

Ekstrakcija piperina u ekološki prihvatljivim otapalima

Bužančić, Margarita

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:873348>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Margarita Bužančić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Margarita Bužančić

DIPLOMSKI RAD

Ekstrakcija piperina u ekološki prihvatljivim otapalima

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Aleksandra Sander

izv. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

prof. dr. sc. Vesna Tomašić

Zagreb, rujan, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandre Sander, i na Zavodu za fizikalnu kemiju Odjela kemije, biologije i biotehnologije Sveučilišta u Perugi pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Paole Sassi, tijekom trajanja akademske 2015./2016. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Aleksandri Sander na trudu i zanimanju koji je uložila u osmišljavanje i provedbu ovog diplomskog rada, na njezinoj stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade. Također, zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo kao i asistenticama Martini Biošić i Ivi Mingi, a posebno želim zahvaliti tehničaru Željku Pavlinu na pomoći tijekom pripreme eksperimenata.

Zahvaljujem profesorici dr. sc. Paoli Sassi na mogućnosti izrade eksperimentalnog dijela na Odjelu za kemiju, biologiju i biotehnologiju Sveučilišta u Perugi i mentorstvu tijekom mog boravka u Italiji. Veliko hvala na pomoći i strpljenju asistenticama Marii Ricci, Beatrice Gironi i cijeloj istraživačkoj grupi Zavoda za fizikalnu kemiju. Također, zahvaljujem Francesci Rossi i tehničaru Robertu Maria Pellegrinu na pristupu potrebnim instrumentima i laboratorijima na fakultetu.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom studija, a posebno hvala mojoj baki i sestri, koje su mi ovih pet godina bile najveći oslonac. Želim se zahvaliti kolegicama Bernardi Damianić i Ana-Marii Županić koje su mi bile najveća pomoć u rješavanju papirologije, unaprijeđivanju talijanskog jezika i snalaženju na stranom sveučilištu tijekom Erasmus+ mobilnosti. Zahvaljujem se kolegici s Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Miji Filić koja mi je pomogla razumjeti i primijeniti statističke metode koje sam koristila u obradi podataka.

Također hvala svim prijateljima, kolegama, profesorima, službenicama u referadi, erasmus koordinatorima i ostalima koji su mi na različite načine pomogli.

SAŽETAK:

Ekstrakcija je toplinski separacijski proces koji se koristi u raznim industrijskim granama zbog blagih uvjeta provedbe procesa. U većini slučajeva koriste se organska otapala koja često predstavljaju ekološki problem, zbog čega se kontinuirano radi na razvoju različitih novih, ekološki prihvatljivih otapala. Istraživanja su pokazala da ekološki prihvatljiva niskotemperaturna eutektička otapala mogu biti adekvatna zamjena hlapivim organskim otapalima. U novije vrijeme, istražuje se njihova primjena za ekstrakciju visokovrijednih spojeva iz biljnih sirovina. Ekstrakcijom iz papra dobiva se piperin - alkaloid karakterističnog ljutog okusa, koji zbog svojih svojstava ima različitu i široku primjenu u kućanstvu, kao i u medicini.

U ovom radu istraženi su novi postupci ekstrakcije piperina iz devet različitih vrsta papra, uz pomoć niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Korištenjem spektroskopskih i kromatografskih metoda, provedena je fitokemijska analiza papara. Prilikom iste istražene su razlike u ispitivanim vrstama te je dokazano da piperina najviše sadrži zeleni papar vrste *P. nigruma*. Na dobivenim rezultatima provedena je statistička analiza glavnih komponenata.

Na temelju preliminarnih istraživanja vezanih za topljivost i strukturu rekristaliziranog piperina odabrano je kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) kao najpovoljnije otapalo za ekstrakciju piperina iz papara. Ekstrakcija je provedena u šaržnom ekstraktoru s magnetskim miješanjem pri različitim udjelima papra u suspenziji. Za kristalizaciju piperina iz ekstraktne faze korištena je voda kao antiotapalo. Otapalo je regenerirano isparavanjem pod vakuumom čime je omogućeno njegovo višestruko korištenje.

Ključne riječi: ekstrakcija, niskotemperaturna eutektička otapala, papar, piperin, regeneracija

ABSTRACT:

Extraction is a thermal separation process which is used in various industries because it can be conducted at mild process conditions. The most commonly used solvents are volatile organic solvents, which often represent an environmental problem. In order to make the process environmentally friendly, many investigations are devoted to the development of new solvents. Studies have shown that environmentally acceptable deep eutectic solvents can be an adequate replacement for volatile organic solvents. Recently, the application of deep eutectic solvents for the extraction of valuable natural compounds from plant materials has been investigated. Piperine, an alkaloid with characteristic pungent taste, can be extracted from pepper. Due to its properties piperine is widely used in households, as well as in medicine.

This paper explores new process of piperine extraction from nine different types of pepper with the use of deep eutectic solvents. Phytochemical analysis of peppers was made by means of spectroscopic and chromatographic methods. Differences between different types of pepper have been investigated. It was proven that green pepper contains the highest concentration of piperine. Principal component analysis was applied on the obtained results. Based on the preliminary results, related to the solubility and structure of a recrystallized of piperine, choline chloride - ethylene glycol (1: 2.5) was chosen as the best solvent for the extraction of piperine from pepper. The extraction was carried out in a batch extractor equipped with magnetic stirrer at various ratios of the pepper in the suspension. For the crystallization of piperine from extract phase, water was used as an antisolvent. The solvent is recovered by evaporation under vacuum. In that way its multiple use is enabled.

Keywords: extraction, deep eutectic solvent, pepper, piperine, regeneration

Sadržaj:

1. UVOD:	3
2. OPĆI DIO:	5
2.1. PAPAN	5
2.1.1. Piperin	11
2.2. ESKTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO	13
2.2.1. Biljna ekstrakcija čvrsto – kapljevito	14
2.2.2. Niskotemperturna eutektička otapala	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO:	21
3.1. SVRHA	21
3.2. MATERIJALI	21
3.2.1. Kemikalije	21
3.2.2. Papri	21
3.2.3. Sinteza otapala	22
3.3. PROVEDBA POKUSA	23
3.3.1. Preliminarni pokusi	23
3.3.2. Priprava otapala	23
3.3.3. Ekstrakcija čvrsto – kapljevito	23
3.3.4. Rekristalizacija piperina	24
3.3.5. Regeneracija otapala	24
3.4. ANALITIČKE METODE	25
3.4.1. Svjetlosna mikroskopija u kombinaciji s digitalnom kamerom	25
3.4.2. UV/Vis spektrofotometrija	25
3.4.3. Vibracijske spektroskopije	26
3.4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	27
3.4.3.2. NIR Ramanova spektroskopija	29
3.4.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)	31
3.4.5. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)	32
3.4.6. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	33
3.4.7. Tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenim spektrometrom (LC – MS/MS)	34
4. REZULTATI:	38

4.1. FITOKEMIJSKA ANALIZA ZRNA PAPRA	38
4.1.1. FTIR analiza.....	38
4.1.2. Raman NIR analiza	40
4.1.3. Tekućinska kromatografija u kombinaciji sa masenim spektrometrom (LC – MS/MS)	41
4.2. PRELIMINARNI POKUSI	47
4.2.1. Određivanje topljivosti.....	47
4.2.2. Usporedba otapala.....	47
4.3. EKSTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO	51
4.4. REKRISTALIZACIJA PIPERINA	57
4.5. REGENERACIJA OTAPALA	58
5. RASPRAVA:	59
5.1. FITOKEMIJSKA ANALIZA ZRNA PAPRA	59
5.2. PRELIMINARNI POKUSI	62
5.3. EKSTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO	64
5.4. REKRISTALIZACIJA PIPERINA	67
5.5. REGENERACIJA OTAPALA	67
6. ZAKLJUČCI:	68
7. POPIS SIMBOLA:	69
8. LITERATURA:	70
9. PRILOZI:	77
9.1. BAŽDARNI DIAGRAM	77
9.2. LITERATURNI PODACI SUPSTANCI KOJE SU ZAJEDNIČKE ISPITIVANIM PAPIRIMA.....	78
9.3. ¹ H NMR GRAFOVI.....	80
ŽIVOTOPIS:	82

1. UVOD:

Napretkom tehnologije i sve bržim razvojem znanosti mogućnosti su sve veće, standard u porastu, a život i komunikacija ubrzaniji. U općoj svijesti ljudi gotovo da ne postoji nešto što čovjek nije izmislio, a da industrija ne proizvodi. Međutim, svaki napredak donosi i negativne strane; troše se resursi budućih generacija, utječe se na klimu što rezultira prirodnim anomalijama koje se manifestiraju kroz kisele kiše, globalno zatopljenje, izmjenu godišnjih doba i drugo. To se očituje kroz povećano izumiranje različitih životinjskih i biljnih vrsta, ali i na zdravlju ljudi. Srećom, sve je veća osviještenost ljudi da treba zaštititi prirodu i okoliš u kojem živimo. Industrija danas teži primjeni takozvane zelene kemije, odnosno što čistim procesima, očuvanju prirode kroz povećanje iskoristivosti procesa i recirkulaciju te upotrebi čistih otapala koja nemaju negativan utjecaj na okoliš. Upravo je ekstrakcija, kao toplinski separacijski proces, zastupljena u mnogim različitim industrijama te predstavlja ekološki problem zbog upotrebe organskih otapala koja su iznimno štetna za okoliš i zahtijevaju posebno zbrinjavanje što je dodatni ekonomski trošak. Ciljano se radi na ispitivanju različitih novih otapala koja bi bila jednako učinkovita, a ne bi bila toksična. Ovaj rad se bavi istraživanjem primjene niskotemperaturnih eutektičkih smjesa kao novih *zelenih otapala* u već poznatim i istraženim biljnim ekstrakcijama. Zbog jednostavnosti nabave i pripreme uzoraka, izabran je papar kojeg koristimo kao začini te su provedena istraživanja na devet različitih vrsta papra koje je komercijalno moguće nabaviti na tržištu u Hrvatskoj, od kojih dva papra iako su začini papra, ne spadaju u rod *Pipera*.

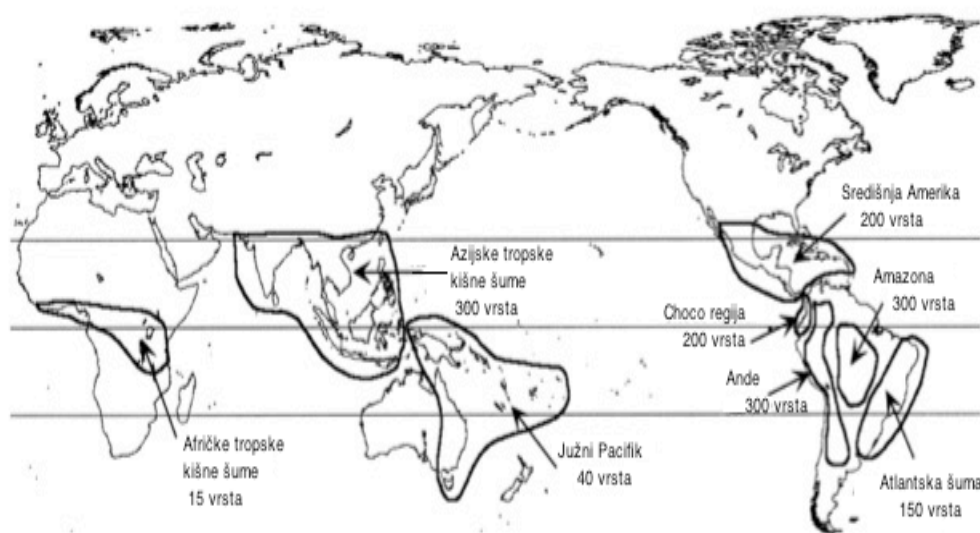
Provedena je fitokemijska analiza zrna papra te kvalitativna i kvantitativna usporedba različitih vrsta. Pomoću PCA analize određena je podudarnost istraživanih papri na molekularnoj razini. Karakterizacija zrna izvedena je korištenjem spektroskopskih i kromatografskih analitičkih metoda. Zbog iznimnih ljekovitih svojstava, visoke aktivnosti unutar metabolizma čovjeka i činjenice da se lako može ekstrahirati iz papra, istraživali smo izoliranje piperina koristeći niskotemperaturna eutektička otapala. Preliminarnim istraživanjima odabrano je najpogodnije otapalo i antiotapalo, provedene su ekstrakcije pri različitim masenim udjelima papra te je izvedena rekristalizacija željene supstance. Dokazana je regeneracija otapala i mogućnost ponovne upotrebe čime raste iskoristivost samog procesa. Raspravljani su svi

ustanovljeni problemi i usporedba s literaturom iz čega su doneseni zaključci o mogućnosti realne primjene i održivosti procesa.

2. OPĆI DIO:

2.1. PAPAR

Porijeklo riječi papar u hrvatskom jeziku dolazi preko grčkog *peperi*, odnosno iz dravidskog jezika *pippali* što znači bobica ili grozd.[1] Najstarija pronađena zrna papra datiraju u godinu 1213. prije Krista, gdje su bili dio pogrebne ceremonije mumificiranja te su pronađeni u nosnicama egipatskog faraona Ramzesa II.[2] Pretpostavlja se da je papar bio poznat i kultiviran u Indiji 2000 godina prije Krista, puno prije svih drugih začina. Prvi izvoznici divljeg papra iz tropskih šuma indijskog podkontinenta bili su Ariji iz doline rijeke Ganges. Međutim, Teofrast, Aristotelov učenik, u svojoj knizi *Sistematika bilja* navodi da papar u Europu dolazi tek s osvajanjima Aleksandra Makedonskog. O tom aromatičnom začinu Plinije Stariji piše u svome djelu *Poznavanje prirode* i čudi se bobicama kojima je vrijednost jednaka težini poput srebra ili zlata. Osim začinskih, pridodavana su mu i ljekovita svojstva, a osobito je bio poznat kao afrodizijak. Dolaskom u Europu, papar zamjenjuje bobice mirte, iako se one i danas mogu pronaći u mediteranskoj kuhinji.[3]



Slika 2.1.1. Geografska rasprostranjenost vrste *piper* [4]

Kao kralj mirodija u antičko doba i kroz povijest, zbog svoje važnosti u trgovini i skupocjenosti papar je postao sinonim za začim te danas poznajemo više od 1000 vrsta bobica i bilja karakterističnog izraženog jakog i ljutog okusa.[4] Uz sol, papar je

neophodan i jedinstven dodatak jelima te se koristi u svim kuhinjama svijeta. Domovina papra je Indija, a biljka raste i uzgaja se u tropskim krajevima s vlažnom i toplom klimom, od Vijetnama, Malezije, Indonezije, Madagaskara i Kine dok najviše vrsta papra pronalazimo u šumama Središnje i Južne Amerike.[4,5] To je plod biljaka paprovki (*Piperaceae*) grmolikih i drvenastih povijuša iz reda paprolike (*Piperales*), koji svoj oštar okus može zahvaliti alkaloidu piperinu.[6]

Najpoznatija vrsta papra je *Piper nigrum* koji ovisno o stupnju zrelosti zrna i obrade prilikom berbe daje čak četiri vrste papra koje se koriste kao začin i koje imaju bitno različiti okus pa tako i primjenu u kuhanju. U divljini, kao parazit na drveću, naraste do 6m u visinu. Prepoznatljiv je po velikom i debelom lišću i sitnim bijelim cvjetovima koji rastu na stabljici nasuprot lišću i stvaraju grozdove gusto pakiranih bobica koje sazrijevanjem od zelenih postaju crvene.[3]



Slika 2.1.2. Crni papar (*P. nigrum*): a) i b) biljka te c) plod

Da bi se dobile crne bobice najjačeg okusa, ručno se bere zeleni plod koji se potom suši na suncu dok ne poprimi smeđo – crnu boju. Pikantni zeleni papar zapravo je nezreli plod koji se ispire i brzo suši, a takav postupak sprječava fermentaciju i čuva boju zrna. Bijeli papar nastaje tako što se ubrane bobice ostave tjedan dana namočene u vodi dok se ne odvoji ljuska, a postupak se ponavlja do zadovoljavajuće čistoće, o čemu ovisi kvaliteta i što ga čini skupljim na tržištu. Također zbog odstranjivanja ljuske, bijeli papar je znatno slabije jačine okusa i ustajalog mirisa. Najrjeđe i najteže za nabaviti je zrelo zrno papra specifične narančasto – crvene boje, gdje je postupak tretiranja zrna jednak kao i kod zelenog, a aroma slična crnom papru.[5]

Tablica 2.1.1. Sistematika ili biološka klasifikacija *P. nigrum*,
P. Longum, *P. cubeba* i *P. barbonense*

Kolokvijalni naziv:	CRNI, BIJELI, ZELENI, CRVENI	BENGALSKI	JAVANSKI	VOATSIPERIFERY
DOMENA	Eukarya	Eukarya	Eukarya	Eukarya
CARSTVO	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
ODJELJAK	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
RAZRED	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida
RED	Piperales	Piperales	Piperales	Piperales
PORODICA	Piperaceae	Piperaceae	Piperaceae	Piperaceae
ROD	<i>Piper</i>	<i>Piper</i>	<i>Piper</i>	<i>Piper</i>
VRSTA	<i>P. nigrum</i>	<i>P. longum</i>	<i>P. cubeba</i>	<i>P. borbonense</i>

Drugi najkarakterističniji papar u svijetu začina je *Piper longum* koji izvorno raste u Tenaserskim šumama Burme (današnji Mianmar), a danas se najviše uzgaja u Bengalu, Indiji i na Javi. Kod nas se na tržištu može pronaći pod nazivom bengalski papar.[7] To su grozdovi od kojih se pri branju ne odvajaju zrna, a nezreli plodovi suše se na suncu dok ne posmeđe. Miriše ugodno slatkasto, dok je okusom i jačinom sličan crnom papru. Povijesno se spominje u Indijskoj medicini još u petom stoljeću prije Krista, a Hipokrat ga navodi prvenstveno kao lijek, a tek onda kao začim.[3] Nekoć je bio čest na ovim prostorima, a danas je rijedak u europskoj kuhinji i teško ga se može nabaviti. Iako je bio omiljen kroz čitav stari vijek, u 12. stoljeću *Piper nigrum* preuzima vodstvo i postaje sve popularniji. Također, zbog sličnog oblika i velike aromatičnosti smatra se da je *Piper longum* u europskoj kuhinji potpuno zamijenila upotreba chilli papričica.[3]



Slika 2.1.3. Bengalski papar (*P. longum*): a) i b) biljka te c) plod

Zbog svoje specifičnosti i iznimne aromatičnosti *P. Cubeb* imao je različite primjene, a pridodavana su mu i raznorazna magična svojstva. U arapskom svijetu bio je poznati lijek, čak i *Priče iz 1001 noći* navode smjesu začina na bazi papra cubeba koja pomaže protiv neplodnosti.[8] Kroz srednji vijek koristio se uz tamjan kao mirisno sredstvo za odbijanje demona.[9]



Slika 2.1.4. Javanski papar Cubeba (*P. cubeb*): a) biljka i b) plod

Korčulanin Marko Polo u svojem *Milijunu* piše da *P. Cubeb* izvorno dolazi s Jave gdje se i danas uzgaja.[10] Najvažnij spoj *P. Cubeba*, *cubebol* u novije se vrijeme koristi kao aroma u prehrambenoj industriji, od slatkiša, sokova, sladoleda do cigareta, te stomatološke i farmaceutske industrije, a posebno u proizvodnji kozmetike od parfema do šampona, krema, ulja, losiona i drugo.[11]

Treba spomeniti još *P. borbonense* koji je kao začin poznat pod nazivom papar *voatsiperifery*, a izvorno raste na Madagaskaru. Na nacionalnom jeziku Madagaskara, malagaškom *voa* znači sjeme ili plod, a *tsiperifery* je riječ za papar. Za ovaj divlji i još uvijek neistraženi papar, može se primjetiti da izgledom podsjeća na *P. Cubeba*. To je prvenstveno zbog peteljke koja ostaje pričvršćena uz plod – samo je bobica manja, a okus bitno različit. *Piper Cubeba* ima aromatičan okus koji ostavlja svježinu u ustima i ne peče, dok *Piper borbonense* više sliči na papar na kakav smo navikli s jakim ostrim okusom koji se zadržava dugo u ustima. Danas se smatra raritetom među začinima, a prvi ga je opisao i zapadu predstavio C. H. Wright 1912. godine.[12]

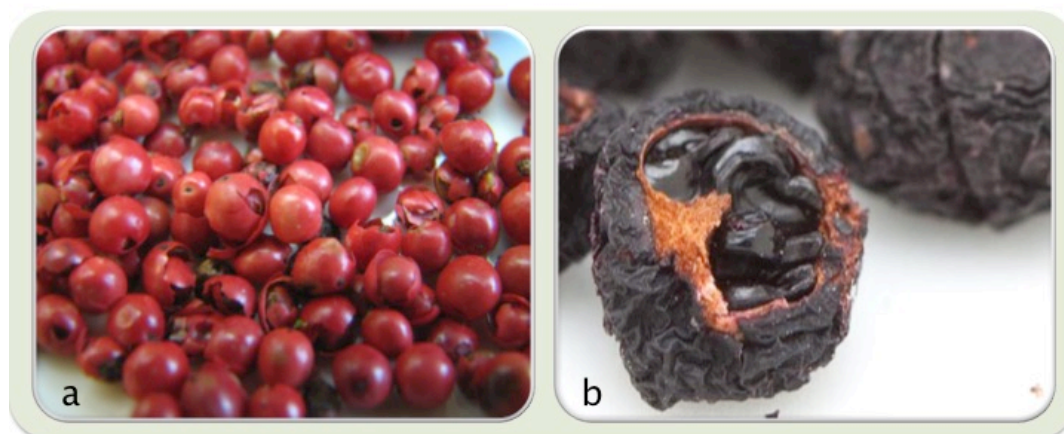
Kao začin papra, osim biljaka iz porodice paprovki, smatraju se i različite druge ljute bobice. One se bitno razlikuju međusobno, kao i od paprovki, međutim danas se

široko primjenjuju u cijelome svijetu te ih samo stručnaci izdvajaju pod nazivom «lažni papar».



Slika 2.1.5. Voatsiperifery papar (*P. borbonense*): a) osušeni i b) zreli plod

Najpoznatije takve bobice proslavila je francuska kuhinja, nazivajući ih zbog eteričnog ulja i pikantnog okusa slatkim paprom, a zbog intenzivne roza boje u Europi se komercijano mogu pronaći pod nazivom rozi papar.[13] Strasnim kuharima, rozi papar čini nezamijenjivu komponentu u poznatoj mješavini začina od četiri vrste papra (crni, bijeli, zeleni i rozi papar), što dovodi do česte zabune i zamjene rozog papra s teško dostupnim crvenim paprom iz porodice *P. nigruma*.



Slika 2.1.6. «Lažni papar»: a) *Schinus terebinthifolia* (rozi papar) i b) *Tasmannia lanceolata* (Tasmanski papar)

Latinski naziv za rozi papar je *Schinus Terebinthifolia*, to je biljka srednjeg ili niskog rasta specifična za područje Središnje i Južne Amerike podrijetlom iz Argentine, Paragvaja i Brazila te je izvan Europe poznata kao brazilsko drvo papara. Zbog iznimno laganog razmnožavanja i širenja, biljka se smatra invazivnom vrstom izvan

svoje originalne domene te je danas zabranjena u saveznoj državi SAD-a, Floridi.[14,15] Od davnina je poznata kao ljekovita biljka, djeluje kao antipiretik, analgetik, koristi se za liječenje urogenitalnih, gljivičnih infekcija, kožnih bolesti i čireva, respiratornih te spolno prenosivih bolesti, ima antikancerogena, antitumorna i mnoga druga poželjna svojstva.[16] Sam plod, odnosno bobice rozog papra imaju antioksidativna te antimikrobna svojstva. U Čile-u se koriste u proizvodnji vina, a u Peru-u kod proizvodnje alkohola, octa i biljnih sirupa.[13]

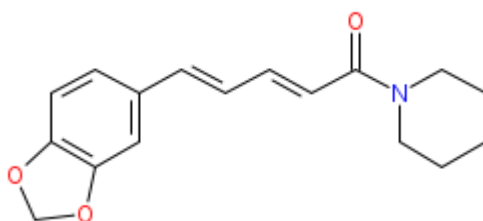
Tablica 2.1.2. Sistematika ili biološka klasifikacija *T.lanceolata*, *S.terebinthifolia*

Kolokvijalni naziv:	TASMANSKI PAPAR	ROZI PAPAR
DOMENA	Eukarya	Eukarya
CARSTVO	Plantae	Plantae
ODJELJAK	Magnoliophyta	Magnoliophyta
RAZRED	Magnoliopsida	Magnoliopsida
RED	Canellales	Sapindales
PORODICA	Winteraceae	Anacardiaceae
ROD	<i>Tasmannia</i>	<i>Schinus</i>
VRSTA	<i>T. lanceolata</i>	<i>S. terebinthifolia</i>

Malo manje dostupan, ali itekako poznat svim ljubiteljima papra, tasmanski papar druga je takva ljuta bobica koja spada u «lažne papre», a koju smo radi usporedbe istraživali u ovom radu. *Tasmannia lanceolata* je srednje do veliki grm i spada u endemske vrste tasmanijskih kišnih šuma i hladnih prašuma jugoistočne Australije.[17] Ovu zimzelenu biljku nazivaju još i planinskim paprom, a plodovi su sjajne, mesnate bobice koje iz tamno crvenih sazrijevanjem postaju crne. Sušenjem na zraku dobije se tvrdo zrno papra ugodnog mirisa. Prilikom konzumacije ovaj papar početno ima slatkastu aromu koji ubrzo zamjeni jak papreni okus i utrnulost usne šupljine.[18] Povijesno su ga prvi koristili Aboridžini kao lijek i začim, posebice za liječenje kožnih i spolnih bolesti, želučanih tegoba, dojenačkih kolika (grčeva) te najvažnije kao zamjenu za kinin. Europljani su pak u njemu prepoznali jak antioksidativni učinak koji je dobar za suzbijanje karcinoma, neuronske degeneracije, dijabetesa, pretilosti i kardiovaskularnih bolesti.[17] U Japanu ga koriste kao jednu od supstanci Wasabi začina.[18]

2.1.1. Piperin

Piperin je alkaloid kemijske formule $C_{17}H_{19}NO_3$ koji pronalazimo u plodu biljaka paprovki (*Piperaceae*).[19] Zajedno sa svojim izomerom kavicinom, piperin daje papru jak ljutit okus zbog čega se koristi kao začim. Prvi ga je izolirao danski fizičar i kemičar Hans Christian Ørsted 1819. godine, iz plodova biljke *P. nigrum*. [20] Piperin se tali pri temperaturi od 130 °C, a daljnjim porastom temperature dolazi do raspada. Stabilan je pri standardnim uvjetima u obliku krutog praškastog materijala.[21] Kristalizacijom formira bijelo – žute prizme. Gotovo je netopljiv u vodi (40mg/L na 18°C), a iznimno topljiv u alkoholu (1g/15mL) i eteru (1g/1,7mL).[22] Trenutno na tržištu pet grama čistog ekstrakta piperina (čistoće >98%) doseže cijenu od minimalno 350 kuna.[23]



Slika 2.1.7. Kemijska struktura piperina

Piperin ima razne primjene, osim u kuhanju kao supstanca začina, u kućanstvu se koristi još i kao insekticid. Međutim, bitniji je njegov utjecaj na zdravlje ljudi, karakteriziraju ga protuupalna, antitumorska i antidepresivna svojstva te se koristi protiv apoptoze (odumiranje stanica). Kod oralne primjene, potiče enzime gušterače i crijeva te povećava izlučivanje žučne kiseline. U pokusima na miševima pokazao je da sprječava i smanjuje proljev uzrokovan raznim uljima te onemogućava nakupljanje tekućine u crijevima. Nakon što je unesen u organizam može drastično povećati apsorpciju selenija, beta-karotena, B-vitamina i drugih hranjivih tvari. Upravo zbog navedenog svojstva povećavanja apsorpcije hranjivih tvari u tijelu pokazao se kao pomoć u borbi protiv raka debelog crijeva. Ima svojstvo povećanja topline simulacijom metabolizma te kao antitiroidni agens djeluje na tiroidne hormone odnosno utječe na pojavu gušavosti.[22] Piperin se koristi još kao antipiretik odnosno snižava tjelesnu temperaturu u slučaju groznice, kao analgetik smanjuje bolove, a njegovom upotrebom neće doći do pojave ulkusa, odnosno čira. Također, dokazano je da pozitivno djeluje na imunološki sustav.[22,24]

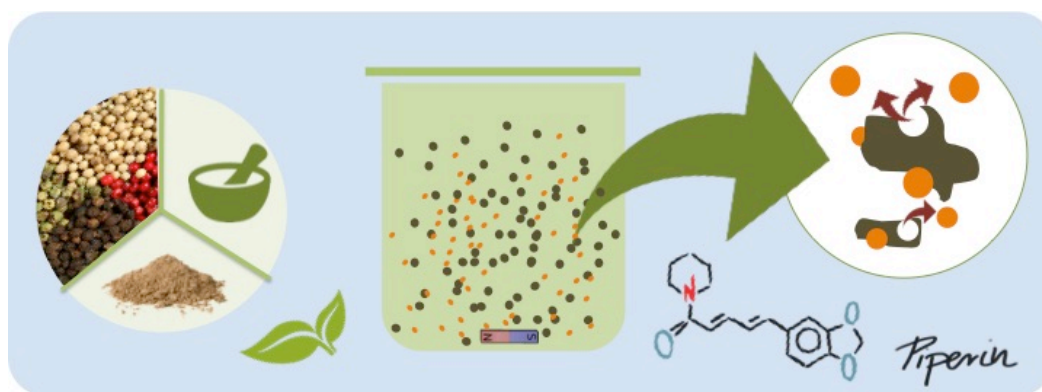
U indijskoj lokalnoj medicini, zbog rubefacijentnog svojstva da prouzroči crvenilo kože širenjem kapilara i povećanjem cirkulacije krvi, koristi se kod upale grla, hemoroida i nekih kožnih bolesti.[25,26] Pipern ima snažan kemo-protektivni učinak pri sprječavanju određenih tvari u metabolizmu da postanu kancerogene. Osim toga, in vitro ispitivanja pokazuju da piperin smanjuje vrijeme potrebno za zgrušavanje krvi, tako što aktivira trombocite, i smanjuje razinu heparina.[26] Među ostalim djelovanjima navedeno je i da ima hepatoprotektivna svojstva, što znači da sprječava cirozu jetre. Koristi se pri suzbijanju kongestije, odnosno povećanog nakupljanja krvi u organima i tkivima, te bronhitisa, kronične astme, anoreksije, gorušice (bolest gastroezofagealnog refluksa) i drugo.[24]



Slika 2.1.8. Kristali piperina ekstrahirani iz *P.nigrum*

2.2. ESKTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO

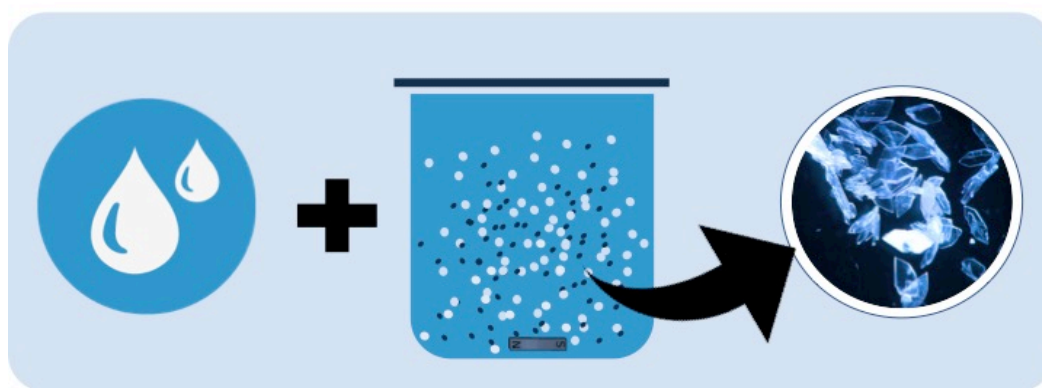
Ekstrakcija čvrsto – kapljevito (SLE – solvent liquid extraction) označava kemijski separacijski proces izdvajanja neke supstance iz krutine uz pomoć određenog otapala, odnosno kapljevine.[27] Taj ravnotežni separacijski proces izdvajanja naziva se još i izluživanje (slika 2.2.1.). Koristi se prvenstveno onda kada izdvajanje destilacijom nije moguće zbog toplinski osjetljivih komponenti, niske hlapivosti ili male količine ekstrahirane komponente. Sam proces se odvija u tri stupnja; prvo je intezivno miješanje usitnjene krutine sa selektivnim otapalom, zatim razdvajanje faza taloženjem krutine te konačno regeneracija korištenog otapala.[28]



Slika 2.2.1. Proces izluživanja na primjeru piperina

Prije samog procesa ekstrakcije potrebno je pripremiti krutinu tako da ekstrakt može biti ekstrahiran u otapalu u što kraćem vremenu. U tu svrhu krutina se može gnječiti, mrviti i usitnjavati što osigurava veću međufaznu površinu i učinkovitiji ravnotežni separacijski proces. Miješanje se provodi da bi se osigurala što bolja interakcija između dviju faza, brže i kvalitetnije uspostavljanje ravnoteže, intezivniji prijenos tvari iz krutine u otapalo te u svrhu smanjenja vremena trajanja procesa. Supstanca koja se želi ekstrahirati mora biti topljiva u selektivnom otapalu, a u krutini može biti prisutna kao kapljevita ili čvrsta komponenta. Otapalo prodire kroz pore čvrste komponente i dolazi do molekula koje se nalaze u krutini, otapa željenu supstancu te ju prenosi u otapalo do uspostavljanja ravnoteže. Zbog toga, procesom ekstrakcije nikada nije potpuno moguće izdvojiti ekstrakt, već dio uvijek ostane zarobljen u krutini. Da bi dobili čisti produkt i reciklirali otapalo za ponovnu upotrebu, provodi se regeneracija otapala i izdvajanje ekstrakta nekom od separacijskih metoda, što je uglavnom najskuplji i najteži dio procesa. Regeneracija se najčešće provodi destilacijom, međutim ako je otapalo lako hlapljivo s niskom točkom vrelišta i malom

latentnom toplinom isparavanja može se otparavati otapalo. Također, regeneracija se može provesti kristalizacijom uz pomoć hlađenja otapala ili dodatkom otapala koje snižava topljivost komponente, do izdvajanja željene komponente. Ekstrakcija, odnosno dodavanje sekundarnog otapala (slika 2.2.2.) koristi se kada ni jedna druga tehnika nije zadovoljavajuća, jer zahtijeva dodatnu separaciju ta dva otapala što osim složenosti povećava i trošak procesa.[29]



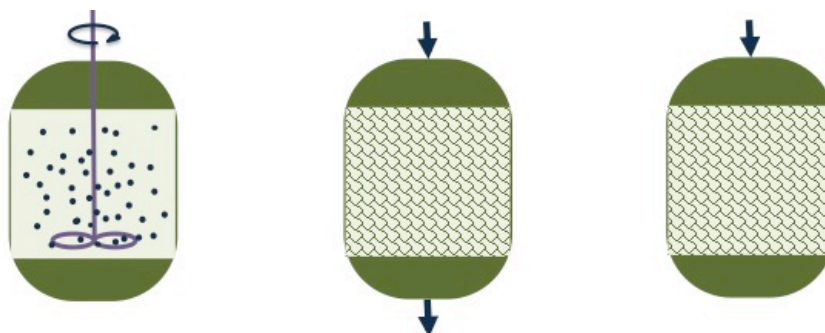
Slika 2.2.2. Proces rekristalizacije ekstrakta dodatkom sekundarnog otapala

Pri izboru otapala za provedbu procesa važno je obratiti pažnju na slijedeće karakteristike: otapalo mora biti takvo da se maksimalno pojednostavni ekstrakcija u svrhu ekonomski prihvatljivog i isplativog procesa, a da se istovremeno vodi računa i o ekološkim zahtjevima i normama. Otapalo mora selektivno izvlačiti željenu supstancu te imati dovoljno veliki kapacitet otapanja aktivne tvari u svrhu korištenja što manje količine samog otapala. Potrebno je da bude moguća regeneracija otapala i odvajanje od ekstrakta da bi se dobio čisti i zadovoljavajući produkt. Prednost uvijek ima otapalo niske cijene i koje je jednostavno nabaviti, također ne korozivno otapalo olakšava rad i smanjuje cijenu postrojenja. Poželjno je da bude nisko toksično ili potpuno ne toksično, da je temperatura zapaljenja 25°C iznad radne temperature kao i niski tlak para na temperaturi provedbe procesa. Otapalo niske viskoznosti uvjetuje smanjeni pad tlaka i dobar prijenos tvari i topline.[29]

2.2.1. Biljna ekstrakcija čvrsto – kapljevito

Proces ekstrakcije čvrsto – kapljevito (SLE) tijekom kojeg se izdvaja neki vrijedni produkt iz biljaka bio je poznat civilizacijama Egipta i Mezopotamije; prvi pronađeni zapisi i opisi procesa ekstrakcije prirodnih supstanci datiraju iz 3500. godine prije Krista. Industrijska ekstrakcija počinje se primjenjivati tek početkom 20. stoljeća

najviše za proizvodnju lipida iz žitarica, saharoze iz šećera i fitokemikalija iz biljaka, a od nedavno i za proizvodnju aroma, začina, kofeina i funkcionalnih hidrokoloida iz algi. Veliki broj aktivnih supstanci može se ekstrahirati iz lišća, kore, cvijeta, korijena, grana, ploda ili sjemenki biljaka, a s obzirom na broj i raznovrsnost samih biljnih vrsta ekstrakcija predstavlja jedan od najzastupljenijih procesa farmaceutske industrije. Danas se ekstrakcija iz biljaka široko primjenjuje za dobivanje farmaceutika i pokriva jedno od najvećih i najunosnijih tržišta svijeta. Tako je 2002. godine zarada od ekstrakcije i prodaje biljnih supstanci na farmaceutskom tržištu procijenjena na 30,7 milijuna američkih dolara. Ekstrakcija čvrsto – kapljevito najčešće se koristi za izvlačenje čvrstih supstanci iz biljaka, dok se ulja češće dobivaju hladnim prešanjem. Farmaceutika, odnosno aktivne komponente prosječno ima od 0,3 do 3% s različitom zastupljenosti ovisno o kojem se dijelu biljke radi. Dok se naprimjer u crnom papru može pronaći čak od 5 do 9 % samog piperina.[30]



a) Imerzija – uranjanje b) Perkolacija – cijedenje c) Maceracija – močenje

Slika 2.2.3. Osnovne izvedbe ekstrakcije kruto - kapljevito

Kod biljne SLE ekstrakcije razlikujemo tri osnovne izvedbe procesa, kao što je prikazano na slici 2.2.3.;

Imerzija (uranjanje) – je nestacionarni šaržni proces ekstrakcije uz intenzivno miješanje biljnog materijala na sobnoj temperaturi; to je također najčešći, odnosno klasični proces ekstrakcije čvrsto – kapljevito.

Perkolacija (cijedenje) – je kontinuirani proces ekstrakcije u kojem otapalo prolazi preko nepomičnog filma biljnog materijala, odnosno uz pomoć gravitacijske sile se cijedi preko stacionarnog filma na sobnoj temperaturi.

Maceracija (močenje) – je stacionarni šaržni proces u kojem cijeli ili smrvljeni biljni materijal stoji nepomično u otapalu na sobnoj temperaturi određeno vrijeme

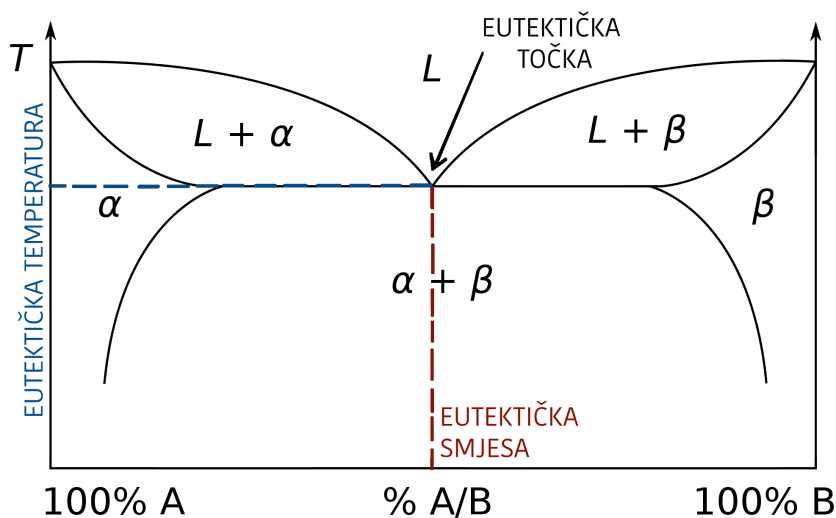
(minimalno tri dana). Ove metode prednjače u procesima biljne ekstrakcije upravo zbog toga što na sobnoj temperaturi neće doći do razgradnje temperaturno osjetljivih komponenti. Bitno je još spomenuti proces kontinuirane ekstrakcije uz kontrolirano zagrijavanje, tzv. Soxhlet ekstrakciju koja se najčešće koristi za utvrđivanje topljivosti ispitivanih komponenti u odabranom otapalu te kao usporedna metoda za provjeru uspješnosti novih, nekonvencionalnih ekstrakcijskih metoda.[30,31]

Kod ekstrahiranja farmaceutika najzastupljenija su organska otapala; njih se ovisno o učinku koji uzrokuju može podijeliti u četiri osnovne skupine. Prva i najkritičnija skupina otapala podrazumijeva ona s kancerogenim učinkom na ljude, u drugu skupinu spadaju toksična i štetna za okoliš. Treću skupinu karakteriziraju toksična otapala, a četvrtu čine otapala koja su štetna samo za okoliš. Sva organska otapala imaju manje ili više nepoželjan utjecaj na ljude i okolinu, a zbog intenzivnog prodiranja u biljni materijal uvijek postoji određena zaostala količina tog otapala u konačnom produktu. Zbog štetnosti, zakonski je određena minimalna doza zaostalog otapala koja se smije zadržati u konačnom produktu. Zbog njihovog potencijalnog negativnog učinka na samu supstancu, odnosno degradaciju iste cilj je maksimalno smanjiti količinu otapala koje zaostane. Da bi se ono što učinkovitije i potpunije uklonilo koriste se dodatne separacijske tehnike što dovodi i do poskupljenja procesa. Najpoželjnije otapalo za farmaceutike je voda, jer zadovoljava kriterije netoksičnosti, neštetnosti, niske viskoznosti, hlapivosti, cijene i mogućnosti nabave, međutim predstavlja problem pri izdvajanju i regeneraciji zbog velike količine energije koju je potrebno dovesti za sušenje.[32] Također, u slučaju slabo topljivih supstanci voda može poslužiti kao sekundarno otapalo, odnosno za rekristalizaciju i izdvajanje ekstrakta. Alkaloidi su generalno nisko – topljivi ili netopljivi u vodi, što vodu uz ostale gore navedene karakteristike čini poželjnim antiotapalom.[33]

Novi pristupi imaju za cilj izbaciti potpuno toksična organska otapala na način ili da ih zamijene neštetnim otapalima sličnih svojstava, ili da se direktno utječe na proces ekstrakcije. Neke od nekonvencionalnih metoda koje se koriste kod ekstrakcije čvrsto – kapljevito iz biljaka te koje su manje štetne za ljude i okoliš su: ultrazvučna ekstrakcija, enzimsko digestija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ionskim kapljevinama, ubrzana ekstrakcija otapalom, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem i druge.[34]

2.2.2. Niskotemperturna eutektička otapala

Naziv eutektik dolazi iz grčkog *εὕτηκτος* što znači *lako topljiv*. To je smjesa ili slitina dvije ili više tvari u takvom omjeru u kojem ima najniže talište. Drugim riječima, eutektička smjesa ima niže talište od svake pojedine tvari koje ju sačinjavaju i njihove smjese u bilo kojem drugom omjeru.[35,36] Fazne promjene nekog sustava smjese – grafički se opisuju ravnotežnim faznim dijagramom stanja, pri atmosferskom tlaku, odnosno prikazom ovisnosti sastava smjese o temperaturi. Eutektični diagram je diagram stanja za smjesu čije se komponente potpuno miješaju u kapljevitom stanju, a ne miješaju u čvrstom stanju. Karakteristični prikaz sadrži: eutektičku točku – sastav smjese u kojem ona ima najnižu temperaturu taljenja, odnosno eutektičnu temperaturu pri kojem su obe komponente u kapljevitom stanju i međusobno potpuno mješljive (slika 2.2.4).[37]



Slika 2.2.4. Shema eutektičkog diagrama

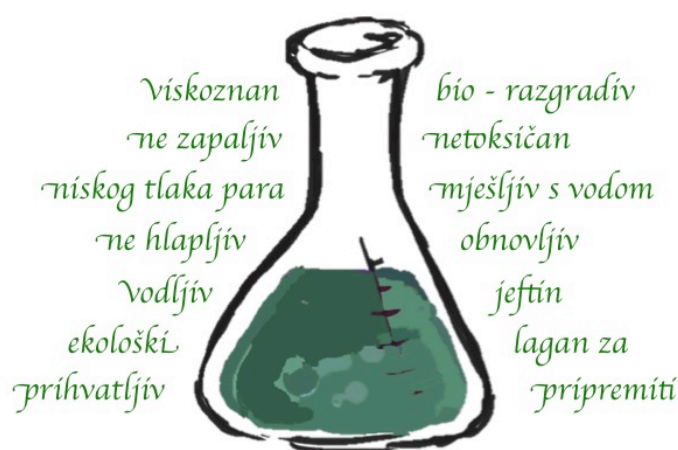
Eutektičkim smjesama nazivaju se one kapljevine pri čijoj sintezi nastaje vodikova veza između aniona halogenog elementa i donora vodika, dok kapljevine koje stvaraju jaku ionsku vezu nazivamo ionskim kapljevina. Također, upravo zahvaljujući delokalizaciji naboja koja nastaje zbog stvaranja vodikove veze takva kapljevina ima nižu točku tališta od svojih sastavnica u čistom obliku.[38] Prvu niskotemperaturnu eutektičku smjesu sintetizirali su Abbott i suradnici 2001. godine koristeći cinkov klorid i/ili kositrov (II) klorid sa kvaternim amonijevim solima tijekom traženja otapala koja bi imala slična svojstva, a čija bi sinteza bila jednostavnija i cijena pristupačnija od klasičnih ionskih kapljevina.[39] Nastavljajući svoj prijašnji rad 2002. sintetizirali su smjesu između uree i kolin – klorida te među prvima upotrijebili

naziv «*deep eutectic solvent*» (*DES*) za opis svojstava ove kapljevine. Danas se upravo smjesa urea – kolin klorid smatra početkom istraživanja ovih novih otapala.[40] Ustanovljeno je da se niskotemperaturne eutektičke smjese mogu pripremiti pomoću organske kiseline, šećera ili polialkohola s aminima ili kolin – kloridom, ali i brojnim drugim kombinacijama. Mogu se pripremiti na dva načina ovisno o svojstvima kemikalija i konačnoj primjeni. Prvi je način zagrijavanje smjese uz konstantno miješanje i otparivanje vode, drugi je liofilizacijom, odnosno tehnikom sušenja i zamrzavanja. Potonje se češće primjenjuje u tehnikama pripreme nanočestica.[38]

Niskotemperaturna eutektička smjesa je netoksično, ekološki prihvatljivo i bio – razgradivo zeleno otapalo, koje je stabilno i u kapljevitom stanju na sobnoj temperaturi. To je nezapaljivo otapalo inertno u reakcijama s vodom. Specifično je po tome što ima talište niže od svih komponenata koje ga sačinjavaju najčešće u intervalu od 50 – 100°C, što ga čini pogodnim za organske reakcije. Karakterizira ga niski tlak para na sobnoj temperaturi zbog čega ne dolazi do isparavanja i visoka viskoznost koja se, ovisno o primjeni, može podešavati dodavanjem vode, a porastom temperature raste mu vodljivost i tečenje.[38,40,41,42,43] Iako su niskotemperaturne eutektičke smjese proizašle iz istraživanja vezanih za ionske kapljevine (IL), razlikuju se ne samo u svojstvima već i u samoj strukturi i načinu pripreme. Tako IL sačinjavaju isključivo ioni, dok se u DES-u mogu pronaći neutralne molekule zajedno sa ionima; uz to IL se sintetiziraju kemijskim putem dok je za dobivanje DES-a potrebno samo miješanje uz zagrijavanje. Upravo zbog toga, niskotemperaturne eutektičke smjese su jeftinije, lako ih je pripremiti, a visoke su čistoće te ih se može više puta reciklirati bez velike promjene aktivnosti otapala. Također, tijekom same pripreme DES-a moguće je kontroliranjem procesa utjecati na kiselost, polarnost i mješljivost kapljevine.[44, 45, 46]

Pojedini eutektici pokazali su sposobnost da ostanu u kapljevitom stanju na vrlo niskim temperaturama i nakon potpunog uklanjanja vode. Također, neke bioaktivne komponente u eutektiku pokazuju neaktivnost, a nakon dodatka vode u smjesu ponovno postanu aktivne. Ta svojstva potencijalno objašnjavaju određene još potpuno nerazumljive procese u živom svijetu, kao što je otpornost biljaka na isušivanje. Trenutno je jedno od najvećih imperativa u biološkim znanostima traženje čvrstih dokaza da upravo različite prirodne niskotemperaturne eutektičke smjese omogućavaju živim stanicama preživljavanje u ekstremnim uvjetima nedostatka vode,

visoke ili niske temperature, velike količine soli i drugo.[41, 42]



Slika 2.2.5. Svojstva niskotemperaturnog eutektičkog otapala

Zbog komopnenata koje daju ili primaju elektrone i/ili protone za stvaranje vodikove veze ove kapljevine imaju dobru sposobnost otapanja.[40] Zahvaljujući tome, niskotemperaturne eutektičke smjese pokazale su se kao dobro otapalo za tvari koje su netopljive, slabo topljive ili nestabilne u vodi. Naime, topljivost takvih supstanci u DES-u je od 50 – 100 puta veća nego u vodi. Dokazano je da povećavaju topljivost aromatskih kiselina, anorganskih soli i aminokiselina, zbog čega se razmatraju kao potencijalni nosač aktivne substance pri ranim istraživanjima lijekova na štakorima i miševima. Također, dobar su medij za provođenje bioloških i kemijskih reakcija.[41, 47] Zbog visoke vodljivosti, koriste se u elektrokemiji za baterije [48] te su se pokazala kao dobra otapala u proizvodnji filmova i premaza [49], odnosno u tehnologiji obrade metala (elektropoliranje [50], elektrodpoziciju [51] i elektroplatiranje materijala [52]), a kao stabilne kapljevine pogodne su za jednostavno skladištenje i čuvanje [39]. Interes za ova zelena otapala raste pa tako nova istraživanja pokazuju da su niskotemperaturne eutektičke smjese pronašle primjenu kao katalizatori i otapala u proizvodnji biodizela [53] i u sintezi polimera [54, 55], te kao dobra otapala za apsorpciju CO₂ [56], također i u nanotehnologiji, odnosno kod priprave ugljikovih nanocjevčica [57]. DES ima veću aktivnost i stabinost od organskih otapala, ionskih kapljevina a nekad i od vode, zbog čega se može koristiti kao otapalo u enzimatskim reakcijama i organskim sintezama.[44, 58, 59]

Bogaars navodi da je korištenje ovih otapala ekonomski isplativije zbog bio – razgradivih svojstava otapala koja ne zahtijevaju naknadnu obradu, i zbog niže cijene na tržištu od organskih otapala. Međutim potrebna energija u procesima ekstrakcije je

veća nego li kada se koriste organska otapala. Ekološki ona su neusporedivo bolja i prihvatljivija, jer nije pronađeno štetno djelovanje na čovjeka niti na okoliš tijekom pripreme, trajanja procesa i rada s niskotemperaturnim eutektičkim smjesama.[43]

3. EKSPERIMENTALNI DIO:

3.1. SVRHA

Proučavanjem procesa ekstrakcije čvrsto – kapljevito na primjeru izdvajanja piperina iz ploda biljke papra, ispitana su svojstva niskotemperaturnih eutektičkih smjesa kao novih zelenih otapala. Istražen je i pokušaj zaokruživanja procesa kao i svi problemi koji se pojavljuju. Cilj rada je istraživanje mogućnosti potpune zamijene štetnih organskih otapala s ekološki prihvatljivim niskotemperaturnim eutektičkim smjesama u procesima ekstrakcije. Također, provedena je usporedba devet različitih vrsta papra međusobno, kao i definiranje karakterističnih spojeva koji se nalaze u plodu biljaka začina papra u svrhu spoznavanja što većeg broja informacija o tom zanimljivom začinu.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Kemikalije

Kao standard korišten je 98% čisti piperin koji proizvodi i pakira ACROS Organics, New Jersey, USA. Za sintezu niskotemperaturnih eutektičkih smjesa upotrebljene su navedene kemikalije:

- 99% kolin – klorid koji proizvodi i pakira ACROS Organics, New Jersey, USA
- 100% etilen – glikol AnalAR NORMAPUR, dobavljač: VWR CHEMICALS, proizvodi se u Europskoj Uniji, Francuska
- 100% glicerol proizvodi i pakira CARLO ERBA Reagents, 27106 Val de Reuil, Francuska

Također korištena je demineralizirana voda, koju proizvodi i pakira Kemijska industrija d.o.o., ISKRA Zelina, Fučkani 6, Sv. Ivan Zelina, 10380 HR i 96% etilni alkohol proizvođača KEFO d.o.o., Brnčičeva ulica, 1231 Ljubljana – Črnuče, SLO.

3.2.2. Papri

Piper nigrum:

- Crni papar – u zrnu, zemlja porijekla Vijetnam, uvozi i pakira AGZ.d.o.o., Stolačka 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska
- mljeveni, zemlja porijekla Vijetnam, uvozi i pakira Šafram d.o.o., Oranice 118, 10 000 Zagreb, Hrvatska

- Bijeli papar – u zrnu, zemlja porijekla Vijetnam, uvozi i pakira AGZ.d.o.o., Stolačka 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska
– mljeveni, zemlja porijekla Malezija, uvozi i pakira Šafram d.o.o., Oranice 118, 10 000 Zagreb, Hrvatska
- Crveni – Papar Kampot, zemlja porijekla Kambodža, nabavlja Harissa Spice Store, Masarikova 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska
- Zeleni – zemlja porijekla Indija, uvozi i pakira Kotanyi d.o.o., Savska cesta 116, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Piper longum – Bengalski papar, zemlja porijekla Indija, nabavlja Harissa Spice Store, Masarikova 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Piper cubeba – Javanski papar, zemlja porijekla Indonezija, nabavlja Harissa Spice Store, Masarikova 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Piper borbonense – Papar Voatsiperifery, zemlja porijekla Madagaskar, nabavlja Harissa Spice Store, Masarikova 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Tasmania lanceolata – Tasmanski papar, zemlja porijekla Australija, nabavlja Harissa Spice Store, Masarikova 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Schinus terebinthifolia – zemlja porijekla Francuska, uvozi BENIX d.o.o., Kraljevička 10, 10 000 Zagreb, Hrvatska

3.2.3. Sinteza otapala

Korištene kemikalije kolin – klorid, glicerol i etilen – glikol sušene su minimalno osam sati pod potpunim vakuumom i temperaturom od 60°C dok sva voda nije uklonjena, nakon čega su ohlađene i izvagane na željeni omjer te pomiješane. Takva smjesa ponovno se zagrijava na rotavaporu pri 60°C i potpunom vakuumu do izjednačavanja i postizanja zadovoljavajuće izmiješanosti komponenti. Sinteza otapala provedena je na IKA RV 10 rotavaporu, IKA – Werke GmbH & Co., 79219 Staufen im Breisgau, Njemačka.

3.3. PROVEDBA POKUSA

3.3.1. Preliminarni pokusi

Sa svrhom odabira najboljeg otapala za provedbu ekstrakcije provedena su preliminarna istraživanja koja uključuju određivanje topljivosti piperina u tri različite niskotemperaturne eutektičke smjese; kolin klorid – etilen glikol (1:2), kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) i kolin klorid – glicerol (1:1) te u čistom etanolu i etilen – glikolu. Pripremljeno je točno 10ml otopine svakog od ispitivanih otapala te je dodavan piperin uz miješanje do potpune zasićenosti otopine. Pokusi su provedeni i s usitnjenim crnim paprom primjenom magnetskog i ultrazvučnog miješanja.

3.3.2. Priprava otapala

Za ekstrakciju su odabrane tri niskotemperaturne eutektičke smjese s točno definiranim molnim omjerima komponenti: kolin klorid – etilen glikol (1:2), kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) i kolin klorid – glicerol (1:1). Sastojci smjesa sušili su se u vakuum sušioniku kroz 8 sati pri temperaturi od 60°C, kako bi se uklonila eventualno prisutna voda. Nakon toga, odvagane su točno izračunate mase svake komponente te su miješane u vakuum isparivaču na temperaturu od 60°C do postizanja homogene otopine.

3.3.3. Ekstrakcija čvrsto – kapljevito

Da bi se ekstrahirao piperin iz istraživanih papri, zrna papra prvo su usitnjena uz pomoć stolnog mlinca za papar i određena je raspodjela veličina čestica. Pripremljeni uzorci ekstrahirani su u prethodno pripravljenim otapalima uz konstantno miješanje na digitalnoj magnetskoj mješalici ROTAMIX 609 MM, proizvođača TEHTNICA ŽELEZNIKI, 4228 Železniki, Slovenija. Sve ekstrakcije vođene su pod identičnim uvjetima u trajanju od dva sata pri sobnoj temperaturi i tlaku ($T = 25^{\circ}\text{C}$ i $p = 101\,325\text{ Pa}$). Provedeni su pokusi za različite masene udijeje papra, tako je za sve ispitivane uzorke provedena ekstrakcija pri $w(\text{papra}) = 1; 3; 5; 7\%$. Kao otapalo korištena je sintetizirana niskotemperaturna eutektička smjesa kolin klorida – etilen glikola (1:2,5). Nakon provedene ekstrakcije uzorci su profiltrirani čime je otapalo odvojeno od čestica papra, a dobiveni ekstrakt je analiziran i uspoređen s literaturom. Za filtraciju korišteni su CHROMAFIL Xtra RC – 45/25 filteri, koje proizvodi MACHEREY – NAGEL GmbH & Co. KG, 52355 Düren, Njemačka.

3.3.4. Rekristalizacija piperina

Da bi zaokružili proces i izdvojili ekstrahirani piperin iz otapala provedena je rekristalizacija piperina. Alkaloid piperin nije topljiv u vodi, odnosno dodatkom vode u otapalo pri sobnoj temperaturi tvori bijelo – žute kristale. Preliminarnim pokusima i vizualnom procjenom *in situ* ustanovljeno je da su korištene niskotemperaturne eutektičke smjese u potpunosti mješljive s vodom. Kao antiotapalo korištena je demineralizirana voda upravo zbog sposobnosti da razdvaja željenu komponentu od otapala, a u ekstrakt je dodavana u omjeru 1:3. Dobiveni kristali piperina profiltrirani su korištenjem filter papira The Whatman 1PS Phase Separator Silicone Treated, koji proizvodi SIGMA ALDRICH SRL, 20151 Milano, Italija i prikladnog laboratorijskog posuđa.

3.3.5. Regeneracija otapala

Regeneracija preostalog otapala s vodom napravljena je u IKA RV 10 rotavaporu, IKA – Werke GmbH & Co, pod potpunim vakuumom i na temperaturi od 60° C dok nije isparila sva voda. Time je proces zaokružen, a otapalo potpuno iskoristivo.

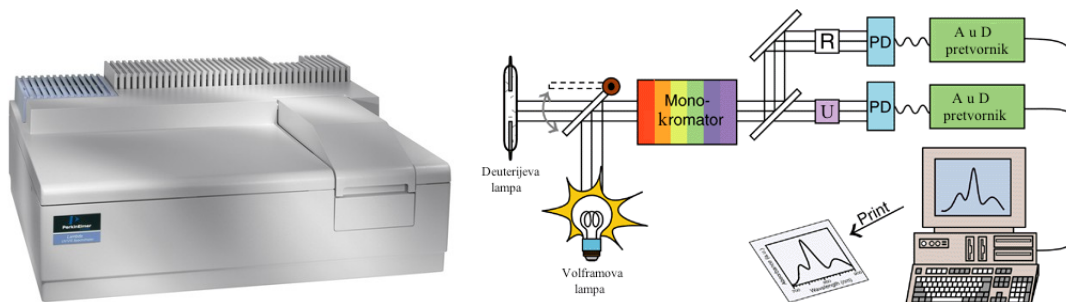
3.4. ANALITIČKE METODE

3.4.1. Svjetlosna mikroskopija u kombinaciji s digitalnom kamerom

Svjetlosna mikroskopija je tehnika prikupljanja vidljive svjetlosti, koja prolazi kroz ili se reflektira od promatranog objekta, uz pomoć jedne ili više optičkih leća pri čemu nastaje slika (uvećana, virtualna i obrnuta). Digitalna kamera detektira sliku koja se zatim analizira i obrađuje na računalu.[60] Za snimanje kristala piperina nastalih rekristalizacijom nakon dodatka sekundarnog otapala korišten je svjetlosni mikroskop MOTIC BA200, uz uvećanje od 100x. Mjerenja su provedena na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

3.4.2. UV/Vis spektrofotometrija

Spektroskopija proučava međuodnos tvari i energije, odnosno – proučava strukturalne ili energetske promjene unutar atoma i molekula nakon njihove interakcije s elektromagnetskim zračenjem. Rezultat spektroskopske analize je spektar s prikazom intenziteta emitiranog, apsorbiranog ili raspršenog zračenja nastalog pobuđivanjem uzorka.[61] UV/Vis spektrofotometrija je analitička tehnika koja proučava apsorpciju elektromagnetnog zračenja unutar ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra. Apsorpcija zračenja mijenja se s valnom duljinom, a koncentracija tvari može se izračunati iz Lambert, Beer i Bourguierovog zakona apsorpcije EMZ, odnosno metoda je pogodna za kvantitativnu i kvalitativnu analizu uzoraka.[62]



Slika 3.4.1. LAMBDA™ 35 PerkinElmer UV/Vis spektrofotometar i princip rada

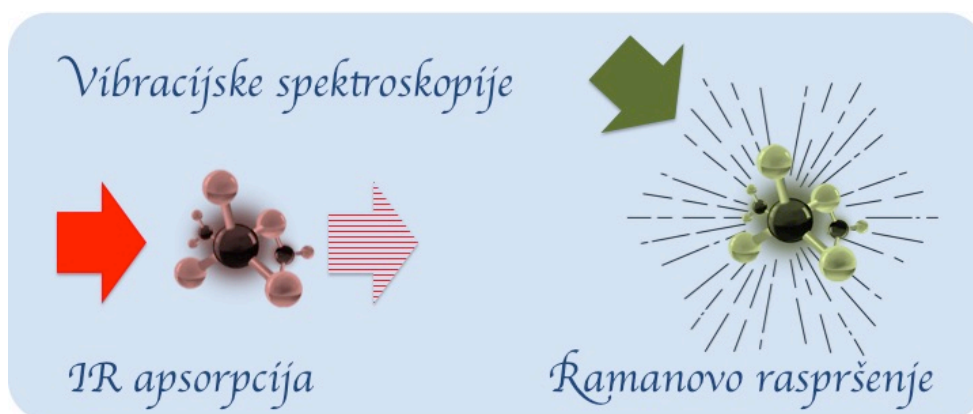
Tablica 3.4.1. Specifikacije spektrofotometra [63]

Izvor zračenja:	deuterijeva i volframova lampa
Područje rada:	190 – 1100 nm
Širina vrpce:	0,5 – 4 nm

Za snimanje apsorpcijskih spektara nakon ekstrakcije korišten je LAMBDATM 35 PerkinElmer UV/Vis spektrofotometar, Waltham, Massachusetts, USA. Spektri su analizirani i obrađeni uz pomoć Microsoft Excel for Mac 2011 (14.4.4) i PerkinElmer UV Win Lab računalnih softvera. Mjerenja su provedena na Zavodu za analitičku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

3.4.3. Vibracijske spektroskopije

Vibraciona spektroskopska analiza proučava vibracije na molekularnoj razini i daje spektar “otiska prsta” specifičan za svaku molekulu, čime omogućava indentifikaciju materijala. Pod vibracijom se misli na oscilaciju jezgre oko svojeg ravnotežnog položaja; a budući da se ovom pomaku opire veza između atoma, dolazi do promjene u dužini veze (istezanja) ili do promjene kuta između atoma (torzije ili savijanja).[64] Postoje dvije različite vibracijske spektroskopske tehnike koje su komplementarne međusobno: infracrvena apsorpcija i Ramanovo raspršenje.

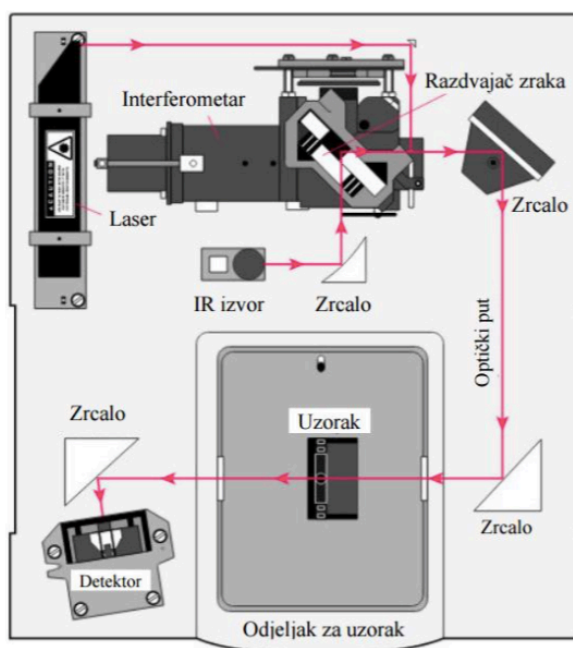


Slika 3.4.2. Vibracijske spektroskopije

Glavna razlika između tehnika je u interakciji uzorka s pobuđenim zračenjem: apsorpcija infracrvenog zračenja uzrokuje promjenu u trajnom dipolnom momentu molekule, a raspršenje je povezano s promjenom induciranog dipolnog momenta. U slučaju apsorpcije uzorak je izložen zračenju određene valne duljine, a spektar se dobije usporedbom intenziteta uzorkom propuštenog zračenja s intenzitetom referentnog zračenja karakterističnog za svaku valnu duljinu. Kod Ramanovog raspršenja, uzorak je izložen monokromatskom zračenju (laser) te se mjeri uzorkom raspršeno polikromatsko zračenje.[65]

3.4.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

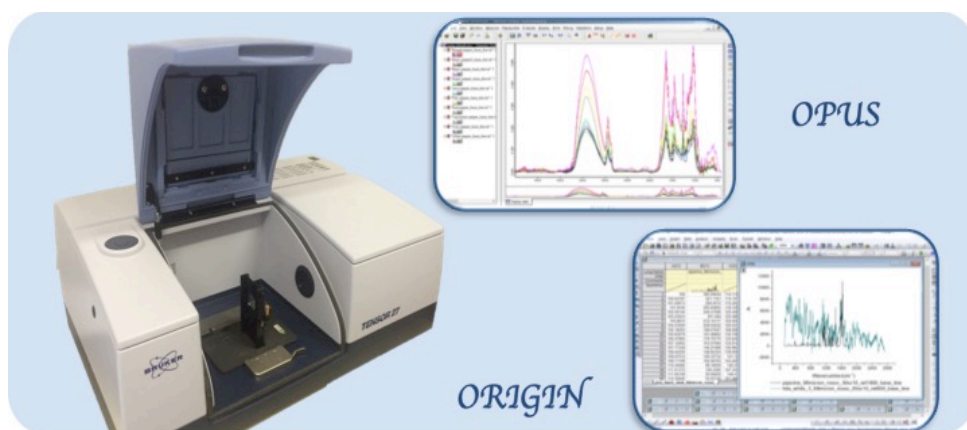
Kao što je već spomenuto, da bi tijekom vibracije došlo do apsorpcije infracrvenog zračenja, ono mora uzrokovati promjenu dipolnog momenta molekule. Što je veća ta promjena, intenzivniji će biti apsorpcijski pojas. To podrazumjeva mnogo različitih vibracija čak i kod posve jednostavnih molekula. Složenost infracrvenog spektra proizlazi iz spajanja vibracija duž većeg dijela ili duž kompletne molekule. Takve vibracije se nazivaju *skeletne* vibracije. Pojasevi pridruženi skeletnim vibracijama vjerojatno će se poklapati s obrascem ili *otiskom* molekule u cjelini. S druge strane, ostale apsorpcije se odnose na specifične skupine unutar molekule, odnosno na aproksimaciju frekvencije koja odgovara određenoj skupini. Zajedno s kvalitativnom analizom uzorka (plinovitog, tekućeg ili krutog), ova tehnika omogućava i kvantitativnu analizu, jer je intenzitet dobivenog IR pojasa razmjeran koncentraciji apsorbirajuće tvari.[66]



Slika 3.4.3. Prikaz dijelova i shema rada FTIR-a

Najčešće korištena instrumentacija je mid – IR spektrometar s Furierovom transformacijom, koji koristi Globar izvor raspona od 400 do 5000 cm^{-1} . Princip rada FTIR instrumenta prikazan je na slici 3.4.3; glavni dio instrumenta je Michelsonov interferometar, koji sadrži razdvajač zrake te fiksno i pomično ogledalo. Michelsonov interferometar proizvodi interferencijske trake cijepajući svjetlo koje dolazi iz izvora tako da jedna zraka pogodi fiksno, a druga pomično ogledalo. Nakon što se tako reflektirane zrake ponovno spoje, kao rezultat dobije se interferirajući uzorak.

Interferencija stvara varijacije u intenzitetu izlaznog snopa zbog razlike u promjenama duljine puta upadnih zraka. Dobivene varijacije intenziteta izlaznog snopa mogu se mjeriti detektorom kao funkcija razlike duljine puta: rezultat takvog mjerenja je interferogram. Svaki interferogram se može prikazati kao skup sinusnih i kosinusnih funkcija pri različitim frekvencijama, koji se primjenom matematičke metode Fourierove transformacije mogu pretvoriti u raspodjelu intenziteta valnih duljina. Takav signal prolazi kroz uzorak i doseže detektor, nakon računalne primjene Fourierovih transformacija daje nam spektar s karakterističnim vrijednostima. [65,66,67,68] Ova tehnika je primjenjiva na kapljevine, otopine, paste, praške, filmove, vlakna, plinove i površine; a u slučaju vodenih otopina nastaje problem zbog jakog intenziteta vodenog spektra.[66]



Slika 3.4.4. Bruker – Tensor 27 FT-IR spektrometar sa sučeljima od OPUS i Origin programa

FTIR spektri snimljeni su s Bruker – Tensor 27 FT-IR spektrometrom (slika 3.4.4.). Spektralna analiza i obrada podataka napravljene su uz pomoć računalnih programa: OPUS-a i Origin-a. Analize su izvedene na krutim praškastim uzorcima zrna papra i tekućim uzorcima papra nakon ekstrakcije u tri različita niskotemperaturna eutektička otapala: kolin klorid – etilen glikol (1:2 i 1:2,5) i kolin klorid – glicerol (1:1). KBr pločice čvrstog uzorka papra pripremljene su na sljedeći način: zrna papra su smrvljena ručno u tarioniku da se dobije vrlo fini prah, a zatim su ostavljeni u eksikatoru 10 dana da se minimalizira utjecaj vode na spektar. Osušeni praškasti papar se miješa s kalij bromidom kao bazom te se preša pod visokim tlakom kako bi se dobila pločica debljine oko 1 mm. Kapljevitih uzorci stavljaju se između dva prozora od kalcijeva fluorida. Snimanja su izvršena na Zavodu za fizikalnu kemiju Odjela kemije, biologije i biotehnologije Sveučilišta u Perugi.

FTIR spektri praškastih uzoraka čistog te rekristaliziranog piperina iz otapala i tekući uzorci otapala nakon regeneracije snimljeni su s Bruker VERTEX 70 na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su analizirani direktno bez prethodne pripreme., Računalna obrada napravljena je uz pomoć Microsoft Excel for Mac 2011 (14.4.4). Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi (25°C) i 101 235 Pa.



Slika 3.4.5. Priprema praškastih uzoraka papra

Tablica 3.4.2. Specifikacije provedenih FTIR eksperimenata

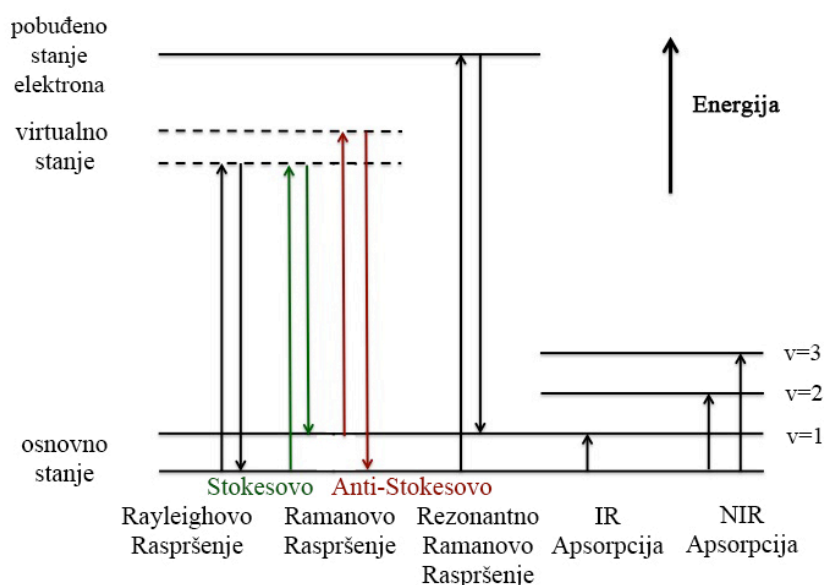
Spektralni raspon:	500 – 5000 cm ⁻¹
Skenovi:	30
Rezolucija:	2 cm ⁻¹

3.4.3.2. NIR Ramanova spektroskopija

Raman i Krishna su 1928. godine pronašli tzv. Ramanovo raspršenje.[69] Oni su otkrili da određena količina raspršenog zračenja pokazuje različitu frekvenciju od upadnog zračenja, i da takvo raspršenje ovisi o kemijskoj strukturi molekule. Pobuda se najčešće vrši u vidljivom području s zelenim ili crvenim laserom te uzrokuje da se 10^{-6} – 10^{-8} fotona neelastično rasprši.[68] Iz slike 3.4.6. možemo vidjeti da postoje tri osnovna tipa raspršenog zračenja: Rayleighovo, Stokesovo i anti – Stokesovo Ramanovo raspršenje. Rayleighovo raspršenje nakon ekscitacije ne mijenja frekvenciju fotona (odgovorno je za plavu boju neba). Fotoni koji nakon sudara izmijene dio svoje energije, uzrokuju raspršenje molekule pri nižoj (Stokes) ili višoj (anti – Stokes) frekvenciji od pobuđenog zračenja.[70] Anti – Stokesovo Ramanovo raspršenje je slabije od Stokesovog Ramanovog raspršenja, zbog čega većina komercijalnih Ramanovih spektrometra snima samo Stokesov spektar.[71]

Ramanov spektar pokazuje samo rotacije i vibracije molekula koje mijenjaju polarizabilnost. Kako se molekula stimulirana vibracijom, steže ili širi, polarizabilnost

se mijenja zbog različitog utjecaja jezgre nad elektronima. Prema tome pravilo odabira za korištenje Ramanove tehnike je da se polarizabilnost treba mijenjati u sklopu vibracija molekule.[70] Ova metoda koristi se za mjerenje simetričnih molekula, a glavna prednost Ramanove tehnike je mogućnost mjerenja vodenih otopina, također uzorci ne zahtijevaju daljnje pripreme. S tim u vezi, Raman se smatra komplementarnom tehnikom infracrvenoj spektroskopiji.[68]



Slika 3.4.6. Vrste vibracionih spektroskopija

Postoje dvije glavne mane Raman tehnike: prva je slabost učinka, a druga je fluorescencija koja može biti puno jača od Ramanovog raspršenja.[64] Budući da vrpce fluorescencijskog emisijskog spektra pokrivaju isto područje valnih dužina kao Stokesov Ramanov signal, javlja se problem fluorescencije koja pokriva Ramanov signal.[71] Kako bi se smanjila fluorescencija, Ramanov spektar može biti pobuđen u bliskom infracrvenom području; ovaj pristup se smatra kao najprikladniji za analizu uzoraka papra. Glavni problem NIR Ramana je prisutnost NIR apsorpcije, koja prigušuje upadnu svjetlost. S druge strane, kao vibracijska spektroskopska metoda ona je bezkontaktna, nedestruktivna, neinvazivna te zahtijeva minimalnu pripremu uzoraka.[71] Raman spektri snimljeni su NIR FT-Raman spektrometrom (slika 3.4.7.), koji koristi infracrveni laser $\lambda = 1064\text{nm}$ valne duljine. Spektralna analiza i manipulacije su napravljene uz pomoć Origin 8.0 programa firme OriginLab Corporation. Analizirano je cijelo zrno papra, koje je prerezano na pola. Svi spektri su snimljeni pri sobnoj temperaturi (25°C) i 101235Pa , u Laboratoriju za ispitivanje

materijala u konzervaciji umjetničkih djela, Odjela za kemiju, biologiju i biotehnologiju Sveučilišta u Perugi.



Slika 3.4.7. Rigaku, Xantus TM - 2 dual band – prijenosni Raman analizator

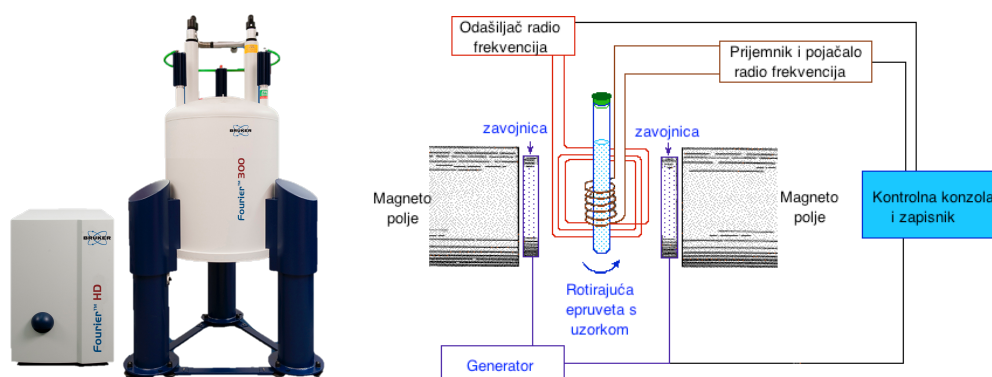
Tablica 3.4.3. Specifikacije Raman NIR instrumenta

Valna duljina lasera:	1064 nm
Snaga lasera:	60 mW
Vrijeme integracije:	5000 ms
Prosjek:	5
Prag šuma:	1000

3.4.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Nuklearna magnetska rezonancija je vrsta apsorpcijske spektroskopske tehnike, gdje uzorak postavljen unutar magnetnog polja apsorbira frekvenciju u području radio valova. Apsorpcija ovisi o karakteristikama jezgri u molekuli. NMR spektar je prikaz frekvencija u ovisnosti o intenzitetu apsorpcije. Može se snimati spektar onih jezgri čiji naboj ima sferičnu raspodjelu prilikom vrtnje oko nukleusa, odnosno čiji je kvantni broj spina $\frac{1}{2}$, kao što su; ^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Nesferična raspodjela naboja rezultira preklapanjem signala i spajanjem sa susjednom jezgrom. Naboj koji se rotira stvara slabo magnetno polje koje se može detektirati te se dobivaju informacije o strukturi, fizikalnim i kemijskim svojstvima, kemijskom okolišu i dinamici molekule. U ovom radu je korištena tehnika protonske magnetne rezonancije (^1H NMR) na Bruker Avance 300 MHz FT NMR spektrometru. Dio mjerenja sniman je i na ^{13}C NMR instrumentu u Centralnom ispitnom laboratoriju INA d.d., čije specifikacije ne mogu biti navedene. Instrument radi pomoću pulsirajuće FT tehnike i supravodljivih magneta hlađenih tekućim helijem. Pulsirajuća tehnika razvijana je zbog potrebe za većom osjetljivošću, koja se postiže istovremenim uzbuđivanjem svih protona te prikupljanjem njihovih signala, odnosno skeniranjem. Uzorak koji se otopi

s deuteriranim otapalom u 5mm staklenoj epruveti, postavlja se unutar probe čiji je princip rada prikazan na slici 3.4.8.[72,73] Mjerenja su provedena u Centru za NMR na Institutu Ruđera Boškovića u Zagrebu.



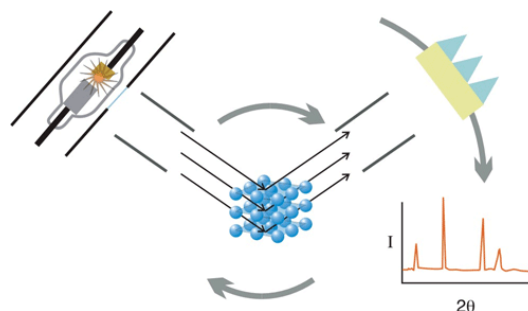
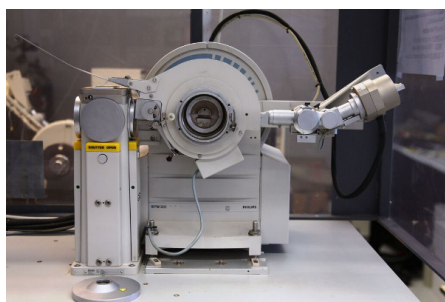
Slika 3.4.8. Bruker Avance 300 MHz FT NMR spektrometar i princip rada

Tablica 3.4.4. Specifikacije H^1 NMR instrumenta [73]

Jakost magnetnog polja:	7,05 T
Raspon frekvencija:	14 – 121 MHz
Inverzna proba:	BBI-z Inverse Broadband Probehead, H-BB-D, 5 mm, z-grad
Direktna proba:	BBO z Broadband Observed Probehead, BB-H-D, 5 mm, z-grad

3.4.5. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

XRD, odnosno rendgenska difrakcija praha – je analitička tehnika koja daje informacije o strukturi proučavanog uzorka. Princip rada prikazan je na slici 3.4.8., karakteristična X – zraka usmjeri se na prethodno pripremljeni praškasti uzorak te se mjeri intenzitet difraktiranog rendgenskog zračenja u ovisnosti o kutu difrakcije. Moguće je analizirati kruti, kristalni uzorak – prirodni ili sintetski, organski ili anorganski u praškastom obliku. Koristi se najčešće za identifikaciju kristalnih faza, odnosno za kvalitativnu analizu, ali metodu je moguće koristiti i pri određivanju; relativnih udjela faza, veličine kristalita, detekciji naprezanja strukture, parametara kristalne rešetke te stupnja kristaliničnosti.[60] Mjerenja su izvedena na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, pri čemu je korišten rendgenski difraktometar Philips PW 1830.



Slika 3.4.9. Philips PW 1830 rendgenski difraktometar i princip rada

Tablica 3.4.5. Specifikacije XRD instrumenta [60]

Generator:	PW 1830 HT
Rendgenska cijev:	CuK α zračenje; Ni filtar
Goniometar:	PW 1050 okomiti s regulacijom hoda
Jedinica za vođenje:	PW 3710, sistemski softver

3.4.6. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

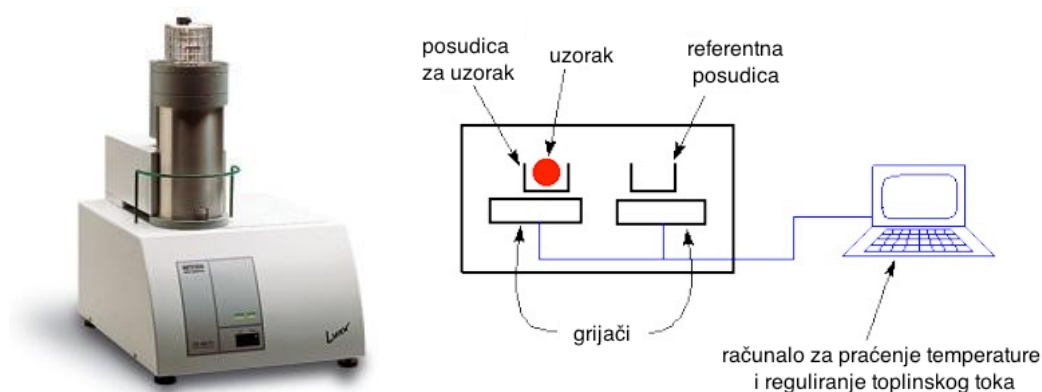
Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je termoanalitička metoda kojom se određuju toplinska svojstva materijala. Referentni i ispitivani uzorak zagrijava se te se mjeri razlika temperatura iz koje se dobivaju informacije o njihovim toplinskim svojstvima. Povećanje temperature unaprijed je programski zadano da raste linearno s vremenom. DSC uređaj daje podatke o toplinskim tokovima i faznim prijelazima u ovisnosti o vremenu i temperaturi. Analizom možemo odrediti fazne prijelaze (taljenje, staklište, kristalizaciju), oksidacijsku stabilnost, čistoću, kinetiku i specifični toplinski kapacitet, a tehnika se koristi za kvantitativno i kvalitativno određivanje anorganskih ili organskih, prirodnih ili sintetskih uzoraka.[60] Korišten je DSC uređaj Netzsch STA 409, a mjerenja su provedena na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 3.4.6. Specifikacije DSC instrumenta [60]

Temperaturni raspon:	- 150 do 500 °C
Brzina zagrijavanja:	0,01 – 100 °C /min
Uvijeti:	• izotermni • neizotermni

Atmosfera:

- oksidacijska
- redukcijaska
- inertna



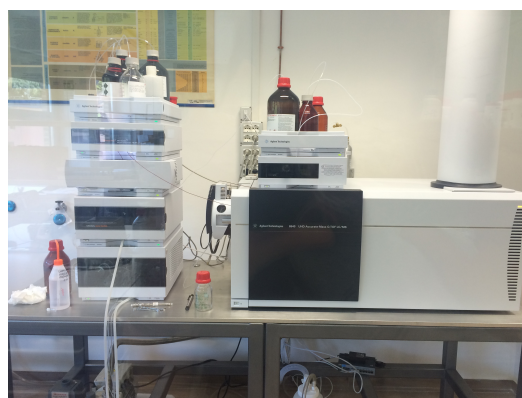
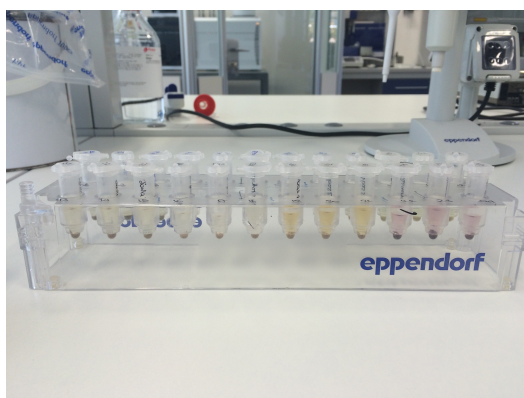
Slika 3.4.10. DSC instrument i princip rada

3.4.7. Tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenim spektrometrom (LC – MS/MS)

Tekućinska kromatografija je tehnika razdvajanja koja proučava prijenos tvari između mobilne i stacionarne faze. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, UHPLC – je vrsta kolonske kromatografije, s kolonom koja sadrži čestice veličine $\leq 2\mu\text{m}$, što rezultira poboljšanjem rezolucije i smanjenjem vremena potrebnog za analizu.[74,75] UHPLC se pokazala kao dobra analitička metoda u proteomici (proučavanje proteina), metabolomici (proučavanje metabolita – kemikalija proizvedenih u stanicama ili organizmima), kod ispitivanja degradacije proizvoda, forenzici, analizi hrane i okoliša. Može se s velikom točnošću koristiti za profiliranje, identificiranje, karakterizaciju i kvantifikaciju.[76]

Nadogradnjom LC-a s masenim spektrometrom razvijena je LC – MS/MS analitička metoda koja može detektirati i prepoznati različite tvari bez primjene standarda.[74] Princip rada LC – MS/MS metode bazira se na tome da se prvo kolonskom kromatografijom visoke djelotvornosti razdvoje i izoliraju različite supstance u uzorku. Tako dobiveni spojevi zatim se ioniziraju u masenom spektrometru, nakon čega se ioni razdvajaju na temelju svoje mase i naboja. Dobiva se grafički prikaz raspona o intenzitetu, odnosno broju iona. Koristi se za analizu već poznatih kao i nepoznatih spojeva. Za poznate spojeve radi se baza podataka masenih spektara pretpostavljenih molekula koje se mogu nalaziti u ispitivanom uzorku, dok se za

nepoznate spojeve u kombinaciji s IR ili NMR tehnikama može identificirati novi spoj.[72] LC – MS/MS analiza je provedena na kromatografu Agilent 1290 Infinity LC System u kombinaciji s masenim spektrometrom Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System. Uzorci za analizu pripremljeni su na način da se papir ručno usitnjavao u tarioniku dok nije dobiven vrlo fini prašak koji je sušen u eksikatoru 10 dana, nakon čega je na svim uzorcima identično i precizno provedena ekstrakcija etanolom. Na tako pripremljenim uzorcima papra napravljena je LC – MS/MS analiza, za svaki papir mjerenja su ponovljena tri puta. Korištena je LC kolona s predkolonom koje proizvodi Phenomenex, Torrance, CA, SAD (tablica 3.4.7.). Za analizu, pripremljena je baza podataka od 262 pretpostavljena spoja koja su pronađena u ispitivanim paprima sukladno literaturnim izvorima; dio podataka priložen je u tablici 9.2.1. Svi spektri su snimljeni u Moby TOF Laboratoriju, Odjela za kemiju, biologiju i biotehnologiju Sveučilišta u Perugi.



Slika 3.4.11. Uzorci papra i LC – MS/MS sustav

Tablica 3.4.7. Specifikacije LC kolone

Marka:	Kinetex
Faza:	Bifenil
Veličina čestica:	2,6 μm
Veličina pora:	100 Å
Dužina:	50 mm
Unutarnji Promjer:	4,60 mm

Tablica 3.4.8. Specifikacije LC instrumenta

Način ubrizgavanja:	0,1 μ l
Gradijent:	Binarni
Otapalo A:	Voda
Otapalo B:	Metanol
• Vrijeme 0 min:	100% A – 0% B
• Vrijeme 7 min:	0% A – 100% B
• Vrijeme 10 min:	Zaustavljanje
Fluks:	0,850 ml/min
Temperatura kolone:	30 °C

Tablica 3.4.9. Specifikacije masenog spektrometra:

Otkriva/detektira:	Positivni ioni
Plin:	N ₂
Temperatura plina:	300 °C
Protok plina:	8 L/min
Kapilarni potencijal:	4 000 V
Temperatura kolone:	30 °C

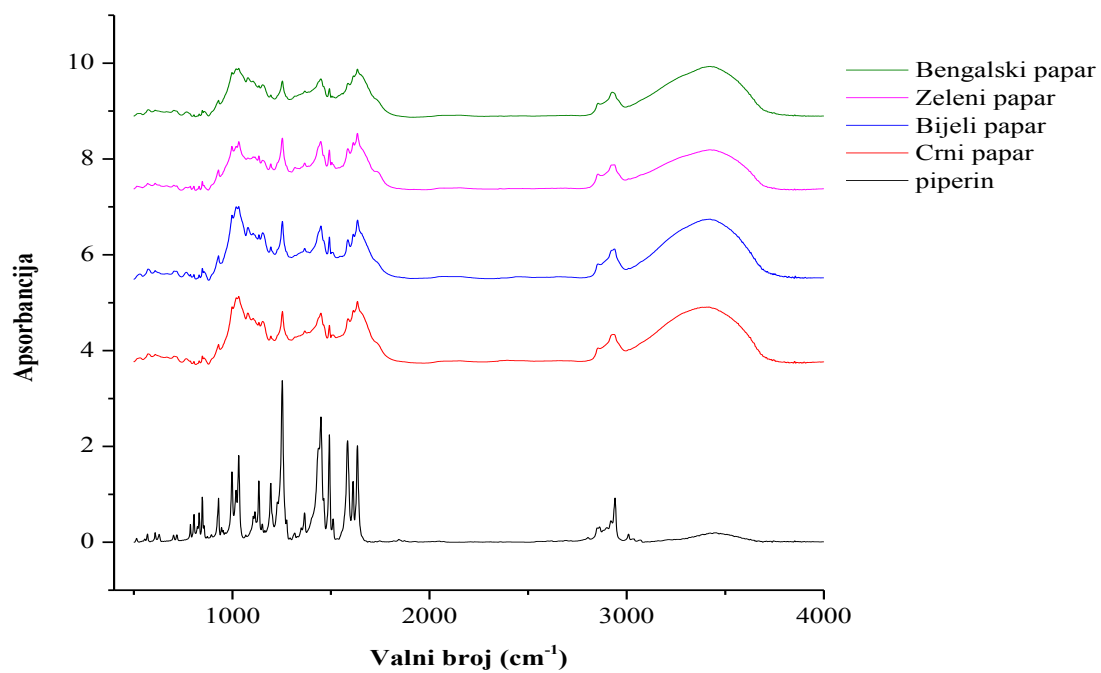
Metoda glavnih komponentata (PCA) je statistička metoda kojom se smanjuje broj inicijalnih varijabli. To se postiže zamjenom inicijalnih varijabli, njihovim linearnim kombinacijama koje čine novi set varijabli. Nađene glavne komponente su nepovezane, ali raspoređene na način da zadržavaju informacije sadržane u izvornim varijablama. Broj glavnih komponentata je manji ili jednak broju izvornih varijabli.[78,79] Metoda se uglavnom koristi za što bolju vizualizaciju promatranih podataka. Kroz vizualizaciju je moguće i izvoditi zaključke o značajnosti razlika između populacija ili pripadnosti nove mjerene jedinke (papra) pojedinoj populaciji. Naravno, predviđanja o pripadnosti populaciji su moguća samo ukoliko je uočena separacija jedinki prema populacijama, u našem slučaju papra. S dimenzije broja svih analiziranih tvari sustav je reduciran na trodimenzionalni sustav. Očuvanje veće dimenzije dovodi do zanemarivo malo novih podataka koji ne pridonose opisu karakteristika promatranog papra. Promatravši papre iz različitih populacija, dobiva se matematička i vizualna separacija podataka u novim koordinatama prema

populacijama.[80] Temeljem toga, može se zaključiti kako se pojedine vrste papra značajno razlikuju u mjerenim varijablama. PC1 predstavlja x – os, PC2 – y os, a PC3 – z os u trodimenzionalnom sustavu. PCA analiza kao i obrada podataka dobivenih LC – MS/MS tehnikom je provedena uz pomoć posebno razvijenog programa u Moby TOF Laboratoriju, Odjela za kemiju, biologiju i biotehnologiju Sveučilišta u Perugi, čije specifikacije spadaju u industrijsku tajnu i ne mogu biti navedene u ovom istraživanju.

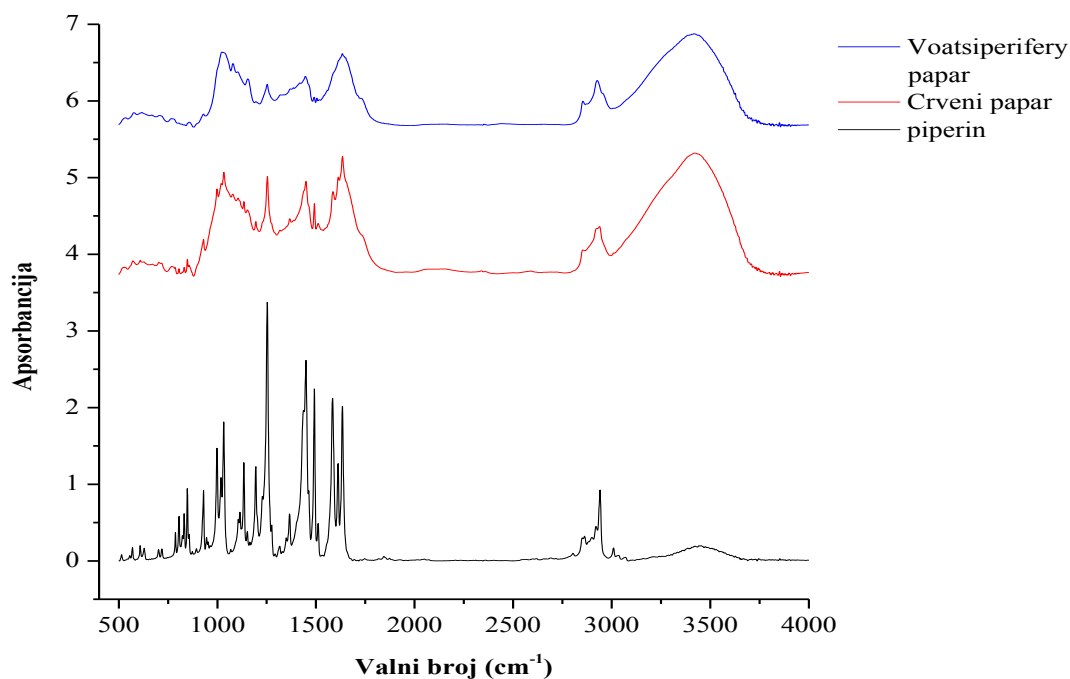
4. REZULTATI:

4.1. FITOKEMIJSKA ANALIZA ZRNA PAPRA

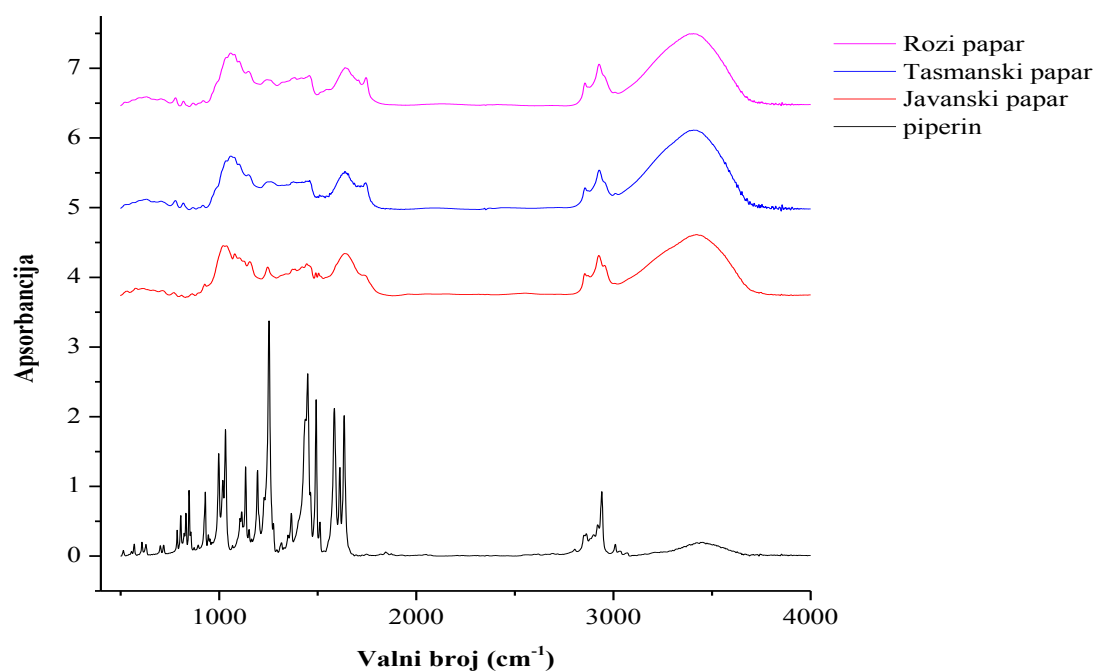
4.1.1. FTIR analiza



Slika 4.1.1. Usporedba FTIR spektra crnog, bijelog, zelenog papra (*P. nigrum*), Bengalskog papra (*P. longum*) i čistog piperina

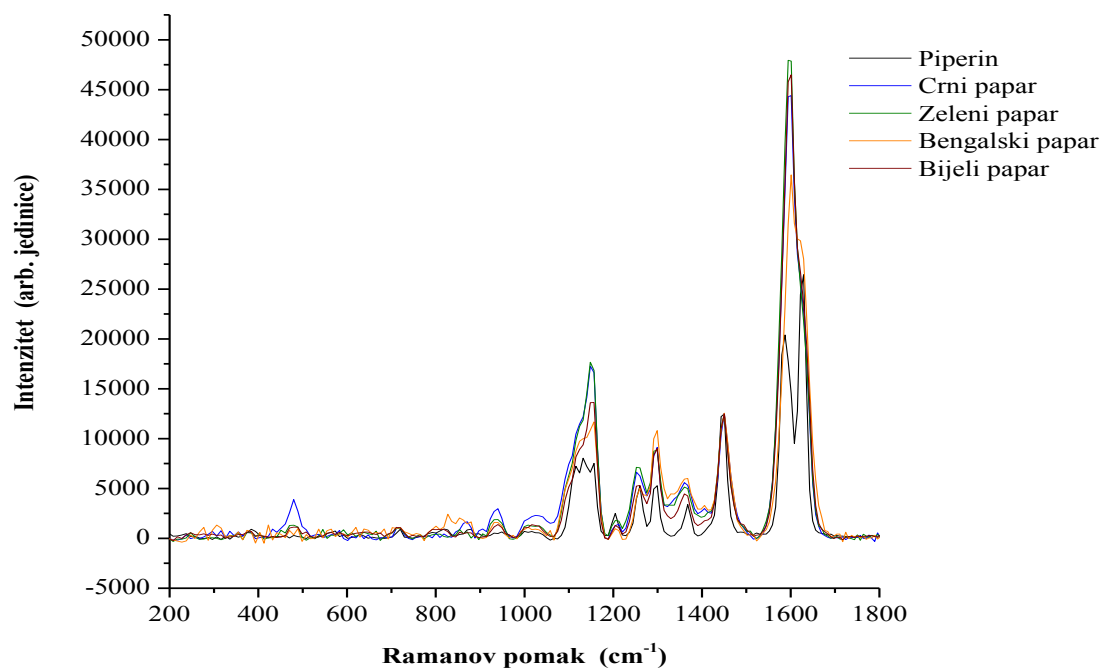


Slika 4.1.2. Usporedba FTIR spektra crvenog papra (*P. nigrum*), voatsiperifery papra (*P. borbonense*) i čistog piperina

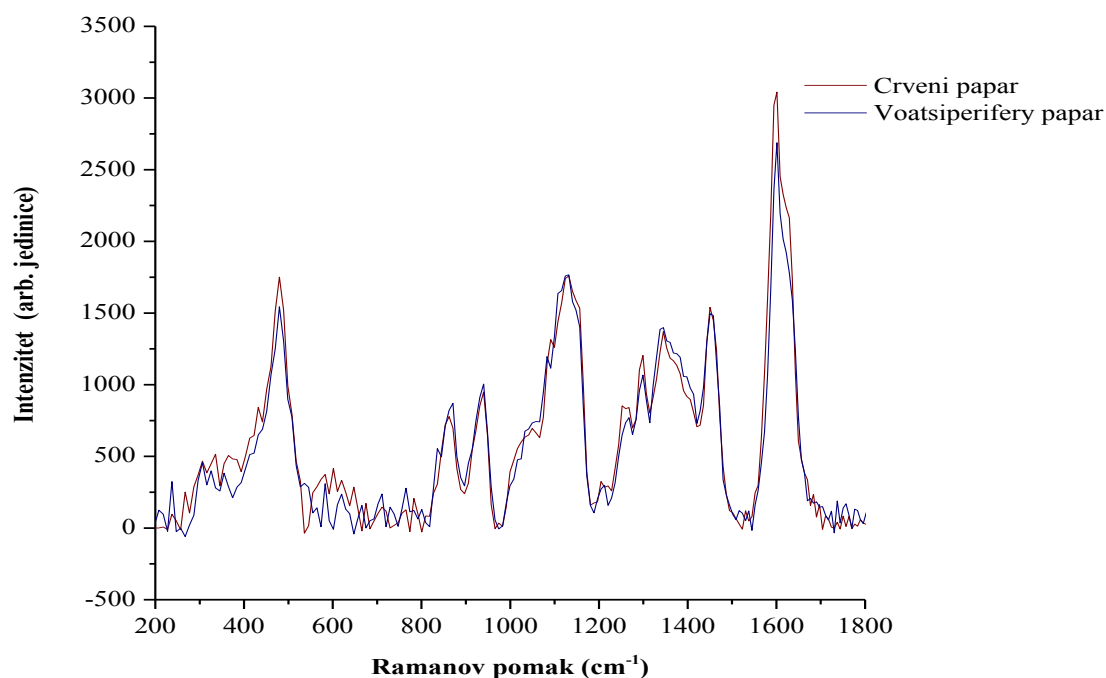


Slika 4.1.3. Usporedba FTIR spektra Javanskog papra (*P. cubeb*), Tasmanjskog papra (*T. lanceolata*), rozog papra (*S. terebinthifolia*) i čistog piperina

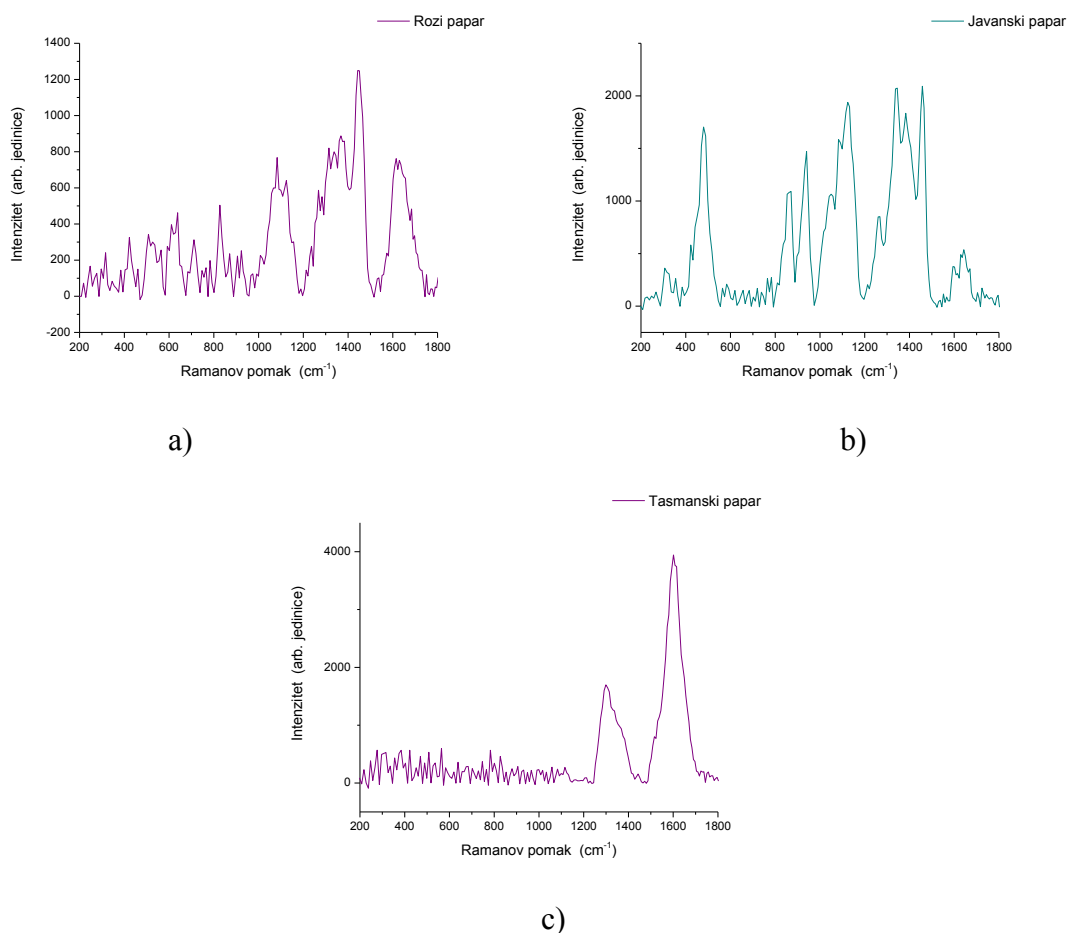
4.1.2. Raman NIR analiza



Slika 4.1.4. Usporedba Raman NIR spektra crnog, bijelog, zelenog papra (*P. nigrum*), Bengalskog papra (*P. longum*) i čistog piperina

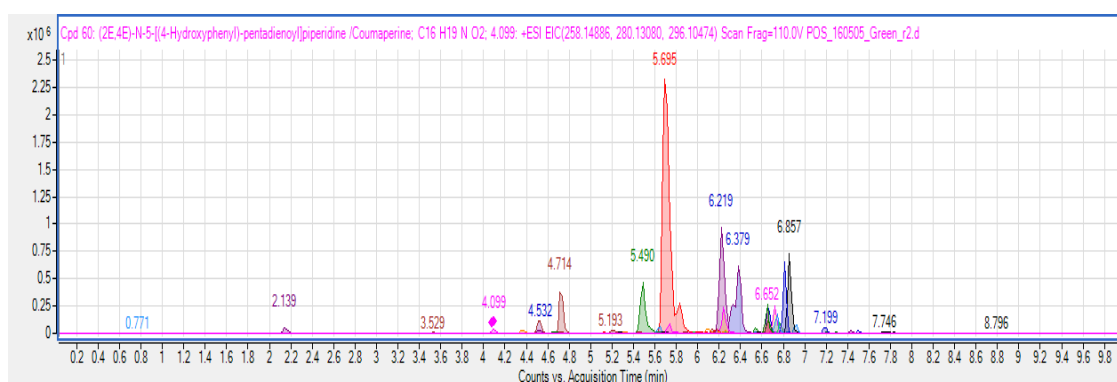


Slika 4.1.5. Usporedba Raman NIR spektra crvenog papra (*P. nigrum*) i voatsiperifery papra (*P. borbonense*)



Slika 4.1.6. Raman NIR spektar a) rozog papra (*S. terebinthifolia*), b) Javanskog papra (*P. cubeb*) i Tasmanskog papra (*T. Lanceolata*)

4.1.3. Tekućinska kromatografija u kombinaciji sa masenim spektrometrom (LC – MS/MS)



Slika 4.1.7. Primjer grafa dobivenog LC – MS/MS analizom za zeleni papra (*P. Nigrum*)

Tablica 4.1.1. *Piper nigrum* (crni, bijeli, zeleni i crveni papar)

CRNI	površina pika	%
Piperine	4405273,01	49,07
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	681521,668	7,59
Piperettine	652084,77	7,26
Trichostachine	545643,826	6,08
Piperettine	460646,332	5,13
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	405966,175	4,52
Dihydropipericide	340784,454	3,8
3.761.132	230946,635	2,57
Guineensine	178566,262	1,99
Dehydropipernonaline	139974,063	1,56
Piperlonguminine	133233,745	1,48
BIJELI	površina pika	%
Piperine	5336639,03	55,17
Piperettine	757979,865	7,84
Piperettine	751440,839	7,77
Trichostachine	577235,299	5,97
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	541349,205	5,6
Dihydropipericide	309912,195	3,2
3.761.132	274967,198	2,84
Pipericide	143451,149	1,48
Dehydropipernonaline	120260,222	1,24
2.221.787	99554,5753	1,03
ZELENI	površina pika	%
Piperine	5081066,8	44,56
Piperettine	1302543,39	11,42
Trichostachine	872986,61	7,66
Piperettine	849703,511	7,45
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	545870,8	4,79
Dihydropipericide	450728,765	3,95
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	442157,244	3,88
3.761.132	254410,731	2,23
Guineensine	206903,712	1,81
Piperlonguminine	151231,59	1,33
Dehydropipernonaline	146577,08	1,29
Tricholein	140820,71	1,24
CRVENI	površina pika	%
Piperine	4394294,1	63,15
Trichostachine	504991,647	7,26
Piperettine	309268,42	4,44
Piperettine	261381,951	3,76
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	249936,14	3,59
3.761.132	231475,504	3,33
Dihydropipericide	110869,269	1,59
Piperlonguminine	103811,015	1,49
Guineensine	98075,1489	1,41
3.363.250	92092,7523	1,32
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	79446,7179	1,14

Tablica 4.1.2. *Piper borbonense*

VOATSIPERIFERY	površina pika	%
Piperine	4074523,72	52,42
Trichostachine	836322,586	10,76
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	518182,224	6,67
Piperamide	503244,509	6,47
Piperlonguminine	281251,253	3,62
3.761.132	232005,583	2,99
Guineensine	216228,925	2,78
(-)-Muurolene	182976,646	2,35
(2E,4E,10E)-N-1 l-(3,4-Methylenedioxyphenyl)undercatrienoyl piperidine	155321,713	2,00
4,5-Dihydropiperlonguminine	123487,03	1,59
Dehydropipernonaline	105794,126	1,36
Pipericide	84238,9597	1,08

Tablica 4.1.3. *Piper longum*

BENGALSKI	površina pika	%
Piperine	4870370,18	59,71
Pipericide	728010,635	8,93
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	685929,13	8,41
Piperamide	491421,005	6,02
3.761.132	259216,854	3,18
Piperlonguminine	246956,942	3,03
Guineensine	227136,495	2,78
Dehydropipernonaline	213814,475	2,62
(2E,4E,10E)-N-1 l-(3,4-Methylenedioxyphenyl)undercatrienoyl piperidine	117916,003	1,45

Tablica 4.1.4. *Piper cubeb*

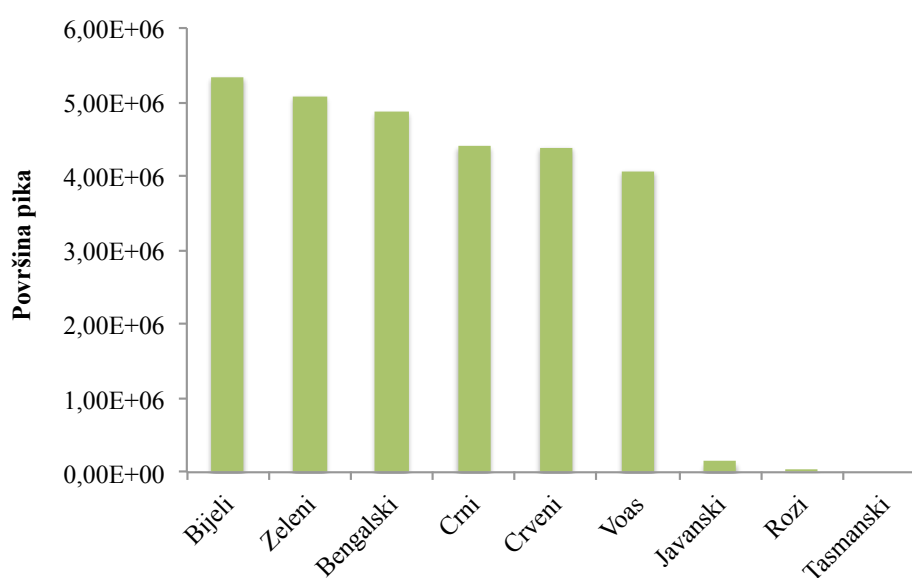
JAVANSKI	površina pika	%
(-)-Muurolene	1838885,22	68,66
Piperamide	484957,905	18,11
Piperine	141515,446	5,28
2.031.795	72550,6038	2,71
2.031.793	40116,2742	1,5

Tablica 4.1.5. *Tasmannia lanceolata*

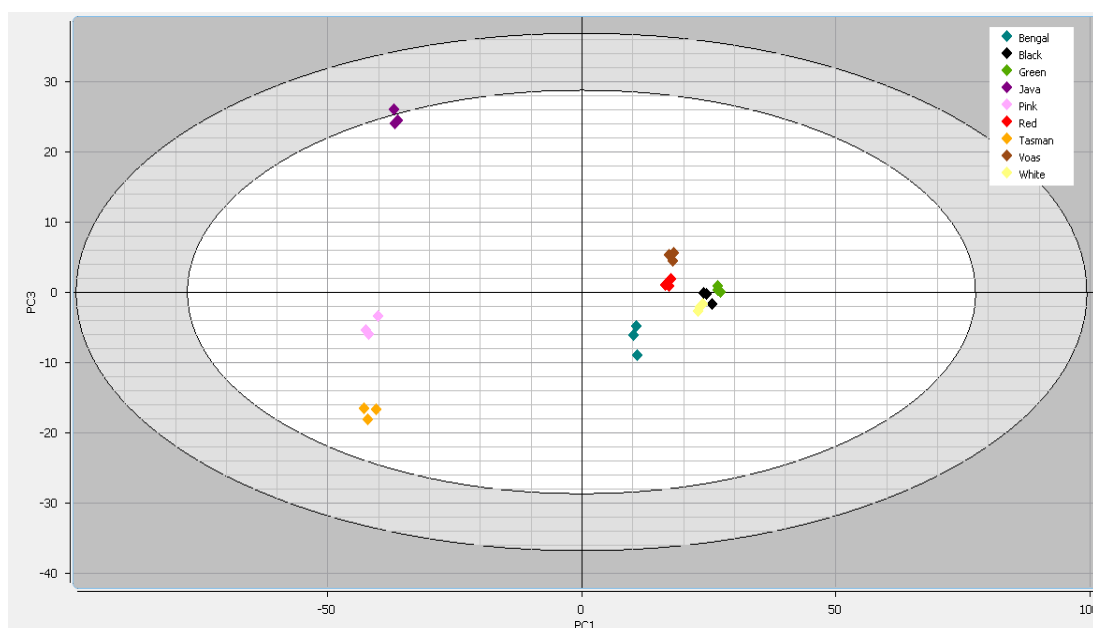
TASMANSKI	površina pika	%
Piperamide	501990,313	27,16
2.191.742	312869,175	16,93
2.191.746	228383,674	12,36
(2E,4E,10E)-N-1 l-(3,4-Methylenedioxyphenyl) undercatrienoyl piperidine	181033,856	9,79
Quercitrin	116091,273	6,28
Quercitrin	106249,756	5,75
Cepharanone B	88900,2589	4,81
Vernolic acid	63664,4332	3,44
2.351.672	37315,826	2,02
(-)-Muurolene	36702,7362	1,99
2.351.674	29071,1395	1,57
2.031.793	22777,156	1,23
2.051.952	19735,4255	1,07

Tablica 4.1.6. *Schinus terebinthifolia*

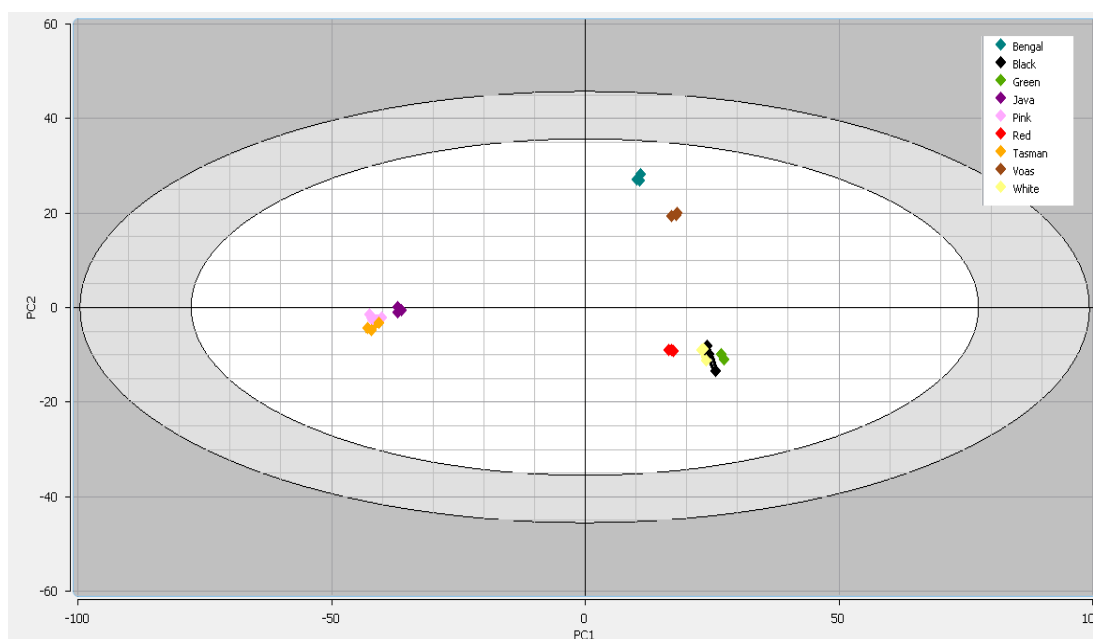
ROZI	površina pika	%
Piperamide	508292,705	45,24
(2E,4E,10E)-N-1 l-(3,4-Methylenedioxyphenyl) undercatrienoyl piperidine	205616,997	18,3
2.351.672	86421,3412	7,69
(-)-Muurolene	62289,4408	5,54
Vernolic acid	56466,2029	5,03
2.051.952	39457,1737	3,51
Cepharanone B	29244,952	2,6
2.031.795	28145,175	2,51
2.031.796	21150,4392	1,88
2.351.674	16935,9348	1,51
Agathisflavone	11270,0008	1



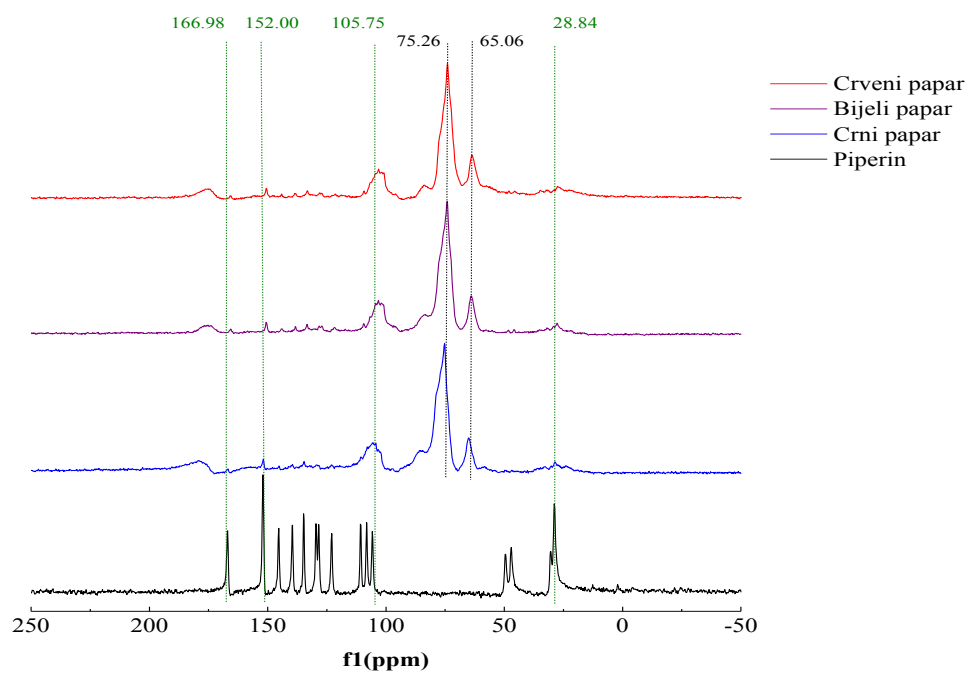
Slika 4.1.8. Grafički prikaz usporedbe piperina u ispitivanim paprima



Slika 4.1.9. Grafički prikaz analize glavnih komponentata (PCA) za sve ispitivane papre: PC1 – PC3



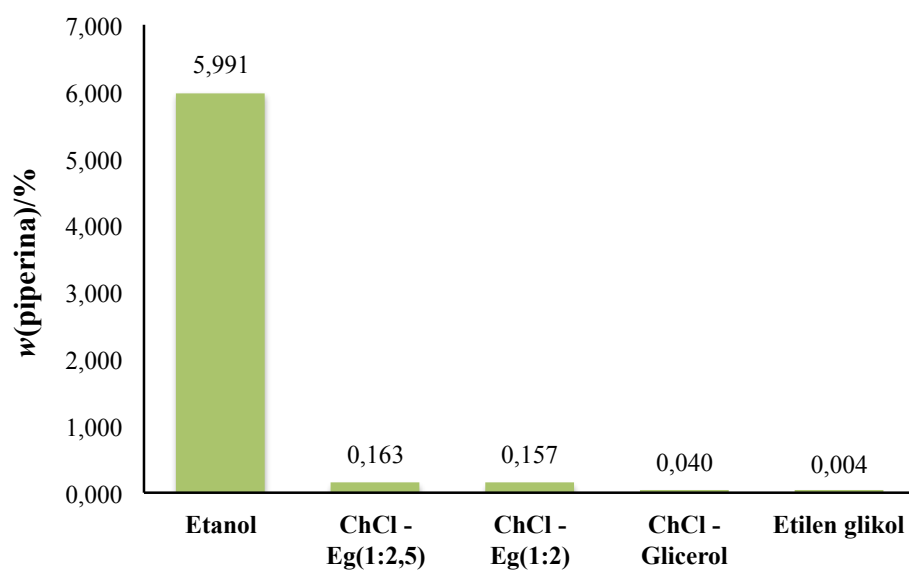
Slika 4.1.10. Grafički prikaz analize glavnih komponentata (PCA) za sve ispitivane papre: PC1– PC2



Slika 4.1.11. Usporedba ^{13}C NMR spektra crnog, bijelog, crvenog papra (*P. nigrum*), i čistog piperina

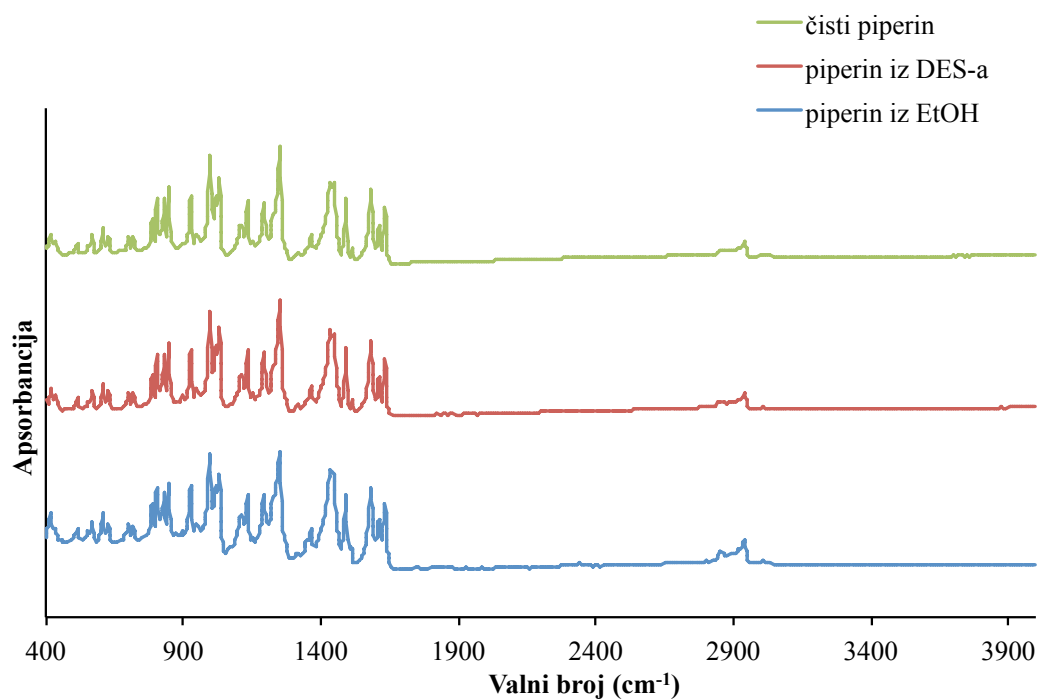
4.2. PRELIMINARNI POKUSI

4.2.1. Određivanje topljivosti

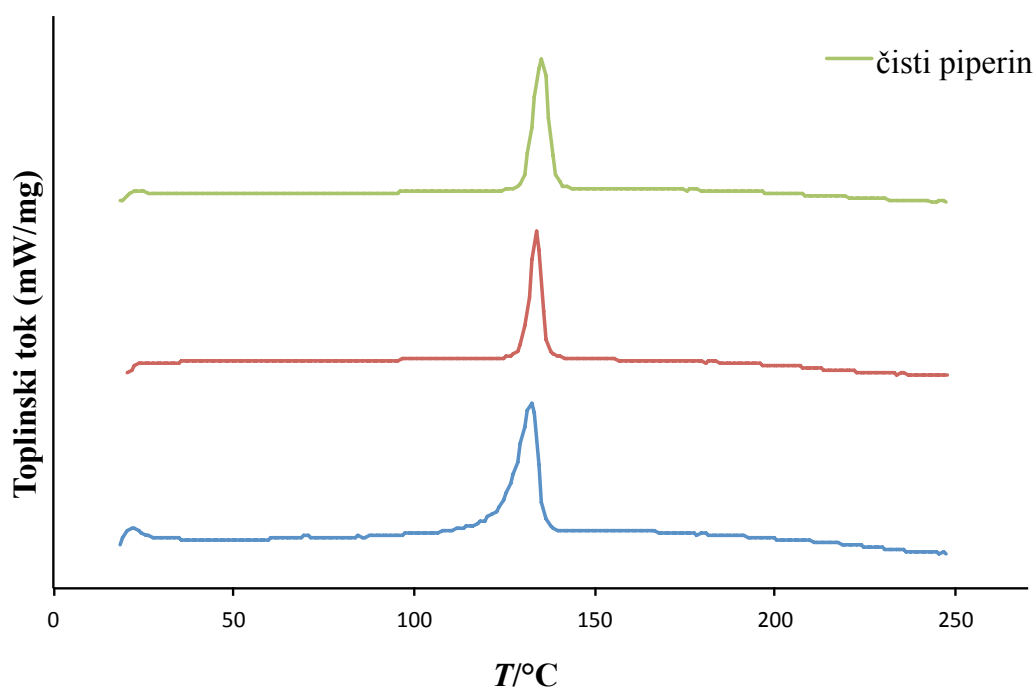


Slika 4.2.1. Topljivost piperina u odabranim otapalima

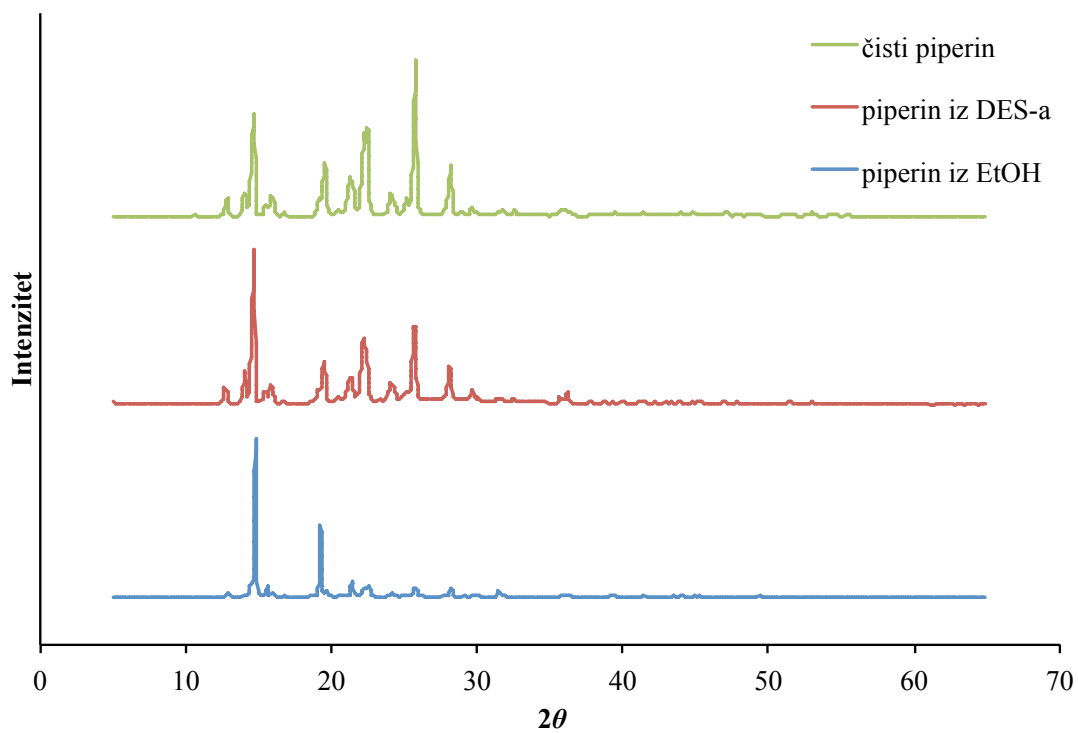
4.2.2. Usporedba otapala



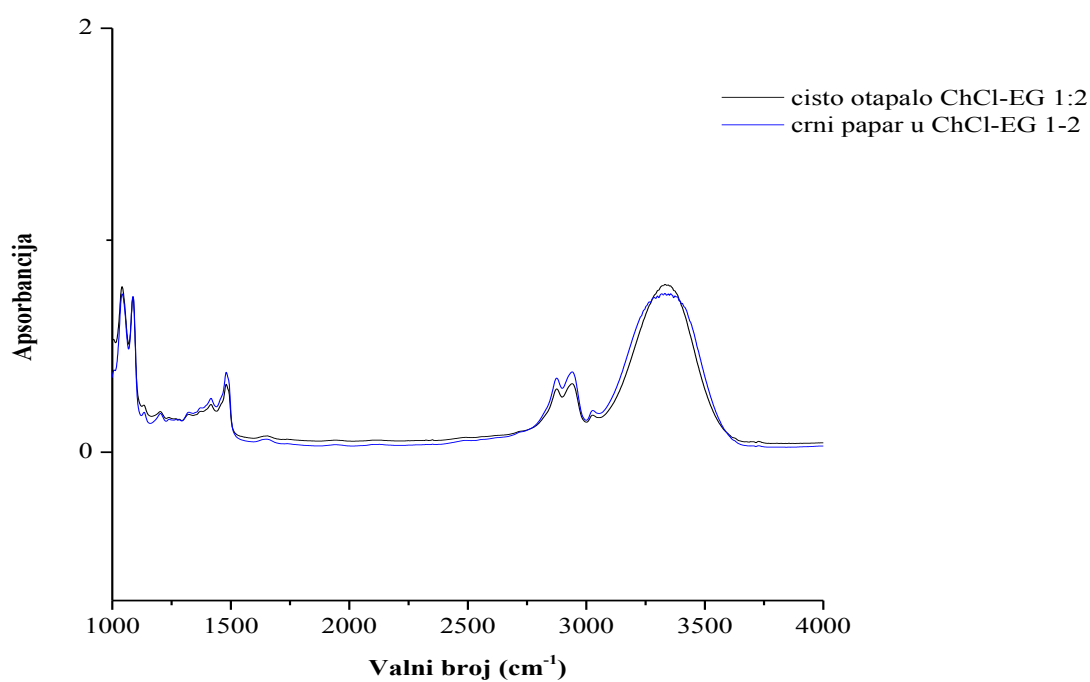
Slika 4.2.2. FTIR spektri čistog i regeneriranog piperina iz etanola i eutektičke smjese (ChCl-Eg 1:2,5)



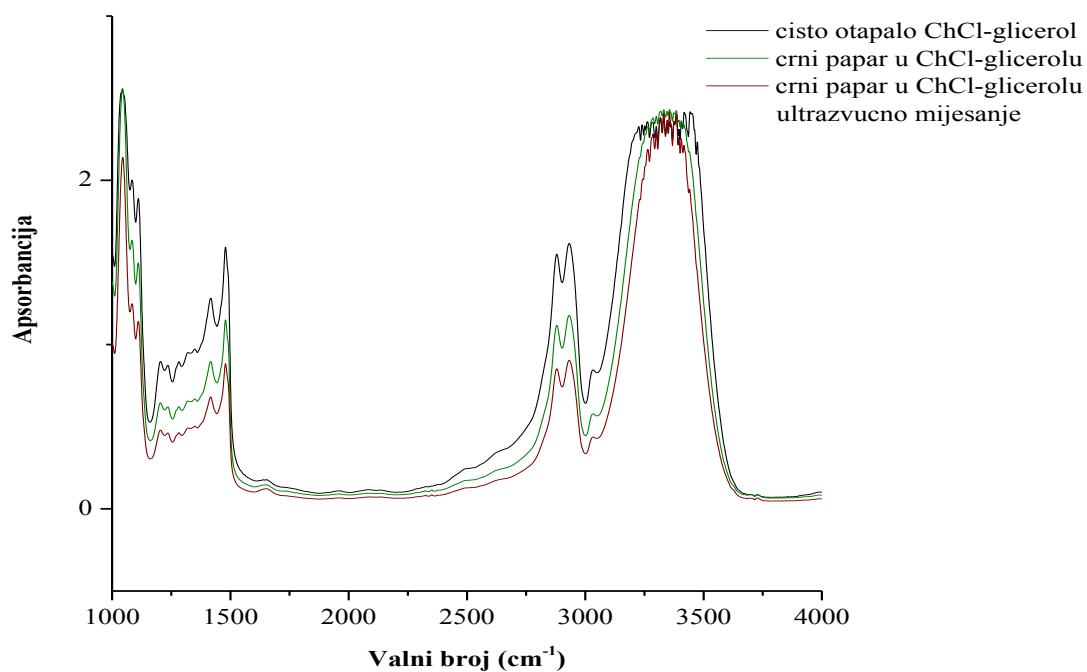
Slika 4.2.3. DSC spektri čistog i regeneriranog piperina iz etanola i eutektičke smjese (ChCl-Eg 1:2,5)



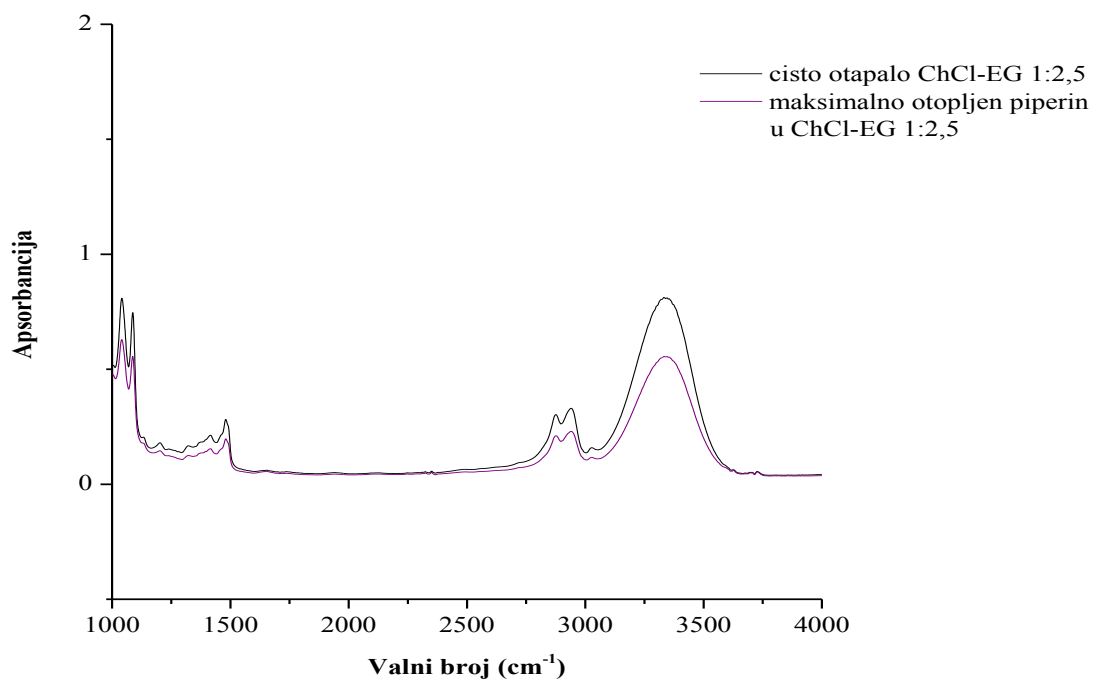
Slika 4.2.4. XRD spektri čistog i regeneriranog piperina iz etanola i eutektičke smjese (ChCl-Eg 1:2,5)



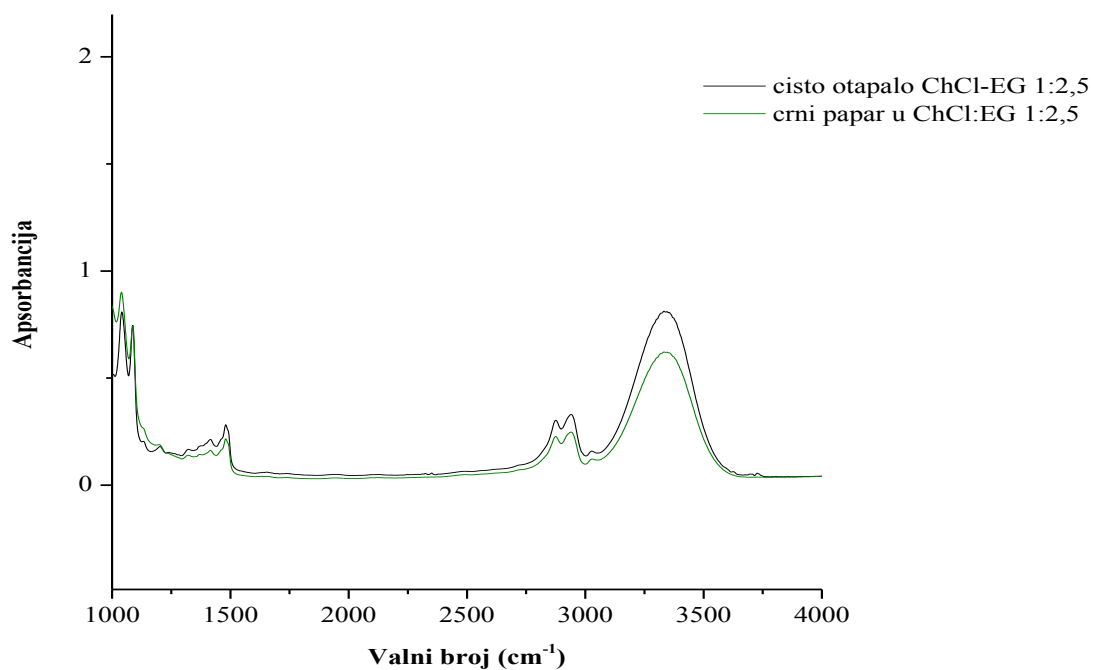
Slika 4.2.5. FTIR spektri otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2)) prije i nakon ekstrakcije iz crnog papra



Slika 4.2.6. FTIR spektri otapala (kolin klorid – glicerol (1:1)) prije i nakon ekstrakcije iz crnog papra (magnetsko i ultrazvučno miješanje)

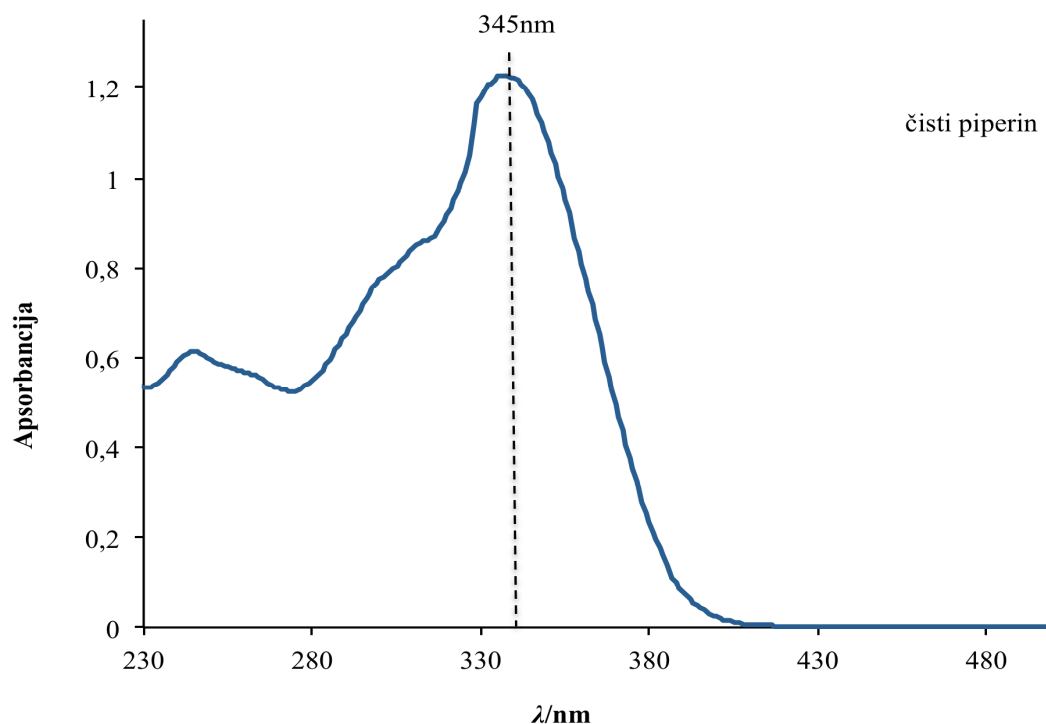


Slika 4.2.7. FTIR spektri čistog otapala (kolin klorida – etilen glikola (1:2,5)) i otapala s maksimalno mogućom koncentracijom piperina

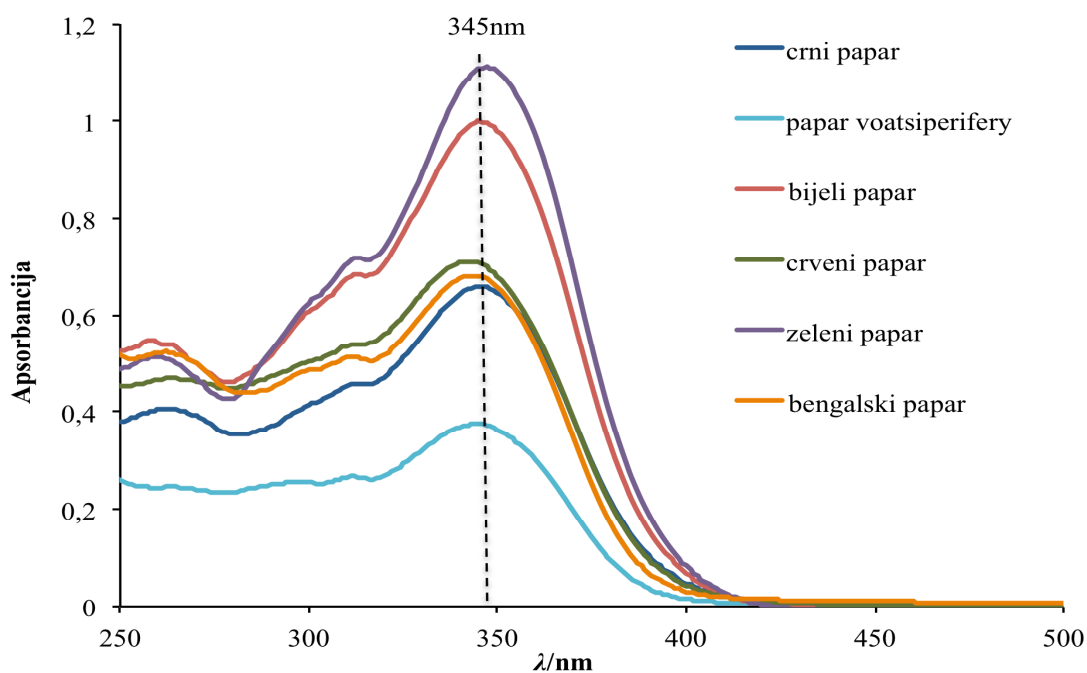


Slika 4.2.8. FTIR spektri otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) prije i nakon ekstrakcije iz crnog papra

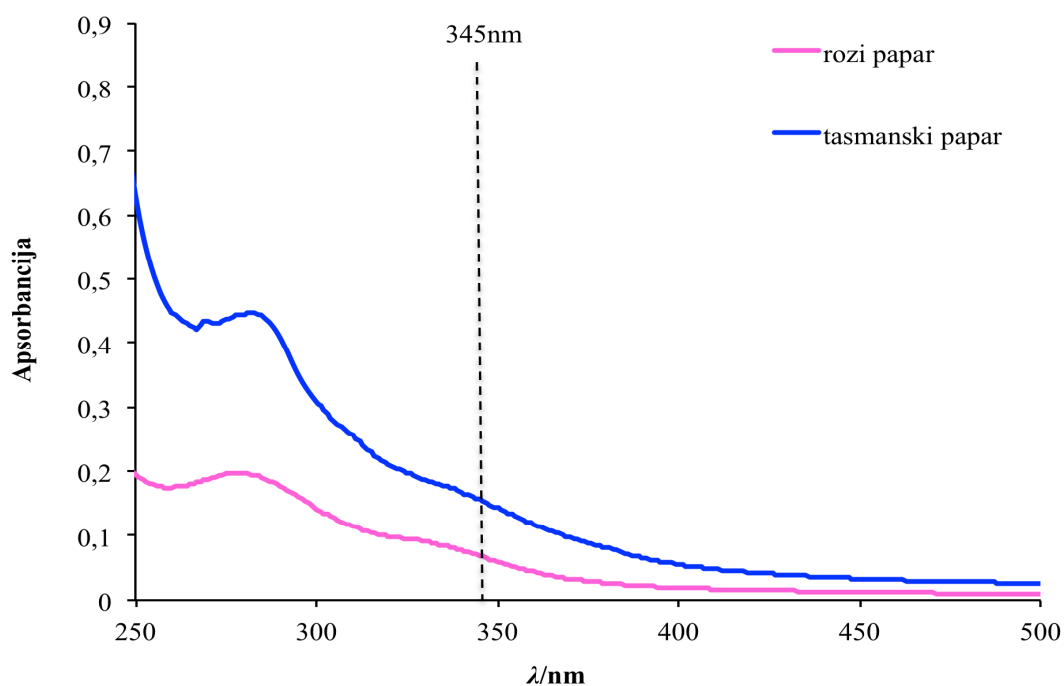
4.3. EKSTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO



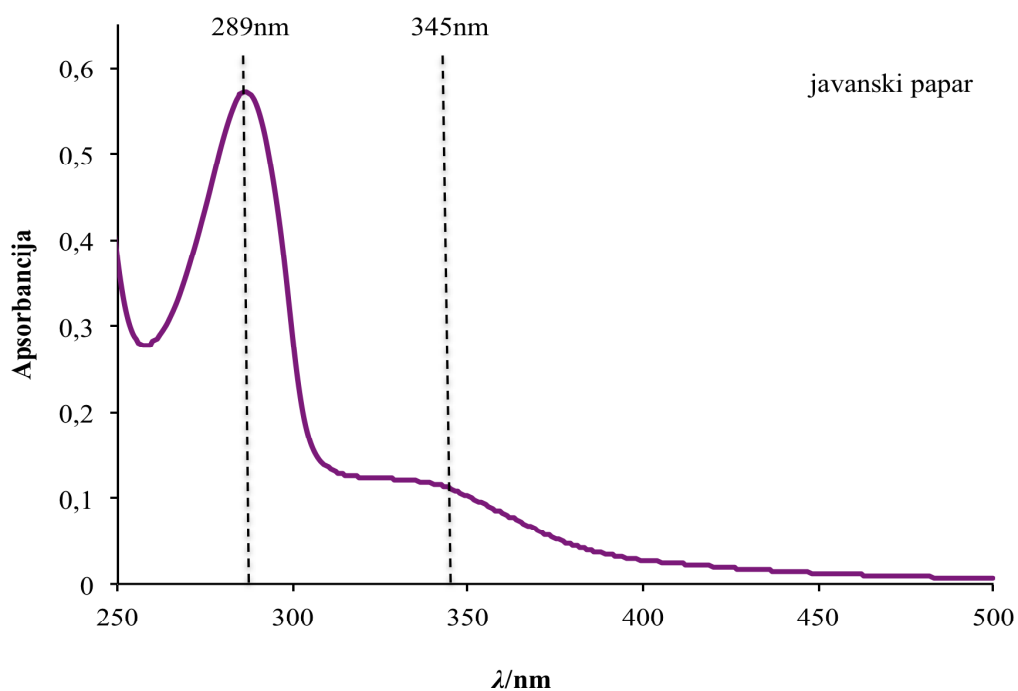
Slika 4.3.1. UV/vis spektar čistog piperina



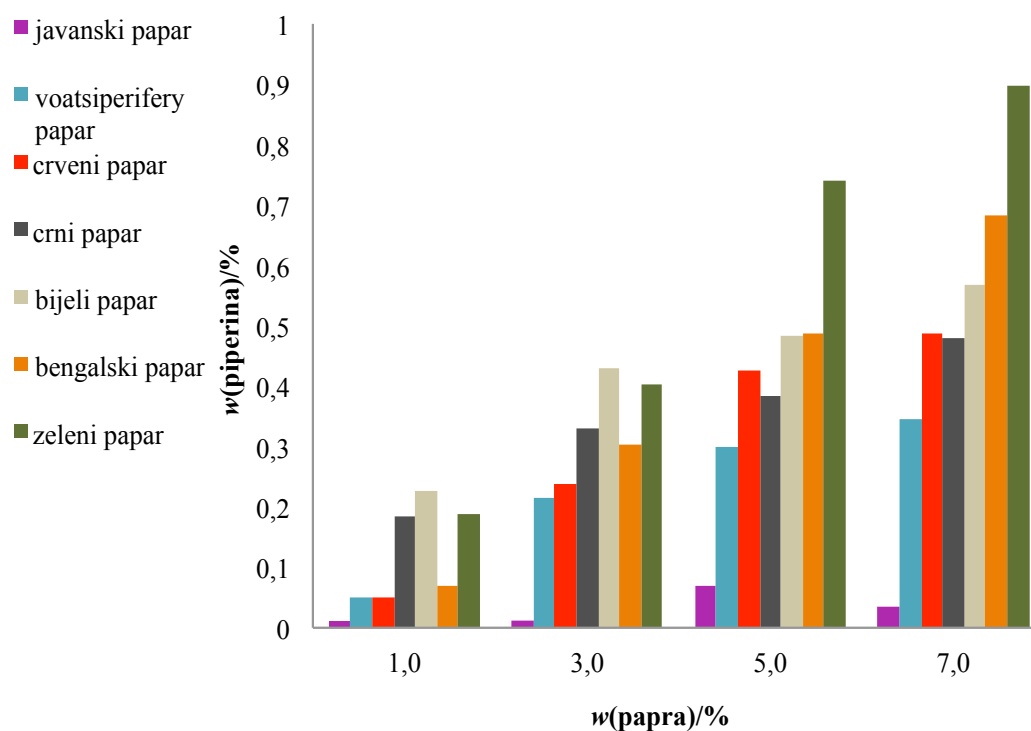
Slika 4.3.2. UV/vis spektri otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) nakon ekstrakcije iz *P. nigrum* (crni, crveni, bijeli i zeleni), *P. longum* (bengalski) i *P. borbonense* (voatsiperifery), pri masenom udjelu papra od 3%



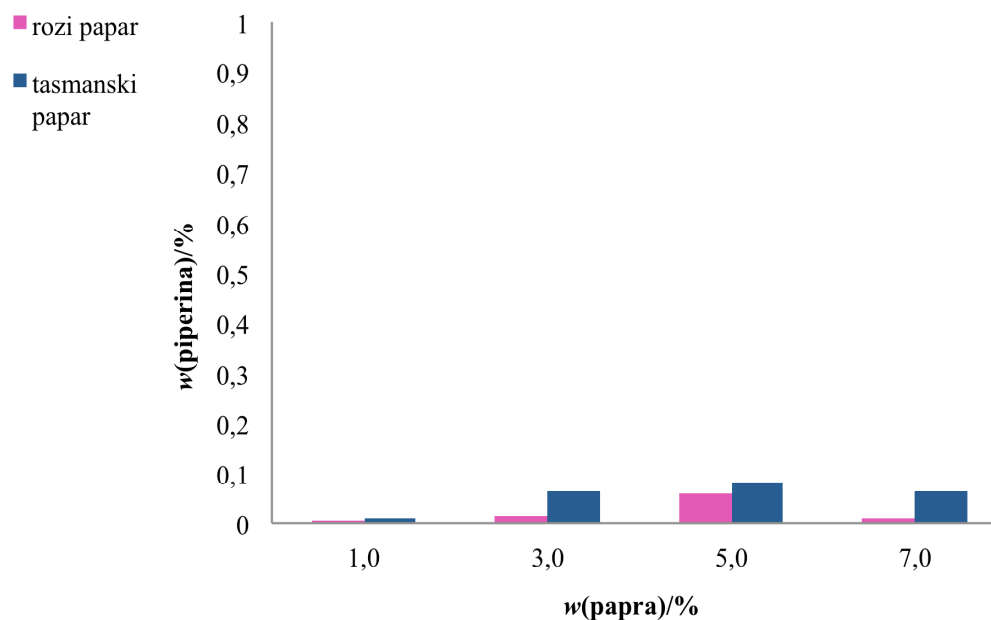
Slika 4.3.3. UV/vis spektri otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) nakon ekstrakcije iz *S. terebinthifolia* (rozi) i *T. lanceolata* (tasmanski), pri masenom udjelu papra od 3%



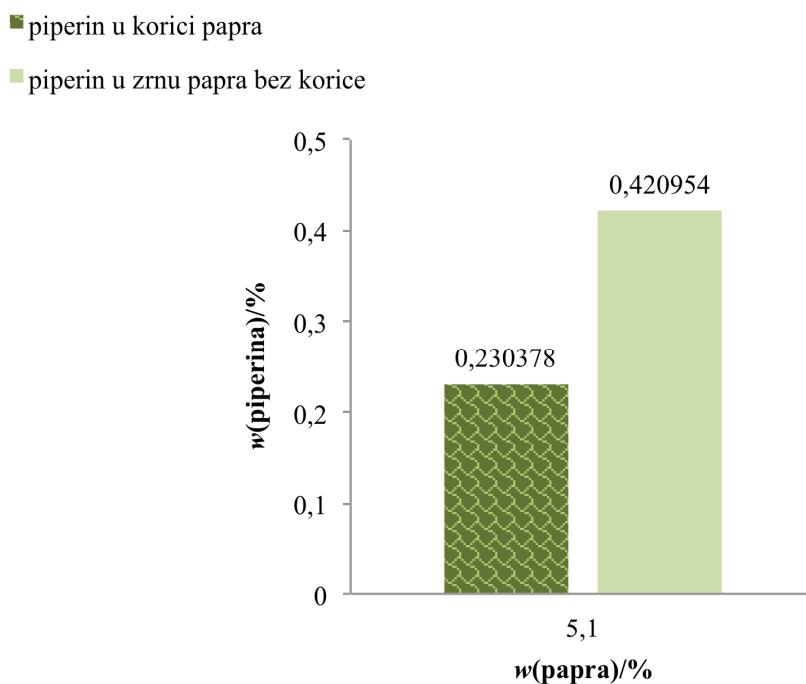
Slika 4.3.4. UV/vis spektar otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5) nakon ekstrakcije iz *P. Cubeb* (javanski), pri masenom udjelu papra od 3%



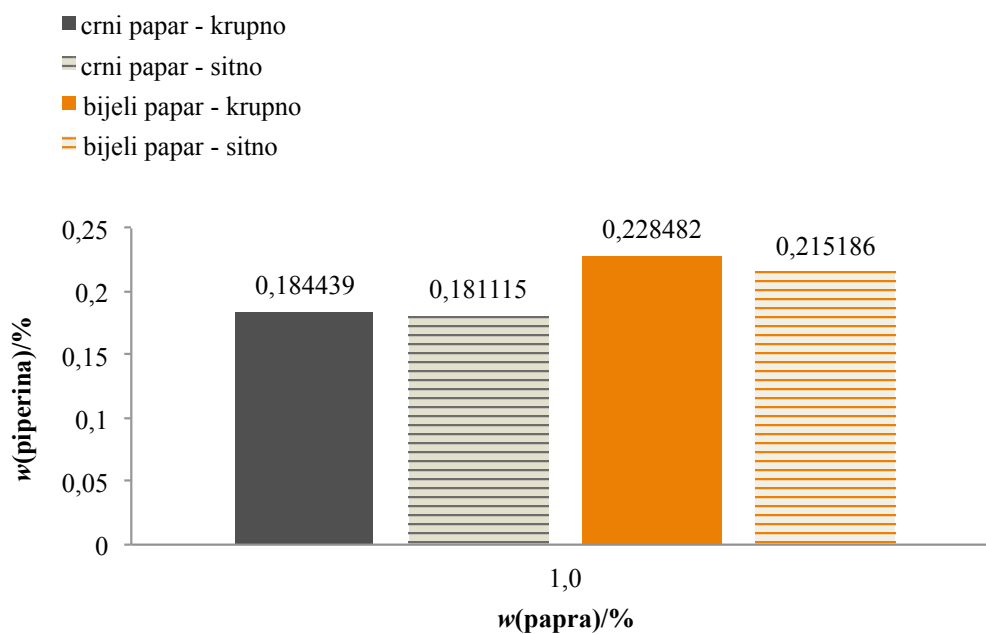
Slika 4.3.5. Utjecaj masenog udjela papra na koncentraciju piperina u otapalu (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) nakon ekstrakcije iz istraživanih papara (*P. nigruma* (crni, crveni, bijeli i zeleni), *P. longuma* (bengalski) i *P. borbonense-a* (voatsiperifery) i *P. cubeba* (javanski))



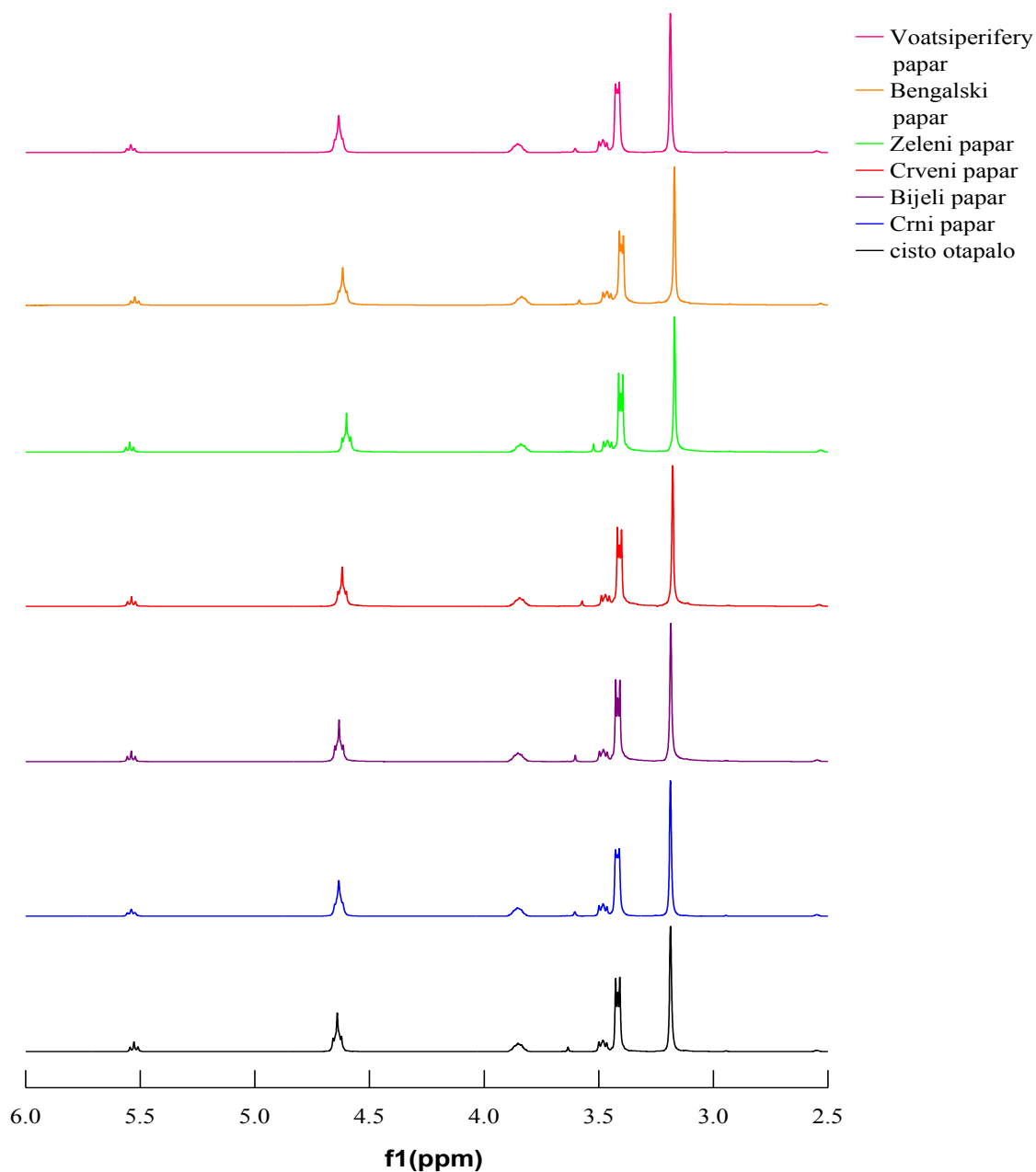
Slika 4.3.6. Utjecaj masenog udjela papra na koncentraciju piperina u otapalu (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) nakon ekstrakcije iz istraživanih papra (*S. terebinthifolie* (rozi) i *T. lanceolate* (tasmanski))



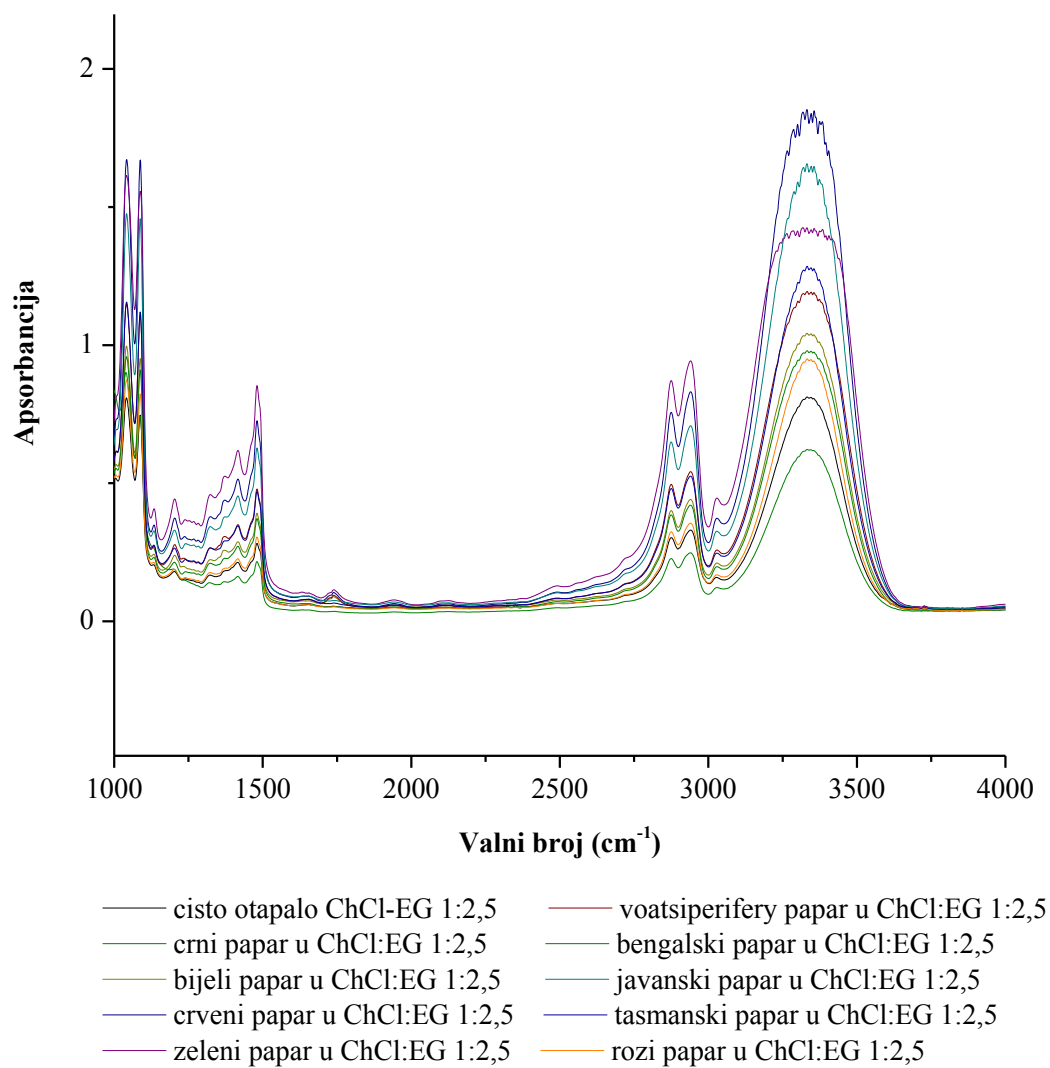
Slika 4.3.7. Grafički prikaz UV/vis analize usporedbe piperina ekstrahiranog iz korice i iz središta zrna zelenog papra (*P. nigrum*)



Slika 4.3.8. Utjecaj veličine čestica na koncentraciju ekstrahiranog piperina iz papra – *P. nigrum* (crni i bijeli)

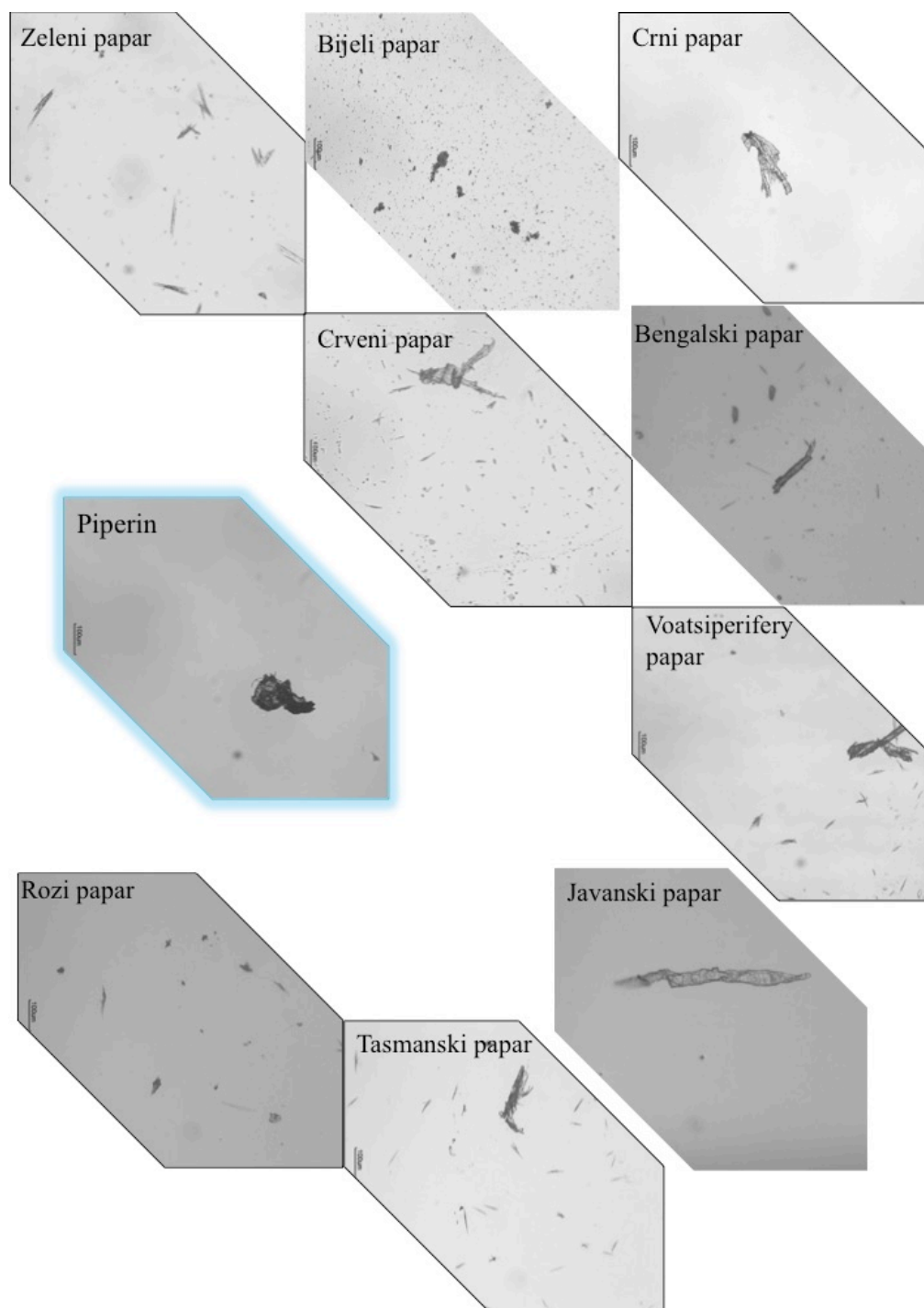


Slika 4.3.9. ^1H NMR spektri otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) prije i nakon ekstrakcije iz (crnog, crvenog, bijelog, zelenog papra (*P. nigrum*), bengalskog papra (*P. longum*) i voatsiperifery papra (*P. borbonense*),)



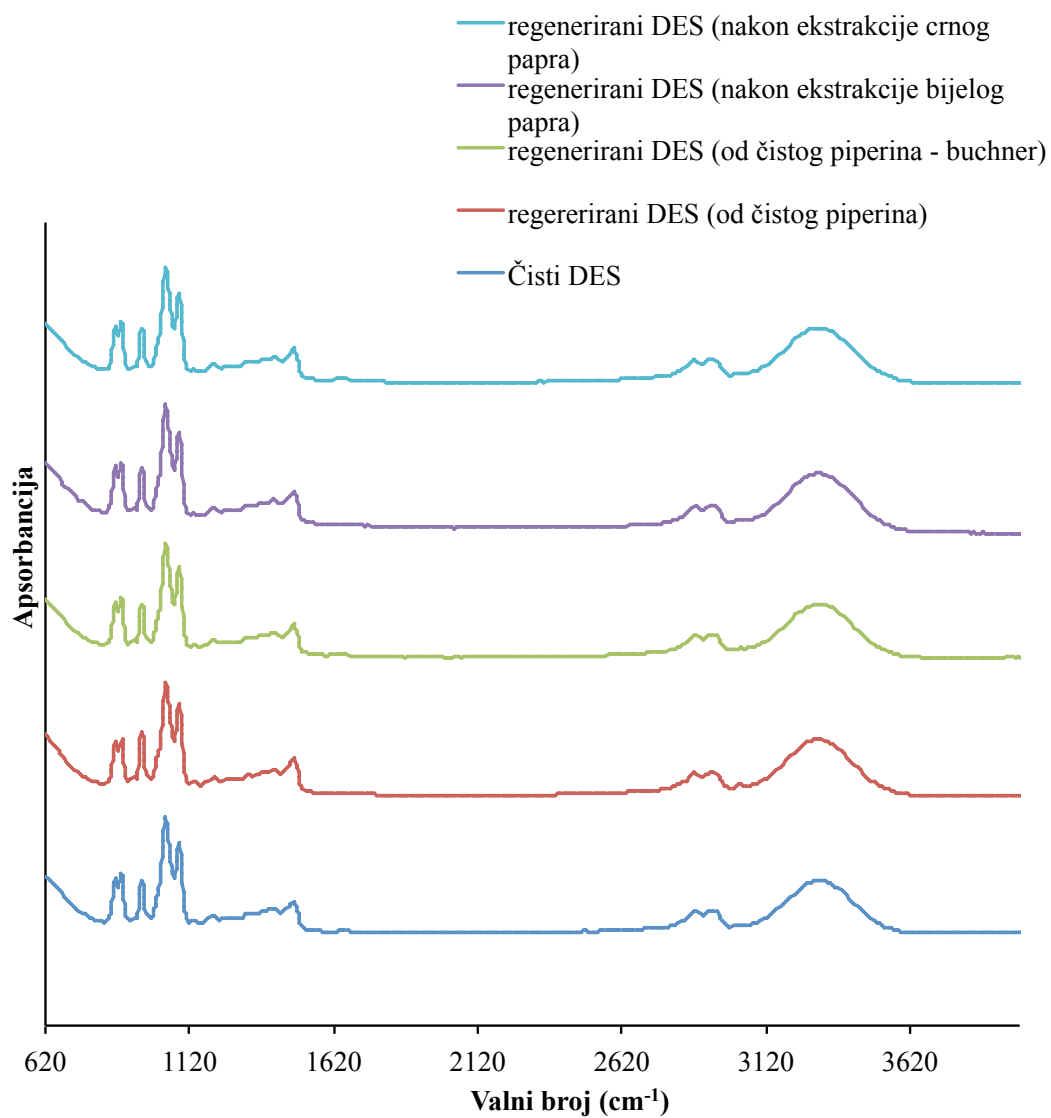
Slika 4.3.10. Usporedba FTIR spektra otapala (kolin klorida – etilen glikola (1:2,5)) prije i nakon ekstrakcije za devet različitih vrsta papara

4.4. REKRISTALIZACIJA PIPERINA



Slika 4.4.1. Kristali dobiveni dodatkom vode u otopine kolin klorid – etilen glikola (1:2,5) nakon ekstrakcije iz svih istraživanih papra (uvećanje 100 x)

4.5. REGENERACIJA OTAPALA



Slika 4.5.1. Grafički prikaz uspoređenih FTIR spektara čistog otapala i regeneriranog otapala nakon otapanja čistog piperina te ekstrakcije bijelog i crnog papra

5. RASPRAVA:

5.1. FITOKEMIJSKA ANALIZA ZRNA PAPRA

Fitokemijska analiza devet različitih papri napravljena je u svrhu usporedbe i definiranja sličnosti, odnosno razlika ispitivanih uzoraka. Osim pukog interesa svakog čovjeka o tome što konzumira, koji su utjecaji i može li svojim izborima učiniti nešto više za svoje zdravlje, nas je zanimalo koje su razlike u detektiranim supstancama kada se analizira direktno plod papra. Tražili smo odgovore na pitanja: koje su supstance topljive u otapalu i u kojoj se količini ekstrahiraju, koji od ispitivanih papri je najbogatiji piperinom, odnosno s kojim paprom bi proces ekstrakcije bio najučinkovitiji, po čemu se to «lažni papri» razlikuju odnosno po čemu nalikuju rodu *piper* te može li nam ta informacija na bilo koji način biti korisna.

Na slici 4.1.1. prikazani su FTIR spektri crnog, bijelog, zelenog (*P. nigrum*) i bengalskog (*P. longum*) papra te čistog piperina. Na spektrima navedenih papri jasno se mogu uočiti pikovi karakteristični za piperin (998 cm^{-1} , 1194 cm^{-1} i 1252 cm^{-1})[81]. Spektralnom analizom dokazano je da zeleni papar ima spektar koji se najviše podudara s čistim piperinom, što navodi na zaključak da zeleni papar sadrži najveću koncentraciju piperina.

FTIR spektri ostalih istraživanih papri prikazani su na slikama 4.1.2. i 4.1.3. Svi signali karakteristični za piperin uočljivi su na spektru crvenog papra (*P. nigrum*). Na spektru voatsiperifery (*P. boronense*) papra mogu se uočiti signali na 1194 cm^{-1} i 1252 cm^{-1} , dok je na spektru javanskog papra (*P. Cubeb*) vidljiv samo slabi signal na 1252 cm^{-1} .

Usporedbom FTIR spektara rozog (*S. terebinthifolia*) i tasmanskog (*T. lanceolata*) papra sa spektrom čistog piperina, slika 4.1.3., jasno se može uočiti da nema vidljivih signala piperina, ali da spektri pokazuju sličnosti među sobom – odnosno sadrže neke druge zajedničke supstance. Također, uočeni su signali koji se pojavljuju u svim ispitivanim paprima, a ne poklapaju se sa signalima piperina.

Raman spektar intenzivnije detektira pikove piperina, posebice pik na 1600 cm^{-1} . Na slici 4.1.4. vidi se da je u Raman spektru crnog, bijelog, zelenog (*P. nigrum*) i bengalskog (*P. longum*) papra prisutan isključivo signal piperina. Također, kao i kod

FTIR analize, najjasnije se vide pikovi piperina u spektru zelenog papra – što potvrđuje navod da piperina ima najviše u zelenom papru.

Raman NIR spektar javanskog (*P. Cubeb*) papra ima drugačije pikove od piperina (slika 4.1.6.b), ali se poklapa sa signalima crvenog papra (*P. nigrum*) te se može pretpostaviti da se vide signali iste molekule s različitim supstituentima (npr. vernolinske kiseline)[77]. Također, u javanskom papru vidi se pik piperina na 1600 cm^{-1} , ali malog intenziteta što bi značilo da ga ima u malim količinama.

Iz slike 4.1.5. jasno se vidi preklapanje spektara crvenog (*P. nigrum*) i voatsiperifery (*P. borbonense*) papra. Osim toga, određena supstanca prisutna u velikoj količini u javanskom papru također je zastupljena u značajnim količinama i u crvenom (*P. nigrum*) i voatsiperifery (*P. borbonense*) papru. Prema tome, rezultati dobiveni Raman NIR tehnikom približno se poklapaju s rezultatima FTIR analize.

Dobiveni grafički prikazi rozog (*S. terebinthifolia*) i tasmanskog (*T. lanceolata*) papra se u potpunosti razlikuju od svih drugih ispitivanih uzoraka (slika 4.1.6. pod a i c) kao što je slučaj i kod FTIR analize. Uz to, spektar tasmanskog papra ukazuje na veliku fluorescenciju te se mogu raspoznati samo dva pika iznad fluorescencije.

LC – MS/MS analiza daje nam detaljan popis etanolom ekstrahiranih supstanci iz ispitivanih papri, od čega su u rezultatima prikazane samo one supstance koje su ekstrahirane u značajnijim količinama ($>1\%$). Iz podataka za *P. nigrum* prikazanih u tablici 4.1.1., u sva četiri papra, piperin je najzastupljenija supstanca, oko 50% usporedbom s ostalim ekstrahiranim spojevima. Najviše piperina ekstrahirano je iz bijelog i zelenog papra, a najmanje iz crvenog papra.

Za *P. borbonense* ova su ispitivanja od iznimne važnosti, iz razloga što je začim iznimno teško nabaviti – ne postoje podaci u literaturi o istraživanjima ove vrste papra. U tablici 4.1.2. LC – MS/MS analize za voatsiperifery (*P. borbonense*) papar, piperin je uočljivo najzastupljenija komponenta. Uspoređujući s ostalim paprima, voatsiperifery je po strukturi najbližiji *P. nigrumu* (što se vidi i iz poklapanja FTIR i Raman NIR spektara crvenog i voatsiperifery papra), drugi po sličnosti mu je bengalski (*P. longum*) papar (tablica 4.1.3.). Iz toga se može zaključiti da je *P. borbonense* po strukturnoj analizi – kombinacija *P. nigruma* i *P. longuma*.

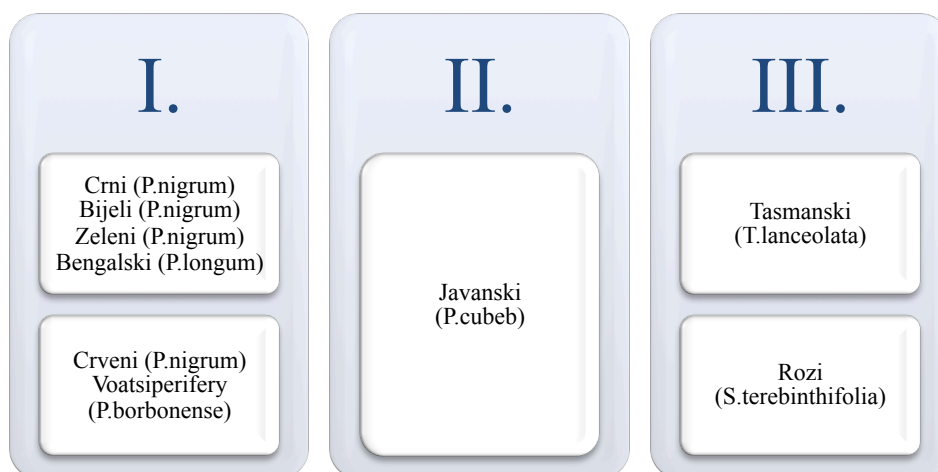
P. Cubeb odnosno javanski papar ima najzanimljivije rezultate, jer kao rod *pipera* pokazuje najveće odstupanje od svojih rođaka i nagine «lažnim paprima». Od

početka istraživanja postavljalo se pitanje sadrži li piperin – najvažniju supstancu koja papar karakterizira kao začín. Spektroskopske analize daju naslutiti da bi se piperin možda mogao nalaziti u *P. Cubebu*, međutim LC – MS/MS analiza sa sigurnošću potvrđuje postojanje piperina (tablica 4.1.4.) što se slaže i s literaturnim podacima *Phytochemistry of the genus piper* [77].

Iz rezultata vibracionih spektroskopija i LC – MS/MS analize vidljivo je da *P. nigrum*, *P. borbonense* i *P. longum* sadrže značajnu količinu, *P. Cubeb* i *S. terebinthifolia* (tablica 4.1.6.) imaju zanemarivo malo, a *T. lanceolata* (tablica 4.1.5.) nema piperina. To se vizualno lijepo može vidjeti na slici 4.1.8. gdje se koncentracija piperina smanjuje u nizu: bijeli > zeleni > bengalski > crni > crveni > voatsiperifery >> javanski >> rozi papar.

Također, javanski papar (*P. Cubeb*) sadrži uglavnom muurolen, dok tasmanski (*T. lanceolata*) i rozi papar (*S. terebinthifolia*) sadrže najviše piperamida (tablice 4.1.4., 4.1.5., 4.1.6.). Ovi rezultati razlikuju se od dobivenih FTIR spektara i literaturnih podataka [13,26,27,77], iz razloga što FTIR prepoznaje sličnosti između javanskog – crvenog i voatsiperifery, kao i između javanskog – rozog i tasanskog papra. LC – MS/MS analiza daje slabe signale za javanski, rozi i tasanski papar (najjači signal je deset puta slabiji od signala piperina u zelenom papru). Najvjerojatniji uzrok tome je otapalo korišteno u pripremi uzoraka za LC – MS/MS analizu; moguće je da etanol nije zadovoljavajuće otapalo za navedena tri papra. Zatim, FTIR spektar pokazuje signale koji se pojavljuju u svih devet ispitivanih uzoraka papra, a nisu signali piperina. Uspoređujući s literaturnim podacima (prikazanim u tablici 9.2.1.) može se pretpostaviti da ti signali predstavljaju *p – Cymen*, jer je on jedina komponenta prisutna u svim ispitivanim paprima.

Usporedbom rezultata vidljivo je da primjenjene analitičke metode (FTIR, NIR Raman i MS/MS LC) dijele ispitane papre u tri velike grupe, kao što je prikazano slikom 5.5.1..



Slika 5.1.1. Tri grupe analiziranih papri

Provedena PCA analiza potvrđuje gore navedene zaključke, tako se na slici 4.1.9. jasno mogu razabrati tri glavne grupe: I – *P. nigrum*, *P. longum* i *P. borbonense* (crni, bijeli, crveni, zeleni, bengalski i voatsiperifery papar), II – *P. Cubeb* (javanski papar) i III – *T. lanceolata* and *S. terebinthifolius* (tasmanski i rozi papar). Na slici 4.1.10. mogu se uočiti sličnosti između javanskog, rozog i tasmanskog papra (najvjerojatnije zbog prisustva piperamida), te bengalskog i voatsiperifery papra. Iz obje slike (4.1.9. i 4.1.10.) je očigledno da su sva četiri papra vrste *P. nigruma* (crni, bijeli, crveni i zeleni papar) najbliži međusobno. Zanimljivo je primjetiti da ne postoji sličnost između javanskog – crvenog i voatsiperifery papra, jer je PCA analiza provedena na rezultatima dobivenim LC – MS/MS tehnikom.

Također, usporedbom ^{13}C NMR spektara za piperin i *P. nigrum* (slika 4.1.11.), u papru se vide karakteristični pikovi piperina na 166.98, 152.00, 105.75 i 28.84 ppm. Osim piperina ispitivani papri dijele neke druge zajedničke supstance čiji se signali vide na 75.26 i 65.06 ppm i intenzivniji su od signala piperina.

5.2. PRELIMINARNI POKUSI

Sa svrhom odabira odgovarajućeg otapala koje bi se koristilo za ekstrakciju piperina, eksperimentalno je određena topljivost piperina u tri pripravljena niskotemperaturna eutektička otapala te uspoređena s topljivošću u etanolu i etilen glikolu, a rezultati su prikazani na slici 4.2.1. Etanol se inače i koristi kao otapalo za ekstrakciju piperina iz papra prvenstveno zbog svoje niske toksičnosti i minimalnog negativnog utjecaja na okoliš. Iako je jedna od prednosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala sposobnost otapanja različitih tvari, osnovni je problem vezan uz primjenu ovih otapala njihova velika viskoznost, te zahtijevaju duže vrijeme trajanja procesa te intenzivnije

miješanje. Viskoznost ovih otapala može se podesiti dodatkom vode, međutim kako piperin nije topljiv u vodi [22] takvo rješenje ne bi bilo zadovoljavajuće. Ekstrakcija pri povišenim temperaturama također nije prihvatljiva zbog tendencije piperina da se raspada na višim temperaturama [21]. Najveća topljivost piperina (osim u etanolu) uočena je u kolin-klorid – etilen glikolu (1:2,5). Shahbaz i suradnici navode da povećanjem molarnog udjela etilen – glikola u ispitivanom DESu dolazi do smanjenja viskoznosti [82], čime raste sposobnost otapanja, što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom radu. Zbog najveće topljivosti, za ekstrakciju piperina iz uzoraka papra izabrano je niskotemperaturno eutektičko otapalo kolin-klorid – etilen glikol (1:2,5).

Nadalje, radi usporedbe utjecaja otapala na ispitivani farmaceutik napravljene su analize čistog piperina i piperina rekristaliziranog nakon otapanja u etanolu i DES-u, korištenjem tri različite analitičke metode (FTIR, DSC i XRD). Na slici 4.2.2., na sva tri uspoređena FTIR spektra jasno se vidi da su prisutni karakteristični pikovi piperina koji se slažu s literaturnim podacima [83]: alkeni – 3008.18 cm^{-1} , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ – 2932.66 cm^{-1} , amini – 1630.82 cm^{-1} , ketonska grupa – 1582.55 cm^{-1} . Osim toga vidljivo je da se spektar piperina rekristaliziranog iz DES-a potpuno preklapa sa spektrom čiste supstance, dok spektar piperina rekristaliziranog iz etanola pokazuje određeno odstupanje. Takav rezultat je logičan jer etanol kao organsko otapalo duboko prodire u samu tvar koju otapa i rekristalizacijom zaostaje određeni dio otapala zarobljen unutar kristala [32]. DSC krivulje, prikazane na slici 4.2.3., uglavnom se preklapaju uz manji pomak signala piperina rekristaliziranog iz etanola u odnosu na čisti piperin. Prateći gore navedene rezultate, XRD spektri prikazani na slici 4.2.4. potvrđuju već navedene zaključke, odnosno mogu se uočiti razlike u spektrima kristala piperina iz etanola u odnosu na čisti piperin i piperin iz DES-a. Usporedbom sve tri korištene metode uočljiva je ponovljivost rezultata, odnosno može se primjetiti da niskotemperaturno eutektičko otapalo ne utječe na molekularnu strukturu piperina. Upravo ta činjenica da nakon otapanja i rekristalizacije ispitivani farmaceutik ostaje nepromjenjen, predstavlja glavnu prednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala nad organskim otapalima.

U daljnjoj istraživanju snimljeni su FTIR spektri usporedbe tri čista niskotemperaturna eutektička otapala:

- kolin-klorid – etilen glikol (1:2),
- kolin-klorid – glicerol (1:1),

- kolin-klorid – etilen glikol (1:2,5),

s istim otapalima nakon ekstrakcije iz crnog papara i dvije različite tehnike:

- magnetsko miješanje
- ultrazvučno miješanje

Osim toga snimljen je i FTIR spektar kolin klorid – etilen glikola (1:2,5) zasićenog piperinom. Dobiveni su rezultati prikazani na slikama 4.2.5. – 4.2.8.. Spektri čistih otapala te otapala nakon ekstrakcije u potpunosti se preklapaju i ne ukazuju na prisutnost piperina. Naime, signali otapala intenzivniji su i od inače vrlo izraženih i prepoznatljivih signala piperina te se može zaključiti da je FTIR neadekvatna metoda za analizu ove vrste uzoraka. Takva pojava se može objasniti jakom vodikovom vezom koju imaju niskotemperaturna eutektička otapala [38], a koju FTIR-ov spektrometar s velikom lakoćom detektira zbog čega intenzitet signala vodikove veze pokrije sve druge slabije signale.

Tijekom provedbe pokusa s ultrazvučnim miješanjem došlo je do izbacivanja papra ultrazvučnim valovima na površinu otopine i dalje po stjenkama reaktora. Uzrok tome su vrlo lagane čestice papra koje kada se stave u viskoznu kapljevину nailaze na veliki otpor i teško se miješaju, a ultrazvučni valovi dodatno potiču razdvajanje faza. Zbog lošeg miješanja ne može doći do ravnomjerne raspodjele čestica u otopini, smanjena je međufazna površina i otežano uspostavljanje ravnoteže, odnosno pada učinkovitost procesa. Pokusom je ustanovljeno da ultrazvučno miješanje nije dobra tehnika i odabrano je magnetsko miješanje za provedbu procesa ekstrakcije.

5.3. EKSTRAKCIJA ČVRSTO – KAPLJEVITO

Zastupljenost svakog industrijskog procesa dirigira njegova cijena te je iznimno važno da novi pristup donosi poboljšanja koja će utjecati na konkurentost konačnog proizvoda. Suprotno tome niskotemperaturna eutektička otapala kao jeftina i neštetna imaju idealne preduvjete da potpuno zamjene organska otapala i smanje cijenu procesa. Osim već poznatih svojstava DES-a, imperativ je bio na istraživanju mogućnosti primjene u procesima ekstrakcije, odnosno na utvrđivanju i pokušaju rješavanja problema koji se pritom javljaju.

Da bi se uspješno provela kvantitativna UV/vis analiza, prvo je sniman spektar čiste supstance i ustanovljeno je da se pik piperina nalazi na valnoj duljini od 345nm (slika 4.3.1.). Literaturni podaci približno se slažu s dobivenim podacima, naime Vinod [84]

navodi valnu duljinu piperina od 342nm. Takvo odstupanje se može pripisati drugačijem kalibriranju instrumenta, različitom dobavljaču piperina itd. Nakon definirane valne duljine za piperin eksperimentalno je određen baždarni dijagram (vidi prilog: slika 9.1.1.) pomoću kojeg su određivani maseni udjeli piperina u odabranom otapalu nakon ekstrakcije. UV/vis spektri otapala nakon provedene ekstrakcije iz svih istraživanih papri prikazani su na slikama 4.3.2., 4.3.3. i 4.3.4. Na UV/vis spektrima *P. nigruma*, *P. longuma* i *P. borbonense-a*, uočljiv je karakteristični pik piperina na 345nm. Spektri tasmanškog i rozog papra (slika 4.3.3.) imaju slab signal na toj valnoj duljini, iz razloga što signal piperina prekriva neka druga supstanca (piperina ima u maloj količini). Pik koji se izraženo vidi na spektru javanskog papra (*P. Cubeb*, slika 4.3.4.) u području od 200-400nm pripada hinokininu [85], dok je pik piperina slabog intenziteta (kao i kod rozog i tasmanškog papra).

Rezultati kvantitativne UV/vis analize uzoraka nakon ekstrakcije prikazanih na slikama 4.3.5. i 4.3.6., dokazuju da je ekstrakcija uz korištenje eutektičkih otapala učinkovita metoda separacije. Kod uzoraka prikazanih slikom 4.3.5. (*P. nigrum*, *P. longum* i *P. borbonense*) povećanjem udjela papra u otopini ($w = 1, 3, 5$ i 7%) vidi se povećanje ekstrahiranog piperina. *P. Cubeb* jedini je papar roda *piper* koji ne prati navedeni trend, njegovo ponašanje više se slaže sa spektrima «lažnih papri» kojima neka druga supstanca, povećanjem masenog udjela sve više utječe na signal i pokriva ga. U pokusima su korištene iznimno male količine uzorka iz razloga što bi otopine nakon ekstrakcije poprimile boju ispitivanog papra te ih je bilo potrebno jako razrijediti da bi se mogla provesti spektroskopska analiza. Osim toga zbog jako viskoznog otapala prevelika količina dodanog papra dovela bi u pitanje učinkovitost procesa miješanja, a samim time i eksperimentalne rezultate. Korištenjem manje količine papra uspješno su riješena oba navedena problema. Na slici 4.3.6. (*T. lanceolata* i *S. terebinthifolia*) piperin je ekstrahiran u zanemarivo malim količinama koje bi se mogle pripisati eksperimentalnoj pogrešci. Međutim, prisutan je u zanemarivo malim količinama u svim analitičkim ispitivanjima, uključujući i ekstrakciju korištenjem etanola. Činjenica da je uopće ekstrahiran je još jedna potvrda eutektičkog otapala kao dostojnog zamjenika štetnim organskim otapalima. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je uz pomoć DES moguće provesti učinkovitu ekstrakciju iz biljnog materijala (u našem slučaju iz papra).

S obzirom da su prethodni eksperimenti provedeni s usitnjenim paprima bez odvajanja korice istraženo je zapravo gdje piperina ima više, u kori ili u sredini ploda kao i utjecaj veličine čestica (sitno i krupno mljeveni papar). Schulz i suradnici u svom radu navode [86] da se kod crnog papra piperin nalazi direktno ispod korice ploda s čime se slažu dobiveni rezultati (slika 4.3.7.). Može se zaključiti da je središte papra bogatije piperinom, odnosno da je papar *ljut u svojoj srži*. Slika 4.3.8. daje usporedbu procesa ekstrakcije na sitnije i krupnije mljevenom papru te se vidi da je razlika zanemariva. Razlog tome mogli bi pronaći u činjenici da je krupno mljeveni papar ručno usitnjavan direktno prije provođenja pokusa, dok je sitniji papar kupljen u takvom obliku. Osim zaključka da nema velikog utjecaja na proces ekstrakcije, može se primjetiti da je svježije mljeveni papar minimalno bogatiji piperinom.

Spektri prikazani na slikama 4.3.2. i 4.3.5. poklapaju se s fitokemijskom analizom zrna papra, odnosno najizraženiji je signal zelenog papra, koji usko prati bijeli papar (oba vrste *P.nigruma*). Kao što je gore navedeno (slika 4.3.7.) piperina ima više u središtu zrna nego li u korici, a bijeli papar je zrno bez korice. Što znači da je zbog odstranjene ljuske veća koncentracija piperina na istu količinu papra, odnosno ako bi uračunali utjecaj ljuske i gledali čitavi plod najviše piperina ima u zelenom papru. Time, rezultati dobiveni pomoću četiri različite analitičke metode (FTIR, Raman NIR, LC-MS/MS i UV/vis), na dva sveučilišta (u Hrvatskoj i Italiji) definitivno pobijaju literaturne podatke [5] koji tvrde da piperina najviše ima u crnom papru. Umjesto toga slažu se s drugačijim literaturnim navodima [86,87] i dokazuju tvrdnju da se najveća količina piperina nalazi u zelenom papru (*P. nigrum*). Takav zaključak djelomično pogoduje ekonomičnosti procesa ekstrakcije, jer je zeleni papar jeftinije nabaviti od bijelog, ali skuplje od crnog.

¹H NMR spektri čistog otapala te otapala nakon provedene ekstrakcije piperina iz svih istraživanih vrsta papra prikazani su na slici. 4.3.9. i u prilogu 9.3.. Iako je UV/Vis metodom potvrđeno da se piperin ekstrahira, ¹H NMR spektri ne pokazuju pikove karakteristične za piperin. Kako je koncentracija ekstrahiranog piperina vrlo mala, moguće je da je ispod granice detekcije metode.

Niska koncentracija ekstrahiranog piperina u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu nakon ekstrakcije, te znatno intenzivnijih signala samog otapala razlog su nemogućnosti identifikacije piperina FTIR analizom (slika 4.3.10.).

5.4. REKRISTALIZACIJA PIPERINA

Da bi zaokružili proces ekstrakcije i dobili čisti piperin iz uzoraka papra, ispitane su različite metode izdvajanja ekstrahiranog piperina iz odabranog niskotemperaturnog eutektičkog otapala. Metodom pokušaja i pogreške nakon niza različitih pristupa, dodatak sekundarnog otapala se pokazao kao najjednostavnija i najefikasnija separacijska tehnika za izdvajanje piperina iz niskotemperaturnog eutektičkog otapala. Kao antioatapalo odabrana je voda, zbog toga što se piperin teško ili nikako ne otapa u istoj [22]. Upravo ovaj dio procesa sukladno s literaturom [29], pokazao se kao najteži i naproblematičniji. Dodatkom vode u otopinu, moglo se primjetiti da je trenutno došlo do kristalizacije piperina. Dobiveni kristali piperina snimani su svjetlosnim mikroskopom s ugrađenom digitalnom kamerom i uvećanjem od 100x. Prikazani su na slici 4.4.1., gdje se vidi da im veličina varira od deset do par stotina μm . Nakon filtracije i sušenja na sobnoj temperaturi bilo je nemoguće ukloniti vrlo sitne kristale s filter papira kako bi se potvrdila njihova struktura. Sa svrhom dobivanja većih kristala koje bi bilo lakše ukloniti s filter papira, otopine su hladene u hladnjaku ali niti ta metoda nije bila uspješna. S obzirom da je koncentracija piperina u paprima vrlo mala, mala se količina piperina može izdvojiti ekstrakcijom. Proces separacije bio bi učinkovitiji uz veći maseni omjer papra i otapala.

5.5. REGENERACIJA OTAPALA

Otapala nakon kristalizacije sadrže određenu količinu vode koju je potrebno ukloniti kako bi se moglo ponovno koristiti u ekstrakciji. Voda se jednostavno uklanja isparavanjem pod vakuumom. Na slici 4.5.1. prikazani su FTIR spektri regeneriranih otapala. Iako FTIR analiza nije pouzdana zbog nemogućnosti detekcije malih koncentracija piperina, ispiranjem s vodom došlo je do njegove kristalizacije pa se može zaključiti da je otapalo regenerirano i spremno za ponovnu upotrebu. Isparavanje je energetski nepovoljan proces, ali voda je dostupno, sigurno i jeftino otapalo a piperin vrijedna komponenta tako da je proces isplativ.

6. ZAKLJUČCI:

U ovom je radu istražena mogućnost ekstrakcije piperina iz devet komercijalno dostupnih papri pomoću niskotemperaturnih eutektičkih smjesa. Na temelju provedene fitokemijske analize svježih uzoraka papri definirani su sastavi uzoraka koji su zatim podijeljeni u tri skupine. Iz vibracionih spektroskopskih analiza može se zaključiti da svi ispitivani papri sadrže određenu količinu piperina a najveća mu je koncentracija u zelenom papru (*P. nigrum*), a. Također, da je *P. borbonense*, za koji ne postoje prijašnja istraživanja, po strukturnoj analizi kombinacija dva najpoznatija papra: *P. nigrum* i *P. longum*. Zanimljivo je da se javanski papar (*P. Cubeb*), značajno razlikuje od roda *piper* kojem pripada. LC – MS/MS analiza ekstrahiranih supstanci pokazuje određena odstupanja od vibracionih spektroskopija. Tako piperina ima malo više u bijelom nego li u zelenom papru (*P. nigrum*), ne prepoznaju se sličnosti javanskog (*P. cubebu*) s ostalim paprima iz roda *piper*, i ne vidi se supstanca zajednička svim ispitivanim paprima (*p – Cymen*). Za *S. terebinthifoliju* i *T. lanceolatu* otapalo nije pogodno te ne možemo sa sigurnošću ustvrditi koja je glavna supstanca. Navedeni zaključci sumirani su i potvrđeni analizom glavnih komponenata.

Kao selektivno otapalo za ekstrakciju piperina iz papri odabran je u kolin klorid – etilen glikolu (1:2,5). Naime, topljivosti piperina najveća je u tom otapalu te ne dolazi do strukturnih promjena piperina što je dokazano FTIR, DSC i XRD analizama.

UV/vis spektroskopija pokazala se kao pouzdana metoda za mjerenje koncentracije piperina u odabranom otapalu. Porastom mase usitnjenog papra u suspenziji s kolin klorid – etilen glikolom (1:2,5) raste koncentracija ekstrahiranog piperina. Također, ustanovljeno je da se piperin u značajnoj količini nalazi u unutrašnjem dijelu zrna kao i da veličina čestica ne utječe bitno na proces ekstrakcije.

Piperin je izdvojen iz ekstraktne faze kristalizacijom uz dodatak vode kao antiotapala te filtracijom. Voda je nakon toga uklonjena iz smjese sa selektivnim otapalom, isparavanjem pod vakuumom. Tako regenerirano niskotemperaturno eutektično otapalo može se ponovno koristiti u procesu s jednakom učinkovitošću.

7. POPIS SIMBOLA:

λ – valna duljina

ϑ – kut difrakcije

T - temperatura

w – maseni udio

ChCl – kolin klorid

DES – Niskotemperaturno eutektičko otapalo (Deep eutectic solvent)

DSC – Diferencijalna pretražna kalorimetrija (Differential scanning calorimetry)

Eg – etilen glikol

EMZ – Elektromagnetno zračenje

FTIR – Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (Fourier – transform infrared)

LC - MS/MS – Tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenim spektrometrom (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry)

NMR – Nuklearna magnetska rezonancija (Nuclear magnetic resonance)

NIR – Blisko – infracrveno područje (Near – infrared)

PCA – Analiza glavnih komponentata (Principal component analysis)

SLE – Ekstrakcija čvrsto – kapljevito (Solvent liquid extraction)

UHPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)

XRD – Rendgenska difrakcijska analiza praha (X – ray powder diffraction analysis)

8. LITERATURA:

1. Sessa Iyengar, T.R., *Dravidian India*, Asian Educational Services, New Delhi, Chennai, 1982., str.137
2. Fitzgerald, S., *Ramses II, Egyptian Pharaoh, Warrior, and Builder*, Compass Point Books, Minneapolis, Minnesota, 2008., str. 88
3. Toussaint-Samat, M., *The History of Food*, Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2009. Str. 441-444.
4. Jaramillo, M. A., Manos, P. S., *Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus Piper (Piperaceae)*, American Journal of Botany **88** (2001) 706-716
5. Kolovrat M., Zajedno u rodu, a bitno različiti papir, Tehnologija **9** (2007) 177-180
6. Lichvar W. R., Fertig W., *Epiphytes and the national wetland plant list*, Phytoneuron (2011) 1-31
7. Parry J. W., *The story of spices*, Chemical Publishing Co., New York, 1953., str. 14
8. Mathers, E.P., *The Book of the Thousand Nights and One Night (Vol. 2)*, Routledge & Kegan Paul Plc, London and New York, 1986., str 96
9. Sinistrari, L.M. Summers, M., *Demoniality*, Dover Publications, New York, 1989, str. 56-57
10. Polo, M., *Milion: putovanja Marka Pola*, Marjan tisak, Split, 2004., str. 166.
11. US Pat.6,214,788, B1 (Apr. 10, 2001) Velazco M.I., Wuensche L., Deladoey P., (to Firmenich SA.)
12. Wright, C.H., *Flora Capensis (Vol. 5)*, Royal Botanic Gardens, Kew (K), 1912, str.487
13. Silva-Júnior, E. F., Aquino, P. G. V., Santos-Júnior, P. F. S., Nascimento, I. J. S., Gomes, E. A., Silva, A. L. L., Verissimo, R. C. S. S., Aquino, T. M., Araújo-Júnior, J. X., *Phytochemical compounds and pharmacological properties from Schinus molle Linnaeus and Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae)*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research **7** (2015) 389 -393
14. Faccin, A., Damé Schuch, L.F., Schiavon, D.B.A., Lambrecht Gonçalves, C., Voight Mota, F., Ferreira Lessa, L., *Use of hydroalcoholic extract of Schinus*

- terebinthifolius* Raddi in pre- and post-milking antiseptics of the teat in dairy cows, *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia **17** (2016) 90 - 97
15. Elfers, S.C., FLFO, *Element Stewardship Abstract for Schinus terebinthifolius, Brazilian Pepper-tree*, The Nature Conservancy, Arlington, Virginia, 2007.
 16. Carvalho, M.G., Melo, A.G.N., Aragão, C.F.S., Raffin, F.N., Moura, T.F.A.L., *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, **15** (2013) 158 – 169
 17. Cook, I.E., *The phytochemistry and chemotherapeutic potential of Tasmannia lanceolata (Tasmanian pepper): A review*, *Pharmacognosy Communications*, **3** (2013)
 18. Department of Primary Industries, Parks, Water and Environment, *Tasmannia lanceolata*, Tasmanian Government, 2009.
 19. Budavari, S. *The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals*, Merck, 1989.
 20. Ørsted, H.C., *Über das Piperin, ein neues Pflanzenalkaloid*, *Journal für Chemie und Physik*, **29** (1820) 80-82
 21. Material Safety Data Sheet Piperine MSDS, Sciencelab.com, Inc., 4025 Smith Rd. Houston, Texas 77396
 22. Vasavirama K., Mahesh Upender, *Piperine: A valuable alkaloid from piper species*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4** (2014) 34-38
 23. http://www.alibaba.com/product-detail/Reliable-Manufacturer-Provide-100-Natural-black_60330376541.html?spm=a2700.7724857.29.1.8CbLqE&s=p (pristup 9.studenog 2015.)
 24. Sabina E. P., Nasreen A., Vedi M., Rasool M., *Analgesic, Antipyretic and Ulcerogenic Effects of Piperine: An Active Ingredient of Pepper*, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **5** (2013) 203-206
 25. Matthews P., Derry S., Moore R.A., McQuay H.J. *Topical rubefacients for acute and chronic pain in adults*, Europe PMC Author Manuscripts, **3** (2009) CD007403
 26. US Pat. 6,365,601 B1 (Apr. 2, 2002) Gaikar V. G., Raman G., (to Council of Scientific Industrial Research, New Delhi)

27. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (pristup 17. svibnja 2016.)
28. Sander, A., *Toplinski separacijski procesi (interna skripta)*; Jedinične operacije u ekoinženjerstvu; I dio, Zagreb, 2011.
29. Gamse, T., *Extraction: Liquid – Liquid Extraction, Solid – Liquid Extraction, High Pressure Extraction*, Graz, 2009., str. 20.
30. Bart H.J., Pilz S., *Industrial Scale Natural Products Extraction*, Wiley-VCH, Germany, 2011.
31. Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. *Extraction technologies for Medical and Aromatic Plant*, Internacional centre for science and high technology, Trieste, 2008.
32. Grodowska, K., Parcewski, A., *Organic solvents in the pharmaceutical industry*, Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research **67** (2010) 3-12
33. Aniszewski, T., *Alkaloids – Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
34. 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., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*, Journal of Food Engineering **117** (2013) 426–436
35. Hrvatska enciklopedija, sv. 3: Da-Fo, Leksikografski Zavod "M. Krleža", Zagreb, 2001, str. 555
36. Opći hrvatski leksikon: A/Ž, Leksikografski Zavod "M. Krleža", Zagreb, 1996, str. 256
37. Matković, T., Matković, P., *Fizikalna metalurgija I (interna skripta)*, Sisak 2009. str. 80-96
38. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Hae Choi, Y., *Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development*, Leiden, 2013.
39. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed R. K., and Tambyrajah, V., *Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains*, Chem. Commun., 2001, (2010-2011.)

40. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed R. K., and Tambyrajah, V., *Novel solvent properties of choline chloride / urea mixtures*, Chem. Commun., 2002, (2003.) 70-71
41. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., *Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?*, Plant Physiology, **156** (2011) 1701-1705
42. Bogaars, R. A., *Exploring Commercial Applications of Natural Deep Eutectic Solvents* (master thesis), Delft University of Technology, Delft, 2015.
43. Fischer, V., *Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents and Low-Melting Mixtures*, (doktorska disertacija), Regensburg, 2015.
44. Handy, S., T., *Deep Eutectic Solvents in Organic Synthesis, Ionic Liquids - Current State of the Art*, InTech, 2015.
45. Leron, R., B., Li, M., H., *High-pressure volumetric properties of choline chloride – ethylene glycol based deep eutectic solvent and its mixtures with water*, Thermochimica Acta **546** (2012) 54– 60
46. EP PAT, 2,597,099 A1 (MAY, 29, 2013) A-Zahrani, S., M., AlNashef, I., M., (to Goddar, Heinz J. Boehmert & Boehmert, München)
47. Morrison, H., G., Sun, C., C., Neervannan, S., *Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles*, International Journal of Pharmaceutics, **378** (2009) 136-139
48. Chakrabarti, M., H., Mjalli, F., S., AlNashef, I., M., Hashima, M., A., Hussain, M., A., Bahadori L., Low, C., T., J., *Prospects of applying ionic liquids and deep eutectic solvents for renewable energy storage by means of redox flow batteries*, Renewable and Sustainable Energy Reviews **30** (2014) 254–270
49. Gu, C., Tu, J., *One-step fabrication of nanostructured Ni film with lotus effect from deep eutectic solvent*, Langmuir **27** (2011) 10132–10140
50. Abbott, A., P., Capper, G., McKenzie, K., J., Ryder, K., S., *Voltammetric and impedance studies of the electropolishing of type 316 stainless steel in a choline chloride based ionic liquid*, Electrochimica Acta **51** (2006) 4420–4425
Voltammetric
51. Xie, X., Zou, X., Lu, X., Lu, C., Cheng, H., Xu, Q., Zhou, Z., *Electrodeposition of Zn and Cu – Zn alloy from ZnO / CuO precursors in deep eutectic solvent*, Applied Surface Science, **385** (2016) 481–489

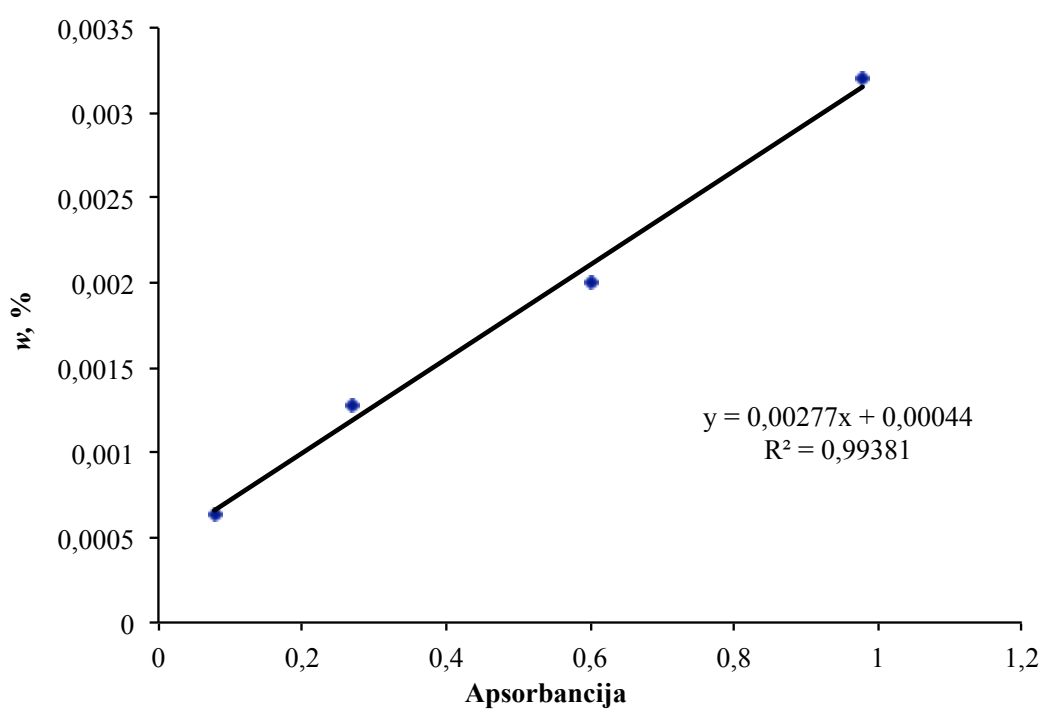
52. Yi, T., Shiraishi, K., Akiyoshi, T., Azuma, K., Watanabe, Y., Ohgai, T., Morimura, T., Nakano, M., Fukunaga, H., *Electroplated Fe-Co-Ni films prepared from deep-eutectic-solvent-based plating baths*, AIP Advances **6** (2016) 055917
53. Troter, D., Z., Todorović, Z., B., Đokić-Stojanović, D., R., Stamenković, O., S., Veljković, V., B., *Application of ionic liquids and deep eutectic solvents in biodiesel production: A review*, Renewable and Sustainable Energy Reviews **61** (2016) 473–500
54. Liao, J., H., Wu P., C., Bai, Y., H., *Eutectic mixture of choline chloride/urea as a green solvent in synthesis of a coordination polymer: $[Zn(O_3PCH_2CO_2)] \cdot NH_4$* , Inorganic Chemistry Communications **8** (2005) 390–392
55. Wang, Q., Yao, W., Geng, Y., Zhou, Q., Lu, X., Zhang, S., *Deep eutectic solvents as highly active catalysts for the fast and mild glycolysis of poly(ethylene terephthalate)(PET)*, Green Chemistry, **17** (2015) 2473–2479
56. Ali, E., Hadj-Kali, M., K., Mulyono, S., Alnashef, I., *Analysis of operating conditions for CO₂ capturing process using deep eutectic solvents*, International Journal of Greenhouse Gas Control **47** (2016) 342–350
57. Zhang, L., S., Gao, S., P., Huang, Y., P., Liu, Z., S., *Green synthesis of polymer monoliths incorporated with carbon nanotubes in room temperature ionic liquid and deep eutectic solvents*, Talanta, **154** (2016) 335–340
58. Yang, S., L., Duan, Z., Q., *Insight into enzymatic synthesis of phosphatidylserine in deep eutectic solvents*, Catalysis Communications **82** (2016) 16–19
59. Shahabi, D., Tavakol, H., *One-pot synthesis of quinoline derivatives using choline chloride/tin (II) chloride deep eutectic solvent as a green catalyst*, Journal of Molecular Liquids **220** (2016) 324–328
60. Glasnović, A., *Katalog opreme*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišna tiskara d.o.o., Zagreb, 2007.
61. Farrukh, M. A., *Advanced Aspects of Spectroscopy*, InTech, Vienna, 2012.
62. Horvat, A., J., M., Margeta, K., *Instrumentalna analiza (interna skripta)*, Zagreb, 2009., str. 23–24
63. <https://pr.vwr.com/store/product/4832209/lambda-25-35-series-uv-vis-spectrophotometers-perkinelmer> (pristup 12. kolovoza 2016.)

64. Smith, E., Dent, G., *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2005.
65. Particle Sciences, *Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Development*, Technical Brief, **7** (2011) 1-2
66. Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 2004.
67. Popović, Z., *Infracrvena spektroskopija (interna skripta)*, Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb 1999.
68. Desnica, V., *Instrumentalna analiza (interna skripta)*, Akademija likovnih umjetnosti, Zagreb, 2012.
69. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., Publication, Ohio, 2000.
70. Atkins, P., De Paul J., *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2006.
71. Li, Z., Deen, M.J., Kumar, S., Selvaganapathy, P.R., *Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring — Instrumentation and Potential*, *Sensors* **14** (2014) 17275-17303
72. Silverstein, R., M., Webster, F., X., Kiemle, D., J., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., United States of America, 2005.
73. https://sestar.irb.hr/instrumenti_show.php?ID=25&page=0 (pristup 26. Kolovoza 2016.)
74. Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V., *Analitičke metode u forenzici hrane*, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8** (2013) 90-101
75. *Agilent 1290 Infinity LC System - System Manual and Quick Reference*, Agilent Technologies, Inc., Germany, 2012
76. *Agilent 6540 and 6538 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS Systems Exceptional MS and MS/MS performance without compromises*, Agilent Technologies, Inc. U.S.A, 2009
77. Parmar, V., S., Bisht, K., S., Jain, R., Teneja, P., Jha, A., Tygi, O., D., Prasad, A., K., Wengel, J., Olsen, C., E., Boll, M., *Phytochemistry of the genus piper*, *Phytochemistry*, Elsevier Science, **46** (1997) 597 – 673

-
78. Jolliffe, I., T., *Principal Component Analysis, Second Edition*, Springer, Aberdeen, UK , 2002.
 79. Smith, L., I., *A tutorial on Principal Components Analysis Introduction*, 2002.
 80. Kvaternik, K., K., Huzak, M., *Primjenjena statistika (interna skripta PMF)*, Zagreb, 2015.
 81. Schulz, H., Baranska, M., *Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy*, *Vibrational Spectroscopy* 43 (2007) 13–25
 82. Shahbaz, K., Mjalli, F., S., Hashim, M., A., ALNashef, I., M., *Using Deep Eutectic Solvents for the Removal of Glycerol from Palm Oil-Based Biodiesel*, *Journal of Applied Sciences*, **10** (2010) 3349 – 3354
 83. Vinod, K., R., Santhosha, D., Anbazhagan, S., *Formulation and evaluation of piperina cream-a new herbal dimensional approach for vitiligo patients*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2011) 975 – 1491
 84. Vinod, K., R., *Formulation and Evaluation of Piperine Incorporated Topical Preparations Intended for Vitiligo*, Acharya Nagarjuna University, India, 2012, str. 108
 85. Haribabu, K., Ajitha, M., Mallavadhani, U., V., *Quantitative estimation of (-)-hinokinin, a trypanosomicidal marker in Piper cubeba, and some of its commercial formulations using HPLC-PDA*, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **5** (2015) 130 – 136
 86. Schulz, H., Baranska, M., Quilitzsch, R., Schütze, W., Lösing, G., *Characterization of Peppercorn, Pepper Oil, and Pepper Oleoresin by Vibrational Spectroscopy Methods*, *Journal of agricultural and food chemistry* **53** (2005) 3358 - 3363
 87. Friedman, M., Levin, C., E., Lee., S., U., Lee., J., S., Ohnisi-Kameyama, M., Kozukue, N., *Analysis by HPLC and LC/MS of Pungent Piperamides in Commercial Black, White, Green, and Red Whole and Ground Peppercorns*, *Journal of agricultural and food chemistry* **56** (2008) 3028–3036

9. PRILOZI:

9.1. BAŽDARNI DIAGRAM



Slika 9.1.1. Baždarni diagram za kvantitativnu UV/vis analizu ekstrakcije piperina iz papra pomoću eutektičkog otapala

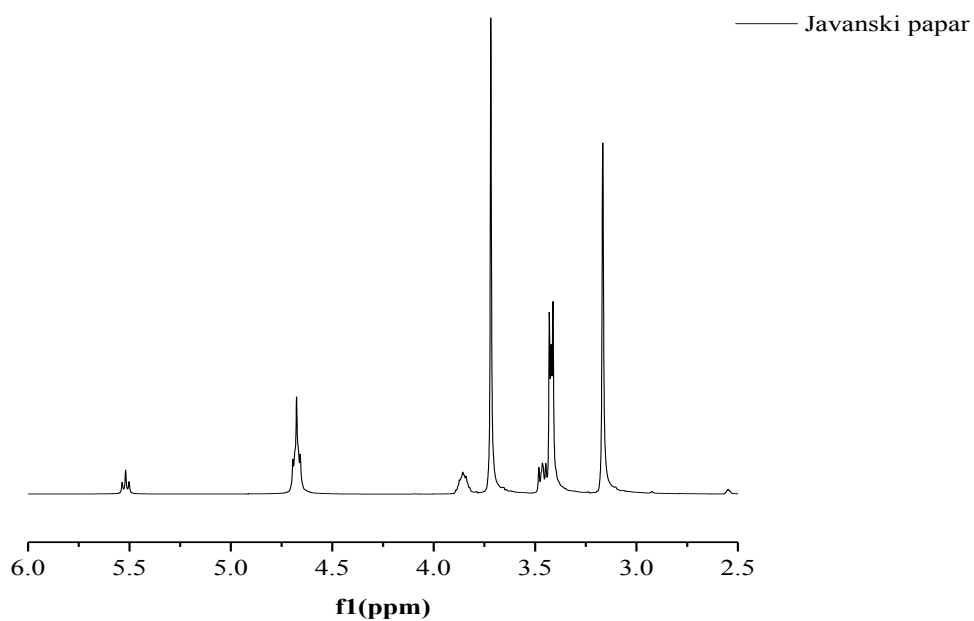
9.2. LITERATURNI PODACI SUPSTANCI KOJE SU ZAJEDNIČKE ISPITIVANIM PAPERIMA

Tablica 9.2.1. Literaturni podaci za *P.nigrum*, *P.longum*, *P.cubeb*, *T.lanceolata* i
S.terebinthifolia [13,16,17,77]

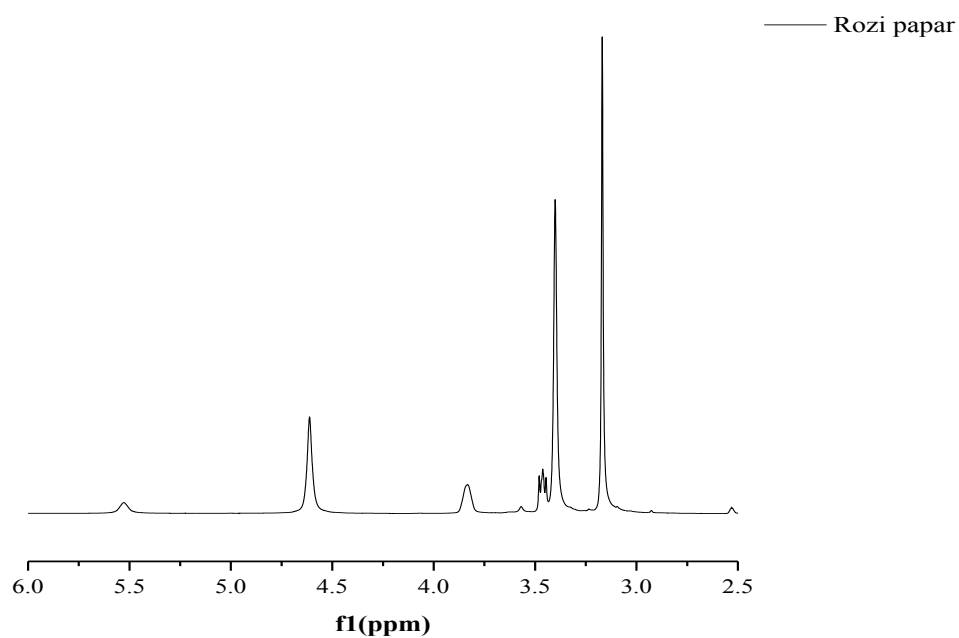
	Piper nigrum CRNI, BIJELE, CRVENI, ZELENI	Piper longum BENGALSKI JAVANSKI	Piper cubeb TASMANSKI	Tasmania lanceolata ROZI	Schinus terebinthifolia
Piperine	+	+	+		
Guineensine	+	+			
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	+	+			
(2E,4E)-N-Isobutyleicosadienamide	+	+			
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	+	+			
(2E,4E)-N-Isobutyloctadienamide	+	+			
(2E,8E)-N-9-(3,4-Methylenedioxyphenyl)nonadienoylpiperidine	+	+			
Pipericide	+	+			
Retrofractamide A	+	+			
p-Cymene	+	+	+	+	+
Dihydrocarveol	+	+			
Terpinolene	+	+		+	
α-Thujene	+	+	+		
Sitosterol	+	+			
(-) - Cubebin	+		+		
Sesamin		+	+		
(-) – Piperenone	+		+		
α - Copaene	+		+	+	
α –Cubebene	+		+	+	+

Limonene	+	+	+	+
(-)-Muurolene	+	+		
Myrcene	+	+	+	
β-Ocimene	+	+		
α-Phellandrene	+	+		+
β-Phellandrene	+	+	+	+
α-Pinene	+	+	+	+
β-Pinene	+	+	+	+
Sabinene	+	+	+	+
α-Terpinene	+	+		+
γ-Terpinene	+	+	+	+
α-Terpineol	+	+	+	
Myristicine	+		+	
Safrole	+		+	
Caffeic acid	+		+	
Eugenol	+		+	
p-Coumaric acid	+		+	+
Linalool	+		+	
Calamenene	+		+	
Camphene	+		+	+
Germacrene D			+	
Guaiol	+		+	
Linoleic acid	+		+	
Eugenol methyl ether	+		+	
gallic acid	+		+	+
chlorogenic acid			+	+
Isocaryophyllene				+
α-Cadinol	+			+
spathulenol	+		+	+

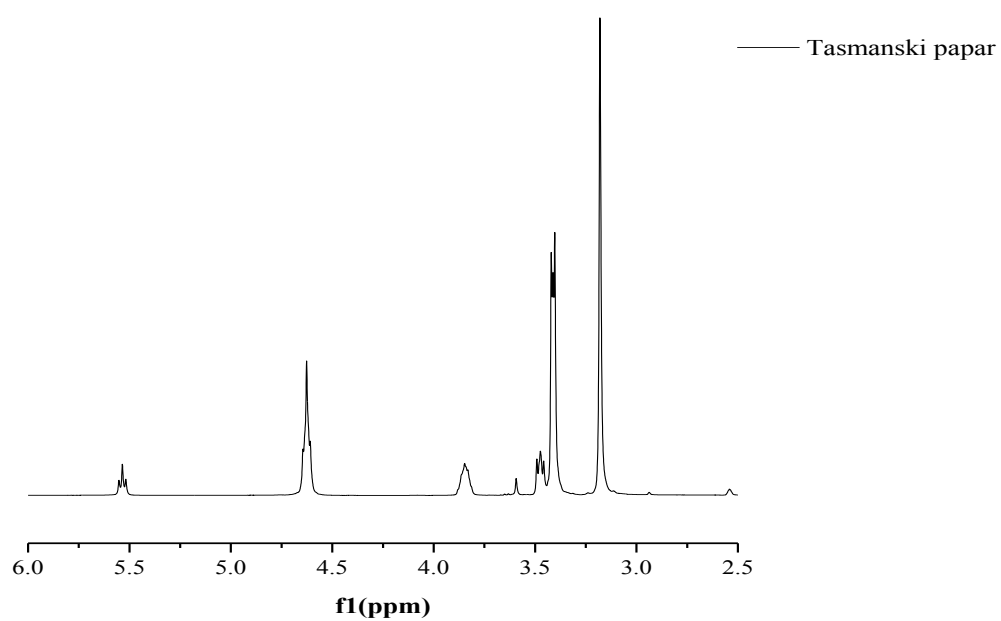
9.3. ^1H NMR GRAFOVI



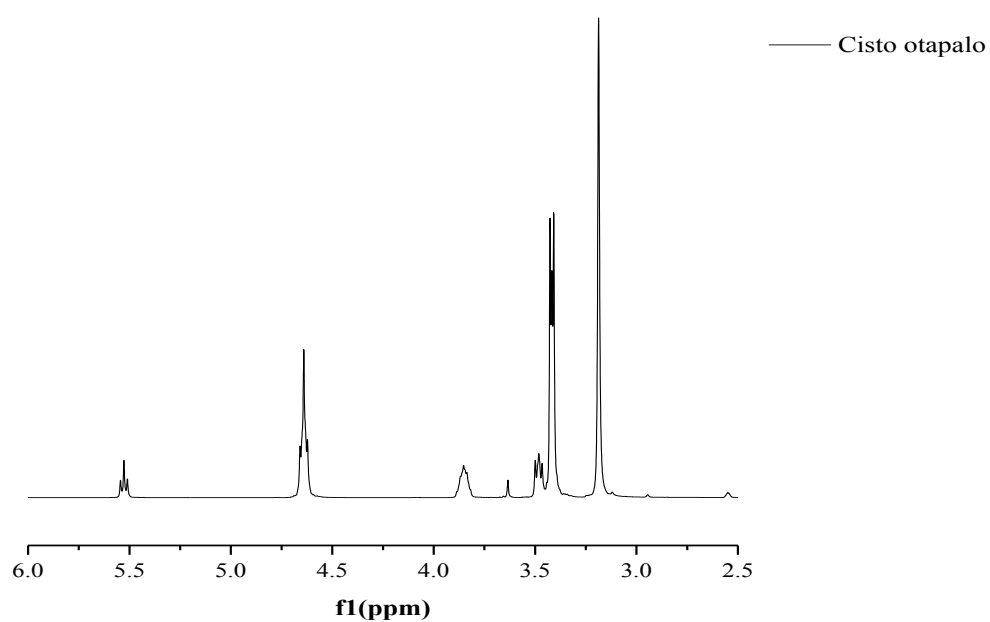
Slika 9.3.1. ^1H NMR spektar otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) nakon ekstrakcije iz javanskog papra (*P. Cubeb*)



Slika 9.3.2. ^1H NMR spektar otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) nakon ekstrakcije iz rozog papara (*S. terebinthifolia*)



Slika 9.3.3. ^1H NMR spektar otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5)) nakon ekstrakcije iz tasmanskog papra (*T. lanceolata*)



Slika 9.3.4. ^1H NMR spektar otapala (kolin klorid – etilen glikol (1:2,5))

ŽIVOTOPIS:

Osobni podaci:

Ime i prezime: Margarita Bužančić

Datum i mjesto rođenja: 01.09.1992, Zagreb, RH

Adresa: Dominisova 22, 21 000 Split

E – mail: buzancic.margarita@gmail.com

Telefon: 021/ 344 - 854

Mobitel: 091/ 7687 027

Obrazovanje:

- 2016. – završava Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (diplomski studij)
- 18. - 19. veljače 2016. – pod vodstvom dr. sc. A. Sander, red. prof. sudjeluje na Susretu mladih kemičara i kemijskih inženjera u Zagrebu
- 20. listopada 2015. – s kolegicama dobiva **Dekanovu nagradu** za studentski znanstveni rad: *Konusni sušionik s fluidiziranim slojem: kinetika i scale – up*, M. Bužančić, A. Klobučić, A. Petračić, pod mentorstvom dr. sc. A. Sander, red. prof.
- 21. - 24. travnja 2015. – zajedno sa kolegama i pod vodstvom mentorice dr. sc. A. Sander, red. prof. sudjeluje na 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera, u Zagrebu s radom: *Uvećanje sušionika s fluidiziranim slojem konusne geometrije*, A. Sander, M. Bužančić, A. Klobučić, A. Petračić, T. Penović te dobiva **nagradu za najbolji poster**
- 14. srpnja 2014. – obranila završni rad: *Selektivna katalitička oksidacija glicerola do tartronske kiseline* pod mentorstvom dr. sc. Stanke Zrnčević, red. prof. na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, s odličnim uspjehom
- 2011. – maturirala u Nadbiskupijskoj klasičnoj gimnaziji «Don Frane Bulić» u Splitu, s vrlo dobrim uspjehom
- 2007. – završila OŠ «Dobri» u Splitu, s odličnim uspjehom