

# Ocjena metoda ekstrakcije piperina iz različitih vrsta papra

---

**Belošević, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:659984>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Belošević

## **DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, prosinac 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Katarina Belošević

**DIPLOMSKI RAD**

**Ocjena metoda ekstrakcije piperina iz različitih vrsta papra**

Mentor:

prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Zagreb, prosinac 2023.

*Svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander, zahvaljujem na pruženoj prilici za ovaj rad, na znanju koje mi je prenijela, na svim savjetima, te prijateljskoj atmosferi i velikom strpljenju i toleranciji prilikom izrade rada, čak i kad se stvari nisu odvijale po planu.*

*Zahvaljujem i prof. dr. sc. Danijeli Ašperger, na pruženoj pomoći tijekom izrade rada, strpljenju prilikom ponavljanja istih eksperimenata i entuzijazmu s kojim mi je pristupala.*

*Zahvaljujem asistenticama Bruni Babić Visković, mag. ing. oecoiing., na velikoj pomoći i mnogobrojnim HPLC analizama, kao i na tome što me naučila nekim novim tehnikama rada, te dr. sc. Ani Petračić, na pomoći prilikom eksperimenata i veseloj radnoj atmosferi.*

*No najveća zahvala ide mojim roditeljima, ostatku obitelji, starim i novim prijateljima te Grgi – bez vaše podrške u najrazličitijim oblicima u svim mojim avanturama, bez vaše brige i ljubavi – doista ne bi bilo ni ove titule.*

## SAŽETAK

Ekstrakcija je jedan od dobro znanih separacijskih procesa, a od njezinih začetaka kada je predstavljala samo jednostavno miješanja uzorka i otapala proces je do danas znatno napredovao. Težilo se pronaći metodu koja je ekonomična, ne dugotrajna, a učinkovita, stoga su razvijene brojne metode ekstrakcije. Jedna od primjena je ekstrakcija iz biljnog materijala koji u sebi sadrži vrijedne sastojke, a primjer takvog ekstrakta je piperin dobiven iz papra. U ovom radu provedene su četiri metode ekstrakcije (ekstrakcija otapalom, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) na četirima paprima (crni, bijeli, zeleni i voatsiperifery papir) korištenjem etanola kao otapala. Ekstrakcije su se izvodile pri različitim temperaturama i korištenjem različitih veličina čestica papra. Cilj rada bio je usporediti metode po svom djelovanju na proces, odnosno utvrditi utjecaj temperature i veličine čestica na učinkovitost ekstrakcije.

Soxhlet ekstrakcijom i UV/Vis spektroskopijom utvrđeno je da najviše piperina ima u zelenom, a najmanje u voatsiperifery papru. Rezultati su pokazali da procesu ekstrakcije pogoduje povišenje temperature i smanjenje veličine čestica. Najučinkovitijom metodom pokazala se ekstrakcija otapalom na magnetskoj miješalici.

**Ključne riječi:** ekstrakcija, papir, piperin, temperatura ekstrakcije, veličina čestica papra

## ABSTRACT

### *Evaluation of methods for extraction of piperine from different types of pepper*

Extraction is one of well-known separation processes, which has developed profoundly from its starts when it presented just a simple mixing of a sample and a solvent. The aim of scientists was to find extraction method that is economical, short-lasting, and efficient, so a numerous methods have been invented. One of application of the process is extraction of plant material which consists of valuable ingredients, such as is piperine obtained from pepper. In this paper four extraction methods have been conducted (solvent extraction, Soxhlet extraction, ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction) using four different types of pepper (black, white, green and voatsiperifery pepper) and ethanol as solvent. Extractions were executed under different temperatures and using different peppercorn particle size. The goal of the paper was to compare the methods by their effect on the process, and determine the impact of temperature and particle size on extraction.

By using UV spectroscopy results of Soxhlet extraction, it was determined that content of piperine is the highest in green pepper, and the lowest in voatsiperifery pepper. Results have shown that the rise of temperature and decrease of particle size enhance the efficiency of extraction. The most efficient extraction is solvent extraction performed by using magnetic stirrer.

**Key words:** extraction, pepper, piperine, temperature of extraction, peppercorn particle size

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Papar .....	2
2.2. Piperin.....	3
2.3. Ekstrakcija.....	4
2.3.1. Ekstrakcija otapalom.....	5
2.3.2. Soxhlet ekstrakcija .....	6
2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	7
2.3.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	10
2.3.5. Utjecaj otapala u ekstrakciji piperina.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. Cilj rada.....	18
3.2. Materijali.....	18
3.3. Provedba eksperimenta .....	19
3.3.1. Ekstrakcija otapalom na magnetskoj miješalici.....	19
3.3.2. Soxhlet ekstrakcija .....	20
3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	20
3.3.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	21
3.4. Analiza ekstrakta.....	22
3.4.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti .....	22
3.4.2. UV/Vis spektroskopija.....	23
3.4.3. FTIR spektroskopija.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Prinos piperina .....	24
4.2. UV/Vis spektri uzoraka.....	26
4.3. Učinkovitost ekstrakcija.....	27
4.4. FTIR spektri uzoraka .....	34
5. ZAKLJUČAK .....	38
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	39
7. LITERATURA .....	40
8. PRILOZI .....	43
ŽIVOTOPIS.....	47

## 1. UVOD

Ekstrakcija je jedan od dugo znanih separacijskih procesa, a koristi se za odvajanje jedne ili više komponenta iz neke smjese pomoću selektivnog otapala. To otapalo utječe na proces, a osim selektivnosti moralo bi ispunjavati niz uvjeta: imati malu viskoznost i niski tlak para, biti jeftino, sigurno za rad itd. Na proces utječu i drugi čimbenici poput vremena trajanja i temperature ekstrakcije te veličina čestica tvari iz koje se ekstrahira željena komponenta. Na početku (primarna) ekstrakcija bila je samo miješanje neke tvari i otapala (danas se taj postupak naziva maceracija), a napretkom znanosti i tehnologije razvijene su brojne metode ekstrakcije, od poboljšanja poput vrlo brzog miješanja sustava (npr. turboekstrakcija), preko upotrebe ultrazvuka i mikrovalova do upotrebe visokoučinkovitih otapala (npr. superkritični CO<sub>2</sub>). Procesi ekstrakcije kontinuirano se poboljšavaju s ciljem skraćivanja vremena trajanja procesa i ekonomične upotrebe energije.

Jedan od važnijih produkata ekstrakcije su biljni ekstrakti, koji se koriste kao dodaci prehrani, u aromaterapiji i sl. Papar, odnosno njegov glavni spoj piperin je primjer takvog biljnog ekstrakta, koji je cijenjen zbog svojih antikancerogenih, antibakterijskih, protuupalnih svojstva i dr., a otkriveno je i da povećava bioraspoloživost lijekova u organizmu. Važno je stoga pronaći najbolju metodu ekstrakcije piperina iz papra, koja bi davala najveći mogući prinos piperina, a ujedno i bila ekonomična.

Cilj ovog rada bio je usporediti četiri različite metode ekstrakcije piperina iz četiriju različitih vrsta papra, te ocijeniti utjecaj veličine čestica i temperature procesa na učinkovitost ekstrakcije. Određena je i količina piperina u svakom papru. U konačnici je zaključeno koja je od korištenih metoda ekstrakcije najbolja za ekstrakciju piperina iz papra.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Papar

Papar je biljka iz porodice paparovki (lat. *Piperaceae*) koja se sastoji od pet rodova čiji je najvažniji rod papar (lat. *Piper*). To je velik rod i uključuje 2405 vrsta od kojih su najpoznatije crni papar (*Piper nigrum*), dugi papar (*Piper longum*), pepeljasti papar (*Piper guineense*), kubeba papar (*Piper cubeba*), voatsiperifery papar (*Piper borbonense*), betelov papar (*Piper betle*) i dr. [1]. Ova biljka raste u vlažnoj tropskoj klimi, stoga su njezini najveći proizvođači Indija, Indonezija, Vijetnam, Šri Lanka i Brazil. U tim državama u antička vremena, ali i dan-danas, papar se koristio u medicinske svrhe budući da ima razna pozitivna svojstva, poput antibakterijskih, antioksidativnih, antitumorskih, protuupalnih itd. Zbog svoje je vrijednosti i donesen iz Azije u Europu [2, 3].

Papar je višegodišnja biljka koja raste u gustim grmovima koji se penju oko neke podloge (stabla u prirodi, odnosno stupa na plantažama, kako je to prikazano na slici 1). Plod papra je klas bobica promjera oko 5 mm (slika 1), a one su jedan od najkorištenijih začina u kuhinji [2].



**Slika 1.** Plantaža i plod papra [4].

Ovisno o vremenu branja i naknadnoj obradi bobica razlikujemo zeleni, crni i bijeli papar. Zeleni papar se dobiva branjem nezrelih zelenih bobica, čija se fermentacija sprečava brzim sušenjem zrakom, a time se sačuva i zelena boja. Njegov je okus blaži. Crni papar se također dobiva branjem zelenih bobica, no one se potom suše na suncu dok ne fermentiraju, odnosno poprime crnu boju. Takav je papar najjačeg okusa. Bijeli papar se dobiva branjem zrelih, crvenih bobica, koje se namaču u vodi nekoliko dana dok se od bobice ne odvoji ljuska, čime

se uklanja i dio okusa. Bobice se potom suše dok ne poprime bijelu boju. Postoji i crveni papar, dakle zrela bobica *Piper nigrum*, no on je skup, stoga se u poznatoj mješavini papra za kućanstvo (prikazanoj na slici 2) on zamjenjuje s tzv. rozim paprom (*Schinus terebinthifolius*) koji zapravo ne spada u taj rod [2, 5].

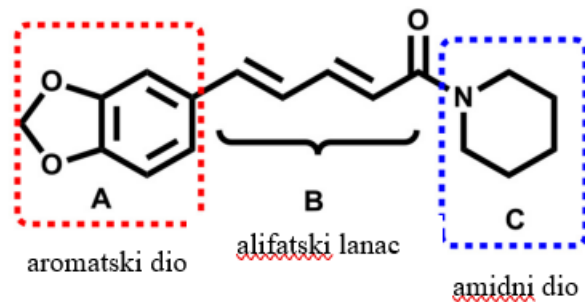
Za „papreni okus“, tj. ljutinu najzaslužniji je spoj piperin, koji spada u alkaloide. Osim njega, u papru se nalaze i drugi alkaloidi: piperetin, piperanin, piperilin A, piperolein B i pipericin koji također doprinose ljutini. U papru se nalaze i hlapivi organski spojevi koji čine aromu papra, a pronađeno ih je više od 80, primjerice kamfen, p-cimen, limonen, kamfor i sl. Osim bobica papra koje se prodaju kao začim u zrnu, prahu ili salamuri, od papra se radi i prodaje oleorezina papra (kapljevina dobivena ekstrakcijom koja također služi kao začim), piperin (dobiven ekstrakcijom, formuliran u obliku praha, tablete ili kapsule, kao dodatak prehrani) i ulje papra (kapljevina dobivena parnom destilacijom i koristi se kao eterično ulje u aromaterapiji) (slika 2) [6].



**Slika 2.** Proizvodi dobiveni od papra: mješavina papra u zrnu [7], oleorezina papra [8], piperin u tabletama [9], ulje papra [10].

## 2.2. Piperin

Piperin je najvažniji spoj u papru, alkaloid kemijske formule  $C_{17}H_{19}NO_3$  (slika 3) i molekulske mase 285,34 g/mol. Iz crnog papra 1819. izolirao ga je Hans Christian Ørsted, danski fizičar i kemičar poznatiji po otkriću elektromagnetizma. Ekstrakcijom je dobio žućkastu kristalnu tvar, blago bazičnu, tališta 128 - 130 °C. Piperin je vrlo topljiv u kloroformu (580 g/L na 18 °C), nešto manje topljiv u etanolu (60 g/L na 18 °C) i dietileteru (27 g/L na 18 °C), a vrlo slabo topljiv u vodi (0,04 g/L na 18 °C) [11].



Slika 3. Molekula piperina [12].

Udio piperina u paprima je različit, uglavnom se kreće između 2 % i 7 %. To ovisi o već spomenutom vremenu branja i obradi bobica, no može ovisiti i o klimatskim uvjetima u kojima je papar rastao (zemlji podrijetla). Osim u papru, piperin se može naći i u drugim biljnim vrstama: lišću *Rhododendrona faurie*, korijenju đumbira i cvijeta *Vicoa indica*, kori drveta *Careya arborea* i sjemenju kopra [11, 12].

Piperin se još od antičkih vremena koristi u tradicionalnoj kineskoj i indijskoj medicini radi svojih brojnih pozitivnih svojstava: ima antikancerogena, antimutagena, antibakterijska, antidepresivna, antialergijska, antioksidativna i protuupalna svojstva, ublažava reumatoidni artritis i groznicu, poboljšava cirkulaciju krvi, potiče apetit, djeluje kao analgetik, antipiretik i insekticid. Povećava bioraspoloživost lijekova u organizmu na način da svojim lipofilnim djelovanjem povećava propusnost stanične membrane i time apsorpciju lijeka, a također i inhibira enzime koji bi razgradili, odnosno inaktivirali lijek. Unutar organizma reagira sa slobodnim radikalima i time sprečava štetne promjene na stanicama [12].

### 2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz neke smjese (kapljevite ili čvrste) pomoću selektivnog otapala, u kojem željena komponenta ima veću topljivost nego u smjesi iz koje se ekstrahira. Ako je riječ o ekstrakciji kapljevina – kapljevina, primarno i sekundarno otapalo ne smiju biti mješljivi, a trebali bi imati i veliku razliku u gustoći kako bi se na kraju procesa lakše odvojili. Otapalo za ekstrakciju trebalo bi također imati malu viskoznost, niski tlak para, toplinsku i kemijsku stabilnost, moralo bi se moći jednostavno regenerirati te biti jeftino, dostupno i sigurno za rad [13].

Osim otapala, drugi čimbenici koji utječu na ovaj proces su veličina čestica krute tvari iz koje se ekstrahira ključna komponenta (ako se radi o ekstrakciji čvrsto – kapljevito), vrijeme trajanja i temperatura procesa. Općenito je za sve procese poželjna što manja veličina čestica tvari jer se time povećava aktivna površina koja omogućava bržu i bolju izmjenu tvari, no u slučaju ekstrakcije, ukoliko je veličina čestica premala, može doći do resorpcije ekstrahirane tvari. Što se tiče vremena trajanja procesa, ona je proporcionalna molekulskoj masi ekstrahirane tvari, a obrnuto proporcionalna temperaturi procesa, no također ovisi i o načinu provedbe ekstrakcije – trajanje ekstrakcije bit će dulje ukoliko se radi samo o djelovanju otapala, koje nije potpomognuto primjerice ultrazvukom ili mikrovalovima. Što se tiče temperature, za ekstrakciju je povoljnija viša temperatura jer ona uzrokuje veću mobilnost molekula i otapala i ekstrahirane tvari, no potrebno je imati na umu da su neke tvari osjetljive na povišene temperature pa se u takvim uvjetima mogu i (djelomično) razgraditi [14].

Za laboratorijske i industrijske potrebe ekstrakcija se koristi umjesto destilacije onda kad je željena komponenta niske hlapivosti ili je toplinski osjetljiva, ili je pak u vrlo maloj količini prisutna u smjesi. Ekstrakcija se tada (na industrijskom mjerilu) provodi miješalicom, centrifugalnim ili kolonskim ekstraktorom. Na laboratorijskom mjerilu većinom se radi maceracija (djelovanje samo otapala na sobnoj temperaturi), digestija (djelovanje samo otapala na povišenoj temperaturi), perkolacija (maceracija u perkolatoru) i Soxhlet ekstrakcija, no prisutne su i turboekstrakcija (vrlo brzo miješanje smjese čime se pospješuje proces), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim CO<sub>2</sub> i dr. Proces ekstrakcije pokušava se poboljšati s ciljem skraćivanja vremena trajanja procesa, ekonomične upotrebe energije, te dobivanja veće količine čisteg ekstrakta [13, 14].

### **2.3.1. Ekstrakcija otapalom**

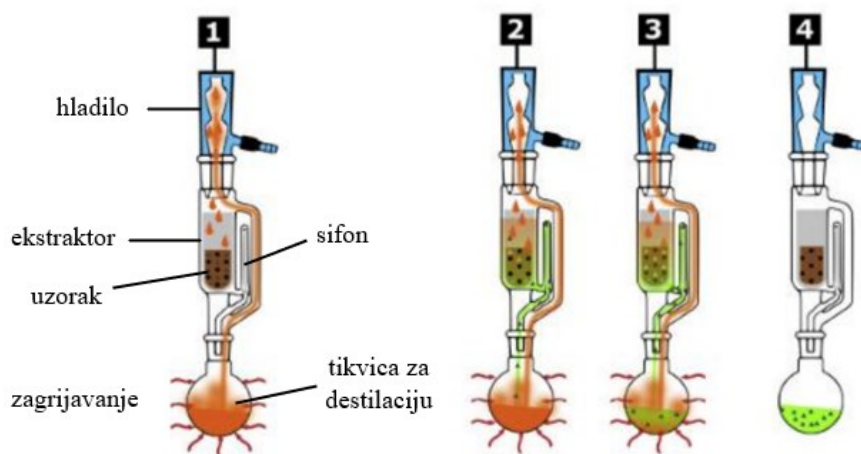
Ekstrakcija otapalom je konvencionalna metoda ekstrakcije čvrsto – kapljevito, u kojoj se ekstrakcija događa djelovanjem samo otapala, odnosno i dodane topline. Već je spomenuto da se ekstrakcija otapalom naziva maceracija ako se odvija na sobnoj temperaturi. Budući da je takav proces dugotrajan, u većini slučajeva ekstrakcija se odvija tako da se sustav zagrijava. Ta dovedena toplina ubrzava gibanje molekula otapala zbog čega one brže prodiru u stanicu krutog uzorka, a to se naziva termalni efekt. Sustav se istodobno i miješa (bez obzira na to

dodaje li mu se toplina ili ne), najčešće na magnetskoj miješalici, kako bi cijela površina uzorka bila u stalnom kontaktu s otapalom [15].

Ovakva ekstrakcija piperina iz papra je dugotrajna i neekonomična jer troši puno energije, stoga su u većini znanstvenih radova korištene nekonvencionalne metode ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili mikrovalovima, a ekstrakcija samo otapalom služi kao referenca da bi se vidjelo koliko se proces ekstrahiranja pospješio upotrebom drugih metoda [15, 16].

### 2.3.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je također konvencionalna metoda ekstrakcije čvrsto – kapljevito, a prvi je put učinjena krajem 19. stoljeća. Odvija se na povišenoj temperaturi, tj. temperaturi vrenja upotrijebljenog otapala, u posebnoj aparaturi prikazanoj na slici 4. Proces se odvija na način da se otapalo zagrijava u tikvici za destilaciju, njegove pare dospijevaju u hladilo gdje se kondenziraju i kapaju u središnji dio, ekstraktor s uzorkom. Dolazi do ekstrakcije, a novostvorena otopina ekstrahirane tvari skuplja se na dnu ekstraktora i u sifonu. Kad dosegne točku prelijevanja, sadržaj cijelog sifona izlije se u tikvicu. Pare otapala ponovno se kondenziraju i svježi kondenzat natapa uzorak. Postupak se ponavlja dok god novostvorena otopina u ekstraktoru ne bude toliko blijede boje da možemo zaključiti da se više nema što ekstrahirati [17].



**Slika 4.** Soxhlet aparatura i ekstrakcija: 1 – isparavanje otapala, kondenzacija i natapanje uzorka, 2 – stvaranje otopine ekstrahirane tvari i prelijevanje iz sifona u tikvicu za destilaciju, 3 – kontinuirano ponavljanje postupka, 4 – završetak ekstrakcije s otopinom ekstrahirane tvari u tikvici [17, 18].

Ova ekstrakcija, iako iznimno učinkovita jer izvlači svu količinu željene tvari iz uzorka, stoga se koristi kao referenca za određivanje učinkovitosti nekonvencionalnih metoda, ima velike nedostatke poput toga da je energetska nepovoljna i dugotrajna, te postoji mogućnost termalne degradacije ekstrahirane tvari jer se ekstrakcija provodi na temperaturi vrenja otapala [17].

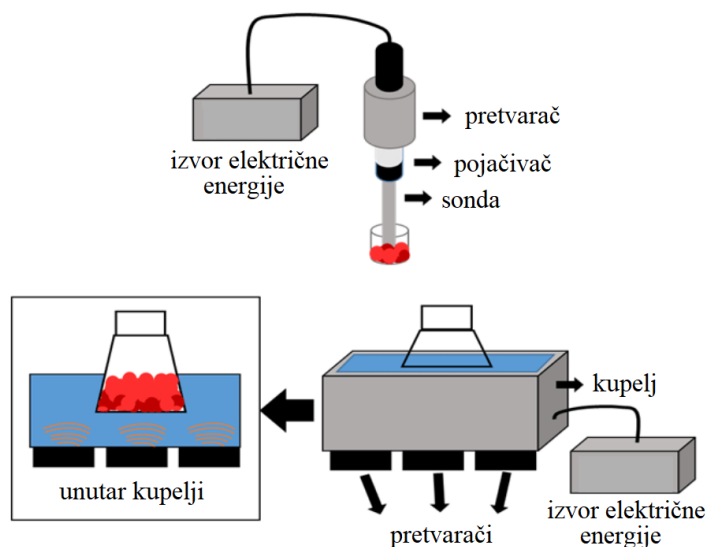
U radu Rathoda i sur. [15] Soxhlet ekstrakcija provedena je na dugom papru. 5 g papra ekstrahirano je sa 150 mL etanola tijekom 4 h, a sam proces odvijao se na 80 °C. Uzorak je analiziran tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Prinos piperina bio je 1,67 mg/g, dok je za isti papir za ekstrakciju samo etanolom u trajanju od 8 h prinos bio 0,98 mg/g [15]. U radu Gorganija i sur. [16] provedena je Soxhlet ekstrakcija 15 g crnog papra s 300 mL etanola u trajanju od 12 h na temperaturi od 70 °C. Uzorak je analiziran na HPLC-u, a rezultat je bio prinos piperina  $39,1 \pm 2,1$  mg/g [16].

### 2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk je longitudinalni mehanički val čija je frekvencija veća od 20 kHz, odnosno veća od granice osjetljivosti ljudskog uha. Osim za ekstrakciju, koristi se u medicini, za testiranje materijala (defektoskopija), pri čišćenju materijala i dr. Za potrebe znanosti i industrije proizvodi ga se korištenjem piezoelektričnog, magnetrostrikijskog, elektrostrikijskog, mehaničkog te elektrostatickog i elektrodinamičkog pretvarača [19].

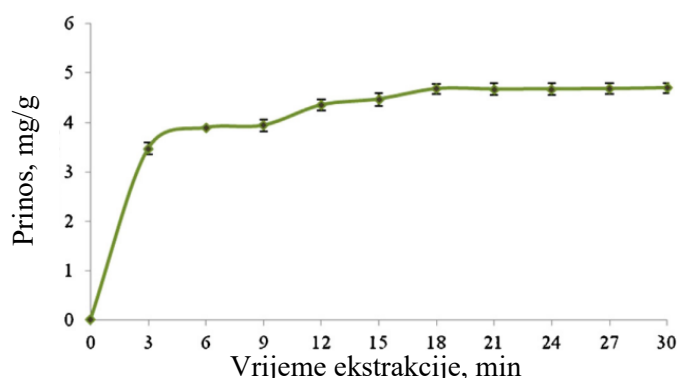
U ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom (engl. *Ultrasound – Assisted Extraction*, UAE) za sam proces međufaznog prijenosa tvari osim termalnog efekta zaslužan je i fenomen kavitacije. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz kapljevinu dolazi do stvaranja područja promjenjivih tlakova (ekspanzija i kompresija). Na mjestu gdje tlak padne ispod kritičnog, kapljevina počinje isparavati i pojavljuju se mikroskopski (kavitacijski) mjehurići koji se šire pod utjecajem negativnog tlaka (manjeg od atmosferskog), a potom implodiraju pod utjecajem pozitivnog. Prilikom implozije okolna kapljevina velikom brzinom struji prema središtu mjehurića, čestice se sudaraju i nastaju visoki udarni tlakovi. Na primjeru ekstrakcije piperina, ti tlakovi razbijaju stijenku stanica papra i omogućuju ulazak otapala u stanicu, čime se ekstrahira piperin [20].

Za ekstrakciju se koriste dva uređaja prikazana na slici 5, ultrazvučna sonda koja se uranja u smjesu otapala i uzorka, te ultrazvučna kupelj, kod koje ultrazvuk na smjesu djeluje izvana [20].

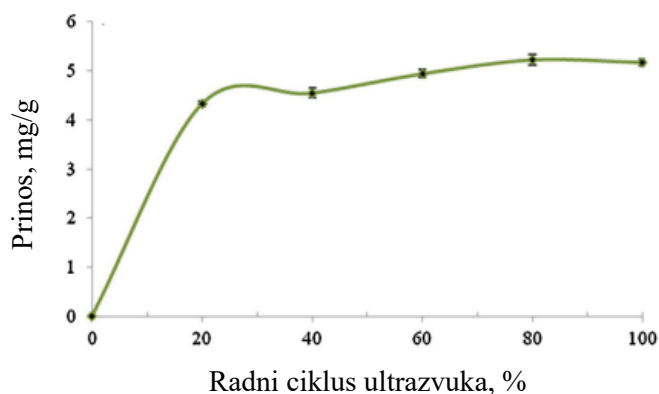


**Slika 5.** Ultrazvučna sonda i ultrazvučna kupelj [21].

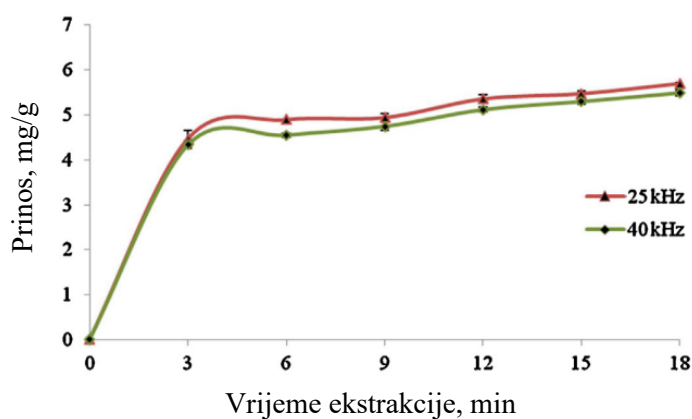
Na proces ultrazvučne ekstrakcije, osim temperature i vremena ekstrakcije, mogu utjecati i parametri ultrazvuka: frekvencija, snaga i radni ciklus. Ovi parametri ispitani su u radu Rathoda i sur. [15] na primjeru ekstrakcije piperina iz dugog papra u ultrazvučnoj kupelji. Kao otapalo odabran je etanol (omjer uzorka i otapala bio je 1:10), a parametri procesa – vrijeme ekstrakcije, radni ciklus ultrazvuka, frekvencija ultrazvuka i temperatura kupelji – mijenjali su se kako bi se istražio njihov utjecaj na proces uz stalne ostale parametre. Dobiveni ekstrakti analizirani su na HPLC-u. Rezultati eksperimenata prikazani su na slikama 6 – 9.



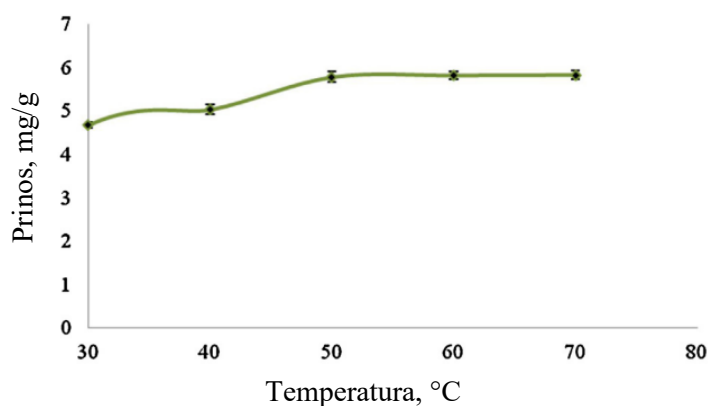
**Slika 6.** Utjecaj vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije piperina iz dugog papra na prinos piperina uz parametre: temperatura kupelji 40 °C, snaga ultrazvuka 175 W, frekvencija ultrazvuka 25 kHz, radni ciklus 80 % [15].



**Slika 7.** Utjecaj radnog ciklusa ultrazvuka na prinos piperina iz dugog papra uz parametre: vrijeme ekstrakcije 18 min, temperatura kupelji 40 °C, snaga ultrazvuka 175 W, frekvencija ultrazvuka 25 kHz [15].



**Slika 8.** Utjecaj frekvencije ultrazvuka na prinos piperina iz dugog papra uz parametre: vrijeme ekstrakcije 18 min, temperatura kupelji 40 °C, snaga ultrazvuka 175 W, radni ciklus ultrazvuka 80 % [15].



**Slika 9.** Utjecaj temperature ultrazvučne kupelji na prinos piperina iz dugog papra uz parametre: vrijeme ekstrakcije 18 min, snaga ultrazvuka 125 W, frekvencija ultrazvuka 25 kHz, radni ciklus ultrazvuka 80 % [15].



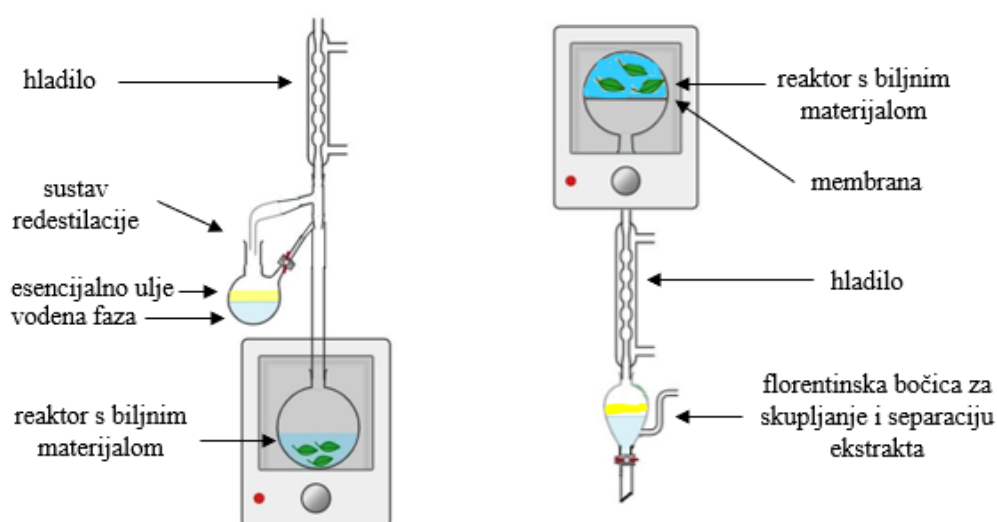
Jedan od zahtjeva (svakog) procesa je naći optimalno vrijeme trajanja između zadovoljavajućeg prinosa i ekonomičnosti procesa. Na slici 6 vidljiv je nagli rast prinosa na početku procesa, koji je uvjetovan velikim koncentracijskim gradijentom piperina u smjesi otapala i uzorka. Smanjenjem tog gradijenta tijekom vremena smanjuje se i prelazak piperina iz uzorka u otapalo, zbog čega u konačnici nema povećanja prinosa nakon 18. minute, što se odabralo kao optimalno vrijeme procesa. Kod ovog tipa ekstrakcije ultrazvučno djelovanje mora se pažljivo dozirati jer predugo izlaganje ultrazvuku može degradirati materijal. Stoga nije preporučljivo da ultrazvuk radi cijelo vrijeme tijekom ekstrakcije, već da se periodično gasi i uključuje, što se naziva radni ciklus (engl. *duty cycle*). Na slici 7 vidljivo je da je povećanje prinosa piperina proporcionalno povećanju radnog ciklusa, no samo do 80 %-tnog radnog ciklusa. S obzirom da se prinos smanjuje poslije toga, moguće je da je došlo do degradacije ekstrahiranog piperina [15]. Nadalje, učinak ultrazvuka je veći pri nižim frekvencijama (18 – 40 kHz) nego pri većim (400 – 800 kHz) jer pri nižima dominira kavitacijski efekt [20]. Iako razlika u frekvenciji između 25 i 40 kHz nije toliko velika, na slici 8 može se vidjeti da je niža frekvencija povoljnija za proces. Što se tiče temperature kupelji, na slici 9 vidi se da prinos raste do temperature od 50 °C, a poslije toga stagnira. S porastom temperature brže se stvaraju kavitacijski mjehurići, no implodiraju s manje sile, stoga se pri većoj temperaturi više ne može računati na kavitacijski efekt, a sam termalni efekt nije dovoljan za učinkovitu ekstrakciju [15, 16]. 50 °C kao optimalna temperatura ultrazvučne ekstrakcije piperina, nakon koje prinos pada, zabilježen je i u radu Gorganija i sur. [16].

#### **2.3.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi valne duljine od 1 do 300 mm. Nemaju dovoljno energije za mijenjanje strukture tvari već samo za ubrzano gibanje molekula – one više titraju i time se tvar podvrgnuta mikrovalovima zagrijava. Ovaj je efekt iskorišten za poboljšanje konvencionalnih metoda ekstrakcije – na primjeru papra, u mikrovalnoj pećnici hlapive tvari i voda koji se nalaze unutar stanice apsorbiraju energiju mikrovalova i isparavaju. Kako se povećava tlak unutar stanice, tako se stanica deformira i naposljetku puca, omogućujući izmjenu tvari s otapalom. Ovakvim postupkom koji se naziva ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave – Assisted Extraction*, MAE), vrijeme procesa se skraćuje, dobiva se veći prinos i potrebna je manja količina otapala nego kod

konvencionalnih metoda. Međutim, zagrijavanje uzrokovano mikrovalovima može biti i prejako, odnosno može dovesti do uništavanja ekstrahiranog materijala [16, 22].

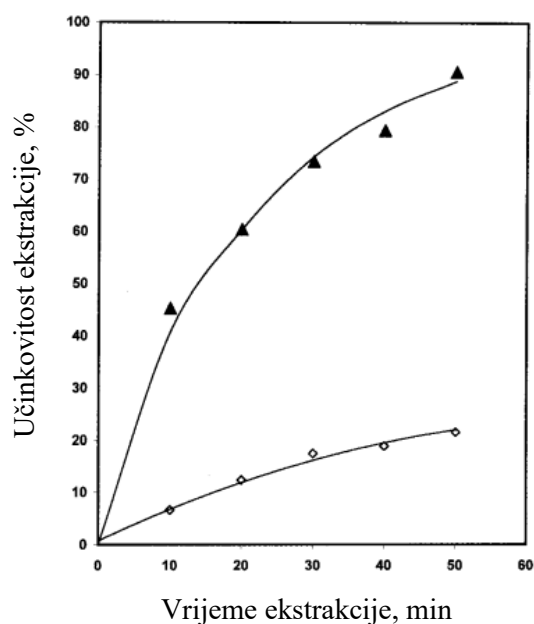
Mehanizam zagrijavanja molekula temelji se na postojanju dipolnog momenta u polarnim molekulama. Kako oscilira elektromagnetsko polje mikrovalova, tako se i rotira dipol u molekulama jer se one poravnavaju s njim. Rotirajuće molekule sudaraju se s drugim molekulama, nastaje trenje i razvija se toplina [16]. Postoji nekoliko izvedbi mikrovalnih pećnica za ekstrakciju: mikrovalna pećnica s vodenim hladilom (slika 10), mikrovalna pećnica s hidrogravitacijom u kojoj se ekstrahirani materijal skuplja na dnu uređaja (slika 10) i mikrovalna pećnica sa zatvorenim posudama s kontroliranim tlakom i temperaturom. U nekim radovima također su korištene mikrovalne pećnice za kućanstvo [16, 23].



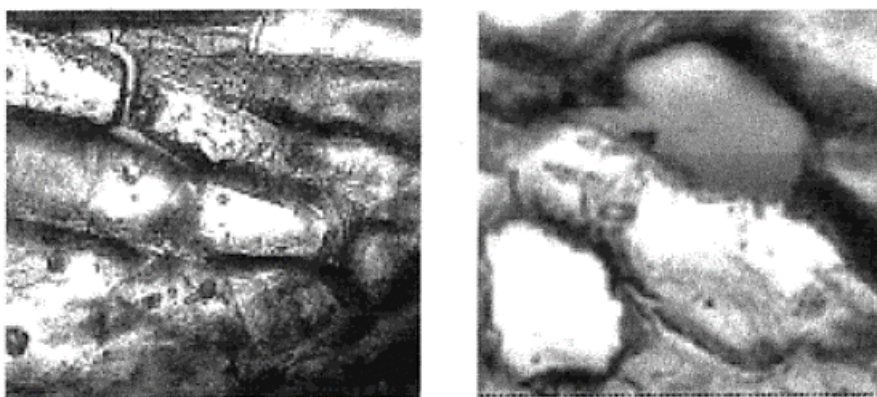
**Slika 10.** Shema mikrovalne pećnice s vodenim hladilom i mikrovalne pećnice s hidrogravitacijom [modificirano iz 22].

U radu Ramana i sur. [23] usitnjeni crni papar podvrgnut je mikrovalnom zračenju u mikrovalnoj pećnici za kućanstvo tijekom 2 minute, a potom je pomiješan s petroleterom radi ekstrakcije. Taj je eksperiment uspoređen s ekstrakcijom samo otapalom, bez mikrovalnog zračenja, a rezultati su prikazani na slici 11. Uzorci su uzimani svakih 15 minuta i analizirani tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Thin – Layer Chromatography*, HPTLC). Ukupna količina piperina u uzorku određena je Soxhlet ekstrakcijom i iznosila je 0,102 g piperina u 2,0 g uzorka. Iz grafa je vidljivo koliko mikrovalno zračenje pospešuje ekstrakciju piperina, i po količini ekstrahirane tvari, i po skraćivanju vremena ekstrakcije. Nadalje, stanice papra prije i nakon podvrgavanja mikrovalovima

pogledane su mikroskopski kako bi se utvrdile promjene u strukturi. Na slici 12 može se vidjeti deformacija (bubrenje) stanica zbog isparavanja hlapivih tvari uslijed generirane topline [23].



**Slika 11.** Usporedba ekstrakcije piperina iz crnog papra petroleterom prije i nakon podvrgavanja usitnjenog papra mikrovalovima (vrijeme i snaga mikrovalnog zračenja: 2 min, 150 W) (▲: papar podvrgnut mikrovalovima, ◇: papar nepodvrgnut mikrovalovima) [23].



**Slika 12.** SEM-mikrografije stanica crnog papra prije i nakon podvrgavanja mikrovalnom zračenju (vrijeme i snaga mikrovalnog zračenja: 2 min, 150 W) [23].

U radu Gorganija i sur. [16] istraživala se kombinacija mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije piperina iz crnog papra. Uzorak s otapalom najprije je podvrgnut mikrovalnoj ekstrakciji u mikrovalnoj pećnici za kućanstvo, a zatim ultrazvučnoj kupelji. Ovaj je eksperiment uspoređen

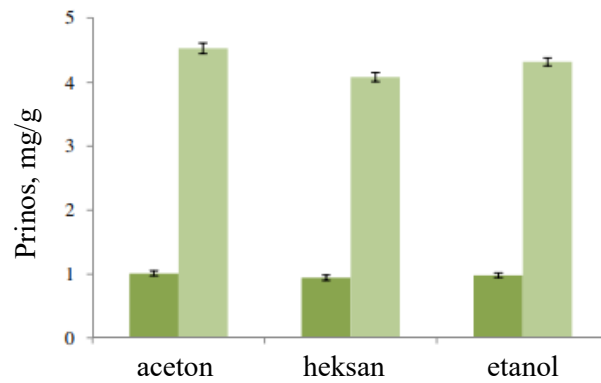
sa samostalnom mikrovalnom, ultrazvučnom te Soxhlet ekstrakcijom kako bi se uvidjela poboljšanja u prinosu. U svakom eksperimentu (osim Soxhleta) crni papar pomiješan je s etanolom u omjeru 1:20, a ostali parametri te prinosi vidljivi su u tablici 1. Svi uzorci analizirani su na HPLC-u. Iz tablice se jasno vidi poboljšanje u prinosu prilikom kombinacije dviju ekstrakcija.

**Tablica 1.** Usporedba prinosa piperina iz crnog papra etanolom postupcima ultrazvučne, mikrovalne, Soxhlet i kombinirane mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije [16]:

<b>Ekstrakcija</b>	<b>Parametri procesa</b>	<b>Prinos piperina</b>
<b>UAE</b>	50 °C, 30 min	37,0 ± 1,6 mg/g
<b>MAE</b>	1 min, 100 W	38,8 ± 1,9 mg/g
<b>Soxhlet ekstrakcija</b>	15 g uzorka, 300 mL etanola, 70 °C, 12 h	39,1 ± 2,1 mg/g
<b>Kombinirana mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija</b>	mikrovalna: 1 min, 100 W ultrazvučna: 50 °C, 30 min	46,6 ± 2,7 mg/g

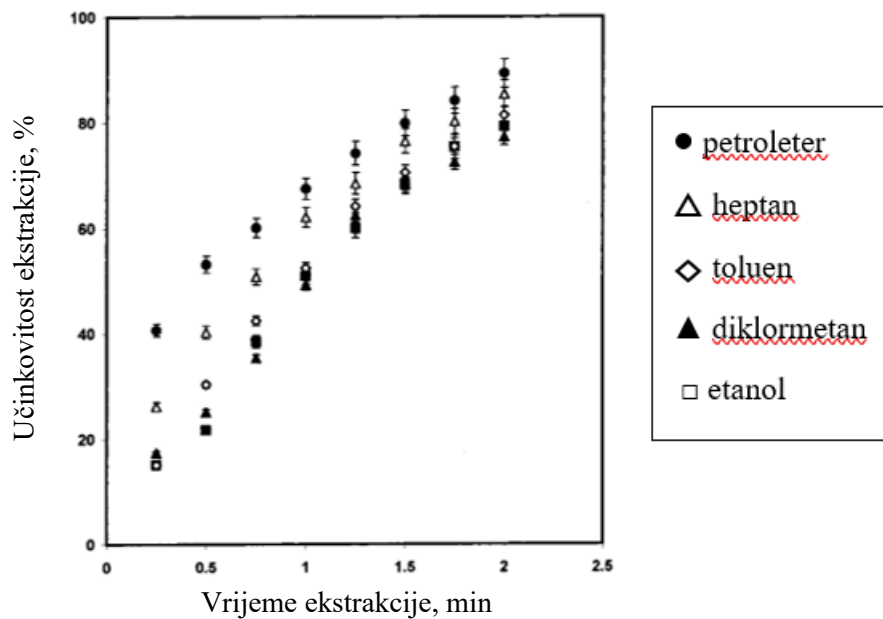
### 2.3.5. Utjecaj otapala u ekstrakciji piperina

Već je napomenuto da otapalo koje se koristi za ekstrakciju mora imati određene karakteristike, poput male viskoznosti kako bi bolje difundiralo u stanicu biljke, što je primjenjivo za svaku metodu ekstrakcije. Nekonvencionalne metode, UAE i MAE, zahtijevaju i specifične karakteristike otapala za uspješniji proces. U radu Rathoda i sur. [15] uspoređivali su različita otapala za ekstrakciju otapalom i UAE, a rezultati su prikazani na slici 13. Omjer uzorka i otapala te temperatura ekstrakcije bili su isti za svaki eksperiment (1:10 i 40 °C). Vidljivo je da je aceton bolje otapalo za obje ekstrakcije, a slijedi ga etanol pa heksan. U ekstrakciji otapalom prinos je uvjetovan polarnošću i viskoznošću otapala. Aceton i etanol imaju gotovo jednak indeks polarnosti (5,1 i 5,2), no aceton ima znatno manju viskoznost od etanola (0,32 cP naprema 1,2 cP), stoga je učinkovitiji za ekstrakciju. Nadalje, za UAE poželjnije je da otapalo ima niži tlak para jer, iako se stvara manji broj kavitacijskih mjehurića, oni implodiraju većom silom, stoga je i ekstrakcija bolja. Etanol ima puno manji tlak para od



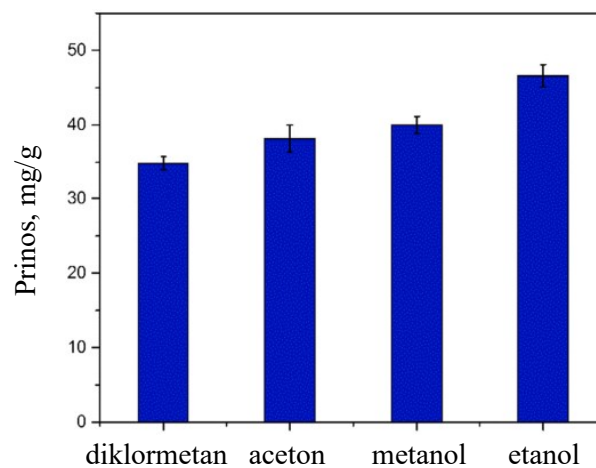
**Slika 13.** Usporedba prinosa piperina iz dugog papra ekstrakcijom otapalom (vrijeme 8 h, brzina miješanja na magnetskoj miješalici 600 rpm) i ultrazvučnom ekstrakcijom (vrijeme 20 min, snaga ultrazvuka 175 W, frekvencija ultrazvuka 25 kHz) korištenjem različitih otapala (■ : ekstrakcija otapalom, ■ : UAE) [15].

acetona (5,2 kPa naprema 24 kPa), i time nadoknađuje veću viskoznost, stoga su njihovi prinosi vrlo slični. No s obzirom da je aceton problematičan za rukovanje i skuplji od etanola, zaključeno je da je etanol bolje otapalo za daljnje istraživanje [15]. Što se tiče poželjne specifične karakteristike otapala za MAE, u radu Ramana i sur. [23] istražena su polarna i nepolarna organska otapala prikazana na slici 14.



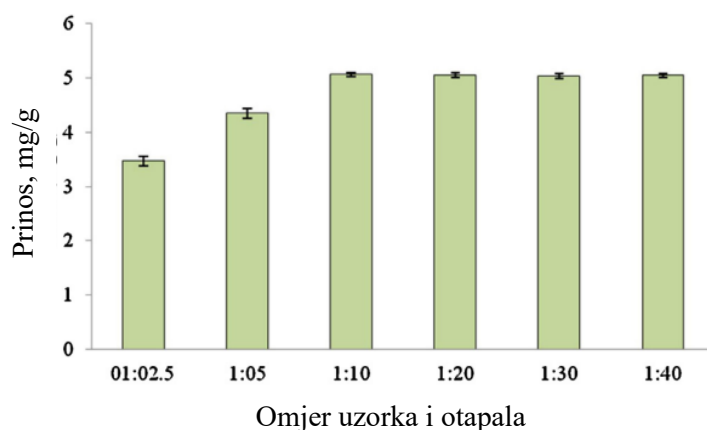
**Slika 14.** Usporedba učinkovitosti mikrovalne ekstrakcije crnog papra korištenjem različitih otapala (vrijeme ekstrakcije 2 min, snaga mikrovalova 150 W) [23].

Iz priloženog je vidljivo da je ekstrakcija bolja u nepolarnim otapalima. Naime, karakteristika otapala koja utječe na mikrovalnu ekstrakciju su dielektrična svojstva. Polarna otapala, poput etanola ili diklormetana, imaju stalan dipol zbog čega apsorbiraju mikrovalno zračenje i „oduzimaju“ ga stanicama papra koje pucaju u manjoj mjeri pa je i ekstrakcija lošija. Napolarna otapala propuštaju mikrovalove pa oni mogu djelovati na stanice papra. Ipak, s obzirom da su upotrijebljena nepolarna otapala opasnija za okoliš i ljude negoli je to etanol, ona se ne preferiraju za ekstrakciju piperina [23]. Razlici u učinkovitosti može se doskočiti kombinacijom mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, kao što je to učinjeno u radu Gorganija i sur. [16] (slika 15). Etanol, iako nije najbolje otapalo za mikrovalnu ekstrakciju, ima najmanji tlak para od svih otapala što je poželjno za ultrazvučnu, i time je rezultirao najvećim prinosom.

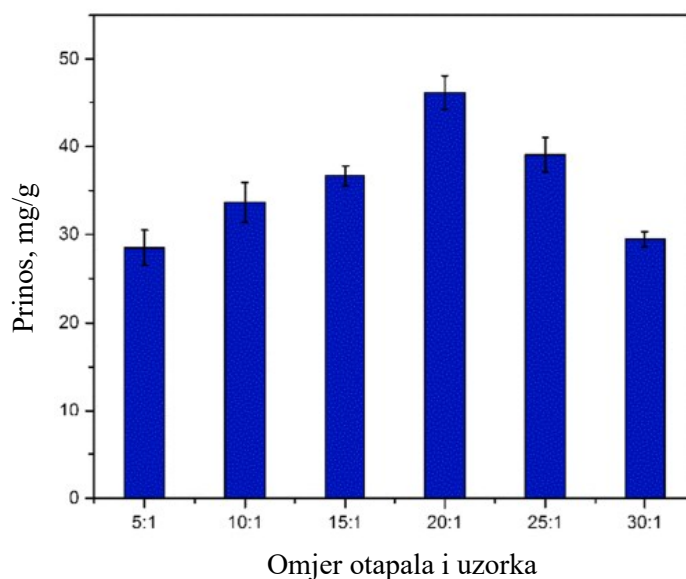


**Slika 15.** Usporedba prinosa piperina iz crnog papra kombiniranom mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom korištenjem različitih otapala (omjer uzorka i otapala 1:20, vrijeme mikrovalne ekstrakcije 1 min, snaga mikrovalova 150 W, vrijeme ultrazvučne ekstrakcije 30 min, temperatura kupelji 50 °C) [16].

Osim karakteristika otapala, na proces ekstrakcije utječe i omjer otapala i uzorka. Otapala mora biti dovoljno kako bi mogao prodrijeti u stanice uzorka i ekstrahirati željenu tvar, no ukoliko ga je previše, može doći i do ekstrahiranja drugih komponenti uzorka čime se narušava čistoća ekstrakta. Tada su troškovi proizvodnje, osim zbog upotrebe veće količine otapala, povećani i radi naknadnog pročišćavanja ekstrakta. Utjecaj omjera otapala (etanola) i uzorka istražen je u radovima Rathoda i sur. [15] za ultrazvučnu ekstrakciju te u radu Gorganija i sur. [16] za kombiniranu mikrovalnu i ultrazvučnu ekstrakciju. Rezultati eksperimenata vidljivi su na slikama 16 – 17.



**Slika 16.** Utjecaj omjera uzorka dugog papra i otapala etanola na prinos piperina korištenjem ultrazvučne kupelji (vrijeme ekstrakcije 18 min, temperatura kupelji 40 °C, snaga ultrazvuka 175 W, frekvencija ultrazvuka 25 kHz) [15].



**Slika 17.** Utjecaj omjera etanola i uzorka crnog papra na prinos piperina korištenjem kombinirane mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije (vrijeme mikrovalne ekstrakcije 1 min, snaga mikrovalova 100 W, vrijeme ultrazvučne ekstrakcije 30 min, temperatura kupelji 50 °C) [16].

Na slici 16 vidljivo je da nema poboljšanja prinosa nakon omjera 1:10. U tom slučaju, otapala ima dovoljno da bi sva površina uzorka bila u kontaktu s otapalom, koncentracijski gradijent je povoljan i događa se maksimalna ekstrakcija piperina. Smatra se da je tada koncentracija otopljenog piperina u etanolu maksimalna, odnosno da se stvorila zasićena otopina, pa više

nema poboljšanja s povećanjem omjera [15]. Na slici 17 vidljivo je da je omjer 1:20 optimalan, s povećanjem omjera prinos piperina čak i pada. U potonjim slučajevima pretpostavljeno je da je otapala bilo previše i ekstrahirale su se i druge tvari u papru, ne samo piperin. Na smanjeni prinos vjerojatno je utjecalo i što mikrovalovi nisu mogli, zbog povećanog volumena otapala, u potpunosti prodrijeti do uzorka pa ekstrakcija nije bila toliko učinkovita [16].



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Cilj rada

Cilj rada bio je ekstrahirati piperin iz četiriju vrsta papra korištenjem četiriju različitih metoda ekstrakcije. Uzorci papra usitnjeni su i podijeljeni u tri veličinske frakcije, a metode su se, ukoliko je bilo moguće, izvodile na različitim temperaturama. Bilo je potrebno utvrditi utjecaj veličine čestica i temperature procesa na učinkovitost ekstrakcije te instrumentalno odrediti prinos piperina u svakom uzorku i ukupnu količinu piperina u svakom papru. U konačnici je bilo potrebno usporediti metode po učinkovitosti, odnosno zaključiti koja je od korištenih metoda ekstrakcije najbolja za ekstrakciju piperina iz papra.

#### 3.2. Materijali

Popis korištenih kemikalija prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Popis kemikalija i proizvođača:

Kemikalije	Čistoća	Proizvođač
etanol	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
metanol	HPLC-čistoće	J.T. Baker, SAD
acetonitril	HPLC-čistoće	VWR, SAD

U radu su korištene četiri vrste papra, prikazane na slici 18:

- crni papar (*Piper nigrum*) u znu, zemlja porijekla Indija, nabavlja Harissa Spice Store, Hrvatska
- zeleni papar (*Piper nigrum*) u znu, zemlja porijekla Indija, nabavlja Harissa Spice Store, Hrvatska
- bijeli papar (*Piper nigrum*) u znu, zemlja porijekla Indija, nabavlja Harissa Spice Store, Hrvatska
- voatsiperifery papar (*Piper borbonense*) u znu, zemlja porijekla Madagaskar, nabavlja Harissa Spice Store, Hrvatska.



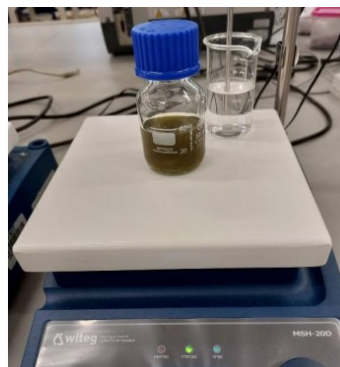
**Slika 18.** Papri korišteni u radu, redom crni, zeleni, bijeli i voatsiperifery papir.

### **3.3. Provedba eksperimenta**

Uzorci svih papra usitnjeni su u električnom mlincu i prosijani tako da se dobiju tri veličinske frakcije:  $1,40 \text{ mm} < d_{\epsilon} < 2,00 \text{ mm}$ ,  $0,71 \text{ mm} < d_{\epsilon} < 1,40 \text{ mm}$  i  $d_{\epsilon} < 0,71 \text{ mm}$ . Za ekstrakciju su korištene četiri metode: ekstrakcija otapalom na magnetskoj miješalici, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u mikrovalnoj pećnici sa zatvorenim posudama s kontroliranim tlakom i temperaturom. Sve ekstrakcije osim Soxhleta provedene su na dvjema ili trima različitim temperaturama. Na UAE i MAE provedene su ekstrakcije svih triju frakcija, dok je za ekstrakciju otapalom odabrana samo najmanja frakcija, a za Soxhlet smjesa svih triju frakcija. Kao ekstrakcijsko otapalo za sve ekstrakcije izabran je etanol.

#### **3.3.1. Ekstrakcija otapalom na magnetskoj miješalici**

Za ekstrakciju etanolom odabrana je samo najmanja frakcija svih papra. Sva ispitivanja provodila su se na elektromagnetskoj miješalici Witeg MSH-20D (Njemačka) jedan sat pri 200 rpm (slika 19). Temperature ekstrakcija bile su sobna temperatura (25 °C), 50 °C i 75 °C. Omjer uzorka papra i etanola bio je 0,1:10. Ekstrakti su filtrirani kroz filter-papir pora promjera  $< 2 \mu\text{m}$  proizvođača LLG (Njemačka) i analizirani.



**Slika 19.** Ekstrakcija otapalom iz zelenog papra.

### 3.3.2. Soxhlet ekstrakcija

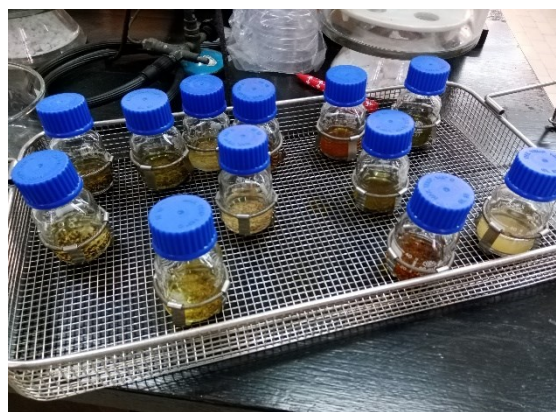
Za Soxhlet ekstrakciju korištena je smjesa svih veličinskih frakcija. 30 g svakog papra i 250 mL etanola stavljeni su u aparaturu, a ekstrakcija je trajala 3 h (slika 20). Temperatura procesa bila je podešena tako da etanol cijelo vrijeme lagano vrije (oko 80 °C). Ekstrakti su filtrirani kroz filter-papir pora promjera < 2 µm proizvođača LLG (Njemačka) i analizirani. Primijećeno je da je nastalo taloga u svim ekstraktima (slika 20), a najviše ga je bilo u ekstraktu voatsiperifery papra.



**Slika 20.** Soxhlet ekstrakcija bijelog papra i filtrirani ekstrakti, redom bijeli, crni, zeleni i voatsiperifery papra.

### 3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

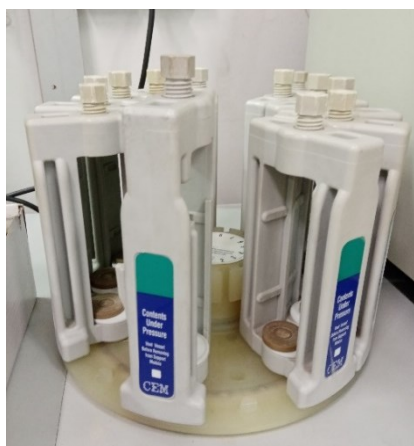
UAE je provedena za svaku frakciju papra u ultrazvučnoj kupelji Sonorex Digital 10 P proizvođača Bandelin (Njemačka), prikazanoj na slici 21. Ekstrakcije su provedene na dvjema temperaturama: 50 °C i 75 °C, a ostali parametri su bili nepromjenjivi: vrijeme ekstrakcije bilo je 30 min, frekvencija ultrazvuka 35 kHz i radni ciklus 100 %. Omjer uzorka i etanola u većini slučajeva bio je 0,1:10, u rezultatima je naznačeno za koje uzorke to nije bio slučaj. Ekstrakti su filtrirani kroz filter-papir pora promjera < 2 µm proizvođača LLG (Njemačka) i analizirani.



**Slika 21.** Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digital 10 P i nosač s uzorcima.

### 3.3.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

MAE je provedena za svaku frakciju papra u mikrovalnoj pećnici sa zatvorenim posudama i regulacijom tlaka i temperature MarsX proizvođača CEM (SAD) koja je prikazana na slici 22. Ona sadrži nosač (slika 22) s 12 mjesta za teflonske ekstrakcijske posude, od kojih je jedna posuda uvijek referentna i u njoj se nalazi osjetilo tlaka i temperature koje omogućuje izravno praćenje ovih parametara tijekom procesa. Ekstrakcije su provedene na trima temperaturama: 50 °C, 75 °C i 95 °C, a ostali parametri su bili nepromjenjivi: vrijeme ekstrakcije bilo je 15 min, snaga mikrovalova 600 W, a maksimalni dopušteni tlak 200 psi. Omjer uzorka i etanola u većini slučajeva bio je 0,1:10, u rezultatima je naznačeno za koje uzorke to nije bio slučaj. Ekstrakti su filtrirani kroz filter-papir pora promjera  $< 2 \mu\text{m}$  proizvođača LLG (Njemačka) i analizirani.



**Slika 22.** CEM MarsX mikrovalna pećnica i nosač s ekstrakcijskim posudama.

### 3.4. Analiza ekstrakta

Nakon filtracije, ekstrakti su bez daljnje obrade analizirani na HPLC-u i UV/Vis spektrometru kako bi se odredila koncentracija piperina u njima, a pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) detektirane su funkcionalne skupine spojeva prisutnih u ekstraktima. Također su napravljena dva baždarna pravca piperina, jedan u metanolu na HPLC-u, i drugi u etanolu na UV/Vis spektrometru.

#### 3.4.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

HPLC-analiza provedena je na HPLC instrumentu Varian ProStar 500 (SAD) uz detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) PDA Detector Varian ProStar 330. Ostali dijelovi uređaja su Varian ProStar 230 tercijarna pumpa, Varian ProStar 410 uređaj za automatsko dodavanje uzoraka, Varian ProStar 500 termostatirani držač kolone i računalo s programom STAR 5.2. preko kojeg se upravlja HPLC-om. Korištena je kolona InertSustain C18 proizvođača GL Sciences (Japan). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina čestica stacionarne faze iznosila je 5  $\mu\text{m}$ . Uređaj je prikazan na slici 23. Ekstrakti su analizirani izokratnom metodom, tj. sastav mobilne faze se nije mijenjao: eluiralo je 30 % A-faze (0,01 % mravlja kiselina u ultračistoj vodi), 5 % B-faze (0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu) i 65 % C-faze (acetonitril). Prije i nakon analize uzoraka kolona se ispiru 65 %-tnim acetonitrilom 1 h pri protoku od 0,5 mL/min i volumenu injektiranja 10  $\mu\text{L}$ . Volumen injektiranja uzoraka također je iznosio 10  $\mu\text{L}$ . Kromatogrami na HPLC-DAD kromatografskom sustavu snimani su na 340 nm. Ovoj analizi podvrgnuti su svi uzorci.



Slika 23. HPLC instrument Varian ProStar 500.

### 3.4.2. UV/Vis spektroskopija

Osim na HPLC-u, ekstrakti su analizirani i UV/Vis spektroskopijom na uređaju Shimadzu UV-1280 (Japan) kako bi se odredila koncentracija piperina (slika 24). Ekstraktima su snimljeni UV/Vis spektri te su očitane apsorbancije u maksimumu pika karakterističnog za piperin.



Slika 24. UV/Vis spektrometar Shimadzu UV-1280.

### 3.4.3. FTIR spektroskopija

Funkcionalne skupine spojeva prisutnih u ekstraktima analizirane su na spektrometru Bruker Vertex 70 (SAD), prikazanom na slici 25. Spektri su uspoređeni s uzorkom čistog etanola i standarda piperina kako bi se vidjeli koji pikovi na spektru dolaze od etanola, a koji od piperina (i potencijalno drugih ekstrahiranih spojeva u uzorku). Ovoj analizi podvrgnuti su samo ekstrakti dobiveni ekstrakcijom na magnetskoj miješalici.

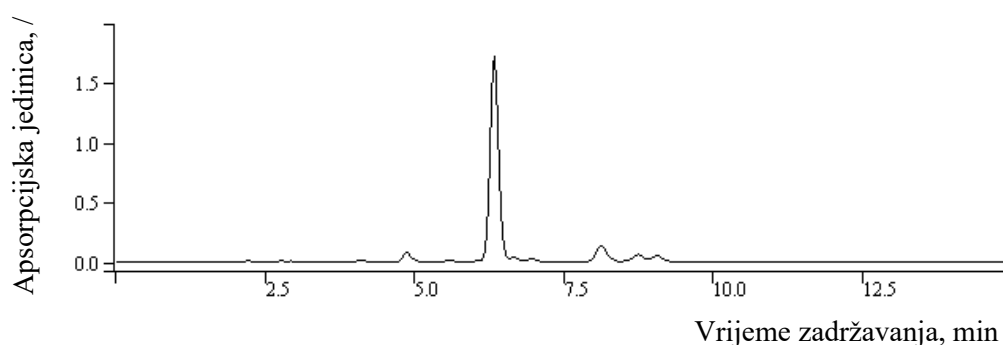


Slika 25. FTIR spektrometar Bruker Vertex 70.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Prinos piperina

Prinos piperina za svaki uzorak određen je na HPLC-DAD kromatografskom sustavu. Tipičan kromatogram prikazan je na slici 26. Najviši pik je piperin, čije vrijeme zadržavanja za korištenu kolonu iznosi 6,30 min.



**Slika 26.** Primjer HPLC-DAD kromatograma za ekstrahirani piperin iz papra.

Kako bi se izračunala koncentracija piperina u ekstraktima, najprije je napravljen baždarni pravac piperina (prilog 1). Pomoću njega i površine pika karakterističnog za piperin na kromatogramu svakog uzorka, određene su masene koncentracije piperina u uzorcima, odnosno prinos piperina za svaku ekstrakciju. Rezultati su prikazani u tablici 3. Količina ekstrahiranog piperina uglavnom raste s porastom temperature te smanjenjem veličine čestica papra, neovisno o metodi provedbe ekstrakcije. Uočena odstupanja mogu biti posljedica nehomogenosti uzoraka. Naime, u literaturi je napomenuto da piperina ima više u srži bobice papra nego u korici [24]. Na primjeru crnog papra, kod kojeg se vidi da je prinos s ekstrakcije otapalom na 50 °C manji nego na 25 °C, moguće je da je uzorak za tu ekstrakciju sadržavao veći udio korice što je rezultiralo manjim prinosom. S obzirom da zrno bijelog papra ne sadrži koricu, ekstrakt sadrži veći udio piperina u istoj masi papra. Bitno je napomenuti da su papri korišteni u ovom radu različitog porijekla pa nije moguće uspoređivati ih međusobno.

**Tablica 3.** Prinos piperina dobiven provedenim metodama ekstrakcije i analiziran HPLC-DAD sustavom (omjer uzorka i otapala 0,1:10, osim ako nije drukčije naznačeno):

		<i>ekstrakcija otapalom</i>		
<b>papar</b>	<b>veličinska frakcija</b>	<b>25 °C</b>	<b>50 °C</b>	<b>75 °C</b>
<b>crni</b>	$d_{\xi} < 0,71$ mm	19,72 mg/g	17,64 mg/g	27,25 mg/g
<b>bijeli</b>	$d_{\xi} < 0,71$ mm	32,12 mg/g	36,01 mg/g	39,02 mg/g
<b>zeleni</b>	$d_{\xi} < 0,71$ mm	15,28 mg/g	31,47 mg/g	37,78 mg/g
<b>voatsiperifery</b>	$d_{\xi} < 0,71$ mm	13,25 mg/g	14,66 mg/g	15,53 mg/g

		<i>Soxhlet</i>
<b>papar</b>	<b>veličinska frakcija</b>	
<b>crni</b>	smjesa	21,68 mg/g
<b>bijeli</b>	smjesa	30,20 mg/g
<b>zeleni</b>	smjesa	44,87 mg/g
<b>voatsiperifery</b>	smjesa	14,42 mg/g

		<i>UAE</i>	
<b>papar</b>	<b>veličinska frakcija</b>	<b>50 °C</b>	<b>75 °C</b>
<b>crni</b>	1,40 mm < $d_{\xi}$ < 2,00 mm	12,35 mg/g	15,30 mg/g
	0,71 mm < $d_{\xi}$ < 1,40 mm	16,71 mg/g	17,00 mg/g
	$d_{\xi} < 0,71$ mm	20,77 mg/g	20,41 mg/g
<b>bijeli</b>	1,40 mm < $d_{\xi}$ < 2,00 mm	15,31 mg/g	18,67 mg/g
	0,71 mm < $d_{\xi}$ < 1,40 mm	20,65 mg/g	21,38 mg/g
	$d_{\xi} < 0,71$ mm	32,58 mg/g	36,44 mg/g
<b>zeleni</b>	1,40 mm < $d_{\xi}$ < 2,00 mm	17,62 mg/g	20,10 mg/g
	0,71 mm < $d_{\xi}$ < 1,40 mm	24,56 mg/g	32,45 mg/g
	$d_{\xi} < 0,71$ mm	32,39 mg/g	37,02 mg/g
<b>voatsiperifery</b>	1,40 mm < $d_{\xi}$ < 2,00 mm	6,91 mg/g	9,49 mg/g
	0,71 mm < $d_{\xi}$ < 1,40 mm	8,39 mg/g	8,98 mg/g
	$d_{\xi} < 0,71$ mm	13,59 mg/g	14,01 mg/g

*Napomena: narančasto obojane ćelije označavaju ekstrakte s omjerom uzorka i otapala 0,025:10.*



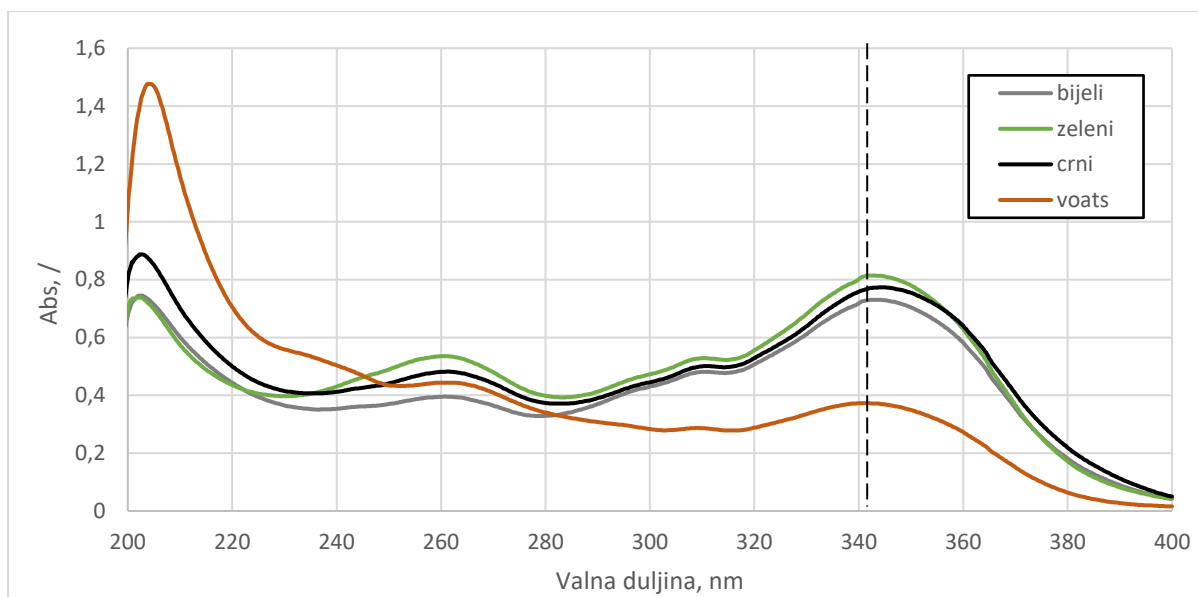
		<i>MAE</i>		
<b>papar</b>	<b>veličinska frakcija</b>	<b>50 °C</b>	<b>75 °C</b>	<b>95 °C</b>
<b>crni</b>	1,40 mm < $d_{\epsilon}$ < 2,00 mm	14,16 mg/g	17,83 mg/g	20,61 mg/g
	0,71 mm < $d_{\epsilon}$ < 1,40 mm	17,05 mg/g	21,44 mg/g	22,17 mg/g
	$d_{\epsilon}$ < 0,71 mm	21,95 mg/g	19,20 mg/g	20,92 mg/g
<b>bijeli</b>	1,40 mm < $d_{\epsilon}$ < 2,00 mm	18,99 mg/g	19,76 mg/g	18,06 mg/g
	0,71 mm < $d_{\epsilon}$ < 1,40 mm	22,52 mg/g	27,30 mg/g	29,15 mg/g
	$d_{\epsilon}$ < 0,71 mm	34,83 mg/g	36,12 mg/g	37,47 mg/g
<b>zeleni</b>	1,40 mm < $d_{\epsilon}$ < 2,00 mm	23,80 mg/g	29,15 mg/g	32,04 mg/g
	0,71 mm < $d_{\epsilon}$ < 1,40 mm	31,44 mg/g	35,02 mg/g	41,48 mg/g
	$d_{\epsilon}$ < 0,71 mm	35,86 mg/g	37,29 mg/g	36,44 mg/g
<b>voatsiperifery</b>	1,40 mm < $d_{\epsilon}$ < 2,00 mm	8,80 mg/g	9,75 mg/g	9,19 mg/g
	0,71 mm < $d_{\epsilon}$ < 1,40 mm	9,12 mg/g	10,35 mg/g	10,79 mg/g
	$d_{\epsilon}$ < 0,71 mm	14,27 mg/g	15,45 mg/g	15,68 mg/g

*Napomena: zeleno obojane ćelije označavaju ekstrakte s omjerom uzorka i otapala 0,05:10.*

## 4.2. UV/Vis spektri uzoraka

Na UV/Vis spektrometru također se određivala koncentracija piperina u pojedinim uzorcima, a najprije je napravljen baždarni pravac piperina prikazan u prilogu 2. Određena je koncentracija piperina u svim ekstraktima dobivenim Soxhlet ekstrakcijom, što je korišteno za izračun učinkovitosti ostalih metoda ekstrakcije. Na slici 27 mogu se vidjeti UV/Vis spektri uzoraka dobivenih Soxhlet ekstrakcijom.

Zračenje valne duljine od 342 nm apsorbira piperin, stoga se prema slici 27 može utvrditi da piperina ima najviše u Soxhlet ekstraktu zelenog papra, potom crnog papra, bijelog i voatsiperifery papra. Ovakvi rezultati drukčiji su od rezultata dobivenih na HPLC-u, tom analizom bijeli papar je imao više piperina od crnog. Kod promatranja rezultata s UV/Vis spektra treba imati na umu izomere piperina i druge piperamide koji apsorbiraju na vrlo sličnoj valnoj duljini kao piperin (prilozi 3 – 5), stoga ih UV/Vis spektrometar ne može „razdvojiti“, odnosno postoji mogućnost da pik na (oko) 342 nm ne predstavlja samo piperin u uzorku. To može objasniti razlike između rezultata UV/Vis-a i HPLC-a s obzirom da se taj pik koristio za izračun količine piperina u uzorcima.



**Slika 27.** UV/Vis spektri uzoraka sa Soxhlet ekstrakcije (uzorak je bio smjesa svih veličinskih frakcija, omjer uzorak i etanola 3:25, vrijeme ekstrakcije 3 h).

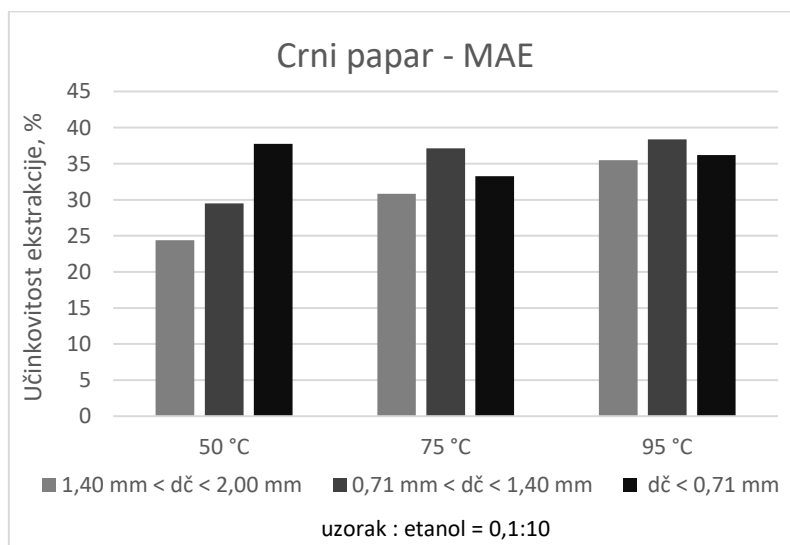
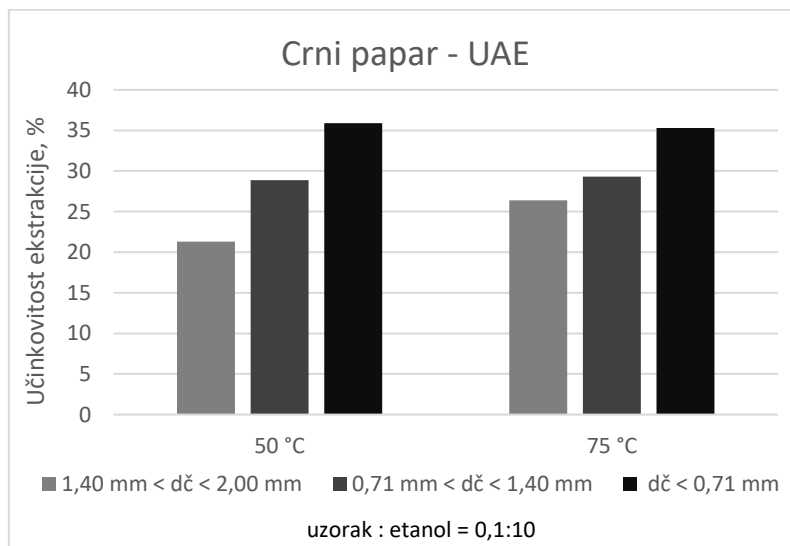
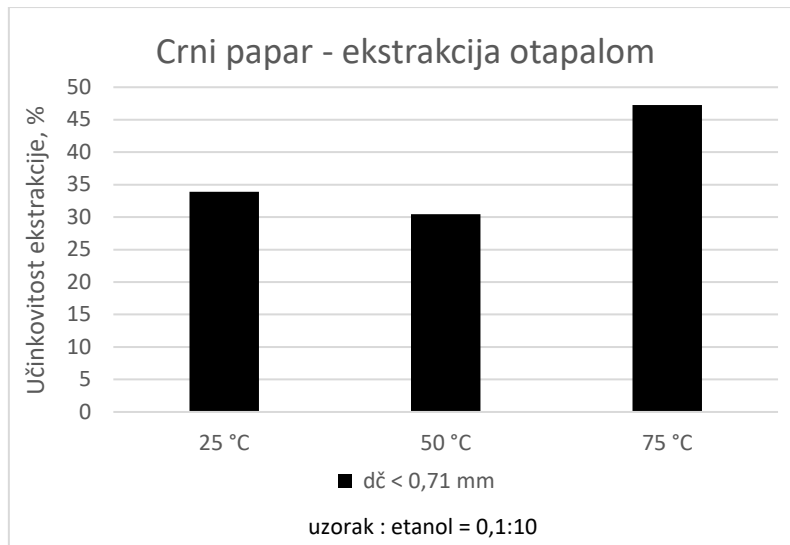
Preko prikaza nacrtana je crna okomita linija na 342 nm kako bi se lakše uočili pomaci u maksimumu krivulje. Maksimum krivulje za zeleni i voatsiperifery papar leži na liniji, dok se kod maksimuma crnog i bijelog papra primjećuje odmak od te linije.

### 4.3. Učinkovitost ekstrakcija

Za učinkovitost svih ekstrakcija referentna vrijednost bila je ukupna količina piperina u svakom papru, ekstrahirana gore opisanom Soxhlet ekstrakcijom i određena UV/Vis spektroskopijom (tablica 4). Iako se ove vrijednosti razlikuju od onih dobivenih HPLC analizom, UV/Vis vrijednosti sličnije su literaturnima [25], stoga je odlučeno da one budu referentne. Vidljivo je da najviše piperina ima zeleni papar, potom crni i bijeli, a najmanje voatsiperifery papar. Rezultati analize učinkovitosti prikazani su na slikama 28 – 31.

**Tablica 4.** Ukupna količina piperina u paprima (Soxhlet ekstrakcija, UV/Vis spektroskopija):

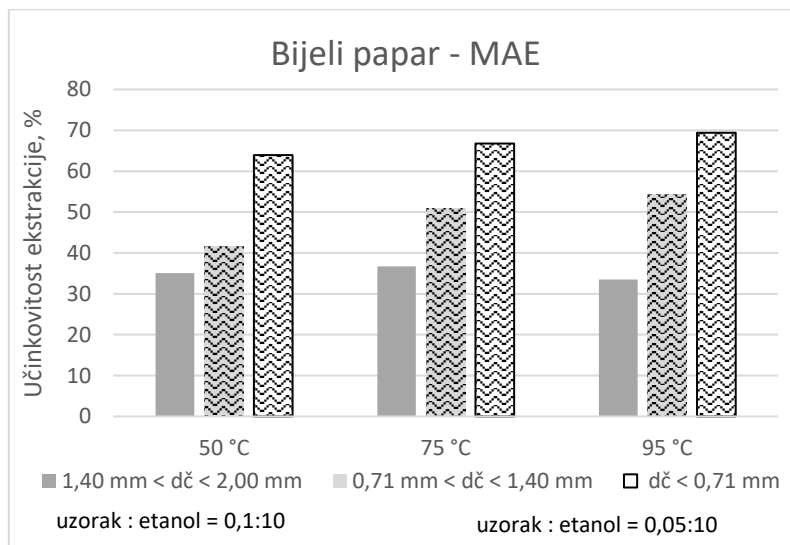
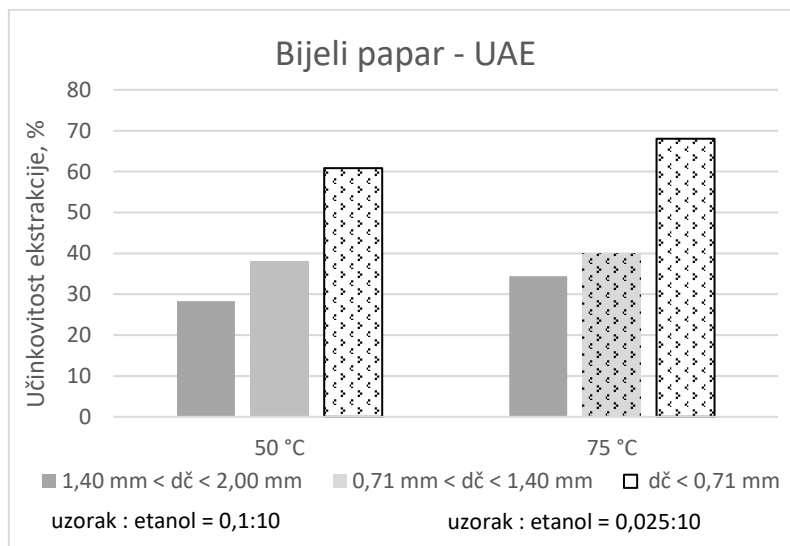
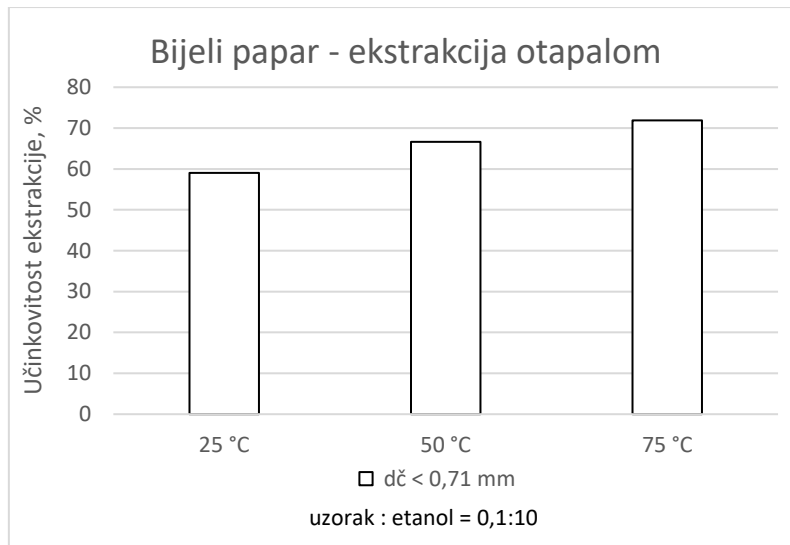
Ukupna količina piperina	
<b>Crni papar</b>	57,96 mg/g
<b>Bijeli papar</b>	54,09 mg/g
<b>Zeleni papar</b>	61,09 mg/g
<b>Voatsiperifery papar</b>	26,39 mg/g



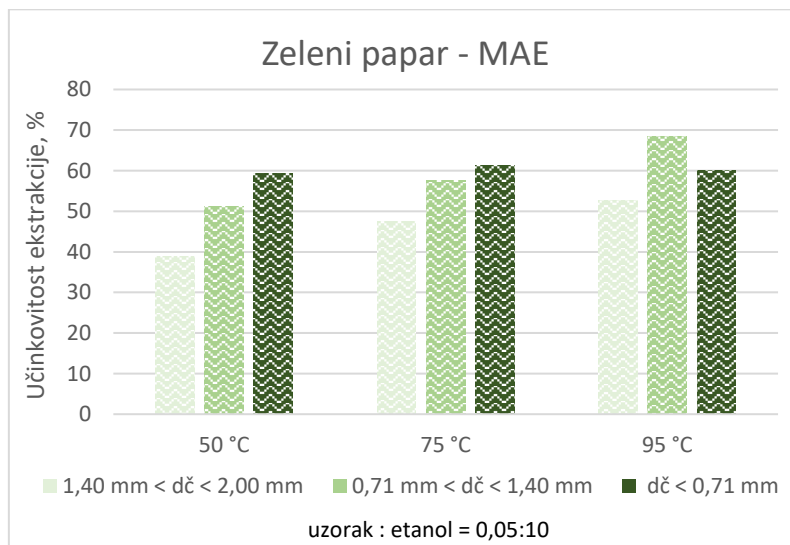
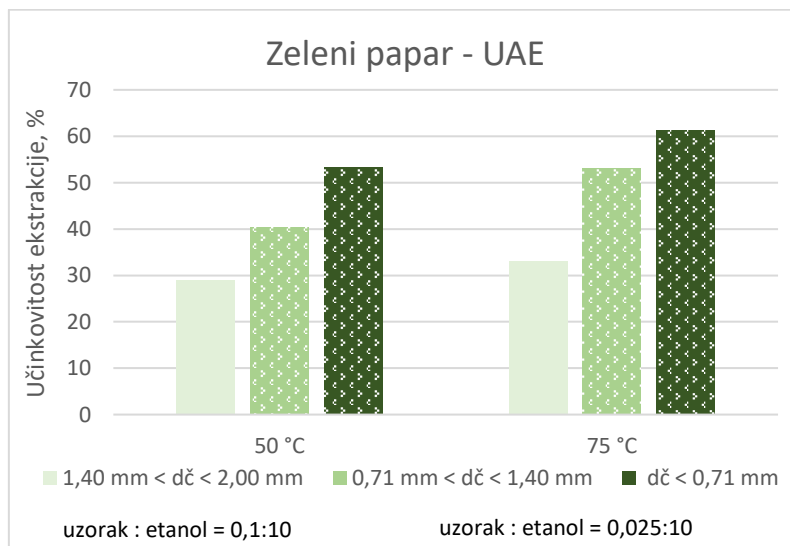
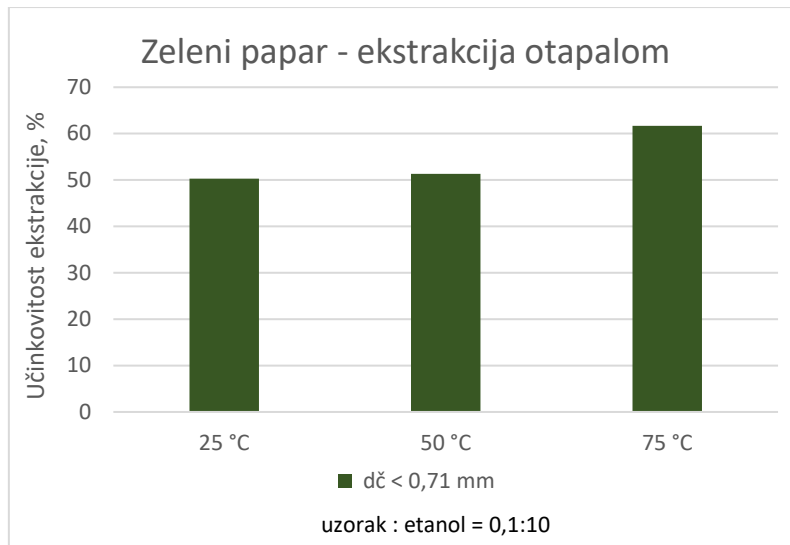
**Slika 28.** Učinkovitost svih ekstrakcija za crni papar (svi uzorci u omjeru 0,1:10 naprema etanolu).

Kod crnog papra najveća učinkovitost postiže se ekstrakcijom otapalom na magnetskoj miješalici na 75 °C (najmanja veličina čestica). Na istoj temperaturi i s istom frakcijom UAE je 12 % lošija, a MAE čak 14 %. Kod ekstrakcije otapalom primjećuje se da je temperatura procesa od 50 °C dala slabiji rezultat od 25 °C i 75 °C, no to se može pripisati spomenutoj nehomogenosti uzorka zbog korice. Ultrazvučna ekstrakcija na objema temperaturama daje vrlo sličnu učinkovitost, vidi se malo poboljšanje s porastom temperature, što je očekivano prema teoriji. Kod mikrovalne ekstrakcije razlika među frakcijama je još vidljivija – na 50 °C učinkovitost ekstrakcije raste sa smanjenjem veličine čestica kao što je očekivano, no na 75 °C i 95 °C srednja frakcija ima najveću učinkovitost, dok su i prva i druga frakcija manje od nje. Iako ta razlika među rezultatima veličinskih frakcija nije velika, može se pretpostaviti da je utjecaj veličine čestica manji što je veća temperatura ekstrakcije. S druge strane, gledajući samo najmanju frakciju, vidljivo je da ona dobro reagira na povišenje temperature kod ekstrakcije otapalom, dok kod UAE i MAE učinkovitost te frakcije ostaje ista ili se smanjuje bez obzira na povišenje temperature. Postoji više mogućih razloga za to: u literaturi [14] napominje se mogućnost resorpcije piperina kod najmanjih čestica prilikom ekstrakcije, a u radu Gorganija i sur. [16] napomenuto je da sitne čestice imaju manju sposobnost apsorpcije mikrovalnog zračenja, odnosno da se apsorbirana energija vrlo brzo gubi, pa je i sama ekstrakcija manje učinkoviti. Nadalje, prema rezultatima najmanje frakcije, učinkovitost pada za istu temperaturu (75 °C) od ekstrakcije otapalom preko UAE do MAE, tj. od najvećeg miješanja čestica i otapala do najmanjeg. Slabije miješanje je moglo dovesti do „sljepljivanja“ čestica, a posljedično je umanjeno prodiranje otapala do unutrašnjosti stanice, tj. manja je učinkovitost ekstrakcije.

Kod bijelog papra na slici 29 ekstrakcija otapalom daje vrlo dobre rezultate, puno bolje od crnog papra za sve veličinske frakcije. To se može objasniti već spomenutim utjecajem korice - crni papar ima koricu (iako je ona vjerojatno mehanički oslabljena jer su bobice fermentirale na suncu), a bijeli papar ne jer se on radi tako da se namakanjem u vodi bobicama potpuno odstranjuje korica, zbog čega je kod njega veća mogućnost prodiranja otapala do srži, tj. omogućuje se učinkovitija ekstrakcija. Kod svih ekstrakcija sve frakcije slijede teorijsko pravilo da se učinkovitost povećava s povišenjem temperature i smanjenjem veličine čestica (osim prve frakcije na mikrovalnoj ekstrakciji, no to se može pripisati eksperimentalnoj grešci). To znači da se kod ove vrste papra vidi utjecaj veličine čestica. Porast učinkovitosti ekstrakcije uočava se bez obzira na smanjenje masenog omjera uzorka i etanola. Pri manjem je masenom omjeru omogućeno da se više piperina otopi u istoj masi otapala jer je na taj način povećana pokretačka sila za međufazni prijenos tvari.



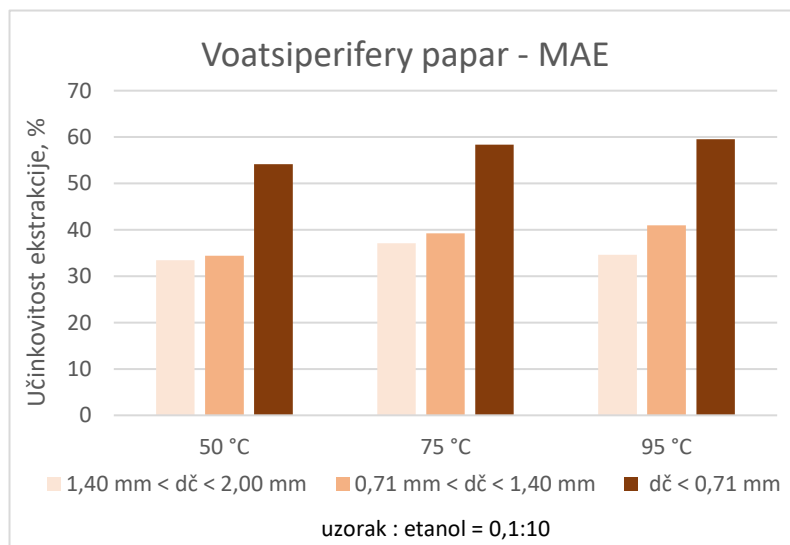
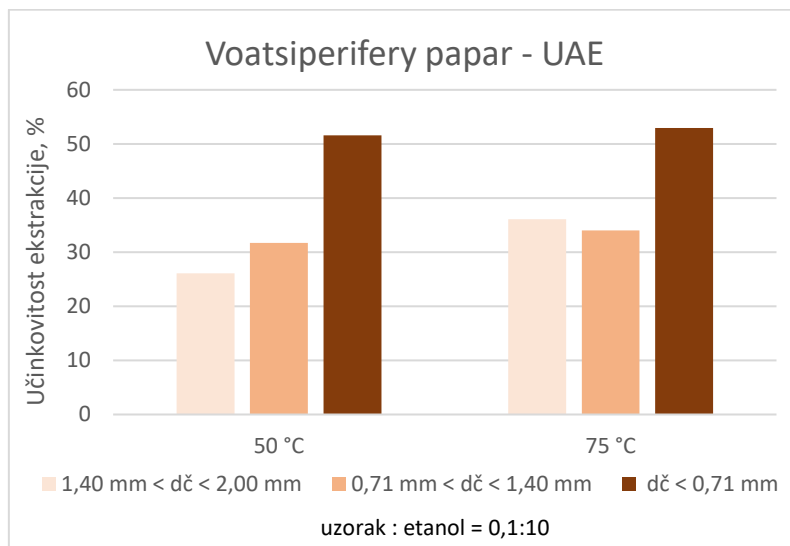
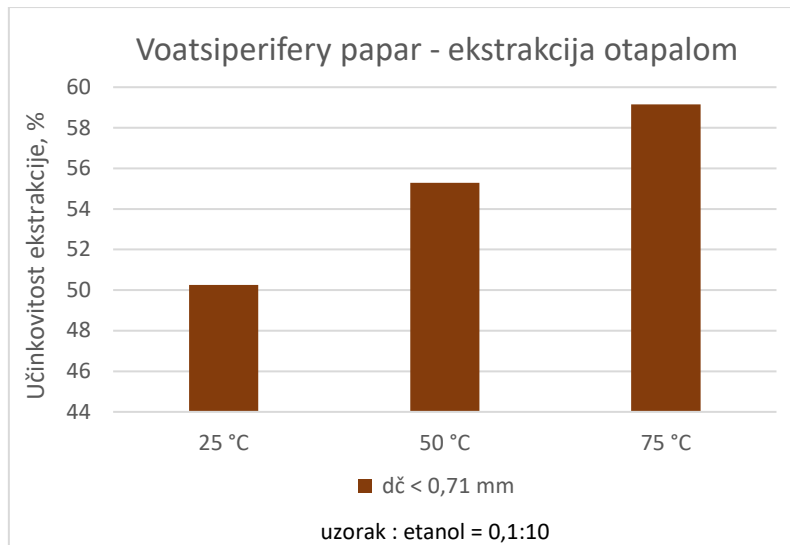
**Slika 29.** Učinkovitost svih ekstrakcija za bijeli papir (stupići s punom bojom - omjer 0,1:10, stupići s uzorkom – omjer 0,025:10, odnosno 0,05:10).



**Slika 30.** Učinkovitost svih ekstrakcija za zeleni papar (stupići s punom bojom - omjer 0,1:10, stupići s uzorkom – omjer 0,025:10, odnosno 0,05:10).

Kod zelenog papra može se primijetiti da različite metode ekstrakcije različito djeluju na iste veličinske frakcije, odnosno, za razliku od crnog i bijelog papra, na grafovima se može vidjeti utjecaj različitih metoda na ekstrakciju piperina. Naime, kod ekstrakcije otapalom rezultati su gotovo jednaki za temperature od 25 °C i 50 °C, dok je učinkovitost ekstrakcije veća za 10 % na temperaturi od 75 °C, što bi značilo da se piperin ekstrahira u većoj mjeri tek na višim temperaturama. Međutim, za istu veličinsku frakciju (najmanju) kod UAE vidi se poboljšanje od otprilike 10 % između 50 °C i 75 °C – što sugerira povoljan utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju – a kod MAE učinkovitost je gotovo ista za sve temperature, odnosno maksimalna ekstrakcija zbog povoljnog utjecaja mikrovalova postignuta je već na najmanjoj temperaturi. Takvi rezultati odgovaraju teorijskoj hipotezi da je metoda ekstrakcije bolja ako je nekonvencionalna, tj. ako prodiranju otapala pomažu i drugi čimbenici. Nadalje, kod UAE vidi se utjecaj veličine čestica, učinkovitost raste sa smanjenjem veličine (pretpostavlja se da bi tako bilo i da su omjeri uzorka i otapala isti). Iako se kod MAE čini da se utjecaj čestica gubi s povećanjem temperature jer je na 50 °C rast učinkovitosti pravilan, na 75 °C srednja i najmanja frakcija neznatno se razlikuju, a na 95 °C srednja frakcija značajno raste i veća je od najmanje, i to bi se moglo objasniti utjecajem veličine – najmanja frakcija zelenog papra je optimalna za ekstrakciju jer i pri najnižoj temperaturi reagira s otapalom u maksimalnoj mjeri. Prema rezultatima se čini da je mikrovalna ekstrakcija najučinkovitija metoda za ekstrakciju piperina iz zelenog papra.

Kod voatsiperifery papra na slici 31 najmanja frakcija pokazuje najveću učinkovitost na svim temperaturama i svim metodama ekstrakcije. To je najvidljiviji utjecaj veličine čestica od svih papra, a također se može povezati i s utjecajem korice – budući da bobice voatsiperifery papra imaju koricu, najusitnjenije čestice omogućuju bolje prodiranje otapala do srži bobice gdje se nalazi najveći dio piperina. Za prve dvije frakcije može se reći da su veličine čestica prevelike da bismo iz njih mogli ekstrahirati piperin. Uspoređujući rezultate za istu temperaturu (50 °C i 75 °C) i istu (najmanju) frakciju za sve tri ekstrakcije, oni su dosta slični, vidi se blago poboljšanje u ekstrakciji otapalom naprema ultrazvučnoj i mikrovalnoj ekstrakciji. Ovo upućuje na to da na ovu vrstu papra djelovanje mikrovalova i ultrazvuka nema značajan utjecaj, već da je za učinkovitost ekstrakcije značajnija temperatura. Najučinkovitija metoda ekstrakcije piperina iz ove vrste papra je mikrovalna ekstrakcija pri temperaturi od 95 °C za najmanju veličinsku frakciju, gdje je postignuta učinkovitost od 59,54 %. Odmah iza nje je ekstrakcija otapalom za istu frakciju pri temperaturi od 75 °C, za koju je učinkovitost 59,15 %.

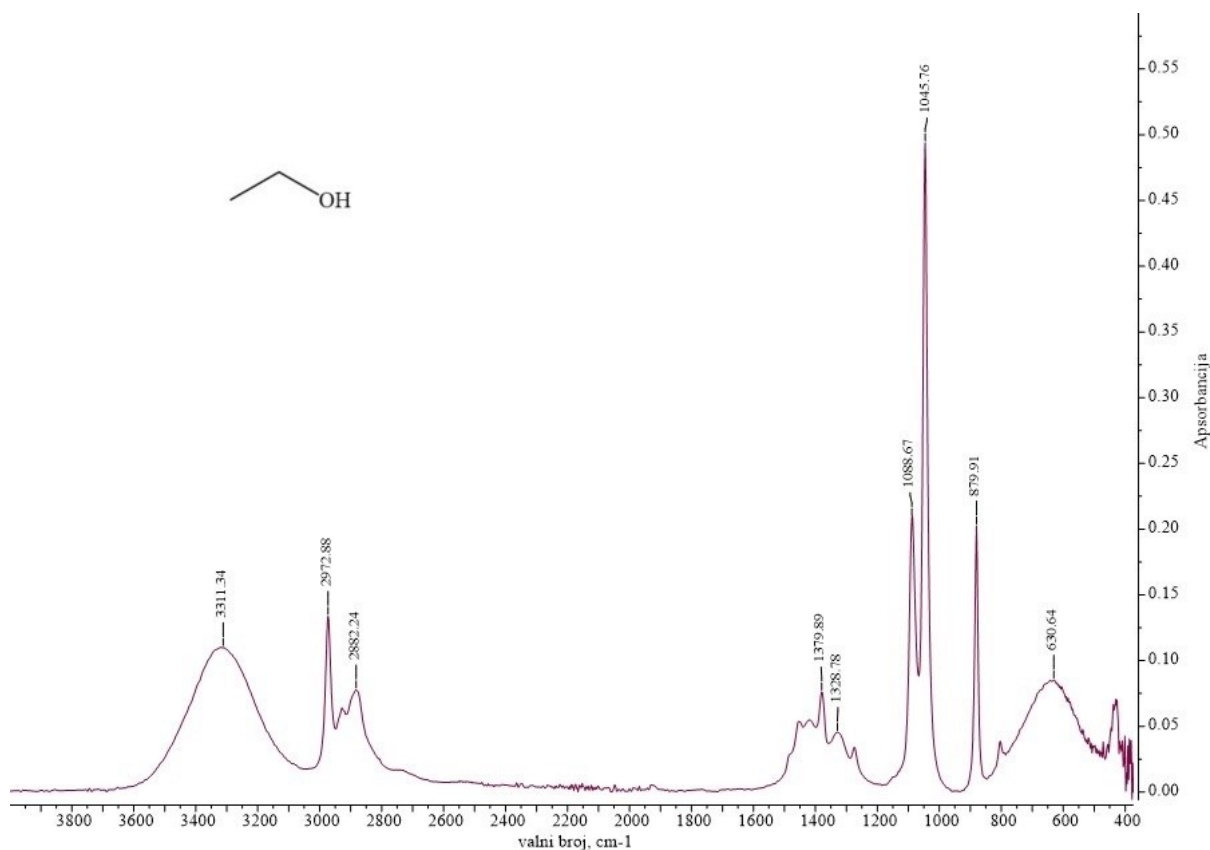


**Slika 31.** Učinkovitost svih ekstrakcija za voatsiperifery papar (svi uzorci u omjeru 0,1:10 naprema etanolu).



#### 4.4. FTIR spektri uzoraka

Funkcionalne skupine spojeva pristunih u ekstraktima dobivenih ekstrakcijom na magnetskoj miješalici, čistog etanola i standarda piperina analizirane su FTIR spektrometrom. Spektri etanola i piperina prikazani su na slikama 32 – 33, a oznake njihovih pikova u tablicama 5 – 6. Za označavanje pikova korištene su internetske baze podataka [26, 27]. Na slici 34 prikazana je usporedba ekstrahiranih uzoraka te čistog etanola i piperina.



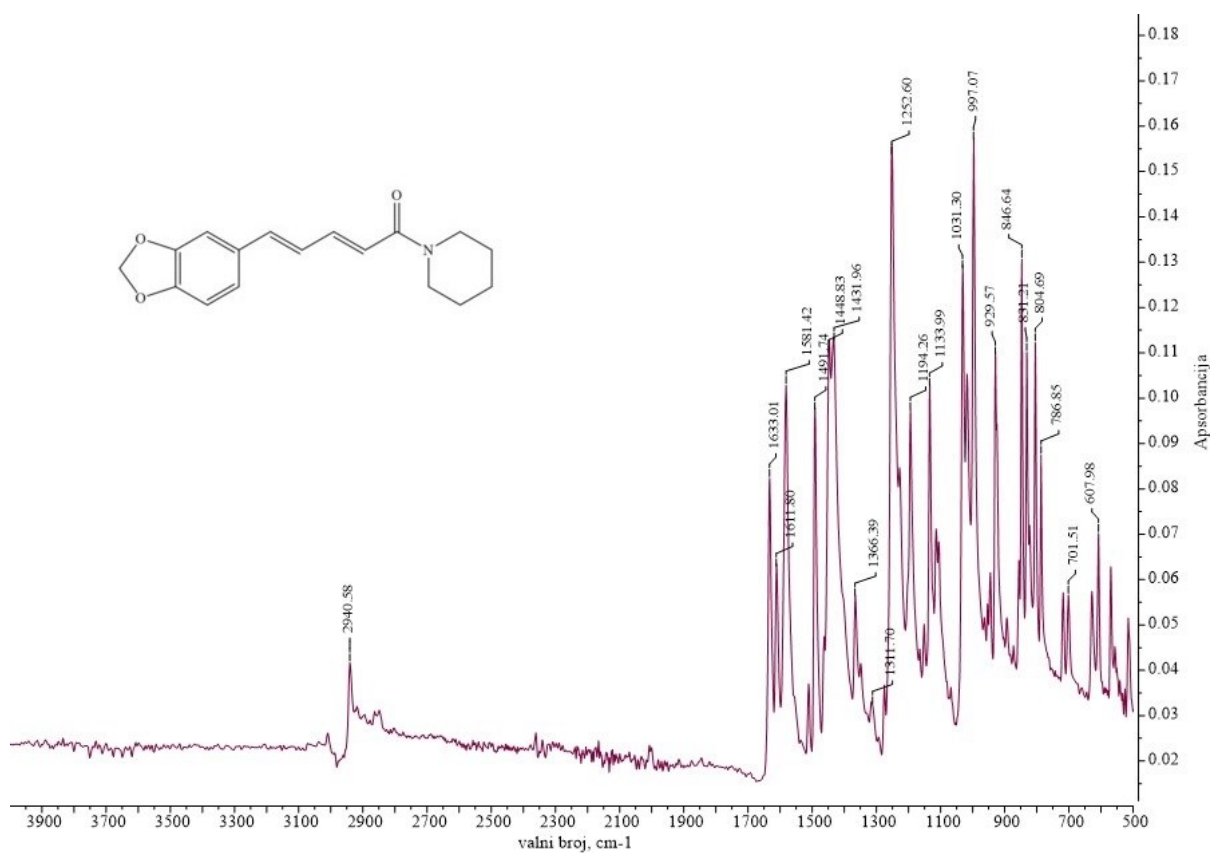
**Slika 32.** FTIR spektar etanola.

Na FTIR spektrima široki pik između 4000 cm<sup>-1</sup> i 3000 cm<sup>-1</sup> uvijek signalizira O-H vezu, u ovom slučaju etanola on označava alkoholnu skupinu. Oštar pik na 2972,88 cm<sup>-1</sup> i slabiji pik u tom području, 2888,24 cm<sup>-1</sup>, označavaju istezanje C-H veze, i to one koja se pojavljuje u jednostrukim C-H vezama. Na 1328,78 cm<sup>-1</sup> događa se savijanje O-H veze, što je pik karakterističan za alkohole, kao i oštar pik na 1088,19 cm<sup>-1</sup> koji označava istezanje C-O veze u primarnom alkoholu. Najoštriji i najsnažniji pik je C-C-O asimetrično istezanje na 1045,28 cm<sup>-1</sup>, a do njega je simetrično istezanje iste veze na 879,91 cm<sup>-1</sup>. Slično kao na početku spektra, gdje je bio širok pik koji je označavao istezanje O-H veze, na kraju spektra također se

nalazi široki pik koji označava O-H vezu, samo što je energija infracrvenog zračenja na tim valnim brojevima dovoljna samo za savijanje veze [26].

**Tablica 5.** Funkcionalne skupine etanola identificirane FTIR-om:

Valni broj, cm <sup>-1</sup>	Oznaka
3311,34	O-H istezanje
2972,88	C-H istezanje
2888,24	C-H istezanje
1379,89	C-O istezanje
1328,78	O-H savijanje
1088,19	C-O istezanje
1045,28	C-C-O asimetrično istezanje
879,91	C-C-O simetrično istezanje
627,26	O-H savijanje



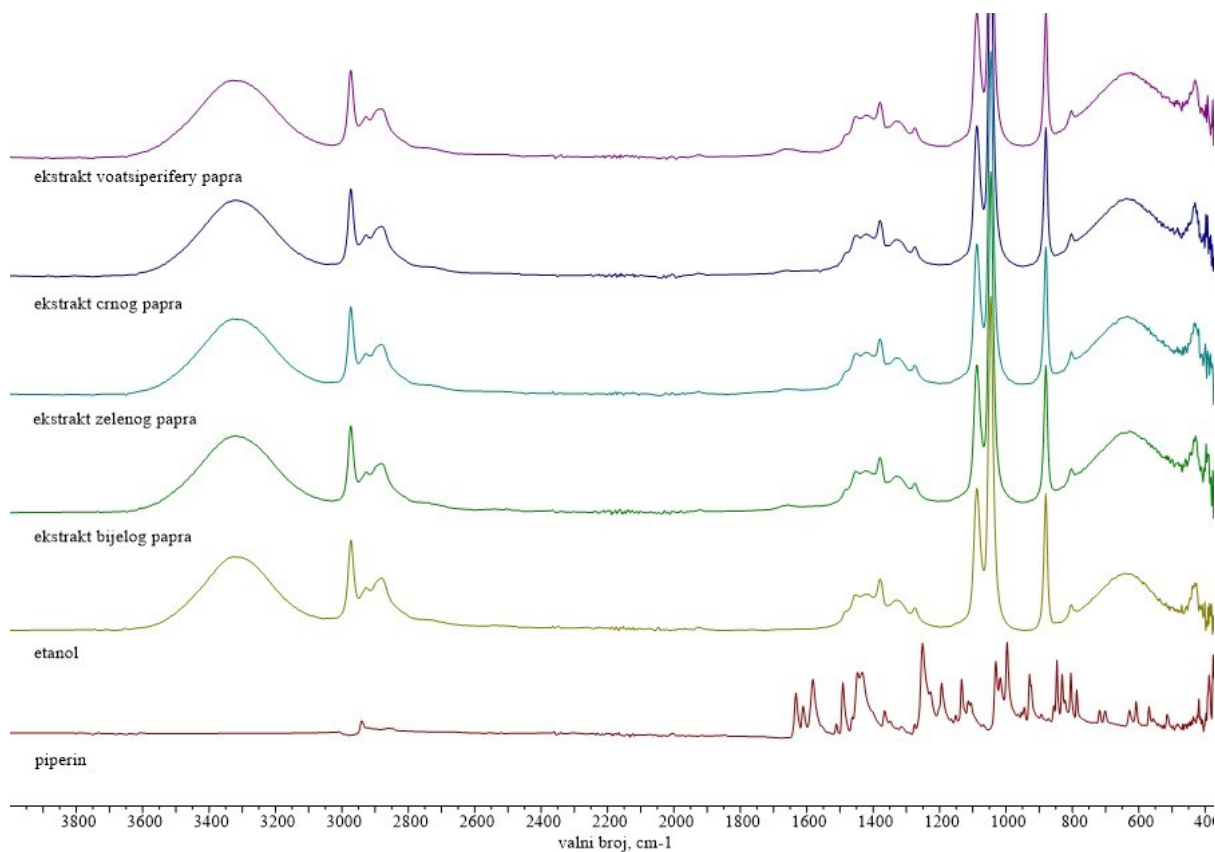
**Slika 33.** FTIR spektar piperina.

**Tablica 6.** Funkcionalne skupine piperina identificirane FTIR-om:

Valni broj, $\text{cm}^{-1}$	Oznaka
2940,58	C-H istežanje
1633,01	C=C istežanje
1611,80	aromatsko istežanje C=C
1581,42	N-C=O istežanje
1491,74	aromatsko istežanje C=C
1448,83	CH <sub>2</sub> savijanje u metilendioksi grupi
1431,96	C=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> deformacija i savijanje
1366,39	C-H savijanje
1311,70	C-N istežanje
1252,60	asimetrično =C-O-C istežanje u metilendioksi grupi
1194,26	asimetrično =C-O-C istežanje u metilendioksi grupi
1133,99	savijanje fenilnog C-H
1031,30	simetrično =C-O-C istežanje u metilendioksi grupi
997,07	C-H savijanje trans -CH=CH-
929,57	C-O istežanje u metilendioksi grupi
846,64	C-H savijanje
831,21	C-H savijanje
804,69	C-H savijanje
786,85	C-H savijanje
701,51	C-H savijanje
607,98	C-H savijanje

Na slici 33 oštar pik na  $2940,58 \text{ cm}^{-1}$  označava istežanje C-H veze, koja dolazi od alifatskog dijela molekule. Potom se na nižim valnim brojevima nalazi niz oštih i snažnih pikova: na  $1633,01 \text{ cm}^{-1}$  događa se istežanje C=C veze u alkenskom dijelu molekule, a odmah pokraj njega na  $1611,80 \text{ cm}^{-1}$  istežanje C=C veze u benzenskom prstenu (to se događa i na  $1491,74 \text{ cm}^{-1}$ ). Slijedi istežanje veze karbonilnog amida (N-C=O), a na  $1448,83 \text{ cm}^{-1}$  savijanje CH<sub>2</sub> veze u metilendioksi grupi. Vrlo snažan i oštar pik na  $1252,60 \text{ cm}^{-1}$  i do njega pik na  $1194,26 \text{ cm}^{-1}$  označavaju asimetrično istežanje =C-O-C veze u metilendioksi grupi, a simetrično istežanje iste veze događa se na  $1031,30 \text{ cm}^{-1}$ . Između njih je pik na  $1133,99 \text{ cm}^{-1}$

za savijanje C-H veze u fenilnom dijelu molekule. Najsnažniji pik na  $997,07\text{ cm}^{-1}$  označava savijanje C-H veze od CH=CH veza u trans-položaju. Blizu njega na  $929,57\text{ cm}^{-1}$  je C-O istežanje u metiledioksi grupi, a potom do kraja spektra slijede savijanja C-H veza [26, 27].



**Slika 34.** Usporedba FTIR spektara ekstrakta svih papra, otapala etanola i standarda piperina.

Etanolski ekstrakti svih papara s magnetske miješalice, ekstrakcija provedena na  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uspoređeni su sa spektrima etanola i piperina. Prisutnost piperina je potvrđena HPLC-om, no na FTIR spektrima ekstrakata papra funkcionalne skupine piperina se ne vide, jer je spektar etanola znatno većeg intenziteta. Može se primijetiti samo maleni pik na  $1654\text{ cm}^{-1}$  koji bi mogao odgovarati piperinu budući da ga u spektru etanola nema.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provodila se ekstrakcija piperina iz četiriju različitih papra korištenjem četiriju različitih metoda ekstrakcije, a kao selektivno otapalo odabran je etanol. Svi papri usitnjeni su i podijeljeni na tri veličinske frakcije. Soxhlet ekstrakcijom i UV/Vis spektroskopijom utvrdila se ukupna količina piperina u paprima, te su rezultati pokazali su da piperina najviše ima u zelenom papru, a slijede ga crni, bijeli i voatsiperifery papar.

Zbog različitih masenih omjera uzorka i otapala u eksperimentima ne može se utvrditi koja je najučinkovitija metoda ekstrakcije, no s obzirom da je korištenjem manjeg masenog omjera (kod bijelog i zelenog papra) učinkovitost ekstrakcija već bila zadovoljavajuća, može se zaključiti da bi kod većeg omjera i učinkovitost bila veća. Gledajući rezultate svih ekstrakcija, može se primijetiti da, unatoč tome što je konvencionalna metoda, ekstrakcija otapalom pri 75 °C za najmanju veličinu čestica daje vrlo dobre rezultate za sve papre, jednake ili veće učinkovitosti od UAE i MAE za istu ili čak višu temperaturu. Iz ovog se može zaključiti da mikrovalno zračenje i ultrazvučne vibracije nemaju toliki pozitivni utjecaj na proces koliko brzina miješanja čestica papra i otapala, koja je bila najveća u ekstrakciji otapalom.

Gledajući utjecaj temperature, vidljivo je da učinkovitost raste s povišenjem temperature u svim ekstrakcijama. Ovakvi rezultati potvrđuju teorijsku pretpostavku da procesu pogoduje viša temperatura. Što se tiče utjecaja veličine čestica, najmanja frakcija daje općenito najbolje rezultate, što također potvrđuje teoriju, no kod crnog i zelenog papra primjećuje se da se utjecaj veličine čestica smanjuje s porastom temperature.

Zaključeno je da je bijeli papar optimalan izbor za ekstrakciju piperina jer ima zadovoljavajuću količinu tog spoja, a jeftiniji je od zelenog papra, i također pokazuje najveću sklonost ekstrakciji, tj. ima najbolje rezultate učinkovitosti svih ekstrakcija.

## 6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Abs	apsorbancija
AU	atomska jedinica
$d_c$	veličina čestica
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i> )
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourirerovom transformacijom (engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPTLC	tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>High Performance Thin – Layer Chromatography</i> )
MAE	ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. <i>Microwave – Assisted Extraction</i> )
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. <i>Ultrasound – Assisted Extraction</i> )
UV/Vis	ultraljubičasto i vidljivo zračenje (engl. <i>Ultra Violet; Visible</i> )

## 7. LITERATURA

- [1] Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R., Arnason, J. T., A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action, *Phytochemistry Reviews*, 7 (2007) 65-75.
- [2] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=46518> (pristup 5. studenog 2022.)
- [3] Abdallah, E. M., Abdalla, W. E., Black pepper fruit (*Piper nigrum* L.) as antibacterial agent: A mini-review, *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6 (2018) 141-145.
- [4] <https://www.agrifarming.in/black-pepper-farming> (pristup 5. studenog 2022.)
- [5] Kolovrat, M., Zajedno u rodu, a bitno različiti - papar, *Meso*, 9 (2007) 177-180.
- [6] Ravindran, P. N., Kallapurackal, J. A., *Handbook of Herbs and Spices*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, 2012., 86-115.
- [7] <https://safram.hr/papar-sarena-mjesavina-mlin/> (pristup 6. studenog 2022.)
- [8] <http://www.essentialoil.in/black-pepper-oleoresin.html> (pristup 6. studenog 2022.)
- [9] <https://naturashop.com.hr/605-piperin-crni-papar-vege-kapsule-100-kapsula.html> (pristup 6. studenog 2022.)
- [10] [https://www.amazon.com/Black-Pepper-Essential-Oil-Therapeutic/dp/B00PX9L4O4/ref=sr\\_1\\_2?keywords=Pepper+Oil&qid=1667729637&sr=8-2](https://www.amazon.com/Black-Pepper-Essential-Oil-Therapeutic/dp/B00PX9L4O4/ref=sr_1_2?keywords=Pepper+Oil&qid=1667729637&sr=8-2) (pristup 6. studenog 2022.)
- [11] Quijia, C. R., Araujo, V. H., Chorilli, M., Piperine: Chemical, biological and nanotechnological applications, *Acta Pharmaceutica*, 71 (2021) 185-213.
- [12] Tiwari, A., Mahadik, K. R., Gabhe, S. Y., Piperine: a comprehensive review of methods of isolation, purification and biological properties, *Medicine in Drug Discovery*, 7 (2020) 100027.
- [13] Sander, A., *Ekstrakcija, interno predavanje*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.

- [14] Goločorbin-Kon, S., Ekstraktivni preparati, interno predavanje, Medicinski fakultet, Novi Sad, 2011.
- [15] Rathod, S. S., Rathod, V. K., Extraction of piperine from *Piper longum* using ultrasound, *Industrial Crops and Products*, 58 (2014) 259-264.
- [16] Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Nikzad, M., Sequential Microwave-Ultrasound-Assisted Extraction for Isolation of Piperine from Black Pepper (*Piper nigrum* L.), *Food and Bioprocess Technology*, 10 (2017) 2199-2207.
- [17] Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F., Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2383-2389.
- [18] Opačak, A., Ekstrakcija piperina iz različitih vrsta papra: odabir ekološki prihvatljivog otapala, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2023.
- [19] <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=63120> (pristup 20. kolovoza 2023.)
- [20] Drmić, H., Režek Jambrak, A., Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2 (2010) 22-33.
- [21] Strieder, M., Silva, E. K., Angela, M., Meireles, A., Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-assisted Extraction of Natural Colorants, *Food and Public Health*, 9 (2019) 45-52.
- [22] Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F., Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3 (2011) 32-47.
- [23] Raman, G., Gaikar, V. G., Microwave-Assisted Extraction of Piperine from *Piper nigrum*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41 (2002) 2521-2528.
- [24] 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.
- [25] 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.



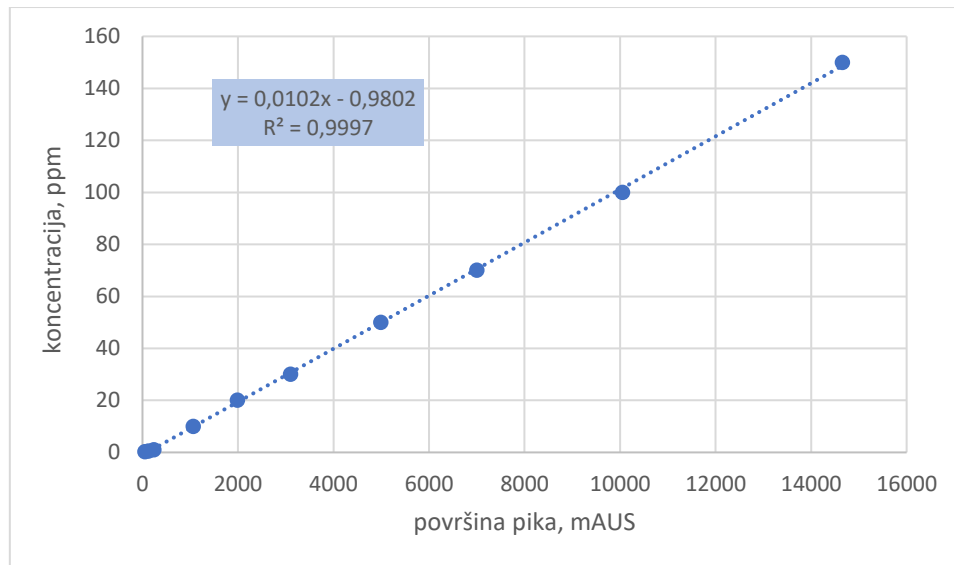
[26] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table> (pristup 13. rujna 2023.)

[27] White, C., *Infrared Analysis of Piperine in Black Pepper*, Atenski tehnički koledž, Atena, 2001.

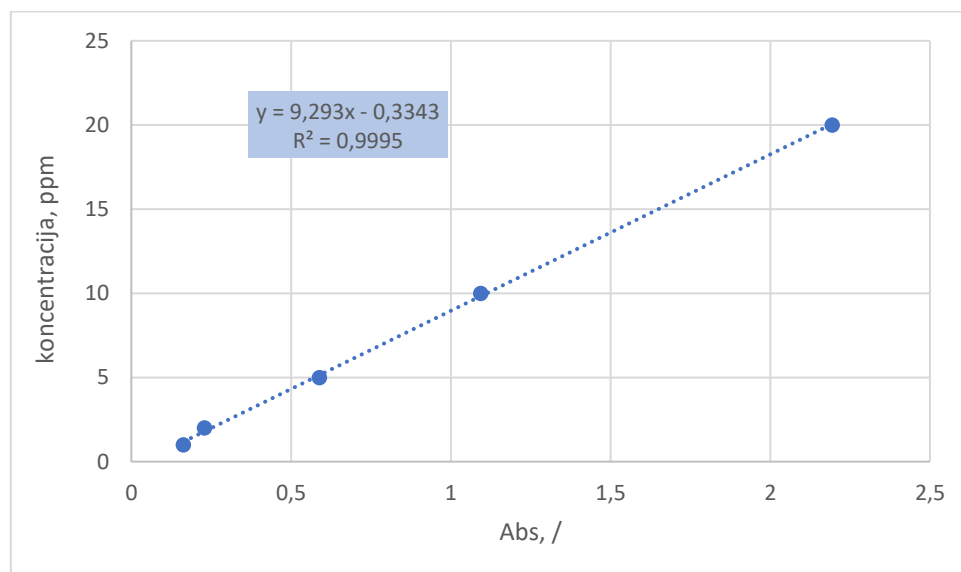
[28] Namjoyan, F., Hejazi, H., Ramezani, Z., Evaluation of Drying Process on the Composition of Black Pepper Ethanolic Extract by High Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detector, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7 (2012) 163-167.

## 8. PRILOZI

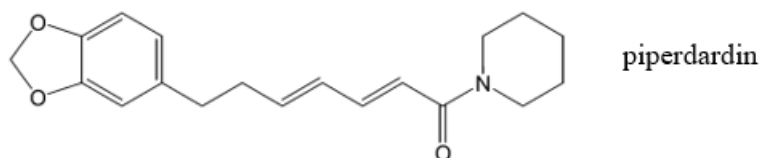
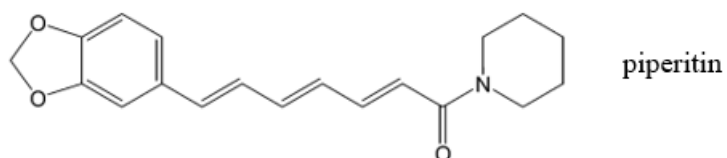
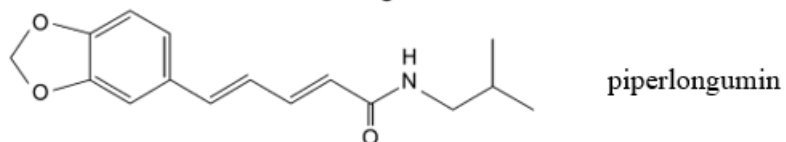
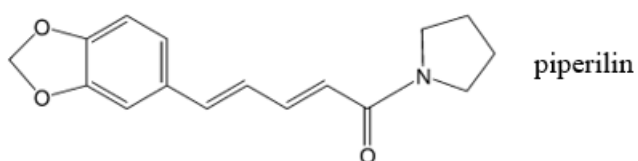
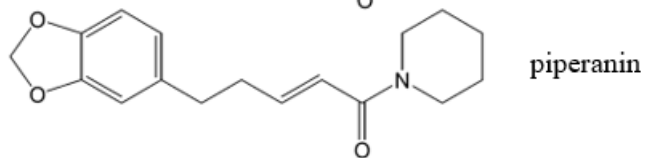
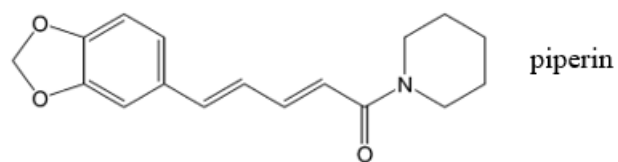
**Prilog 1.** Baždarni pravac piperina napravljen na HPLC-DAD-u.



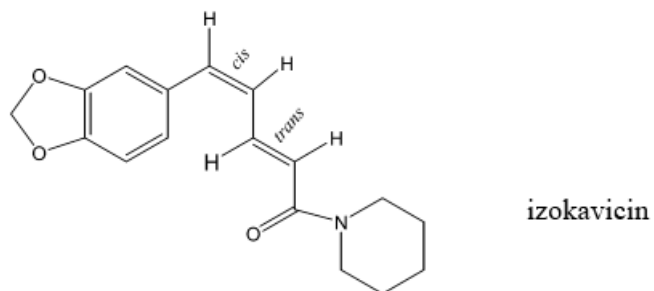
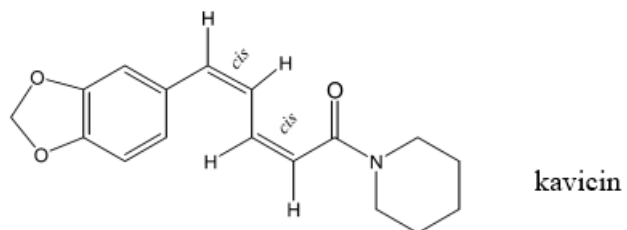
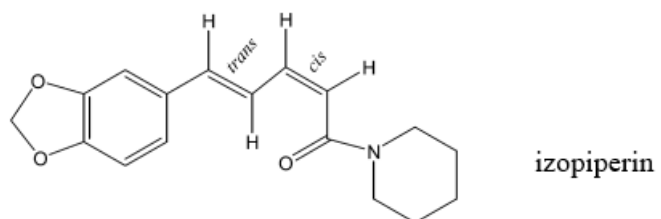
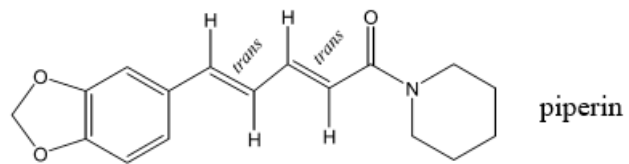
**Prilog 2.** Baždarni pravac piperina napravljen na UV/Vis spektrometru.



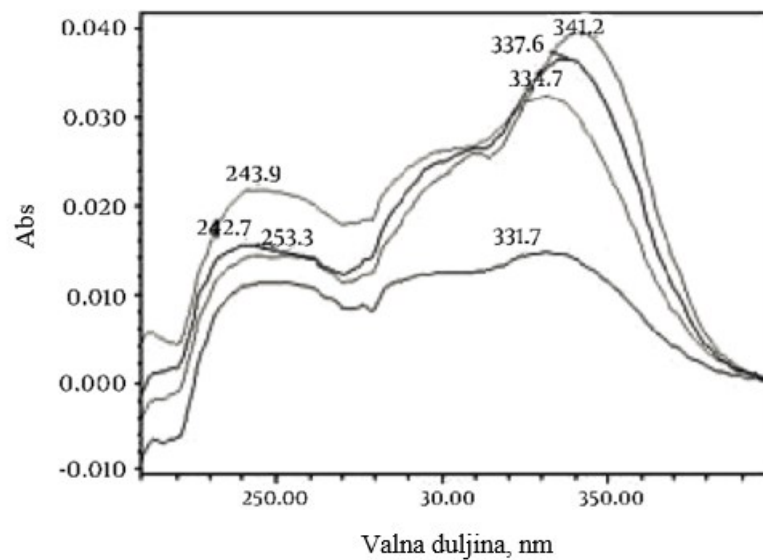
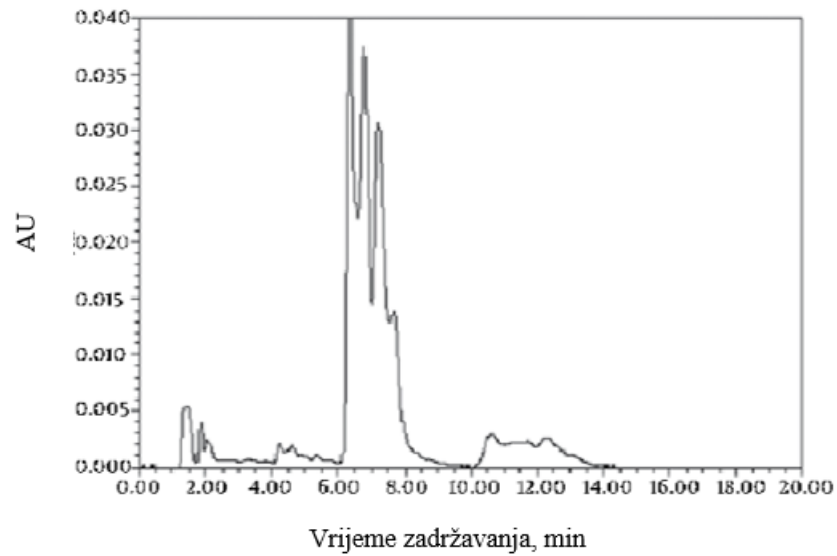
**Prilog 3.** Piperamidi pronađeni u paprima [25].



**Prilog 4.** Izomeri piperina [25].



**Prilog 5.** HPLC-DAD kromatogram etanolskog ekstrakta crnog papra i UV/Vis spektar četiriju najvećih pikova (na 341,2 nm apsorbira piperin, a na 337,6 nm, 334,7 nm i 331,7 nm njegovi izomeri) [28].



## ŽIVOTOPIS

Katarina Belošević rođena je u Zagrebu 5. 10. 1997. Nakon završenog gimnazijskog obrazovanja upisuje 2016. preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odrađuje na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo na Odjelu na predmete opće uporabe. Akademske godine 2019./2020. odlazi na bilateralnu studentsku razmjenu u Sankt Peterburg i osvaja Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad. 2020. završava preddiplomski studij obranom rada pod nazivom *Svojstva grafena pripremljenog eksfolijacijom persulfatom interkaliranog grafita u obradi voda* pod vodstvom doc. dr. sc. Marina Kovačića. Potom upisuje diplomski studij istog smjera. Ljetni semestar 2022./2023. godine provela je na studijskom boravku na INP-u u Toulouseu. U obliku posterskog priopćenja s diplomskim radom 2023. sudjeluje na znanstveno-stručnom skupu 28. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera. Govori engleski i francuski.