

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

DIJANA DRLJAČA I MARINA MRĐA
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA EPIKATEHINA I PROCIJANIDINA B2
IZ ČOKOLADE



Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom dr. sc. Danijele Ašperger i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008./2009.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. PROANTOCIJANIDINI	2
2.1.1. Epikatehin i procijanidin B2	2
2.2. FIZIKALNE METODE ZA IZOLACIJU/EKSTRAKCIJU I KONCENTRACIJU ANALITA IZ PREHRAMBENIH PROIZVODA	3
2.2.1. Destilacija	3
2.2.2. Sublimacija	5
2.2.3. Liofilizacija (sušenje smrzavanjem)	5
2.2.4. Membranske tehnike	5
2.2.5. Ekstrakcija čvrstom fazom	6
2.2.6. Ekstrakcija fluidom u superkričnim uvjetima	7
2.2.7. Ekstrakcija otapalom	9
2.3. PREGLED METODA IZOLACIJE/EKSTRAKCIJE I KONCENTRACIJE FLAVONOIDA IZ PREHRAMBENIH UZORAKA	12
2.4. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI	19
3.1.1. Kemikalije	19
3.2. INSTRUMENTI	20
3.2.1. Instrumenti za provedbu tankoslojne kromatografije	20
3.2.2. Uređaj za separaciju flavonoida iz čokolade	21
3.3. METODE RADA	22
3.3.1. Priprava čokolade za ultrazvučnu kupelj	22
3.3.2. Kromatografsko određivanje epikatehina i procijanidina B2	22
4. REZULTATI I DISKUSIJA	23
4.1. IZBOR OTAPALA	23
4.2. IZBOR TEMPERATURE	25
4.3. IZBOR VOLUMENA OTAPALA	27
4.4. IZBOR VREMENA TRAJANJA EKSTRAKCIJE	29
4.5. IZBOR SNAGE ULTRAZVUČNE KUPELJI	30
5. ZAKLJUČAK	31
6. LITERATURA	32
7. SAŽETAK	38
8. SUMMARY	39
9. ŽIVOTOPISI	40

1. UVOD

Općenito je poznato da polifenolni spojevi imaju dobro djelovanje na zdravlje ljudi. Polifenolni spojevi se mogu naći u nizu različitih biljaka, pa tako i u kakaovcu koji se koristi kao sirovina za proizvodnju čokolade. Karakteristični polifenolni spojevi iz grupe proantocijanidina u kakaovcu su epikatehin (EC) i procijanidin B2 (pB2).

Proces proizvodnje čokolade se sastoji od obrade same sjemenke kakaovca koju je nužno nakon procesa fermentacije, sušenja i uklanjanja koštica, usitniti i pržiti uz strogo kontrolirane i sterilne uvjete da bi se došlo do kakao praha za proizvodnju čokolade.

Koncentracija EC i pB2 tijekom procesa obrade same sirovine pa do konačnog produkta se mijenja, i najvjerojatnije se smanjuje, osobito na to može utjecati način skladištenja sirovine i konačnog produkta.

Da bi se mogla pratiti koncentracija navedenih polifenolnih spojeva nužno ih je ekstrahirati iz uzoraka čokolade ili sirovine. Metoda ekstrakcije trebala bi dati što veće iskorištenje EC i pB2, ali uz što manji utjecaj matice.

Klasične metode ekstrakcije uglavnom podrazumijevaju klasično mućkanje uzoraka otapalom ili destilaciju vodenom parom. Navedene metode su vrlo dugotrajne, potrebna je velika količina uzorka, ali je i značajan utjecaj matice.

Cilj ovoga rada bio je optimirati jednostavnu i brzu metodu ultrazvučne ekstrakcije otapalima, pri čemu je kao model uzorka uzeta čokolada sa 72% kakao praha („Zvečevo“, Požega, Hrvatska). Optimirana je vrsta i volumen otapala, vrijeme i temperatura ultrazvučne ekstrakcije, kao i snaga ultrazvučne kupelji.

2. OPĆI DIO

2.1. PROANTOCIJANIDINI

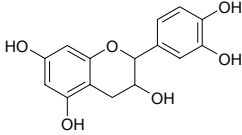
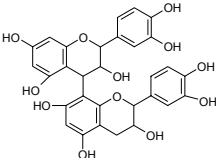
Proantocijanidini su polifenolni spojevi koji su zapravo velika skupina bioflavonoida. Dobro djeluju na zdravlje ljudi. Mogu se naći u različitim biljkama. To su uglavnom plavi i ljubičasti pigmenti u brojnim biljkama. Ekstrakti proantocijanidina pokazuju širok spektar farmakološke aktivnosti. Podižu razinu vitamina C u organizmu, smanjuju krhkost i propusnost kapilara, neutraliziraju slobodne radikale i sprječavaju razaranje kolagena, jednog od najznačajnijih građevnih proteina u tijelu. Također, smatra se da pomažu u čuvanju funkcija očiju. Najviše ih ima u sjemenkama kakaovca koje se koriste za dobivanje čokolade, crnom ribizlu, borovnicama i crnom vinu. [1]

Karakteristični polifenolni spojevi u sjemenkama kakaovca su epikatehin (EC) i procijanidin B2 (pB2), koji između ostalog djeluju antioksidativno. Postupci proizvodnje i način skladištenja utječu na kvalitetu, ali i stabilnost EC i pB2 u čokoladi.

2.1.1. Epikatehin i procijanidin B2

Epikatehin i procijanidin B2 poboljšavaju protok krvi i smatraju se dobrim za zdravlje kardiovaskularnog sustava. Kakao, pogotovo izrazito crna čokolada sadržava jako puno epikatehina i procijanidina B2 za koje je utvrđeno da su dvostruko jači antioksidansi od bioflavonoida crnog vina i tri puta jači antioksidansi od antioksidansa zelenog čaja (Tablica 1). [2]

Tablica 1. Kemijska i fizikalna svojstva epikatehina (EC) i procijanidina (pB2) [2]

Flavonoid	CAS broj	Mr	pK_a
(-) epikatehin (EC)  $C_{15}H_{14}O_6$	490-46-0	290,27	13,41; 23,00; 9,49; 8,72
procijanidin B2 (pB2)  $C_{30}H_{26}O_{12}$	29106-49-8	578,52	nema podataka

2.2. FIZIKALNE METODE IZOLACIJE/EKSTRAKCIJE I KONCENTRACIJE ANALITA IZ PREHRAMBENIH UZORAKA

Da bi bilo moguće analizirati željeni analit u nekom prehrambenom uzorku, nužno je taj analit izolirati, a po potrebi i koncentrirati. Metode izolacije, odnosno ekstrakcije i koncentriranja mogu biti različite i mogu se kombinirati, ovisno o analitu, ali i vrsti uzorka.

Neke od najčešće korištenih metoda izolacije/ekstrakcije i koncentriranja analita iz prehrambenih uzoraka su: destilacija, sublimacija, liofilizacija, membranske tehnike, ekstrakcija čvrstom fazom, ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima i ekstrakcija otapalom.

2.2.1. Destilacija

Destilacija je najvažnija metoda za izolaciju i pročišćavanje tekućih tvari, a također je pogodna za izolaciju topljivih dijelova čvrstih uzoraka. Razdvajanje smjese uz pomoć destilacije moguće je zato što neki sastojci smjese lakše isparavaju, pa se para obogaćuje tim hlapljivim tvarima. Hlapljivost tekućine ovisi o tlaku para. Što su slabije međumolekularne privlačne sile, tekućina ima pri određenoj temperaturi viši tlak para. Dovođenjem toplinske energije kinetička se energija molekula povećava do savladavanja privlačnih sila između molekula, odnosno do izjednačavanja tlaka para tekućine s vanjskim tlakom. Temperatura pri kojoj se uspostavlja to stanje ravnoteže između plinske i tekuće faze naziva se vrelište. Djelotvornost separacije ovisi o fizikalnom svojstvima sastojaka u smjesi, korištenoj opremi, metodi destilacije i vanjskom tlaku, za jednostavno izvođenje destilacije najčešće korištene tehnike su: jednostavna destilacija, frakcijska destilacija i destilacija vodenom parom.

a) Jednostavna destilacija

Odnosi se na procese gdje para nije podvrgnuta parcijalnoj kondenzaciji i kontaktu s kondenziranim tekućinom prije dolaska u kondenzator. Sastav pare koji ide od površine tekućine do kondenzatora ne mijenja se tijekom procesa. Potrebna oprema je minimalna i obično se sastoji od boce povezane na kondenzator i skupljača produkta. Koristi se kad se ne zahtjeva djelotvorna separacija kao kod odvajanja tekućine od otopljene nehlapljive čvrste tvari ili separacije jednostavnih smjesa kod kojih sastojci imaju vrlo različite točke vrelišta.

b) Frakcijska destilacija

Proces u kojem se dio kondenzata (refluksa) uz pomoć posebne kolone vraća u tikvicu, pri čemu dolazi u dodir s uzlaznim parama. Za frakcijsku destilaciju upotrebljava se Vigreuxova kolona ili kolone ispunjene nehrđajućom čeličnom spužvom odnosno komadićima staklenih cijevčica ili kuglicama. Takvo punjenje dovodi do niza ciklusa uparavanja – kondenziranja tijekom putovanja pare uz kolonu. Para se u ovom procesu postupno obogaćuje sastojcima s nižim vrelištem, koja prva destilira u više ili manje čistom obliku. Koristi se kad postoji zahtjev za većom djelotvornošću, a ne može se upotrebljavati za tekućine koje imaju bliska vrelišta ili za tzv. azeotropne smjese.

c) Destilacija s vodenom parom

To je jedna od najuobičajenijih metoda za pripremu uzorka. Metoda se temelji na svojstvu mnogih spojeva da hlape zajedno s vodenom parom, pri temperaturi znatno nižoj od njihovog vrelišta, odnosno nižoj od 100 °C. Uparivanje smjese postiže se kontinuiranim upuhivanjem pare kroz smjesu ili kuhanjem vode i smjese zajedno. U oba slučaja hlapljiva organska komponenta biva nošena parom u omjeru proporcionalnom njihovim parcijalnim tlakovima i molekularnim masama.

$$\frac{m(H_2O)}{m(A)} = \frac{n(H_2O)M(H_2O)}{n(A)M(A)} = \frac{p(H_2O)m(H_2O)}{p(A)M(A)} \frac{n(H_2O)}{n(A)} = \frac{p(H_2O)}{p(A)}$$

Za dobru izolaciju produkt tlaka para i molekulske mase analita treba biti veći od ekvivalentne veličine za paru, inače bi kondenzat za izravnu analizu bio previše razrijeđen. Uz ovaj uvjet analit mora zadovoljavati još dva uvijeta, biti što manje topljiv u vodi (optimalan slučaj je kada je tvar netopljiva) i biti stabilan pri kuhanju s vodom.

Destilacija vodenom parom osobito je pogodna za pročišćavanje tvari koje se raspadaju pri temperaturi vrelišta, a vrlo se ekonomično mogu pročišćavati tvari s velikom molekulskom masom i malim tlakom para s obzirom na malu molekularnu masu vode i njezin visok tlak para.

2.2.2. Sublimacija

Sublimacija je izravno isparavanje i kondenzacija čvrste tvari bez prolaska kroz tekuću fazu. To je jednostavna, brza, a često i najdjelotvornija metoda za čišćenje uzorka. Često se upotrebljava vakuum-sublimacija koja je pogodnija od obične sublimacije zbog smanjene mogućnosti da se tvar rastali. Vakuum-sublimacija je povoljnija od sublimacije pod atmosferskim tlakom, jer se neke organske tvari raspadaju pri povišenoj temperaturi. Da bi se sublimacija mogla uspješno primijeniti kao tehnika za izolaciju neke tvari, treba zadovoljiti ove uvjete:

1. dovoljno visok tlak para iznad čvrste faze te tvari pri temperaturi nižoj od njihovog tališta,
2. primjese ne smiju sublimirati,
3. rad s razmjerno malim količinama uzorka.

2.2.3. Liofilizacija (sušenje smrzavanjem)

Liofilizacija je metoda uklanjanja vode s pomoću vakuum-sublimacije leda. Metoda je pogodna za koncentriranije nehlapljivih organskih sastojaka u vodenim otopinama i za očuvanje biološkog uzorka. Nakon liofilizacije biološki uzorci često mogu biti usitnjeni (samljeveni) što omogućava homogeniziranje uzorka za analizu. Naročito je važno da je uzorak zaleđen i zatim smješten pod visoki vakuum. Toplina apsorbirana iz okoline uzorka uzrokuje sublimaciju leda, koji se nakon toga kondenzira. Gubici su mogući kod hlapljivih komponenata. Kisele i lužnate komponente mogu biti prevedene u soli prije liofilizacije kako bi se smanjili gubici tijekom isparavanja. Anorganske tvari se koncentriraju istovremeno s organskim te se u nekim analizama može javiti problem odsoljavanja uzorka.

2.2.4. Membranske tehnike

a) Dijaliza

U dijalizi se analiti separiraju na temelju sposobnosti difuzije kroz membranu, koja je rezultat koncentracijskog gradijenta. Djelotvornost procesa je kontrolirana omjerom brzine protoka otopine uzorka i dijalizacijske otopine i konstantom brzine prijenosa otopljenе tvari između dviju otopina, koja je određena mogućnostima membrane, geometrijom kanala i brzinom fluida. Relativna veličina različitih molekula uvelike određuju selektivnost membrane u

odsutnosti jako specifičnih interakcija. Dijaliza je najdjelotvornija u odvajanju malih molekula u biološkim fluidima kao što su krv i urin te u desalinizaciji dijelova proteina.

b) Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je separacijski proces u kojemu se velike molekule izdvajaju iz otopine filtracijom kroz membranu. Membrane mogu razdvojiti molekule molekulske mase od 10^3 - 10^6 . Ultrafiltracija je primarno bila korištena za izolaciju niskomolekularnih od visokomolekularnih analita, a pomoću nje se može frakcijski razdvojiti uzorak na molekule različitih veličina.

c) Reverzna osmoza

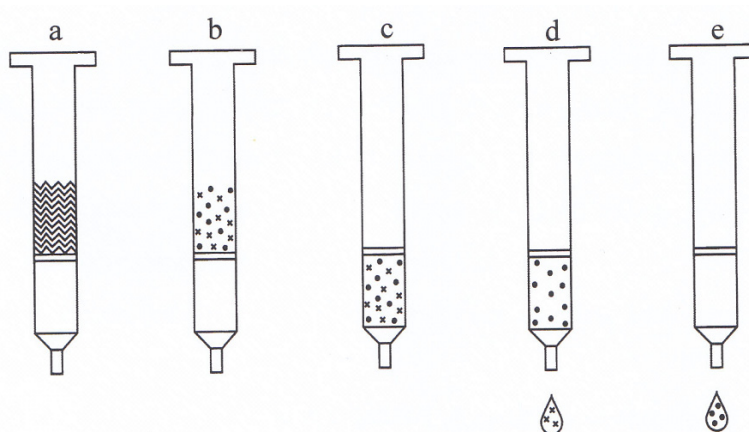
To je separacijska tehnika slična ultrafiltraciji, osim što su membrane mnogo manjih pora a radni tlakovi mnogo viši. Radni tlak mora biti viši od prirodnog osmotskog tlaka sustava kako bi došlo do kretanja otapala, obično vode, iz otopine visoke koncentracije uzorka u onu niske koncentracije. Iz tog razloga reverzna osmoza pogodna je za koncentriranje analita iz relativno velikih volumena otopina kao što su uzorci površinskih voda i voda za piće. Ipak za poluhlapljive organske tvari, protok ograničava propusnost membrane kod nekih analita. Udio tvari propuštene kroz membranu ovisi o kemijskoj kompatibilnosti membrane i analita. Iz tog razloga reverzna osmoza može biti korištena za separaciju tvari podjednake veličine.

2.2.5. Ekstrakcija čvrstom fazom

Posljednjih godina ekstrakcija čvrstom fazom jedan je od najčešće korištenih postupaka za pripremu uzoraka. Prednost ovog postupka u odnosu na uobičajene postupke pripreme uzorka kao što je ekstrakcija otapalom je smanjenje vremena potrebnog za analizu, trošenje manje otapala i jednostavnost postupka. To je metoda u kojoj se koriste male kolone punjene raznim adsorbensima. Kolone mogu biti punjene uobičajenim anorganskim sorbensima (silikagel, aluminijev-oksidi, florosil) ili sorbensima modificiranim uvođenjem različitih funkcionalnih skupina i ionoizmjenjivačkim smolama. Čestice sorbensa imaju veličinu od 30 do 60 μm i pakirane su u kolone od polietilena ili polipropilena visoke čvrstoće. Količine sorbensa kreću se od 30 mg-1,6 g. Kroz kolonu se može propustiti i do 2 L uzorka. Uzorak možemo koncentrirati i do 1000 puta zbog korištenja malog volumena otapala za eluiranje. Metoda se koristi za koncentriranje analita iz razrijeđenih otopina, a upotrebljava se i za uklanjanje

interferencija iz koncentriranih ekstrakta. Analit može biti adsorbiran ili direktno propuštan kroz kolonu u kojoj se zadržavaju interferencije. Adsorbirani analit se nakon ispiranja najčešće eluira s kolone s nekoliko mL odgovarajućeg otapala i ta se otopina izravno nanosi na kromatografski sloj. Za eluiranje sastojaka koriste se brojna otapala različite jakosti i polarnosti.

Na Slici 1. Prikazani su osnovni koraci ekstrakcije čvrstom fazom.



Slika 1. Osnovni koraci ekstrakcije čvrstom fazom

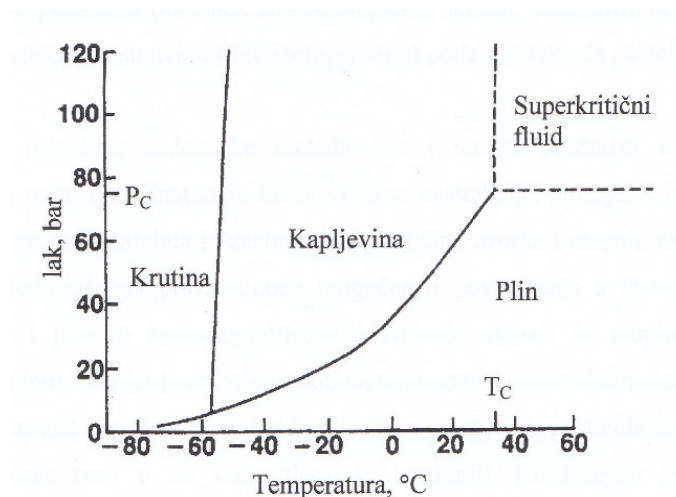
- a) kondicioniranje kolone
- b) unošenje uzorka
- c) ekstrakcija željenog sastojka
- d) ispiranje nečistoća
- e) eluiranje željenih sastojaka

Ekstrakcija čvrstom fazom koristi se za izolaciju pesticida iz vode i za pročišćavanje uzorka nakon ekstrakcije uzorka iz tla, sedimenta ili hrane. Može se automatizirati, a postoji i mogućnost povezivanja kolona u seriju.

2.2.6. Ekstrakcija fluidom u superkričnim uvjetima

Ekstrakcija fluidom u superkričnim uvjetima pogodna je, selektivna i brza metoda za izolaciju i pročišćavanje.

Plin ili kapljevina zagrijani na temperaturu iznad kritične i kontinuirano tlačeni do tlaka iznad kritičnog prelaze u superkrični fluid (Slika 2).



Slika 2. Fazni dijagram za ugljikov (IV) oksid

Na granici kritičnog područja fluid može pokazivati svojstva slična i plinu i kapljevini. Unutar granice kritičnog područja fluid pokazuje kombinaciju svojstava. Prednosti superkritičnog fluida u odnosu na kapljevinu za selektivnu ekstrakciju su:

1. mala viskoznost i odsutnost površinske napetosti fluida što povećava brzinu prolaza fluida u maticu,
2. veliki koeficijent difuzije fluida koji omogućava brzi prolaz kroz maticu uzorka.

Oba ova procesa povećavaju brzinu ekstrakcije u usporedbi s kapljevinom. Trajanje ekstrakcije manje je od 30 minuta. Djelotvornost ekstrakcije može se mijenjati promjenom temperature i tlaka, a kao modifikatori dodaju se male količine organskih otapala. Velika selektivnost ekstrakcije postiže se ako postoji znatna razlika u fizikalnim svojstvima (molekularnoj masi, polarnosti) između matice i analita. Većina fluida koji se koriste za ekstrakciju (CO_2 , NO_2 , SF_6) slaba su otapala, pa je ograničeno područje polarnosti i molekulske mase analita koji se mogu učinkovito ekstrahirati.

Ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima obično koristi CO_2 kao osnovni fluid. CO_2 nije otrovan, ni zapaljiv, niti skup, klasificira se kao nepolaro otapalo, ali ima određeni afinitet prema određenim otapalima i mnoge su velike organske molekule topive u njemu. Da bi CO_2 mogao ekstrahirati polarne molekule dodaju mu se modifikatori polarnosti (metanol, etanol, propanol, heksan, acetonitril, diklormetan), ali se mora paziti da su uvjeti (p i T) podešeni tako da postoji samo jedna faza.

Uz navedene nedostatke metoda ima i mnoge prednosti u odnosu na ekstrakciju otapalom. Znatno je kraće vrijeme ekstrakcije, smanjena je mogućnost zagađenja uzorka, potrebna je

mного manja količina uzorka i otapala za ekstrakciju. Uz ove prednosti ona pruža mnoge mogućnosti povezivanja s instrumentima za tekućinsku i plinsku kromatografiju, a izdvajanje otapala iz otopine izvodi se dekompresijom, zato jer je otapalo na sobnoj temperaturi i normalnom tlaku plin.

2.2.7. Ekstrakcija otapalom

Jedna od najraširenijih tehnika pripreme uzorka plinova, tekućina i čvrstih tvari je otapanje cijelog ili dijela uzorka u odgovarajućem otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Raspodjelom uzorka između dvaju nemješljivih otapala u kojima su analit i matica različito topljivi moguće je povećati selektivnost. Uobičajene metode ekstrakcije otapalom su mućkanje u tikvici, Soxhlet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija. U zadnje se vrijeme sve češće koristi metoda mikrovalne ekstrakcije.

a) Mućkanje u tikvici

Mućkanje u tikvici pogodno je ako je analit jako topiv u otapalu, a matica tekućina ili porozna krutina. Ovaj postupak ima najmanju djelotvornost.



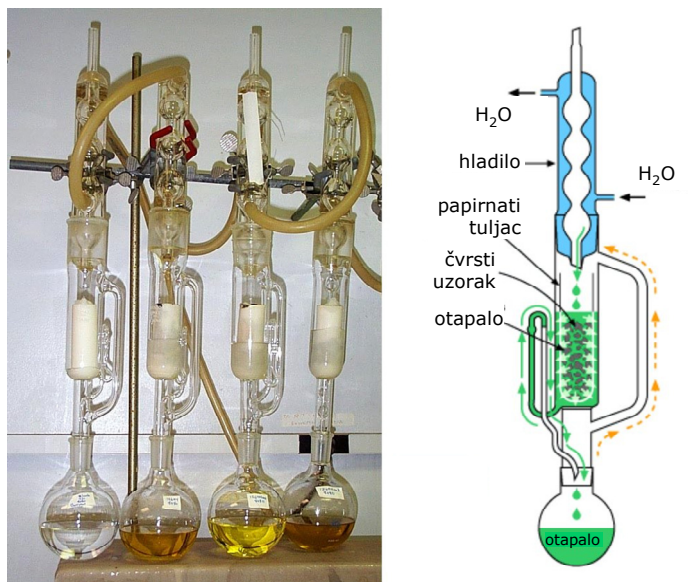
Slika 3. Prikaz mućkanja uzorka u ekstrakcijskom lijevku (a) i u tikvici na mućkalici (b)

b) Soxhlet ekstrakcija

Za ekstrakciju analita iz praškastih uzoraka najčešće se koristi metoda Soxhlet ekstrakcije, pri čemu se izabire otapalo u kojemu je analit jako topljiv. Otapalo ili smjesa otapala koje se

koriste za ekstrakciju moraju imati veliki afinitet prema analitu, mali afinitet prema uzorku, malu viskoznost i jaku hlapljivost tako da se lako uklanjaju iz ekstrahiranog uzorka.

Soxhlet ekstrakcija izvodi se tako da se pogodno otapalo upari, kondenzira i zatim propušta kroz usitnjeni i homogenizirani čvrsti uzorak koji se nalazi u naprstku za ekstrakciju. Nakon toga se otapalo vraća u tikvicu zajedno s ekstraktom.



Slika 4. Soxhlet aparatura za ekstrakciju

Osnovni nedostaci Soxhlet ekstrakcije su dugo trajanje (10–24 h), zagađenje okoliša zbog velike potrošnje organskih otapala (300 mL/uzorak), a spojevi koji se ekstrahiraju moraju biti stabilni na temperaturi vrenja otapala za ekstrakciju. Zbog velikog volumena ekstrakta koji je jednak početnom volumenu otapala potrebno ga je koncentrirati najčešće uparavanjem. Problem velike količine otapala pokušao se riješiti uporabom automatske Soxhlet ekstrakcije. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija troši manje otapala, ali je taj volumen još uvijek velik (50–100 mL), a trajanje ekstrakcije dugo.

Iskorištenje Soxhlet ekstrakcije je od 50–100 % ovisno o ekstrahiranom spoju. Najčešće se koristi za ekstrakciju organskih spojeve, pesticida i PCB-a iz uzoraka tla, sedimenata, biljnog i životinjskog tkiva te iz čvrstog otpada.

c) Mikrovalna ekstrakcija

Za razliku od Soxhlet ekstrakcije i mućkanja u tikvici mikrovalna ekstrakcija omogućuje smanjenje vremena ekstrakcije i količine potrebnog otapala za ekstrakciju. Upotrebom

mikrovalnog zračenja može se izbjeći i razgradnja uzorka zbog visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matrice. Loša svojstva mikrovalne ekstrakcije su:

1. Potreba za razdvajanjem ekstrakta od uzorka dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem
2. Hlađenje ćelije za mikrovalnu ekstrakciju nakon ekstrahiranja na sobnu temperaturu prije otvaranja, čime se gubi dosta vremena koje se dobiva ovom brzom metodom ekstrakcije.

Nedavni razvoj mikrovalnih instrumenata omogućio je dobru kontrolu tlaka i temperature, čime se postižu precizni i reproducibilni uvjeti. Automatiziranom mikrovalnom ekstrakcijom moguće je istovremeno ekstrahirati veći broj uzoraka.



Slika 5. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s teflonskim posudama za uzorke

d) Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija osigurava djelotvorniju ekstrakciju od mućkanja u tikvici i Soxhlet ekstrakcije. Uzrok povećanoj djelotvornosti ultrazvučne ekstrakcije je mnogo bolji kontakt između čvrste tvari i otapala. Ultrazvučna ekstrakcija najčešće se koristi za čvrste uzorke.

Ultrazvuk je dio zvučnog spektra od 20 kHz do 10 MHz. Širi se putem valova pri čemu uzrokuje vibracije molekula medija i prijenos mehaničke energije titranja valova na medij. Povećanjem intenziteta ultrazvuka u određenom trenutku postiže se kritična točka u kojoj dolazi do stvaranja mjehurića u mediju kroz koji prolazi ultrazvuk. Para i plin ispunjavaju mjehuriće, a pojava se naziva kavitacija. Zbog izloženosti udarima kavitacijski mjehurići rastu i propadaju. Ovo kavitacijsko propadanje mjehurića stvara drastične uvjete unutar medija. Zbog ovih ekstremnih uvjeta djelovanje ultrazvuka uzrokuje različite fizičke i kemijske učinke u izloženom sustavu. Kavitacijski mjehurići mogu se promatrati kao mikroreaktori. Bitni učinci ultrazvuka za proces ekstrakcije analita iz čvrstog uzorka su smanjenje čestica i ubrzani prijenos mase tvari.

Za ekstrakciju flavonoida iz čokolade u ovom radu je zbog jednostavnosti i brzine izabrana ultrazvučna ekstrakcija kod kontroliranih uvjeta temperature i snage ultrazvučne kupelji.

2.3. PREGLED METODA IZOLACIJE/EKSTRAKCIJE I KONCENTRIRANJA FLAVONOIDA IZ PREHRAMBENIH UZORAKA

U Tablici 2 navedena su otapala i uvjeti korišteni za izolaciju i ekstrakciju flavonoida iz prehrambenih uzoraka različitim metodama iz literature unatrag deset godina.

Tablica 2. Pregled metoda izolacije/ekstrakcije polifenolnih spojeva

Flavonoidi	Uzorak	Metoda ekstrakcije
ukupni sadržaj flavonoida	<i>Brussels sprouts</i>	Mikrovalna pećnica, 700W, 5 min acetonitril:H ₂ O=70:30 [3]
pB	kora ananasa	Termalna kupelj, 37,5 °C, EtOH [5]
EGCG, EC	ljudska slina	Mučkanje, 5 min, SDS, limunska kiselina [41]
flavonoidi	voće, povrće, čaj	Vodena kupelj, 70°C, 11 min, CH ₃ COOH:CH ₃ OH:CH ₃ CN= 7:1:2 [42]
(-)E i (+)C	crveno vino, čokolada, zeleni čaj, razno voće	Ultrazvučna kupelj NH ₄ H ₂ PO ₄ i NH ₄ H ₂ PO ₄ u acetonitrilu= 80:20 [43]
C, biofenoli	afrički krumpir	Centrifugiranje, 1600 o/min, sobna temp., destilirana voda [8]
EC, C, ECG, kafein	guarana	Magnetska mješalica, 2h, H ₂ O, MeOH, 35% aceton, 60% EtOH [9]
EC, pB2	voće	Mučkanje, H ₂ O: EtOH=50:50 [10]
antocijanidin, proantocijanidin	riža	Mučkanje, 1h, 95 °C, ButOH:HCl= 95:5 [12]
EC, pB2, ChA, HP, IQ	voće	Centrifugiranje, 5 min, 13000 o/min, destilirana voda [44]
polifenoli, procijanidini, flavonoidi	hrastovina	Vodena kupelj, 40 min, 95 °C ButOH:HCl=95:5 [14]
EGCG, EGC, ECG, EC	zeleni čaj	Centrifugiranje, 1000 o/min, 1 min, DCFH (diklorofluoroscein) [16]
ECG, EGCG, EC, CN	kineski zeleni čaj	Mučkanje, sterilna destilirana voda [17]
(-)E i (+)C	kakao zrno	Ultrazvučna kupelj 65 °C, 15 min H ₂ O:EtOH=71:29 [45]
EC, EGC, EGCG, ECG	mlijeko i čaj	Mučkanje, 5 min na 1400 o/min, HCl:H ₂ O=2:98 [18]
(+) C, (-) E	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Vodena kupelj 40 °C, 30 min., MeOH:HCl [46]
C, E	različite vrste kakaa	Centrifugiranje 5000 o/min, 15 min, sobna temp., 60% aceton [19]

Tablica 2. Pregled metoda izolacije/ekstrakcije polifenolnih spojeva [nastavak 1.]

Flavonoidi	Uzorak	Metoda ekstrakcije
C, EC, galska i kafeinska kiselina	kikiriki	Centrifugiranje, 3000 o/min, 15 min, sobna temp., 80% EtOH [20]
(+)C, (-)EC, pB2, pB3	<i>Tamarindus indica L.</i>	Ultrazvučna kupelj, 10 min, sobna temperatura, aceton:MeOH:H ₂ O=70:29,5:0,5 [47]
kvercetin, luteolin, miricetin, apigenin	maslina, origano, lovorov list, glog	Ultrazvučna kupelj, 2 h, 40 °C, atmosferski tlak, 100 mL 100% MeOH [25]
procijanidini	latice ruže	Mučkanje, 2000 o/ min, 10 min, 50%, 70% i 85% aq. Me ₂ CO 100% Me ₂ CO, i 50%, 70% i 85% aq. EtOH, i 100% EtOH [27]
polifenol	jabuka	Ultrazvučna kupelj 10 min, 35 °C, MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH=30:69:1 [28]
(-)E i (+)C	15 vrsta voća	Ultrazvučna kupelj, 5 min., 80% MeOH [48]
(-) E, (+) C, GA, ECG, EGC, EGCG, PB1, PB2	grožđe	Centrifugiranje, 6000 o/min, 5 min, -4 °C, 8 mL EtOAc [49]
flavonoidi, hidroksicinamična kis., antocijanini	jabuka	Ultrazvučna kupelj, 10 min, MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH=30:69:1 [50]
(-) E, (+) C	voće i povrće	Magnetska miješalica, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pod pritiskom, 200 W, 100 °C, MeOH [29]
flavonol	crno vino	Mučkanje, 90 °C, 2 min, toluene α-thiol 5% u MeOH koji sadrži 0,2 M HCl [51]
EC, EGCG, EGC,GA, ECG	kakao	Mučkanje, H ₂ O:MeOH:CH ₃ COOH=87%:8%:5 % [32]
(-)EC, (+)C, Q	jagode	Mučkanje, EtOH i acetonitril [33]
C, E	pivo, vino, voćni sokovi	Ultrazvučna kupelj, 10 min, 40 °C, Pivo - destilirana voda vino i voćni sokovi - aceton [52]
pB	grožđe	Mučkanje 1 h, H ₂ O:MeOH=3:1 [53]
pB2 i pB5	kakao	Mučkanje 90 min, parafin [54]
procijanidini	čokolada	Ultrazvučna kupelj, 70 min, klorna otopina [55]
(+)C, (-)EC, galska kis., Q	vino	Centrifugiranje, 180 o/min, 20 min, 5 mL dietil-eter [56]
pB	kakao	Centrifugiranje, aceton:H ₂ O:CH ₃ COOH=70:29.5:0.5 [57]

Tablica 2. Pregled metoda izolacije/ekstrakcije polifenolnih spojeva [nastavak 2.]

Flavonoidi	Uzorak	Metoda ekstrakcije
(+)C, (-)E, CG, ECG, EGC, EGCG,	zeleni i crni čaj	Ultrazvučna kupelj, 10 min, 25 kV, 30 °C, 0,4 mL 20% acetonitril [37]
polifenoli	jabuka	Vodena kupelj, 37 °C, 20 min, 1 ml otopine xanthine oxidase [28]
(+)C, (-)EC, galska i kafeinska kis., EGC, EGCG	čaj	Termalna kupelj, 10min, voda [58]
procijanidini, (-)EC, pB2	jabuka	Centrifugiranje, 3500 o/min, otopina kalcij-pirosulfita [60]
(-) E, (+) C, CG, ECG, EGC, EGCG,	zeleni čaj	Mikrovalna pećnica, 1 min, 500 W, 100 mL kipuće H ₂ O[61]
E	zeleni čaj	Ultrazvučna kupelj 30 min, Acetonitril-2% metafosforna kiselina= 1:1 [62]

2.4. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

Tankoslojna kromatografija je jedna od najraširenijih analitičkih metoda. Nju karakterizira detekcija odvojenih tvari nakon završetka kromatografskog procesa, za razliku od kromatografije na stupcu kod koje se detekcija uglavnom provodi istovremeno s kromatografskim procesom. Tankoslojna kromatografija je plošna kromatografska metoda koja je vrlo slična papirnoj kromatografiji. Nepokretna faza je tanki sloj finog zrnatog (praškastog) materijala koji ima svojstvo sorpcije. Prednost ove metode je kraće vrijeme razvijanja, razdvajanja oštrije, veća je mogućnost detekcije, a zbog mogućnosti upotrebe različitih materijala za tanki sloj postoji veći izbor povoljnih uvjeta za razdvajanje različitih vrsta spojeva. Kao tanki slojevi primjenjuju se različiti sorbensi: anorganski (silikagel, aluminijev-oksidi, diatomna zemlja), organski (celuloza, poliamidi, smole za izmjenu iona). Sorbensi se karakteriziraju svojom strukturom, veličinom čestica, stupnju čvrstoće i prisutnim vezivima. Prilikom pripreme tankog sloja treba najprije pripremiti suspenziju sorbensa u vodi ili nekom organskom otapalu. Omjer sorbensa prema vodi ovisi o svojstvima sorbensa. Suspenzija se homogenizira mućkanjem i nanosi se na ploče koje služe kao nosioci (podloga) sloja sorbensa. Ploče su staklene i potpuno čiste. Tanki slojevi mogu se na ploče nanijeti na nekoliko načina: uranjanjem ploče u suspenziju, nalijevanjem suspenzije na ploče i pokretanjem pločice, nalijevanje suspenzije na ploče s tankim trakama zalijepljenim na njenim dvama rubovima, a zatim izravnavanjem suspenzije ravnim predmetom ili se nanose

uređajima od ručnih do automatiziranih. Danas se koriste gotove kromatografske ploče. Otopina uzorka za analizu nanosi se na ploče pomoću mikropipete, kapilarnih cjevčica ili specijalnih uređaja.

Uzorak se stavlja na mjesto 1-2 cm udaljeno od ruba ploče u obliku okrugle mrlje ili linije. Ploča s uzorkom se stavlja u komore za razvijanje u kojoj se nalazi pokretna tekuća faza (razvijatelj). Donji rub ploče uroni se u tekućinu i komora se hermetički zatvori. Komore ili kade za razvijanje su posude različitih veličina i oblika s brušenim poklopcem. U kadama se istodobno mogu razvijati dvije ili više ploča uzlaznom tehnikom razvijanja, a ponekad i horizontalno. Nakon završetka razvijanja ploča se vadi iz kade i suši na zraku ili toplim zrakom, a zatim se pristupa uočavanju mrlja. Najvažnije je prskanje ili izlaganje ploča reagensima koji oboje mrlju i promatranje pod IR svjetlom. Detekcija IR svjetlom pogodna je i zato što se spojevi kemijski ne mijenjaju. Tvari se na kromatogramu dokazuju na temelju faktora zaostajanja, obojenja mrlje i usporednog razvijanja čistih tvari.

U tablici 3 navedene su vrste i uvjeti metoda određivanja polifenolnih spojeva iz različitih uzoraka. Pregled literature unatrag deset godina ukazuje da se kao metoda određivanja uglavnom koristi kolonska tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), no u ovom radu je za određivanje optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije korištena tankoslojna kromatografija, koja se pokazala vrlo brzo i jednostavnom metodom za provedbu ispitivanja optimizacije ultrazvučne ekstrakcije polifenolnih spojeva iz čokolade.

Tablica 3. Pregled metoda određivanja polifenolnih spojeva

Flavonoidi	Uzorak	Metode određivanja
ukupni sadržaj flavonoida	<i>Brussels sprouts</i>	HPLC–UV/VIS, C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), 2 mL/min, λ=254 nm, izokratno, ACN:H ₂ O [3]
E, GC, Q, R	Andean mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)	HPLC-DAD, UV-VIS, X-terra RP 18 (5 µm, 250 x 4,6 mm), 30 °C, gradijentno, A:H ₂ O:CH ₃ COOH; B:ACN [4]
pB	kora ananasa	RP-HPLC (MF 10 IKA-WERKE, Staufen Germany) (100 x 2,1 mm µRPC C2/C18 SC 2, 1/10), gradijentno, H ₂ O:CH ₃ CN [5]
(+)C, (-)EC, pB2, pB3	grožđe	HPLC, UV, Nucleosil 100 C18 (5 µm, 250 x 4 mm), 0,7 mL/min, gradijentno, dihidrogen amonij fosfat:acetonitril [6]

Tablica 3. Pregled metoda određivanja polifenolnih spojeva [nastavak 1.]

Flavonoidi	Uzorak	Metode određivanja
(+)C, pB2	kora drveta (<i>Anisophylles ea dichostyla</i>)	HPLC, UV, C18 (5 µm, 250 mm x 4 mm), Germany, λ=250-340 nm gradijentno, CH ₃ COOH u H ₂ O:MeOH [7]
C, biofenoli	afrički krumpir	HPLC, LiChrospher 100 RP 18 (5 µm, 250 mm x 25 mm), λ=260 nm, 0,8 mL/min, UV/VIS, gradijentno, A:KH ₂ PO ₄ , B:acetonitril [8]
EC, C, ECG, kafein	guarana	Analiza EC: HPLC (Germany) Eclipse XDB C18 kolone (5 µm, 4,6 mm x 150 mm) Analiza procijanida: UV spektrometar (Varian- UV/VIS-Spektrometar), 15 min, 95 °C, λ=540 nm, izokratno H ₂ O [9]
EC, pB2	voće	HPLC-ESI EM-kolona H80 (200 mm x 2,1 mm, 5 µm), Japan, UV/VIS, 0,5 mL/min, λ = 254 nm, 25 °C, gradijentno A:HCOOH u H ₂ O B:HCOOH u MeOH [10]
(+)C, EC, galska kiselina	vino	HPLC, Shimadzu Pathfinder AS silica 100, RP kolone (5 µm, 150 mm x 4,6mm), gradijentno, A:CH ₃ COOH u H ₂ O, B:MeOH:ACN:CH ₃ COOH [11]
antocijanidini, proantocijanidini	riža	HPLC, C18 Shimpack CLC-ODS, 1 mL/ min, Shimadzu UV/VIS spektrometar, 30 °C, λ =340nm TLC (0,1 mm celulozna pločica) CH ₃ COOH:HCl:H ₂ O=30:3:10 [12]
(+)C, (-)EC, GA, Q	kora ananasa	HPLC, UV/VIS, C18 Hypersil ODS (5 µm, 250 mm x 4,6 mm), 0,7 mL/min, λ=280 nm, gradijentno, A:CH ₃ COOH, B:MeOH [13]
polifenoli, procijanidini, flavonoidi	hrastovina	HPLC, Interchrom C18 (10 µm, 250 mm x 4,6mm), 20 °C, 1 mL/min, Waters 486 MS λ=280 nm, izokratno, A:MeOH:H ₃ PO ₄ , B:H ₂ O:H ₃ PO ₄ [14]
procijanidini	crveno vino	HPLC-ESI-MSI, LiChrospher 100 RP18 (5 µm, 250 mm x 4 mm, Merck), 0,7mL/min, λ = 280-525 nm, 30 °C, izokratno, A:H ₂ O:CH ₃ COOH, B:CH ₃ COOH .H ₂ O [15]
EGCG, EGC, ECG, EC	zeleni čaj	HPLC, UV/VIS, Waters µBondapak NH ₂ (10 µm, 3,9 mm x 300 mm), GSH/ GSSG, izokratno, ACN:HCOOH u H ₂ O [16]
ECG, EGCG, EC, CN	kineski zeleni čaj	HPLC-DAD (Phenomenex Luna 5µ C18 kolona (250 mm x 4,6 mm, 5 µ), λ=280 nm HSCCC, 1ml/min, λ=254-280 nm, UV, gradijentno, A: ACN, B:CH ₃ COOH u H ₂ O [17]
EC, EGC, EGCG, ECG	mlijeko i čaj	Tekućinska kromatografija Nova Pak C18 (3,8 mm x 150 mm), 1ml/min, 35 °C, gradijentno, A: H ₂ O : CH ₃ COOH, B: acetonitril [18]

Tablica 3. Pregled metoda određivanja polifenolnih spojeva [nastavak 2.]

Flavonoidi	Uzorak	Metode određivanja
C, EC	različite vrste kaka	HPLC (LicroCart 250-4 (ODS), C18, 5 μ m, 26 °C, λ =280 nm, UV, gradijentno, A:CH ₃ COOH, B:ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH [19]
C, EC, galska i kafeinska kis.	kikiriki	HPLC-MS, Nucleosil RP C18 (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm), 0,8 mL/min, λ =280 nm, UV, gradijentno HCOOH:H ₂ O [20]
pB, (+)C	vino	HPLC-DAD-MS, C18 kolona(3 μ m, 150 mm x 4,6 mm), 35 °C, 0,5 mL/min, λ =280 nm, gradijentno, A:CH ₃ COOH, B:CH ₃ COOH:ACN, C:ACN [21]
(-)E, pB	zečja pluća	HPLC (Supelcosil LC 18 DB (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm), 1,2 mL/min, λ =214 nm, UV/VIS, izokratno, acetonitril [22]
(+)C, (-)EC, pB2, pB3	<i>Tamarindus indica L.</i>	HPLC, Hewlett Packard HP 1090, C18 (5 μ m, 250 mm x 4 mm), UV-DAD, λ =250, 278 i 340 nm, gradijentno, A:H ₂ O, B:MeOH [23]
(-)EC, pB2	grožđe	Spektroskopija, UV/VIS, HPLC, Ultrasphere C18 ODS (250 mm x 4,6 mm), DAD; λ =280 nm gradijentno, A: H ₂ O:HCOOH, B:CH ₃ CN:H ₂ O:HCOOH [24]
kvercetin, luteolin, miricetin, apigenin	maslina, origano, lovorov list, glog	HPLC, Watters kolona C18 (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm), λ =367 nm, 0,7 mL/min, UV/VIS, izokratno A:fosfatna kiselina, B:MeOH [25]
flavoni i procijanidi	mauritanski crni čaj	HPLC, Germany, Spherisorb ODS 2 RP 18 kolona (5 μ m, 4,6 mm x 150 mm), 0,7 mL/min, 25°C, λ =280nm, ACN: H ₂ O, gradijentno [26]
procijanidini	<i>Rose hips</i>	HPLC-ESI-MS-Superspher 100 RP-18 (4 μ m, 75 mm x 4 mm), izokratno, A:H ₃ PO ₄ , B: ACN [27]
polifenol	jabuka	HPLC-DAD Nova Pak C18 (300 mm x 3,9 mm, 4 μ m) i Nova Pak C18 (10 mm x 3,9 mm, 4 μ m), UV/VIS, λ =370 nm, izokratno, MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH [28]
(-) E, (+) C	voće i povrće	HPLC (250 mm x 3 mm, 5 μ m), 300 μ L/min, UV/ VIS A:H ₂ O:2% CH ₃ COOH, gradijentno B:MeOH:H ₂ O:octena kis.= 90:8:2, gradijentno [29]
(-)EC, (+)C, Q, R	jabuka	HPLC, C8 kolona (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm), 1mL/min, izokratno, MeOH:CH ₃ COONa [30]
(-)EC, (+)C	grožđe	HPLC-UV/VIS Nova Pak C18 (3,9 mm x 150 mm), λ =280 nm, gradijentno, CH ₃ COOH:H ₂ O [31]
EC, EGCG, EGC,GA, ECG	kakao	HPLC, Waters Symmetry C-18 kolona (3,8 mm x 250 mm), 0,8 mL/min, λ =280 nm, UV, izokratno, H ₂ O:MeOH:CH ₃ COOH [32]
(-)EC, (+)C, Q	jagode	HPLC, Series 1100, Hypersil ODS kolona (5 μ m, 125 mm x 4 mm), UV-DAD, gradijentno, A:H ₃ PO ₄ , B:MeOH, C:ACN [33]

Tablica 3. Pregled radova metoda određivanja polifenolnih spojeva [nastavak 3.]

Flavonoidi	Uzorak	Metode određivanja
(-)EC, (+)C	plazma i urin čovjeka i štakora	HPLC, Deverosil HG-5 kolona (2 mm x 250mm), 15 mL/min, 30 min, sobna temp., LC-MS i NMR, gradijentno, MeOH:CH ₃ COOH [34]
(+)C, (-)EC	kakao, plazma krvi	HPLC, Alltima C 18 kolona (5 μm, 150 mm x 4,6 mm), gradijentno, A:MeOH:Na-acetat u H ₂ O, B:MeOH:H ₂ O:Na-acetat [35]
pB2 i (-)EC	urin i plazma štakora	HPLC, LC-MS analiza- Deverosil C30-UG-5 kolona (2 mm x 250 mm), gradijentno, A:HCOOH, B: ACN [36]
(+)C, (-)E, CG, ECG, EGC, EGCG	zeleni i crni čaj	HPLC, PartiSphere 5 C18 (5 μm, 110 mm x 4,6 mm), 32 °C, λ=205 nm, UV, 1 μL CE (40 cm x 50 μm), gradijentno, A: ACN, B: TFA [37]
(-)EC, (+)C, pB1, pB2, pB3, pB4	vino	HPLC, Nucleosil 100 C18 (5 μm, 250 mm x 4 mm), UV-DAD, 0,7 mL/min, 25 °C, gradijentno, A:ortofosforna kis., B:acetonitril, C: ortofosforna kis. TLC (silikagelna pločica, debljine 0,2 mm), izokratno, toluen : aceton : HCOOH [38]
(-)EC, pB2, pB5	cvijeće	HPLC, UV-DAD, LiChrosorb RP-18 (5 μm, 250 mm x 4 mm), 1mL/min, 24 °C, λ=280 nm, gradijentno, A:MeOH, B:o-H ₃ PO ₄ u H ₂ O [39]
EC, EGC, GA, ECG, EGCG	crni, zeleni, jasmin čaj	HPLC-Perkin Elmer 4 LC pumpa,USA (5 μm, 250 mm x 4,6 mm), DAD, C18, UV/VIS λ=210-400 nm gradijentno, A:ACN, B:MeOH:CH ₃ COOH [40]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KEMIKALIJE

Kemikalije i otopine korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, te proizvođači kemikalija prikazani su Tablicom 4. za provedbu ultrazvučne ekstrakcije i tankoslojnu kromatografiju.

Tablica 4. Popis kemikalija upotrijebljenih za ultrazvučnu ekstrakciju i tankoslojnu kromatografiju

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač
acetonitril	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Kemika, Hrvatska
aceton	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	Kemika, Hrvatska
etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Kemika, Hrvatska
heksan	C_6H_{14}	Kemika, Hrvatska
metanol	CH_3OH	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	CH_3COOH	Kemika, Hrvatska
propan-1-ol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	Kemika, Hrvatska
propan-2-ol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	Kemika, Hrvatska
oksalna kiselina	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	Kemika, Hrvatska
diklormetan	CH_2Cl_2	Kemika, Hrvatska

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Instrumenti za provedbu tankoslojne kromatografije

Za nanošenje uzoraka na kromatografske ploče upotrebljavan je uređaj za nanošenje Linomat IV, Camag, Švicarska sa špricom od 100 μL , Hamilton, SAD (Slika 6).



Slika 6. Linomat IV (Camag)

Za snimanje kromatografskih ploča upotrebljen je video - denzitometar Reprostar 3, CAMAG, Švicarska (Slika 7).



Slika 7. Uređaj za snimanje i pohranjivanje kromatograma Reprostar 3

Video denzitometar omogućuje snimanje, pohranjivanje i obradu snimljenih kromatograma. Sastoji se od 3CCD kolor video kamere Hitachi HV- C20 CCIR/ PAL, kabineta i računala. Analogna slika kromatograma snimljena 3CCD kamerom digitalizira se i u takvom digitalnom obliku obrađuje pomoću programa Video Store 2 i VideoScan 1.01. Video Store 2 program koristi se isključivo za pohranjivanje snimljenih kromatograma. Omogućava i programsko podešavanje kamere u smislu podešavanja kontrasta, bijele boje i svjetline slike. Program VideoScan 1.01 koristi se za kvantitativnu obradu pohranjenih kromatograma. Princip kvantitativne obrade kromatograma istovjetan je skeniranju klasičnim denzitometrom s pukotinom. Na zaslonu računala biraju se i definiraju vrpce koje se pretražuju (skeniraju), a rezultat su kromatografske krivulje i parametri kao što su visina i površina ispod kromatografskih krivulja.

3.2.2. Uređaj za separaciju flavonoida iz čokolade

Ekstrakcija flavonoida iz čokolade provedena je ultrazvučnom kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (Slika 8).

Napon: 230 V;
Snaga: 1200 W;
Volumen: 26 L

Frekvencija: 35 kHz;
Dimenzije posude:
500x300x 200 mm.



Slika 8. Ultrazvučna kupelj SONOREX DOGITAL 10 P, Bandelin, Njemačka

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprava čokolade za ultrazvučnu ekstrakciju

Uzorak čokolade iz „Zvečeva“ sa 72% kakaa prvo je zamrznut u tekućem dušiku i usitnjen u tarioniku. Potom se odvagalo 50 mg dobivene čokolade i odmastilo mućkanjem 1 min s 4 mL *n*-heksana. Iz tog se odvagalo 25 mg odmašćene čokolade u koju se dodalo odgovarajući volumen otapala, te se stavljalo kod određenih uvjeta na ultrazvučnu kupelj.

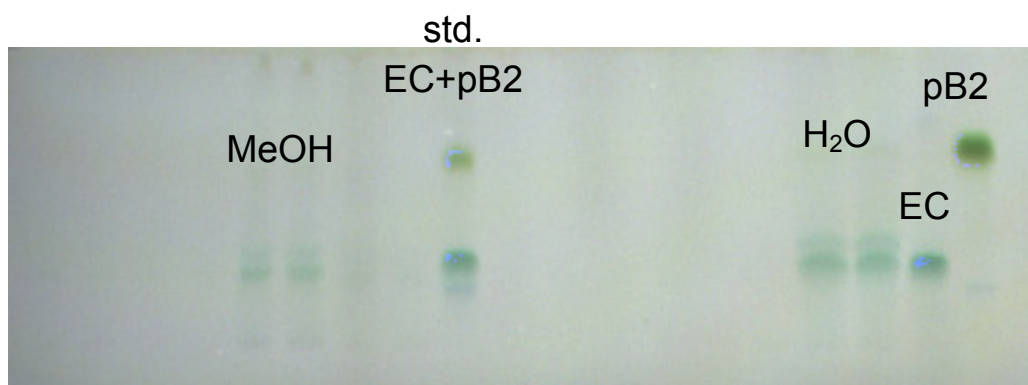
3.3.2. Kromatografsko određivanje epikatehina i procijanidina B2

Dobiveni ekstrakti ultrazvučnom ekstrakcijom profiltrirani su kroz 0,45 µm membranske diskove. Profiltrirani ekstrakti potom su nanašani Linomatom IV na celuloznu kromatografsku podlogu, pri čemu se nanosilo 10 µL ekstrakta. Kromatogrami su razvijani u komori s dvostruko deioniziranom vodom kao pokretnom fazom, a vizualizacija EC i pB2 se provodila 4-dimetilcinamaldehydom te su dobiveni kromatogrami arhivirani i obrađivani Reprostar 3 sustavom s 3 CCD video kolor kamerom [63].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

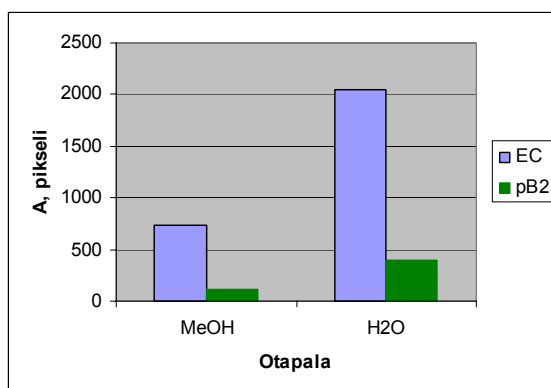
4.1. IZBOR OTAPALA

U 1. eksperimentu je provedena ekstrakcija s čistim organskim otapalima: aceton (ACO), acetonitril (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1-propanol (1-PrOH), 2-propanol (2-PrOH), diklormetan (DKM) i voda (H₂O), koja su najčešće korištena prema literaturnim podacima (Tablica 2).



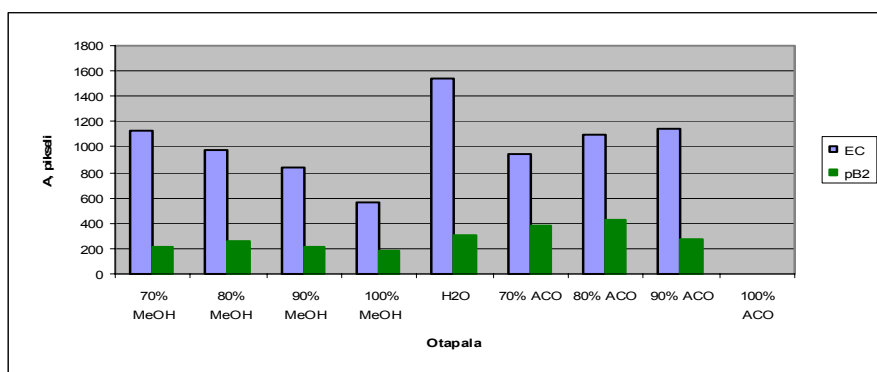
Slika 9. Kromatogram za čista otapala (ACO, ACN, MeOH, EtOH, 1-PrOH, 2-PrOH, DKM, H₂O)

EC i pB2 su ekstrahirani iz uzoraka odmašćene čokolade samo s MeOH i H₂O. Voda je dala veće iskorištenje ekstrakcije kao što je vidljivo iz grafičkog prikaza (Slika 10.), no s vodom se ekstrahiraju i drugi spojevi iz čokolade koji utječu na separaciju analita tankoslojnom kromatografijom, kao što je vidljivo na kromatogramu (Slika 9).

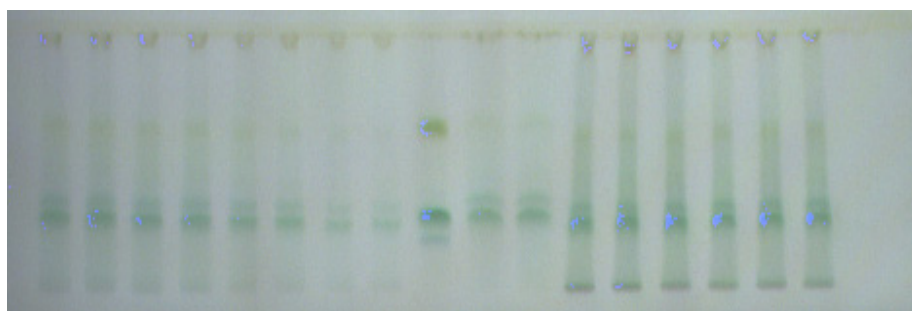


Slika 10. Grafički prikaz izbora otapala za 1. eksperiment

Na temelju 1. eksperimenta odlučilo se dalje provoditi ekstrakciju s organskim otapalima, ali uz određeni udio vode, kako bi postigli bolje iskorištenje pB2 iz čokolade. Kao organska otapala izabrani su metanol (MeOH) i aceton (ACO). MeOH nam je dao jedini rezultate u prethodnom eksperimentu, a ACO s određenim udjelom vode se najčešće koristi u literaturi za ekstrakciju flavonoida iz različitih biljnih materijala. Najčešća organska otapala za ekstrakciju flavonoida iz biljnih materijala mućkanjem koriste se 70%, 80%, 90% i 100% -tni MeOH i ACO. Stoga se u 2. eksperimentu provodi ekstrakcija 70%, 80%, 90% i 100% -tnim MeOH i ACO 10 minuta na ultrazvučnoj kupelji kod 30 °C uz 100%- tnu snagu. Najbolji rezultati su postignuti obzirom na EC s čistom H₂O, odnosno 90%-tni ACO i 70%-tni EtOH, no gledajući pB2 najbolja ekstrakcija postignuta je podjednako s 80% i 90% ACO, odnosno 80% MeOH (Slike 11 i 12).



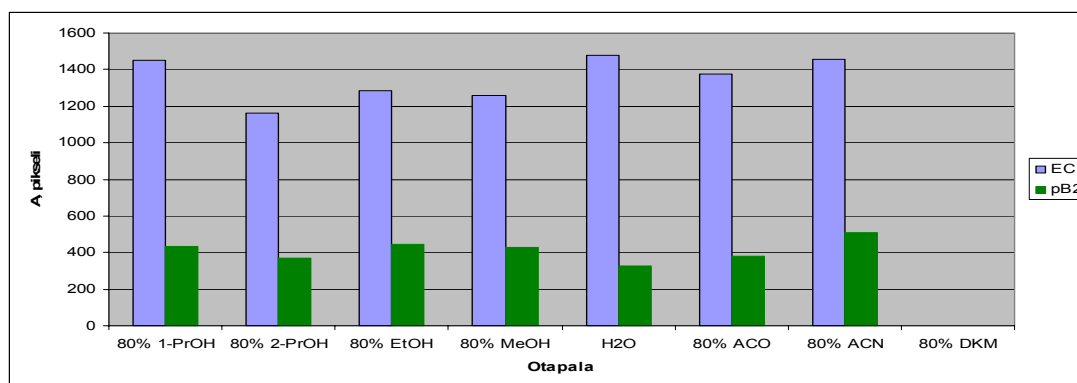
Slika 11. Grafički prikaz za 70%, 80% i 90%- tna organska otapala MeOH i ACO na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C



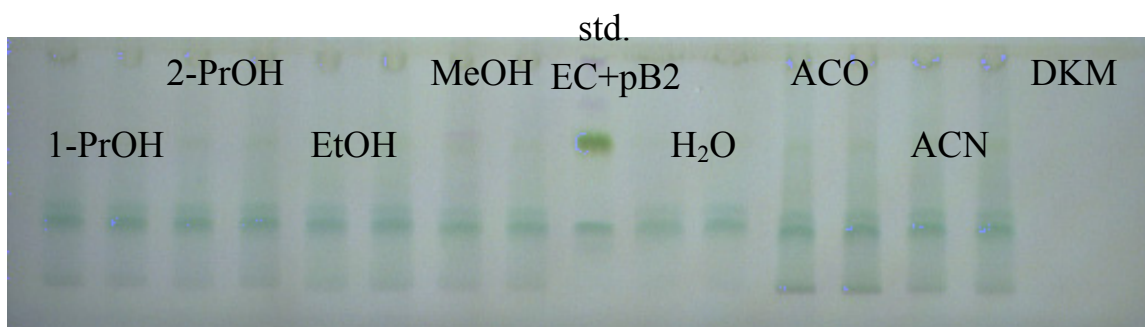
Slika 12. Kromatogram za 70%, 80% i 90%- tna organska otapala MeOH i ACO, te ekstrakti vode na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C

U 3. eksperimentu je provedena ekstrakcija flavonoida i s ostalim 80%-tnim organskim otapalima (1-PrOH, 2-PrOH, DKM, ACN, EtOH) koji kao čista otapala nisu uopće ekstrahirali navedene analite.

S obzirom na EC najbolji rezultati su ponovno postignuti s H₂O, dok za pB2 dobivaju se podjednaka iskorištenja i za 80%-tni 1-PrOH, EtOH, MeOH, kao i za ACO, a nešto bolje iskorištenje dobiveno je s 80%-tnim ACN (Slike 13 i 14).



Slika 13. Grafički prikaz 80%- tna organska otapala i ekstrakti vode na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C

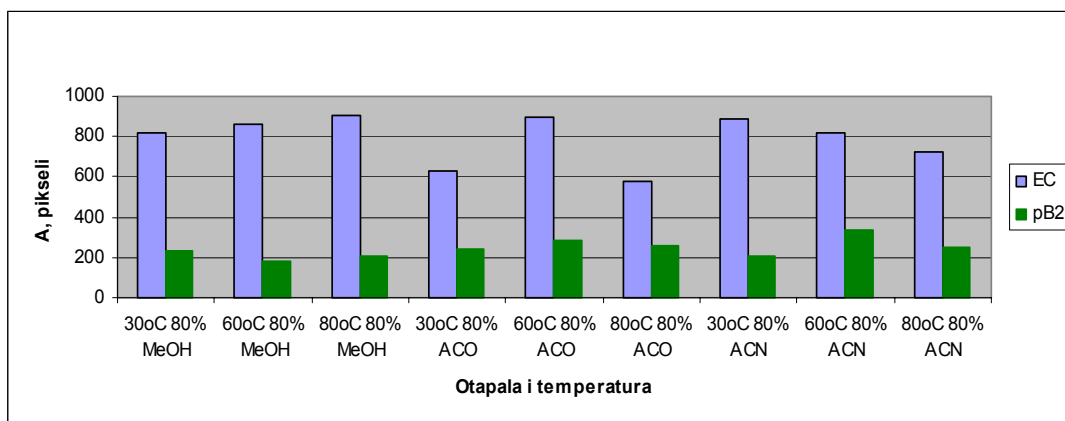


Slika 14. Kromatogram za 80%- tna organska otapala i ekstrakti vode na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C

4.2. IZBOR TEMPERATURE

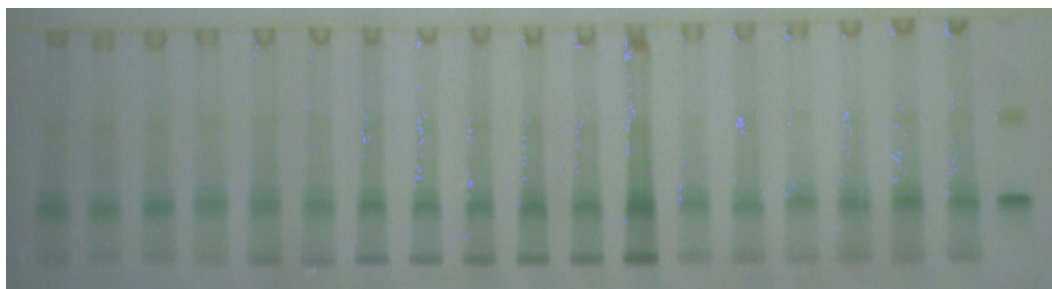
Iz tog razloga u 4. eksperimentu u kojem se želi izabrati optimalna temperatura, ekstrakcija se provodi s 80%- tni MeOH, ACO i ACN. 1-PrOH i EtOH se u daljnim ispitivanjima ipak ne koriste jer se ponašaju gotovo jednako kao MeOH.

Obradom kromatograma najbolje iskorištenje je dobiveno kod 80 °C za 80 %-tni MeOH s obzirom na EC, dok za pB2 su rezultati podjednaki kod sve tri temperature. Kod 60 °C 80 %-tni ACO daje najbolje rezultate s obzirom na EC i na pB2. Dok za 80 %-tni ACN je dobiveno najbolje iskorištenje kod 30 °C za EC, a kod 60 °C za pB2 (Slika 15).



Slika 15. Grafički prikaz za 80%-tna organska otapala MeOH, ACO i ACN na ultrazvučnoj kupelji 10 min, 100% (1200 W), kod različitih temperatura-30-60-80 °C

No kao što je vidljivo iz kromatograma kod viših temperatura ekstrahira se i veća količina drugih spojeva iz čokolade, te postoji značajan utjecaj matice, koji utječe na separaciju željenih analita, ali i na njihovo određivanje, stoga je odlučeno da bi se smanjio utjecaj matice da se svi daljnji eksperimenti i dalje rade na 30 °C (Slika 16).

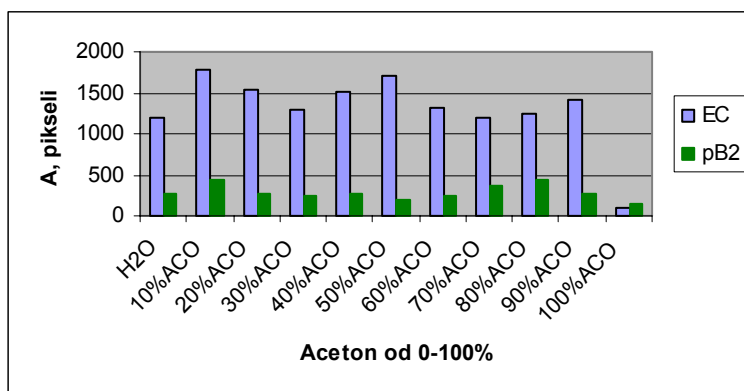


Slika 16. Kromatogram za 80%-tna organska otapala MeOH, ACO i ACN na ultrazvučnoj kupelji 10 min, 100% (1200 W), kod različitih temperatura-30-60-80 °C

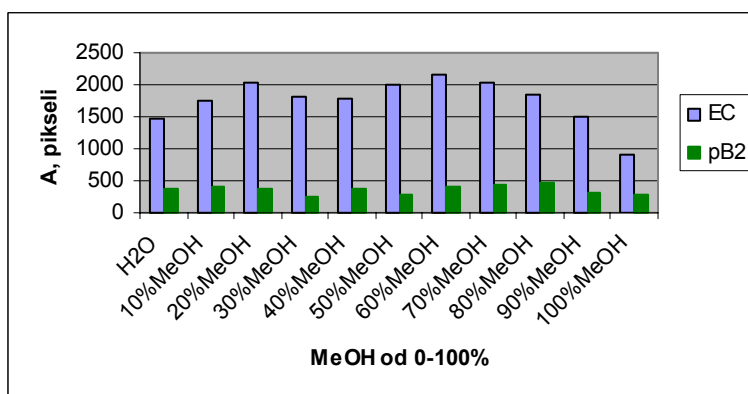
Iz svih dosada provedenih eksperimenata može se primjetiti da površine kromatografskih krivulja za EC varira od približno 800-1200 piksela, dok kod pB2 između 200-400 piksela, na što osobito utječe matica uzorka. Stoga se u idućem eksperimentu željelo vidjeti kako utječe udio organskog otapala na ekstrakciju, kao i dodatak oksalne kiseline koja ima svojstvo stvaranja kompleksa, te da li se dodavanjem kiseline može smanjiti utjecaj matice.

4.3. IZBOR VOLUMENA OTAPALA

U 5. eksperimentu je vidljivo da 10 %-tni aceton daje najbolje iskorištenje i za EC i pB2, no u literaturi se taj sustav nije do sada koristio za ekstrakciju i to zbog velikog udjela vode s kojom se otapa iz čokolade i niz drugih spojeva što daje veliki utjecaj matice, dok kod MeOH se dobivaju najbolja iskorištenja s 20 %-tnim i 60 %-tnim MeOH i u ovom slučaju se primjećuje veći utjecaj matice što je veći udio H₂O (Slike 17 i 18).

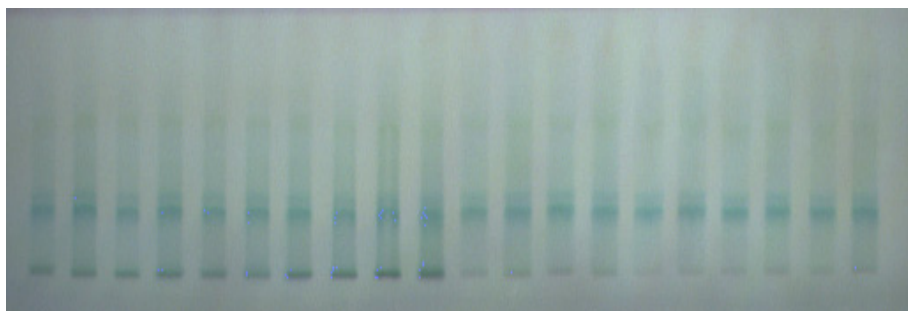


Slika 17. Grafički prikaz izbora otapala za 0-100%-tni ACO, ultrazvučna kupelj 10 min, 100% (1200 W), 30 °C

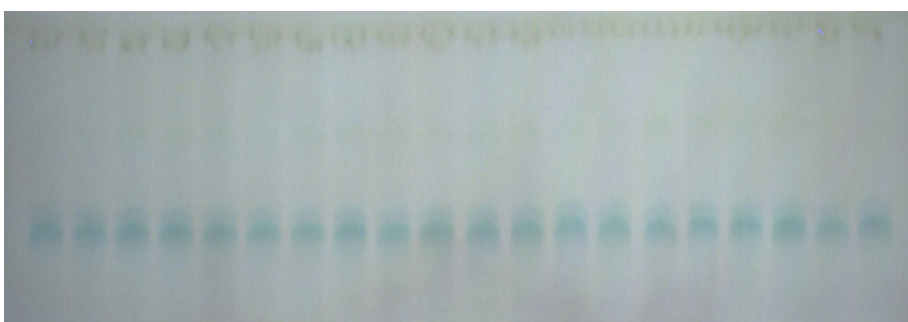


Slika 18. Grafički prikaz izbora otapala za 0-100%-tni MeOH, ultrazvučna kupelj 10 min, 100% (1200 W), 30 °C

U 7. i 8. eksperimentu dodavala se oksalna kiselina u rasponu od 0,5 % do 2 % uz veći i manji udio organske faze, no iz kromatograma je vidljivo da je utjecaj matice uz dodatak kiseline još pojačan, osobito za otapala s većim udjelom organske faze, a kod 8. eksperimenta je smanjen utjecaj matice, ali i iskorištenje za pB2 pri čemu je površina kromatografskih krivulja bila ispod 200 piksela. Iz tog razloga je odlučeno da se u daljnjim eksperimentima ide samo s 80 %-tnim MeOH jer prema kromatogramu pokazuje dobro iskorištenje pB2 iz čokolade s relativno malim utjecajem matice, osobito obzirom na 80 %-tni ACO i H₂O (Slike 19 i 20).

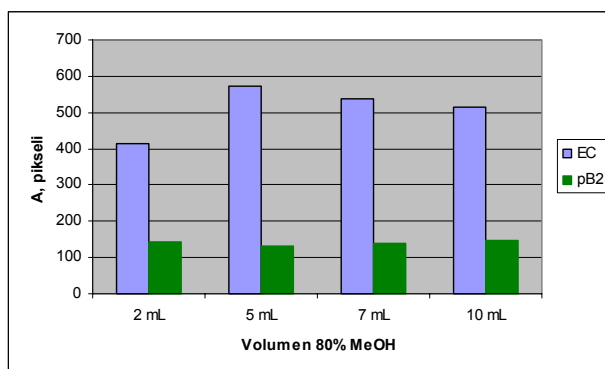


Slika 19. Kromatogram za 90% i 80% ACO; 60% i 70% MeOH s oksalnom kiselinom (0,5%-1%) na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C

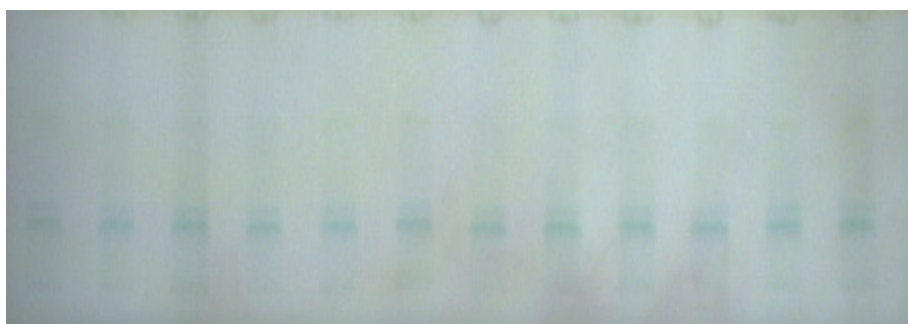


Slika 20. Kromatogram za 10% i 20% MeOH s oksalnom kiselinom (0,5%-1%-2%) na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W), 30 °C

Svi do sada navedeni eksperimenti radili su se s 5 mL bilo kojeg sustava otapala, no željelo se vidjeti da li volumen otapala utječe na bolju ili lošiju ekstrakciju EC i pB2 i kao što je vidljivo iz grafičkog prikaza (Slika 21) volumen otapala ne utječe značajno na ekstrakciju pB2, vjerojatno jer ga u ovoj vrsti čokolada ima u vrlo malom udjelu svega 0,04-1,20 mg/g čokolade. Dok volumen otapala utječe na ekstrakciju EC (u ovoj vrsti čokolada ima ga značajno više od 1,20 mg/g), te je za daljnje eksperimente odlučeno da se nastavi raditi s 5 mL 80 %-tnog metanola (Slika 22).



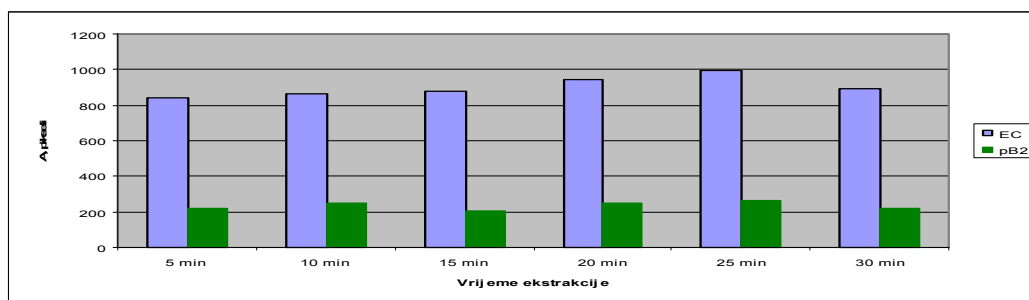
Slika 21. Grafički prikaz izbora volumena otapala za 80 %-tni MeOH, ultrazvučna kupelj 10 min, 100% (1200 W), 30 °C



Slika 22. Kromatogram za ekstrakciju analita različitim volumenima (2-5-7-10 mL) s 80% MeOH na ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, 100% (1200 W) kod 30 °C

4.4. IZBOR VREMENA TRAJANJA EKSTRAKCIJE

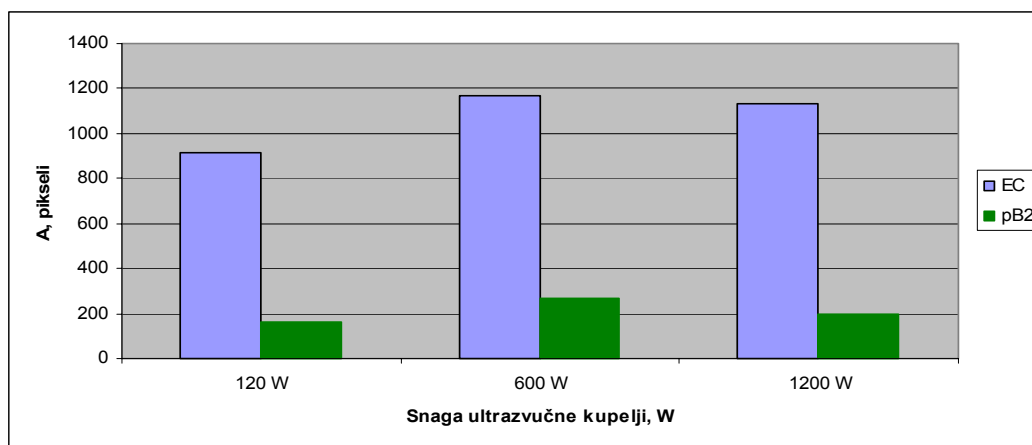
U 10. eksperimentu biralo se vrijeme trajanja ekstrakcije na ultrazvučnoj kupelji, najveće iskorištenje postignuto je kod 25 minuta i za EC i pB2 (Slika 23).



Slika 23. Grafički prikaz za izbor vremena trajanja, ekstrakcija analita s 5 mL 80% MeOH na ultrazvučnoj kupelji 5-10-15-20-25-30 minuta uz 100% (1200 W) snagu kod 30 °C

4.5. IZBOR SNAGE ULTRAZVUČNE KUPELJI

Svi eksperimenti su provedeni uz snagu ultrazvučne kupelji od 1200 W, stoga se posljednjim eksperimentom htjelo odrediti da li je nužno raditi uz najveću snagu ultrazvučne kupelji ili je moguće raditi kod manjih snaga. Najbolji rezultati dobiveni na temelju svih do sada navedenih eksperimenata dobiveni su s 5 mL 80 %-tnog metanola kod 30 °C uz trajanje ultrazvučne ekstrakcije 25 minuta, pa je u 11. eksperimentu provedena ekstrakcija EC i pB2 iz odmašćene čokolade kod navedenih uvjeta uz promjenu snage ultrazvučne kupelji: 120 W, 600 W i 1200 W. Iz Slike 24. vidljivo je da se najbolje iskorištenje postiže kod 600 W i za EC i za pB2.



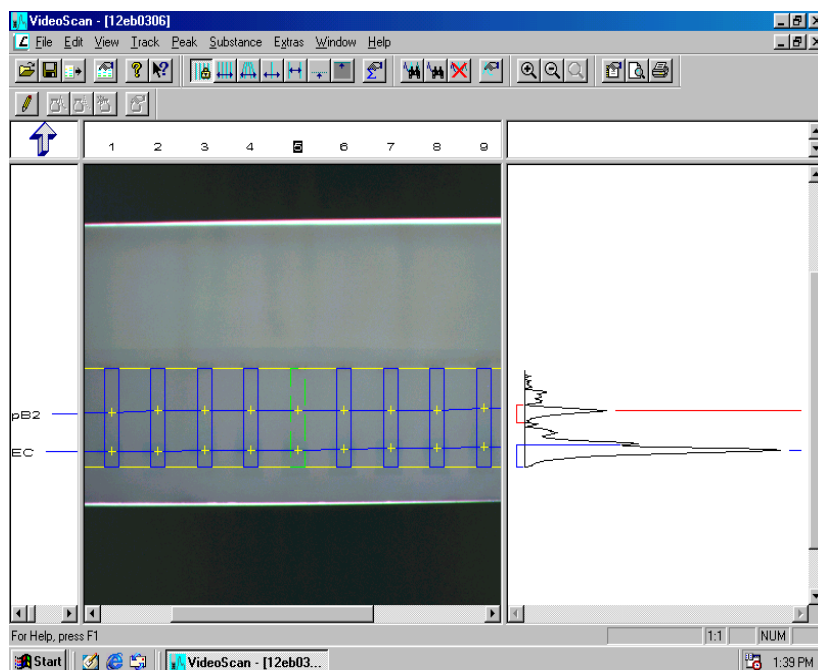
Slika 24. Grafički prikaz izbora snage ultrazvučne ekstrakcije EC i pB2 s 5 mL 80% MeOH na ultrazvučnoj kupelji 25 minuta uz snagu od 120 W-600 W-1200 W kod 30 °C

5. ZAKLJUČAK

Konačno smo zaključili da su optimalni radni uvjeti za ekstrakciju EC i pB2 na ultrazvučnoj kupelji sljedeći: otapalo je 80 %-tni MeOH, volumen otapala iznosi 5 mL, temperatura ekstrakcije 30 °C, vrijeme ekstrakcije 25 min te snaga ultrazvučne kupelji 600 W (Slika 25).

Ultrazvučna ekstrakcija je mnogo brža od uobičajenih metoda, a potrošnja organskog otapala je bitno manja. Nadalje, ekstrakte nakon ultrazvučne ekstrakcije nije potrebno dodatno pročišćavati, na primjer ekstrakcijom čvrstom fazom, prije kromatografskog određivanja, što dodatno smanjuje trajanje analize.

Svi eksperimenti do sada provedeni su na jednoj vrsti čokolade pri čemu je bio glavni cilj dobiti što veću površinu ispod kromatografske krivulje za EC i pB2, nastavak rada podrazumijeva rad uz standardni dodatak EC i pB2 radi kvantifikacije metode ekstrakcije i njene primjene na druge vrste čokolade.



Slika 25. Kromatogram dobiven kod optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije EC i pB2 iz čokolade

6. LITERATURA

[1] <http://hr.wikipedia.org/wiki/Bioflavonoidi>

[2] <http://www.plivazdravlje.hr/?section=arhiva&acat=a&cat=a&id=3093&show=1>

[3] D. F. Olivera, S. Z. Viña, C. M. Marami, R. M. Ferreyra, A. Mugridge, A. R. Chaves, R. M. Mascheroni,
Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (Brassica oleracea L. Gemifera DC) after frozen storage,
Journal of Food Engineering 84 (2008) 148-155

[4] R. Chirinos, D. Campos, N. Costa, C. Arbizu, R. Pedreschi, Y. Larondelle,
Phenolic profiles of andean mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity,
Food Chemistry 106 (2008) 1285-1298

[5] M. Jerez, A. Selga, J. Sineiro, J. L. Torres, M. J. Núñez,
A comparison between bark extracts from Pinus pinaster and Pinus radiata: Antioxidant activity and procyanidin composition,
Food Chemistry 100 (2007) 439-444

[6] C. Laurent, P. Besançon, B. Caporiccio,
Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/ Caco-2 cell culture model,
Food Chemistry 100 (2007) 1704-1712

[7] F. Khallouki, R. Haubner, W. E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, R. W. Owen,
Isolation, purification and identification of ellegic acid derivatives, catechins and procyanidins from the root bark of Anisophyllea dichostyla R. Br.,
Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 472-485

[8] O. Laporta, L. P. Fons, R. Mallavia, N. Caturla, V. Micol,
Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from Hypoxis rooperi corm extract (African potato),
Food Chemistry 101 (2007) 1425-1437

[9] L. Majhenič, M. Škerget, Ž. Knez,
Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts,
Food Chemistry 104 (2007) 1258-1268

[10] K. Koba, A. Matsuoka, K. Osada, Y.-S. Huang,
Effect of loquat (Eriobotrya japonica) extracts on LDL oxidation,
Food Chemistry 104 (2007) 308-316

[11] T. I. Lafka, V. Sinanoglou, E. S. Lazos,
On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes,
Food Chemistry 104 (2007) 1206-1214

[12] A. M. Reddy, V. S. Reddy, B. E. Scheffler, U. Wienand, A. R. Reddy,
Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential,
Metabolic Engineering 9 (2007) 95-111

- [13] M. Jerez, M. Pinelo, J. Sineiro, M. J. Núñez,
Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis,
Food Chemistry 94 (2006) 406-414
- [14] N. Vivas, M. F. Nonier, I. Pianet, N. Vivas de Gaulejac, É. Fouquet,
Proanthocyanidins from Quercus patraea and Q. robur heartwood: quantification and structures,
C. R. Chimie 9 (2006) 120-126
- [15] B. Sun, M. C. Leandro, V. de Freitas, M. I. Spranger,
Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography,
Journal of Chromatography A 1128 (2006) 27-38
- [16] G. Galati, A. Lin, A. M. Sultan, P. J. O'Brien,
Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins,
Free radical Biology and Medicine 40 (2006) 570-580
- [17] W. Si, J. Gong, R. Tsao, M. Kalab, R. Yang, Y. Yin,
Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract,
Journal of Chromatography A 1125 (2006) 204-210
- [18] M. G. Ferruzzi, R. J. Green,
Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography,
Food chemistry 99 (2006) 484-491
- [19] N. Niemenak, C. Rohsius, S. Elwers, D. O. Ndoumou, R. Lieberei,
Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolic and anthocyanins contents,
Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 612-619
- [20] J. Yu, M. Ahmedna, I. Goktepe, J. Dai,
Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing,
Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 364-371
- [21] M. García-Marino, J. C. Rivas-Gonzalo, E. Ibáñez, C. García-Moreno,
Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction,
Analytica Chimica Acta 563 (2006) 44-50
- [22] J. I. Ottavini, L. Actis-Goretta, J. J. Villordo, C. G. Fraga,
Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition,
Biochimie 88 (2006) 359-365
- [23] Y. Sudjaroen, R. Haubner, G. Würtele, W. E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder,
S. Changbumrung, H. Bartsch, R. W. Owen,
Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (Tamarindus indica L.) seeds and pericarp,
Food and Chemical Toxicology 43 (2005) 1673-1682

- [24] B. Berké, V. A. P. de Freitas,
Influence of procyanidin structures of their ability to complex with oenin,
Food Chemistry 90 (2005) 453-460
- [25] M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hraš, M. Simonič, Ž. Knez,
Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities,
Food Chemistry 89 (2005) 191-198
- [26] A. L. Ramma, T. Bahorun, A. Crozier, V. Zbarsky, K. P. Datla, D. T. Dexter,
O. I. Aruoma,
Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas,
Food Research International 38 (2005) 357-367
- [27] J. P. Salminen, M. Karonen, K. Lempa, J. Liimatainen, J. Sinkkonen, M. Lukkarinen, K. Pihlaja,
Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C,
Journal of Chromatography A 1077 (2005) 170-180
- [28] R. M. Alonso-Salces, A. Barranco, E. Corta, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente,
A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurised liquid extraction,
Talanta 65 (2005) 654-662
- [29] Z. Piñeiro, M. Palma, C. G. Barroso,
Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids,
Journal of Chromatography A 1026 (2004) 19-23
- [30] S. B. Lotito, B. Frei,
Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects,
Free Radical Biology and Medicine (2004) 201-211
- [31] B. Pekić, V. Kovač, E. Alonso, E. Revilla,
Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds,
Food Chemistry (1998) 201-206
- [32] H. Osman, R. Nasarudin, S. L. Lee,
Extracts of cocoa (Theobroma cacao L.) leaves and their antioxidant potential,
Food Chemistry 86 (2004) 41-46
- [33] F. Breitfellner, S. Solar, G. Sontag,
Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries,
Radiation Physics and Chemistry 67 (2003) 497-499
- [34] M. Natsume, N. Osakabe, M. Oyama, M. Sasaki, S. Baba, J. Nakamura, T. Osawa,
J. Terao,
Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat,
Free Radical Biology and Medicine (2003) 840-849

- [35] D. D. Schramm, M. Karim, H. R. Schrader, R. R. Holt, N. J. Kirkpatrick, J. A. Polagruto, J. L. Ensunsa, H. H. Schmitz, C. L. Keen, *Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols*, Life sciences 73 (2003) 857-869
- [36] S. Baba, N. Osakabe, M. Natsume, J. Terao, *Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 (epicatechin-(4- β -8)-epicatechin) in rats* Free radical Biology and Medicine 33 (1) (2002) 142-148
- [37] B. L. Lee, C. N. Ong, *Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 881 (2000) 439-44
- [38] P. L. Teissedre, N. Landrault, *Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability*, Food Research International 33 (2000) 461-467
- [39] G. E. Rohr, B. Meier, O. Sticher, *Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in Crataegus leaves and flowers*, Journal of Chromatography A 835 (1999) 59-65
- [40] W. E. Bronner, G. R. Beecher, *Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 805 (1998) 137-142
- [41] D. Rosseti, G. E. Yakubov, J. R. Stokes, A.-M. Williamson, G. G. Fuller, *Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology*, Food hydrocolloids (2007)
- [42] B. Liu, Y. Zhu, *Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids*, Journal of Food Engineering 78 (2007) 584-587
- [43] J. L. Donovan, D. V. Luthria, P. Stremple, A. L. Waterhouse, *Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'-and 4'-O-methylated analogs A comparison of sensitive methods* Journal of Chromatography B 726 (1999) 277-283
- [44] Q. Chang, Z. Zuo, M. S. S. Chow, W. K. K. Ho, *Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (Crataegus pinnatifida var. major) fruits and a hawthorn drink*, Food Chemistry 98 (2006) 426-430
- [45] R. Gotti, S. Furlanetto, S. Pinzauti, V. Cavrini, *Analysis of catechins in Theobroma cacao beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography*, Journal of Chromatography A 1112 (2006) 345-352

- [46] M. C. Domínguez, S. Guyot, N. Marnet, J. Le Petit, I. P. Gaime, S. Roussos, C. Augur,
Degradation of procyanidins by Aspergillus fumigatus: Identification of a novel aromatic ring cleavage product,
Biochimie 88 (2006) 1899-1908
- [47] Y. Sudjaroen, R. Haubner, G. Würtele, W. E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalter, S. Changbumrung, H. Bartsch, R. W. Owen,
Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (Tamarindus indica L.) seeds and pericarp,
Food and Chemical Toxicology 43 (2005) 1673-1682
- [48] S. T. Savova, F. Ribarova, M. Gerova,
(+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits,
Journal of food Composition and Analysis 18 (2005) 691-698
- [49] R. Guendez, S. Kallithraka, D. P. Makris, P. Kefalas,
Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis vinifera sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity,
Food Chemistry 89 (2005) 1-9
- [50] R. M. Alonso-Salces, K. Ndjoko, E. F. Queiroz, J. R. Ioset, K. Hostettmann, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente,
On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection,
Journal of Chromatography A, 1046 (2004) 89-100
- [51] E. Salas, V. Atanasova, C. P. Legrand, E. Meudec, J. P. Mazauric, V. Cheynier,
Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions,
Analytica Chimica Acta 513 (2004) 325-332
- [52] A. M. Gil, I. F. Duarte, M. Godejohann, U. Braumann, M. Maraschin, M. Spraul,
Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection,
Analytica Chimica Acta 488 (2003) 35-51
- [53] J. A. Kennedy, A. W. Taylor,
Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography,
Journal of Chromatography A 995 (2003) 99-107
- [54] J. P. E. Spencer, H. Schroeter, B. Shenoy, S. Kaila, S. Srail, E. S. Debnam, C. Rice-Evans,
Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine,
Biochemical and Biophysical Research Communications 285 (2001) 588-59
- [55] J. Wollgast, L. Pallaroni, M. E. Agazzi, E. Anklam,
Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection,
Journal of Chromatography A 926 (2001) 211-220

- [56] M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J. P. Pérez, T. Borges, F. J. García Montelongo,
Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection,
Journal of Chromatography A 912 (2001) 249-257
- [57] K. A. Chevaux, L. Jackson, M. E. Villar, J. A. Mundt, J. F. Commisso§, G. E. Adamson, M. M. McCullough, H. H. Schmitz, N. K. Hollenberg,
Proximate, mineral and procyanidin content of certain foods and beverages consumed by the Kuna Amerinds of Panama,
Journal of Food Composition and Analysis 14 (2001) 553-563
- [58] J. P. Aucamp, Y. Hara, Z. Apostolides,
Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography,
Journal of Chromatography A 876 (2000) 235-242
- [59] T. K. Mao, J. Powell, J. Van de Water, C. L. Keen, H. H. Schmitz, J. F. Hammerstone, M. E. Gershwin,
The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells,
Life Sciences (2000) 1377-1386
- [60] A. Yanagida, T. Kanda, T. Shoji, M. O. Kameyama, T. Nagata,
Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography,
Journal of Chromatography A 855 (1999) 181-190
- [61] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel,
Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system,
Journal of Chromatography A 827 (1998) 113-120
- [62] H. Horie, K. Kohata,
Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation,
Journal of Chromatography A 802 (1998) 219-223
- [63] V. Glavnik, B. Simonovska, I. Vovk,
Densitometric determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by 4-dimethylaminocinamaldehyde reagent,
Journal of Chromatography A xxx (2008) xxx-xxx, *in press*
Doi:10.1016/j.chroma.2009.03.026

7. SAŽETAK

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA EPIKATEHINA I PROCIJANIDINA B2 IZ ČOKOLADE

Dijana Drljača i Marina Mrđa

Proantocijanidini su polifenolni spojevi koji su zapravo velika skupina bioflavonoida. Mogu se naći u različitim biljkama. Karakteristični polifenolni spojevi u sjemenkama kakaovca su epikatehin (EC) i procijanidin B2 (pB2), koji djeluju antioksidativno. Izrazito crna čokolada sadrži jako puno EC i pB2 za koje je utvrđeno da su dvostruko, pa i trostruko jači antioksidansi od bioflavonoida u crnom vinu i zelenom čaju. Da bi bilo moguće pratiti utjecaj tehnološkog procesa proizvodnje čokolade na sadržaj EC i pB2 nužno ih je ekstrahirati iz polazne sirovine, ali i nakon svakog pojedinog koraka proizvodnje.

Klasičnom ekstrakcijom tekuće-kruto ekstrahira se niz spojeva koji smetaju pri određivanju EC i pB2. Ultrazvučna ekstrakcija je metoda ekstrakcije analita otapalom iz krutog uzorka djelovanjem ultrazvučnih valova kod kontroliranih uvjeta temperature i snage, čime se postiže bolje iskorištenje uz manju potrošnju organskih otapala i kraće vrijeme ekstrakcije. Pravilnim odabirom otapala za ekstrakciju i eksperimentalnih uvjeta, moguće je ukloniti ukupne interferencije ostalih tvari prisutnih u uzorku.

Cilj ovog rada bio je optimirati postupak ultrazvučne ekstrakcije EC i pB2 kako bi se smanjio utjecaj matice, odnosno poboljšalo iskorištenje. U svrhu postizanja što bolje ekstrakcije ispitana su različita otapala, i mijenjani su eksperimentalni uvjeti kao što su: volumen otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije, te snaga ultrazvučne kupelji.

Dobiveni optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije za 25 mg odmašćenog uzorka čokoladnog praha bez masnoće su: 5 mL 80% metanola kod 30 °C uz trajanje ekstrakcije 25 minuta kod snage ultrazvučne kupelji od 600 W.

Za određivanje EC i pB2 u ekstraktima primijenjena je tankoslojna kromatografija.

Ključne riječi:

epikatehin, procijanidin B2, čokolada, ultrazvučna ekstrakcija, tankoslojna kromatografija

8. SUMMARY

ULTRASONIC SOLVENT EXTRACTION OF EPICATECHIN AND PROCYANIDIN B2 FROM CHOCOLATE

Dijana Drljača and Marina Mrđa

A number of studies have shown that natural antioxidants from plant sources can effectively inhibit oxidation in food and reduce the risk of age-dependent diseases. Polyphenols, abundant in fruits, vegetables, teas, medicinal plants, have received the greatest attention and have been studied extensively, since they are a kind of highly effective antioxidant and less toxic than synthetic antioxidants. Cocoa beans, chocolate, and cocoa powder are known to be rich sources of polyphenols. The concentrations of all polyphenols can vary tremendously between cocoa-containing foods, and this can vary depending on the source of the beans, the processing conditions, and how the chocolates are manufactured. Due to these facts, the ratio and type of polyphenols found in the beans are unlikely to be exactly the same as those found in the final product. The main polyphenols in chocolate are (-)-epicatechin (EC) and procyanidin B2 (pB2).

The aim of this work was to extract EC and pB2 from chocolate samples with high efficiency and less matrix effect. The extraction of these phenolic compounds from plants and other solid samples has been traditionally performed using solvent extraction (Soxhlet) or steam distillation techniques. Traditional methods of extraction are labour-intensive, time consuming and require large volumes of solvents. In this work ultrasonic solvent extraction (USE) procedure was developed for the fast extraction of EC and pB2 from chocolate. Several critical parameters of the USE procedure (extraction time and temperature, volume of solvent, power of ultrasonic bath) were studied for the optimization of the extraction protocol. The optimal yield with ultrasonic solvent extraction was 80% methanol 5 mL/25 mg defatted chocolate powder, at 30 °C for 25 min in ultrasonic bath at 600 W.

Extraction efficiency was determined by thin-layer chromatography.

Key words:

epicatechin, procyanidin B2, chocolate, ultrasonic solvent extraction, thin-layer chromatography

9. ŽIVOTOPISI

DIJANA DRLJAČA

Rođena 12. kolovoza 1984. u Zagrebu. 2003. godine završila je srednju Kemijsku i geološku-tehničku školu u Zagrebu, te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Na Zavodu za analitičku kemiju u sklopu kolegija Kemijsko-inženjerske vježbe započinje svoj znanstveni rad pod mentorstvom dr.sc. Danijele Ašperger. koji je i dio Bilateralne suradnje Hrvatska-Slovenija (Babić-Vovk). Dio rezultata svog znanstvenog djelovanja prikazala je u poster sekciji na XII. Ružičkinim danima u Vukovaru (rujan, 2008.). Sudjelovala je kao dio tehničke potpore na Festivalu znanosti u Tehničkom muzeju u Zagrebu (travanj, 2008.) u radionici „Određivanje antioksidansa u čokoladi“ i na XIV. Međunarodnom simpoziju separacijskih znanosti-Nova postignuća u kromatografiji u Primoštenu (listopad, 2008.). Trenutačno izrađuje diplomski rad pod naslovom „Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta“ pod mentorstvom dr. sc. Sandre Babić, doc. Koristi se vrlo dobro engleskim jezikom, te osnovno njemačkim i računalno je pismena.

MARINA MRĐA

Rođena 2. studenog 1984. u Bihaću, BiH. 2003. godine završila je srednju XIII. Gimnaziju u Zagrebu, te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Na Zavodu za analitičku kemiju u sklopu kolegija Kemijsko-inženjerske vježbe započinje svoj znanstveni rad pod mentorstvom dr.sc. Danijele Ašperger. koji je i dio Bilateralne suradnje Hrvatska-Slovenija (Babić-Vovk). Dio rezultata svog znanstvenog djelovanja prikazala u poster sekciji na XII. Ružičkinim danima u Vukovaru (rujan, 2008.). Sudjelovala je kao dio tehničke potpore na Festivalu znanosti u Tehničkom muzeju u Zagrebu (travanj, 2008.) u radionici „Antibiotici-novi zagađivači u okolišu“. Trenutačno izrađuje diplomski rad pod naslovom „Optimizacija mikrovalne ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta“ pod mentorstvom dr. sc. Sandre Babić, doc. Koristi se vrlo dobro engleskim jezikom i računalno je pismena.