Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima kore mandarine (Citrus reticulata)

Kapitanović, Josipa

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:159:461133

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Josipa Kapitanović

7104/BT

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U ACETONSKIM EKSTRAKTIMA KORE MANDARINE (*Citrus reticulata*)

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTCIJSKA 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 etanolnim ekstraktima kore mandarine (*Citrus reticulata*)

Josipa Kapitanović, *0058207367*

Sažetak: U ovom radu proučavana je efikasnost ekstrakcije polifenola iz kore mandarinke, nusproizvoda nastalog tijekom postupka obrade mandarinke. Ekstrakcija je provedena refluksiranjem (1,5 h) na uzorcima usitnjene, svježe kore mandarinke primjenom vode, vodenih otopina etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 96 %-tnog etanola. Maseni udio ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u ekstraktima kore mandarinke određen je UV/Vis spektrofotometrijskom metodom. Dobiveni rezultati su pokazali da maseni udio polifenola u pripravljenim ekstraktima raste s povećanjem volumnog udjela etanola. Budući da su 50 i 70 %-tne vodene otopine etanola najefikasnija ekstrakcijska sredstva pri izolaciji UF i UFL, ove otopine će se koristiti u daljnjim postupcima ekstrakcije polifenola primjenom novih, inovativnih tehnika.

Ključne riječi: ekstrakcija refluksiranjem, kora mandarine, polifenoli, UV/Vis spektrofotometrija
Rad sadrži: 21 stranicu, 9 slika, 8 tablica,11 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i električnom 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:18. 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 Analitical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Spectrophotometric determination of polyphenols from etanolic extracts of tangerine peel (*Citrus reticulata*)

Josipa Kapitanović, 0058207367

Abstract: In this work was determined the efficiency of polyphenols extraction from tangerine peel, by-product produced during the tangerine processing. Extraction was performed by refluxing (1,5 h) on samples of grinded, fresh tangerine using water, water solution of ethanol (φ = 25, 50 and 70 %, *v*/*v*) and 99 % ethanol. Mass fractions of total phenols (TP) and flavonoids (TFL) in tangerine peel extracts was determined by UV/Vis spectrophotometric method. The obtained results showed that the mass fraction of polyphenols in prepared tangerine peel extracts arise with increases of volume fractions of ethanol. Due to the fact that 50 and 70 % solution of ethanol are most efficient extraction medium for TP and TFL isolation, these solutions will be used in the further procedure of polyphenols extraction applying new, innovative techniques.

Keywords: extraction by refluxing, polyphenols, tangerine peel, UV/Vis spectrophotometry
Thesis contains:21 pages, 9 figures, 8 tables,11 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:18th of September, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2.1. Kora mandarine 2
2.2. Polifenoli 3
2.2.1. Fenolne kiseline 4
2.2.2. Flavonoidi 4
2.3. Ekstrakcija 5
2.3.1. Ekstrakcija refluksiranjem 5
2.4. UV/Vis spektrofotometrija 6
3. MATERIJALI 8
3.1. Materijal 8
3.2. Kemikalije 8
3.3. Aparatura i pribor 8
3.4. Metode rada 9
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka kore mandarine refluksiranjem 9
3.4.2. Određivanje boje i vlažnosti 10
3.4.3.Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida 11
3.4.3.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola: 11
3.4.3.2. Postupak određivanja ukupnih fenola 11
3.4.3.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida 12
3.4.3.4. Postupak određivanja ukupnih flavonoida 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 14
4.1. Određivanje boje i vlažnosti 14
4.2.Određivanje ukupnih fenola i flavonoida 15
5. ZAKLJUČAK 20
6. POPIS LITERATURE 21

1. UVOD

Polifenoli su organske molekule molekulske mase od 500 do 4000 Da, a građeni su od međusobno povezanih fenolnih jedinica. To su sekunadrni biljni metaboliti sintetizirani u stresnim uvjetima, a biljci služe za rast,razmnožavanje,obranu od patogena te štetnog UV zračenja (Manach i sur., 2004.). Osnovno djelovanje im se zasniva na sprječavanju nastanka veoma reaktivnih slobodnih radikala i na temelju toga omogućuju prevenciju raznih bolesti u biljkama i čovjeku. Nalaze se u voću (osobito citrusnom i bobičastom), povrću i napitcima poput kave,kakaa i crnog vina.

Polifenoli imaju brojne blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje poput spriječavanja nastanka i razvoja raka, neurodegenerativnih te kardiovaskularnih bolesti, a omogućuju i zaštitu od štetnog ultraljubičastog zračenja. Međutim, biodostupnost polifenola je relativno niska zbog slabe apsorpcije u probavnom sustavu i ovisi o vrsti spoja, kemijskoj strukturi, opsegu konjugacije i individualnosti crijevne mikrobiote (Shivashankara i Acharya, 2010.). Topljivi su u vodi te imaju izraženu antioksidativnu aktivnost,a to ih je učinilo predmetom brojnih istraživanja u svrhu zamjene umjetnih antioksidansa čija upotreba može imati negativne posljedice na organizam čovjeka.

U ovom radu su opisane strukturne karakteristike polifenola s glavnim podskupinama flavonoidima i fenolnim kiselinama. Kao izvor polifenola korištena je kora mandarine koja je nusprodukt proizvodnje sokova iz mandarine, stoga je u ovom radu upotrebljena kao lako dostupna i jeftina sirovina za istraživanje udjela polifenola u biootpadu. Cilj eksperimentalnog dijela rada je bio: utvrditi koji volumni udjeli etanola u vodenoj fazi, utječu na najbolju ekstrakciju polifenola iz kore mandarine, metodom refluksiranja.

U skladu s postavljenim ciljem, provedeno istraživanje sastojalo se iz:

- priprave ekstrakata kore mandarine primjenom refluksiranja kao konvencionalne metode ekstrakcije s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 96 %-tnog etanola
- određivanja ukupnih fenola i flavonoida u pripravljenim ekstraktima kore mandarine upotrebom spektrofotometrije u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kora mandarine

Predmet istraživanja ovog rada je kora mandarine (Slika 1.) koja je izuzetno bogata vitaminima, mineralima i polifenolima te se koristi kao sirovina istih u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Mandarina (lat. *Citrus reticulata*) je zimzelena biljka iz porodice *Rutaceae*, a pripada rodu *Citrusa*. S obzirom na svoju osjetljivost na hladnoću, najbolje uspjeva u suptropskim krajevima, a u Hrvatskoj se uzgaja u dolini Neretve. Zbog velikog udjela kalcija, kalija, magnezija, te vitamina C u svom kemijskom sastavu (Tablica 1., Šatalić i sur., 2013.), ima mnogo blagodati na organizam čovjeka poput jačanja imuniteta, bržeg zacijeljivanja rana, spriječavanja degenerativnih bolesti, očuvanja vida i ubrzavanja metabolizma.



Slika 1. Mandarina (lat. *Citrus reticulata*)

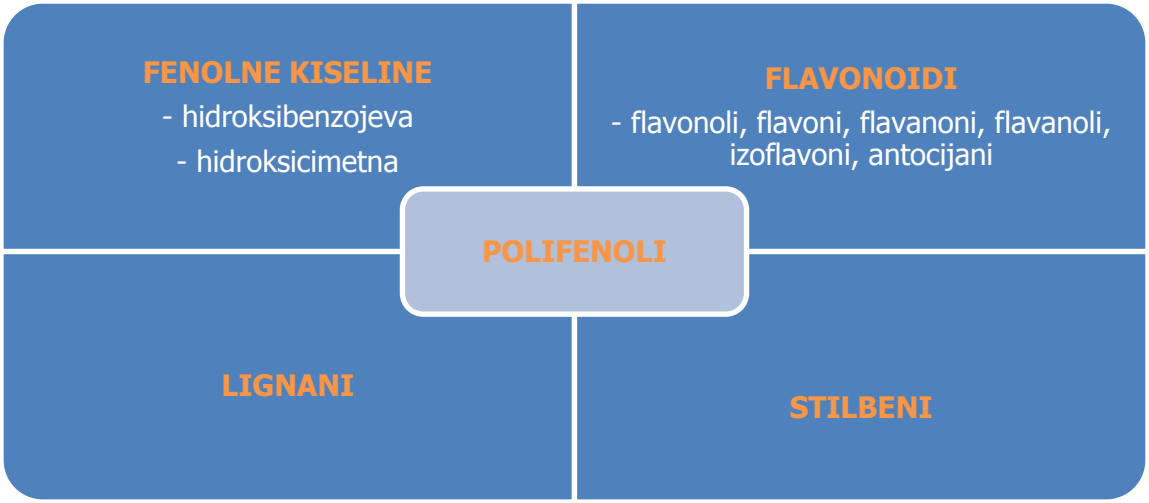
Tablica 1. Kemijski sastav mandarine (Šatalić i sur., 2013.).

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

2.2. Polifenoli

Polifenoli su široko rasprostranjena, heterogena grupa sekundarnih biljnih metabolita i čine jednu od najvažnijih skupina prirodnih antioksidansa. Oni dolaze u različitim oblicima i koncentracijama, ovisno o namirnici, a procjena dnevnog unosa je između 3 i 70 mg (Russo i sur., 2000.). Daleko najveći izvor polifenola upravo su biljke, pa je tako više od 8000 polifenolnih sastavnica otkriveno u raznim biljnim vrstama (Pandey i sur., 2009.). Na sastav i količinu polifenolnih spojeva u biljkama utječu okolišni uvjeti kao što su količina dostupne svjetlosti, temperatura, količina vode, sastav tla, uvjeti dozrijevanja, a potom i uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Svedstrom i sur., 2006.). S obzirom na to da se svakodnevno unose u organizam putem hrane te imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjeka, njihova biološka aktivnost se sve više istražuje.

Polifenoli obuhvaćaju veliku skupinu organskih spojeva koja se može podijeliti u četiri skupine, a to su: fenoli, flavonoidi, lignani i stilbeni. One se potom dalje dijele u veliki broj manjih podskupina (Slika 2.). U poglavljima 2.2.1. i 2.2.2. biti će pobliže opisane skupine fenoli i flavonoidi, koji su ujedno i predmet ovog rada.



Slika 2. Podjela polifenola po skupinama i podskupinama

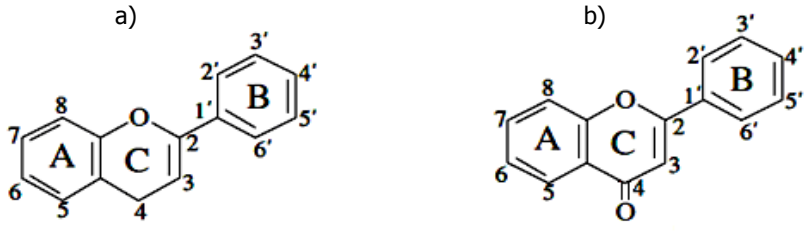
2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine gotovo trećinu ukupnih fenola te imaju različite funkcije u biljkama, uključujući asimilaciju hranjivih tvari, sintezu proteina, aktivnost enzima i antioksidacijsko djelovanje. Generalno se dijele na derivate benzoične te derivate cinaminske (ili cimetne) kiseline (Manach i sur., 2004; Pandey i sur., 2009). Hidroksicinaminske kiseline se najčešće nalaze u vezanom obliku odnosno u glikoziliranim oblicima ili kao esteri kviniske, šikiminske i tartarne kiseline. Voće koje ih sadrži najviše su borovnice, kivi, šljive, višnje i jabuke (Manach i sur., 2004). Za razliku od hidroksicinaminskih, hidroksibenzoične kiseline se rijetko kada nalaze u jestivom voću, a iznimka su crveno voće i luk.

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su velika i istraživačima izuzetno zanimljiva skupina polifenola. Osnovna kemijska struktura flavonoida se sastoji od 15 atoma ugljika, koji su povezani u jezgru od tri fenolna prstena: A, B i C (Tapas i sur., 2008).

Flavonoidi se dalje dijele na šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavononi, flavanoli, antocijani i izoflavoni (Manach i sur., 2004.; Pandey i sur., 2009.). Najčešći predstavnici flavonoida u prehrani su kvercetin, miricetin, katehini itd. (Pandey i sur., 2009). Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Antocijanini su najobilniji u crnom voću (borovnice, crni ribizl, crno grožđe) i crnom vinu; flavonoli u crvenom kupusu, kelju i brokuli; flavoni u peršinu i celeru; flavanoni u soku citrusnog voća; izoflavoni u sojinom brašnu i sjemenkama; a flavanoli u čokoladi, grahu i breskavama (Manach i sur., 2004).



Slika 3. Osnovna struktura flavanoida: a) flavan i b) okso-flavan jezgre (Kurtagić, 2017.)

2.3. Ekstrakcija

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili suhih uzoraka biološkog materijala. Često se prije same ekstrakcije biljni materijal usitnjava i homogenizira čemu mogu prethoditi operacije sušenja. Sušenje se može provoditi na zraku ili se provodi pri niskim temperaturama (liofilizacija). Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala obzirom na polarnost, vrijeme ekstrakcije i temperaturu,ali i o kemijskim te fizikalnim svojstvima samog uzorka. S obzirom da se i polifenolni spojevi međusobno razlikuju obzirom na kemijsku strukturu i svojstva, logično je da ne postoji jedinstvena metoda ekstrakcije kojom se svi polifenoli mogu ekstrahirati.

Ekstrakcija većine polifenolnih spojeva najčešće se provodi upotrebom organskih otapala, a najčešće korištena otapala su metanol, aceton, acetonitril, etanol i druga. Često se za ekstrakciju koriste i njihove kombinacije koje se u različitim omjerima miješaju s vodom, a upravo pravilan odabir otapala utječe na iskorištenje ekstrakcije polifenola. 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 superkritičnim fluidima i dr. (Azmir i sur., 2013). Prilikom ekstrakcije fenola i flavonoida za potrebe izrade ovog rada, proveli smo ekstrakciju metodom refluksiranja koja je opisana u sljedećem poglavlju.

2.3.1. 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.

2.4. UV/Vis spektrofotometrija

Spektroskopske instrumentalne metode služe za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva, a osnova njihovog rada je bazirana na interakciji elektromagnetskog zračenja sa uzorkom, pri čemu promatrana (mjerena) tvar emitira ili apsorbira točno određenu količinu zračenja koja se mjeri i interpretira (Pine, 1994.). U eksperimentalnom dijelu rada ukupni fenoli i flavonoidi određeni su UV/Vis spektrofotometrijskom metodom. To je analitička metoda koja se koristi prilikom identifikacije i određivanja organskih i anorganskih molekula koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 200 - 400 nm (UV područje), odnosno od 400 - 800 nm (Vis područje). Ima široku primjenu jer je nedestruktivna, pa uzorak koji ostaje sačuvan, a mjerenja se mogu izvoditi pri izrazito niskim koncentracijama analita. Mjerenje se provodi na uređaju koji se zove spektrofotometar (Slika 4). UV/Vis spektofotometari rade unutar područja valnih duljina od 200 do 800 nm, a sastoje se od izvora zračenja, monokromatora, spremnika za uzorak (kiveta), detektora i procesora signala. Nepoznata koncentracija analita se lako izračuna nakon izmjerene apsorbancije pomoću Lambert-Beerovog zakona koji glasi:

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon\, c\, l$$

gdje je A apsorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm mol), c koncentracija mol/L, l duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), I_0 je intenzitet ulazne zrake, a I intenzitet zrak nakon prolaska kroz uzorak. Odnos između apsorbancije i nepoznate koncentracije analita je linearan.

Tablica 2. Prikaz valnih duljina i energetskog raspona UV/Vis zračenja.

Spektralno područje	valna duljina (nm)	Raspon energije (kJ/ mol)
Ultraljubičasto	200 - 400	300 – 600
Vidljivo	400 - 800	150 – 300



Slika 4. UV/Vis spektrofotometar (vlastita fotografija)

3. MATERIJALI

3.1. Materijal

Kora mandarinke sakupljena u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska). Svježa kora mandarinke je oguljena, isjeckana i usitnjena u blenderu, a potom je smrznuta i čuvana do početka provođenja ekstrakcije refluksiranjem

3.2. Kemikalije

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram-mol, 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 µL (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka Japan)
- Magnetska mješalica
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Povratno hladilo

- Propipeta
- Staklene boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Staklene boce za čuvanje otopina uzoraka od 300 mL
- Staklene čaše od 50 i 100 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Staklene kivete
- Tikvica s okruglim dnom od 250 mL

3.4. Metode rada

U ovom radu korištene su slijedeće analitičke tehnike:

- ekstrakcija kore mandarinke metodom refluksiranja
- gravimetrijsko određivanje sadržaja vlage u uzorcima kore mandarinke
- određivanje *L*, *a* i *b* parametara boje u ekstraktima kore mandarinke
- UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarinke

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka kore mandarine refluksiranjem

Provedena je ekstrakcija polifenola metodom refluksiranja na uzorcima usitnjene, svježe kore mandarine. 5,000 g samljevenog uzorka ekstrahirana su s 100 mL vode, vodenih otopina etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnom. Ekstrakcija je trajala 1,5 h, na povišenoj temperaturi (temperatura vrelišta otapala). 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. Tako pripremljeni ekstrakti su do početka analize čuvani u hladnjaku na +4 °C (Slika 5).



Slika 5. Ekstrakti kore mandarine (osobna fotografija).

3.4.2. Određivanje sadržaja vlage u kori mandarinke

Postupak određivanja vlažnosti započeo je vaganjem uzoraka kore mandarinke u aluminijskim posudicama. Uzorci su potom stavljeni u sušionik na 105 °C 4 h. Nakon sušenja posudice s uzorkom su ohlađene u eksikatoru 1 h, a zatim su ponovno vagane. Postupak sušenja i vaganja ponavljan je više puta, sve dok nije dobivena konstantna, nepromijenjena masa (m_3). Udio vlage u uzorku izračunat je prema:

$$w\,(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

gdje je m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g), m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.4.3. Određivanje boje u etanolnim ekstraktima kore mandarinke

Boja ekstrakata kore mandarinke dobivena refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnim etanolom 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).

Dobivene vrijednosti etanolnih ekstrakata kore mandarinke uspoređene su sa vrijednostima izmjerenim za vodeni ekstrakt kore mandarinke (referentni uzorak).
Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka (L^*a^*b) prema:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

pri čemu se ΔL, Δa i Δb računaju tako da se od izmjerenih vrijednosti L, a i b za uzorke, oduzmu L, a i b vrijednosti dobivene za referentni uzorak vode.

3.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida

3.4.4.1. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola

- Otopina Folin-Ciocalteu reagensa (c = 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.
- Otopina natrijeva karbonata (20 %, *w*/*v*)
  200 g Na_2CO_3 otopljeno je u 800 mL ključale 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.

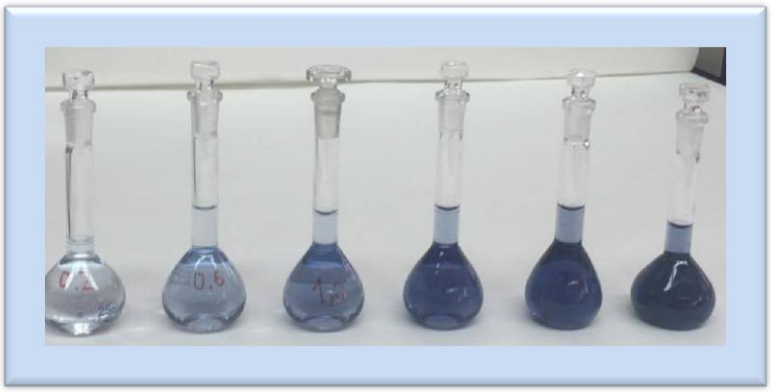
3.4.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Postupak određivanja ukupnih fenola sastojao se od izrade baždarnog dijagrama i određivanja masenog udjela fenola u etanolnim ekstraktima kore mandarine.
Za izradu baždarnog dijagrama priređena je ishodna standardna otopina galne kiseline tako da je odvagano 0,25 g galne kiseline i otopljeno u 10 mL etanola nakon čega je otopina kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 50 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 FC

reagensa (žuto obojan). Nakon 5 minuta dodano je 3,75 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake.

Tako priređene otopine (Slika 6) 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 otopine su pripremljene na isti način kao i za mjerenje apsorbancije standardnih otopina, ali umjesto 1 mL standarda otpipetirano je 0,4 mL uzorka. Za slijepu probu, upotrijebljena je destilirana voda (1 ili 0,4 mL).



Slika 6. Standardne otopine pripremljene za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (osobna fotografija).

3.4.4.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih flavonoida

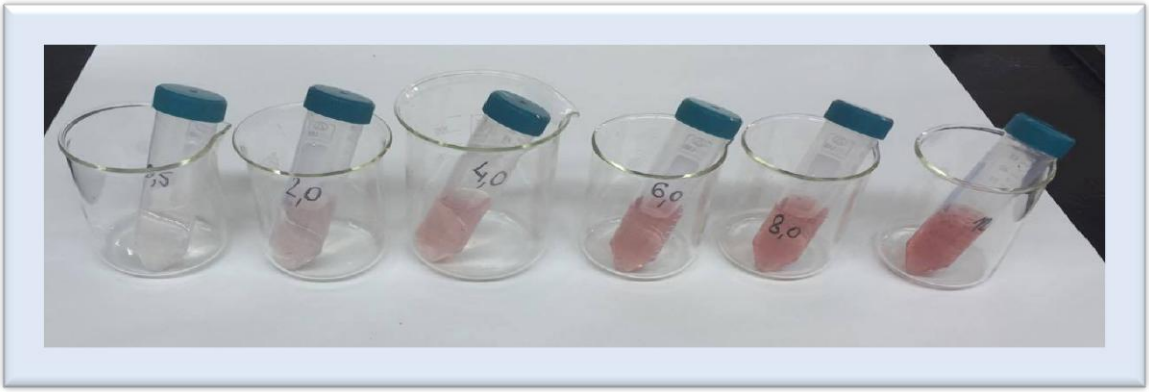
- Otopina natrijeva nitrita (5 %, *w*/*v*)
  Odvagano je 5 g $NaNO_2$ i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina aluminijeva klorida (10 %, *w*/*v*)
  Odvagano je 10 g $AlCl_3$ i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Otopina natrijeva hidroksida (c = 1 M)
  Odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 50 mL.

3.4.4.4. Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida također je bilo potrebno izraditi baždarni dijagram. U tu svrhu 0,1000 g rutina je otopljeno u 10 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, otpipetirano je 2,0 mL pojedine standardne otopine u staklene kivete, 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 minuta).

Nakon sljedećih 6 minuta 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 (Slika 7). Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 510 nm. Za mjerenje apsorbancije uzoraka, otopine su pripravljene na isti način kao i standardi, ali umjesto 2,0 mL standarda otpipetirano je 0,4 mL otopine uzorka. Slijepa proba je izmjerena upotrebom destlirane vode volumena 2 i 0,4 mL.



Slika 7. Standardne otopine pripremljene za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida (osobna fotografija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati određivanja sadržaja vlage u uzorcima kore mandarinke, boja i udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem u vremenu od 1,5 h s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnim etanolom.

4.1. Određivanje udjela vlage

Gravimetrijskom analitičkom metodom određen je sadržaj vlage u uzorcima svježe, usitnjene kore mandarinke. Nakon učestalog sušenja (4 h) i hlađenja u eksikatoru (1 h) konačna dobivena vrijednost udjela vlage za četiri paralelna određivanja iznosi 72,8724 ± 0,2244. (Tablica 3).

Tablica 3. Rezultati određivanja udjela vlage u uzorku usitnjene i osušene kore mandarine

Uzorak kore mandarine	*w* (vlage)/(%)	*w* (vlage)/(%) ± SD*
1-JK	73,0403	72,8724±0,2244
2-JK	72,8326	
3-JK	73,0462	
4-JK	72,5705	

*N = 4

4.2. Određivanje boje

Pripravljenim ekstraktima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem u vremenu od 1,5 h s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnim etanolom određena je boja, odnosno *L*, *a* i *b* parametri (Tablica 4).

Tablica 4. Parametri boje određeni u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine etanola i etanol) dobivenih refluksiranjem.

Uzorak	Otapalo	ρ (otapalo)/%	*L**	*a**	*b**	*ΔE*
1-JK	H_2O	/	96,43	-1,09	6,47	0
2-JK	Etanol	25	98,88	-2,39	7,24	2,88
3-JK		50	98,26	-4,4	14,18	8,59
4-JK		70	97,91	-6,2	21,9	16,32
5-JK		96	94,06	-7,83	77,77	71,66

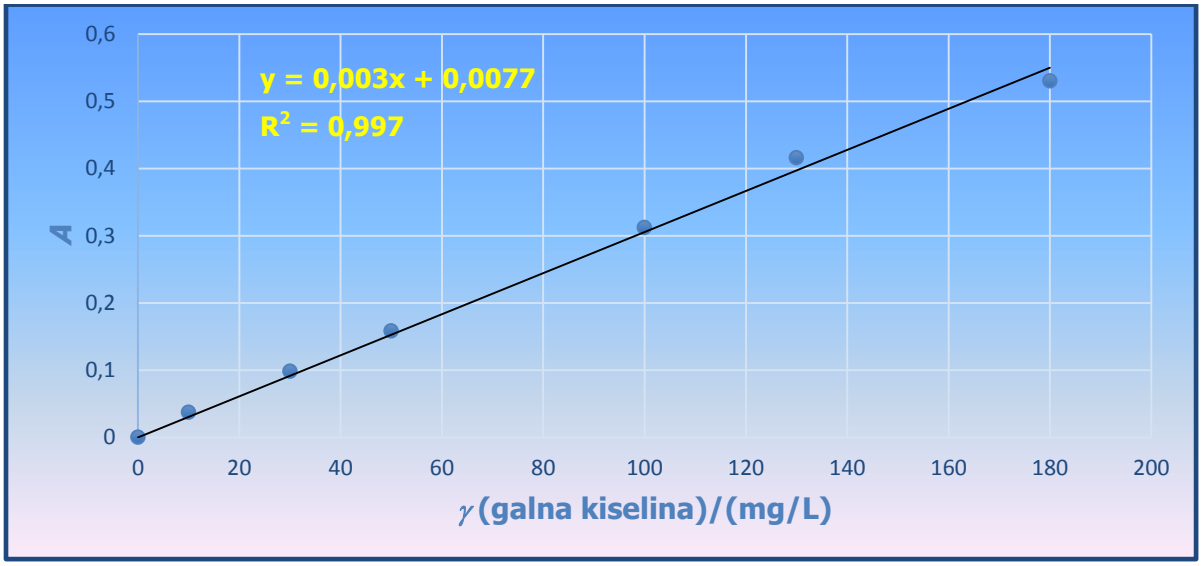
Iz rezultata prikazanih u Tablici 4 vidljivo je kako volumni udio otapala ima utjecaj na parametre boje. Vrijednosti parametara *L* i *a* opadaju s porastom volumnog udjela etanola, dok parametrar b pokazuje porast.
Najveća vrijednost parametara *L* i *a* je izmjerena kod 25 %-tnog etanola (*L* = 98,88), dok je najveća vrijednost parametra *b* izmjerena kod 96 %-tnog etanola (*b* = 77,77).

4.3. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Da bismo odredili nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u ekstraktima kore mandarine dobivenih ekstrakcijom refluksiranjem u vremenu od 1,5 h s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnim etanolom bilo je potrebno izraditi baždarne dijagrame. Tablice 5 i 6 prikazuju vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline, odnosno rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih su izrađeni baždarni dijagrami (Slika 8 i 9). Iz regresijskih pravaca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u ektrahiranim uzorcima. Maseni udjeli UF i UFL izraženi su kao mg galne kiseline, odnosno mg rutina na g ekstrahirane kore mandarine.

Tablica 5. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 760 nm.

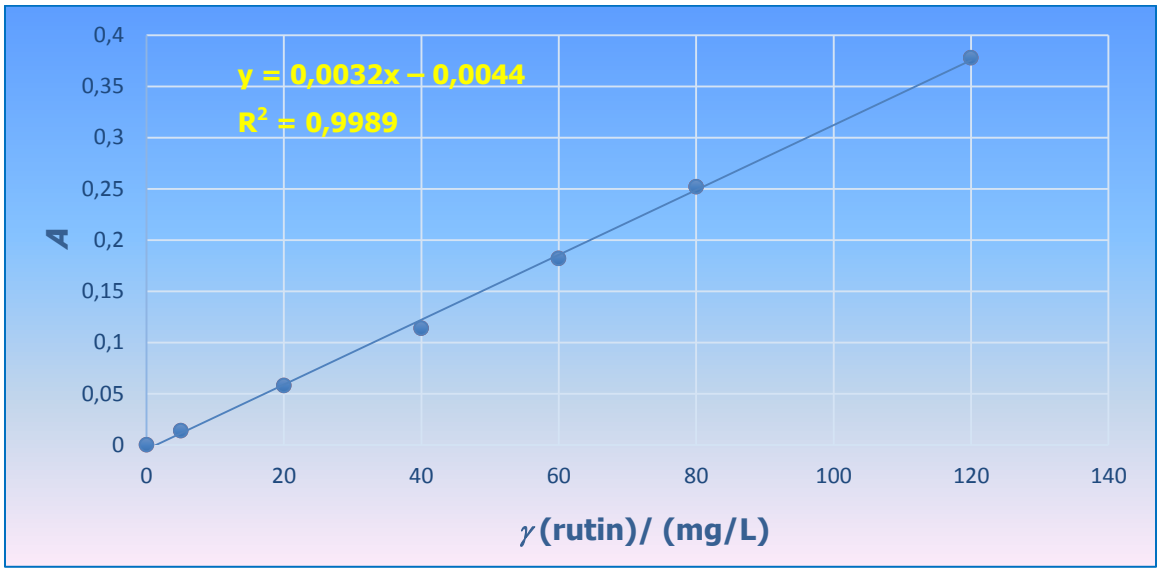
Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg/L)	*A* (apsorbancija)
0	0	0
1	10	0,037
2	30	0,098
3	50	0,158
4	100	0,312
5	130	0,416
6	180	0,530



Slika 8. Baždarni dijagram galne kiseline

Tablica 6. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	γ (rutin)/(mg/L)	*A* (apsorbancija)
0	0	0
1	5	0,014
2	20	0,058
3	40	0,114
4	60	0,182
5	80	0,252
6	120	0,378



Slika 9. Baždarni dijagram rutina

Tablica 7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima kore mandarinke (voda, vodene otopine etanola i etanola) dobivenih ekstrakcijomrefluksiranjem.

Uzorak	φ(otapalo)/%		A ± SD	w(UF)/(mg/g) ± SD
1-JK	H_2O	/	0,168±0,000	66,79 ±0,00
2-JK	Etanol	25	0,205±0,000	82,21±0,00
3-JK		50	0,270±0,007	109,29±2,95
4-JK		70	0,320±0,001	126,17±5,01
5-JK		96	/	/

Iz rezultata spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (Tablica 7) u ekstraktima kore mandarine dobivenih refluksiranjem s vodom, vodenim otopinama etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) i 99 %-tnim etanolom, vidljivo je da su voda, te 25, 50 i 70 %-tni etanol pogodna otapala za izolaciju fenola. Međutim, prilikom određivanja ukupnih fenola u 96 %-tnom etanolnom ekstraktu došlo je do zamućenja (pojava bijelog taloga) što ukazuje da 96 %-tni etanol nije povoljno otapalo za ekstrakciju fenola. Najboljim ekstrakcijskim sredstvima su se pokazale vodene otopine 50 i 70 %-tnog etanola.

U Tablici 8 su prikazani i rezultati određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarine metodom refluksiranja.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore mandarine (voda, vodene otopine etanola i etanol) dobivenih refluksiranjem.

Uzorak	φ (otapalo)/%		A ± SD	w(UFL)/(mg/g) ± SD
1-JK	H_2O	/	0,044±0,002	6,14±0,27
2-JK	Etanol	25	0,077±0,000	10,43±0,00
3-JK		50	0,146±0,005	19,20±0,63
4-JK		70	0,224±0,001	29,26±0,18
5-JK		96	/	/

Kao i kod ukupnih fenola voda i vodene otopine etanola (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) su se pokazale dobrim otapalima za izolaciju flavonoida. S porastom volumnog udjela etanola u vodenoj fazi, raste i maseni udio ukupnih flavonoida, uz iznimku 96 %-tnog etanola koji se pokazao nepogodnim ekstrakcijskim sredstvom, zbog zamućenja koje je onemogućilo spektrofotometrijsko mjerenje. Općenito, čista organska otapala nisu se pokazala dobrim izborom pri ekstrakciji polifenola, što su potvrdili i Karsheva i sur. (2013). Oni navode 50 i 70 %-tne vodene otopine etanola vrlo efiksnim ekstrakcijskim sredstvima.

5. ZAKLJUČAK

Kako bi se utvrdio utjecaj volumnog udjela etanola u vodenoj fazi (φ = 25, 50 i 70 %, *v*/*v*) na prinos polifenola, u ovom radu su pripremljeni ekstrakti kore mandarine metodom refluksiranja u vremenu od 1,5 h. Da bismo usporedili otapanje polifenola u spomenutim vodenim otopinama etanola, koristili smo još i čisti 96 %-tni etanol i vodu. Iz provedenog istraživanja možemo zaključiti:

- voda i vodene otopine etanola su se pokazale dobrim izborom pri ekstrakciji polifenola iz kore mandarine
- 96 %-tni etanol nije pogodno otapalo jer zbog pojave zamućenja nije bilo moguće izmjeriti apsorbanciju, a time niti odrediti masene udjele polifenola
- maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida su najniži u vodi, što znači da je za otapanje polifenola bolji izbor organsko u odnosu na anorgansko otapalo
- s porastom volumnog udjela etanola u vodenoj fazi, raste i maseni udio ukupnih fenola i flavonoida
- najveći maseni udjeli polifenola su izmjereni u 50 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima kore mandarine, pa su navedene otopine najbolji izbor za buduću izolaciju polifenola iz kore mandarine primjenom novih, suvremenih ekstrakcijskih tehnika.

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: A review. *Journal of Food Engineering* **117:** 426-436.

Karsheva M., Kirova E., Alexandrova S. (2013) Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols: Effects of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **48:** 35-41.

Kurtagić H. (2017) Polifenoli i flavonoidi u medu. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku **6:** 28-35.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* **5**: 727-747.

Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2**: 270-278.

Pine S. H. (prijevod I. Bregovec i V. Rapić) (1994) Organska kemija, str. 1062-1138

Russo M., Spagnuolo C., Tedesco I., Russo G. L. (2010) Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Truth or Dare? *Toxins (Basel)* **2**: 517-551.

Shivashankara K. S., Acharya S. N. (2010) Bioavailability of Dietray Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* **3**: 227-241.

Svedstrom U., Vuorela H., Kostiainen R., Laakso I., Hiltunen R. (2006) Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* **1112**: 103-111.

Šatalić Z. (2013) 100 (i pokoja više) iz znanosti o prehrani, Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 288.

Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **7:** 1089-1099.