

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima lovora (*Laurus nobilis*)

Marjanović, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:989995>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivona Marjanović

7009/BT

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
ACETONSKIM EKSTRAKTIMA LOVORA (*Laurus nobilis*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

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

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima lovora (*Laurus nobilis*)

Ivona Marjanović, 0058205801

Sažetak: Polifenoli su iznimno važni zbog svog antioksidativnog djelovanja i pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Mogu pokazivati i antikorozijska svojstva, a njihova sposobnost adsorpcije na metale ili metalne legure pripisuje se njihovim strukturnim karakteristikama. U ovom radu su pripremljeni acetonski ekstrakti lišća lovora ($\rho = 30$ i 70 %) primjenom ultrazvučne ekstrakcije pri vremenu od 3, 6 i 9 min i amplitudi od 60, 80 i 100 %. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima određen je spektrofotometrijski. Na temelju dobivenih rezultata mjerenja određeni su optimalni uvjeti (70 %-tni aceton, $A = 100$ % i $t = 9$ min) ultrazvučne ekstrakcije, koji će se koristiti u daljnjim pripravama ekstrakata pri praćenju njihova antikorozijskog djelovanja.

Ključne riječi: antikorozijska i antioksidacijska svojstva, lovor, polifenoli, ultrazvuk

Rad sadrži: 26 stranica, 8 slika, 8 tablica, 19 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Pomoć pri izradi: Darjan Pipić, tehnički suradnik

Datum obrane: 17. srpnja 2017.

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

Spectrophotometric determination of polyphenols from acetone extracts of laurel
(*Laurus nobilis*)

Ivona Marjanović, 0058205801

Abstract: Polyphenols are extremely important because of their antioxidant activity and positive effects on human health. They can show anticorrosion property, and their absorption capability on metals or metal alloys depend on their structural characteristics. In this work, laurel leaves acetone ($\rho = 30$ and 70 %) extracts were prepared by ultrasound extraction at time of 3, 6 and 9 min and amplitude of 60, 80 and 100 %. Mass fraction of total phenols and flavonoids in prepared extracts is determined by spectrophotometric method. With regard to obtained results, optimal conditions (70 % acetone, $A = 100$ % and $t = 9$ min) of ultrasound extraction were determined and will be used for further preparation of extracts for monitoring of its anticorrosion activity.

Keywords: anticorrosion and antioxidant activity, laurel, polyphenols, ultrasound

Thesis contains: 26 pages, 8 figures, 8 tables, 19 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

Technical support and assistance: Darjan Pipić, Technical Associate

Defence date: July 17th, 2017

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Lovor	2
2.2. Polifenoli	2
2.2.1. Fenolne kiseline.....	3
2.2.2. Flavonoidi	3
2.2.3. Polifenoli u lovoru	4
2.2.4. Antioksidativna svojstva polifenola	5
2.3. Metode ekstrakcije	6
2.3.1. Soxhlet ekstrakcija.....	7
2.3.2. Ekstrakcija refluksiranjem.....	7
2.3.3. Maceracija.....	7
2.3.4. Destilacija	8
2.3.5. Ekstrakcija ultrazvukom.....	8
2.3.6. Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem.....	9
2.3.7. Ekstrakcija mikrovalovima.....	10
2.4. UV/Vis spektrofotometrija	10
3. Materijali i metode	11
3.1. Materijal	11
3.2. Kemikalije.....	11
3.3. Aparatura i pribor	11
3.4. Metode rada	12
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lista lovora ultrazvukom.....	12
3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lista lovora refluksiranjem	12
3.4.3. Određivanje boje	13
3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida	13
3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola	13
3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola.....	13
3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida	14
3.4.4.4. Postupak određivanje ukupnih flavonoida.....	15
4. Rezultati i rasprava	16
4.1. Određivanje boje.....	16
4.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida	17
5. Zaključak	24
6. Popis literature	25

1. Uvod

Polifenoli su široko rasprostranjeni spojevi koje nalazimo u mnogim začinskim biljkama, voću i povrću. Poznati su po svojim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje kao npr. usporavanje starenja, zaštita kardiovaskularnog sustava, zaštita kože od djelovanja UV zraka i dr. Njihovo antioksidativno djelovanje je od velike važnosti jer je otkriveno da sintetički antioksidansi koji su se dosad koristili mogu imati štetno djelovanje na organizam.

Pored navedenih karakteristika, polifenoli mogu pokazivati i antikorozijska svojstva (Vrsalović i sur., 2019; Deng i Li, 2012; Bouammali i sur., 2013; Fouda i sur., 2014; Okafor i Apebende, 2014). U posljednje vrijeme se sve više istražuju biljni materijali kao prirodni, jeftini i lako dostupni potencijalni inhibitori korozije metala i metalnih legura, koji bi zamijenili toksične, kemijski sintetizirane inhibitore.

Budući da je vrlo mali broj znanstvenih radova (Gülşen, 2012; Halambeki sur., 2014) pokazao antikorozijsku aktivnost ekstrakata lovora na inhibiranje korozije metala ili metalnih legura, cilj ovog rada bio je pripremiti acetonske ekstrakte ($\rho = 30$ i 70 %) lovora, koji će se koristiti u daljnjim istraživanjima praćenja inhibicije korozije metala i metalnih legura u sastavu ambalažnog materijala za prehrambene namjene.

Budući da je apsorpcija polifenolnih biljnih ekstrakata na metale i metalne legure povezana s njihovim strukturnim, a time i antioksidacijskim karakteristikama, u ovom radu su opisane strukturne značajke polifenola s glavnim podskupinama, flavonoidima i fenolnim kiselinama. Također, detaljno je opisan i mehanizam antioksidativnog djelovanja kao i karakteristike koje doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Obzirom da je cilj eksperimentalnog dijela rada bio priprema acetonskih ekstrakata lovora primjenom ultrazvuka, govorit ćemo o ekstrakciji ultrazvukom, ali i drugim nekonvencionalnim, kao i konvencionalnim metodama ekstrakcije.


Provedeno istraživanje sastojalo se iz:

- pripreme acetonskih ekstrakata lovora primjenom ultrazvuka kao nekonvencionalne metode ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 min uz amplitudu od 60, 80 i 100 %).
- pripreme acetonskih ekstrakata lovora primjenom refluksiranja kao konvencionalne metode ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije od 1,5 i 3 h).
- određivanja ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim ekstraktima lovora upotrebom spektrofotometrije u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja (UV/Vis spektrofotometrija).
- odabira optimalnih uvjeta ekstrakcije koji će se koristiti tijekom daljnje pripreme ekstrakata i njihova ispitivanja kao prirodnih antikorozijskih sredstava.

2. Teorijski dio

2.1. Lovor

Lovor (lat. *Laurus nobilis*) je autohtona vrsta mediteranskog područja, gdje se proširio iz zapadne Azije. Jedina je biljka iz porodice Lauraceae prisutna u Europi. Lovor je aromatična biljka koja raste u obliku zimzelenog stabla ili grma s tamnozelenim, kožastim listovima. Ima neugledne dvodomne cvjetove svijetle zeleno-žute boje. Njegov plod, često nazivan bobica, modrocрна je koštunica koja sadrži jednu sjemenku. Listovi se beru kada su posve razvijeni, a suše se na zraku, u sjeni. Plodovi se beru kada su posve zreli. Plod sadrži eterična i masna ulja koja se dobivaju tiještenjem i ekstrakcijom vodom. Listovi sadrže eterična ulja, gorke tvari i tanine (Patrakar i sur., 2012). Lovor se koristi u kulinarstvu, ali i u ljekovite svrhe jer ima antiseptično djelovanje, poboljšava probavu, pomaže kod bronhitisa, migrene, glavobolje, regulira krvni tlak itd. Eterično ulje koristi se u kozmetičkoj industriji za kreme, sapune i parfeme (Kaurinovic i sur., 2010).



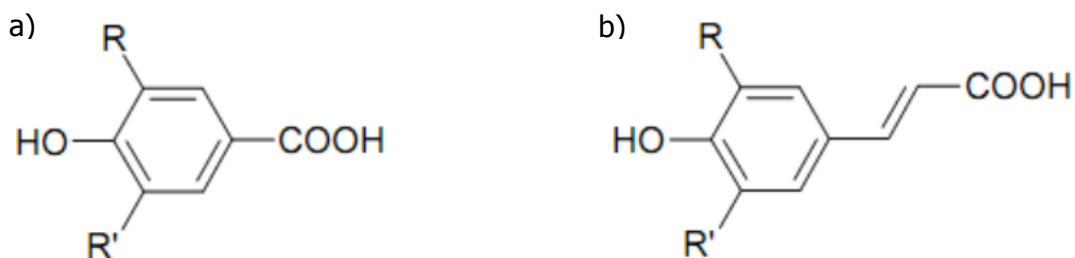
Carstvo: Plantae
Razred: Magnoliopsida
Red: Laurales
Porodica: Lauraceae
Rod: *Laurus*
Vrsta: *Laurus nobilis*

2.2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti koji su u velikim količinama prisutni u biljkama. Prefiks poli- označava da su građeni od više fenolnih podjedinica, iako mogu varirati od jednostavnih fenolnih spojeva do visoko polimeriziranih. Većina prirodno prisutnih polifenola dolazi u konjugiranom obliku s monosaharidima i polisaharidima, a mogu biti i u obliku estera. Oni biljkama daju boju (prvenstveno plodovima i cvjetovima), doprinose okusu i aromi, štite biljku od UV zračenja, oksidativnog stresa, patogena i teških klimatskih uvjeta. U ljudskom organizmu smanjuju upale, štite kardiovaskularni sustav, štite kožu od UV zračenja, sprječavaju djelovanje slobodnih radikala te tako usporavaju starenje, potiču zdravlje mozga, normalan krvni tlak i normalnu razinu šećera u krvi. Biljke bogate polifenolima su: začinske biljke (npr. cimet, šafran, đumbir, kadulja, menta, origano), povrće (npr. artičoka, crveni luk, cikorija, špinat, brokula) i voće (npr. jabuka, naranča, šljiva, višnja, jagoda) (Brglez Mojzer i sur., 2016). Fenolne kiseline i flavonoidi su najčešće skupine polifenola, a uz njih postoje još i tanini, kumarini i stilbeni.

2.2.1. Fenolne kiseline

Ovu skupinu čine aromatične kiseline koje su građene od fenolnog prstena i funkcionalne karboksilne skupine. Dvije vrste prirodnih fenolnih kiselina su hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016) čije strukturne formule su prikazane na Slici 1.



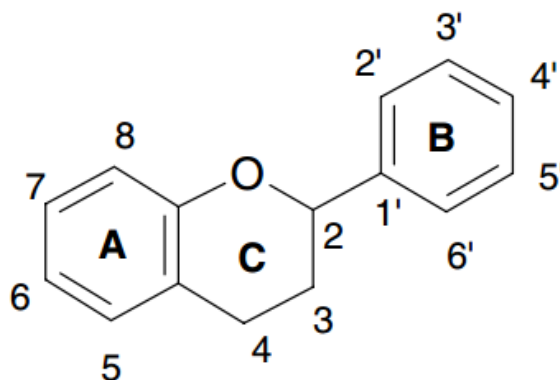
Slika 1. Opća strukturna formula hidroksibenzojevih (a) i hidroksicimetnih (b) kiselina (Brglez Mojzer i *sur.*, 2016).

Hidroksibenzojeve kiseline u prirodi mogu biti prisutne u slobodnom obliku ili konjugirane šećerima i organskim kiselinama, dok su hidroksicimetne prisutne uglavnom u konjugiranom obliku ili kao esteri. U skupinu hidroksibenzojevih kiselina spadaju npr. galna, vanilinska i siringinska kiselina. Najpoznatiji ester hidroksicimetne kiseline je klorogenska kiselina, a još neke kiseline iz ove skupine su: kafeinska, sinapinska i *p*-kumarinska.

Mogu se koristiti kao konzervansi, antiinflamatorni agensi i antioksidansi. Droge koje ih sadrže često su se koristile kao holeretici i holagozi u liječnju bolesti jetre, a danas se značajno koriste kao hepatoprotektivni lijekovi.

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću grupu prirodnih fenola. Oni sadrže difenilpropanski kostur koji je građen od dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) te su male molekulske mase. Njihova opća strukturna formula (Balasundram i *sur.*, 2006) prikazana je na Slici 2. U prirodnim izvorima su najčešće prisutni vezani na šećere (npr. glukoza, galaktoza, ksiloza, ramnoza itd.) tvoreći β -glikozide.



Slika 2. Opća strukturna formula flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

Međusobno se razlikuju prema stupnju oksidacije piranskog prstena, stupnju nezasićenosti te broju i položaju -OH skupina. Vezanje različitih supstituenata na piranski prsten rezultira podjelom flavonoida na flavone, izoflavone, flavonole, flavanone, flavan-3-ole, antocijane, procijanidine i flavan-3,4-diole. Flavoni i flavonoli su najrašireniji u prirodi i imaju najveću strukturnu raznolikost. Supstitucije na prstene A i B rezultiraju podjelom tih osnovnih skupina flavonoida na različite spojeve. Reakcije supstitucije uključuju oksigenaciju, alkilaciju, glikozilaciju, acilaciju i sulfataciju (Balasundram i sur., 2006). Flavonoidi djeluju na krvožilni sustav tako da smanjuju permeabilnost i rahlost stjenki krvnih žila, a povećavaju elastičnost i tonus. Također, djeluju kao diuretici, antiinflamatorici, spazmolitici, atialergeni, antioksidansi i citostatici. Flavonoidi se uglavnom nalaze u vanjskom dijelu biljke.

2.2.3. Polifenoli u lovoru

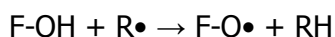
Eterično ulje lovora sadrži visok udio monoterpena (~60 %) te relativno malo seskviterpena i estera (~10 %). Najzastupljeniji sastojak eteričnog ulja je 1,8-cineol koji se često naziva eukaliptol. Osim njega, najčešće su prisutni i terpinil acetat, metil eugenol i drugi α - i β -pineni, felandren, linalol, geraniol, terpineol, karvakrol, sabinen i laurinska kiselina. Neki od njih pokazuju antimikrobnu aktivnost: 1,8-cineol prema bakteriji *Staphylococcus aureus*, linalol prema bakterijama kao npr. *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes*, karvakrol prema Gram-negativnim bakterijama te sabinen i metil eugenol. Ovi spojevi antimikrobnu aktivnost mogu zahvaliti svojoj sposobnosti da permeabiliziraju staničnu membranu mikroorganizama tako što uzrokuju kolaps protonske pumpe te razaraju polisaharide, masti i fosfolipide. Osim antimikrobne aktivnosti 1,8-cineol, linalol i karvakrol odlikuju se i antioksidativnom aktivnošću (Ramos i sur., 2012).

Eterična ulja lovora mogu imati različite sastojke, ovisno o genetičkim svojstvima, klimi, geografskim i drugim čimbenicima.

2.2.4. Antioksidativna svojstva polifenola

Oksidacija je uzrokovana djelovanjem slobodnih radikala i kisika. Posljedice oksidacije su: oštećenje biomolekula, starenje, rak, pospješivanje ateroskleroze, poticanje peroksidacije lipida u hrani što smanjuje nutritivnu vrijednost i kvalitetu hrane. U prošlosti su se industrije, posebice prehrambena, oslanjale na sintetičke antioksidanse kao što su butil hidroksi anisol, butil hidroksi toluen, *tert*-butil hidrokinon. Međutim, novija istraživanja su utvrdila da se oni nakupljaju u tijelu te obzirom da su toksični, mogu imati negativne učinke na organizam (Muñiz-Márquez i *sur.*, 2014). Zbog toga se sve više istražuje antioksidativno djelovanje prirodnih spojeva, na prvom mjestu polifenola.

Oksidacijski stres je narušavanje ravnoteže u organizmu. Naime, tijekom normalnih fizioloških procesa u tijelu nastaju reaktivne kisikove čestice (npr. superoksid radikal, vodikov peroksid i hidroksil radikal) (Conforti i *sur.*, 2006) koje su bitne za opskrbu energijom, detoksikaciju, kemijsku signalizaciju i imunološke funkcije. U organizmu postoje enzimi (npr. superoksid-dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza i dr.) i ne-enzimske antioksidacijske rezerve koje sprječavaju njihove potencijalne štetne učinke te se tako održava ravnoteža. Međutim, u slučaju stresa, fizičkog oštećenja, smanjenja imuniteta, virusnih infekcija ili pak djelovanja karcinogenih ili citotoksičnih spojeva, dolazi do pretjerane proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica, što može rezultirati oksidacijskim oštećenjem molekula proteina, lipida ili DNA. U tom slučaju su važni spojevi koji imaju antioksidacijsku aktivnost (Ishtiaque i *sur.*, 2015). Antioksidansi imaju sposobnost keliranja metalnih kationa te gašenja radikala doniranjem atoma vodika ili elektrona, uz nastajanje manje reaktivnog fenoksil - radikala.



Glavna odrednica polifenolske sposobnosti keliranja metalnih kationa i gašenja radikala je njihova struktura.

Utjecaj strukturnih karakteristika na antioksidacijsku aktivnost kod fenolnih kiselina (Balasundram i *sur.*, 2006):

- ❖ Broj i položaj hidroksilnih skupina u odnosu na funkcionalnu karboksilnu skupinu utječe na antioksidacijsku aktivnost
- ❖ Monohidroksibenzojeve kiseline s hidroksilnom skupinom na *ortho*- ili *para*- položaju u odnosu na karboksilnu skupinu ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost, dok u slučaju *meta*- položaja pokazuju
- ❖ Antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina povećava se s povećanjem stupnja hidroksilacije, kao npr. u slučaju trihidroksilirane galne kiseline koja pokazuje visoku antioksidacijsku aktivnost

- ❖ Supstitucija hidroksilnih grupa na 3- i 5- položaju s metoksilnim skupinama, kao u siringinskoj kiselini, smanjuje aktivnost
- ❖ Hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline što može biti povezano s $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ skupinom, koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i stabilizaciju radikala nego -COOH skupina u hidroksibenzojevim kiselinama

Utjecaj strukturnih karakteristika na antioksidacijsku aktivnost kod flavonoida (Balasundram i *sur.*, 2006):

- ❖ Stupanj hidroksilacije i položaj -OH skupina u prstenu B utječu na antioksidativnu aktivnost
- ❖ Dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma, zajedno s 4-okso-skupinom u prstenu C povećava sposobnost gašenja radikala
- ❖ Dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma, u kombinaciji s 3-OH skupinom u prstenu C također povećava sposobnost gašenja radikala. Supstitucija 3-OH skupine dovodi do povećanja torzije kuta i gubitka koplanarnosti, što dovodi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti
- ❖ Supstitucija hidroksilnih skupina u prstenu B s metoksi-skupinama mijenja redoks potencijal što utječe na sposobnost gašenja radikala
- ❖ Glikozilacija flavonoida i stupanj polimerizacije također utječu na antioksidativnu aktivnost

Antioksidativni kapacitet biljnih ekstrakata ovisi o sastavu ekstrakta i o uvjetima metoda koje se provode za određivanje kapaciteta. Metode koje se koriste mogu se podijeliti u 2 skupine: test baziran na prijenosu atoma vodika (engl. hydrogen atom transfer - HAT) i test baziran na prijenosu elektrona (engl. electron transfer - ET). Testovi bazirani na prijenosu atoma vodika primjenjuju sustav kompetitivne reakcije u kojoj se antioksidans i supstrat natječu za peroksil radikale. Testovi bazirani na prijenosu elektrona mjere sposobnost antioksidansa da reducira oksidans, pri čemu dolazi do promjene boje. Stupanj promjene boje je u korelaciji s koncentracijom antioksidansa u uzorku (Dudonne i *sur.*, 2009).

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta nije dovoljna samo jedna metoda, nego se mora provesti više testova kako bi se u obzir uzeli različiti oblici djelovanja antioksidansa.

2.3. Metode ekstrakcije

Prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljnog materijala nekoliko faktora može utjecati na uspješnost ekstrakcije, kao što su: vrsta otapala, omjer otapala i uzorka, temperatura i trajanje ekstrakcije te broj ponavljanja ekstrakcije. Podešavanje tih čimbenika ovisi o

svojstvima prisutnih polifenolnih spojeva u biljci, kao i o samom biljnom materijalu. Tako će na primjer različita organska otapala (voda, aceton, etanol i dr.) ekstrahirati različitu količinu polifenolnih spojeva iz istog biljnog materijala. Kako bismo izabrali odgovarajuće otapalo, trebamo uzeti u obzir i utjecaj temperature i vremena trajanja. Suprotno općem utjecaju povećanja temperature i trajanja reakcije na povećanje topljivosti tvari, kod polifenola dolazi do degradacije i odvijanja nepoželjnih reakcija (npr. enzimska oksidacija). Povećanje omjera otapala i uzorka potiče ekstrakciju, ali poželjno je odrediti optimalni odnos kako bi se smanjilo zasićenje otopine polifenolima i utrošak otapala (Khoddami i *sur.*, 2013).

Ekstrakcijske metode možemo podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne. Konvencionalne metode su Soxhlet ekstrakcija, refluksiranje, maceracija i destilacija, dok su nekonvencionalne metode ekstrakcija ultrazvukom, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim fluidima i dr. (Azmir i *sur.*, 2013).

2.3.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija provodi se tako da se mala količina suhog uzorka u celuloznom tuljcu stavi u Soxhlet ekstraktor (naprstak) povezan s tikvicom koja sadrži otapalo. Otapalo se uparava, potom kondenzira i kaplje po uzorku koji se nalazi u naprstku. Kada se naprstak napuni, otapalo s ekstraktom se vraća natrag u tikvicu, a kruti materijal ostaje u naprstku (Azmir i *sur.*, 2013). Tako je omogućeno da se kruti materijal ne miješa s ekstraktom u tikvici i da se ovaj postupak, ukoliko je potrebno, ponovi nekoliko puta.

2.3.2. Ekstrakcija refluksiranjem

Refluksiranje je ekstrakcijska tehnika koja se provodi pri povišenoj temperaturi, a podrazumijeva zagrijavanje materijala s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom. Iako je efikasnost ekstrakcije ovom metodom izrazito velika, njeni osnovni nedostaci su upotreba velikih količina otapala, dugo vrijeme ekstrakcije i mogućnost ekstrahiranja interferenata koje je potrebno dodatno pročistiti. Budući da se ekstrahirani materijal mora odvojiti od otopine s analitom, kod ove ekstrakcijske tehnike potrebno je provesti i operacije filtriranja ili dekantiranja.

2.3.3. Maceracija

Kod ekstrakcije maceracijom, prvo se provodi usitnjavanje biljnog materijala radi povećanja površine. Zatim se usitnjenom materijalu dodaje odgovarajuće otapalo te se takva smjesa

ostavi stajati određeno vrijeme (i do nekoliko dana) na sobnoj temperaturi. Biljni materijal se ocijedi kako bi se odvojila sva tekućina. Tako dobivena tekućina se izbistri dekantiranjem ili filtriranjem. Poboljšanje ekstrakcije se može postići povremenim potresanjem koje utječe na povećanje difuzije i pomiče koncentrirani dio otopine koji je u izravnom kontaktu sa materijalom i omogućava dolazak „novog“ otapala koje će se moći zasititi (Azmir i *sur.*, 2013).

2.3.4. Destilacija

Razlikujemo 3 vrste destilacije: destilacija vodom, destilacija vodenom parom i destilacija parom.

Destilacija vodom provodi se tako da je biljni materijal uronjen u vruću vodu koja se zagrijava unutarnjim grijanjem ili plamenom ispod destilacijskog kotla. Voda i eterično ulje isparavaju te se u hladilu kondenziraju. Nakon kondenzatora slijedi separator koji odvaja eterično ulje od vode. Ova vrsta destilacije nije primjerena za komponente visokog vrelišta.

Kod destilacije vodenom parom biljni materijal nalazi se na perforiranoj podlozi kroz koju prolazi para koja nastaje direktnim zagrijavanjem destilacijskog kotla plamenom. Ovdje je biljni materijal u kontaktu samo sa zasićenom parom, a ne sa vrelom vodom kao kod vodene destilacije što ovaj postupak čini kraćim i povoljnijim.

Destilacija parom se od prethodnog postupka razlikuje po tome što u destilacijskom kotlu nema vode čijim se isparavanjem stvara vodena para, već se para uvodi izvana. Zbog toga nema hidrolize komponenata, a kako nema niti zagrijavanja, ne može doći do termičke degradacije komponenti. Ovaj postupak se ne može primijeniti u slučaju da su komponente topljive u vodi ili osjetljive na visoku temperaturu.

2.3.5. Ekstrakcija ultrazvukom

Ultrazvučni valovi vrsta su zvučnih valova, frekvencija većih od 20 kHz. Dije se na valove visokog i niskog intenziteta. Za ekstrakciju se koriste valovi visokog intenziteta. Oni prolaze kroz medij uzrokujući oscilaciju tlaka, dolazi do izmjene područja visokog i niskog tlaka što dalje uzrokuje fenomen poznat kao kavitacija. Tijekom ciklusa niskog tlaka, u tekućini nastaju mjehurići vakuuma. Kinetička energija prevodi se u toplinsku koja potom zagrijava sadržaj mjehurića koji mogu imati temperaturu oko 5000 K i tlak 1000 atm (Azmir i *sur.*, 2013). Kada mjehurići dosegnu volumen u kojem više ne mogu apsorbirati energiju, tijekom ciklusa visokog tlaka implodiraju. Kavitacija podrazumijeva nastanak, rast i pucanje mjehurića i samo čiste tekućine ili one koje sadrže krute čestice pokazuju efekt kavitacije. Kavitacijski mjehurići koji se rasprsnu blizu uzorka uzrokuju oštećenje stanične stijenke, što

uzrokuje oslobađanje staničnog sadržaja. Mehanizam djelovanja ultrazvuka je pojačanje prijenosa mase i olakšanje pristupa otapala staničnim sastojcima biljke, a omogućuju ga dva fizikalna fenomena: difuzija kroz staničnu stijenku i oslobađanje sadržaja stanice nakon oštećenja stanične stijenke (Rajbhar i *sur.*, 2015).

Odgovarajuće otapalo pomiješa se s biljnim materijalom i izlaže ultrazvuku određeno vrijeme. Efikasnost ekstrakcije ovisi o sadržaju vlage uzorka, stupnju mljevenja, veličini čestica i izboru otapala. Količina dobivenog ekstrakta ovisi o djelovanju ultrazvuka, a ono ovisi o vremenu sonifikacije, temperaturi i otapalu, ali također i o frekvenciji i distribuciji ultrazvučnih valova (Azmir i *sur.*, 2013).

Razlikujemo statičku i dinamičku ekstrakciju fenola iz biljnih materijala primjenom ultrazvuka. Statički sustav se sastoji od zatvorene posude u koju se otapalo ne dovodi kontinuirano, dok se dinamički sustav kontinuirano opskrbljuje svježim otapalom. Tako je omogućen kontinuirani transport ekstrahiranog analitaza posude za ekstrakciju, što sprječava degradaciju termolabilnih spojeva uzrokovanu toplinom koja se razvija djelovanjem ultrazvuka. Dva najčešća načina primjene ultrazvuka su ultrazvučne sonde i kupke. Sonde, koje su korištene za provedbu eksperimentalnog dijela ovog rada, konstantno su u dodiru s uzorkom prilikom provođenja ekstrakcije što onemogućava provođenje većeg broja ekstrakcija istovremeno te doprinosi riziku od kontaminacije i proizvodnje pjene. S druge strane, ultrazvučne kupke se mogu istodobno primjenjivati za provođenje više ekstrakcija.

Prednosti ekstrakcije ultrazvukom u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije uključuju smanjenje vremena ekstrakcije i uporabe otapala te je jedan od najjeftinijih i najjednostavnijih sustava za ekstrakciju (Khoddami i *sur.*, 2013). Nadalje, ultrazvučna energija omogućava učinkovitije miješanje, smanjenje temperature ekstrakcije i toplinskih gradijenata, selektivnu ekstrakciju i smanjenje koraka provedbe ekstrakcije zbog čega se ultrazvuk može kombinirati s raznim konvencionalnim tehnikama ekstrakcije kako bi se poboljšala njihova učinkovitost.

2.3.6. Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem

Princip rada ove tehnike je izlaganje suspenzije stanica električnom potencijalu, koji prolaskom kroz staničnu membranu osigurava razdvajanje molekula prema razlici u naboju. Postupak se provodi tako da se materijal stavi između dvije elektrode. Kada se primijeni kritični potencijal dolazi do odbijanja između nabijenih molekula membrane što rezultira nastajanjem pora i povećanjem permeabilnosti membrane (Azmir i *sur.*, 2013). Efikasnost ove tehnike ovisi o jakosti polja, broju pulseva, materijalu koji se koristi te temperaturi. Pri sobnoj temperaturi, postupak ekstrakcije može se provoditi kontinuirano i traje nekoliko

sekundi (Khoddami i *sur.*, 2013). Zahvaljujući učinku permeabilizacije membrane, pulsirajuće električno polje može se koristiti za poboljšanje ekstrakcije te skraćanje vremena ekstrakcije.

2.3.7. Ekstrakcija mikrovalovima

Mikrovalovi predstavljaju zračenje frekvencija između 300 MHz i 300 GHz. Izlaganjem materijala mikrovalovima, elektromagnetska energija se pretvara u toplinu. Toplina nastaje zbog 2 razloga: 1. opiranje medija ionskoj provodljivosti, 2. kretanje iona u smjeru oscilirajućeg polja koje mijenja svoj smjer zbog čega se ioni često sudaraju. Zagrijavanje dovodi do isparavanja vode u biljnim stanicama. Nastala para uzrokuje bubrenje stanice i njeno pucanje pri čemu se oslobađa stanični sadržaj (Azmir i *sur.*, 2013). Prednosti ovakve ekstrakcije su: smanjenje vremena ekstrakcije, toplinskih gradijenata i količine otapala te povećanje prinosa (Khoddami i *sur.*, 2013).

2.4. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je analitička metoda prikladna za identifikaciju i određivanje kemijskih vrsta (anorganske i organske) koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 200 - 400 nm (UV područje), odnosno od 400 - 800 nm (Vis područje). Mnoge vrste koje ne apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje mogu se određivati nakon kemijske reakcije kojom se prevode u derivate koji apsorbiraju. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka (analita) i njegove koncentracije daje Lambert-Beerov zakon:

$$A = \epsilon bc$$

gdje je A apsorbancija, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent, c množinska koncentracija i b debljina sloja otopine. Iz Lambert-Beerovog zakona je vidljivo da je apsorbancija linearno ovisna o koncentraciji analita što omogućuje jednostavno računanje koncentracije iz izmjerene apsorbancije.

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

3. Materijali i metode

3.1. Materijal

Osušeni list lovora (Slika 3) prikupljen je u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska).



Slika 3. Osušeni list lovora.

3.2. Kemikalije

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

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- Ultrazvuk (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda promjera 22 mm (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1, Massachusetts, USA)

- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Propipeta
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke

3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su sljedeće analitičke tehnike: ekstrakcija, određivanje boje i spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom području (Vis) elektromagnetskog zračenja.

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka lista lovora ultrazvukom

Provedena je ekstrakcija polifenola ultrazvukom visokog intenziteta uzorcima osušenog i usitnjenog lista lovora. 3,000 g samljevenog uzorka ekstrahirana su s 100 mL acetona ($\rho = 30$ i 70 %) ultrazvučnom sondom promjera 22 mm. Primijenjeni procesni parametri pri ekstrakciji ultrazvukom su: izlazna snaga 400 W, frekvencija 30 kHz, ciklus 1, amplituda 60, 80 i 100 %, vrijeme 3, 6 i 9 min.

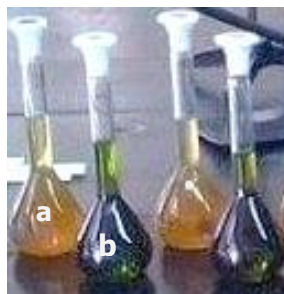
Nakon provedene ekstrakcije uzorci su ručno stiješteni kroz gazu, a potom je ekstrakt dodatno procijeđen kroz cijedilo, filtriran kroz obični filter papir u odmjernu tikvicu od 100 mL, te do oznake nadopunjen otapalom korištenim za ekstrakciju (Slika 4). Tako pripremljeni ekstrakti su do početka analize čuvani u hladnjaku na +4°C.

3.4.2. Ekstrakcija uzoraka lista lovora refluksiranjem

Za ekstrakciju metodom refluksiranja uzorci su priređeni na isti način kao i kod ekstrakcije ultrazvukom (3 g uzorka/100 mL 30 ili 70 %-tnog acetona). Ekstrakcija je trajala 1,5 i 3 h, na povišenoj temperaturi (temperatura vrelišta otapala). Postupak obrade ekstrahiranih uzoraka za daljnja analitička određivanja identičan je postupku opisanom u poglavlju 3.4.1.

3.4.3. Određivanje boje

Boja 30 i 70 %-tnih acetonskih ekstrakata lovora (Slika 4) određena je kolorimetrom po CIE L , a , b sistemu. Metoda se zasniva na kolorimetrijskom, kvantitativnom određivanju vrijednosti svjetline (L), udjela crvene (a) i udjela žute boje (b).



Slika 4. Acetonski ekstrakti lovora dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom refluksiranjem: a) $\rho = 30\%$ i b) $\rho = 70\%$.

3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida

3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens (0,2 M)
U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL 2 M Folin-Ciocalteu reagensa i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.
- Na_2CO_3 (20 %, w/v)
200 g Na_2CO_3 otopljeno je u 800 mL klučale destilirane vode i nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 1000 mL, te je dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Otopina je nakon 24 h profiltrirana.

3.4.4.2. Postupak određivanje ukupnih fenola

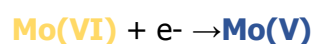
Postupak određivanja ukupnih fenola sastojao se od izrade baždarnog dijagrama i određivanja masenog udjela fenola u ekstraktima lovora.

Za izradu baždarnog dijagrama priređena je ishodna standardna otopina galne kiseline tako da je odvagano 0,5 g galne kiseline i otopljeno u 10 mL acetona nakon čega je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja je potom nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Iz ishodne otopine galne kiseline, pripremljen je niz pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L. Pojedinoj standardnoj otopini izmjerena je apsorbancija nakon što je otpipetiran 1,0 mL pojedine standardne otopine u odmjernu tikvicu od 25 mL, dodano 10 mL destilirane vode i

1,3 mL 0,2 M otopine Folin-Ciocalteu reagensa (žuto obojan). Nakon 5 minuta dodano je 3,75 mL 20 %-tne otopine Na₂CO₃ i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Tako priređene otopine su čuvane 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, a potom im je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm.

Za analizu uzoraka (Slika 5) otopine su pripravljene na isti način kao i za mjerenje apsorbancije standardnih otopina, ali umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,1 mL uzorka. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 ili 0,1 mL).

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenske i fosforwolframove kiseline koje se, pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima, reduciraju u molibdenov oksid i wolframov oksid koji su plavo obojeni, a njihov intenzitet je ovisan o koncentraciji polifenola u ekstraktu.



Slika 5. Uzorci pripremljeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (osobna fotografija).

3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

- NaNO₂ (5 %, w/v)
Odvagano je 5 g NaNO₂ i otopljeno u 100 mL deionizirane vode.
- AlCl₃ (10 %, w/v)
Odvagano je 10 g AlCl₃ i otopljeno u 100 mL deionizirane vode.
- NaOH (1 M)
Odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u 50 mL deionizirane vode.

3.4.4.4. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida također je bilo potrebno izraditi baždarni dijagram. U tu svrhu 0,1 g rutina je otopljen u 20 mL metanola, a zatim je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL, koja je potom nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Ovako priređena ishodna otopina rutina služila je za pripremu 6 individualnih standardnih otopina masenih koncentracija 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L. Za određivanje njihove apsorbancije, otpipetiran je 1,0 mL pojedine standardne otopine, dodano je 2 mL destilirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 i 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 (nakon 5 min). Nakon sljedećih 6 min dodano je 2 mL 1 M otopine NaOH , pri čemu dolazi do stvaranja stabilnih, obojanih aluminij - flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 510 nm.

Za mjerenje apsorbancije uzoraka (Slika 6) otopine su pripravljene na isti način kao i standardi, ali umjesto 1,0 mL standarda otpipetirano je 0,2 mL otopine uzorka u odmjernim tikvicama od 25 mL, koje su nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 i 0,2 mL).



Slika 6. Uzorci pripremljeni za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida (osobna fotografija).

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lovora dobivenim upotrebom dviju ekstrakcijskih metoda: ultrazvučna ekstrakcija i refluksiranje. Ultrazvučna, nekonvencionalna ekstrakcija provedena je u vremenu od 3, 6 i 9 min, pri amplitudi od 60, 80 i 100 %, a ekstrakcija refluksiranjem pri vremenu od 1,5 i 3 h.

4.1. Određivanje boje

Prije određivanja ukupnih fenola i flavonoida, pripremljenim acetonskim ekstraktima lovora određena je boja, odnosno L , a i b parametri, a potom je ΔE vrijednost izračunata korištenjem referentnih uzoraka (L2 i L4) pripremljenih metodom refluksiranja s destiliranom vodom.

Tablica 1. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lovora dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	L^*	a^*	b^*	ΔE
Aceton ($\rho = 30\%$)					
1-IM	3	84,70	2,25	45,69	32,73
2-IM	6	83,77	2,22	45,52	32,45
3-IM	9	80,52	2,96	49,33	27,97
4-IM	3	80,95	3,8	51,66	26,08
5-IM	6	78,91	4,34	54,03	23,35
6-IM	9	77,11	5,05	55,98	20,96
7-IM	3	83,19	3,54	50,24	28,21
8-IM	6	82,97	3,55	50,42	27,98
9-IM	9	80,17	4,06	52,71	24,89
Aceton ($\rho = 70\%$)					
10-IM	3	74,06	-16,35	97,21	46,35
11-IM	6	73,85	-14,81	99,06	46,33
12-IM	9	76,95	-11,18	99,52	44,43
13-IM	3	72,10	-15,75	97,31	45,79
14-IM	6	74,91	-14,72	98,33	45,91
15-IM	9	74,81	-14,42	99,59	46,50
16-IM	3	75,42	-18,5	95,25	47,07
17-IM	6	74,12	-17,23	96,63	46,70
18-IM	9	74,69	-16,64	97,01	46,53

Tablica 2. Parametri boje određeni u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	<i>t</i> (ekstrakcije)/h	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	ΔE
Aceton ($\rho = 30\%$)					
L17	3	76,84	4,31	56,22	21,25
L19	1,5	83,47	1,05	49,95	30,03
Aceton ($\rho = 70\%$)					
L13	3	69,95	-11,96	98,57	43,68
L15	1,5	66,07	-10,79	94,97	40,53
Destilirana voda					
L4	3	69,37	19,85	68,64	0
L2	1,5	75,00	18,43	65,62	6,54

L2 i L4 = referentni uzorci, dobiveni ekstrakcijom s destiliranom vodom u vremenu od 1,5 i 3 h, metodom refluksiranja.

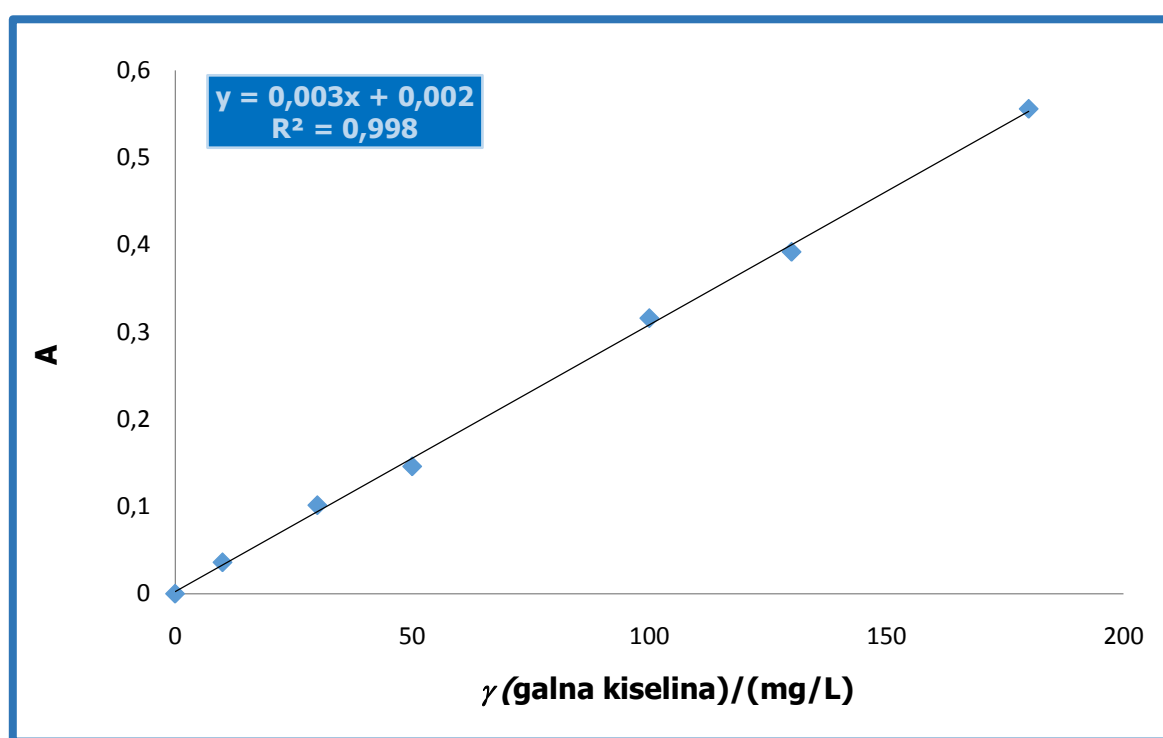
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su ultrazvukom (Tablica 1) pripremljeni 30 %-tni acetonski ekstrakti svjetliji (77,11 - 84,70) u odnosu na 70 %-tne ekstrakte (72,10 - 76,95). Također, i 30 %-tni ekstrakti dobiveni refluksiranjem (Tablica 2) daju vrijednosti (76,84 - 83,47) gotovo identične onima dobivenim ultrazvukom. Najniže vrijednosti (66,07 - 69,95) mogu se uočiti kod 70 %-tnih uzoraka, ekstrahiranih refluksiranjem. Nadalje, jasno se vidi kako su i *a* vrijednosti veće kod 30 %-tnih u odnosu na 70 %-tne ekstrakte. Suprotno njima *b* vrijednosti su veće kod 70 %-tnih ekstrakata (95,25 - 99,52). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako otapalo, odnosno volumni udio otapala u vodenoj fazi može utjecati na parametre boje, a time i na upotrebu pripremljenih ekstrakata u različite svrhe.

4.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima lovora bilo je potrebno izraditi baždarne dijagrame. Tablice 3 i 4 prikazuju vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline, odnosno rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih su izrađeni baždarni dijagrami (Slika 7 i 8). Iz regresijskih pravaca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli UF i UFL izraženi su kao mg galne kiseline, odnosno mg rutina na g ekstrahiranog lišća lovora.

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 760 nm.

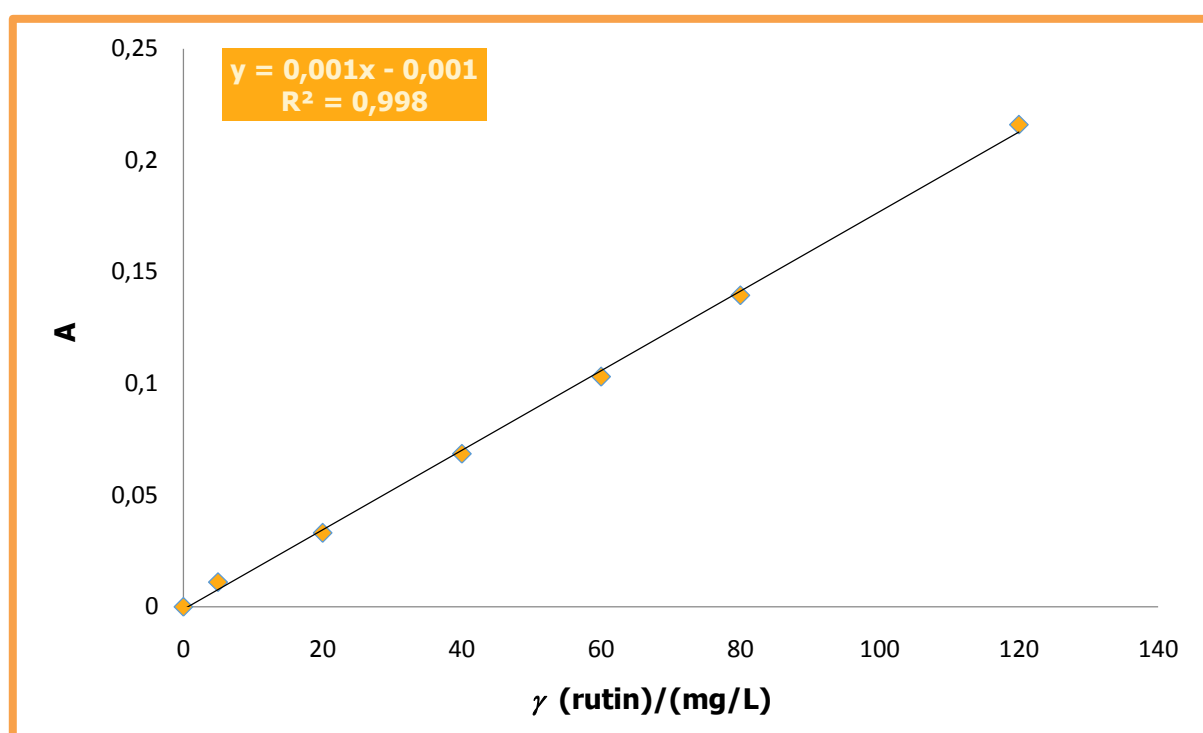
Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	A
0	0	0,000
1	10	0,036
2	30	0,102
3	50	0,146
4	100	0,316
5	130	0,392
6	180	0,556



Slika 7. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{rutin})/(\text{mg/L})$	A
0	0	0,000
1	5	0,011
2	20	0,033
3	40	0,069
4	60	0,103
5	80	0,140
6	120	0,216



Slika 8. Baždarni dijagram rutina.

U Tablici 5 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u acetonskim ($\rho = 30$ i 70 %) ekstraktima usitnjenog lista lovora dobivenim nakon ultrazvučne ekstrakcije u vremenu od 3, 6 i 9 min i amplitudama od 60, 80 i 100 %.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima ($\rho = 30$ i 70 %) lovora dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	A \pm SD	w (mg/g) \pm SD*
Aceton ($\rho = 30$ %)				
1-IM	3	100	0,206 \pm 0,000	566,7 \pm 0,0
2-IM	6		0,207 \pm 0,000	569,4 \pm 0,0
3-IM	9		0,218 \pm 0,001	600,0 \pm 3,9
4-IM	3	80	0,221 \pm 0,001	608,3 \pm 3,9
5-IM	6		0,225 \pm 0,000	619,4 \pm 0,0
6-IM	9		0,237 \pm 0,000	652,8 \pm 0,0
7-IM	3	60	0,216 \pm 0,000	594,4 \pm 0,0
8-IM	6		0,218 \pm 0,000	600,0 \pm 0,0
9-IM	9		0,229 \pm 0,000	630,6 \pm 0,0
Aceton ($\rho = 70$ %)				
10-IM	3	100	0,252 \pm 0,000	694,4 \pm 0,0
11-IM	6		0,284 \pm 0,000	783,3 \pm 0,0
12-IM	9		0,291 \pm 0,000	802,8 \pm 0,0
13-IM	3	80	0,244 \pm 0,000	672,2 \pm 0,0
14-IM	6		0,270 \pm 0,000	744,4 \pm 0,0
15-IM	9		0,280 \pm 0,000	772,2 \pm 0,0
16-IM	3	60	0,215 \pm 0,001	590,3 \pm 3,9
17-IM	6		0,246 \pm 0,001	676,4 \pm 3,9
18-IM	9		0,255 \pm 0,001	701,4 \pm 3,9

*mg galne kiseline/g osušenog lista lovora, $N = 4$

Uspoređujući utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola jasno je vidljivo kako se kod ekstrakcije koja je trajala 3 minute dobije najmanji, a kod 9 minuta najveći maseni udio polifenola, pa se može zaključiti da je maseni udio ukupnih fenola u korelaciji s vremenom provođenja ekstrakcije.

Ako promatramo utjecaj amplitude na ekstrakciju ukupnih fenola možemo uočiti razliku između 30 i 70 %-tnih acetonskih ekstrakata. Naime, kod 30 %-tnog acetona najveći maseni udjeli polifenola dobiju se kod 80 % amplitude (608,3 - 652,8 mg/g), a najmanji kod 100 % (566,7 - 600,0 mg/g). Kod 70 %-tnog acetona, 100 % amplituda doprinosi najvećoj ekstrakciji ukupnih fenola, dok 80 i 60 % amplitude daju nešto niži udio ukupnih fenola. Dakle, 30 %-tnim acetonom, u kombinaciji s 80 % amplitudom i vremenom provođenja ekstrakcije od 9 min dobiva se visoki udio polifenola (652,8 mg/g), dok kombinacija 70 %-tnog acetona, 100 % amplitude i vremena ekstrakcije od 9 min daje najveći maseni udio

polifenola (802,8 mg/g), što je ujedno i najbolja kombinacija postavljenih parametara ekstrakcije.

U cilju praćenja efikasnosti ultrazvučne ekstrakcije, usitnjeni listovi lovora podvrgnuti su i ekstrakciji refluksiranjem. Tablica 6 prikazuje rezultate spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima primjenom metode refluksiranja kod vremena ekstrakcije od 1,5 i 3 h.

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima ($\rho = 30$ i 70 %) lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	t (ekstrakcije)/h	$A \pm SD$	w (mg/g) $\pm SD^*$
Aceton ($\rho = 30$ %)			
L17	3	0,284 \pm 0,000	783,3 \pm 0,0
L19	1,5	0,273 \pm 0,000	752,8 \pm 0,0
Aceton ($\rho = 70$ %)			
L13	3	0,339 \pm 0,000	936,1 \pm 0,0
L15	1,5	0,344 \pm 0,000	950,0 \pm 0,0

*mg galne kiseline/g osušenog lista lovora, $N = 4$

Kod 30 %-tnog acetona, više polifenola se dobije kod ekstrakcije koja je trajala 3 h (783,3 mg/g), dok kod 70 %-tnog u onoj koja je trajala 1,5 h (950,0 mg/g). Dakle, može se zaključiti da kombinacija jačeg otapala (70 %) i duljeg vremena ekstrakcije (3 h) negativno utječe na prinos polifenola u ekstraktu lovora.

Važno je naglasiti da gotovo i ne postoje znanstveni radovi koji pokrivaju područje ekstrakcije polifenola iz lovora ultrazvukom ili pak refluksiranjem, pa i usporedba dobivenih rezultata s drugim vrijednostima nije bila moguća. Među rijetkima valja istaknuti istraživanje Muñiz-Márquez i *sur.* (2014), koji dobivaju vrijednosti do 10 mg/g ovisno o vremenu ekstrakcije (2, 4, 6 i 8 h) i volumnom udjelu etanola (35 i 70 %) uz ekstrakciju destilacijom.

Pored ukupnih fenola, u radu su određeni i ukupni flavonoidi, a Tablica 7 prikazuje rezultate spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima usitnjenog lista lovora dobivenima ekstrakcijom ultrazvukom.

Tablica 7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u acetonskim ekstraktima ($\rho = 30$ i 70 %) lovora dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

Uzorak	t (ekstrakcije)/min	Amplituda/%	$A \pm SD$	w (mg/g) $\pm SD^*$
Aceton ($\rho = 30\%$)				
1-IM	3	100	0,072 \pm 0,000	304,2 \pm 0,0
2-IM	6		0,074 \pm 0,001	310,4 \pm 2,9
3-IM	9		0,086 \pm 0,000	362,5 \pm 0,0
4-IM	3	80	0,092 \pm 0,001	385,4 \pm 2,9
5-IM	6		0,097 \pm 0,000	408,3 \pm 0,0
6-IM	9		0,109 \pm 0,001	456,3 \pm 2,9
7-IM	3	60	0,089 \pm 0,001	377,1 \pm 2,9
8-IM	6		0,094 \pm 0,000	395,8 \pm 0,0
9-IM	9		0,102 \pm 0,000	429,2 \pm 0,0
Aceton ($\rho = 70\%$)				
10-IM	3	100	0,105 \pm 0,000	441,7 \pm 0,0
11-IM	6		0,125 \pm 0,000	525,0 \pm 0,0
12-IM	9		0,126 \pm 0,001	529,2 \pm 2,9
13-IM	3	80	0,108 \pm 0,000	454,2 \pm 0,0
14-IM	6		0,115 \pm 0,001	481,3 \pm 2,9
15-IM	9		0,115 \pm 0,001	483,3 \pm 2,9
16-IM	3	60	0,082 \pm 0,000	345,8 \pm 0,0
17-IM	6		0,089 \pm 0,001	375,0 \pm 2,9
18-IM	9		0,103 \pm 0,001	431,3 \pm 2,9

*mg rutina/g osušenog lista lovora, $N = 4$

Kao i kod ukupnih fenola, produljenjem vremena ekstrakcije od 3 do 9 min raste i udio flavonoida u ekstraktu za 30 i 70 % volumni udio otapala. Promatrajući utjecaj amplitude na maseni udio flavonoida može se zamijetiti sličnost kao i kod određivanja ukupnih polifenola. Dakle, kod 30 %-tnog acetona, najveći udio flavonoida (456,3 mg/g) daje amplituda od 80 % i vrijeme provođenja ekstrakcije od 9 min, dok se kod 70 %-tnog acetona najveći maseni udio flavonoida (529,2 mg/g) dobije pri 100 % amplitudi i 9 min ekstrakcije. Iz svega navedenog vidi se da je optimalna kombinacija parametara ekstrakcije jednaka kao i kod ukupnih fenola.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u acetonskim ekstraktima ($\rho = 30$ i 70 %) lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	t (ekstrakcije)/h	$A \pm SD$	w (mg/g) $\pm SD$
Aceton ($\rho = 30$ %)			
L17	3	0,131 \pm 0,001	550,0 \pm 2,9
L19	1,5	0,120 \pm 0,000	504,2 \pm 0,0
Aceton ($\rho = 70$ %)			
L13	3	0,149 \pm 0,000	625,0 \pm 2,9
L15	1,5	0,151 \pm 0,001	633,3 \pm 0,0

*mg rutina/g osušenog lista lovora, $N = 4$

U Tablici 6 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u 30 i 70 %-tnim acetonskim ekstraktima usitnjenog lista lovora dobivenim primjenom metode refluksiranja. Kod 30 %-tnog acetona, više polifenola dobije se ekstrakcijom koja je trajala 3 h, dok kod 70 %-tnog u onoj koja je trajala 1,5 h, što odgovara rezultatima dobivenim za ukupne fenole.

5. Zaključak

Iz rezultata provedenih mjerenja vidljivo je da je 70 %-tni aceton bolje otapalo za ekstrakciju polifenola iz lovora u odnosu na 30 %-tni aceton. Pri ekstrakciji ultrazvukom od 3 primijenjene amplitude (60, 80 i 100 %) najbolji rezultati su dobiveni kod 80 % ako je korišten 30 %-tni aceton te kod 100 % ako je korišten 70 %-tni aceton. Maseni udio polifenola raste s porastom vremena pa su najbolji rezultati dobiveni pri trajanju ekstrakcije od 9 min. Dakle, optimalna kombinacija parametara uočena pri provedbi ekstrakcije ultrazvukom je: 70 %-tni aceton, 100 % amplituda i vrijeme provođenja ekstrakcije 9 min. 70 %-tni aceton pokazao se boljim otapalom i kod provođenja ekstrakcije refluksiranjem. Iako se ekstrakcijom refluksiranjem dobije veći maseni udio polifenola u ekstraktu, u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju, njena provedba je višestruko dulja i zahtjeva pripremu aparature. Zbog toga je ekstrakcija ultrazvukom bolji izbor, posebice ako je potrebno prirediti veći broj ekstrakata u kratkom vremenu. Iz tog razloga ova ekstrakcijska tehnika uz prethodno navedene optimalne parametre koristit će se u daljnjoj pripravi ekstrakata lovora i njihovoj primjeni pri praćenju antikorozijskog djelovanja.

6. Popis literature

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 of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426 - 436.

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

Bouammali H., Ousslim A., Bekkouch K., Bouammali B., Aouniti A., Al-Deyab S.S., Jama C., Bentiss F., Hammouti B. (2013) The Anti-Corrosion Behavior of *Lavandula dentata* Aqueous Extract on Mild Steel in 1M HCl. *International Journal of Electrochemical Science* **8**: 6005 - 6013.

Brglez Mojzer E., Knez Hrn M., Škerget M., Knez Ž., Bren U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**: 1 - 38.

Conforti F., Statti G., Uzunov D., Menichini F. (2006) Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *Piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**: 2056 - 2064.

Deng S., Li X. (2012) Inhibition by *Ginkgo* leaves extract of the corrosion of steel in HCl and H₂SO₄ solutions. *Corrosion Science* **55**: 407 - 415.

Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M., Merillon J. (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 1768 - 1774.

Fouda A.S., Etai S.H., Elnggar W. (2014) Punica Plant extract as Green Corrosion inhibitor for C-steel in Hydrochloric Acid Solutions. *International Journal of Electrochemical Science* **9**: 4866 - 4883.

Gülşen A. (2012) Corrosion inhibition of mild steel by *Laurus nobilis* leaves extract as green inhibitor. *Research on Chemical Intermediates* **38**: 1311 - 1321.

Halambek J., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I., Berković K. (2014) Corrosion Behaviour of Aluminium and AA5754 Alloy in 1% Acetic Acid Solution in Presence of Laurel Oil. *International Journal of Electrochemical Science* **9**: 5496 - 5506.

- Ishtiaque S., Naz S., Soomro N., Khan K., Siddiqui R. (2015) Antioxidant activity and total phenolics content of extracts from *Murraya Koenigii* (curry leaves), *Laurus nobilis* (bay leaves), and *Camellia sinensis* (tea). *Quaid-E-Awam University Research Journal of Engineering, Science & Technology* **14**: 20 - 25.
- Kaurinovic B., Popovic M., Sanja Vlajsavljevic S. (2010) *In Vitro* and *in Vivo* Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules* **15**: 3378 - 3390.
- Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.
- Muñiz-Márquez D.B., Rodríguez R., Balagurusamy N., Carrillo M.L., Belmares R., Contreras J.C., Nevárez G.V., Aguilar C.N. (2014) Phenolic content and antioxidant capacity of extracts of *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L. *CyTA – Journal of Food* **12**: 271 - 276.
- Okafor P.C., Apebende E.A. (2014) Corrosion inhibition characteristics of *Thymus vulgaris*, *Xylopiya aethiopica* and *Zingiber officinale* extracts on mild steel in H₂SO₄ solutions. *Pigment & Resin Technology* **43**: 357 - 364.
- Patrakar R., Mansuriya M., Patil P. (2012) Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus Nobilis*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* **1**: 595 - 602.
- Rajbhar K., Dawda H., Mukundan U. (2015) Polyphenols: Methods of Extraction. *Scientific Reviews and Chemical Communications* **5**: 1 - 6.
- Ramos C., Teixeira B., Batista I., Matos O., Serrano C., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Nunes M.L., Marques A. (2012) Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research* **26**: 518 - 529.
- Vrsalović L., Kliškić M., Gudić S.(2009) Application of Phenolic Acids in the Corrosion Protection of Al-0.8Mg Alloy in Chloride Solution. *International Journal of Electrochemical Science* **4**: 1568 - 1582.

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

Ivana Marijanović

Ime i prezime studenta