

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola izoliranih iz kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta

Miletić, Vicenzia

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:159:571502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Vicenzia Miletić
7531/BT

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA IZOLIRANIH IZ
KORE RAJČICE ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA**

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 studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Spektrofotometrijsko određivanje polifenola izoliranih iz kore rajčice ultrazvukom
visokog intenziteta**

Vicenzia Miletić, 0058067560

Sažetak: U ovom radu proučavana je učinkovitost ekstrakcije polifenola iz kore rajčice, nusproizvoda nastalog tijekom postupka obrade rajčice. Ekstrakcija je provedena ultrazvukom visokog intenziteta na uzorcima osušene kore rajčice sa i bez pektina, djelovanjem 96 i 70 % (v/v) etanola u vremenu od 5, 10 i 15 min. Maseni udio ukupnih fenola i flavonoida određen je UV/Vis spektrofotometrijskom metodom. Dobiveni rezultati su pokazali da uzorci kore rajčice sa pektinom sadrže veći udio ukupnih fenola i flavonoida, u odnosu na uzorke kore rajčice bez pektina. Utvrđeno je da vrijeme ekstrakcije od 15 min i 70 % etanol utječu na optimalnu ekstrakciju polifenola kod uzoraka kore rajčice sa pektinom. Zaključno, provedeno istraživanje je pokazalo da se kora rajčice kao jeftin biosupstrat može efikasno iskoristiti za jednostavnu i brzu izolaciju polifenola, smanjujući pri tome troškove sakupljanja i nagomilavanja velikih količina biootpada.

Ključne riječi: biootpad, kora rajčice, polifenoli, ultrazvuk, UV/Vis spektrofotometrija

Rad sadrži: 27 stranica, 10 slika, 6 tablica, 17 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: dr. sc. Filip Dujmić, viši asistent

Datum obrane: 18.09.2017.

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 isolated from tomato peel by
high intensity ultrasound**

Vicenzia Miletić, 0058067560

Abstract: In this work was investigated the efficiency of polyphenols extraction from tomato peel, by-product formed during tomato processing. Extraction was performed by high intensity ultrasound on dried tomato peel samples with and without pectin, with 96 and 70 % (v/v) ethanol at 5, 10 and 15 min. The content of total polyphenols and flavonoids was determined by the UV/Vis spectrophotometric method. The obtained results showed that the content of total phenols and flavonoids is higher in tomato peel with pectin, compared with tomato peel samples without pectin. It was found that the extraction time of 15 min and the 70 % ethanol affects the optimum extraction of polyphenols in tomato peel samples with pectin. In conclusion, performed research has shown that the tomato peel as an inexpensive bio-substrate can be used efficiently for the simple and rapid isolation of polyphenols, reducing the costs of collecting and accumulating large amounts of bio-waste.

Keywords: bio-waste, tomato peel, polyphenols, ultrasound, UV/Vis spectrophotometry

Thesis contains: 27 pages, 10 figures, 6 tables, 17 references

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: Senior Assistant, PhD, Filip Dujmić

Defence date: 18th of September, 2017

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Rajčica i biootpad nastao preradom rajčice.....	2
2.2. Bioaktivni spojevi u kori rajčice.....	2
2.3. Struktura polifenola.....	3
2.4. Metode ekstrakcije polifenola.....	6
2.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta.....	7
2.6. Analitičke metode određivanja polifenola.....	8
2.6.1. UV/Vis spektrofotometrija.....	9
3. Eksperimentalni dio.....	11
3.1. Materijal.....	11
3.2. Kemikalije.....	11
3.3. Aparatura i pribor.....	12
3.4. Metode rada.....	12
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka kore rajčice ultrazvukom.....	12
3.4.2. Princip spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola.....	15
3.4.3. Princip spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida.....	16
3.4.4. Priprava otopina za određivanje ukupnih fenola i flavonoida.....	16
3.4.5. Postupak određivanja ukupnih fenola i flavonoida.....	17
3.4.5.1. Ukupni fenoli.....	17
3.4.5.2. Ukupni flavonoidi.....	17
4. Rezultati i rasprava.....	18
5. Zaključak.....	25
6. Popis literature.....	26

1. UVOD

Znanstvena istraživanja (Toor i Savage, 2005; Četković i sur., 2007; Savatović i sur., 2010; Lavelli i Torresani, 2011; Kalogeropoulos i sur., 2012) provedena na biootpadu, nastalom tijekom industrijske prerade rajčice pokazala su da ovaj organski materijal sadrži značajne količine bioaktivnih spojeva, koji mogu zadržati aktivnost i nakon postupaka obrade rajčice. Na osnovi težine suhe tvari, pokazano je (Kalogeropoulos i sur., 2012) da otpad rajčice sadržava povećanu količinu β -karotena, tokoferola, sterola i terpena, dok je količina masnih kiselina gotovo jednaka onoj u neobrađenoj rajčici. Pored navedenih fitokemikalija, otpad rajčice (kora, sjemenke i pulpa) sadržava i značajne količine polifenola (Savatović i sur., 2010; Kalogeropoulos i sur., 2012), koji se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi za formulaciju funkcionalne hrane ili kao aditivi u prehrambenim sustavima za produljenje roka trajanja (Kalogeropoulos i sur., 2012).

Dakle, cilj ovog rada bio je provesti izolaciju polifenola iz kore rajčice, a sakupljeni biootpad nastao tijekom njena konzerviranja iskoristiti kao jeftin reciklirajući biosupstrat. U postupku izolacije polifenola korištena je ultrazvučna ekstrakcije kao jednostavna i brza, nekonvencionalna ekstrakcijska tehnika. Ekstrakcija je provedena na dvije vrste uzoraka kore rajčice: a) uzorci sa pektinom kao sastavnim dijelom kutikule kore rajčice i b) uzorci kod koje je pektin iz kutikule uklonjen smjesom oksalne kiseline i amonijeva oksalata (Ninčević Grassino i sur., 2016).

Provedeno istraživanje se sastojalo iz:

- priprave etanolnih (70 i 96 %, v/v) ekstrakata kore rajčice (uzorci sa i bez pektina) ultrazvukom visokog intenziteta pri vremenu ekstrakcije od 5, 10 i 15 min, sondom promjera 7 mm,
- određivanja ukupnih fenola i flavonoida u pripremljenim etanolnim ekstraktima uzoraka kore rajčice, primjenom spektrofotometrije u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja (UV/Vis spektrofotometrija),
- odabira optimalnih uvjeta ekstrakcije koji će se koristiti tijekom budućih priprava ekstrakata kore rajčice i njihove implementacije u skladu je s trendom održivosti i recikliranja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Rajčica i biootpad nastao preradom rajčice

Rajčica (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je, nakon krumpira, drugo najčešće konzumirano povrće na svijetu, a približno 30 % konzumirane rajčice čine prerađeni proizvodi, poput konzervirane i sušene rajčice, soka od rajčice, ketchupa, pirea, umaka i juha od rajčice (Savatović i sur., 2010; Ćetković i sur., 2012). Svježi i obrađeni proizvodi posjeduju visoku nutritivnu vrijednost, zbog sadržaja različitih makro i mikronutrijenata, poput vlakana (59 % s.t.), proteina (19 % s.t.), vitamina (C i E), folata, karotenoida (likopena i β -karotena) i polifenolnih spojeva (kvercetin, kempferol, naringenin, kafeinska, klorogenska, ferulinska i *p*-kumarna kiselina).

Industrijskom preradom rajčice u proizvode kao što su ketchup, umak ili sok stvaraju se velike količine organskog otpada (3 - 7 % težine rajčice čini otpad), sastavljenog iz kore, sjemenka i dijelova pulpe, a poznati su pod nazivom komina rajčice. Budući da komina sadrži različite nutritivne komponente, ali i antioksidanse (Savatović i sur., 2010), može se smatrati značajnim prirodnim resursom u njihovoj izolaciji, a potom i daljnoj primjeni u proizvodnji funkcionalne hrane ili dodataka prehrani. Pored navedenog, recikliranjem komine rajčice znatno se smanjuje stvaranje velikih zaliha biootpada, a stoga i onečišćenje okoliša (Lavelli i Torresani, 2011). Drugim riječima, ovaj prirodni resurs u potpunosti zadovoljava kriterije održivosti i razvoja cirkularne ekonomije.

2.2. Bioaktivni spojevi u kori rajčice

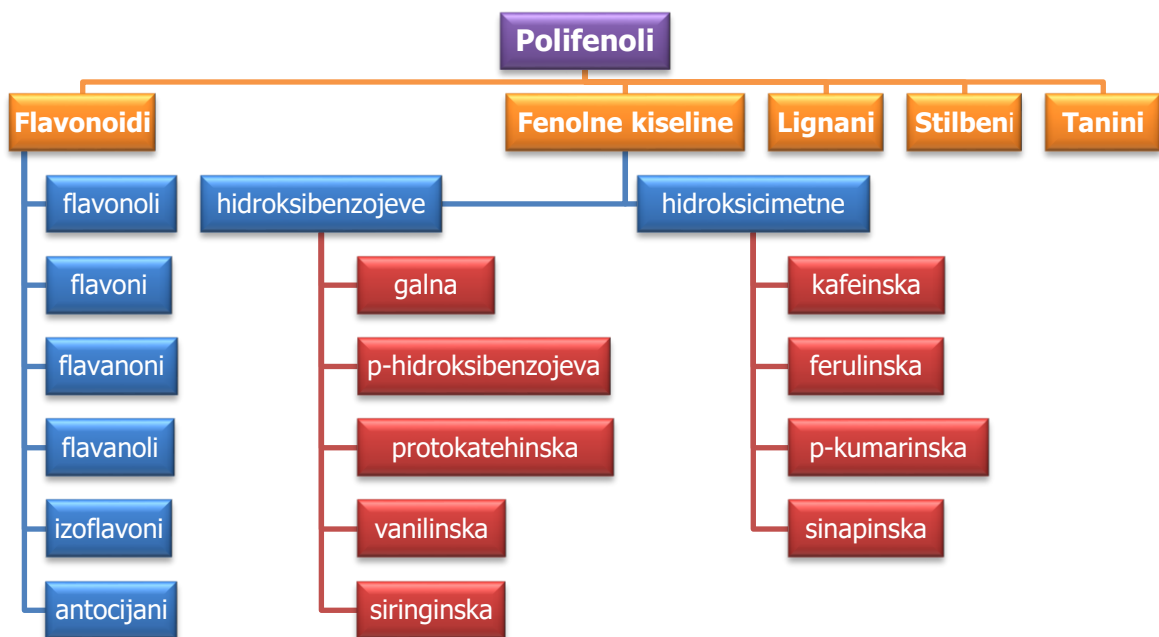
Bioaktivni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka. Za razliku od primarnih metabolita (ugljikohidrati, aminokiseline, proteini i lipidi) koji su namijenjeni za rast i razvoj, sekundarni metaboliti pomažu biljci da poveća ukupnu sposobnost preživljavanja. Sekundarni biljni metaboliti izazivaju farmakološki ili toksikološki učinak kod ljudi i životinja (Azmir i sur., 2013). Fenolni spojevi su jedna od najrasprostranjenijih skupina fitokemikalija koje imaju značajnu fiziološku i morfološku važnost u biljaka. Osim što doprinose boji i osjetilnim karakteristikama voća i povrća, ovi spojevi imaju važnu ulogu u rastu i reprodukciji biljaka dajući im zaštitu od patogena i grabežljivaca. Fenolni spojevi pokazuju širok raspon fizioloških svojstava poput antialergijskih, antiarteriogenih, protuupalnih, antimikrobnih, antioksidativnih, antitrombotskih, kardioprotektivnih i vazodilatatornih učinaka. Ovi pozitivni učinci pripisuju se

njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, odnosno sposobnosti za uklanjanje slobodnih radikala, za doniranje atoma vodika ili elektrona, ili kationa kelirajućih metala. Primjerice, antioksidacijska aktivnost kod fenolne kiseline ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilnu funkcionalnu skupinu (Balasundra i sur., 2006).

Istraženo je da kora i sjemenke rajčice čine bogatiji izvor polifenola u odnosu na pulpu (Savatović i sur., 2010). U radu Georgei sur. (2004) utvrđeno je da kora rajčice sadrži 10,4 - 40,0 mg/100 g ukupnih fenola u odnosu na svježju rajčicu (9,2 - 27,0 mg/100 g). Toor i Savage (2005) utvrdili su da sjemenke i kora rajčice sadrže 22,0 i 29, 0 mg/100 g ukupnih fenola, dok pulpa znatno manje (12,7 mg/100 g). Savatović i sur. (2010) su pokazali da kora i sjemenke rajčice sadrže 11,41 - 73,22 mg/g ukupnih fenola i 4,03 - 69,82 mg/g ukupnih flavonoida, nakon ultrazvukom provedene ekstrakcije u 80 %-tnom etanolu. U radu Lavelli i Torresani (2011) utvrđeno je da svježja kora i sjemenke rajčice sadrže 26 mg/kg (s.t.) rutina i 121 mg/kg (s.t.) klorogenske kiseline, dok toplinski obrađena kora i sjemenke rajčice sadrži 17 mg/kg (s.t.) rutina i 97 mg/kg (s.t.) klorogenske kiseline.

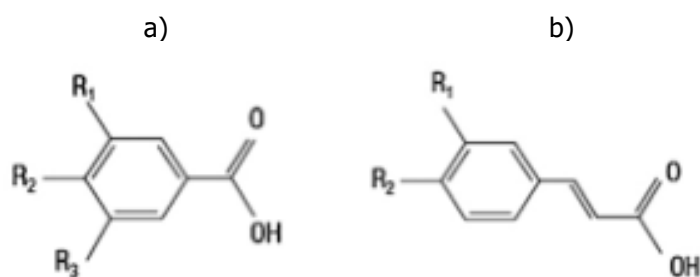
2.3. Struktura polifenola

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka nastali u biosintetskim putevima šikiminske kiseline, fenilpropanoida i flavonoida. Strukturno, fenolni spojevi sadrže aromatski prsten koji ima jedan ili više hidroksilnih supstituenata i kreću se od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva (Ignat i sur., 2011). Većinom, fenolni spojevi u prirodi se javljaju kao konjugati mono i polisaharida, vezanih na jednu ili više fenolnih grupa, a mogu se pojaviti i kao funkcionalni derivati, poput estera i metil estera. Iako takva strukturna raznolikost rezultira širokom rasponu fenolnih spojeva, oni se mogu kategorizirati u nekoliko skupina (Slika 1).



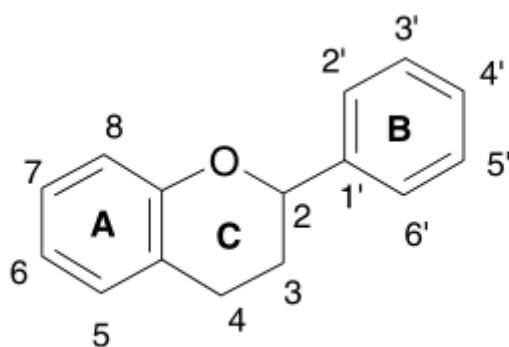
Slika 1. Shematski prikaz podjele polifenola.

Fenolne kiseline se sastoje od dvije podskupine: a) hidroksibenzojeve i b) hidroksicimetne kiseline (Slika 2). Hidroksibenzojeve kiseline imaju C_6-C_1 strukturu, a čine ih galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Hidroksicinaminske kiseline s pobočnim lancem od tri ugljika (C_6-C_3) su najčešće kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina.



Slika 2. a) hidroksibenzojeve kiseline i b) hidroksicinaminske kiseline (Ignat i sur., 2011).

Flavonoidi čine najveću skupinu biljnih fenola, više od polovice od 8000 prirodnih fenolnih spojeva. To su spojevi niske molekulske mase, koji se sastoje od 15 ugljikovih atoma, raspoređenih u C₆-C₃-C₆ konfiguraciji. Struktura sadrži 2 aromatska prstena A i B povezanih sa mostom od 3 ugljika, obično u obliku heterocikličkog prstena C (Slika 3). Aromatski prsten A nastaje acetat/malonatnim biosintetskim putem, a prsten B nastaje putem šikiminske kiseline. Modifikacije u strukturi C prstena rezultiraju glavnim skupinama flavonoida (Slika 1): flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli (katehini), izoflavoni, flavanonoli, antocijanini, od kojih su flavoni i flavonoli najčešće prisutni i strukturno drugačiji. Modifikacije na prstenovima A i B dovode do različitih spojeva unutar svake skupine flavonoida. Te modifikacije mogu uključivati oksidaciju, alkilaciju, glikozilaciju, acilaciju i sulfataciju.



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

Tanini, spojevi s relativno visokom molekulskom masom koji čine treću važnu skupinu fenolnih spojeva, mogu se podijeliti u hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Prvi su esteri galne kiseline a drugi (poznati kao proantocijanidi) su polimeri polihidroksiflavan-3-ol monomera (Balasundram i sur., 2006).

2.4. Metode ekstrakcije polifenola

U postupcima efikasnog odvajanja bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala važnu ulogu ima primjena odgovarajuće metode ekstrakcije. Njen izbor ovisi u prvom redu o svojstvima pojedinih dijelova (listovi, sjemenke, cvjetovi i plodovi) biljnog materijala, kao i vrsti i strukturi bioaktivnih komponenta u biljnom matriksu. Da bi ekstrakcija bila što učinkovitija, potrebno je odabrati otapalo koje će uz ostale osnovne procesne parametre (temperatura, tlak i vrijeme) utjecati na selektivnu izolaciju analita. Voda, vodene otopine etanola, metanola i acetona najčešće se upotrebljavaju kao otapala za ekstrakciju polifenola, a njihov izbor ovisi o polarnosti spoja. Osim odabira otapala, za uspješno provođenje ekstrakcije treba uzeti u obzir i druge čimbenike poput molekularnog afiniteta otapala i otopljene tvari, prijenosa mase u odgovarajućem otapalu, sigurnosti okoliša, toksičnosti za ljude i financijskoj isplativosti (Azmir i sur., 2013; El-Malah i sur., 2015).

Pri izolaciji bioaktivnih komponenta iz biljnog materijala mogu se koristiti različite ekstrakcije tehnike, a podijeljene su u dvije osnovne grupe (Wijngaard i sur., 2012; Azmir i sur., 2013), klasične ili konvencionalne i nove, suvremene ili nekonvencionalne (Slika 4). Klasične metode kao što su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i destilacija, temelje se na topljivosti tvari u različitim otapalima, zagrijavanju i miješanju. Glavni nedostaci klasičnih metoda su dugo vrijeme ekstrakcije, potreba za skupim otapalima, visoke čistoće, isparavanje velikih količina otapala, niska selektivnost i termička razgradnja termolabilnih spojeva. U cilju skraćivanja vremena ekstrakcije, snižavanja temperature, smanjenja korištenja otapala štetnih za okoliš, snižavanja troškova procesa i istovremenog postizanja veće efikasnosti ekstrakcije uvedene su i nove, nekonvencionalne tehnike ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

Klasične (konvencionalne) metode ekstrakcije

- soxhlet ekstrakcija
- ekstrakcija refluksiranjem
- maceracija
- destilacija

Suvremene (nekonvencionalne) metode ekstrakcije

- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
- ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima
- ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom
- ekstrakcija pomoću enzima
- ekstrakcija pomoću električnog polja
- ekstrakcija superkritičnim fluidima

Slika 4. Shematski prikaz metoda ekstrakcije.

2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta

Ultrazvuk je poseban tip zvučnog vala kojemu je frekvencija veća od gornje granice osjetljivosti ljudskog uha. U kemiji je to obično reda veličine od 20 kHz do 100 MHz. Kao i drugi valovi, ultrazvučni valovi prolaze kroz medij stvaranjem kompresije i ekspanzije, uslijed čega dolazi do proizvodnje, rasta i puknuća mjehurića (fenomen nazvan kavitacija). Ovim procesom može se proizvesti velika energija uslijed pretvorbe kinetičke energije gibanja u zagrijavanje sadržaja mjehurića. Mjehurići imaju temperaturu otprilike 5000 K, tlak 1013,25 bara i brzinu grijanja i hlađenja preko 1010 K/s. Kavitacija potiče ekstrakciju na način da uzrokuje oštećenja stanične stijenke, ubrzava pristup otapala do staničnog materijala i time osigurava lako ispiranje staničnog sadržaja (Azmir i sur., 2013; Khan i sur., 2014). Udio vlage u uzorku, stupanj usitnjavanja materijala, veličina čestica, otapalo, temperatura, tlak, frekvencija i vrijeme ekstrakcije važni su čimbenici za postizanje učinkovite ekstrakcije.

U skladu s prethodno opisanim mehanizmom ultrazvučne ekstrakcije, osnovne prednosti ove ekstrakcijske tehnike su: kraće vrijeme ekstrakcije, manje utrošene energije i upotrebe otapala. Ultrazvučna energija omogućava učinkovitije miješanje, brži prijenos energije, smanjenje gradijenta topline i temperature ekstrakcije, selektivnu ekstrakciju, smanjenje

veličine opreme, brzo pokretanje uređaja, bolju kontrolu procesa ekstrakcije, povećanje proizvodnje i eliminiranje kemijskih reakcija ionizacije, hidrolize i oksidacije, koje se javljaju usljed dugog vremena ekstrakcije, karakterističnim za klasične tehnike (Ignat i sur., 2011).

2.5. Analitičke metode određivanja polifenola

Spektrofotometrija je najčešće korištena metoda za određivanje različitih skupina polifenola zbog svoje jednostavnosti korištenja i niskih troškova. Glavni nedostatak je što se na ovaj način mogu odrediti samo pojedine skupine polifenola, ali ne i udio pojedinačnih spojeva u istoj skupini. Iz tog razloga razvijene su različite kromatografske tehnike, prikladne za određivanje i separaciju polifenola, a čine ih:

- Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. reverse high performance liquid chromatography, HPLC) s UV/Vis detektorom ili detektorom s nizom dioda (engl. diode array detector, DAD) ili tandemnom masenom spektrometrijom (engl. tandem mass spectrometry, MS/MS). Prikladna je za određivanje različitih skupina polifenola kao što su antocijani, proantocijanidi, flavononi, flavonoli, flavan-3-oli, flavoni i fenolne kiseline.
- Protustrujna kromatografija velike brzine (engl. high speed counter current chromatography, HSCCC) je vrsta tekućinsko-tekućinske kromatografije koja koristi centrifugalnu silu kako bi stacionarnu fazu održavala na mjestu. Tijekom rada mobilna faza može postati stacionarna i obrnuto. Ova metoda pokazala se učinkovitom za razdvajanje smjese polifenola iz zelenog i crnog čaja kao što su: katehini, flavonolglukozidi i proantocijanidi.
- Superkrična fluidna kromatografija (engl. supercritical fluid chromatography, SFC) koristi superkrični fluid kao mobilnu fazu, najčešće ugljični dioksid (SC-CO₂). Ekonomičnija je, ima bolju rezoluciju i brže analize od uobičajenih kromatografskih metoda, te je kompatibilna s većim brojem detektora. Temelji se na činjenici da približavajući se kritičnoj točki, otapalo mijenja svojstva kod vrlo malih promjena tlaka. Koristeći superkrični fluid mogu se izbjeći mnoga organska otapala poput *n*-heksana, diklormetana i kloroforma.
- Papirna (engl. paper chromatography, PC) i tankoslojna kromatografija (engl. thin layer chromatography, TLC) se često koriste za pročišćavanje i izolaciju antocijana, flavonola, kondenziranih tanina i fenolnih kiselina u različitim sustavima otapala.
- Plinska kromatografija (engl. gas chromatography, GC) ima veliki separacijski kapacitet, vrlo je osjetljiva i selektivna u kombinaciji s masenom spektrofotometrijom (engl. gas chromatography/mass spectrophotometry, GC/MS). Također se primjenjuje i razdjelna

visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (engl. partition high performance liquid chromatography) za razdvajanje i pročišćavanje bioaktivnih polifenola.

- Kapilarna elektroforeza (engl. capillary electrophoresis, CE) sve se više koristi za određivanje širokog spektra fenolnih spojeva zbog visoke učinkovitosti razdvajanja, visoke rezolucije, kratkog vremena analize i niske potrošnje uzorka i reagensa. Nedostaci su niska osjetljivost na koncentraciju uzorka, slaba ponovljivost rezultata i mali volumen uzorka koji se može uvesti u kapilaru. Najviše se koristi za određivanje flavonoida i antocijanina. Micelarna elektrokinetička kapilarna elektroforeza (engl. micellar electrokinetic capillary electrophoresis, MECC) vrsta je kapilarne elektroforeze koja omogućava razdvajanje neutralnih analita pod utjecajem električnog polja. Princip razdvajanja se temelji na različitoj raspodjeli analita između micela koje predstavljaju nepokretnu fazu i vodene faze koja ih okružuje (Rastija i Medić-Šarić, 2009)

- Gel propusna kromatografija (engl. gel permeation chromatography, GPC) omogućava razdvajanje monomernih i polimernih pigmenata većih molekulskih masa (Ignat i sur., 2011).

2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija

Spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja je jedna je od najčešće korištenih metoda u analitičkoj kemiji, kod koje veliki broj anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta apsorbira ultraljubičasto zračenje pri valnim duljinama (λ) od 200 do 400 nm, odnosno vidljivo zračenje pri valnim duljinama (λ) od 400 do 800 nm. Mnoge kemijske vrste koje ne apsorbiraju UV ili Vis zračenje mogu se kemijskom reakcijom prevesti u derivate koji apsorbiraju.

U apsorpcijskoj spektrofotometriji elektromagnetsko zračenje prolazi kroz uzorak pri čemu velik dio zračenja prolazi bez gubitka intenziteta. Na odabranim valnim duljinama dolazi do prigušenja intenziteta zračenja što se naziva apsorpcija. Apсорpcija zračenja dana je Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \varepsilon b c$$

gdje je A - apsorbancija, c - množinska koncentracija (mol/L), ε - molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm mol), b - duljina puta svjetlosti kroz uzorak (debljina kivete, cm).

Prema Lambert-Beerovom zakonu koncentraciju analita možemo izračunati iz izmjerene apsorbancije ako raspolažemo baždarnim dijagramom (ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda). Spektrofotometar je uređaj za mjerenje apsorbancije, a sastoji se iz: izvora zračenja, monokromatora (izbor valne duljine), kivete za uzorak, detektora (fotoćelija koja

mjeri intenzitet zrake svjetlosti) i procesora signala (pretvara električni signal u signal prikladan za analitičku obradu podataka (Harvey, 2016).

3. EKSPERIMENTALI DIO

3.1. Materijal

Osušena kora rajčice (Slika 5) je prikupljena u području AgroNocerina (Angri, Salerno), talijanske regije Campania (Italija). Kemijski sastav osušene kore rajčice (šarža A) prikazan je u radu Ninčević Grassino i sur., 2016.



Slika 5. Osušena kora rajčice - biootpad nastao tijekom procesa konzerviranja rajčice (vlastita fotografija).

3.1. Kemikalije

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (AcrosOrganics, 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)

3.2. Aparatura i pribor

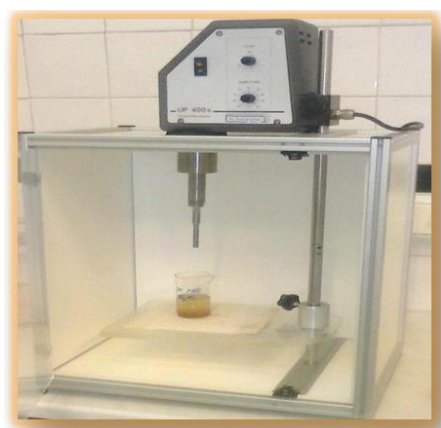
- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Centrifuga, Tehnica, Železnik, Slovenija
- Dispenzor (HirschmannLaborgeräte, Eberstadt, Njemačka, 2-10 mL)
- Infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- Ultrazvuk (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda promjera 7 mm (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- UV/Vis Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Vortex mješalica VTX 400 (LABO-MODERNE, Pariz, Francuska)
- 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
- Kivete za centrifugu, 12 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Propipeta
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke

3.3. Metode rada

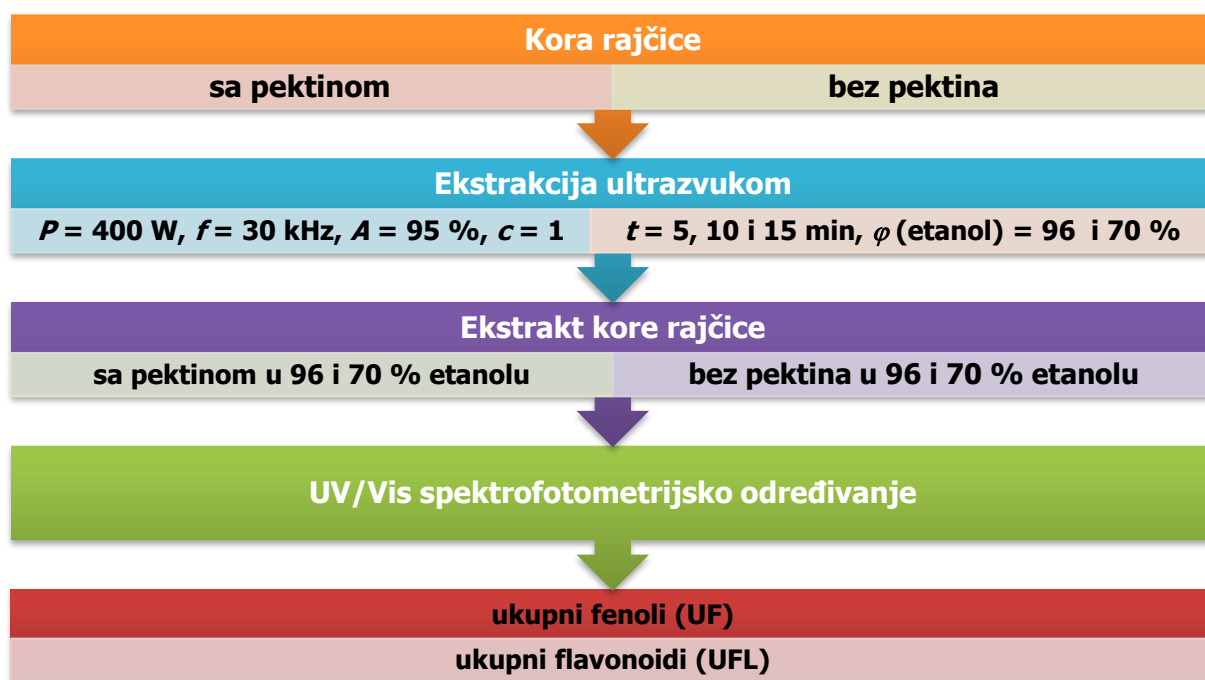
3.3.1. Ekstrakcija uzoraka kore rajčice ultrazvukom

Ekstrakcija polifenola ultrazvukom visokog intenziteta (Slika 6) provedena je na dvije vrste uzoraka (šarža A) osušene kore rajčice: *i*) uzorci kod kojih je pektin sastavni dio kutikule (kora rajčice sa pektinom) i *ii*) uzorci kod kojih je pektin uklonjen iz kutikule ekstrakcijom sa smjesom amonijev oksalat/oksalna kiselina (kora rajčice bez pektina). Nakon izolacije pektina (Ninčević Grassino i sur., 2016), kora rajčice je isprana deioniziranim vodom i osušena na 40 °C, tijekom 6 h.

1,000 g uzorka osušene i usitnjene kore rajčice (sa i bez pektina) ekstrahiran je s 50 mL etanola (96 i 70 %, v/v), ultrazvukom visokom intenziteta, sondom promjera 7 mm pri sljedećim procesnim parametrima: maksimalna izlazna snaga 400 W, frekvencija 30 kHz, amplituda 95 %, ciklus 1 i vrijeme 5, 10 i 15 min (Slika 7).



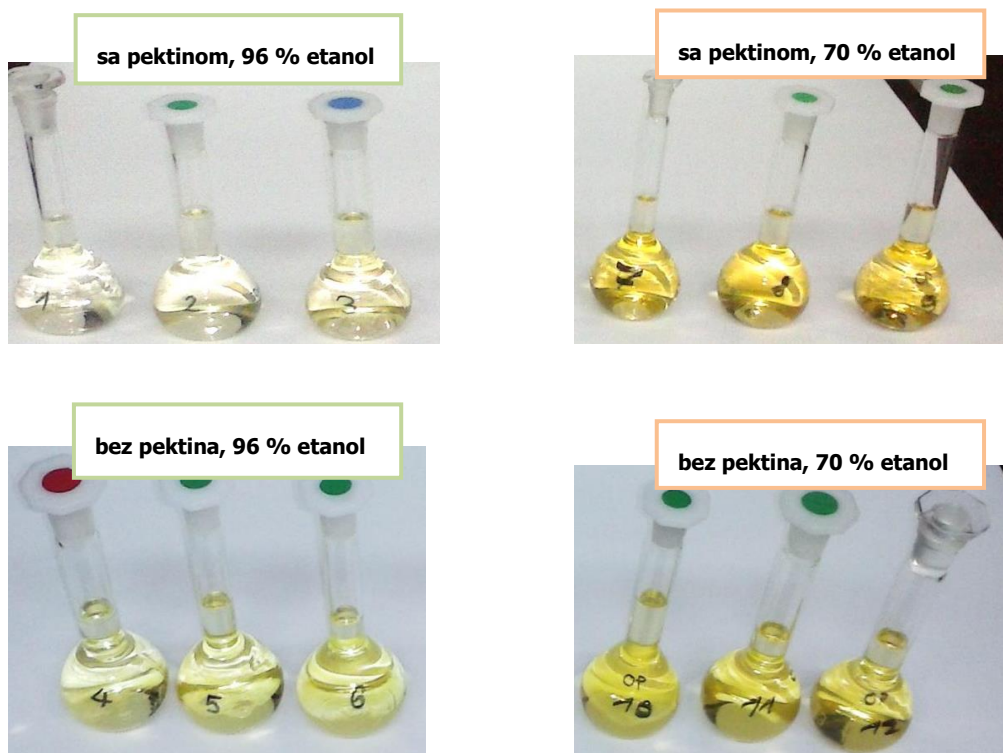
Slika 6. Ekstrakcija kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta (vlastita fotografija).



Slika 7. Shematski prikaz postupka ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta.

Nakon završene ekstrakcije ultrazvukom kora rajčice je kvantitativno prenešena i ručno stiješnjena kroz gazu. Procijeđena suspenzija je filtrirana, a potom i centrifugirana 15 min na 4000 ω /min. Dobiveni centrifugat je filtriran u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjen

otapalom korištenim za ekstrakciju (96 i 70 % etanol). Ekstrakti kore rajčice (Slika 8) čuvani su u hladnjaku do početka analize na + 4 °C, a opis analiziranih uzoraka prikazuje Tablica 1.



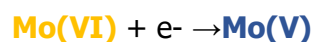
Slika 8. Ekstrakti kore rajčice (sa i bez pektina) u 96 i 70 % etanolu dobiveni ultrazvukom visokog intenziteta u vremenu od 5, 10 i 15 min (vlastita fotografija).

Tablica 1. Analizirani uzorci ekstrakata kore rajčice (sa i bez pektina) u 96 i 70 % etanolu.

Oznaka uzorka	φ (etanol)/%	t (ekstrakcije)/min	Kora rajčice
TP-1	96	5	SA PEKTINOM
TP-2		10	
TP-3		15	
TP-4		5	BEZ PEKTINA
TP-5		10	
TP-6		15	
TP-7	70	5	SA PEKTINOM
TP-8		10	
TP-9		15	
TP-10		5	BEZ PEKTINA
TP-11		10	
TP-12		15	

3.3.2. Princip spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ekstrahirane kore rajčice određen je Folin-Ciocalteu metodom (Agbor i sur., 2014.) koja se temelji na kemijskoj reakciji oksidacije fenolnih spojeva u lužnatoj sredini smjesom fosfomolibdenske kiseline (FC otopina) i redukcije istih u smjesu volframovog i molibdenovog oksida.



Uslijed redukcije FC otopine i stvaranja kompleksa s fenolnim spojevima, otopina analita postaje plavo obojena, a njen intenzitet ovisi o koncentraciji fenolnih spojeva u uzorku. Intenzitet boje, točnije apsorbancija otopine mjeri se spektrofotometrom na valnoj duljini od 760 nm.

3.3.3. Princip spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima ekstrahirane kore rajčice određen je aluminij klorid - spektrofotometrijskom metodom (Pekal i Pyrzynska, 2014; Pallab i sur., 2013) koja se temelji na kemijskoj reakciji stvaranja stabilnih aluminij - flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola. Vezanje aluminija na flavonoidne ligande (kelatni reagens) dovodi do stvaranja obojenih kompleksa, čiju apsorbanciju mjerimo spektrofotometrom na valnoj duljini od 510 nm.

3.3.4. Priprava otopina za određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Sve otopine pripremljene su s kemikalijama *p.a.* čistoće u deioniziranoj vodi.

Otopine korištene pri određivanju ukupnih fenola su:

- Zasićena otopina bezvodnog natrijeva karbonata (20 %, *w/v*) pripravljena je otapanjem 200 g bezvodnog Na_2CO_3 u 800 mL vruće deionizirane vode. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, otopina se prebaci u odmjernu tikvicu od 1000 mL, doda nekoliko kristalića bezvodnog Na_2CO_3 , te nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Nakon 24 h stajanja na sobnoj temperaturi, otopina se profiltrira.
- Otopina Folin-Ciocalteu (FC) reagensa množinske koncentracije 0,2 mol/L pripravljena je razrjeđivanjem FC reagensa, množinske koncentracije 2,0 mol/L.
- Ishodna otopina galne kiseline masene koncentracije 5 g/L pripravljena je otapanjem 0,2500 g galne kiseline u 10 mL 96 % etanola, a potom je otopina nadopunjena deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici od 50 mL.
- Individualne (pojedinačne) standardne otopine galne kiseline masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 150 i 180 mg/L pripremljene su razrjeđivanjem ishodne otopine galne kiseline u odmjernim tikvicama od 100 mL s deioniziranom vodom.

Otopine korištene pri određivanju ukupnih flavonoida su:

- Otopine natrijeva nitrita (5 %, *w/v*), aluminijeva klorida (10 %, *w/v*) i natrijeva hidroksida ($c = 1$ mol/L) pripravljene su vaganjem i otapanjem NaNO_2 , AlCl_3 i NaOH u odmjernim tikvicama od 100 mL, te nadopunjavanjem s destiliranom vodom do oznake.
- Ishodna otopina rutina masene koncentracije 1 g/L pripravljena je otapanjem 0,1000 g rutina u 96 % metanolu, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Individualne (pojedinačne) standardne otopine rutina masenih koncentracija 5, 20, 40, 60, 80, 100 i 120 mg/L pripremljene su razrjeđivanjem ishodne otopine rutina u odmjernim tikvicama od 100 mL s 96 %-tnim metanolom.

3.3.5. Postupak određivanja ukupnih fenola i flavonoida

Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida sastojao se iz dva dijela. U prvom dijelu eksperimenta izrađen je baždarni dijagram (a), a u drugom dijelu uzorci ekstrahirane kore rajčice pripremljeni su za analizu (b) prema u nastavku opisanim propisima.

3.3.5.1. Ukupni fenoli

- a)** 1 mL pripremljenih individualnih standardnih otopina galne kiseline, otpipetiran je u odmjernu tikvicu od 25 mL, potom je dodano 10 mL deionizirane vode i 1,3 mL FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol/L}$). Nakon 5 min otopini je dodano 3,75 mL 20 % Na_2CO_3 i nadopunjeno deioniziranom vodom do oznake. Priređene otopine ostavljene su 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i njihovih poznatih masenih koncentracija konstruiran je baždarni dijagram. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda.
- b)** Uzorci ekstrahirane kore rajčice (Slika 8, Tablica 1) koji sadrže nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola priređeni su za mjerenje apsorbancije na isti način kao i individualne standardne otopine opisane pod a). Umjesto 1 mL individualne standardne otopine uzeto je 2 mL ekstrahirane kore rajčice.

3.3.5.2. Ukupni flavonoidi

- a)** 1 mL pripremljenih individualnih standardnih otopina rutina, otpipetirano je u kivete, potom je svakoj otopini dodano 2 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 . Nakon 5 min stajanja na sobnoj temperaturi dodano je 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 , a nakon 6 min i 2 mL otopine NaOH ($c = 1 \text{ mol/L}$). Priređene otopine su promještane na Vorteksu, centrifugirane 15 min na 4000 °/min i profiltrirane, a potom im je izmjerena apsorbancija na 510 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i njihovih poznatih masenih koncentracija konstruiran je baždarni dijagram. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda.
- b)** Uzorci ekstrahirane kore rajčice (Slika 8, Tablica 1) koji sadrže nepoznate masene koncentracije ukupnih flavonoida priređeni su za mjerenje apsorbancije na isti način kao i individualne standardne otopine opisane pod a). Umjesto 1 mL individualne standardne otopine uzeto je 2 mL ekstrahirane kore rajčice.

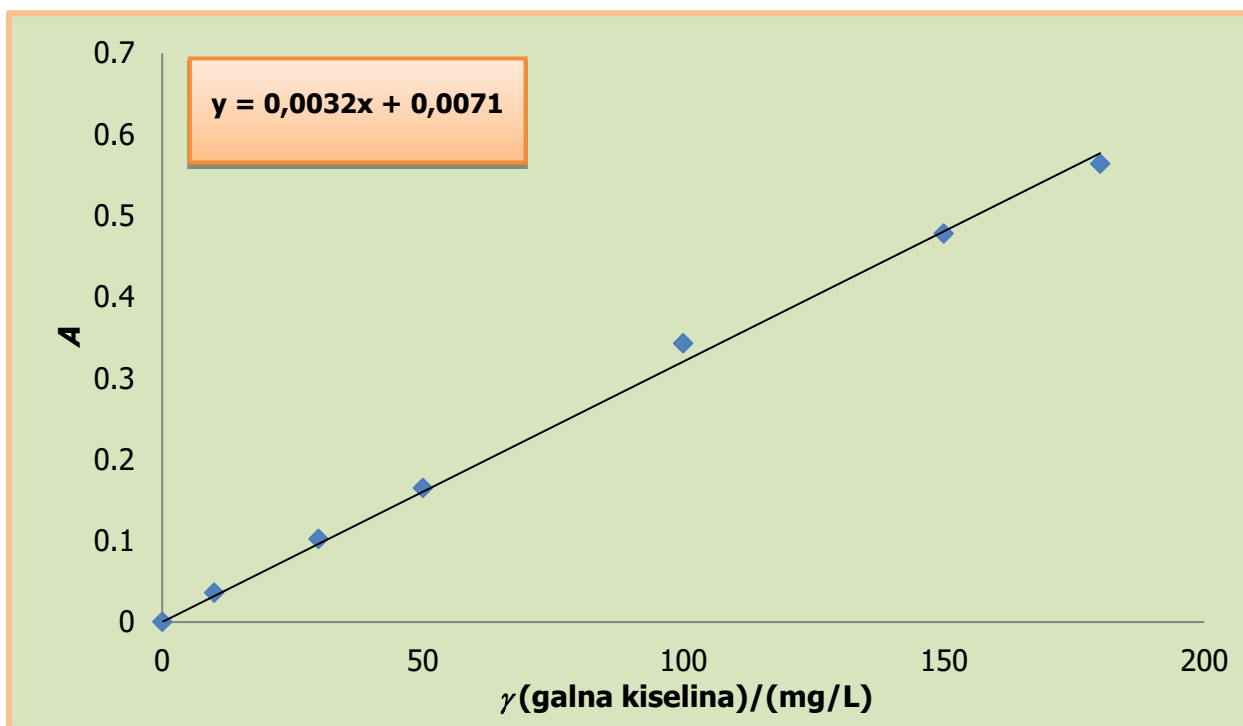
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u 70 i 96 %-tnim etanolnim ekstraktima osušene kore rajčice sa i bez pektina dobivenim upotrebom ultrazvuka visokog intenziteta, u vremenu od 5, 10 i 15 min.

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola i flavonoida u 70 i 96 %-tnim etanolnim ekstraktima osušene kore rajčice bilo je potrebno izraditi baždarne dijagrame. Tablice 2 i 3 prikazuju prikazuju vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline, odnosno rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih su izrađeni baždarni dijagrami (Slike 9 i 10). Iz regresijskih pravaca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida izraženi su kao mg galne kiseline, odnosno mg rutina na 1 g ekstrahirane osušene kore rajčice.

Tablica 2. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 760 nm.

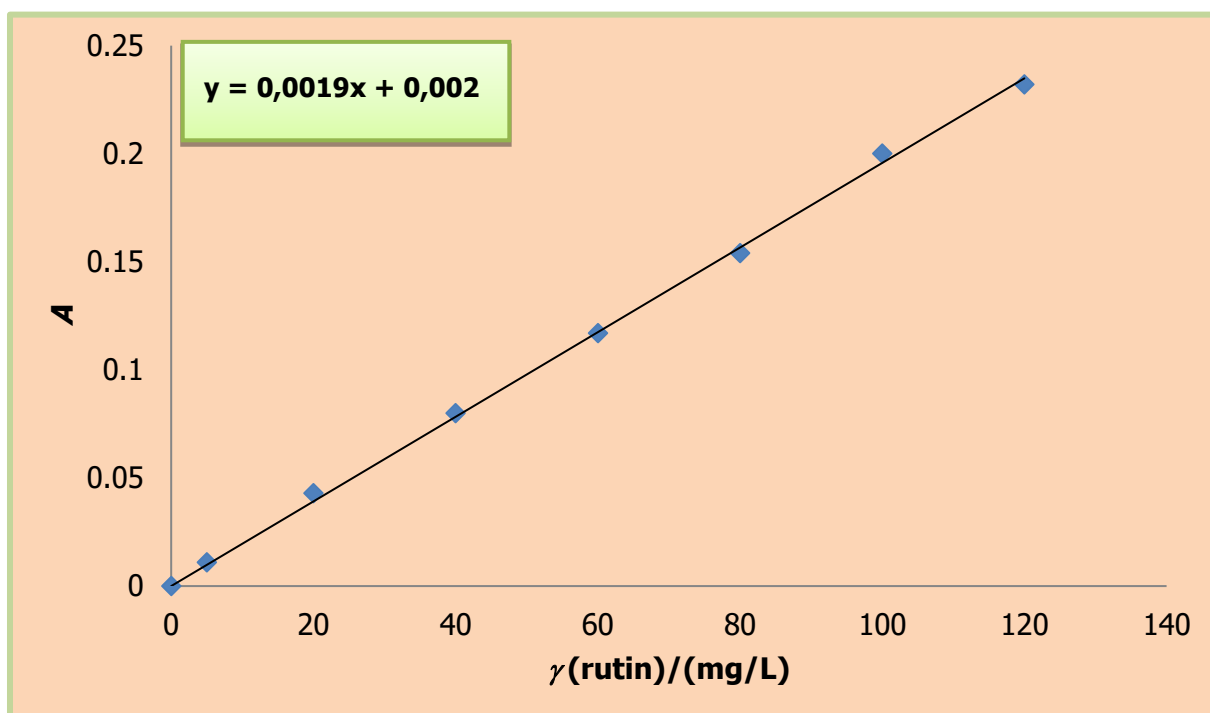
Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	A
0	0	0,000
1	10	0,036
2	30	0,102
3	50	0,165
4	100	0,343
5	150	0,478
6	180	0,564



Slika 9. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih 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	0,043
3	40	0,080
4	60	0,118
5	80	0,156
6	100	0,200
7	120	0,232



Slika 10. Baždarni dijagram rutina.

U Tablicama 4 i 5 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u 70 i 96 %-tnim etanolnim ekstraktima osušene kore rajčice dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom u vremenu od 5, 10 i 15 min, sondom promjera 7 mm.

Tablica 4. Apsorbacija, masena koncentracija i maseni udio ukupnih fenola (UF) u uzorcima kore rajčice (sa i bez pektina) ekstrahiranih ultrazvukom visokog intenziteta u vremenu od 5, 10 i 15 min, sondom promjera 7 mm.

t (ekstrakcije)/min	Uzorak	$A \pm SD$	$\gamma(UF)/(mg/L) \pm SD$	$w(UF)/(mg/g) \pm SD$
Etanol, 96 %				
KORA RAJČICE SA PEKTINOM				
5	TP-1	0,054±0,001	184,18±1,95	9,21±0,10
10	TP-2	0,072±0,001	252,54±1,96	12,63±0,10
15	TP-3	0,076±0,001	268,16±3,74	13,41±0,19
KORA RAJČICE BEZ PEKTINA				
5	TP-4	0,049±0,001	163,67±3,19	8,18±0,16
10	TP-5	0,064±0,001	222,27±4,51	11,12±0,23
15	TP-6	0,068±0,001	235,94±2,26	11,80±0,11
Etanol, 70 %				
KORA RAJČICE SA PEKTINOM				
5	TP-7	0,196±0,001	737,89±4,51	36,90±0,23
10	TP-8	0,206±0,001	776,95±3,19	38,85±0,16
15	TP-9	0,207±0,002	781,84±6,67	39,09±0,33
KORA RAJČICE BEZ PEKTINA				
5	TP-10	0,105±0,001	382,42±3,19	19,12±0,16
10	TP-11	0,112±0,004	401,97±0,03	20,10±0,00
15	TP-12	0,122±0,003	444,92±3,91	22,64±0,51

$N = 3$

Tablica 5. Apsorbacija, masena koncentracija i maseni udio ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima kore rajčice (sa i bez pektina) ekstrahiranih ultrazvukom visokog intenziteta u vremenu od 5, 10 i 15 min, sondom promjera 7 mm.

<i>t</i> (ekstrakcije)/min	Uzorak	<i>A</i> ± SD	γ (UFL)/(mg/L)±SD	<i>w</i> (UFL)/(mg/100 g) ± SD
Etanol, 96 %				
KORA RAJČICE SA PEKTINOM				
5	TP-1	0,016±0,001	25,05±2,53	1,25±0,13
10	TP-2	0,024±0,000	39,37±0,00	1,97±0,00
15	TP-3	0,027±0,000	44,74±0,00	2,24±0,00
KORA RAJČICE BEZ PEKTINA				
5	TP-4	0,014±0,001	22,07±2,07	1,10±0,10
10	TP-5	0,022±0,001	33,11±1,27	1,66±0,06
15	TP-6	0,023±0,000	37,58±0,00	1,88±0,00
Etanol, 70 %				
KORA RAJČICE SA PEKTINOM				
5	TP-7	0,056±0,001	95,74±1,27	4,79±0,06
10	TP-8	0,058±0,001	99,32±1,27	4,97±0,06
15	TP-9	0,062±0,001	108,26±1,27	5,41±0,06
KORA RAJČICE BEZ PEKTINA				
5	TP-10	0,047±0,000	80,53±0,00	4,03±0,00
10	TP-11	0,044±0,000	75,16±0,00	3,76±0,00
15	TP-12	0,039±0,000	66,21±0,00	3,31±0,00

N = 3

Uspoređujući utjecaj otapala na ekstrakciju možemo uočiti da je kod 70 %-tnih ekstrakata kore rajčice dobiven veći udio ukupnih fenola, u odnosu na 96 %-tne ekstrakte. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 36,9 do 39,1 mg/g za uzorke sa pektinom, te 19,12 do 22,64 mg/g za uzorke bez pektina.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u 70 i 96 %-tnim ekstraktima kore rajčice vidljivo je da se kod ekstrakcije koja je trajala 5 min dobije najmanji, a kod 15 min najveći maseni udio ukupnih fenola. Dakle, uz 70 %-tni etanol i vrijeme ekstrakcije od 15 min ostvarena je maksimalna učinkovitost ekstrakcije, a maseni udjeli dobiveni pri tim parametrima su 39,1 mg/g (sa pektinom) i 22,64 mg/g (bez pektina). Tome svakako pridonose i promjene temperature (ΔT) izmjerene prije i nakon ekstrakcije kore rajčice u odgovarajućem otapalu (Tablica 6). One iznose 37,2 °C (TP-9), odnosno 40,6 °C (TP-12). Općenito, promjene temperature kreću se u području od 32,7 do 40,6 °C s obzirom na vrstu uzoraka, upotrijebljeno otapalo i vrijeme ekstrakcije. Te neznatno izražene promjene temperature između uzoraka ekstrahiranih 5, 10 i 15 min (npr. kora rajčice sa pektinom, 70 %-tni etanol) očito utječu i na vrlo slične dobivene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola (36,9, 38,9 i 39,1 mg/100 g).

Tablica 6. Izmjerene vrijednosti temperatura prije (T_0) i nakon (T_k) ultrazvučne ekstrakcije uzoraka kore rajčice (sa i bez pektina) u vremenu od 5, 10 i 15 min, sondom promjera 7 mm.

Uzorak	φ (etanol)/%	t (ekstrakcije)/min	Kora rajčice	T_0 /°C	T_k /°C	ΔT /°C
TP-1	96	5	SA PEKTINOM	22,2	55,5	33,3
TP-2		10		21,9	56,8	34,9
TP-3		15		23,3	55,8	35,5
TP-4		5	BEZ PEKTINA	22,3	55,6	33,3
TP-5		10		21,8	54,5	32,7
TP-6		15		22,3	55,6	33,3
TP-7	70	5	SA PEKTINOM	22,3	55,2	32,9
TP-8		10		22,1	59,1	37,0
TP-9		15		22,8	60,0	37,2
TP-10		5	BEZ PEKTINA	22,3	55,3	33,0
TP-11		10		21,8	58,2	36,4
TP-12		15		21,9	62,5	40,6

Promatrajući utjecaj vrste uzoraka (kore rajčice sa ili bez pektina) jasno se vidi da kora rajčice sa pektinom sadrži veću količinu ukupnih fenola, u odnosu na onu bez pektina, bilo da se radi o 70 ili 96 %-tnim ekstraktima. Budući da je iz kore rajčice uklonjen pektin djelovanjem oksalne

kiseline/amonijeva oksalata, niže dobivene vrijednosti kod ove vrste uzoraka bile su i očekivane jer se tijekom postupka uklanjanja pektina i jedan dio polifenola ko-ekstrahirao (Ninčević Grassino i sur., 2016).

Kod ukupnih flavonoida možemo zamijetiti da je optimalna kombinacija parametara ekstrakcije (70 %-tni etanol, vrijeme 15) identična onoj dobivenoj kod ekstrakcije ukupnih fenola iz kore rajčice sa pektinom. Za koru rajčice bez pektina, vrijeme ekstrakcije od 5 min i 70 %-tni etanol pokazali su se boljim izborom, a vrijednost dobivenog masenog udjela iznosi 4,03 mg/g.

Sadržaj ukupnih flavonoida veći je kod 70 %-tnih ekstrakata u odnosu na 96 %-tne ekstrakte osušene kore rajčice, a dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 4,79 do 5,41 mg/g (sa pektinom) i 3,31 do 4,03 mg/g (bez pektina).

Dobiveni rezultati masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida su u skladu s rezultatima Savatović i sur. (2010) koji dobivaju vrijednosti od 11,41 mg/g, odnosno 4,03 mg/g za koru rajčice podvrgnutu ultrazvučnoj ekstrakciji u 80 %-tnom etanolu. George i sur. (2004) dobivaju vrijednosti ukupnih fenola u rasponu od 10,4 do 40,0 mg/100 g, a Toor i Savage (2005), 22,0 i 29,1 mg galne kiseline/100 g svježe sjemenke, odnosno kore rajčice. Uspoređujući i ove radove može se zaključiti da ultrazvučna ekstrakcija s 96 %-tnim, a pogotovo 70 %-tnim etanolom daje zadovoljavajuće iskorištenje ukupnih fenola i flavonoida.

5. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem pokazana je mogućnost iskorištavanja kore rajčice, biosupstrata nastalog u procesu obrade rajčice, pri izolaciji polifenola, važnih za zdravlje ljudi i životinja.

Prema dobivenim rezultatima mjerenja možemo zaključiti da je 70 %-tni etanol pogodnije otapalo za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida u odnosu na 96 %-tni etanol, kod ekstrakcije kore rajčice (sa i bez pektina) ultrazvukom.

Dulje vrijeme ekstrakcije (15 min) pogodovalo je ekstrakciji ukupnih fenola i flavonoida u 70 i 96 %-tnim etanolnim ekstraktima kore rajčice, osim u slučaju 70 %-tnog etanolnog ekstrakta bez pektina gdje je sadržaj ukupnih flavonoida bio manji nego kod vremena ekstrakcije od 5 min.

Iako se ultrazvučna ekstrakcija pokazala dobrim izborom s obzirom na jednostavnost i brzinu izvedbe, daljnja istraživanja trebala bi se provesti korištenjem sonda većih promjera kako bi se pri kraćim vremenima (< 15 min) dobili relativno visoki prinosi polifenola.

6. POPIS LITERATURE

- Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science* **8**: 147 - 156.
- 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.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Polyphenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 - 203.
- Ćetković G., Savatović S., Čanadanović-Brunet J., Djilas S., Vulić J., Mandić A., Četojević-Simin D. (2012) Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry* **133**: 938 - 945.
- El-Malah M. H., Hassanein M. M. M., Areif M. H., Al-Amrousi E. F. (2015) Utilization of Egyptian Tomato Waste as a Potential Source of Natural Antioxidants Using Solvents, Microwave and Ultrasound Extraction Methods. *American Journal of Food Thechnology* **10**: 14 - 25.
- Harvey D. (2009) Analitical Chemistry, 2. izd., McGraw-Hill. str. 517 – 639. Digitalni udžbenik dostupan preko poveznice:
<http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html> Prispupljeno 30. Kolovoza 2017.
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821 - 1835.
- Kalogeropoulos N., Chiou A., Pyriochou V., Peristeraki A., Karathanos V. T. (2012) Bioactive phytochemicals in idustrial tomatoes and their proccesing byproducts. *Food Science and Thechnology* **49**: 213 - 216.
- Khan M. K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A., Dangles O., Chemat F. (2010) Ultrasoud-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* **119**: 851 - 858.
- Lavelli V., Torresani M. C. (2011) Modelling the stability of lycopene-rich by-products of tomato processing. *Food Chemistry* **125**: 529 - 535.

Ninčević Grassino A., Halambek J., Djaković S., Rimac B. S., Dent M., Grabarić Z. (2016) Utilisation of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids* **52**, 265 - 274.

Pallab K., Tapan K. B., Tapas K. P., Ramen K. (2013) Estimation of total flavonoids content (TFC) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* **3**: 33 - 37.

Pekal A., Pyrzynska K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* **7**: 1776 - 1782.

Rastija, V., Medić-Šarić M. (2009) Kromatografske analize polifenola. *Kemija u industriji* **58**: 121 - 128.

Savatović S., Četković G. S., Čanadanović-Brunet J. M., Djilas S. M. (2010) Utilisation of tomato waste as a source of polyphenolic antioxidants. *Acta Periodica Technologica* **41**: 187 - 194.

Toor R. K., Savage G. P. (2005) Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International* **38**: 487 - 494.

Wijngaard H., Hossain M. B., Rai D. K., Brunton N. (2012) Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International* **46**: 505 - 513.

Izjava o izvornosti

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

Licenzia Kilibet

ime i prezime studenta