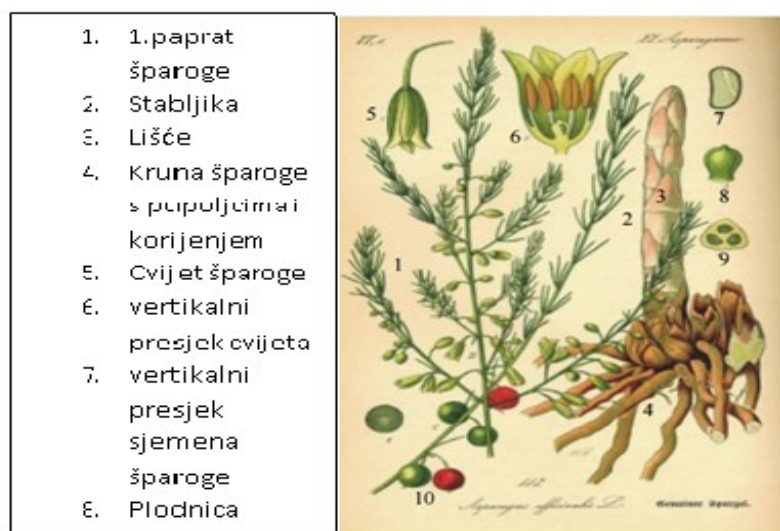
Prekursori lignana su najviše pristuni u lanenim sjemenkama, ali se nalaze i u drugim sjemenkama, nekom voću i povrću. Ti prekursori se pomoću bakterija koje se nalaze u ljudskom probavnom sustavu pretvaraju u enterolignan, enterodiol i enterolakton. Enterolakton i enterodiol mogu oponašati djelovanje estrogena te se zbog toga nazivaju fitoestrogeni (Higdon, J.V, Frei, B. 2003).

2.2. Divlja šparoga

Šparoga (*Asparagus officinalis* L.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice šparogovki (*Asparagaceae*). Nativna je vrsta u Europi, zapadnoj Aziji i sjevernoj Africi, no uzgaja se širom svijeta te je ekonomski važan usjev. Šparoga se smatra vrlo važnom namirnicom jer sadrži veliku količinu bioaktivnih komponenta poput saponina, proteina, vlakana, ugljikohidrata i esencijalnih ulja. Bitna bioaktivna komponenta u kemijskom sastvu šparoge su flavonoidi. Istraživanja su pokazala da je ukupna količina polifenola za 3-6 puta veća kod šparoga koji se razvijaju na svijetlu (Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. 2015). Dokazano je da šparoga ima najveće antioksidativno djelovanje između 43 istraživane biljke (Tsushida, T., i sur. 1994). Antioksidativna aktivnost šparoge linearno se povećava s količinom flavonoida veća je i od one u brokuli (Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. 2015). Prema literaturnim navodima klasičnom ekstrakcijom ukupna količina polifenola u šparogi iznosi 35 mg GAE/ 100 g (Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. 2015). Količina bioaktivnih komponentata u šparogi ovisi o temperaturnim uvjetima rasta biljke, starosti biljke i vremenu berbe (Pedišić, S., i sur. 2010). Na kvalitetu šparoge osim bioaktivnih komponentata utječe i količina sulfata i nitrata. Kemijski sastav biljke uključuje i vitamine A, B1, C, E, minerale Mg, P, Ca, Fe, te aminokiseline aspargin, arginin, tirozin.

Šparoga ima malo kalorija, nisku količinu natrija i sadržava više glutaciona nego ijedna druga biljka. Glutacion je protein koji potpomaže imunološki sustav, smanjuje upale i ima povoljan

učinak na kardiovaskularni sustav. Šparoga je snažan diuretik, potiče staničnu aktivnost u bubrezima te se koristi za liječenje urinarnih problema (El-Azizi, T., Shalaby, W., 2004). Koristi se kao blagi sedativ, a njezino korijenje kao pomoćno sredstvo u liječenju tuberkuloze (Negi, J.S., i sur. 2010). Flavonoidi u šparogi snižuju razinu kolesterola i inhibiraju razvitak raka (Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. 2015).



Slika 3: Morfologija šparoge(Kurt Sanders online library)

2.3. Ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je postupak koji koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s uzorkom, u svrhu izdavanja komponenti uzorka u otapalo (Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. 2000). Mikrovalna energija se koristi za zagrijavanje polarnih otapala u kontaktu s čvrstim uzorcima, smanjujući vrijeme ekstrakcije i potrošnju otapala (Delazar, A., i sur. 2012). Mikrovalovi zagrijavaju molekule dvostrukim mehanizmom dipolne rotacije i ionske kondukcije. Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi smješteni između X-zraka i infracrvenog zračenja sa frekvencijom između 300 MHz i 300 GHz tj valne duljine između 1 mm i 1m. Mikrovalovi se sastoje od međusobno okomitog električnog i magnetskog polja koji osciliraju. Fenomeni ionske kondukcije i dipolne rotacije odgovorni su za zagrijavanje molekule te najčešće

djeluju simultano. Ionska kondukcija jest migracija iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Ako otopina pruža otpor migraciji iona dolazi do trenja te zagrijavanja iste otopine. Dipolna rotacija označava pojavu prestrojavanja dipolnih iona u promjenjivom električnom polju (Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. 2000). Zagrijavanje biljnog materijala pomoću mikrovalova uzrokuje isparavanje vode koja se nalazi unutar biljne stanice. Isparavanje stvara veliki pritisak na straničnu stjenku biljke te dolazi do njenog puknuća i ispuštanja aktivnih sastojaka unutar stanice. Proces mikrovalne ekstrakcije ovisi o svojstvima i volumenu otapala, snazi mikrovalova i temperaturi. (Satyajit, D. i sur. 2010). Mikrovalni ekstraktori sadrže 4 glavne komponente: mikrovalni generator koji služi kao izvor mikrovalova, vodič valova, ekstrakcijska posuda i cirkulator. Koriste se dva tipa mikrovalnih reaktora - otvoreni i zatvoreni sustav. Otvoreni sustavi su sigurniji jer rade pod atmosferskim tlakom i reagensi se mogu dodati u bilo kojem trenutku ekstrakcije. Maksimalnu temperaturu ekstrakcije određuje vrelište otapala. Za ekstrakcije gdje su potrebne visoke temperature i tlakovi koriste se zatvoreni sustavi koji su ujedno i precizniji. Izbor otapala ovisi o interakcijama između analita i otapala, topljivosti analita i sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalove. Na prinos ekstrakcije utječu i ekstrakcijsko vrijeme, snaga mikrovalova i svojstva analita. Povećanjem ekstrakcijskog vremena povisi će se prinos, no može doći do degradacije tremolabilnih komponenti pa proces treba optimizirati. (Jukić, M., i sur. 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

Za istraživanje su korišteni liofilizirani mljeveni uzorci šparoga (*Asparagus officinalis L.*) iz okolice Rijeke, Solina i Sv. Ivana Zeline.

3.1.1. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće

- Destilirana voda
- 40% otopina etanola
- 60% otopina etanola
- 80% otopina etanola
- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina Na₂CO₃

STANDARDI

- Galna kiselina

Priprema standarda galne kiseline: u odmjernu tikvicu od 100 ml se otopi 500 mg galne kiseline u 10 ml 96% etanola, zatim se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3.1.2. Oprema

- Analitička vaga Kern ABT 220-Am
- Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- Mikrovalni reaktor
- Laboratorijsko posuđe

3.2. METODE RADA

- Ekstrakcija polifenola provedena je primjenom mikrovalova (MAE).
- Određivanje ukupnih polifenola provedeno je spektrofotometrijski

Priprema uzorka i ekstrakcija

U eksperimentalnom djelu istraživanja pripremljeno je 36 uzoraka. Korišteni su uzorci šparoge iz okolice Rijeke, Solina i Sv. Ivana Zeline (za svako geografsko područje pripremljeno je po 12 uzoraka). U 500 mg liofilizirane usitnjene šparoge dodalo se 20 ml etanolne otopine. 12 uzoraka tretirano je 40% etanolom (4 uzorka iz Rijeke , 4 iz Solina, 4 iz Sv. Ivana Zeline), 12 uzoraka 60% etanolom i 12 uzoraka s 80% etanolom. Na mikrovalnom reaktoru postavljeni su sljedeći parametri: vrijeme postizanja temperature, vrijeme ekstrakcije i vrijeme hlađenja, temperatura ekstrakcije, snaga miješanja. Uzorci su ekstrahirani pri temperaturi od 50 °C i 65 °C u vremenu ekstrakcije od 10 i 15 min. Nakon ekstrakcije ekstrakti su filtrirani preko naboranog filter papira u odmjerne tikvice od 25 ml i nadopunjeni s odgovarajućim otapalom do oznake.

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola je određen spektrofotometrijski u vodenoj otopini uzorka. Metoda se temelji na bojenoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva te kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet plavog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm.

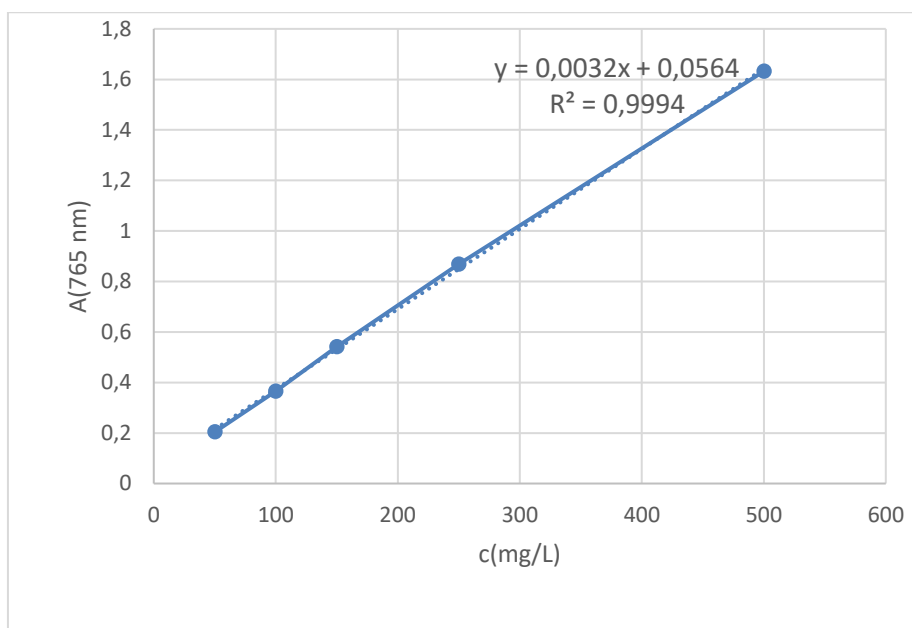
Izrada baždarnog pravca

Iz pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 ml tako da koncentracije galne kiseline iznose : 0,50, 1L00, 150, 250, 500 mg/L. iz svake tikvice se otpipetira 250 μ L uzorka u odmjerne tikvice volumena 25 mL te se određuju ukupni polifenoli.

Baždarni pravac se nacrtava programom Excel tako da se na apscisu nanesu vrijednosti koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu apsorbancija pri 765 nm. Na temelju jednadžbe baždarnog pravca se izračuna koncentracija ukupnih fenola.

Tablica 1: dobivene vrijednosti izmjerenih apsorbancija

c (mg/L)	A (765 nm)
50	0,204
100	0,366
150	0,541
250	0,868
500	1,632



Slika 4: baždarni dijagram galne kiseline

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca $y=0,0032x + 0,0564$ gdje je y-apsorbancija na 765 nm; x-koncentracija galne kiseline (mg/L); R^2 –koeficijent determinacije

Određivanje ukupnih polifenola

U odmjernu tikvicu od 25 ml otpipetira se 250 μ L uzorka, 15 mL deonizirane vode i 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa koji je pomiješan s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije mjerenja. Nakon 3 minute dodaje se 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se tikvice nadopune odgovarajućim otapalom do oznake. Pripremljeni uzorci termostatiraju se u vodenoj kupelji 30 min na 50°C. Na isti način je pripremljena i slijepa proba, no umjesto uzorka koristi se 250 μ L deionizirane vode. Uzorci se ohlade i mjeri im se apsorbncija na valnoj duljini od 7654.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U tablicama od 2 do 7 prikazani su rezultati koncentracije ukupnih polifenola određenih spektrofotometrijski nakon provedene ekstrakcije aktivirane mikrovalovima pri uvjetima prethodno opisanima u eksperimentalnom dijelu rada.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga u ovisnosti o primijenjenom otapalu i trajanju ekstrakcije, pri temperaturama 50 i 65°C i i geografskom porijeklu šparoga (okolica Rijeke -uzorak A, okolica Solina -uzorak B i okolica Sv. Ivana Zeline - uzorak C) dobivenih primjenom MAE prikazani su na slikama 5-7.

Tablica 2: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja apsorbancije koncentracije ukupnih polifenola (uzorak A) šparoga iz okolice Rijeke

uzorak	m (g)	t (min)	T (°C)	c EtOH (%)	apsorbancija
A1	0,504	10	50	40	0,163
A2	0,5	10	50	60	0,106
A3	0,502	10	50	80	0,202
A4	0,5	15	50	40	0,149
A5	0,501	15	50	60	0,166
A6	0,5	15	50	80	0,197
A7	0,502	10	65	40	0,172
A8	0,5	10	65	60	0,242
A9	0,5	10	65	80	0,208
A10	0,5	15	65	40	0,182
A11	0,501	15	65	60	0,259
A12	0,5	15	65	80	0,198

Tablica 3: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Rijeke (uzorak A) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE

uzorak	baždarna krivulja [mg/L]	koncetracija (mg/L)* razrijeđenje	koncetracija (mg/g)	mg/100 g
A1	33,313	166,563	6,610	660,962
A2	15,500	77,500	3,100	310,000
A3	45,500	227,500	9,064	906,375
A4	28,938	144,688	5,788	578,750
A5	34,250	171,250	6,836	683,633
A6	43,938	219,688	8,788	878,750
A7	36,125	180,625	7,196	719,622
A8	58,000	290,000	11,600	1160,000
A9	47,375	236,875	9,475	947,500
A10	39,250	196,250	7,850	785,00
A11	63,313	316,563	12,637	1263,723
A12	44,250	221,250	8,850	885,000

Tablica 4: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja apsorbancije koncentracije ukupnih polifenola (uzorak A) šparoga iz okolice Solina

uzorak	m (g)	t (min)	T (°C)	c EtOH (%)	apsorbancija
B1	0,506	10	50	40	0,265
B2	0,501	10	50	60	0,269
B2	0,503	10	50	80	0,289
B4	0,502	15	50	40	0,243
B5	0,503	15	50	60	0,230
B6	0,503	15	50	80	0,397
B7	0,5	10	65	40	0,207
B8	0,5	10	65	60	0,273
B9	0,5	10	65	80	0,223
B10	0,503	15	65	40	0,190
B11	0,502	15	65	60	0,284
B12	0,503	15	65	80	0,187

Tablica 5: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Solina (uzorak B) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE

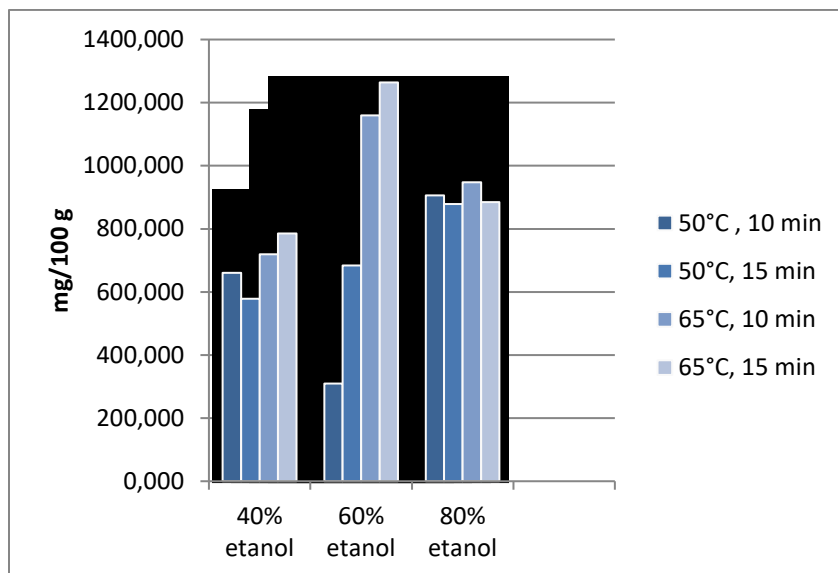
uzorak	baždarna krivulja [mg/l]	koncentracija (mg/L) razrijeđenje *	koncentracija (mg/g)	mg/100 g
B1	65,188	325,938	12,883	1288,291
B2	66,438	332,188	13,261	1326,098
B2	72,688	363,438	14,451	1445,080
B4	58,313	291,563	11,616	1161,604
B5	54,250	271,250	10,785	1078,529
B6	106,438	532,188	21,161	2116,054
B7	47,063	235,313	9,413	941,250
B8	67,688	338,438	13,538	1353,750
B9	52,063	260,313	10,413	1041,250
B10	41,750	208,750	8,300	830,020
B11	71,125	355,625	14,168	1416,833
B12	40,813	204,063	8,114	811,382

Tablica 6: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja apsorbancije koncentracije ukupnih polifenola (uzorak C) šparoge iz okolice Sv. Ivana Zeline

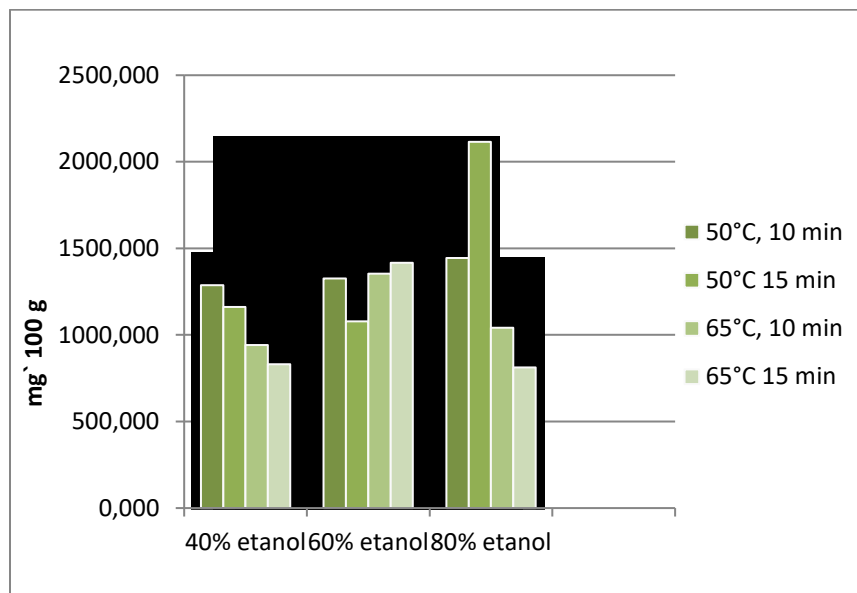
uzrak	m(g)	t (min)	T (°C)	c EtOH(%)	apsorancija
C1	0,500	10	50	40	0,146
C2	0,504	10	50	60	0,123
C3	0,500	10	50	80	0,169
C4	0,502	15	50	40	0,197
C5	0,499	15	50	60	0,147
C6	0,500	15	50	80	0,276
C7	0,502	10	65	40	0,194
C8	0,498	10	65	60	0,241
C9	0,502	10	65	80	0,275
C10	0,500	15	65	40	0,177
C11	0,501	15	65	60	0,204
C12	0,501	15	65	80	0,189

Tablica 7: Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Sv. Ivana Zeline (uzorak C) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE

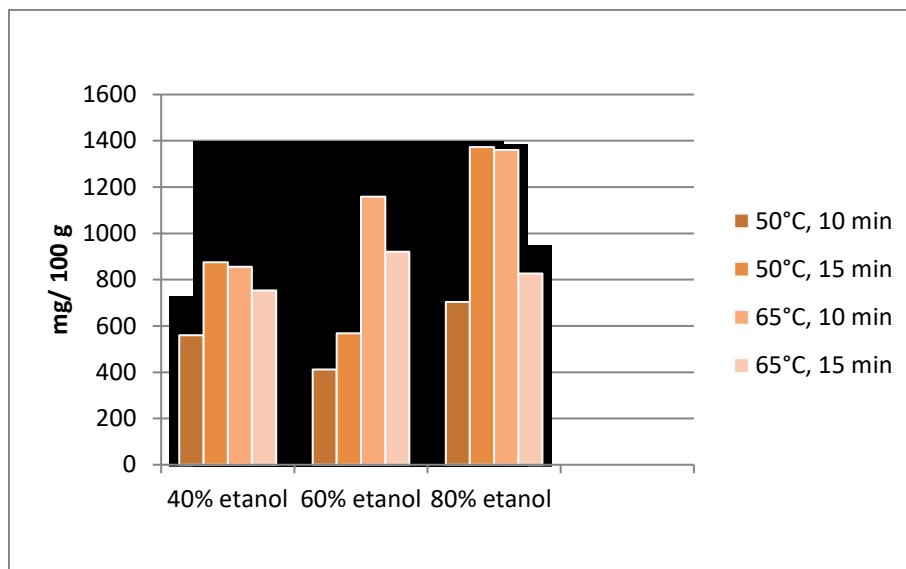
uzorak	baždarna krvulja (mg/l)	koncentracija (mg/L) * razrijeđenje	Koncentracija (mg/g)	mg/100g
C1	28,000	140,000	5,600	560,000
C2	20,813	104,063	4,129	412,946
C3	35,188	175,938	7,038	703,750
C4	43,938	219,688	8,752	875,249
C5	28,313	141,563	5,674	567,385
C6	68,625	343,125	13,725	1372,500
C7	43,000	215,000	8,566	856,574
C8	57,688	288,438	11,584	1158,384
C9	68,313	341,563	13,608	1360,807
C10	37,688	188,438	7,538	753,750
C11	46,125	230,625	9,207	920,659
C12	41,438	207,188	8,271	827,096



Slika 5: grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Rijeke (uzorak A) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE



Slika 6: grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Solina (uzorak B) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE



Slika 7: grafički prikaz rezultata spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Sv. Ivana Zeline (uzorak C) (mg GAE/ 100 g) dobivenih primjenom MAE

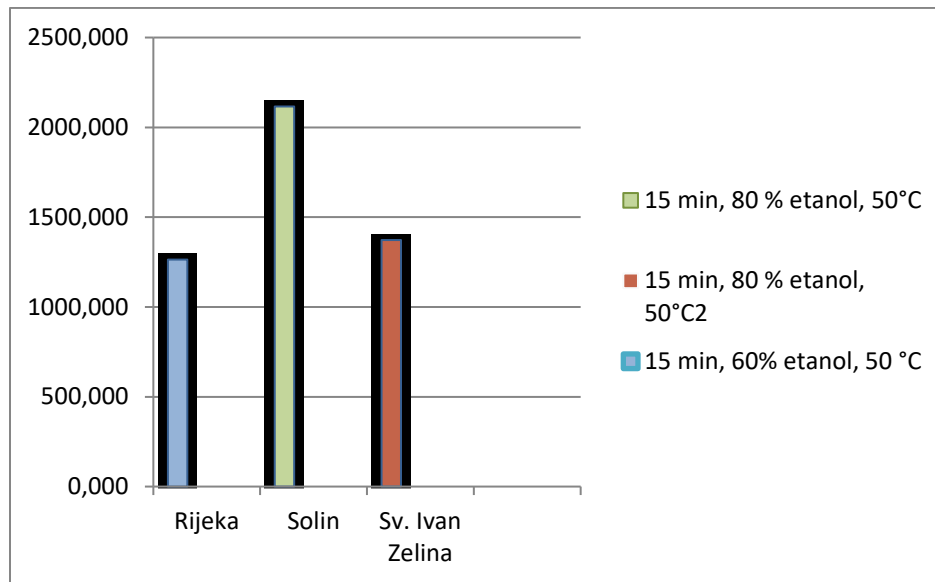
Na osnovi rezultata dobivenih spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoge (*Asparagus officinalis*) iz okolice Rijeke, Solina, Svetog Ivana Zeline dobivenim primjenom ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima vidi se :

- iz uzorka šparoge A (oklica Rijeke) je najviše polifenola koncentracije 1263,722 mg/100 g ekstrahirano pri temperaturi od 65 °C, u vremenu trajanja 15 minuta i u 60% etanolu
- iz uzorka šparoge B (Solina) je ekstrahirano najviše polifenola koncentracije 2116,054 mg/100 g pri temperaturi od 50°C, u vremenu trajanja 15 minuta i u 80% etanolu. Polifenoli su termolabilni spojevi te mjerenjem količine polifenola ekstrahiranih na 65°C nisu postignute tako visoke vrijednosti
- iz uzorka šparoge C (Sv. Ivan Zelina) je najviše polifenola koncentracije 1372,500 mg/100g izolirano pri temperaturi od 50°C, u vremenskom trajanju od 15 minuta i u 80% etanolu

Usporedbom 40%, 60% i 80% otopine etanola pri 50°C vidljivo je da je iz uzorka A u 80% otopini etanola ekstrahirano najviše polifenola koncentracije 906,375 mg/100 g. Iz uzorka B je pri istoj temperaturi ekstrahirano najviše polifenola koncentracije 2116,054 mg/100g u 80% otopini etanola. Iz uzorka C je najveća koncentracija polifenola od 1372,500 mg/100 g u 80% otopini etanola.

Ekstrakcijama potpomognutim mikrovalovima postignute su koncentracije ukupnih polifenola od 400 do 2116,054 mg GAE /100g koje su višestruko veće od koncentracija navedenih u literaturnim navodima (35 mg GAE/ 100 g (Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. 2015). Rezultati literaturnih navoda postignuti su u radu sa uzorcima svježih šparoga dok su se u našem radu rabili liofilizirani uzorci šparoga koji sadrže samo aktivnu suhu tvar pa su velike razlike u koncentraciji polifenola razumljive.

Poznato je da svijetlost potiče sintezu polifenola (Macheix, A. Fleuriet, 1990) što sugerira da biljke s područja koja imaju više sunčanih dana sadrže veću količinu polifenola. Ovo ispitivanje je dokazalo da najveću količinu polifenola sadrže šparoge iz okolice Solina (uzorak B), koje su rasle na vrlo toplom i sunčanom podneblju što je u skladu sa literaturnim navodima da ekološki čimbenici utječu na količinu polifenola u biljci.



Slika 8: grafički prikaz usporedbe rezultata spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima šparoga iz okolice Rijeke, Solina i Sv. Ivana Zeline.

5. ZAKLJUČAK

- Na ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih polifenola primjenom MAE statistički najveći utjecaj ima odabir ekstrakcijskog otapala i temperature pri kojima se provodi MAE.
- Za izolaciju polifenolnih spojeva iz šparoga učinkovitijim su se pokazali binarni sustavi otapala s većim udjelom etanola u ekstrakcijskom otapalu
- Postignut je visoki ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenola uporabom svih ekstrakcijskih otapala već nakon 10 minuta ekstrakcije.
- Najveća koncentracija ukupnih polifenola je ekstrahirana iz uzorka šparoge iz Solina koristeći 80%-tnu otopinu etanola, pri 50° C u vremenu trajanja 15 minuta u iznosu od 2116,054 mg/100 g.
- Ukupno izmjerena količina polifenola ukazuje na visoke antioksidativne vrijednosti šparog
- Rezultati pokazuju da šparoga iz okolice Solina sadrži najveću koncentraciju polifenola u usporedbi s šparogom iz Rijeke i Sv. Ivana Zeline što se može pripisati povoljnijim klimatskim uvjetima
- Ukupno izmjerena količina polifenola ukazuje na visoke antioksidativne vrijednosti šparoge

6. LITERATURA

- Blekic, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3 (1), 32-47.
- Bravo, L. (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, 56, 317-333
- Burda, S., Olsezek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774-2779.
- Chong J., Potaraud A., Huguency P. (2009) :Metabolism and roles of stilbens in plants, *Plant science*,177, 143-155
- D'Archivio ,M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo R., Giovannini, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* ;43(4):348-61.
- El-Azizi, T., Shaloby, W. (2004) Genetical and nutriotional influences on the spear quality of white asparagus(*Aspargu officinalis* l.). *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 265
- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000) Analytical- Scale Microwave Assisted Extraction. *J. Chromatogr.* **902**, 227-250
- Dillard, C.J., Bruce German, J. (2000) Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(12), 1744-1756.

- Higdon, J.V, Frei, B. (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* ;43(1):89-143.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000) Review-Flavonols, flavones and flavanol-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081-1093.
- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141-1148.
- Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Kovač, V., Vorkapić-Furač, J. (2005) Dominantni trendovi «zelene» kemije. *Kem. Ind.* 54, 255-272.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., Treutter, D. (2008) Plant phenolics- secondary metabolites with diverse functions. U: *Recent advances in polyphenols research* (Daayf, F., Lattanzio, V., ured.), Blackwell publishing, Oxford, str. 1-35.
- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012) Microwave assisted extraction of phenolic compounds with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry* 130, 928-936.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Manach, C., Scalbert, A., et al ., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*

- Miller, N.J., Ruiz-Larrea, M.B. (2002) Flavonoids and Other Plant Phenols in the Diet: Their Significance as Antioxidants. *J. Nutr. Envir. Med.* 12, 39-51.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Worlsted, R.E. (2002) Anthocyanins, Phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.
- Negi, J.S., Singh, P, Joshi ,G.P, Rawat ,M.S., Bisht (2010) Chemical constituents of *Asparagus*. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul-Dec; 4(8): 215–220.
- Pathak, D., Pathak, K., Singla, A.K. (1991) Flavonoids as medicinal agents-Recent advances. *Fitoterapia.* 62, 371-389.
- Pedisić, S., Dragović-Uzelac V., Levaj B., Škevin D. (2010) Effect of Maturity and Geographical Region on Anthocyanin Content of Sour Cherries (*PRUNUS CERASUS* var. *MARASCA*). *oi Biofáchnol* 48 (1) 86-93 (2010)
- Quideau, S. P., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. L., Pouységú, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50 (3), 586.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401-436.
- Satyajit, D., Sarker and Lutfun Nahar , Delazar, A. (2012) Natural Products Isolation, *Methods in Molecular Biology*, vol. 864, DOI 10.1007/978-1-61779-624-1_5

- Shahidi, F., Wanasundra, P.K.J.P.D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*32, 67-103.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011) Optimize microwave- assisted extraction of total phenolic from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 282-287.
- Takacs-Hajos, M., Zsombik, L. (2015) Total Polyphenol, Flavonoid and Other Bioactive Materials in Different Asparagus. *Not Bot Horti Agrobo*, 43(1):59-63 .
- Tsao, R., Deng, Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B.* 812, 85-99.
- Tsushida, T., Suzuki M., Kurogi M. (1994). Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds. *J Jap Soc Food Sci Tech* 41(9):611-618.
- Zuolaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L.A., Madariaga, J.M. (1999) Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*. 50, 345-357.