

# Istraživanje upotrebe odabranih otapala u pripremi alternativnih kiselobaznih indikatora

---

**Samardžija, Mia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:548748>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Mia Samardžija

**Istraživanje upotrebe odabranih otapala u pripremi alternativnih  
kiselobaznih indikatora**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Mia Samardžija

**Istraživanje upotrebe odabranih otapala u pripremi alternativnih  
kiselobaznih indikatora**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2022.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Odjel za kemiju****Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****ISTRAŽIVANJE UPOTREBE ODABRANIH OTAPALA U PRIPREMI  
ALTERNATIVNIH KISELO-BAZNIH INDIKATORA****Mia Samardžija****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Mentor:** doc. dr. sc. Ana Amić**Sažetak**

U kemiji se otapala gotovo uvijek koriste bilo kao medij u kojem se odvija reakcija ili kao sam sudionik reakcije. Otapala vrlo često služe i za ekstrakciju biljnih pigmenata poput antocijanina. Takvi pigmenti u različitim pH sredinama pokazuju širok spektar boja poput crvene, ružičaste, ljubičaste, plave, žute, zelene pa čak i sive. Upravo to omogućuje uporabu biljnih materijala bogatih antocijaninima i polifenolima kao alternativnih kiselo-baznih indikatora. Cilj rada bio je istražiti uporabu odabranih otapala u pripremi alternativnih kiselo-baznih indikatora. Biljni materijali koji su se koristili bili su svježi, suhi i voćne prerađevine. Voćne prerađevine koje su se koristile sadržavale su najveći mogući sadržaj odabranog biljnog materijala, bez dodanog drugog voća, umjetnih bojila i drugih potencijalnih kiselo-baznih indikatora. Rezultati istraživanja pokazuju vrlo visok potencijal korištenja određenih otapala u pripremi alternativnih kiselo-baznih indikatora. Biljni materijali koji su se vizualno najbolje istakli su aronija, crna malina, crni ribiz, crni dud i borovnica.

**Diplomski rad obuhvaća:** 90 stranica, 88 slika, 13 tablica, 57 literaturna navoda i 1 prilog**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** pH / biljni materijal / bioaktivne tvari / antocijanini / prirodni indikatori**Rad prihvaćen:** 4. 7. 2022.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, mentorica i članica
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, članica
4. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Chemistry****Graduate University Study of Chemistry; Research study****Scientific Area: Natural Sciences****Field: Chemistry****STUDY OF THE APPLICATION OF SELECTED SOLVENTS IN THE  
PREPARATION OF ALTERNATIVE ACID-BASE INDICATORS****Mia Samardžija****Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
**Supervisor:** Assist. Prof. Ana Amić, PhD**Abstract**

In chemistry, solvents are frequently used either as a medium for the reaction or as a participant in the reaction itself. Solvents are often used to extract plant pigments such as anthocyanins. These pigments in different pH environments show a wide range of colors such as red, pink, purple, blue, yellow, green and even gray. This is precisely what makes plant material rich in anthocyanins and polyphenols appropriate to be used as alternative acid-base indicators. The aim of this thesis was to explore the use of selected solvents in the preparation of alternative acid-base indicators. Used plant materials were fresh, dry and fruit products. Used fruit products contained the highest possible content of selected plant material, without other fruits, artificial colors or other potential acid-base indicators. The research results show a very high potential of using certain solvents in the preparation of alternative acid-base indicators. The plant materials that visually stand out the best are chokeberries, black raspberries, blackcurrants, black mulberries and blueberries.

**Thesis includes:** 90 pages, 88 figures, 13 tables, 57 references, 1 appendix**Original in:** Croatian**Keywords:** pH / plant material / bioactive substances / anthocyanins / natural indicators**Thesis accepted:** 4. 7. 2022.**Reviewers:**

1. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, supervisor and member
3. Assoc. Prof. Mirela Samardžić, PhD, member
4. Assist. Prof. Aleksandar Sečenji, substitute member

**Thesis deposited:** at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Kiselo–bazni indikatori .....	2
2.2. Alternativni kiselo-bazni indikatori .....	3
2.2.1. Bioaktivni spojevi u biljkama .....	9
2.3. Otopala u kemiji .....	16
2.3.1. Otopala u ekstrakciji bioaktivnih tvari .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Ispitivani biljni materijal .....	19
3.2. Kemikalije i pribor .....	19
3.3. Preliminarno ispitivanje .....	20
3.3. Priprema otopina određene pH vrijednosti .....	21
3.4. Priprema biljnog materijala.....	21
4. REZULTATI .....	24
4.1. Rezultati preliminarnog ispitivanja .....	24
4.2. Jagodičasto voće.....	36
4.2.1. Jagoda ( <i>Fragaria sp. L.</i> ) .....	36
4.2.2. Šumska jagoda ( <i>Fragaria vesca L.</i> ) .....	38
4.2.3. Kupina ( <i>Rubus sp. L.</i> ) .....	39
4.2.4. Malina ( <i>Rubus ideaus L.</i> ) .....	41
4.2.5. Crna malina ( <i>Rubus idaeus occidentalis L.</i> ) .....	43
4.2.6. Bijeli dud ( <i>Morus alba L.</i> ) .....	44
4.2.7. Crni dud ( <i>Morus nigra L.</i> ) .....	46
4.2.8. Crveni dud ( <i>Morus rubra L.</i> ) .....	48
4.3. Bobičasto voće.....	50
4.3.1. Brusnica ( <i>Vaccinium sp. L.</i> ) .....	50
4.3.2. Borovnica ( <i>Vaccinium myrtillus L.</i> ) .....	52
4.3.3. Crni ribiz ( <i>Ribes nigrum L.</i> ) .....	54
4.3.4. Crveni ribiz ( <i>Ribes rubrum L.</i> ) .....	56
4.3.5. Ružin šipak ( <i>Rosa sp. L.</i> ) .....	58
4.3.6. Vinova loza ( <i>Vitis vinifera L.</i> ) .....	60
4.4. Dodatno voće .....	62
4.4.1. Aronija ( <i>Aronia melnocarpa (Michx.) Elliott</i> ) .....	62
4.4.2. Drenjina ( <i>Cornus mas L.</i> ) .....	63

4.4.3. Goji bobica ( <i>Lycium sp.</i> L.) .....	65
4.4.4. Korintska groždica ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	66
4.4.5. Tayberry bobica ( <i>Rubus fruticosus</i> × <i>Rubus idaeus</i> ) .....	67
4.5. Voćne prerađevine .....	68
4.5.1. Džem .....	68
4.5.1.1. Džem od divljih brusnica .....	68
4.5.1.2. Džem od borovnica .....	69
4.5.2. Sok .....	70
4.5.2.1. Sok od šumske borovnice .....	70
4.5.2.2. Sok od šumske brusnice .....	71
4.5.3. Vино .....	72
4.5.3.1. Vино od maline .....	72
4.5.3.2. Vино od crvenog ribiza .....	73
5. RASPRAVA .....	74
6. ZAKLJUČAK .....	84
7. LITERATURNА VRELA .....	86
8. PRILOG .....	89
8.1. Životopis .....	89

## 1. UVOD

Jedna od najčešće korištenih komponenata u laboratorijskom radu, bilo u nastavi kemije ili u znanstveno-istraživačkom radu, svakako su otapala. Koriste se kao reakcijski medij ili kao sam sudionik kemijske reakcije. Često se koriste i kao medij za ekstrakciju bioaktivnih tvari, a njihova učinkovitost u tome ovisi o svojstvima samih otapala. Jedno od najčešće korištenih otapala je voda, ali se u ekstrakciji bioaktivnih tvari češće koriste druga otapala, kao što su etanol i aceton, bilo sama ili razrijeđena vodom. Otapala se koriste i u pripremi indikatora, primjerice kiselo-baznih indikatora koji svoju primjenu imaju i u istraživanjima i u školskim pokusima. Međutim, ovi indikatori često su skupi i nedostupni, a neki od njih su opasni za zdravlje i okoliš. Stoga je cilj ovoga rada bio ispitati mogućnost primjene konvencionalnih otapala u pripremi alternativnih kiselo-baznih indikatora. Takvi indikatori imali bi veliku mogućnost primjene primjerice u školi, pogotovo zbog niže cijene i veće dostupnosti.

U prvom dijelu rada opisani su konvencionalni kiselo-bazni indikatori i pH vrijednosti pri kojima mijenjaju boju. Također, nabrojani su i opisani neki od najčešće korištenih alternativnih kiselo-baznih indikatora te je dan kratak pregled njihovih svojstava. Na samom kraju prvog dijela rada, nabrojana su i opisana otapala korištena u ovom radu.

U drugom dijelu rada prvo je dan pregled korištenih materijala i metoda. Nabrojan je biljni materijal te opisan plan rada. Korišteni biljni materijal bilo je jagodičasto i bobičasto voće, a biljni materijal je ispitan u obliku svježeg i suhog voća te odabranih prerađevina. Nadalje, prikazani su rezultati istraživanja upotrebe odabranog biljnog materijala kao potencijalnog alternativnog kiselo-baznog indikatora. Prema planu rada, prvo je napravljeno preliminarno istraživanje kako bi utvrdili naprikladnija otapala, njihov omjer u odnosu na masu biljnog materijala te koncentracije samih otapala (odnosno omjer otapala i vode) koji su onda korišteni u daljem radu. Dobiveni rezultati su prikazani slikama te prodiskutirani, a pokazali su da odabrani biljni materijal i korištena otapala imaju veliki potencijal primjene u pripremi alternativnih kiselo-baznih indikatora.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kiselo-bazni indikatori

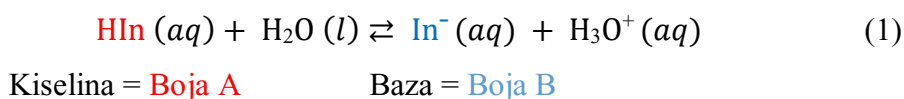
Kiselo-bazni indikatori su spojevi koji na neki način, primjerice promjenom boje, ukazuju na pH medija u kojem se nalaze (Tablica 1.). Na primjer, kako bi fizikalna promjena u točki ili oko točke ekvivalencije bila uočljiva, u titracijsku otopinu se dodaje indikator. Kod točke ekvivalencije dolazi do promjene relativnih koncentracija analita i titranta koje su uzrok promjene boje (strukture) indikatora. Neke od tipičnih promjena su nastajanje ili nestajanje boje, promjena boje i nastanak ili nestanak zamućenja otopine. Osim kiselo-baznih indikatora, neki od uobičajenih indikatora su redoks indikatori, indikatori za kompleksometrijske titracije, taložni te adsorpcijski indikatori [1].

Tablica 1. Prikaz kiselo-baznih indikatora i njihovih promjena boje [2].

Indikatori	Boja u kiseloj otopini	Boja u bazičnoj otopini	Raspon pH
<b>Timol plava (prva promjena)</b>	Crvena	Žuta	1,2-2,8
<b>Metil oranž</b>	Crvena	Žuta	3,2-4,4
<b>Bromkrezol zelena</b>	Žuta	Plava	3,8-5,4
<b>Metil crveno</b>	Žuta	Crvena	4,8-6,0
<b>Bromtimol plavo</b>	Žuta	Plava	6,0-7,6
<b>Fenol crveno</b>	Žuta	Crvena	6,8-8,4
<b>Timol plava (druga promjena)</b>	Žuta	Plava	8,0-9,6
<b>Fenoftalein</b>	Bezbojna	Magenta	8,2-10,0

Kiselo-bazni indikatori su slabe kiseline ili slabe baze koje mijenjaju boju ovisno o promjeni koncentracije oksonijskih ( $H_3O^+$ ) iona u vodenoj otopini. Takva vrsta indikatora najčešće se koristi u titracijama za dokazivanje krajnje točke reakcije. Osim toga, neki od njih mogu se koristiti i za određivanje pH vrijednosti otopine [2].

Ako je indikator slaba kiselina ( $HI_n$ ), ravnoteža u otopini se postiže prema kemijskoj jednadžbi (1):



Iz jednadžbe (1) možemo zaključiti da je HIn kiselina, a In<sup>-</sup> baza. Kod niskog pH, koncentracija H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> je poprilično visoka, što pomiče ravnotežu reakcije u lijevo, stvarajući boju A. Pri visokom pH, koncentracija H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> je poprilično niska, što pomiče ravnotežu reakcije u desno, stvarajući boju B [2].

Primjer indikatora slabe kiseline je fenolftalein, koji je bezbojan kao slaba kiselina, ali disocijacijom u vodi stvara anion crveno-ljubičaste (magenta) boje. U kiseloj otopini, ravnoteža je pomaknuta ulijevo, pa dominira kisela forma fenolftaleina i otopina je bezbojna, a povećavanjem pH ravnoteža se pomiče udesno, dominira anion i otopina postaje crveno-ljubičasta [2].

## 2.2. Alternativni kiselo-bazni indikatori

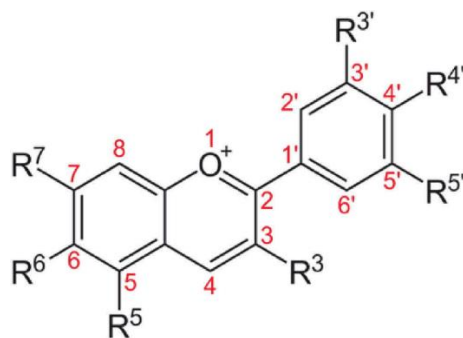
Postoji mnogo biljaka koje se mogu koristiti kao alternativni kiselo-bazni indikatori. Samo neke od njih su cikla, borovnica, kupina, trešnja, curry prah, latice geranija, grožđe, luk, listovi divljeg kestena, latice petunije, crveni (ljubičasti) kupus, latice ruže, kurkuma i dr. Ove biljke sadrže razne biljne pigmente, primjerice antocijanine, koji su osjetljivi na pH, što ih čini savršenim za ispitivanje kiselosti i bazičnosti otopine [3].

Jedan od najpopularnijih alternativnih kiselo-baznih indikatora je crveni kupus (*Brassica oleracea var. capitata F. rubra*). Listovi crvenog kupusa sadrže antocijanine koji su osjetljivi na promjenu pH vrijednosti što omogućuje primjenu otopine crvenog kupusa kao kiselo-baznog indikatora. U kiselom mediju otopina ima crvenu ili ružičastu boju, u neutralnom mediju je ljubičasto-plave boje dok u bazičnom mediju otopina postaje zelene ili žute boje (Slika 1.). Ovako izražene promjene boje omogućuju primjenu otopine crvenog kupusa u točnijem utvrđivanju pH vrijednosti medija. Upravo to je jedan od razloga zašto je crveni kupus jedan od najzastupljenijih prirodnih indikatora [4].



Slika 1. Promjene boje indikatora od crvenog kupusa pri različitim pH vrijednostima [5].

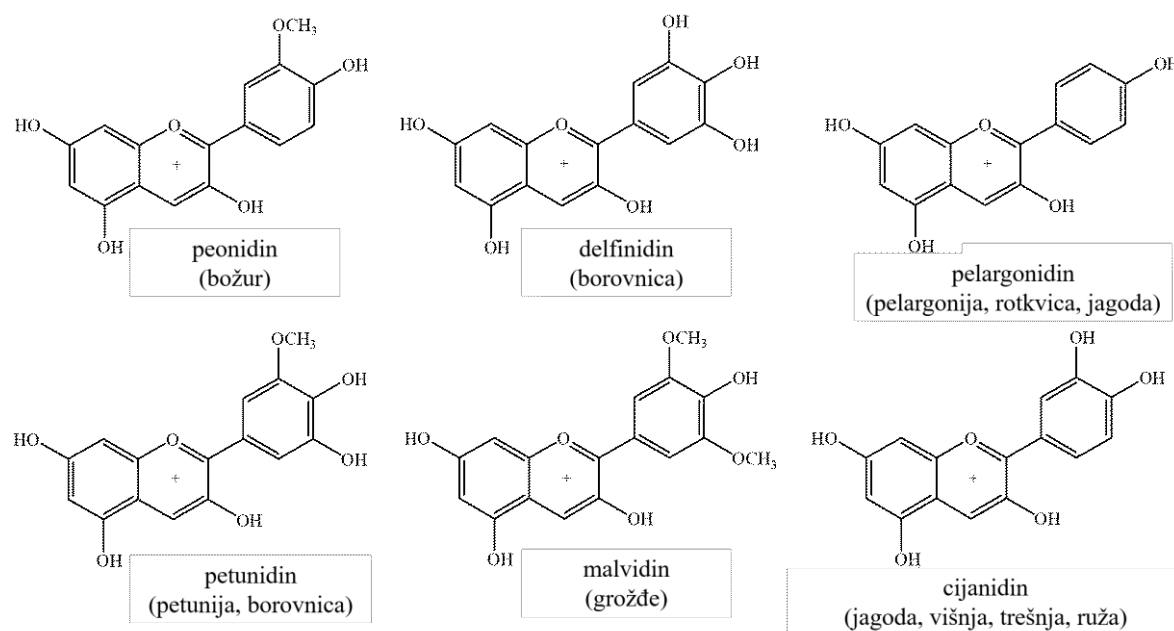
Antocijanini djeluju kao antioksidansi kako u namirnicama u kojima se nalaze tako i u organizmu. Nalaze se uglavnom u kožici, osim u određenim vrstama crvenog voća, poput trešnje i jagode, gdje se nalaze u mesu ploda. Biosinteza antocijana bila je jedna od prvih grana metabolizma propanoida za koju su identificirani biosintetski enzimi i odgovarajući transkripcijski faktori. Imaju karakteristična fizikalno-kemijska svojstva koja im daju jedinstvenu boju i stabilnost. Također, vrlo su reaktivni i podložni reakcijama razgradnje. Izloženost kisiku, visokim temperaturama, svjetlosti, i promjenama pH vrijednosti mogu utjecati na njihovu stabilnost i boju [6]. Opća strukturna formula antocijanina prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Strukturna formula antocijanina [7].

Antocijanini su glikozidni polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilija, koji sadrže dva benzilna prstena. Obično sadrže jednu glikozidnu vezu, ali mogu sadržavati dva, tri ili više ugljikohidrata vezanih na različitim mjestima ili kao bočni lanci oligosaharida. Također, na boju plodova utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina. Ukoliko je prisutno više hidroksilnih skupina boja će biti plavkasta, dok prisutnost

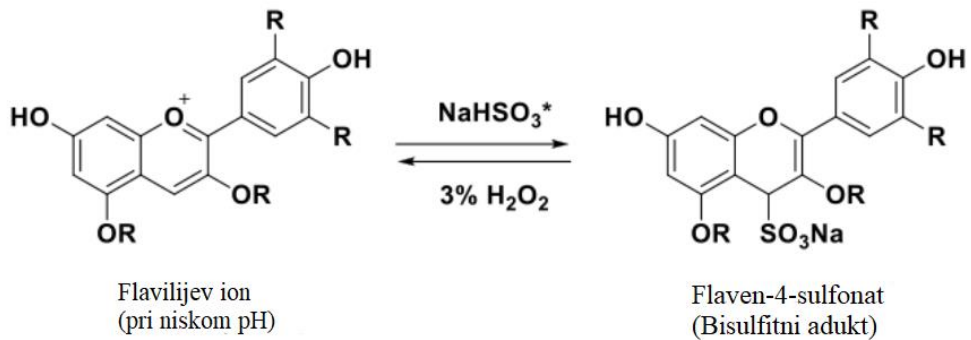
metoksilnih skupina stvara crvenkastu boju [6]. Neki od glavnih antocijanina prikazani su na Slici 3.



Slika 3. Strukture glavnih antocijanina [8].

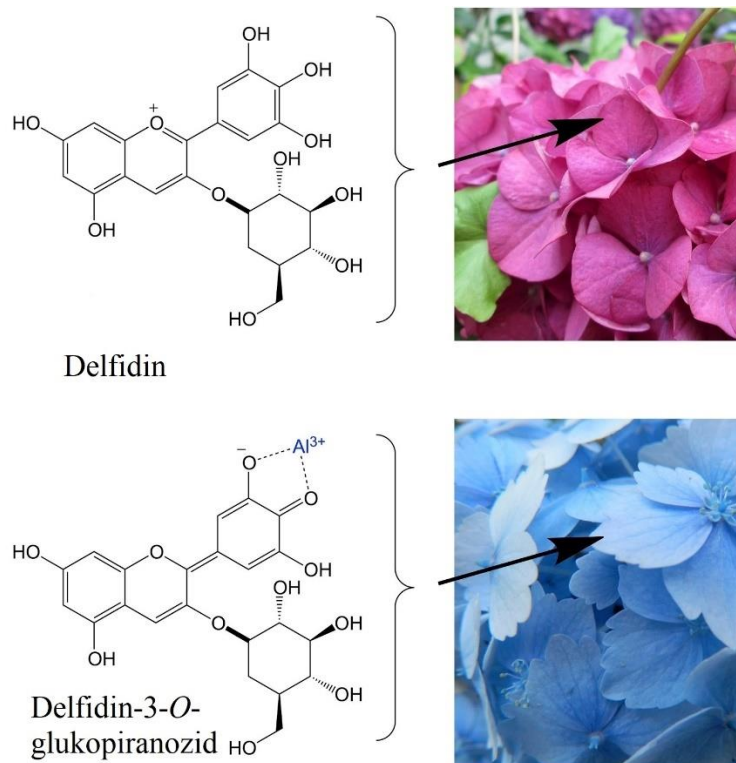
Antocijanin delphinidin odgovoran je za ljubičasto-plavo obojenje biljke dok su petunidin i malvidin zaslužni samo za ljubičastu boju biljke. Nadalje, cijanidin je odgovoran za magenta ili tamnocrveno obojenje biljke, a peonidin za magenta boju biljke. Losos narančastu boju biljkama daje antocijanin pelargonidin [6].

Nadalje, osim kao kiselo-bazni indikator, crveni kupus se može koristiti kao sredstvo za otkrivanje prisutnosti određenih iona. Jedan od njih je bisulfitni ion koji se nalazi u određenim sortama vina kako bi poboljšao okus, boju i aromu vina. Naime, u kiselim uvjetima flavilijevi ioni (crvena boja), dobiveni iz antocijana, reagiraju s bisulfitnim ionima dajući flaven-4-sulfonat, točnije bisulfitni adukt [9]. Nastali sulfonati su bezbojni, kao što je prikazano na Slici 4.



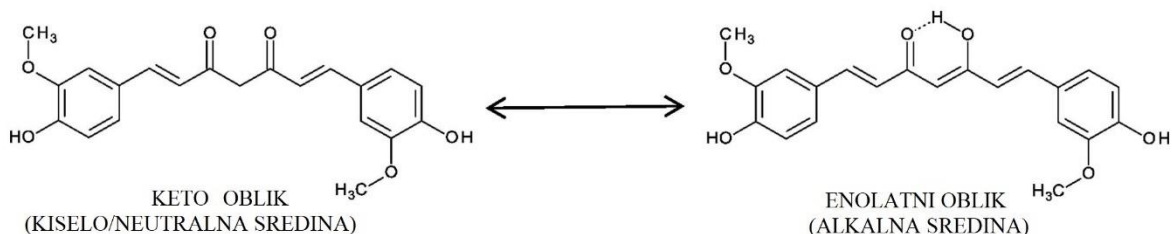
Slika 4. Promjene boje povezane s reverzibilnom reakcijom antocijana s bisulfitnim ionima u vodi [9].

Može se reći da je interakcija metalnih iona i antocijana odgovorna za boju raznolikog cvijeća, a jedan od primjera je hortenzija (*Hydrangea macrophylla* L.). Antocijanin zaslužan za boju cvijetova hortenzija je delfinidin koji u kiselom tlu iznimno bogatom  $\text{Al}^{3+}$  ionima stvara kompleks delfinidin-3-*O*-glukopiranozid što dovodi do nastanka plavog obojenja cvijeta hortenzije. Ključna komponenta aluminijskog kompleksa je anhidrobazni oblik delfinidina koji omogućuje vezanje antocijana na  $\text{Al}^{3+}$  ion [9]. Za razliku od kiselog tla, u bazičnom tlu  $\text{Al}^{3+}$  iona gotovo da ni nema te ne dolazi do stvaranja kompleksa i cvijetovi hortenzije bivaju obojeni u crveno dok u neutralnom tlu imaju ljubičasto obojenje (Slika 5.) [9].



Slika 5. Strukture boja hortenzija [9].

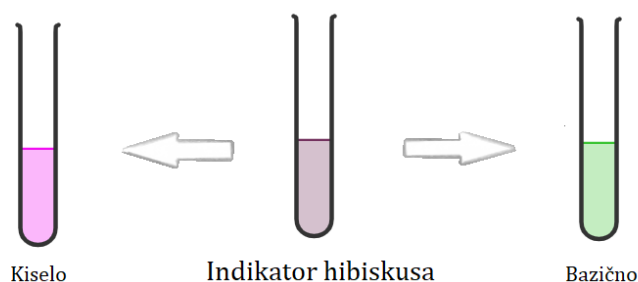
Još jedan od primjera alternativnih kiselo-baznih indikatora je svijetložuti prah kurkume (*Curcuma longa* L.). Pigment odgovoran za boju naziva se kurkumin te se promjena boje događa pri pH vrijednosti 7,4-8,6. Promjene u strukturi molekule kurkumina prikazane su na Slici 6. U kiselom ili neutralnom mediju otopina postaje žuta, dok u bazičnom mediju otopina postaje narančasta do crvenkasto-smeđa. Koristi se kao indikator u obliku kurkuma papira ili otopine [10].



Slika 6. Promjene u molekuli kurkumina u kiseloj/neutralnoj i bazičnoj sredini [10].

Također, cvijet hibiskusa (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) je jedan od primjera alternativnih kiselo-baznih indikatora. Crveni cvjetovi hibiskusa pomiješaju se s vodom te na taj način

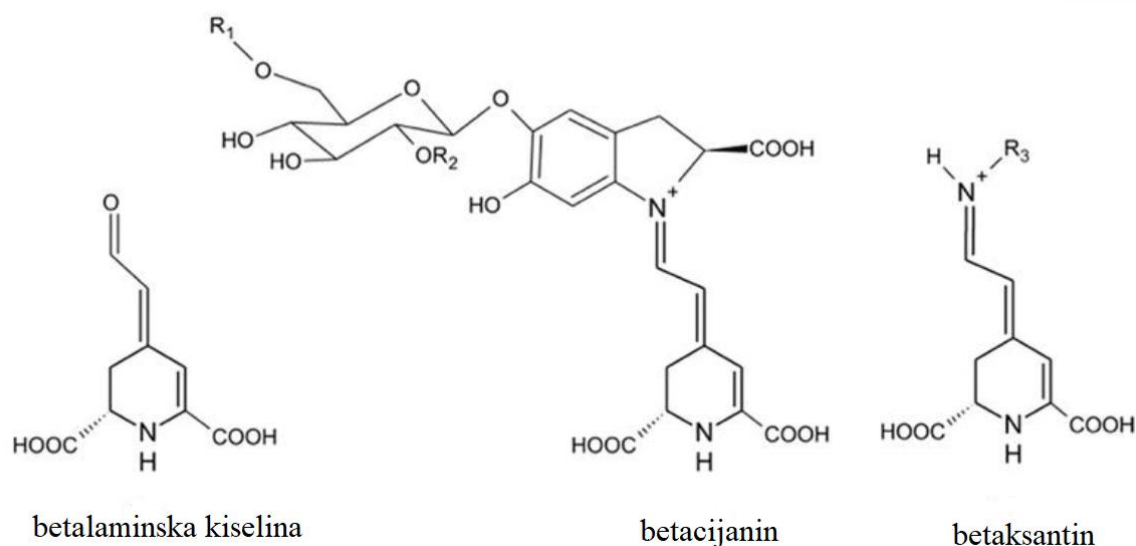
pripremljena otopina može poslužiti kao kiselo-bazni indikatori. Dodatkom tople vode na laticu cvjetova otopina postaje blago ružičasta. Ukoliko se takav indikator izloži kiseloj sredini otopina postaje intenzivno ružičaste točnije magenta boje, no kada se ista otopina izloži bazičnoj sredini otopina postaje zelene boje, kao što je prikazano na Slici 7. [11].



Slika 7. Promjena boje indikatora hibiskusa.

Naposljetku, cikla (*Beta vulgaris* L.) također pripada alternativnim kiselo-baznim indikatorima. Bogata je betalainima te je svrstana u biljke s najvećom antioksidativnom aktivnošću. Betalaini su heterociklički spojevi koji se nalaze u podzemnom dijelu biljke te su odgovorni za njegovu crveno-ljubičastu boju, a osim toga upravo ovi spojevi djeluju kao antioksidansi. Pripadaju skupini etalaina i stabilni su u kiselim do neutralnim sredinama. Izloženost svjetlu i visokim temperaturama te prisutnost kisika samo su neki od čimbenika koji utječu na stabilnost ovih spojeva [11].

Betalaini nastaju iz perkusora, betalaminske kiseline, a dosad je identificirano preko 50 različitih struktura betalaina. Osnovnu strukturu betalaina čini betalaminska kiselina na kojoj se nalaze razni supstituenti, na primjer vodikov atom ili neki složeniji supstituent. Razlika u prisutnom supstituentu rezultat je različitih izvora ovih pigmenta i uvjetuje nijansu pigmenta i njegovu stabilnost. Prema kemijskoj strukturi, betalaini se dijele u dvije podskupine. Odgovorni za narančasto-žutu boju su betaksantini, dok su betacijanini odgovorni za crveno-ljubičastu boju [11]. Opće strukture betalaminske kiseline, betacijanina i betaksantina prikazane su na Slici 8.



Slika 8. Opće strukture betalaminske kiseline, betacijanina i betaksantina [12].

### 2.2.1. Bioaktivni spojevi u biljkama

Bioaktivni spojevi su nehranjivi spojevi koje se nalaze u biljkama te se još nazivaju fitokemikalije ili fitotvari. Identificirano je više od tisuću različitih fitotvari u različitim biljkama i njihovim plodovima. U fiziologiji bilja pripadaju produktima sekundarnog metabolizma, točnije tvarima koje biljka ne treba za primarne potrebe poput rasta i reprodukcije. Samo neki od njih su resveratrol iz vina, likopen iz rajčice, izoflavoni iz soje te flavonoidi iz voća. Biljkama su potrebni, između ostalog, kao zaštita ili obrana od nametnika, bolesti i vremenskih uvjeta [12].

Fitotvari imaju različite mehanizme djelovanja, a jedan od njih je zasigurno antioksidativna aktivnost. Većina fitotvari ima antioksidativnu aktivnost čime pruža zaštitu stanicama od oksidativne štete uzrokovane suvišnim slobodnim radikalima. Neke od najistaknutijih skupina fitotvari prema antioksidativnom djelovanju su karotenoidi, flavonoidi te polifenoli [12].

Fitotvari se ugrubo mogu podjeliti u četiri skupine. Prvi od njih su polifenoli u koje se ubrajaju antocijanini, flavonoidi, flavoni i flavanoli, izoflavonoidi, lignani, fenolne kiseline, stilbenoidi, tanini i mnogi drugi. Druga skupina fitotvari su teprenoidi u koje se ubrajaju monoterpenoidi, iridoidi, seskviterpenoidi, seskviterpenski laktoni, diterpenoidi, itd. Treću skupinu fitotvari čine alkaloidi, glikozidi i ostale dušikove tvari te se u njih ubrajaju betalain, indol, izotiocijanati, izokinolin, pirolidin i piperidini, kinolin, purini i pirimidini i ostali.



Posljednju skupinu fitotvari čine organske kiseline kao što su katehini, kurkumin, dialil sulfid, disulfidi, trisulfidi, izotiocijanati, ftalidi, poliacetileni i mnogi drugi [12].

Fitotvari predmet su brojnih istraživanja, pa su tako Boccalon i sur. (2022.) ispitali primjenu krumpirovog škroba kojem je dodan ekstrakt cijanidina iz crvenog luka u izradi filmova koji bi poslužili kao senzori za detekciju kakvoće hrane. Cijanidin iz luka mijenja boju filma ovisno o pH medija, čime ukazuje na kvarenje hrane i mogao bi poslužiti kao zamjena za sintetske pigmente. Dodatna prednost ovako pripremljenih indikatora je biorazgradivost, budući da je glavna građevna komponenta škrob [13].

Etxabide i sur. (2021.) ispitali su primjenu prirodnih prehrambenih indikatora (kurkumina, betanina i antocijanina) u proizvodnji pametne ambalaže. Ispitali su stabilnost i varijabilnost boje otopine pri različitim uvjetima skladištenja i pH vrijednostima. Utvrdili su da je kurkumin pri pH većim od 9 fotosenzitivan jer je primijećen gubitak boje od 67 % nakon dana skladištenja. Preostala dva su pokazala veću stabilnost jer je primijećen gubitak boje od oko 30 % nakon 28 dana skladištenja. Utvrdili su i da antocijanin pokazuje širok raspon boja, odnosno da boja pri nekoj pH vrijednosti ovisi o tipu i koncentraciji ispitivanih spojeva [14].

Huang i sur. (2021.) pripremili su i ispitali svojstva kolorimetrijskog indikatorskog filma na bazi antocijanina. Radili su s agaroznim matriksom u koji su inkorporirani antocijanini iz ljubičastog slatkog krumpira, a ekstrakciju antocijanina proveli su pomoću zakiseljene alkoholne otopine (50 % etanol, 1 % HCl). Ovako pripremljen indikator poslužio bi u praćenju kakvoće i svježine hrane [15].

Najčešće korištene biljke za pripremu indikatora svježine hrane na bazi antocijanina su crveni kupus i ljubičasti slatki krumpir, kojima se bavi oko 35 % svih istraživanja ove vrste, budući da sadrže visoku koncentraciju cijanidina i peonidina [16, 17]. Osim njih, brojna istraživanja se bave kupinom, grožđem, crnom sojom [18], patlidžanom [19] i crnom šljivom [20]. Osim biljnog materijala, u radovima se koriste i ostaci nastali pri proizvodnji sokova, na primjer pri preradi duda, borovnica, kupina i aronije [21-26].

Osim toga, Szadkowski i sur. (2022.) su proveli sintezu i karakterizaciju novih organsko-anorganskih pH indikatora sačinjenih od antrakinona i minerala. U ispitivanju su koristili alizarin i purpurin, a utvrdili su da prirodni pigmenti imaju izraženu jaku pH osjetljivost te se njihova boja mijenja ovisno o izloženosti HCl i/ili NH<sub>3</sub>. Purpurin se pokazao pogodnijim budući da je pokazao manju migraciju s polimera (oko šest puta manja koncentracija u etanolu nakon 14 dana) [27].

Phenol-Explorer je prva baza podataka o sadržaju polifenola u biljkama i u hrani. Baza sadrži više od 35000 vrijednosti za 500 različitih polifenola u više od 400 namirnica. Ovi podaci proizlaze iz sustavnog prikupljanja više od 60000 vrijednosti izvornih sadržaja objavljenih u više od 1300 znanstvenih publikacija. Razvijen je u Nacionalnom institutu za poljoprivredna istraživanja (fra. *Institut national de la recherche agronomique*, INRA) u suradnji s Francuskom agencijom za sigurnost hrane (fra. *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, AFSSA), Sveučilištem Alberta, Sveučilištem u Barceloni te Međunarodnom agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) [28].

U Tablicama 2.-11. su prikazane vrijednosti koncentracije najzastupljenijih antocijanina i srednje vrijednosti izražene u mg/100 g, minimuma, maksimuma i standardne devijacije (oznaka SD) za biljni materijal korišten u ovom radu. Navedene eksperimentalne vrijednosti su dobivene metodom kromatografije. U ovoj bazi nema podataka za šumsku jagodu, grožđe (*Rose*), crni, crveni i bijeli dud, ružin šipak, goji, drijen te korintsku grožđicu i tayberry bobicu.

Tablica 2. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj jagodi [29-32].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
Antocijanini	pelargonidin-3- <i>O</i> -(6"-suknil-glukozid)	10,44	0,00	31,31	8,10
	pelargonidin-3- <i>O</i> -glukozid)	47,14	20,28	68,27	14,60
Flavanoli	(+)-katehin	6,36	1,57	18,74	5,46
Flavonoli	kvercetin-3- <i>O</i> -glukuronid	1,74	1,74	1,74	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
Hidroksibenzojeve kiseline	4-hidroksibenzojeva kiselina-4- <i>O</i> -glukozid	1,53	0,60	3,40	1,62
	elaginska kiselina	1,24	0,00	4,10	0,80
	elaginska kiselina glukozid	2,85	1,49	6,03	1,12
Hidroksicimetne kiseline	5-kafeoil kininska kiselina	1,93	0,00	2,90	1,67
	<i>p</i> -kumaroil glukozid	4,36	0,37	8,74	2,24

Legenda: min – minimum, max – maksimum, SD – standardna devijacija. Srednja vrijednost izražena je u mg/100g.

Tablica 3. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj kupini [33-35].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -(6"-dioksalil-glukozid)	10,97	3,57	19,34	5,63
	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	138,72	85,21	190,62	37,07
	cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	8,86	1,34	13,81	5,03
	cijanidin-3- <i>O</i> -ksilozid	9,74	4,60	17,81	5,29
<b>Flavonoli</b>	kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	4,10	1,20	8,04	2,48
	kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	3,89	0,00	24,00	8,37
	kvercetin-3- <i>O</i> -ksilozid	1,28	0,00	2,51	0,83
	kvercetin-3- <i>O</i> -ksilozil-glukuronid	2,37	0,62	5,69	1,95
<b>Fenolne kiseline</b>					
	elaginska kiselina	43,67	20,00	69,00	24,54
	galna kiselina	4,67	2,00	9,00	3,79
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	3-kafeoil kininska kiselina	4,53	4,10	5,20	0,59

Tablica 4. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj crvenoj malini [35-37].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	14,89	0,00	30,50	6,78
	cijanidin-3- <i>O</i> -soforozid	37,61	0,00	106,23	26,25
<b>Flavonoli</b>	(-)-epikatehin	5,05	0,30	8,26	3,76
	kvercetin 3- <i>O</i> -rutinozid	11,0	11,00	11,00	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	lambertianin C	30,84	30,84	30,84	0,00
	sanguin H-6	76,10	76,10	76,10	0,00

Tablica 5. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježem crnom ribizu [38-40].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	25,07	12,48	51,78	13,34
	cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	160,78	93,34	241,10	52,33
	delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	86,68	54,20	113,21	24,33
	delfinidin-3- <i>O</i> -rutinozid	304,91	197,41	409,19	78,70
<b>Flavanoli</b>	kvercetin 3- <i>O</i> -rutinozid	4,65	4,65	4,65	0,00
	miricetin-3- <i>O</i> -glukozid	2,71	2,71	2,71	0,00
	miricetin-3- <i>O</i> -rutinozid	3,14	3,14	3,14	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2,61	2,61	2,61	0,00
	kvercetin 3- <i>O</i> -rutinozid	4,65	4,65	4,65	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	4-hidroksibenzojeva kiselina 4- <i>O</i> -glukozid	0,73	0,40	1,30	0,49
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	3-kafeoil kininska kiselina	4,30	3,80	4,80	0,50
	3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	1,73	1,30	2,10	0,40
	kofeoil glukoza	2,79	1,90	4,18	1,04
	feruloil glukoza	1,30	1,10	1,50	0,20
	<i>p</i> -kumaroil glukoza	1,13	1,00	1,40	0,23

Tablica 6. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u vinu crvenog ribiza [41].

Flavonoidi		srednja vrijednost	min	max	SD
<b>Flavonoli</b>	kaempferol	0,05	0,05	0,05	0,00
	miricetin	0,15	0,15	0,15	0,00
	kvercetin	0,24	0,24	0,24	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,48	0,48	0,48	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0,45	0,45	0,45	0,00

Tablica 7. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježem crvenom ribizu [33, 39, 42, 43].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	3,37	0,16	6,57	4,53
	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozil-rutinozid	4,23	0,82	7,64	4,82
	cijanidin-3- <i>O</i> -sambubiozid	9,47	4,38	14,57	7,21
	cijanidin-3- <i>O</i> -ksilozil-rutinozid	11,22	11,22	11,22	0,00
<b>Flavanoli</b>	(+)-katehin	1,27	1,22	1,33	0,08
	(+)-galokatehin	1,28	1,22	1,35	0,09
	prodelphinidin dimer B3	1,70	1,70	1,70	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	4-hidroksibenzojeva kiselina 4- <i>O</i> -glukozid	1,03	0,90	1,30	0,23
<b>Stilbeni</b>					
<b>Stilbeni</b>	resveratrol	1,57	1,57	1,57	0,00

Tablica 8. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj borovnici [42].

Flavonoidi		Srednja vrijednost	Min	Max	SD
<b>Flavonoli</b>	kvercetin	1,27	1,27	1,27	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	ferulična kiselina	2,30	2,30	2,30	0,00

Tablica 9. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj (američkoj) brusnici [43-44].

Flavonoidi		srednja vrijednost	min	max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid	4,47	4,47	4,47	0,00
	cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid	8,89	8,89	8,89	0,00
	peonidin-3- <i>O</i> -arabinozid	9,61	9,61	9,61	0,00
	peonidin-3- <i>O</i> -galaktozid	22,02	22,02	22,02	0,00
	peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	4,16	4,16	4,16	0,00
<b>Flavonoli</b>	kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid	6,17	6,17	6,17	0,00
	miricetin-3- <i>O</i> -arabinozid	5,30	5,30	5,30	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -arabinozid	4,94	4,94	4,94	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	10,81	10,81	10,81	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	benzojeva kiselina	48,10	48,10	48,10	0,00
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	kavena kiselina	2,31	0,38	4,25	2,74
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,08	0,00	2,16	1,53

Tablica 10. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u džemu od brusnice [45].

Flavonoidi		srednja vrijednost	min	max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,58	1,42	1,74	0,23
	delfinidin-3- <i>O</i> -galaktozid	2,03	1,75	2,32	0,40
	delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	2,24	2,04	2,43	0,28
	malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	3,14	3,07	3,21	0,10
	peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	2,50	2,21	2,79	0,41
	petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,96	1,86	2,07	0,15

Tablica 11. Najzastupljeniji bioaktivni spojevi u svježoj aroniji [38, 43].

Flavonoidi		srednja vrijednost	min	max	SD
<b>Antocijanini</b>	cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid	252,76	132,91	372,62	169,50
	cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid	557,67	125,63	989,70	610,99
	cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	19,64	1,69	37,60	25,39
	cijanidin-3- <i>O</i> -ksilozid	45,90	43,76	48,05	3,03
	pelargonidin-3- <i>O</i> -arabinozid	2,14	2,14	2,14	0,00
<b>Flavonoli</b>	kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	46,46	46,46	46,46	0,00
	kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	41,95	41,95	41,95	0,00
<b>Fenolne kiseline</b>					
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	kavena kiselina	141,14	141,14	141,14	0,00

### 2.3. Otapala u kemiji

Otapala su heterogena skupina kemijskih tvari koje se mogu koristiti za razrjeđivanje, otapanje ili raspršivanje drugih spojeva. Sposobnost otapala da otapa drugu molekulu ovisi o molekularnoj strukturi i fizičkim svojstvima otapala i otopljene tvari. Otapala se mogu kategorizirati kao organska i anorganska te kao polarna i nepolarna. Polarna otapala su voda, alkoholi i druge kemijske tvari koje sadrže –OH skupinu te imaju sposobnost doniranja vodikovih iona i stvaranja vodikovih veza. Napolarna otapala se ne miješaju s vodom te se koriste za otapanje hidrofobnih tvari kao što su ulja i masti [46].

Metanol je bezbojna, lako hlapljiva, zapaljiva i otrovna tekućina. Može se dobiti destilacijom drva i uglavnom se sintetizira iz ugljičnog monoksida i vodika. Najznačajnija upotreba metanola je u proizvodnji formaldehida, metil-tert-butil-etera i octene kiseline. Također se koristi u proizvodnji klorometana, metilamina, glikol metil etera i biodizela reakcijom transesterifikacije [47]. Osim gore navedenih tvari, može se naći u plastici, sintetičkim vlaknima, gorivima, smolama, bojama, ljepilima, otapalima, tepisima, rashladnim sredstvima, pigmentima, bojama i tome slično. Koristi se i u pročišćavanju otpadnih voda kako bi se spriječilo cvjetanje algi [48].

Vrlo je važno odabrati pogodno otapalo za ekstrakciju pigmenata jer otapalo određuje stupanj afiniteta prema kemijskom sastavu tvari koje se ekstrahiraju. Osim sposobnosti otapanja prema spojevima koji se ekstrahiraju i kvantificiraju, otapalo također igra važnu ulogu u staničnoj lizi. Agresivnija otapala mogu povećati prinos ekstrakcije stanica s čvrstim

stijenkama. M. Henriques i sur. (2007.) su prvo koristili metanol kao otapalo za ekstrakciju klorofila, ali su ga zbog toksičnosti zamijenili drugim otapalima poput etanola i acetona [49].

Etanol je hlapljiva, zapaljiva, bistra, bezbojna tekućina. Također se ubraja u skupinu primarnih alkohola te je jedan od glavnih sastojaka alkoholnih pića koja se konzumiraju diljem svijeta. Nadalje, miješa se s vodom i mnogim organskim otapalima točnije hidrofilan je. Velike količine etanola se još uvijek proizvode fermentacijom [50].

Primarna upotreba etanola je u proizvodnji alkoholnih pića, ali i kod proizvodnje acetaldehida, etil klorida, etil acetata, etilen dibromida, octene kiseline, glikol etera i etilamina. Osim toga, etanol se također koristi u proizvodnji eksploziva, bojila, deterdženta, punila, maziva, lakova, aditiva, premaza, u kozmetičkoj i parfemskoj industriji, u proizvodnji ekstrahiranih aroma i sl. Etanol je čest dodatak gorivu za čišćenje motora. Većina benzina proizvedenog u SAD-u sadrži 10 % etanola koji oksigenira gorivo i smanjuje njegovo onečišćenje [51].

Farmaceutska upotreba etanola je na primjer u obliku antiseptika te u antibakterijskom spreju. Također se koristi kao protuotrov prilikom trovanja metanolom te kao neurotoksin i teratogeno sredstvo [52].

Etanol ima široku primjenu kao otapalo, te može uključivati smole, masne kiseline, ugljikovodike, masti, ulja i voskove. Također, koristi se kao medicinsko otapalo zbog svoje niske toksičnosti [53]. Z. Gao i sur. (2017.) su uspješno ekstrahirali antocijanin iz borovnice korištenjem etanola kao otapala. Kako su antocijanini polarni spojevi, reguliranje volumnog udjela etanola može ubrzati disocijaciju i oslobađanje antocijanina, uvelike utječući na brzinu pročišćavanja antocijana. Utvrdili su da 60 %-tni volumni udio etanola, omjer biljne prerađevine i otapala od 1 : 10 i ultrazvučna kupelj pri 60 °C čine najbolje uvjete kako bi se antocijanin ekstrahirao, dok su najbolji uvjeti za pročišćavanje antocijanina bili 95 %-tni etanol zakiseljen s 0,3 % klorovodičnom kiselinom [54].

Aceton je bezbojna, lako hlapljiva i zapaljiva tekućina koja se ponajviše koristi kao otapalo ili u obliku aceton cijanohidrina koji je prekursor metil metakrilata. Hidrofilan je te kao takav od velike je važnosti prilikom čišćenja laboratorijskog pribora. Industrijski aceton se koristi za uklanjanje masnoće ili gume s tekstila kao što su vuna i svila, izradu lakova za automobile ili prilikom izrade plastike [55].

Zbog dvostrukog polariteta acetona, to je otapalo koje se može koristiti u mnoštvu različitih industrija. Jedna od najčešćih upotreba acetona je kao aditiv u benzinu. Koristi se prilikom razrjeđivanja benzina, omogućuje mu da se lako difundira u motoru te na taj način poboljšava učinkovitost goriva. Zbog svoje sposobnosti brzog otapanja i isparavanja, aceton



se također koristi prikom čišćenja kod izlivanja nafte i životinja pogođenih takvim katastrofama [56].

Također, prilikom konvencionalne ekstrakcije biljnih pigmenata iz uzoraka listića *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh koristio se upravo aceton (X. Hu i sur., 2013.). Ekstrakcija se odvijala namakanjem listova u 80 % ili čistom acetonu tijekom 12 sati na 4 °C. Utvrdili su da se gotovo 70 % klorofila iz listova ekstrahiralo u 80 %-tnom acetonu, dok je u čistom acetonu ekstrahirana vrlo mala količina klorofila [54].

### 2.3.1. Otapala u ekstrakciji bioaktivnih tvari

Na ekstrakciju bioaktivnih tvari u biljnom materijalu utječe njihova kemijska priroda, veličina uzorka, vrijeme ekstrakcije i uvjeti skladištenja kao i prisutnost interferirajućih tvari. Bioaktivne tvari koje se najčešće izoliraju su različite klase fenola koji su selektivno topivi u otapalima. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog materijala otapalom se često koristi zbog jednostavnosti metode, učinkovitosti i široke primjene. Kemijska ekstrakcija ovisi o vrsti otapala, polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, kao i o kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama uzoraka [57].

Ekstrakcija polifenola otežana je zbog interakcije polifenola s drugim komponentama prisutnim u biljkama. Kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije, proučava se širok raspon otapala poput vode, acetona, metanola, etanola ili njihovih smjesa s vodom. Razrijeđena otapala pokazala su se pogodijima za ekstrakciju fenolnih spojeva dok čista otapala nisu učinkovita jer su polifenoli u biljnom materijalu povezani s drugim biomolekulama, kao što su proteini, polisaharidi, terpeni, klorofil, lipidi i anorganski spojevi. Metanol se pokazao učinkovitim otapalom za ekstrakciju katehina, epikatehina i epigalokatehina, dok je razrijeđeni aceton učinkovit za polarne polifenole, ali se u ekstraktima nalaze i nepoželjni ostaci. Niska topivost polifenola u čistim organskim otapalima posljedica je jačanja vodikovih veza između polifenola i proteina. Povećanje topivosti dodatkom vode u organska otapala posljedica je slabljenja vodikovih veza u vodenim otopinama [57].

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitivani biljni materijal

Koristio se svježi, suhi te prerađeni biljni materijal priređen od jagodičastog i bobičastog voća. Od jagodičastog voća korišteni su jagoda (*Fragaria sp. L.*), šumska jagoda (*Fragaria vesca L.*), kupina (*Rubus sp. L.*), crvena malina (*Rubus idaeus L.*), crna malina (*Rubus idaeus occidentalis L.*), bijeli dud (*Morus alba L.*), crni dud (*Morus nigra L.*) te crveni dud (*Morus rubra L.*). Od bobičastog voća ispitani su vinova loza (*Vitis vinifera L.*), crni ribiz (*Ribes nigrum L.*), crveni ribiz, (*Ribes rubrum L.*), borovnice (*Vaccinium myrtillus L.*), brusnice (*Vaccinium sp. L.*) te ružin šipak (*Rosa sp. L.*). Kao dodatno bobičato voće, u radu su ispitane goji bobice (*Lycium sp. L.*), aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), crveni drijen ili drenjina (*Cornus mas L.*) i korintska groždica (*Vitis vinifera L.*), a od jagodičastog voća ispitane su tayberry bobice (*Rubus fruticosus × Rubus idaeus*).

Također, ispitivane su voćne prerađevine poput džema, soka i vina. Džem od divlje brusnice sadržavao je divlje brusnice (50 %), vodu, šećer i pektin bez umjetnih bojila ili aroma te bez dodataka drugog voća. Džem od borovnica sadržavao je borovnice (43 %), koncentrirani sok od limuna, šećer, tvar za želiranje i pektin, također bez dodanih umjetnih bojila, aroma i drugog voća. Ispitivani sokovi bili su od šumske brusnice i borovnice. Sok od šumske brusnice sadržavao je šumsku brusnicu, infuziju čaja brezinog lista i agavin sirup, dok je sok od šumske borovnice sadržavao šumsku borovnicu, ekstrakt čaja matičnjaka i agavin sirup. Ispitana su vina od maline i crvenog ribiza.

#### 3.2. Kemikalije i pribor

Sve kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće, a voda korištena za pripremu otopina određene pH vrijednosti bila je ultračista voda.

##### **Popis korištenih kemikalija:**

Klorovodična kiselina, HCl ( $M = 36,46$  g/mol, Kemika),

Natrijev hidroksid, NaOH ( $M = 39,99$  g/mol, Kemika),

Ultračista voda,

Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ( $M = 46,07$  g/mol, Kemika),

Metanol, CH<sub>3</sub>OH ( $M = 32,04$  g/mol, Kemika),

Aceton, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O ( $M = 58,08$  g/mol, Kemika).

### **Popis korištenog pribora:**

Jažice, epruvete, stalak za epruvete, keramički tarionik s tučkom, odmjerne tikvice (100 mL), kapalice, stakleni štapić, pinceta, pipeta (10 mL i 5 mL), staklene bočice s čepom.

### **Popis korištenih uređaja:**

Analitička vaga, magnetska miješalica, uređaj za ultračistu vodu (TKA, WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME) i pH metar (808 Titrand, Metrohm).

### 3.3. Preliminarno ispitivanje

Preliminarno istraživanje imalo je nekoliko ciljeva. U njemu se kao biljni materijal koristila suha aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), u četiri različita otapala: acetonu, etanolu, metanolu i vodi. Prvi cilj preliminarnog istraživanja bio je utvrditi optimalni omjer mase biljnog materijala i volumena otapala. U tu svrhu, otapala su se koristila u različitim omjerima mase uzorka i volumena otapala. Masa uzorka iznosila je 1 g dok je ispitivani volumen otapala iznosio 10 mL, 15 mL i 20 mL, odnosno ispitani su omjeri 1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20, kao što je prikazano na Slikama 9.-16. Drugi cilj preliminarnog istraživanja je bio utvrditi koja će od prvotno odabranih otapala dati bolje rezultate ukoliko se koriste u pripremi indikatora, zbog čega je u preliminarnom ispitivanju izvršena i eliminacija dva otapala koja su se pokazala manje dobrima u pripremi indikatora. Treći cilj bio je ispitati utjecaj vremena, pa je u tu svrhu ispitana učinkovitost ovako pripremljenih indikatora odmah po pripremi i nakon 24 sata.

### 3.4. Priprema otopina određene pH vrijednosti

Prilikom pripreme otopina određene pH vrijednosti korištene su koncentrirana klorovodična kiselina i otopina natrijeva hidroksida, dok je ultračista voda korištena kao neutralni medij. pH vrijednost otopina određena je pH metrom.

Kod pripreme kiselih otopina (pH = 1 i 2) prethodno izračunati volumen kiseline pipetom je prenesen u odmjernu tikvicu s destiliranom vodom, koja je potom nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Otopine pH vrijednosti od 3 do 6 pripremljene su razrjeđivanjem iz otopine pH = 1 preko Formule (1):

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (1).$$

Prilikom pripreme bazičnih otopina, čvrsti natrijev hidroksid otopljen je u ultračistoj vodi. Otopine pH vrijednosti 11-14 priređene su otapanjem izvagane mase natrijeva hidroksida u odmjernoj tikvici, koja je nakon toga nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Otopine pH 8, 9 i 10 pripremljene su razrjeđivanjem koristeći prethodno navedenu Formulu (1). pH metrom određena pH vrijednost po potrebi je korigirana. Razlika u pH vrijednosti koja je tolerirana je  $\pm 0,1$ .

### 3.5. Priprema biljnog materijala

Ispitani su svježi i suhi biljni materijal te prerađevine kao što su vino, sok i džem. Biljne prerađevine koje su se koristile sadržavale su samo odabrano voće bez drugog dodanog voća, umjetnih bojila ili aroma. Također, bitno je napomenuti kako pojedini materijal nije bilo moguće dobiti u svim ispitivanim oblicima. Plan rada prikazan je u Tablici 13.

Tablica 13. Plan rada.

	Voće svježe				Voće suho				
		50 % EtOH	75 % EtOH	50 % MetOH	75 % MetOH	50 % EtOH	75 % EtOH	50 % MetOH	75 % MetOH
Jagodičasto voće	Jagoda								
	Šumska jagoda								
	Kupina								
	Malina								
	Crna malina								
	Bijeli dud								
	Crveni dud								
	Crni dud								
Bobičasto voće	Grožđe								
	Crveni ribiz								
	Crni ribiz								
	Borovnice								
	Ružin šipak								
Dodatno voće	Goji								
	Aronija								
	Drenjina								
	Tayberry								
	Korintska grožđica								
Džem	Divlja brusnica								
	Borovnica								
Sok	Šumska brusnica								
	Šumska borovnica								
Vino	Crni ribiz								
	Malina								

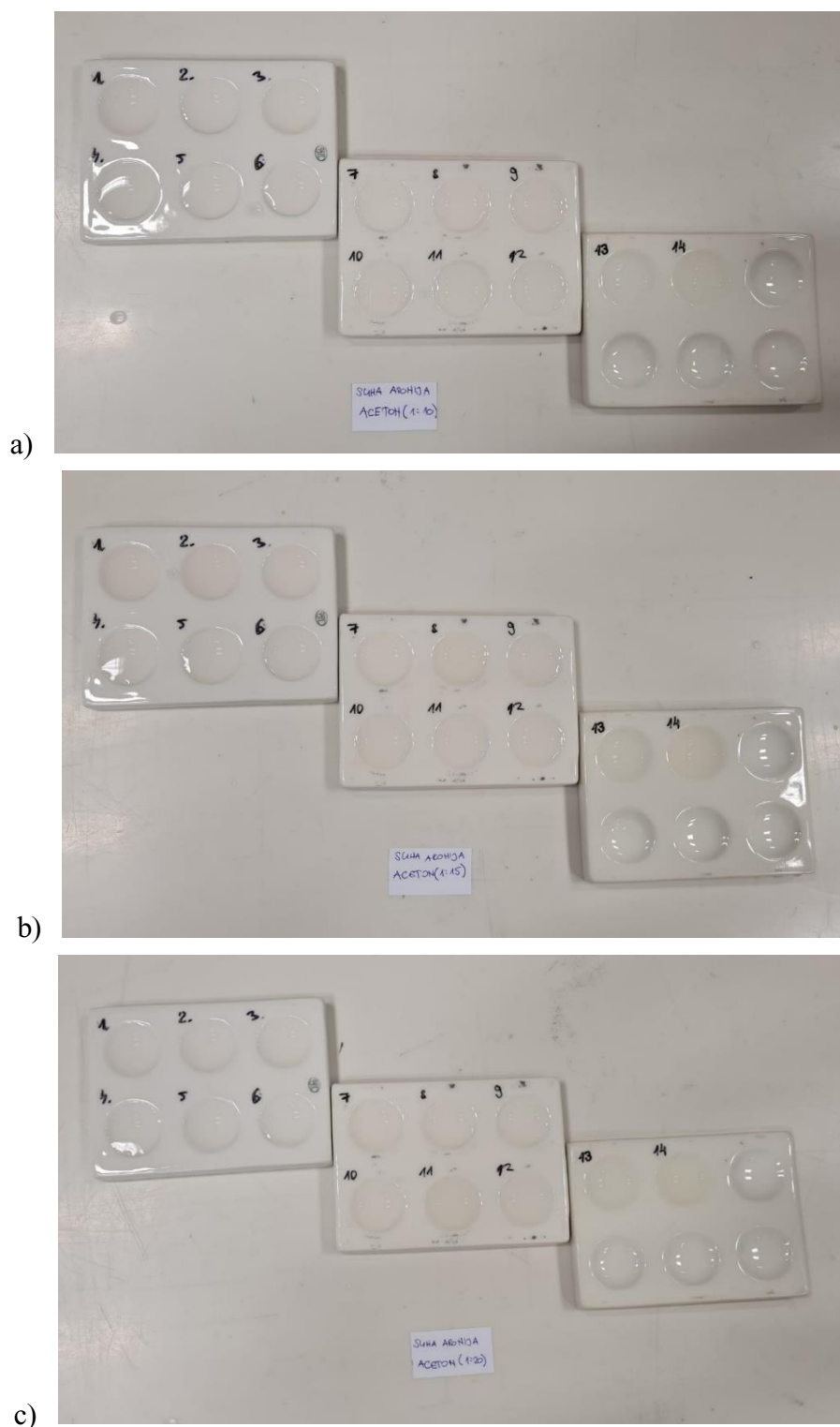
Legenda: EtOH – etanol, MetOH – metanol.

Od svježeg biljnog materijala ispitane su šumska jagoda, jagoda, kupina, crvena malina, bijeli, crveni i crni dud, grožđe *Rose*, crni i crveni ribiz, borovnice, brusnice, ružin šipak, aronija te drenjina. Od suhog voća korišteno je sve kao i svježe, uz dodatak goji bobica, tayberry bobica te korintske grožđice. Također, ispitana su vina od maline i crvenog ribiza te sok i džem od brusnice i borovnice.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati preliminarnog ispitivanja

Rezultati preliminarnog ispitivanja su prikazani na Slikama 9.-16. U preliminarnom ispitivanju, indikatori su pripremljeni od suhe aronije i acetona, etanola, metanola i vode (prvo su korištena otapala bez razrjeđivanja). Njihova učinkovitost ispitana je odmah po pripremi i nakon 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi. Omjeri suhe aronije i otapala koji su ispitani su iznosili 1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20. Izbor otapala koji će se dalje koristiti u radu ovisio je o intenzitetu i vidljivosti promjene boje otopine indikatora pri različitim pH vrijednostima.

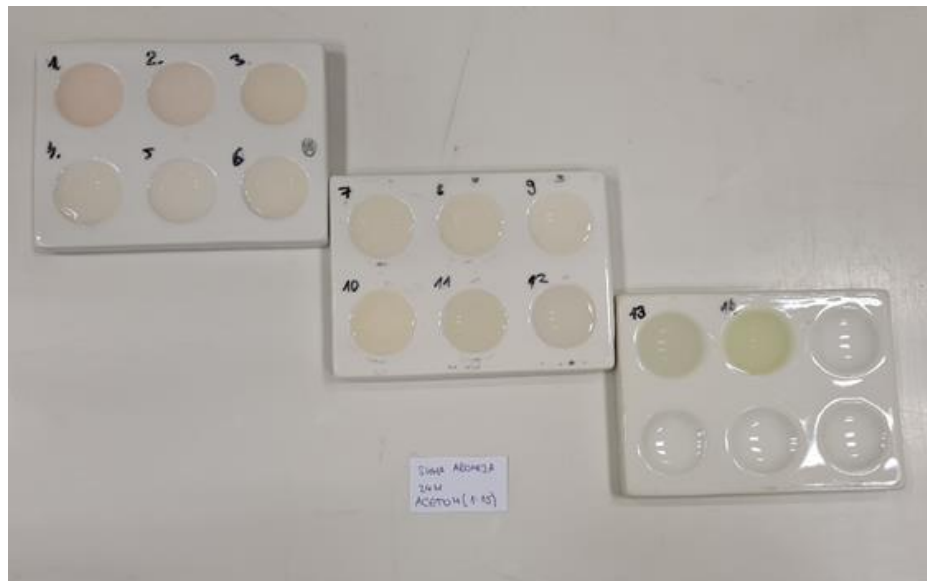


Slika 9. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i acetona u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 odmah po pripremi.





a)



b)



c)

Slika 10. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i acetona u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 nakon 24 sata.



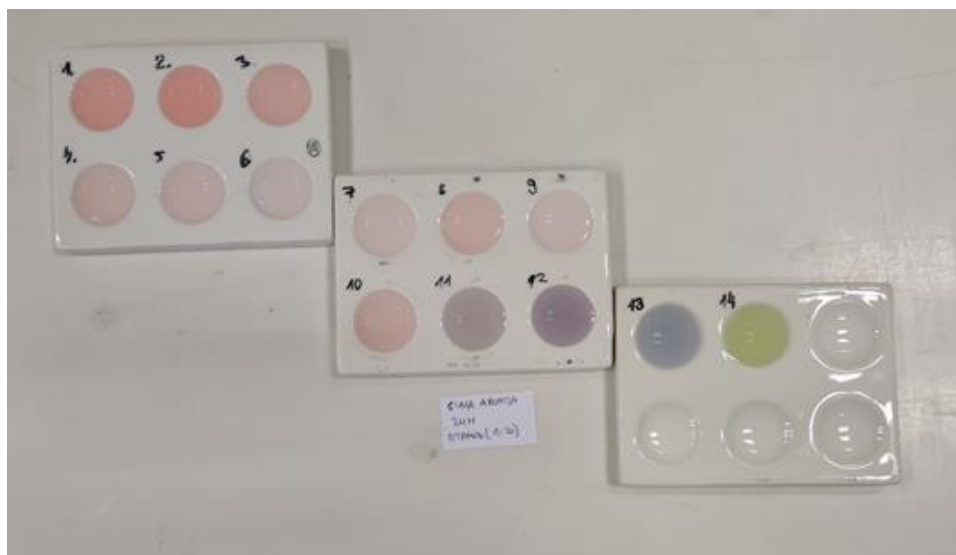
Slika 11. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i etanola u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 odmah po pripremi.



a)



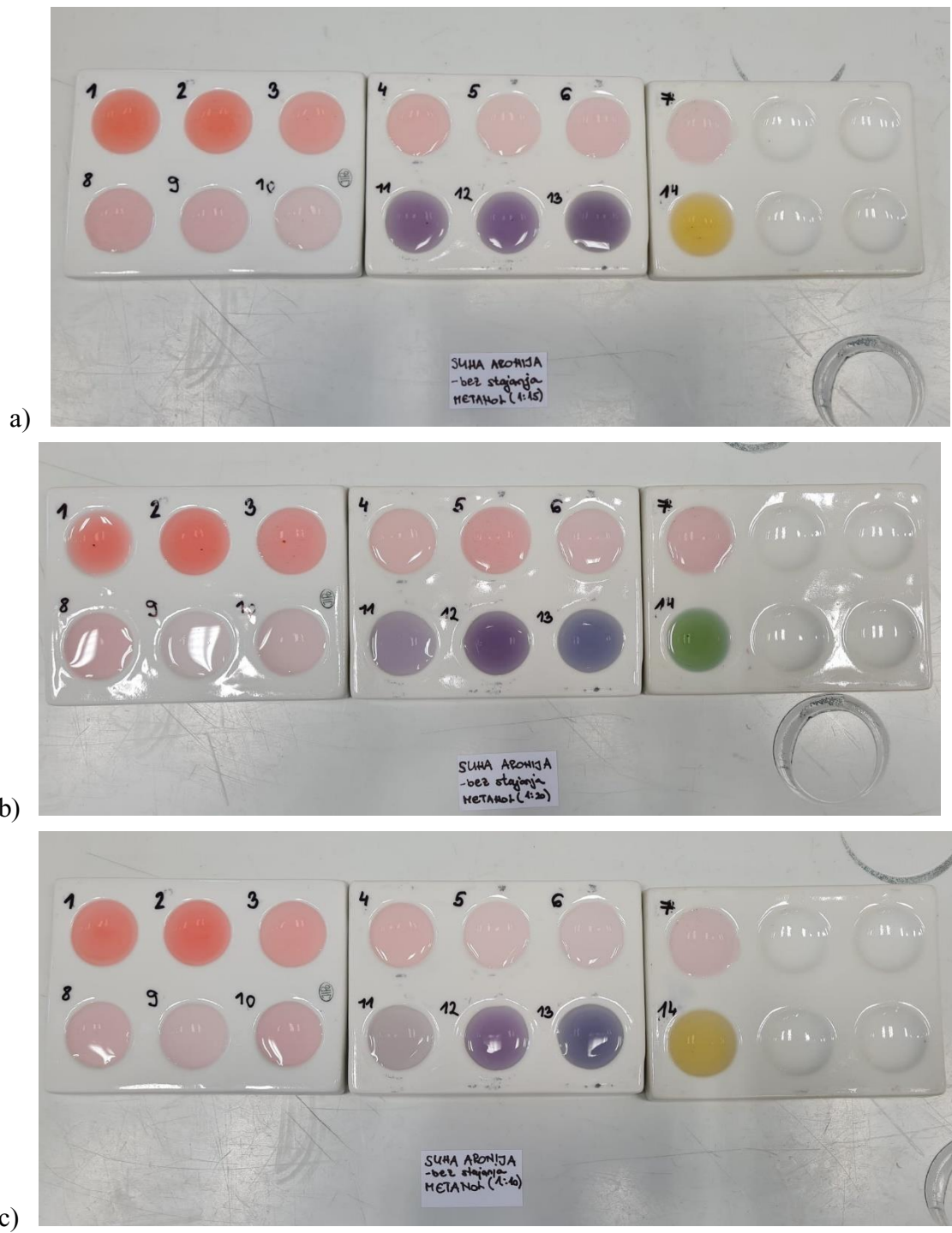
b)



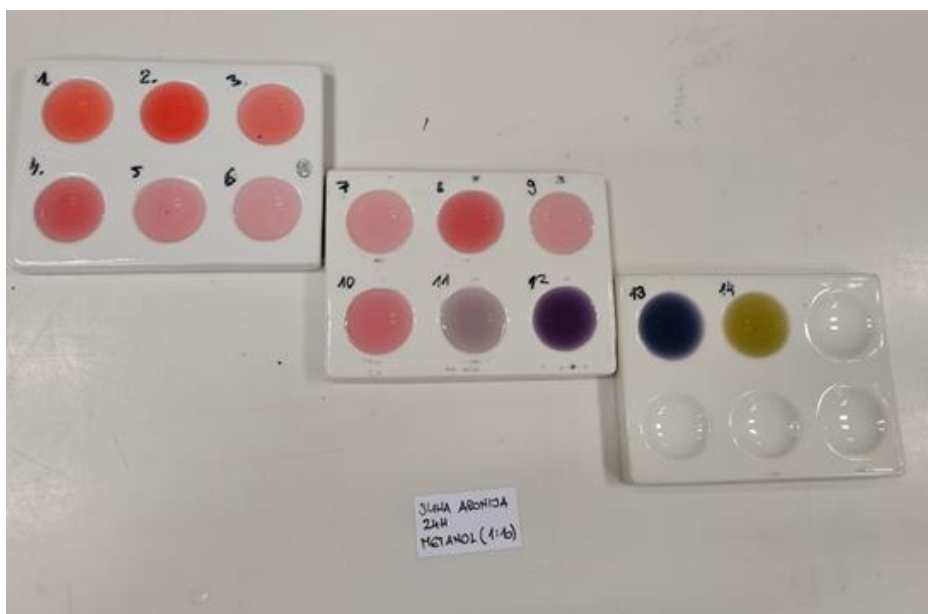
c)

Slika 12. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i etanola u omjerima

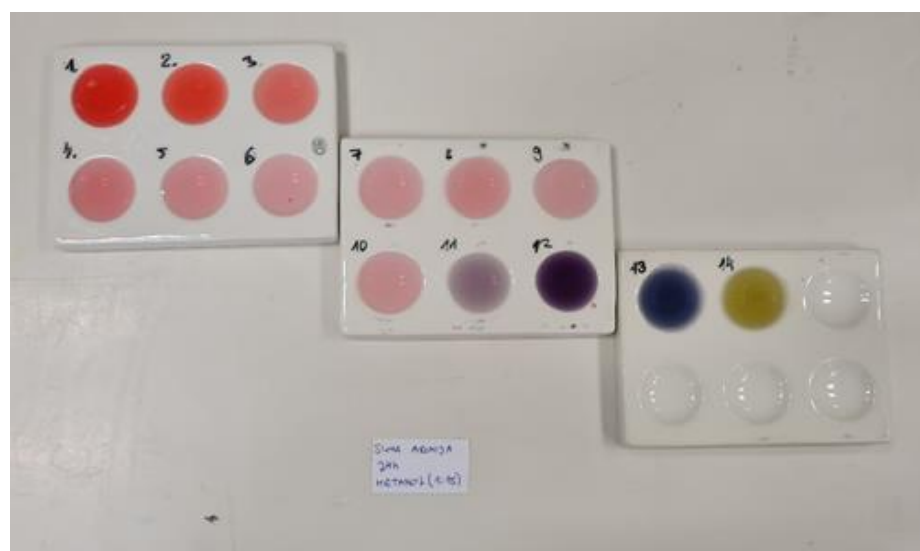
a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 nakon 24 sata.



Slika 13 Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i metanola u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 odmah po pripremi.



a)

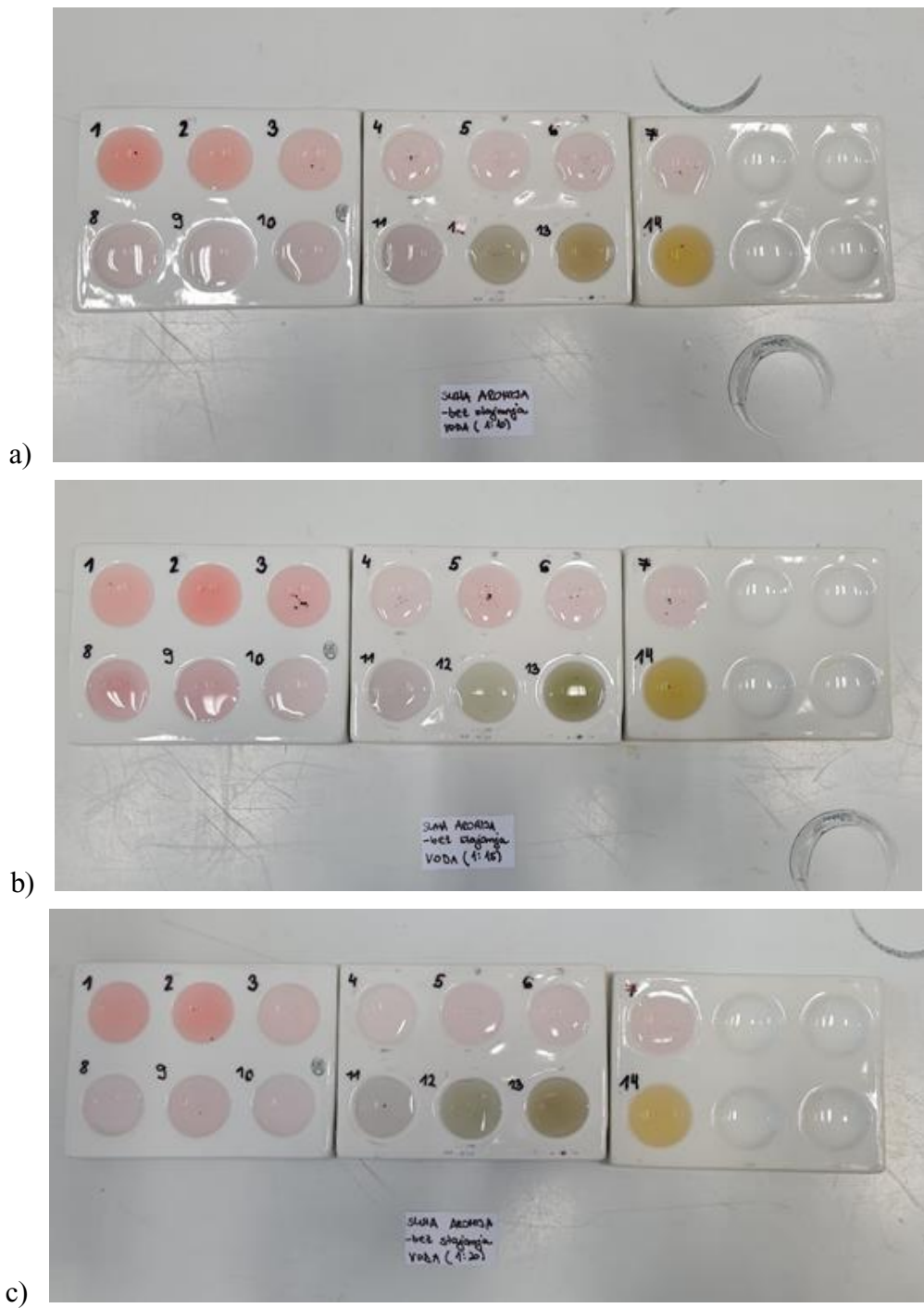


b)



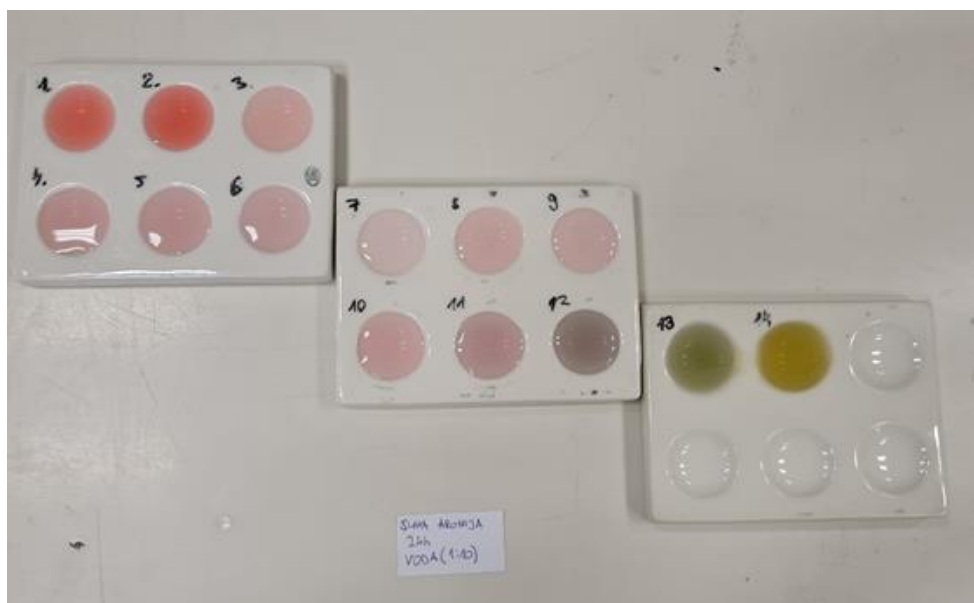
c)

Slika 14. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i metanola u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 nakon 24 sata.

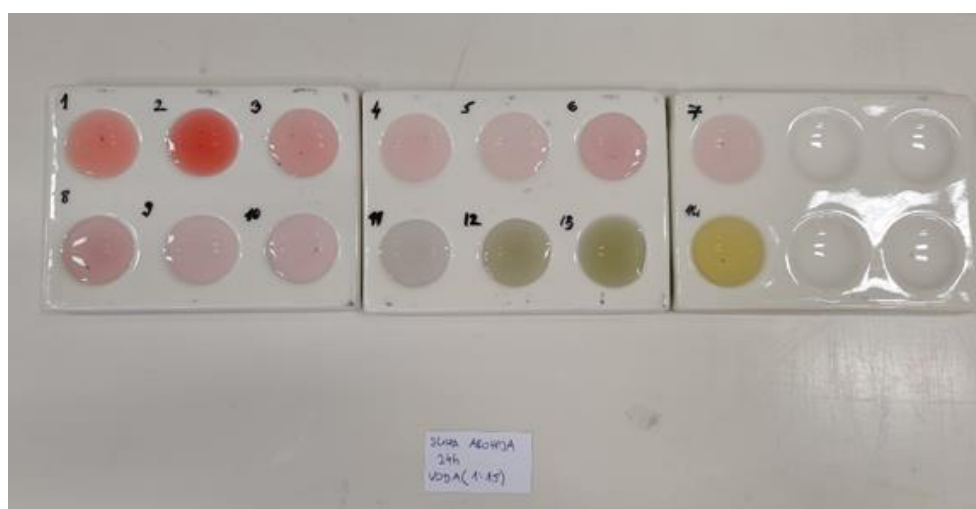


Slika 15. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i vode u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 odmah po pripremi.





a)



b)

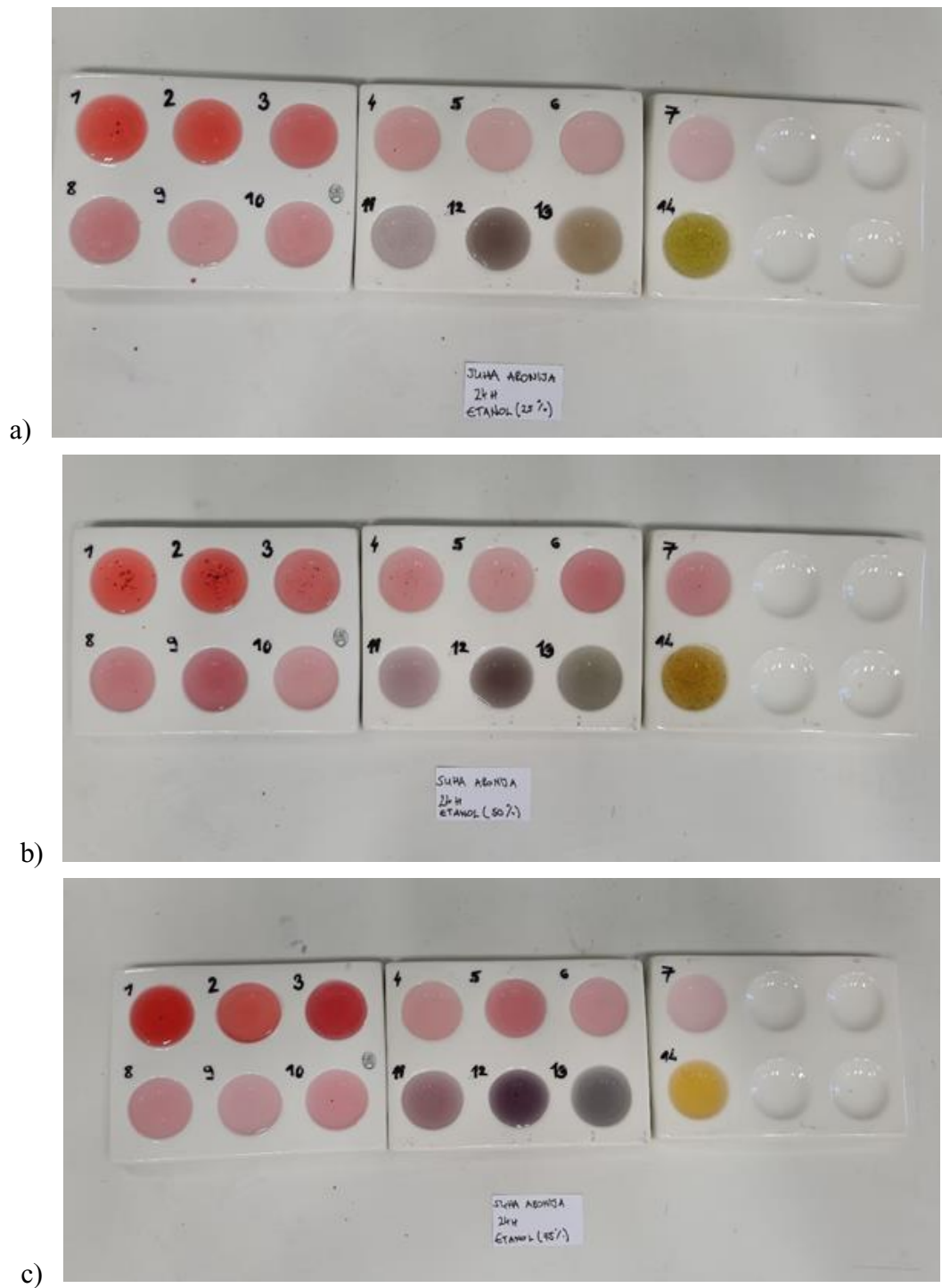


c)

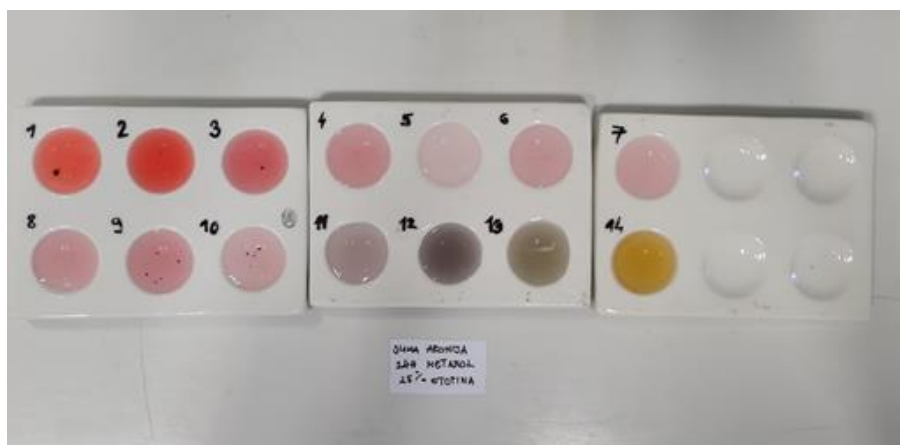
Slika 16. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i vode u omjerima a) 1 : 10, b) 1 : 15 i c) 1 : 20 nakon 24 sata.

Pogodnija otapala bila su etanol i metanolu u omjeru 1 : 10 nakon 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi. Stoga je u idućem koraku ispitana učinkovitost ta dva otapala pri različitim razrijeđenjima: 25 %, 50 % i 75 %. Rezultati su prikazani na Slikama 17.-18. Rezultat primjene 100 %-tnog otapala prikazani su prethodno, na Slikama 12. i 14.

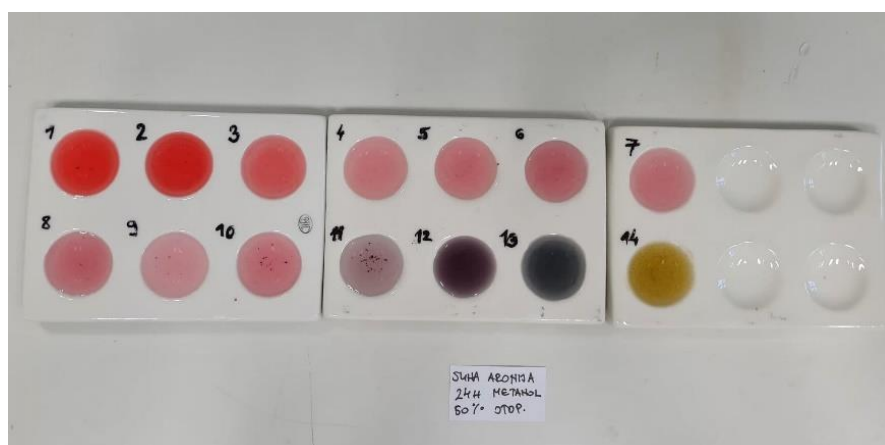




Slika 17. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i etanola u omjerima  
 a) 25 %, b) 50 % i c) 75 % nakon 24 sata.



a)



b)



c)

Slika 18. Alternativni kiselo-bazni indikator priređen od suhe aronije i metanola u omjerima a) 25 %, b) 50 % i c) 75 % nakon 24 sata.

Prema dobivenim rezultatima, pogodnima su se pokazali indikatori priređeni s otapalima koncentracije 50 % i 75 %.

## 4.2. Jagodičasto voće

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje mogućnosti primjene indikatora od svježeg i suhog jagodičastog voća kao kiselo-baznih indikatora prikazani su na Slikama 19.-46.

### 4.2.1. Jagoda (*Fragaria sp. L.*)



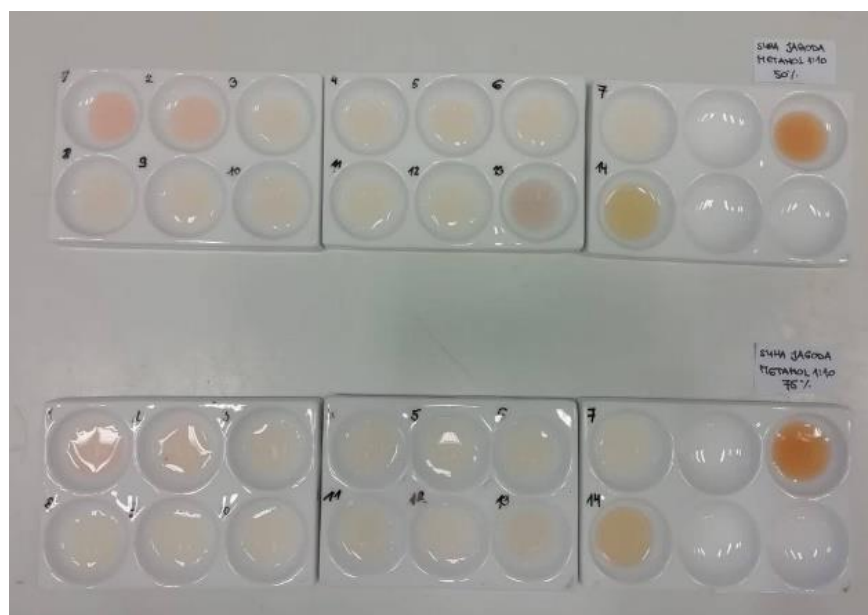
Slika 19. Rezultati primjene indikatora od svježe jagode i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 20. Rezultati primjene indikatora od suhe jagode i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 21. Rezultati primjene indikatora od svježe jagode i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

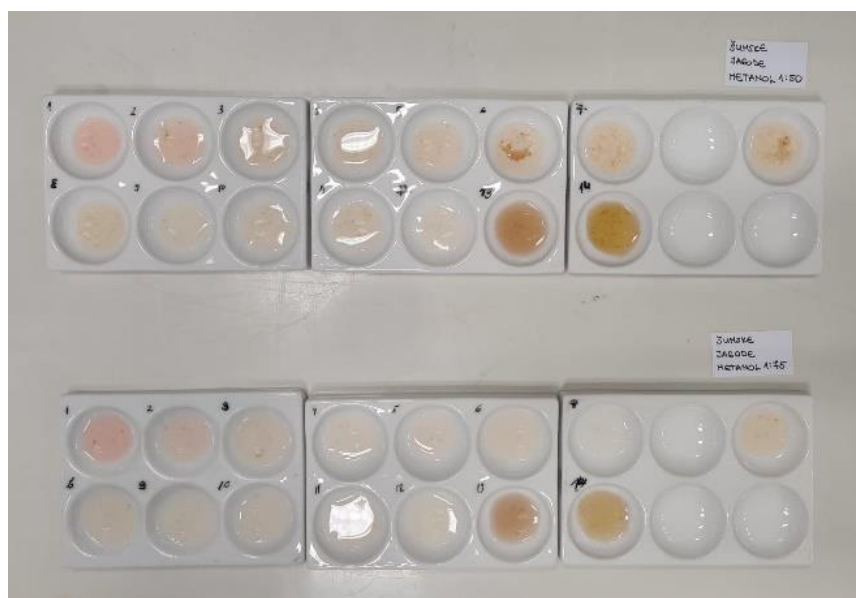


Slika 22. Rezultati primjene indikatora od suhe jagode i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.2. Šumska jagoda (*Fragaria vesca* L.)



Slika 23. Rezultati primjene indikatora od svježe šumske jagode i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

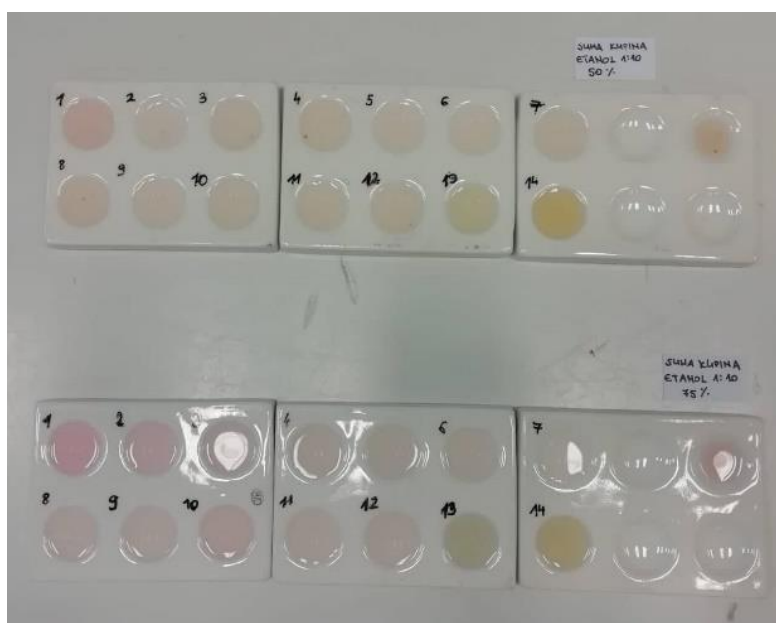


Slika 24. Rezultati primjene indikatora od svježe šumske jagode i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.3. Kupina (*Rubus sp. L.*)

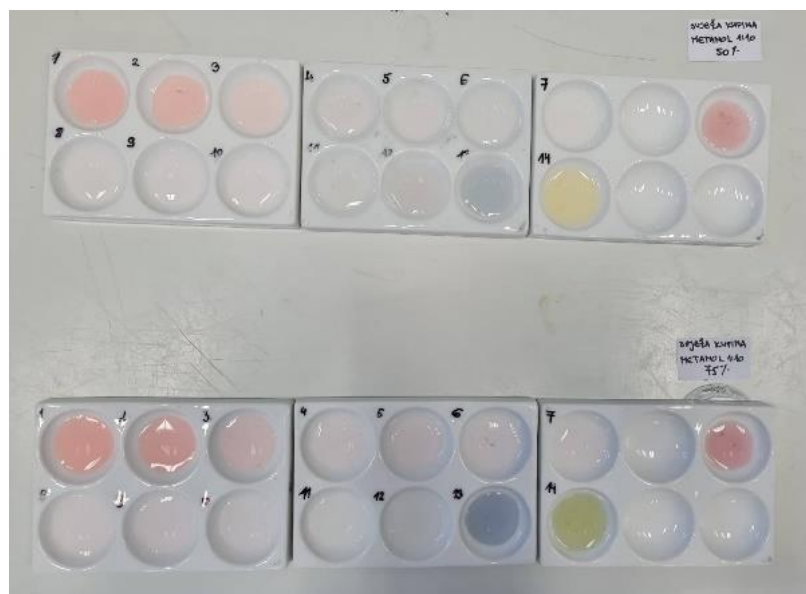


Slika 25. Rezultati primjene indikatora od svježe kupine i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 26. Rezultati primjene indikatora od suhe kupine i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



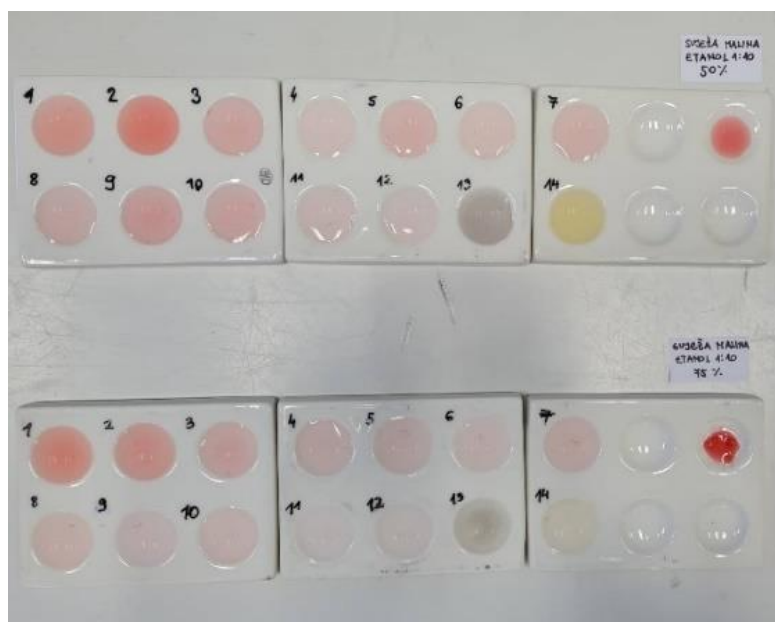


Slika 27. Rezultati primjene indikatora od svježe kupine i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

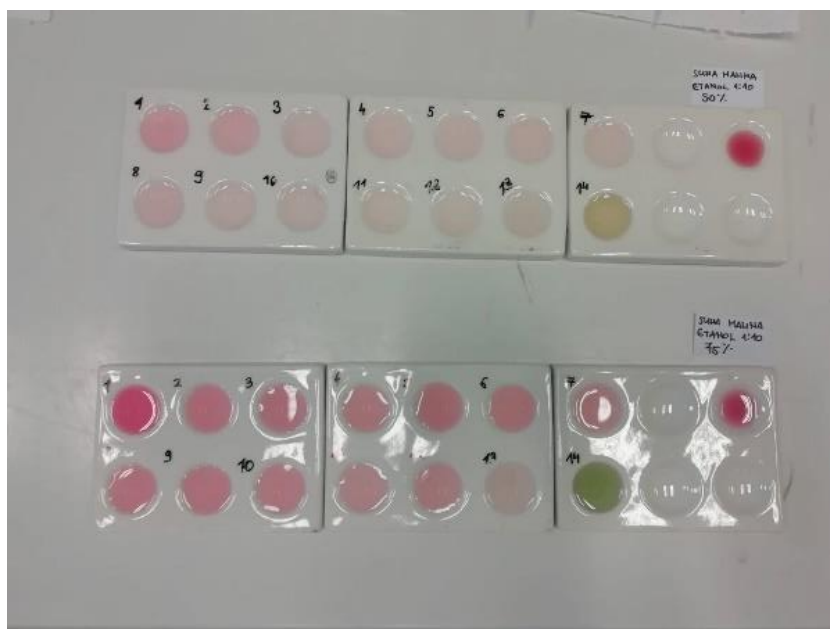


Slika 28. Rezultati primjene indikatora od suhe kupine i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.4. Malina (*Rubus idaeus* L.).



Slika 29. Rezultati primjene indikatora od svježe crvene maline i 50 % etanola (gore ) i 75 % etanola (dolje).

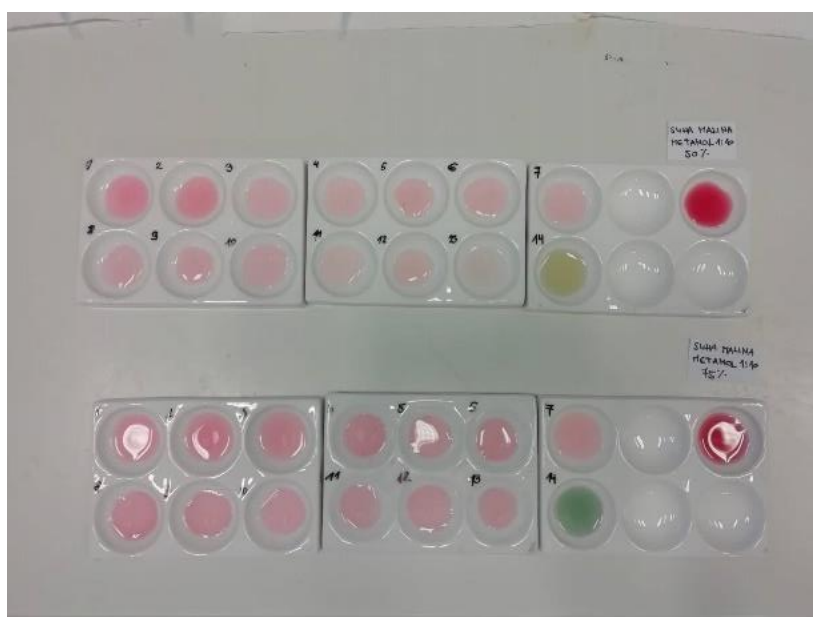


Slika 30. Rezultati primjene indikatora od suhe crvene maline i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



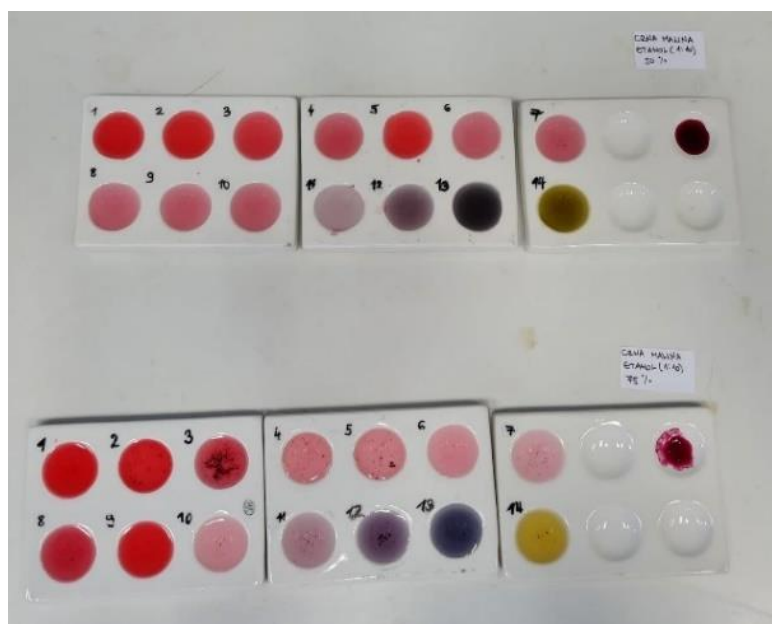


Slika 31. Rezultati primjene indikatora od svježe crvene maline i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

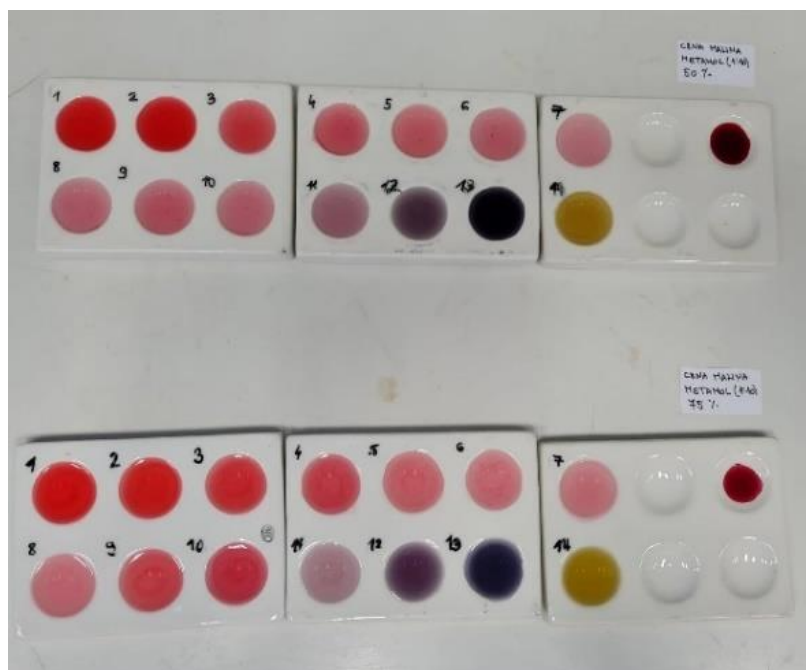


Slika 32. Rezultati primjene indikatora od suhe crvene maline i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.5. Crna malina (*Rubus idaeus occidentalis* L.)



Slika 33. Rezultati primjene indikatora od suhe crne maline i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

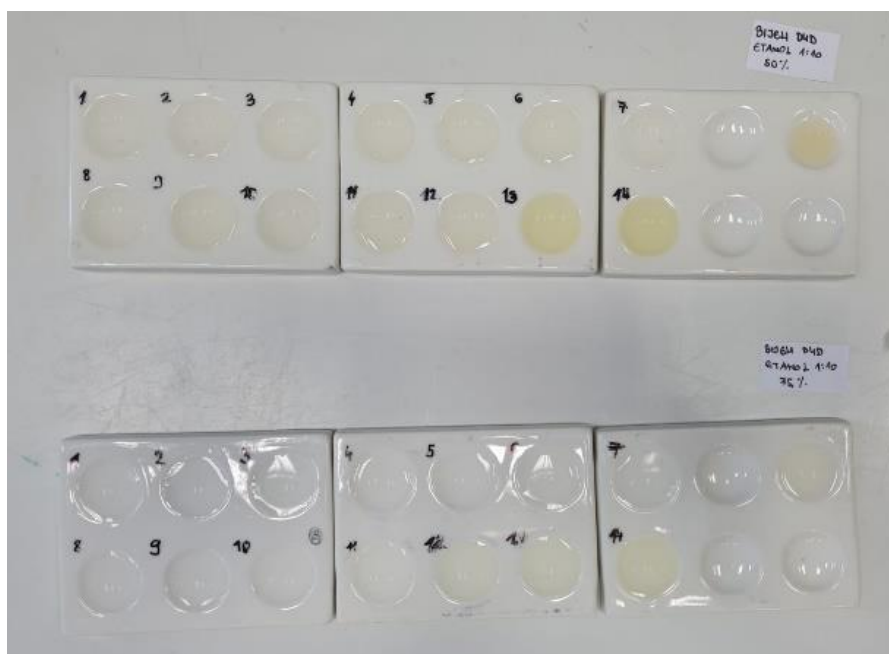


Slika 34. Rezultati primjene indikatora od suhe crne maline i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.6. Bijeli dud (*Morus alba* L.)



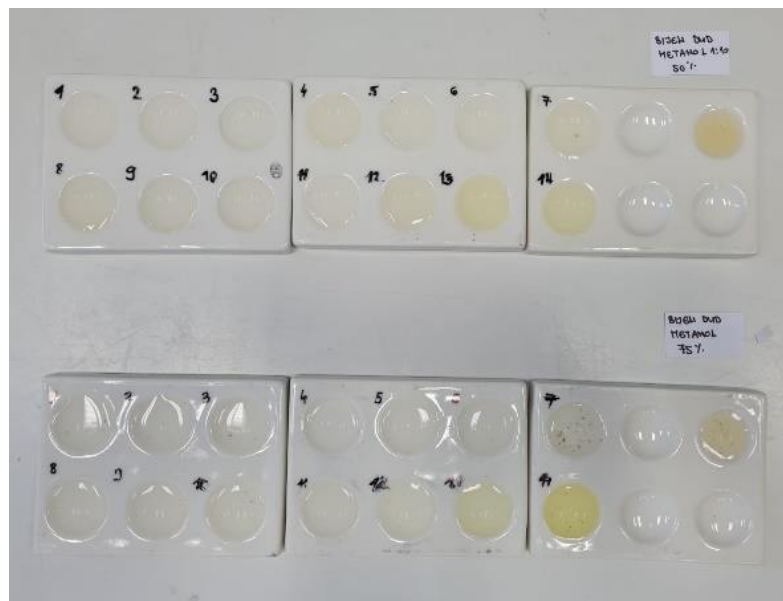
Slika 35. Rezultati primjene indikatora od svježeg bijelog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 36. Rezultati primjene indikatora od suhog bijelog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 37. Rezultati primjene indikatora od svježeg bijelog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

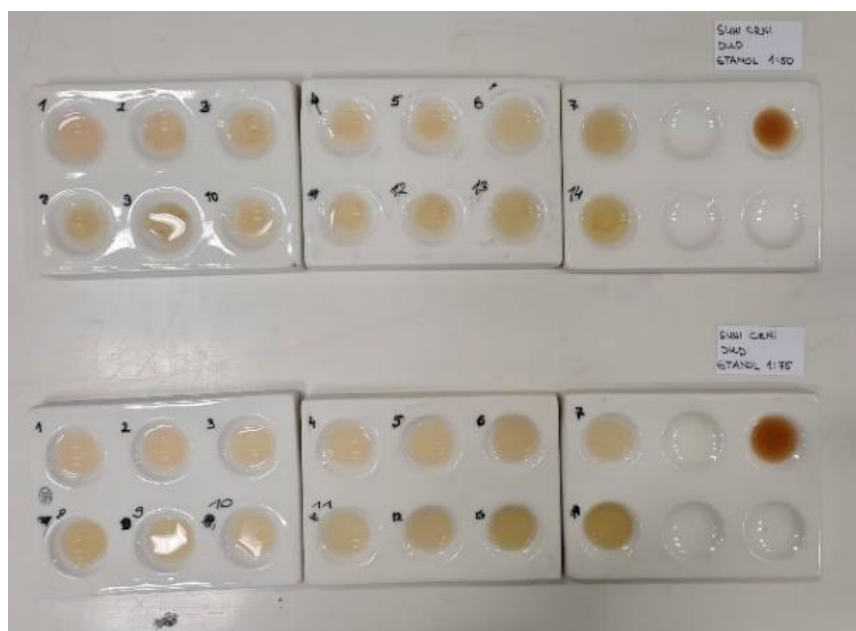


Slika 38. Rezultati primjene indikatora od suhog bijelog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.2.7. Crni dud (*Morus nigra* L.)



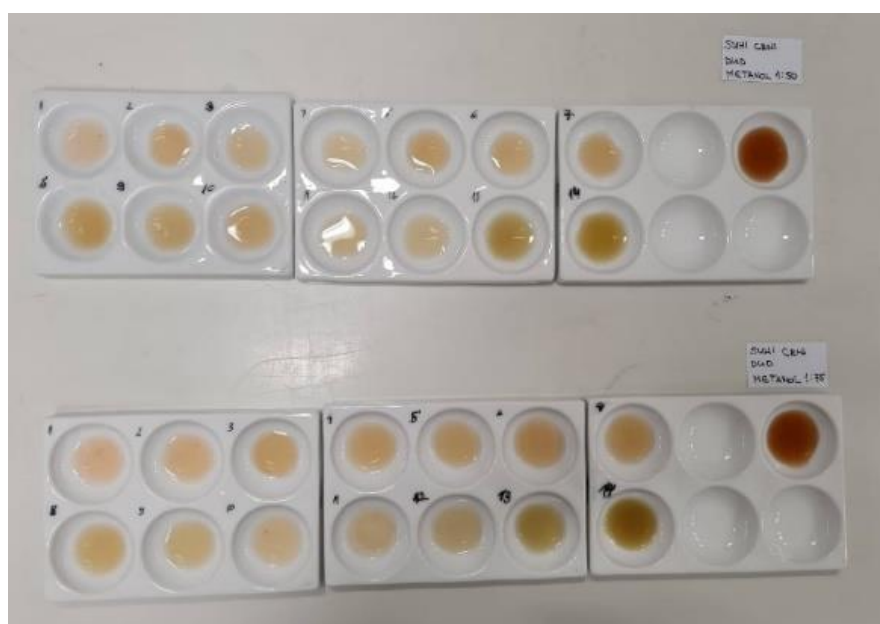
Slika 39. Rezultati primjene indikatora od svježeg crnog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 40. Rezultati primjene indikatora od suhog crnog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



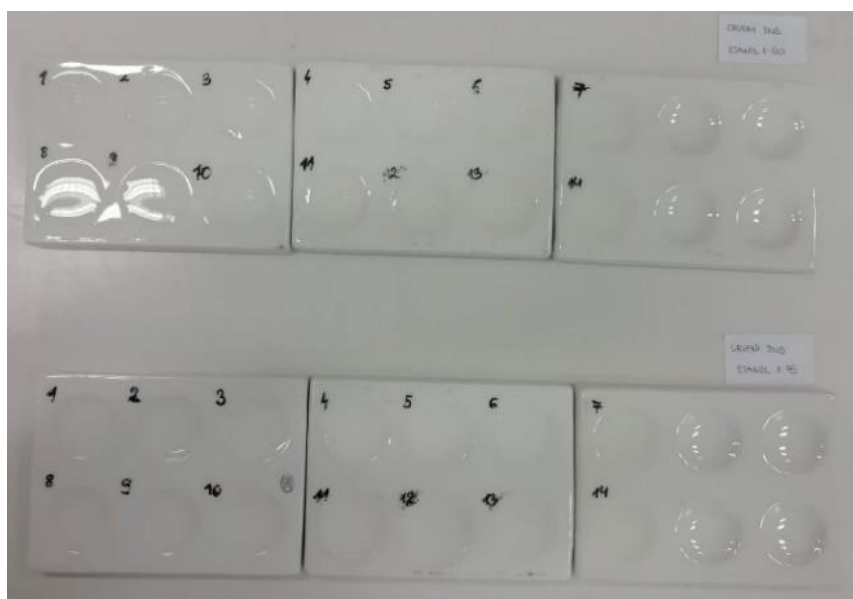
Slika 41. Rezultati primjene indikatora od svježeg crnog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



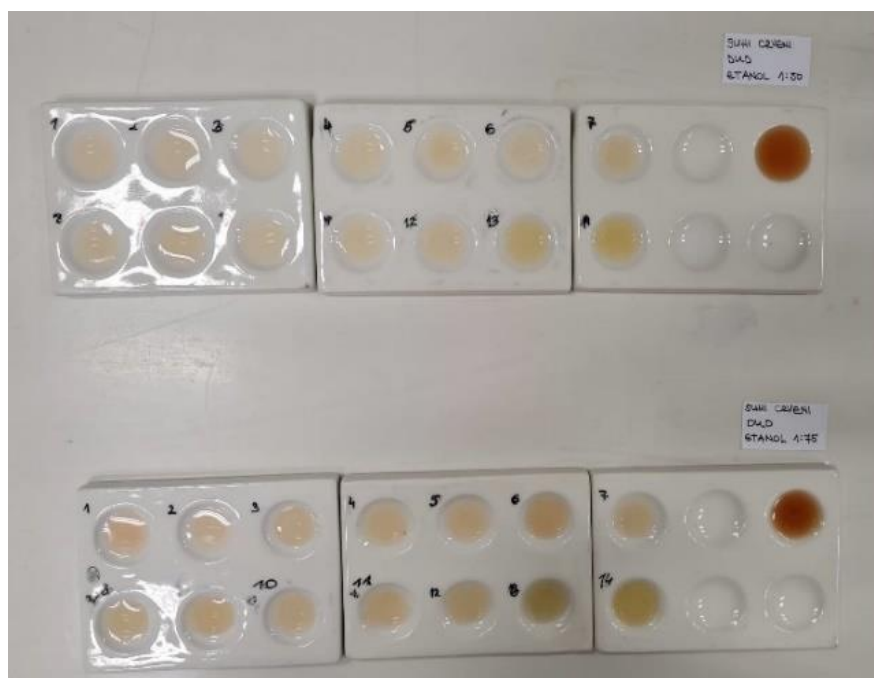
Slika 42. Rezultati primjene indikatora od suhog crnog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



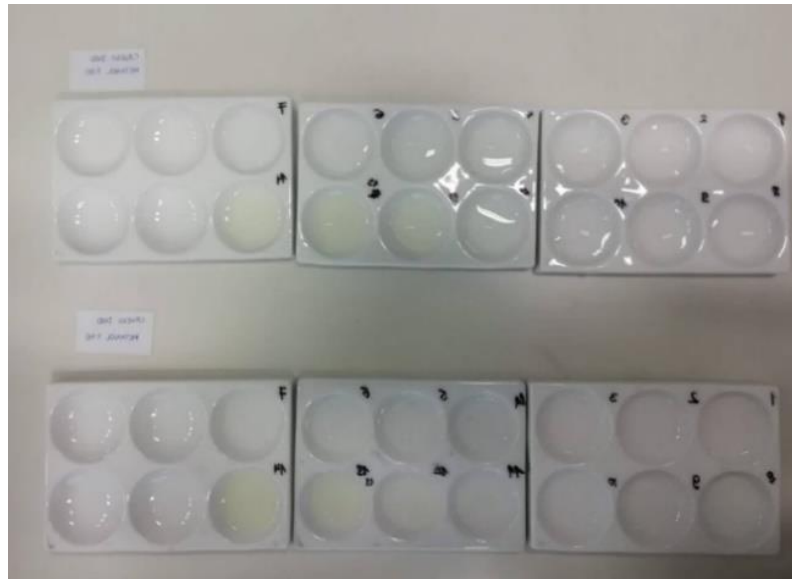
#### 4.2.9. Crveni dud (*Morus rubra* L.)



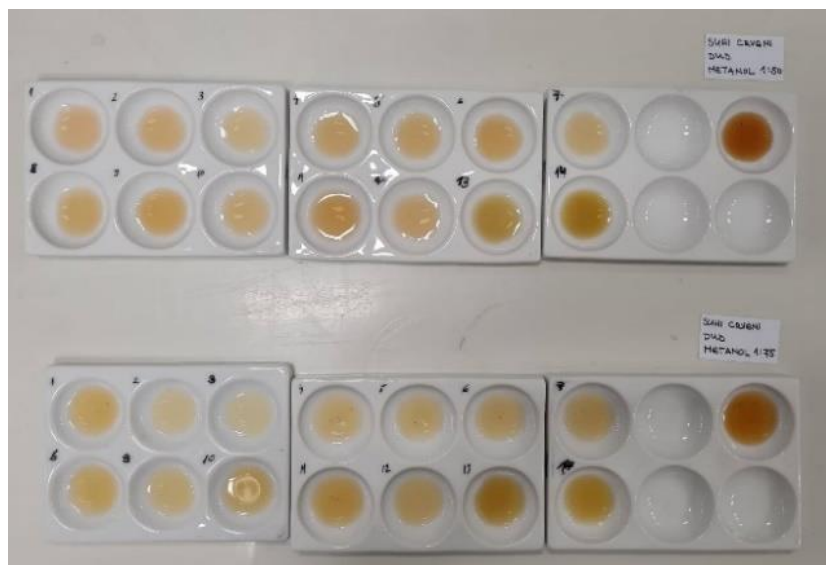
Slika 43. Rezultati primjene indikatora od svježeg crvenog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 44. Rezultati primjene indikatora od suhog crvenog duda i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 45. Rezultati primjene indikatora od svježeg crvenog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



Slika 46. Rezultati primjene indikatora od suhog crvenog duda i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



### 4.3. Bobičasto voće

Rezultati istraživanja koji se odnose na kiselo-bazne indikatore priređene od svježeg i suhog bobičastog voća s odabranim otapalima prikazani su na Slikama 47.-82.

#### 4.3.1. Brusnica (*Vaccinium sp. L.*)



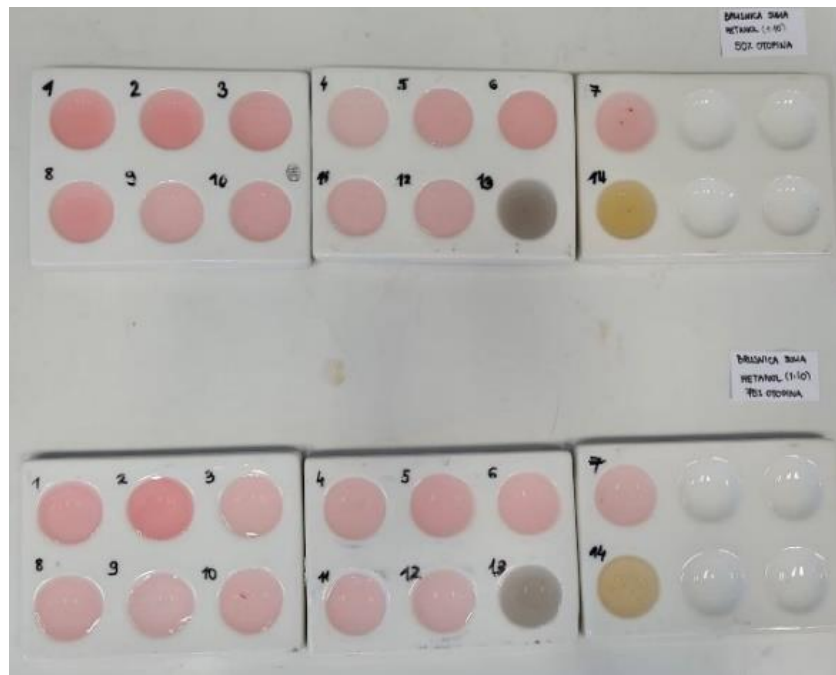
Slika 47. Rezultati primjene indikatora od svježe brusnice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 48. Rezultati primjene indikatora od suhe brusnice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

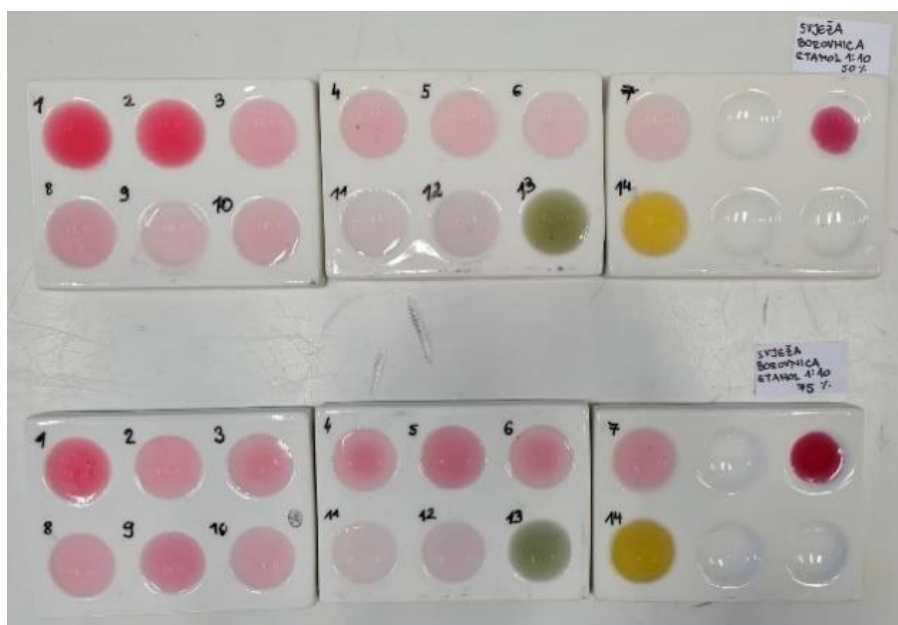


Slika 49. Rezultati primjene indikatora od svježe brusnice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

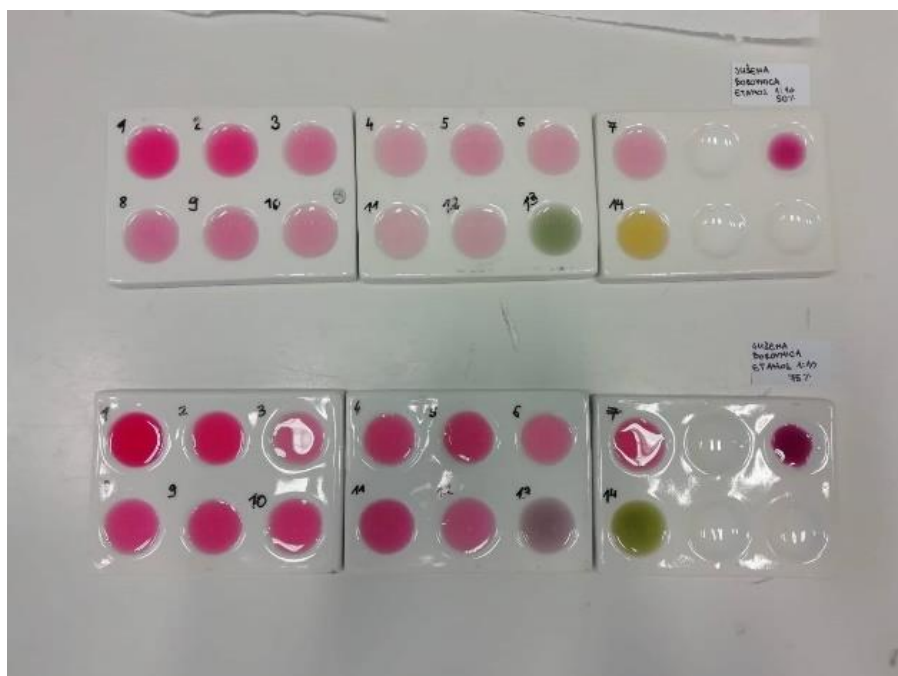


Slika 50. Rezultati primjene indikatora od suhe brusnice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

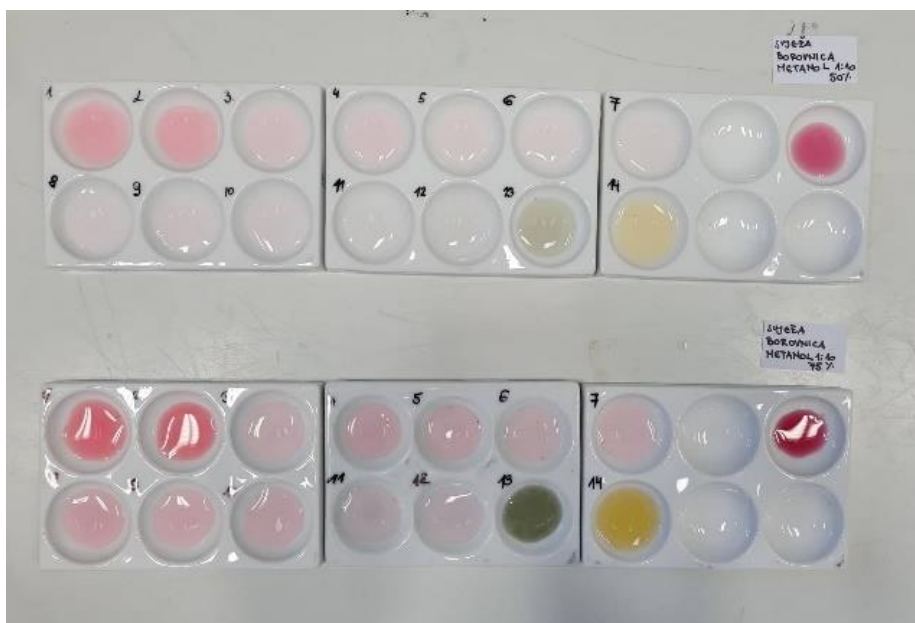
#### 4.3.2. Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.)



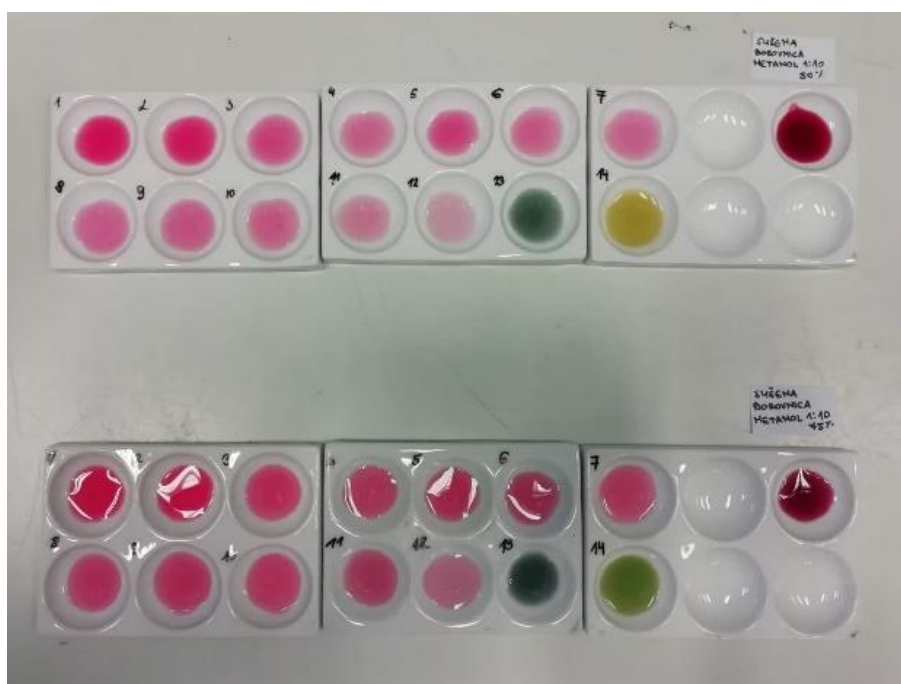
Slika 51. Rezultati primjene indikatora od sveže borovnice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 52. . Rezultati primjene indikatora od suhe borovnice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

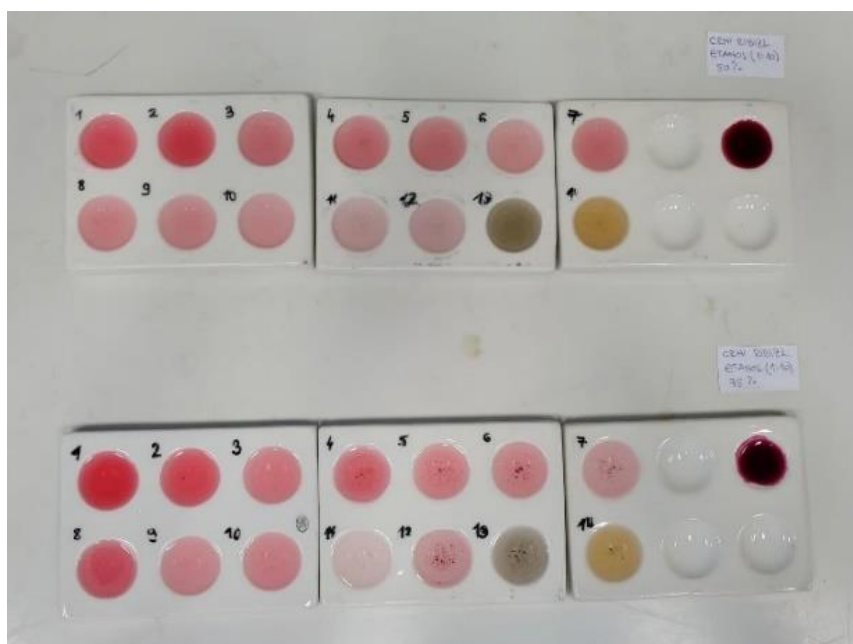


Slika 53. Rezultati primjene indikatora od svježe borovnice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

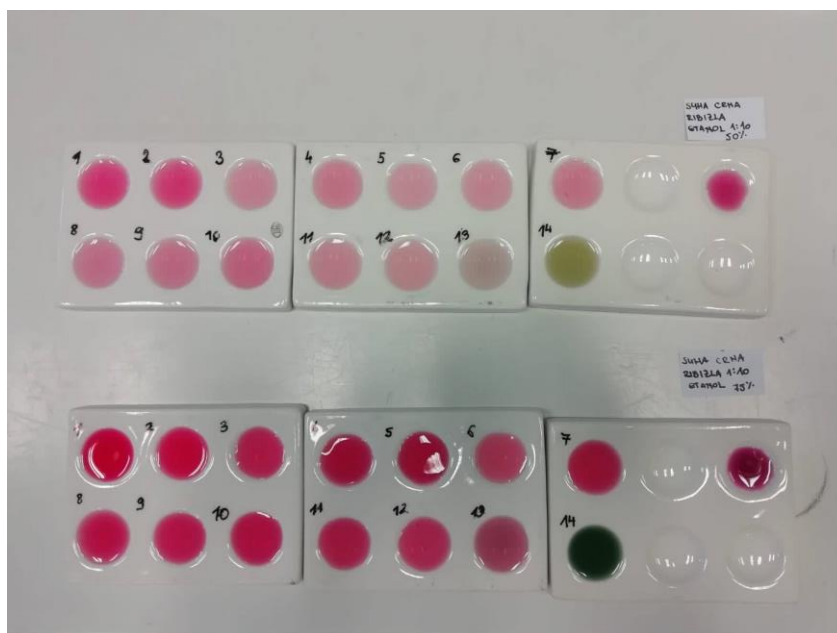


Slika 54. Rezultati primjene indikatora od suhe borovnice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

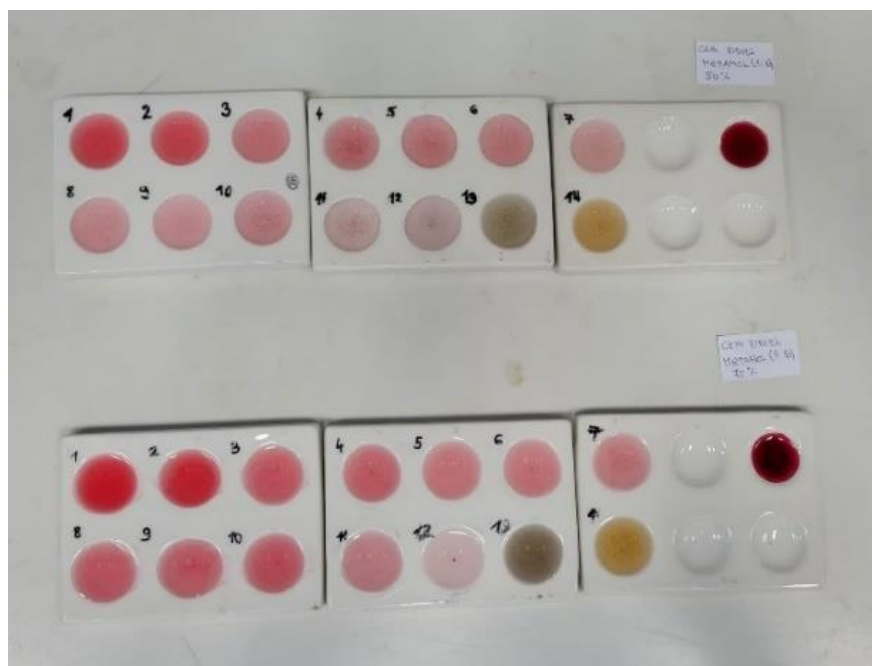
#### 4.3.3. Crni ribiz (*Ribes nigrum* L.)



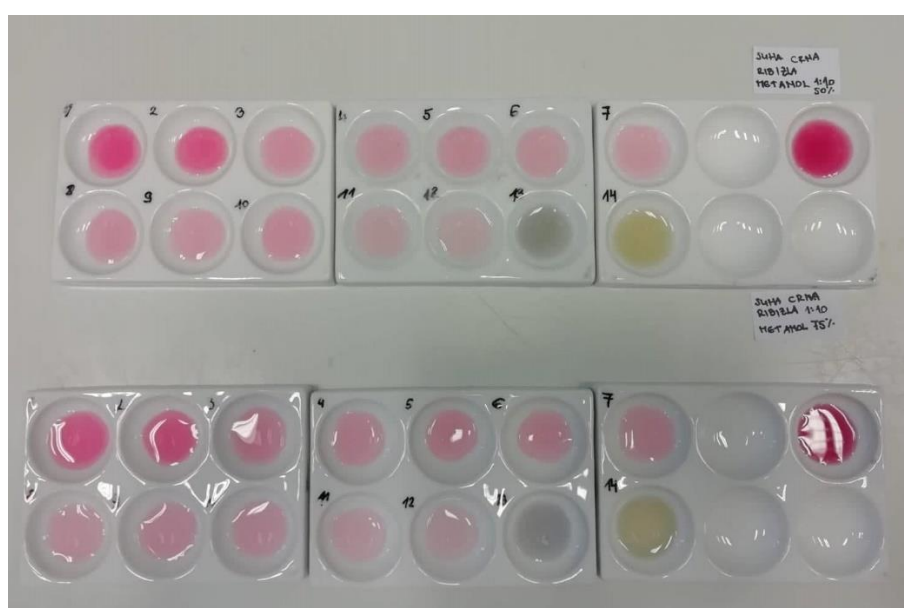
Slika 55. Rezultati primjene indikatora od svježeg crnog ribiza i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 56. Rezultati primjene indikatora od suhog crnog ribiza i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



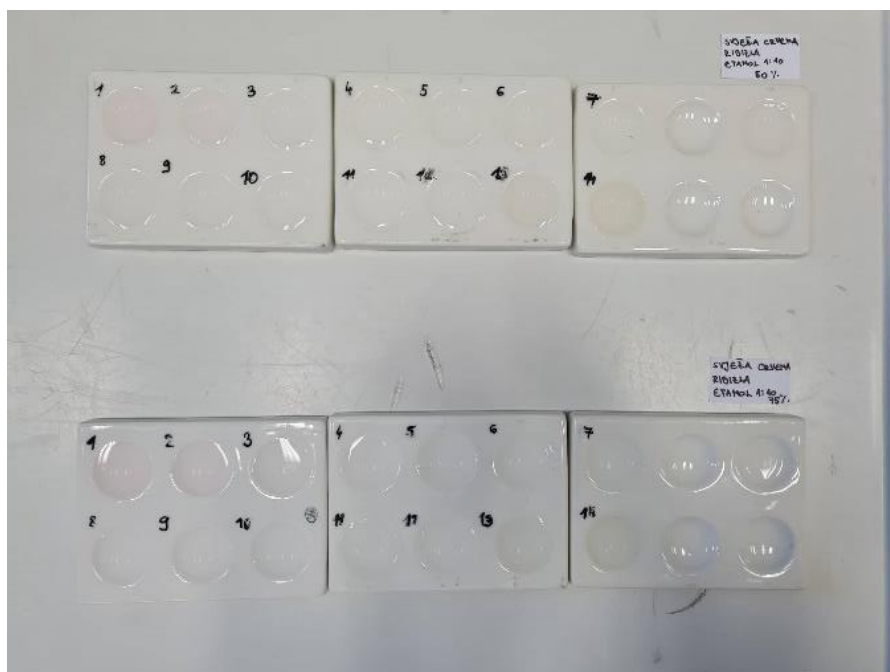
Slika 57. Rezultati primjene indikatora od svježeg crnog ribiza i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



Slika 58. Rezultati primjene indikatora od suhog crnog ribiza i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



#### 4.3.4. Crveni ribiz (*Ribes rubrum* L.)



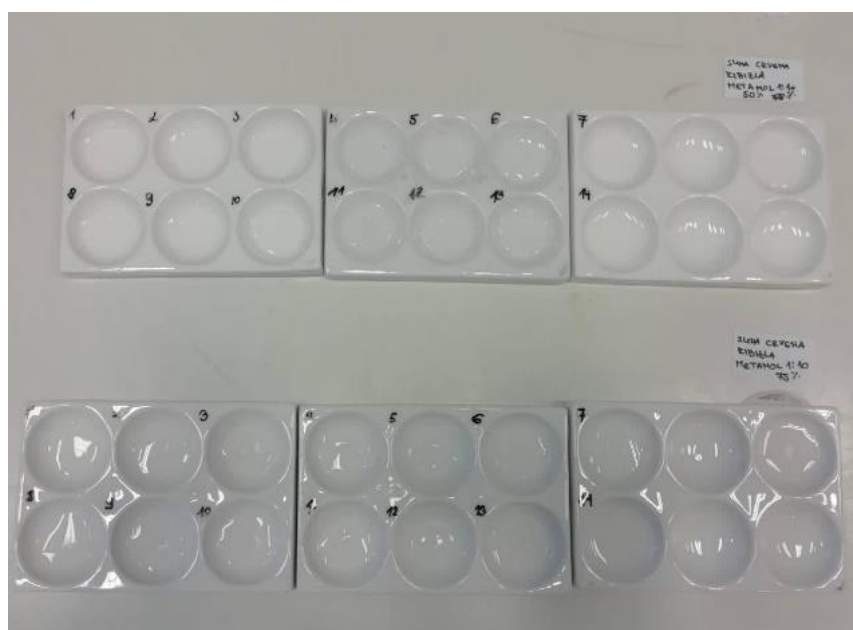
Slika 59. Rezultati primjene indikatora od svježeg crvenog ribiza i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 60. Rezultati primjene indikatora od suhog crvenog ribiza i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



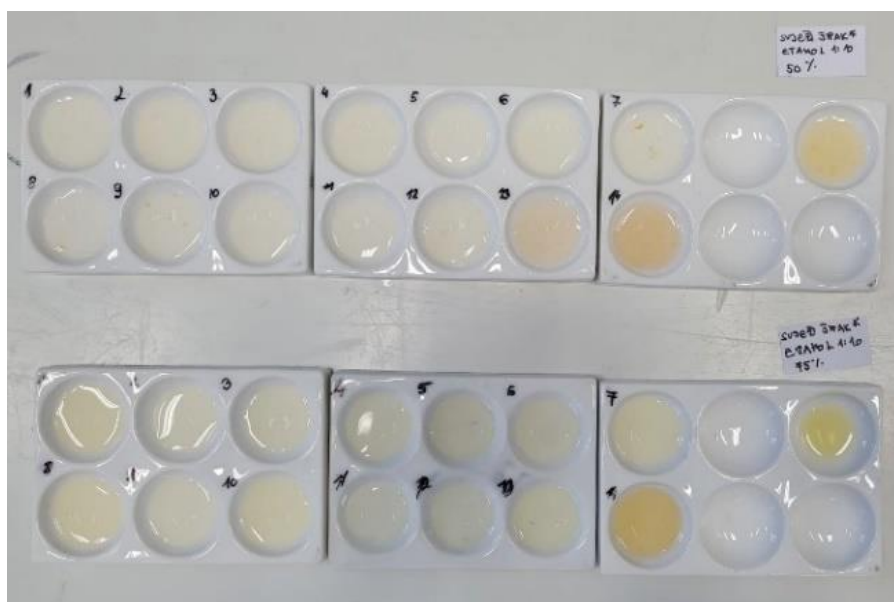
Slika 61. Rezultati primjene indikatora od svježeg crvenog ribiza i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



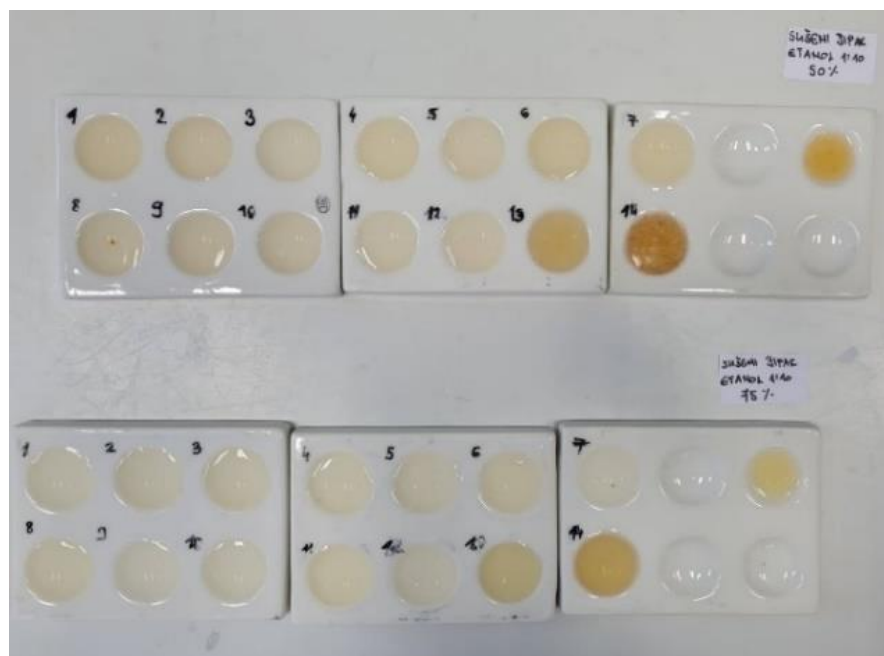
Slika 62. Rezultati primjene indikatora od suhog crvenog ribiza i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



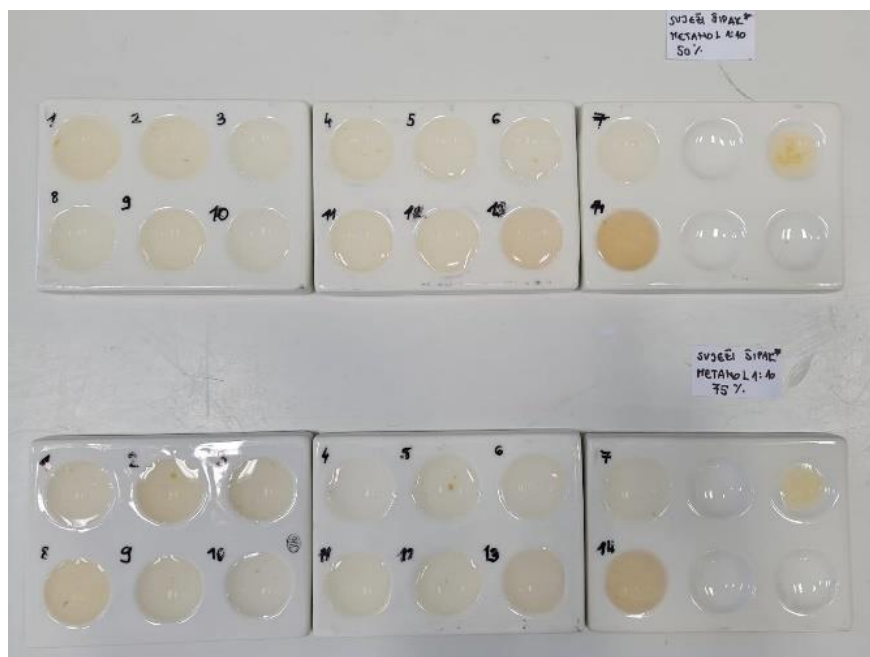
#### 4.3.5. Ružin šipak (*Rosa sp. L.*)



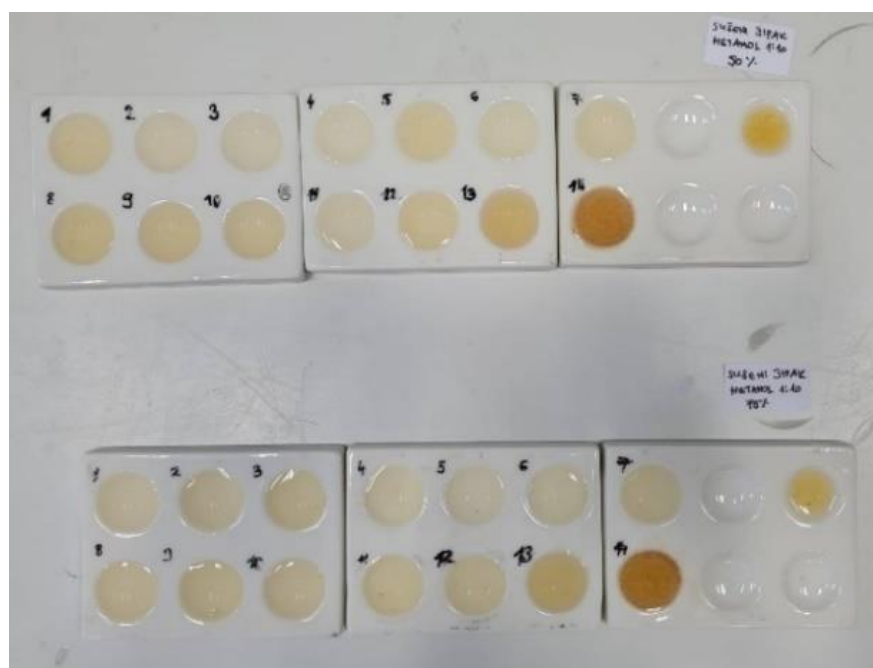
Slika 63. Rezultati primjene indikatora od svježeg ružinog šipka i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 64. Rezultati primjene indikatora od suhog ružinog šipka i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

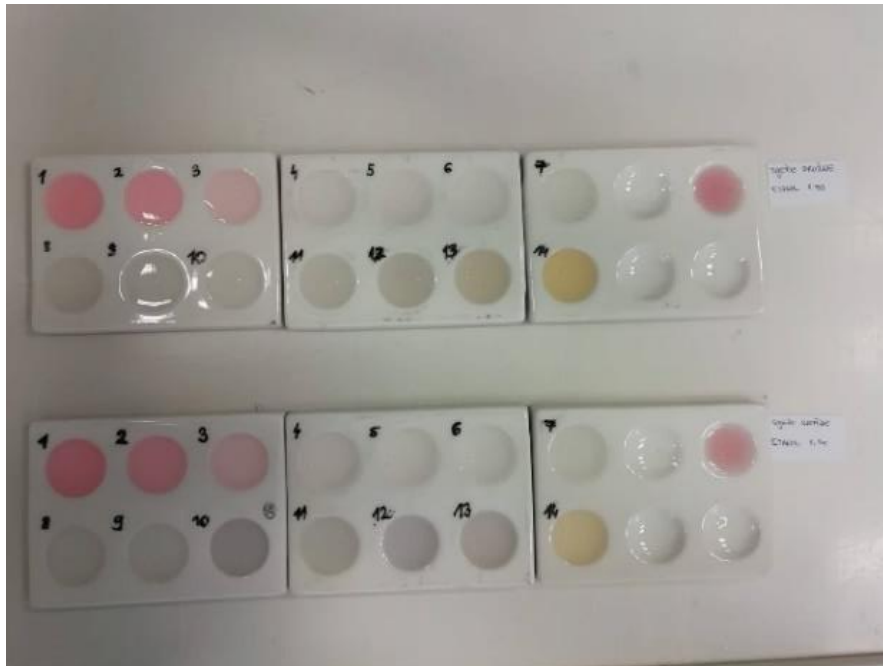


Slika 65. Rezultati primjene indikatora od svježeg ružinog šipka i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



Slika 66. Rezultati primjene indikatora od suhog ružinog šipka i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.3.6. Vinova loza (*Vitis vinifera* L.)



Slika 67. Rezultati primjene indikatora od svježeg *Rose* grožđa i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 68. Rezultati primjene indikatora od grožđica i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 69. Rezultati primjene indikatora od svježeg *Rose* grožđa i 50 % metanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 70. Rezultati primjene indikatora od grožđica i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

#### 4.4. Dodatno voće

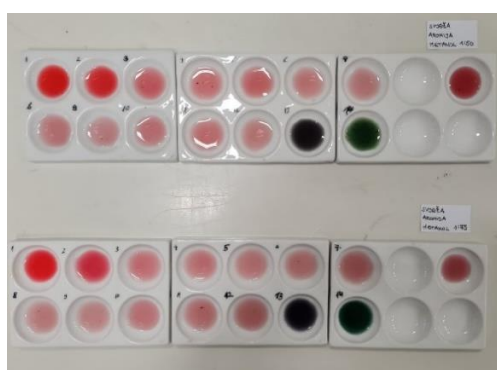
Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje primjene kiselo-baznih indikatora priređenih od dodatnog jagodičastog i bobičastog voća prikazani su na slikama 71.-82.

##### 4.4.1. Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott)



Slika 71. Rezultati primjene indikatora od svježe aronije i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).

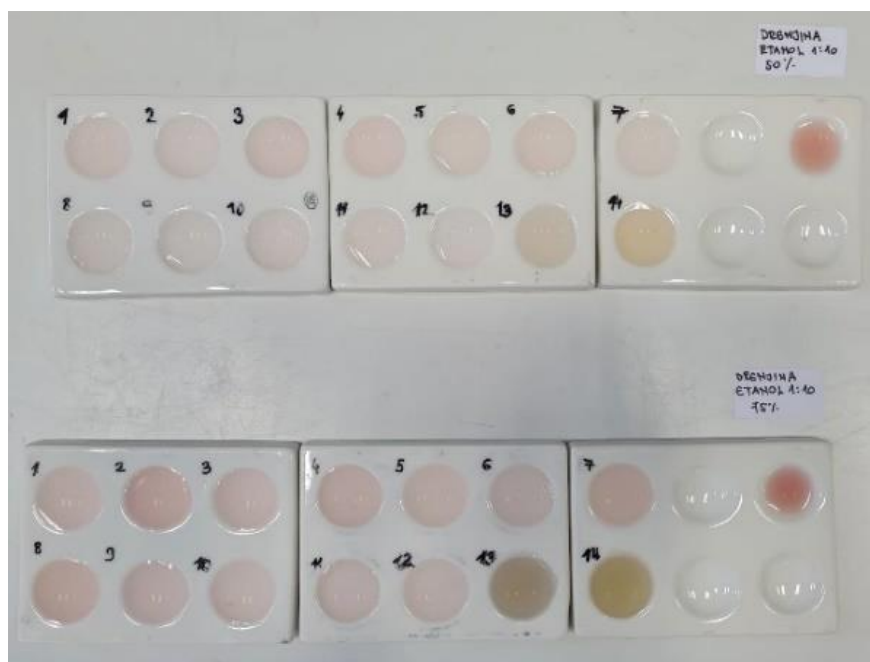
Rezultati primjene indikatora od suhe aronije i etanola prikazani su prethodno, na Slici 17. b) 50 % i c) 75 %.



Slika 72. Rezultati primjene indikatora od svježe aronije i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

Rezultati primjene indikatora od suhe aronije i metanola prikazani su prethodno, na Slici 18. b) 50 % i c) 75 %.

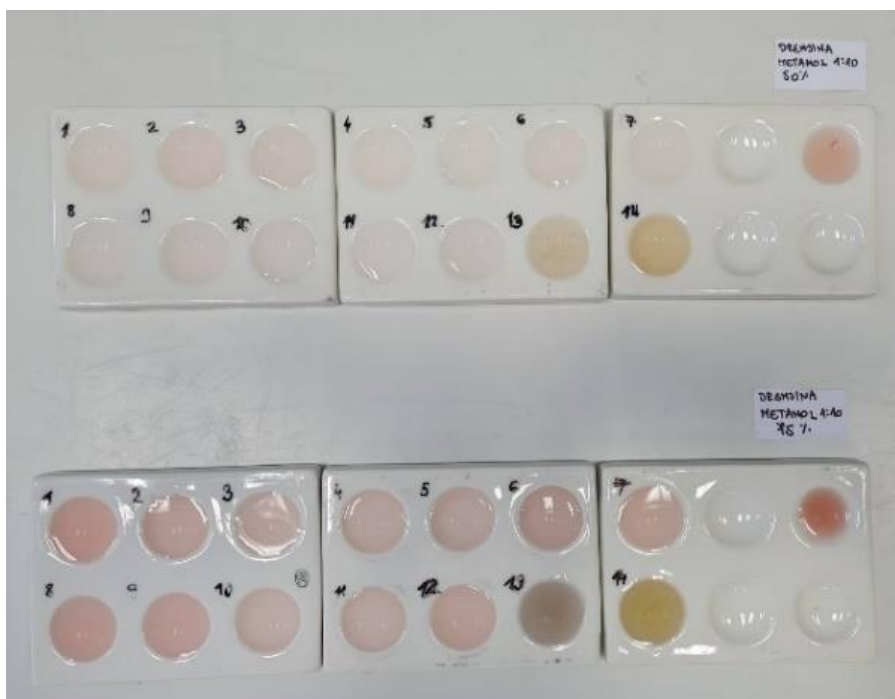
#### 4.4.2. Drenjina (*Cornus mas* L.)



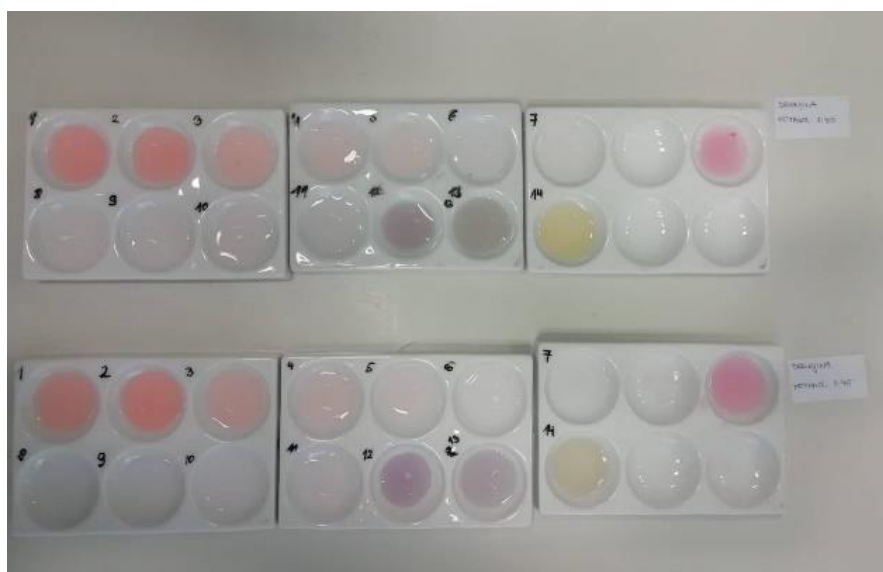
Slika 73. Rezultati primjene indikatora od svježe drenjine i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 74. Rezultati primjene indikatora od suhe drenjine i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



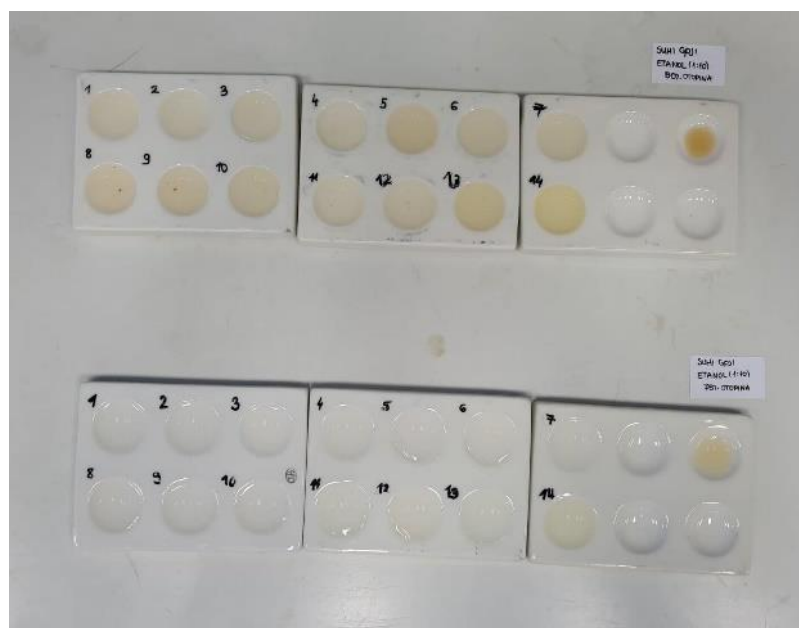
Slika 75. Rezultati primjene indikatora od svježe drenjine i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



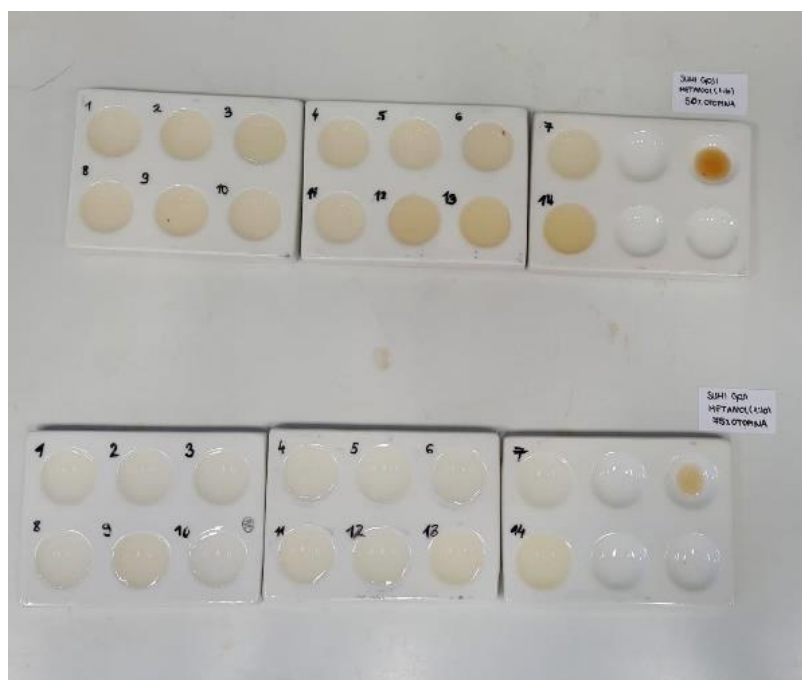
Slika 76. Rezultati primjene indikatora od suhe drenjine i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



#### 4.4.3. Goji bobica (*Lycium sp. L.*)



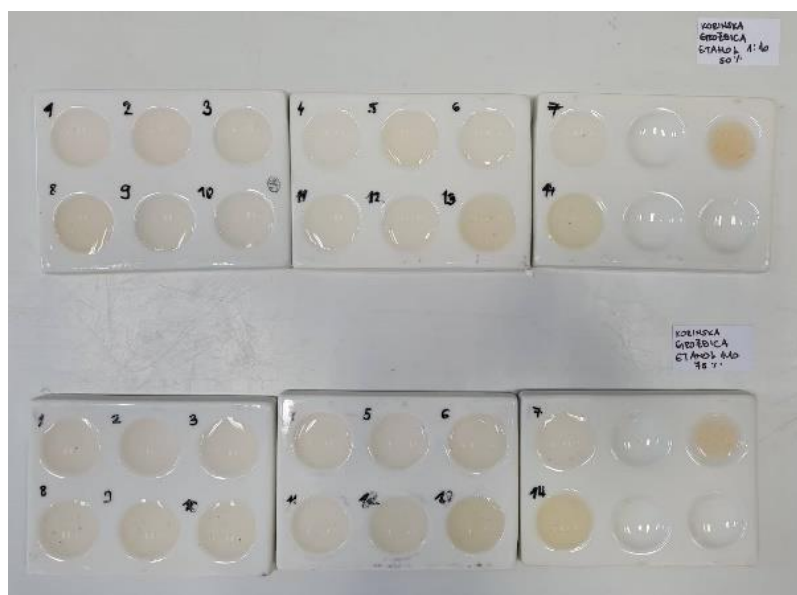
Slika 77. Rezultati primjene indikatora od suhe goji bobice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



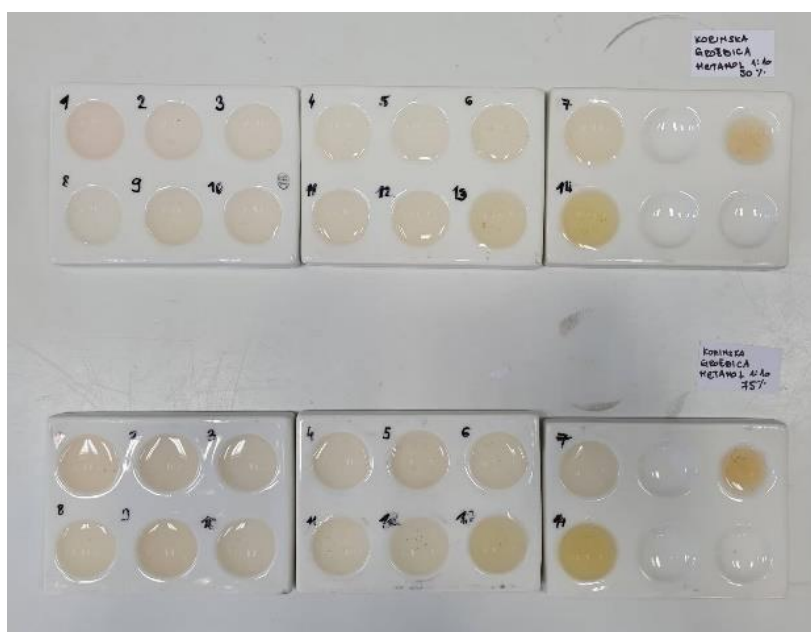
Slika 78. Rezultati primjene indikatora od suhe goji bobice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).



#### 4.4.4. Korinska groždica (*Vitis vinifera* L.)



Slika 79. Rezultati primjene indikatora od korinske groždice i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



Slika 80. Rezultati primjene indikatora od korinske groždice i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

4.4.5. Tayberry bobica (*Rubus fruticosus* × *Rubus idaeus*)



Slika 81. Rezultati primjene indikatora od suhih tayberry bobica i 50 % etanola (gore) i 75 % etanola (dolje).



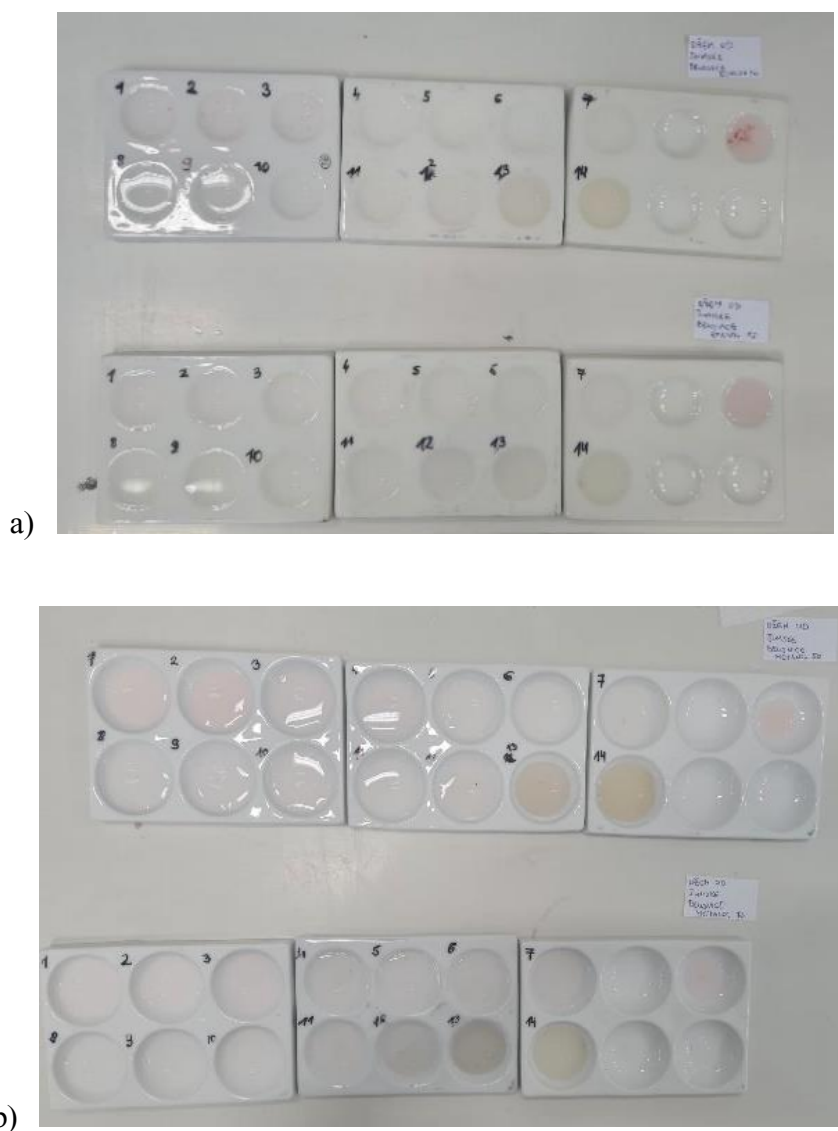
Slika 82. Rezultati primjene indikatora od suhih tayberry bobica i 50 % metanola (gore) i 75 % metanola (dolje).

## 4.5. Voćne prerađevine

Rezultati istraživanja koji se odnose na kiselo-bazne indikatore priređene od biljnih prerađevina (džem, sok i vino) prikazani su na slikama 83.-88.

### 4.5.1 Džem

#### 4.5.1.1. Džem od divljih brusnica



Slika 83. Džem od divljih brusnica s dodanim a) etanolom (50 %, gore i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).

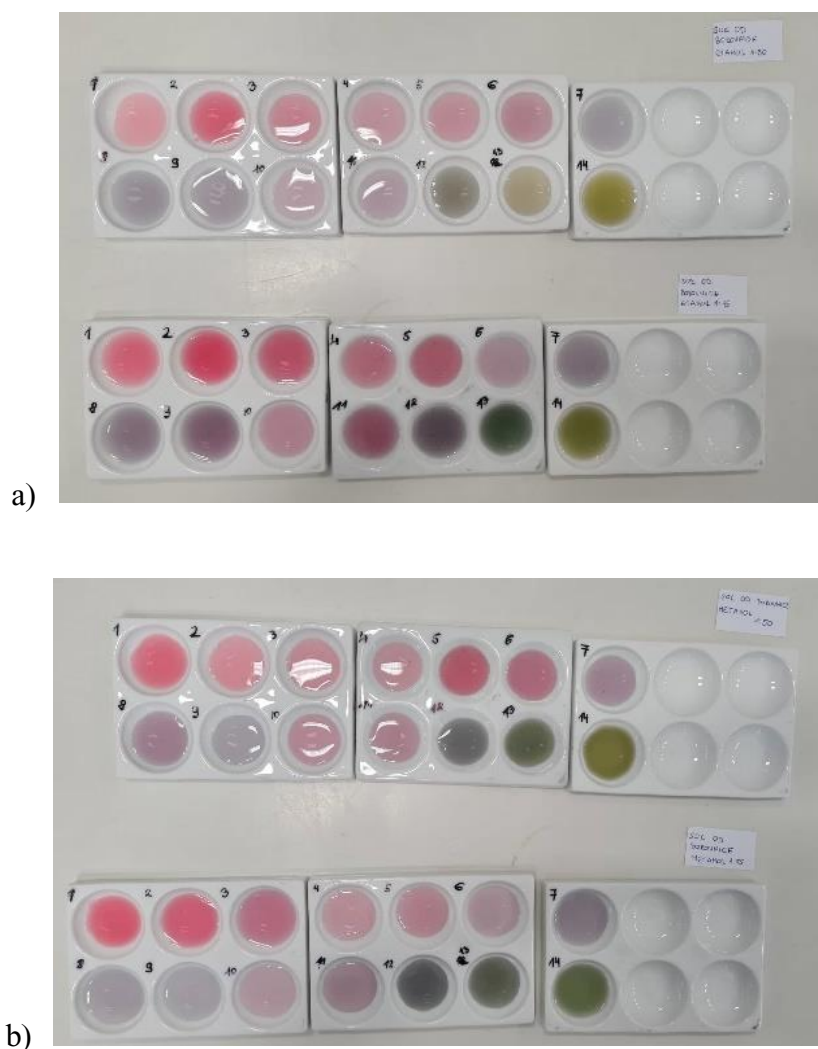
#### 4.5.1.2. Džem od borovnica



Slika 84. Džem od borovnica s dodanim a) etanolom (50 %, gore i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).

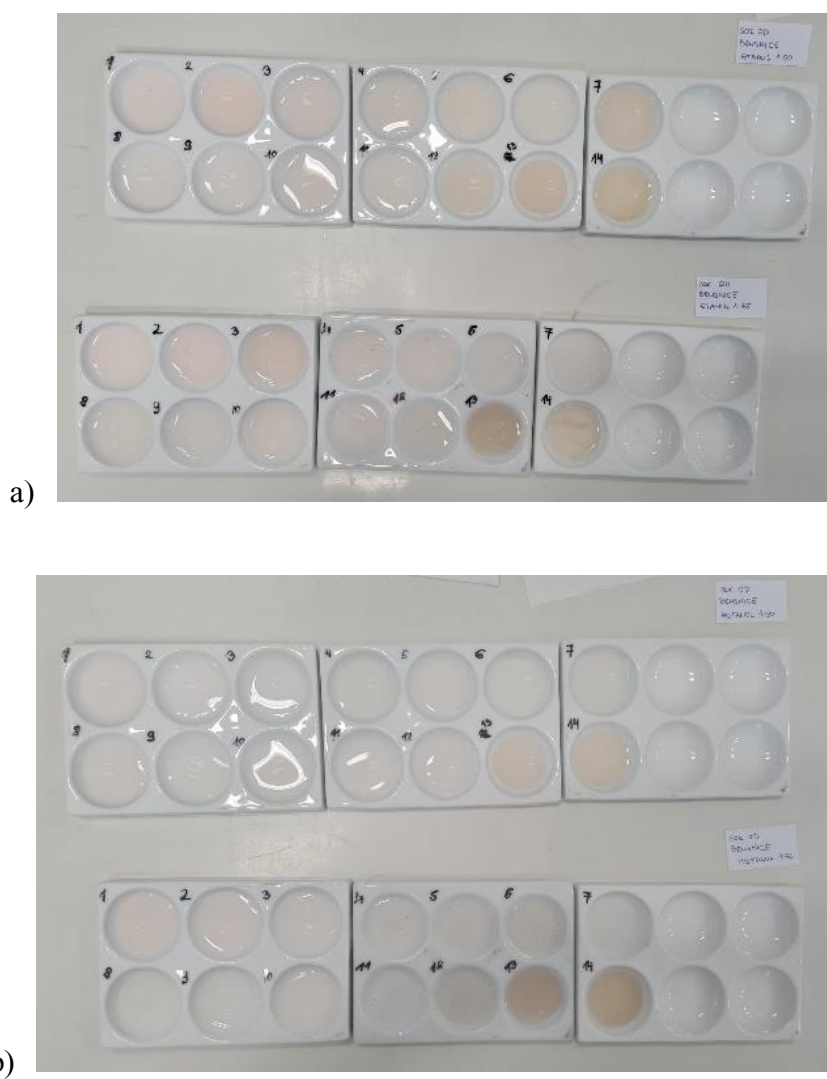
## 4.5.2. Sok

### 4.5.2.1. Sok od šumske borovnice



Slika 85. Sok od šumske borovnice s dodanim a) etanolom (50 %, gore) i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).

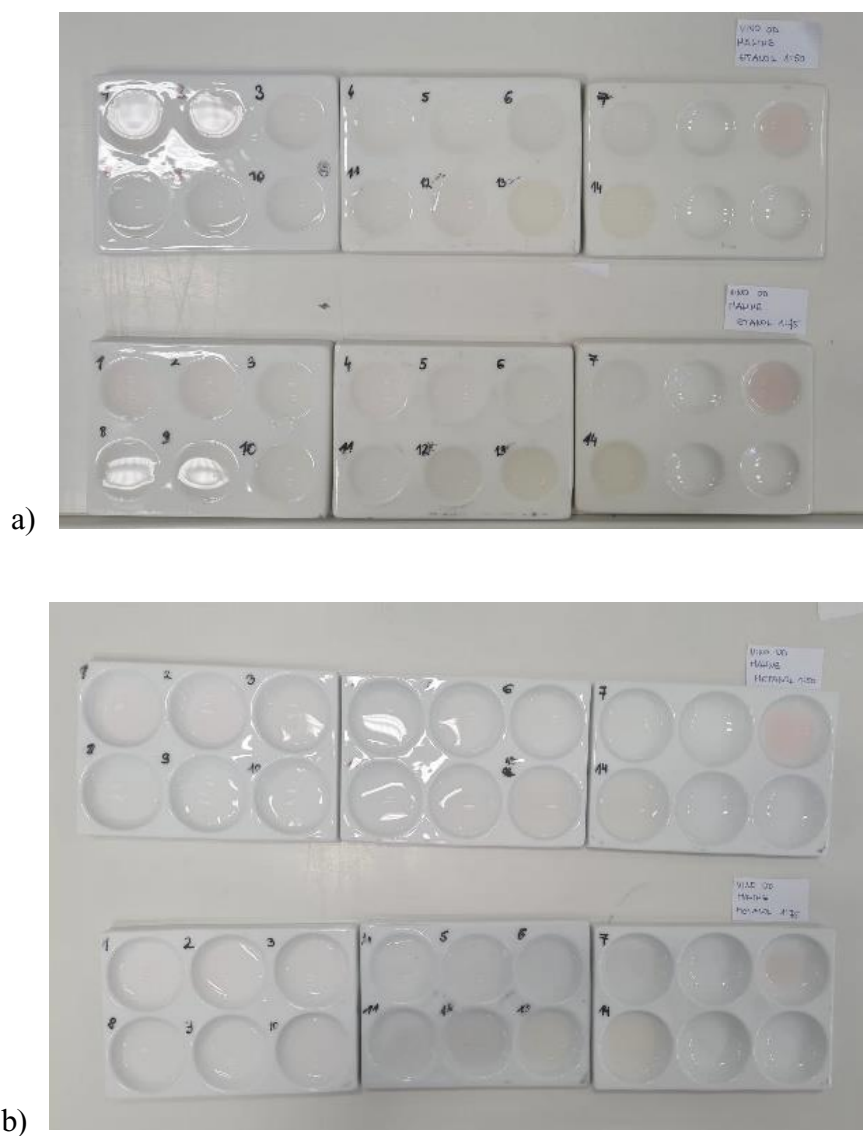
#### 4.5.2.2. Sok od šumske brusnice



Slika 86. Sok od šumske brusnice s dodanim a) etanolom (50 %, gore i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).

### 4.5.3. Vino

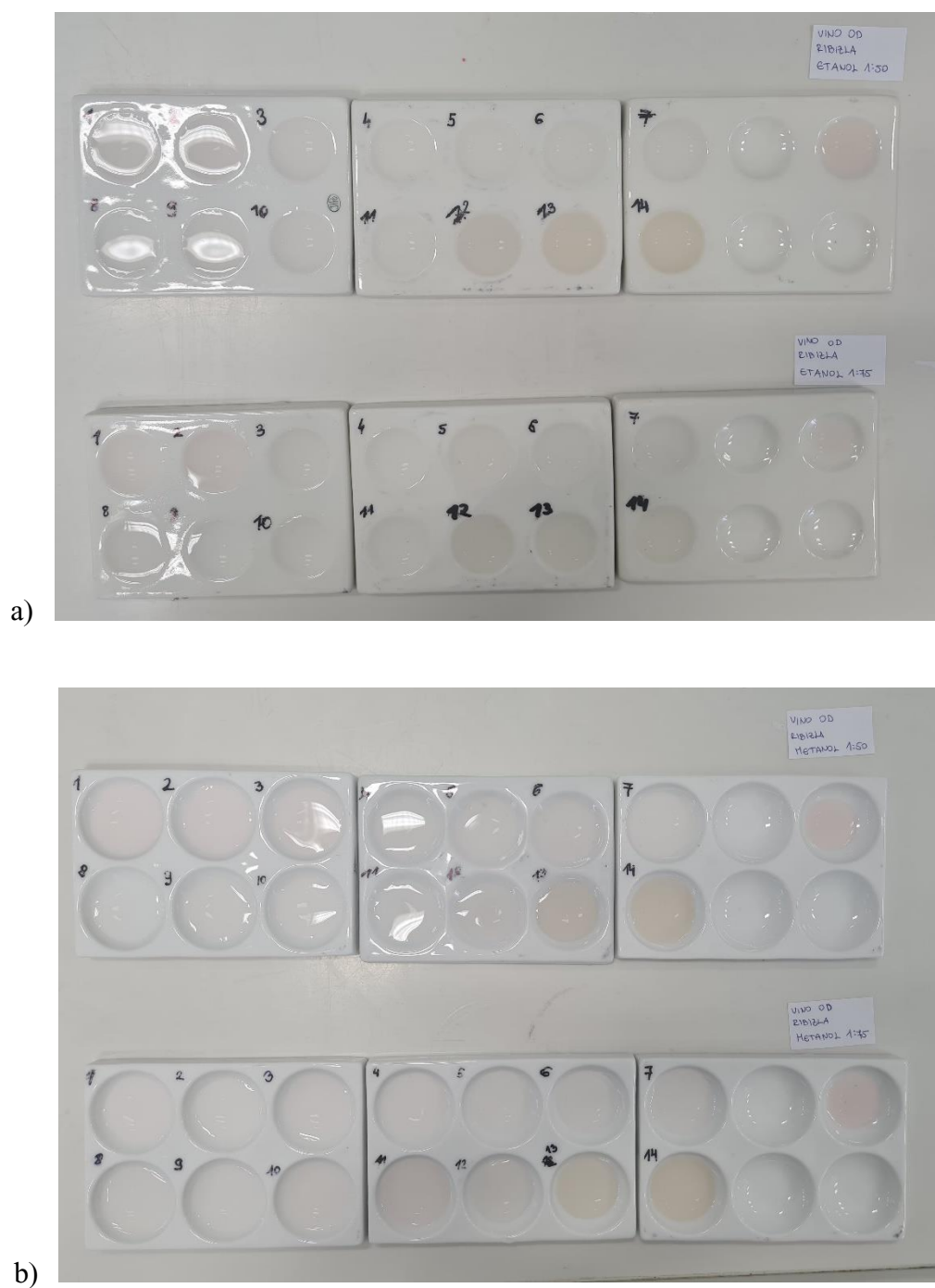
#### 4.5.3.1. Vino od maline



Slika 87. Vino od maline s dodanim a) etanolom (50 %, gore i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).



#### 4.5.3.2. Vино od crvenog ribiza



Slika 88. Vино od crvenog ribiza s dodanim a) etanolom (50 %, gore i 75 %, dolje) i b) metanolom (50 %, gore i 75 %, dolje).



## 5. RASPRAVA

Pregled aktualne znanstvene literature o alternativnim kiselo-baznim indikatorima ukazuje da se glavnina radova koja se bavi ovom tematikom odnosi na ispitivanje primijene ovakvih indikatora u industriji za pametno pakiranje ili za ispitivanje kakvoće hrane. Međutim, ovo istraživanje bilo je usmjereno na mogućnost primijene odabranih otapala u pripremi alternativnih indikatora koji bi svoju primjenu mogli naći primjerice u učionici kemije.

Prema rezultatima preliminarnog ispitivanja, indikator pripremljen od suhe aronije u acetonu (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziran odmah po pripremi (Slika 9.) ne pokazuje nikakve promjene boje pri različitim pH vrijednostima. Kod indikatora pripremljenog od suhe aronije u acetonu (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog nakon 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi (Slika 10.), vidljive su određene promjene boje pri različitim pH vrijednostima. Promjene boje indikatora suhe aronije u acetonu najbolje se vide u omjeru 1 : 15, gdje je indikator u najkiselijem mediju (pH =1) obojen u narančasto, dok je u neutralnim sredinama otopina izbjeljena. Povećanjem pH vrijednosti, indikator poprima žutu boju. Promjene ove vrste indikatora nisu bile dovoljno vidljive i jasne za daljnji rad.

Kod indikatora pripremljenog od suhe aronije u etanolu (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog odmah po pripremi (Slika 11.) promjene boje pri različitim pH vrijednostima bile su vidljive, ali intenzitet boja bio je veći i jasniji kod indikatora pripremljenog od suhe aronije u etanolu analiziranog nakon 24 sata (Slika 12.). Omjeri su također bili 1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20 te su promjene najbolje vidljive kod indikatora od suhe aronije i etanola u omjeru 1 : 10 analiziranog nakon 24 sata (Slika 12. b)). Indikator je u vrlo kiselim sredinama (pH 1-2) bio obojan u žarko crvenu boju, dok je u slabije kiselim do neutralnim sredinama otopina bila obojana blago ružičasto. Rastom pH vrijednosti (pH = 10) otopina poprima blago ljubičasto obojenje te daljnjim rastom otopina postaje intenzivnije ljubičasta (pH = 11). U jako bazičnoj sredini (pH = 13) indikator poprima plavu boju, dok u najbazičnijem mediju (pH = 14) indikator suhe aronije i etanola poprima žuto-zeleno obojenje. Zbog širokog raspona promjena boja pri različitim pH vrijednostima, omjer 1 : 10 činio se kao najpogodniji za daljnje analize.

Kod indikatora pripremljenog od suhe aronije i metanola (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog odmah po pripremi (Slika 13.) i indikatora pripremljenog od suhe aronije i metanola (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog nakon 24 sata (Slika 14.) promjene boje su

jasno vidljive. Vremenskim odmakom od 24 sata promjene boje indikatora od suhe aronije i metanola su postale intenzivnije. Raspon i promjene bile su iste kao kod indikatora suhe aronije i etanola. Prema slikama, bolji indikator za analizu bio je indikator suhe aronije u metanolu (1 : 10) u vremenskom odmaku od 24 sata.

Razlika između indikatora od suhe aronije i vode (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog odmah po pripremi (Slika 15.) i indikatora od suhe aronije i vode (1 : 10, 1 : 15 i 1 : 20) analiziranog nakon 24 sata (Slika 16.) bila je samo u jačini i intenzitetu promjene boje pri različitim pH vrijednostima. U jako kiselom mediju (pH 1-2), otopina je poprimila crvenu do žarko crvenu boju te je intenzitet boje otopina daljnjim povećanjem pH lagano slabio. Kod bazičnog medija (pH 12-13) indikator poprima sivu do zelenu boju dok u najbazičnijem mediju (pH = 14) otopina požuti. Stoga, bolji indikatori bili su suha aronija u etanolu (1 : 10) nakon 24 sata i suha aronija u metanolu (1 : 10) nakon 24 sata.

Nakon toga, u drugom djelu preliminarnog ispitivanja definirana je koncentracija otapala na način da su se odabarana otapala (etanol i metanol) miješala s vodom u određenim omjerima kako bi se utvrdio optimalan omjer vode i otapala. Koncentracije su iznosile 25 %, 50 % i 75 %. Rezultati su prikazani na Slici 17. (suha aronija, etanol (25, 50 i 75 %, 1 : 10), nakon 24 sata) i Slici 18. (suha aronija, metanol (25, 50 i 75 %, 1 : 10), nakon 24 sata). Rezultati koji prikazuju promjene boje indikatora pripremljenog od 100 %-tnog otapala prikazani su na Slici 12. a) (suha aronija, etanol, 1 : 10, 24 sata) i Slici 14. a) (suha aronija, metanol, 1 : 10, 24 sata).

Usporedbom dobivenih rezultata, za dalji rad odabrani su indikator od suhe aronije i etanola (1 : 10) koncentracije 50 % i 75 % nakon 24 sata i indikator od suhe aronije i metanola (1 : 10) koncentracije 50 % i 75 % nakon 24 sata.

Prema dobivenim rezultatima, indikator pripremljen od svježe jagode i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 19.) je u vrlo kiselim sredinama, pH 1-2, svijetlo narančaste boje, dok u slabije kiselim do neutralnim sredinama dolazi do obezbojenja. Pri pH 13 indikator od svježe jagode u etanolu postaje svijetlo ružičaste boje, a u jako bazičnoj sredini, pri pH 14, nastaje žuto obojenje. Također, promjene boja indikatora priređenog od svježe jagode u etanolu vidljivije su pri 50 %-tnoj koncentraciji otapala nego 75 %-tnoj koncentraciji otapala.

Kod indikatora pripremljenog od svježe jagode i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 21.) dolazi do istih promjena kao kod indikatora od svježe jagode u etanolu, samo su promjene vidljivije kod 75 % metanola.

Kod indikatora od suhe jagode i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 20.) promjena je vidljiva samo u jako kiseloj sredini (pH = 1) kada je otopina žarko narančaste boje te u jako bazičnoj sredini kada je otopina posmeđila.

Također, indikator pripremljen od suhe jagode u metanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 22.) pokazuje puno slabiji intenzitet boja od indikatora od suhe jagode i etanola te su promjene vidljive samo u izrazito kiselim sredinama (svijetlo ružičasto obojenje) i u izrazito bazičnim sredinama (svijetlo žuto obojenje).

Za promjene boje indikatora od svježe jagode vjerojatno su zaslužni bioaktivni spojevi prikazani u Tablici 2., od kojih je najzastupljeniji antocijanin pelargonidin-3-*O*-glukozid koji je zaslužan za karakteristično crvenu boju jagode.

Indikator priređen od svježe šumske jagode s etanolom (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 23.) pokazuje promjene boje samo u jako bazičnim sredinama, pH 13-14, gdje je otopina obojana narančasto-smeđe. U ostalim pH sredinama indikator ne dovodi do promjene boje pH otopina. Razlike između indikatora pripremljenog s 50 %-tnim etanolom i 75 %-tnim etanolom nisu vidljive.

Nadalje, indikator od svježe šumske jagode u metanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 24.) pokazuje promjene boje u jako kiseloj sredini, pH 1-2, gdje je otopina svijetlo ružičaste boje, dok je u jako bazičnim sredinama, pH 13-14, otopina žuto-smeđe boje. Također, razlike s 50 %-tnim metanolom i 75 %-tnim metanolom nisu uočene.

Indikator od svježe kupine i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 25.) prikazuje promjenu boje u jakom kiselom mediju te je pri pH 1 jarko crvene boje i pH 2 malo manje intenzivne crvene boje. U jako bazičnom mediju, pH 14, otopina je žuto-zelene boje, a pri pH 13 javlja se plavo obojenje. U ostatku pH vrijednosti (pH 3-12) otopina je jako blijedo obojana, gotovo kao početna otopina. Nadalje, intenzivnije promjene boje vide se kod 50 %-tne koncentracije etanola nego kod 75 %-tne koncentracijeg etanola.

Indikator napravljen od svježe kupine i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 27.) pokazuje malo manje intenzivne, ali iste promjene kao i svježa kupina u etanolu. Jedino u jako bazičnom mediju indikator od svježe kupine i 50 %-tnog metanola daje žuto obojenje.

Spojevi koji bi mogli biti zaslužni za promjenu boje indikatora pripremljenog od svježe kupine prikazani su u Tablici 3. Najdominantniji bioaktivni spojevi su: antocijanini i fenolne kiseline, točnije cijanidin-3-*O*-glukozid i elaginska kiselina. Visoke koncentracije cijanidin-3-*O*-glukozida najviše doprinose promjeni boje indikatora, dok su visoke koncentracije elaginske kiseline zaslužne za antioksidativna svojstva svježih kupina.

Indikator od suhe kupine i 75 %-tnog etanola (1 : 10, Slika 26.) prikazuje promjene samo u jako kiselom i u jako bazičnom mediju. Kod pH 1-2 otopina je poprilično svijetlo ružičastu boju, dok je kod pH 13-14 zeleno-žuto obojenje otopine. Otopine ostalih pH vrijednosti (3-12) ne pokazuju značajnu promjenu boje. Promjene boje kod indikatora od suhe kupine u 50 %-tnom etanolu (1 : 10) nisu vidljive.

Kod indikatora pripremljenog od suhe kupine i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 28.) promjene boje događaju se u jako kiselom mediju (pH 1-2), gdje se otopina obojala u vrlo svijetlo ružičastu boju te u jako bazičnom mediju (pH 13-14) gdje se otopina obojala u žutu boju. Ostale otopine (pH 3-12) nemaju izraženo obojenje. Razlike između 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nisu uočene.

Indikator od svježe crvene maline u etanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 29.) u jako kiselim sredinama (pH 1-2) daje svijetlo crveno-ružičastu boju koja se povećanjem pH vrijednosti gubi. Kod jako bazičnih sredina, kao što je pH 13, otopina je sive boje, dok je kod pH 14 otopina žute boje. Razlike u koncentracijama etanola vidljive su samo u jako bazičnim sredinama gdje je boja intenzivnija kod 50 %-tnog etanola.

Kod indikatora napravljenog od svježe crvene maline i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 31.) dolazi do žutog obojenja otopine samo u jako bazičnim sredinama (pH 13-14), dok kod ostalih pH vrijednosti promjene boje otopine nisu vidljive. Također, razlika 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nije značajna.

Najdominantniji bioaktivni spojevi (prema Tablici 4.) u svježoj crvenoj malini su antocijanini cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-soforozid koji su vrlo vjerovatno odgovorni za promjenu boje otopine svježe crvene maline u etanolu. Osim antocijanina, svježa crvena malina sadrži visoke koncentracije hidroksibenzojevih kiselina kao što su lambertianin C i sanguin H-6 koji doprinose antioksidativnom učinku svježih crvenih malina.

Indikator od suhe crvene maline u etanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 30.) u jako kiseloj sredini (pH 1) daje blago ružičasto obojenje, dok povećanjem pH otopina postaje blago narančasta, osim u jako bazičnoj sredini (pH 14) gdje je otopina poprimala maslinasto zelenu boju. Promjene boje su jasnije i intenzivnije kod indikatora u 75 %-tnom etanolu, dok su kod indikatora u 50 %-tnom etanolom promjene slabo vidljive.

Kod indikatora suhe crvene maline u metanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 32.), promjene boje vrlo su slične kao kod indikatora pripremljenog od suhe crvene maline u etanolu. Razlike između 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nisu vidljive, osim u jako bazičnoj sredini (pH 14).

Indikator od suhe crne maline u etanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 33.) pokazuje širok spekter boja prilikom promjene pH otopine. U jako kiselim sredinama (pH 1-2) otopina je obojana žarko crveno, ali porastom pH intenzitet boje se smanjuje. U slabije bazičnoj sredini (pH 10-11) otopina je obojana blago ljubičasto, u jače bazičnoj sredini (pH 12) u tamnije ljubičasto. Velikim porastom bazičnosti otopine (pH 13) otopina je obojana u tamnoplavo te u izrazito bazičnoj sredini (pH 14) otopina je obojana u maslinasto zeleno. Razlike su što 50 %-tni etanol u jako bazičnoj sredini (pH 14) poprimi maslinasto zeleno obojenje, dok 75 %-tni etanol u istom mediju poprimi žuto (oker) obojenje.

Nadalje, indikator pripremljen od suhe crne maline i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 34.) pokazuje iste promjene kao suha crna malina u etanolu. Razlike koncentracija 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nisu vidljive.

Indikator od svježeg bijelog dudu u etanolu (50 % i 75 %, 1 : 10, Slika 35.) ne pokazuje nikakve promjene boje pri različitim pH vrijednostima, dok indikator pripremljen od svježeg bijelog dudu i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 37.) pokazuje slabo žuto obojenje u jako bazičnim sredinama (pH 12-14). Promjene su vidljivije kod indikatora u 75 %-tnom metanolu nego kod indikatora u 50 %-tnom metanolu.

Suhi bijeli dud u etanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 36.) u jako kiselim do neutralnim sredinama pokazuje slabo žuto obojenje, dok povećanjem pH, otopina postaje intenzivnije žuto obojena. Promjene intenziteta boje indikatora su puno vidljivije u 50 %-tnom etanolu, dok se u 75 %-tnom etanolu promjene gotovo ni ne vide.

Indikator od suhog bijelog dudu i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 38.) prikazuje iste promjene kao i suhi bijeli dud u etanolu, samo su promjene intenzivnije kod indikatora istog voća u 75 %-tnom metanolu.

Indikator pripremljen od svježe crnog dudu i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 39.) kod vrlo kiselog medija (pH 1-2) daje blago ružičasto obojenje. Povećanjem pH otopina postaje blago zelena, dok je u jako bazičnim sredinama (pH 13-14) otopina obojena žuto-zeleno. Razlike između 50 %-tne i 75 %-tne koncentracije otapala nisu uočene.

Indikator od svježeg crnog dudu i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 41.) može poslužiti kao jako dobar alternativni kiselo-bazni indikator jer pokazuje vidljiv i širok raspon promjena boja. U vrlo kiselom mediju (pH 1-2) otopina je obojana u intenzivnu ružičastu boju, pri pH 3 intenzitet boje se smanjio te je obojana u blago ružičasto. U slabije kiselom do neutralnom mediju (pH 4-7) otopina se obezbojila, povećanjem bazičnosti otopine (pH 8-11) otopina poprima sve intenzivniju sivu boju. U vrlo bazičnoj sredini (pH 13) otopina je obojana u zeleno, dok u najbazičnijoj sredini (pH 14) otopina poprima žuto-zelenu boju. Ove promjene

su vidljive samo kod indikatora u metanolu 50 %-tne koncentracije, dok kod indikatora u metanolu 75 %-tne koncentracije promjene nisu uočene.

Indikatori koji se pripravi od crnog duda i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 40.) i od crnog duda i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 42.) ne pokazuju vidljive promjene boje pri različitim pH vrijednostima, osim u jako bazičnom mediju (pH 13-14) gdje dolazi do tamnjenja otopine.

Indikator napravljen od svježeg crvenoga duda u etanolu (50 % etanol, 75 % etanol, 1 : 10, Slika 43.) ne pokazuje nikakve promjene boje pri različitim pH vrijednostima niti u jednoj od koncentracija, isto kao i svježi bijeli dud u etanolu.

Indikator od svježeg crvenog duda i metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 45.) pokazuje slabije žuto obojenje u jako bazičnim sredinama (pH 12-14) dok je u ostalim medijima otopina bezbojna. Promjene kod 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nisu vidljivije.

Indikator pripravljen od svježe brusnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 47.) pokazuje promjene boje samo kod 75 %-tnog etanola. Indikator je u jako kiselim sredinama (pH 1-3) blago ružičaste boje, dok se povećanjem pH vrijednosti otopina obezboji. U jako bazičnom mediju (pH = 13) otopina je posivila, dok je kod pH 14 otopina poprilično zeleno obojenje.

Indikator od svježe brusnice i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 49.) pokazuje iste promjene boje kao svježa brusnica u etanolu. Indikator pripravljen od suhe brusnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 48.) pokazuje intenzivnije promjene boje od indikatora sa svježim brusnicama. No, uzevši u obzir početnu boju otopine, promjene boje otopine nisu značajne te se promjena događa samo u jako bazičnim sredinama gdje je kod pH = 13 otopina sive boje, dok je kod pH 14 otopina pozelenila. Također, iste promjene se događaju i kod indikatora od suhe brusnice i metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 50.) samo su boje malo intenzivnije.

Najzastupljeniji bioaktivni spojevi koji su prisutni su svježoj (američkoj) brusnici prikazani su u Tablici 9. iz koje je vidljivo da su najdominatniji antocijanin peonidin-3-O-galaktozid odgovoran za crvenu boju brusnice i benzojeva kiselina koja posjeduje fungicidna i antibakterijska svojstva. Upravo zbog tih svojstava, svježa brusnica često se koristi kao prirodni lijek protiv urinarnih infekcija.

Nadalje, promjene boje otopine kod indikatora pripremljenog od svježih borovnica i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 51.) vrlo su intenzivne. U jako kiselim sredinama (pH 1-2) otopina je magenta boje, dok rastom pH otopina blijedi. U bazičnom mediju (pH = 13) otopina poprima zelenu boju, dok je kod pH = 14 otopina požutila. Učinak različite koncentracije otapala (50 % i 75 %) nije utvrđen, odnosno nije vidljiv.

Kod indikatora pripremljenog od svježih borovnica i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 53.) promjene boje su iste, ali intenzitet boja je puno manje izražen nego kod indikatora pripremljenog od istog voća u etanolu.

Indikator pripremljen od suhih borovnica i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 52.) i metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 54.) također pokazuju iste promjene kao indikator od svježih borovnica u etanolu. Razlike u koncentracijama 50 %-tnog i 75 %-tnog etanola nisu vidljive, kao ni razlike 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola.

Unatoč intenzivnim i žarkim promjenama boje koje nastaju djelovanjem indikatora od svježe borovnice, koncentracije antocijanina uopće nisu značajne (Tablica 8.). Najzastupljeniji bioaktivni spojevi su kvercetin i ferulična kiselina zbog čega svježa borovnica posjeduje vrlo jaka antioksidativna svojstva.

Indikator pripremljen od svježeg crnog ribiza i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 55.) pokazuje značajne promjene boje u odnosu na početnu (tamnocrvenu) otopinu. U jako kiselom mediju (pH 1-2) otopina je obojana u jarko crvenu boju, dok se povećanjem pH intenzitet boje otopine smanjuje. U bazičnom mediju (pH = 13) otopina je obojana u maslinasto zelenu boju, dok je kod pH 14 otopina požutila. Razlike između indikatora 50 %-tne koncentracije etanola i 75 %-tne koncentracije etanola nisu vidljive. Također, iste promjene događaju se kod indikatora pripremljenog od istog voća u 50 % i 75 % metanolu, 1 : 10 (Slika 57.).

Iako je intenzitet boja kod indikatora pripremljenog od suhog crnog ribiza i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 56.) vrlo jak, promjena boje otopine događa se samo u izrazito bazičnom mediju (pH 14) gdje je otopina zelene boje, dok je kod ostalih pH vrijednosti otopina iste boje kao i početna boja indikatora. Razlika u 50 %-tnom i 75 %-tnom etanolu je samo u intenzitetu boja.

Kod indikatora pripremljenog od suhog crnog ribiza i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 58.) također ne dolazi do promjena boje u odnosu na početnu boju indikatora. Promjene boje su vidljive samo u bazičnom mediju (pH = 13) gdje je otopina posivila i kod pH 14 gdje je otopina poprimila žuto-zeleno obojenje.

Pretragom Phenol-Explorera vidljivo je da je crni ribiz bogat antocijaninima koji su odgovorni za intenzitet boja otopina. Neki od najzastupljenijih su: delfinidin-3-*O*-rutinozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid i delfinidin-3-*O*-glukozid (Tablica 5.).

Indikatori pripremljeni od: svježeg crvenog ribiza i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 59.) i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 61.), te suhog ribiza i etanola (50 i 75 %, 1 : 10,

Slika 60.) i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 62.) ne pokazuju nikakve promjene boje, točnije otopine su iste boje kao i početna otopina.

Za razliku od crnog ribiza, crveni ribiz sadrži puno manje koncentracije antocijanina zaslužnih za intenzivno obojenje otopine. Dominacija antocijanina poput cijanidin-3-*O*-sambubiozida i cijanidin-3-*O*-ksilozil-rutinozida može biti razlog manjkavosti promjena boje otopine.

Indikator pripremljen od svježeg ružinog šipka i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 62.) i indikator pripremljen od svježeg ružinog šipka i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 64.) pokazuje iste boje u svim pH vrijednostima, osim u bazičnoj sredini gdje otopina postaje blago narančasta.

Promjene boje također nisu značajne ni kod indikatora pripremljenih od suhog ružinog šipka i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 62.) i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 63.). Otopina je blago žuto obojana u svim pH sredinama, osim u bazičnom mediju gdje je otopina poprimila narančasto-smeđu boju.

Nadalje, indikator pripremljen od svježeg *Rose* grožđa u etanolu (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 67.) pokazuje značajne promjene u različitim pH sredinama. U kiselom mediju otopina je obojana u ružičasto, dok se porastom pH otopina obezbojila. U bazičnom mediju (pH 10-13) otopina je poprimila blago sivo do blago plavo obojenje, dok je otopina kod pH 14 postala žuta. Razlike u koncentracijama otapala (50 % etanol, 75 % etanol) nisu vidljive. Promjene boje ovog indikatora identične su promjenama boje indikatora pripremljenog od svježeg *Rose* grožđa u metanolu (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 69.)

Kod indikatora od suhih groždica u etanolu (50 % i 75 % etanol, 1 : 10, Slika 68.) i indikatora od groždica u metanolu (50 % i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 70.) nema nikakvih promjena boje.

Indikator pripremljen od svježe aronije i etanola (50 % i 75 % etanol, 1 : 10, Slika 71.) u jako kiseloj sredini (pH 1-2) je obojan ružičasto, dok je daljnjim rastom pH vrijednosti otopina postala sve svijetlija. U neutralnom mediju otopina je poprimila blago sivo obojenje, a kod pH 13 otopina je poprimila maslinasto zelenu boju, dok je kod pH 14 otopina požutila. Razlike kod koncentracija otapala (50 % i 75 % etanol) indikatora je ta da stajanjem indikator pripremljen sa 75-% tnm etanolom u jako bazičnoj sredini (pH 14) pozeleni (Slika 71., dolje).

Indikator pripremljen od suhe aronije i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 72.) pokazuje manji raspon boja pri različitim pH vrijednostima u odnosu na indikator suhe aronije i etanola. U vrlo kiselom mediju (pH 1-2) indikator od suhe aronije i metanola mijenja boju u



žarko crveno, dok porastom pH otopina postaje blago ružičasta. Razlike u boji između pH 3-12 nisu primjetne. Kod jako bazičnog medija (pH 13) otopina je poprimila tamnoplavo do crno obojenje, dok je kod pH 14 otopina pozelenila. Razlike u koncentracijama 50 %-tnog i 75 %-tnog metanola nisu značajne.

Najzastupljeniji bioaktivni spojevi koji su prema Phenol-Explorer bazi utvrđeni u aroniji nalaze se u Tablici 11. Svježa aronija sadrži izmino visoke koncentracije antocijanina koji su zaslužni za intenzivne i žarke promjene boje otopine. Neki od antocijanina su cijanidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-ksilozid.

Indikator od svježe drenjine i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 73.) i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 75.) pokazuju iste promjene pri određenim pH vrijednostima. U kiselim do neutralnim sredinama otopina je obojana u blago narančasto dok se promjene vide samo kod jako bazičnog medija (pH 13-14) gdje otopina poprima smeđe do žuto obojenje. Kod oba indikatora razlika u koncentraciji otapala (50 i 75 %) vidljiva je u intenzitetu boja. Intenzitet boja jasniji je i uočljiviji kod 50 %-tnog etanola.

Također, indikator pripremljen od suhe drenjine i etanola (50 i 75 % etanol, 1 : 10, Slika 74.) i metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 76.) pokazuje iste promjene boje pri određenim pH vrijednostima. U jako kiselom mediju (pH 1-2) otopina je obojana u ružičasto, dok povećanjem pH otopina lagano blijedi. Dolaskom do bazične sredine (pH 12-13) otopina poprima sivo-ljubičasto obojenje, a kod pH 14 otopina postaje žuta.

U slučaju indikatora pripremljenog od suhih goji bobica i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 77.) ili metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 78.), promjena boja otopine pri različitim pH vrijednostima gotovo da ni nema. Jedina razlika je u intenzitetu boja kod 50 %-tne koncentracije kod oba otapala.

Kao ni suhe goji bobice, tako ni indikator od korintske grožđice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 79.) ili metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 80.) ne pokazuje promjene boje pri različitim pH vrijednostima u odnosu na početnu boju indikatora.

Indikator od suhih tayberry bobica i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 81.) i indikator s metanolom (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 82.) mogu poslužiti kao indikatori za vrlo bazično područje. Naime, kod pH 1-12 otopina je blago ružičaste boje, kod pH 13 otopina je smeđe boje dok je kod pH 14 otopina obojana u žuto. Razlike u 50 %-tnom i 75 %-tnom etanolu nisu vidljive.

Nadalje, analizom primjene voćnih prerađevina kao indikatora (džema od divlje brusnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 83. a)) ili metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 83. b)) nisu dobivene jasno vidljive promjene boje pri različitim pH vrijednostima. Bioaktivni

spojevi u džemu od brusnice, prema podacima dobivenima pomoću Phenol-Explorera, prikazani su u Tablici 10. Za razliku od svježe brusnice, koncentracije antocijanina su puno manje, što je vjerojatni razlog dobivenih rezultata u slučaju džema. Neki od antocijanina prisutnih u džemu od brusnica su: delphinidin-3-*O*-galaktozid, delphinidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid.

Indikator pripremljen od džema od borovnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 84. a)) nije najpogodniji alternativni kiselo-bazni indikator. U jako kiselim sredinama (pH 1-2) otopina je blago ružičasta dok daljnjim povećanjem pH boja otopine blijedi, a u jako bazičnim sredinama (pH 13-14) otopina poprima blago žutu boju. Indikator od džema od borovnica i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 84. b)) pokazuje jasnije promjene od indikatora od istog voća u etanolu. Kod vrlo kiselog medija (pH 1-3) otopina je ružičaste boje, dok daljnjim povećanjem pH otopina blijedi. Dolaskom do bazičnog medija pH 11 otopina je blago ljubičasta, kod pH 11 otopina je obojana u sivo, kod pH 13 otopina je obojana u sivo-zelenu boju dok je kod pH 14 otopina poprimila zelenu boju. Razlike u 50 %-tnom i 75 %-tnom etanolu nisu vidljive.

Indikator pripremljen od soka od šumske borovnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 85. a)) te metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 85. b)) pokazuje vrlo slične promjene boje pri različitim pH vrijednostima. Kod kiselog medija pH 1-6 otopina je obojana u ružičasto, dok je u neutralnom mediju otopina obojana u ljubičasto, intenzitet boje raste porastom pH vrijednosti. U bazičnom mediju (pH 12-14) otopina je poprimila maslinasto zelenu boju.

Indikator pripremljenog od soka od šumske brusnice i etanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 86. a)) kao i metanola (50 i 75 %, 1 : 10, Slika 86. b)) ne pokazuje značajne promjene boje u kiselom do neutralnom mediju, dok u vrlo bazičnom mediju (pH 13-14) otopina poprima smeđe-narančastu boju.

Također, indikator od vina od maline i etanola (50 i 75 % etanol, 1 : 10, Slika 87. a)) te metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 87. b)) nije pokazao potencijalnu primjenu kao kiselo-bazni indikator jer ne pokazuje promjene boje otopine niti u jednom od medija.

Indikatori od vina od crvenog ribiza i etanola (50 i 75 % etanol, 1 : 10, Slika 88. a)) te metanola (50 i 75 % metanol, 1 : 10, Slika 88. b)) od svih voćnih preradevina imaju najveći potencijal primjene kao kiselo-bazni indikatori. U jako kiseloj sredini (pH 1-5) otopina je obojana žarko ružičasto, dok je kod neutralnog i blago bazičnog medija (pH 7-9) otopina obojana u blago ljubičasto. Porastom pH raste i intenzitet boje, a u vrlo bazičnoj sredini (pH 12-14) otopina je poprimila zelenu boju.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je upotreba odabranih otapala u pripremi alternativnih kiselobaznih indikatora. Biljni materijal koji se ispitivao bilo je jagodičasto i bobičasto voće u obliku svježeg i suhog voća te voćnih prerađevina. Voćne prerađevine koje su se koristile sadržavale su najveći udio odabranog voća bez umjetnih boja i aroma.

- Indikatori od jagode i šumske jagode u oba otapala ne pokazuju uočljive promjene boje za sve pH vrijednosti, ali postoje vidljive razlike između jako kiselog i jako bazičnog medija što im omogućuje primjenu kao potencijalni kiselobazni indikatori.
- Indikatori od svježe kupine u oba otapala pokazuju širok raspon promjena boja pri različitim pH vrijednostima, dok indikator od suhe kupine u oba otapala nema značajne promjene.
- Suha crna malina u etanolu i metanolu ima odličan potencijal kao alternativno kiselobazni indikator jer pokazuje veliki raspon promjena boja pri različitim pH vrijednostima. U slučaju indikatora od svježe i crvene maline u oba otapala postoji razlika samo između jako kiselog i jako bazičnog medija što mu omogućuje potencijalnu uporabu kao kiselobazni indikator.
- Kod indikatora pripremljenih od svih ispitanih vrsta svježeg dudu (crni, crveni i bijeli) u etanolu i metanolu nije vidljiva primjena boje pri raznim pH vrijednostima, dok indikator pripremljen od suhog crnog dudu i etanola (50 % etanol, 1 : 10) ima veliki potencijal kao alternativno kiselobazni indikator.
- Indikator od svježe brusnice u oba otapala ne pokazuje vidljive promjene boje, dok indikator od suhih brusnica u metanolu i etanolu ima potencijal samo kao indikator za jako kiseli ili jako bazični mediji.
- Slični rezultati dobiveni su u slučaju indikatora od suhe i svježe borovnice te suhog i svježeg crnog ribiza u oba otapala.
- Za razliku od crnog, crveni ribiz u etanolu i metanolu, bez obzira na koncentraciju nema nikakav potencijal kao kiselobazni indikator.
- Istraživanje indikatora od svježeg *Rose* grožđa u oba otapala pokazalo je veliki potencijal primjene kao kiselobaznih indikatora, dok se grožđice u oba otapala nisu vizualno istaknule.

- Indikator pripravljen od ružinog šipka u oba otapala nema potencijal za primjenu kao kiselo-bazni indikator.
- Indikator od suhих goji bobica u oba otapala te od suhих korinskih grožđica u oba otapala nisu se istaknuli kao alternativni kiselo-bazni indikatori.
- Indikatori od suhих tayberry bobica u oba otapala može poslužiti kao indikator isključivo za vrlo bazično područje, dok su suha i svježа aronija u oba otapala te suha drenjina u oba otapala pokazale veliki potencijal primijene kao alternativni kiselo-bazni indikatori.
- Indikatori pripremljeni od džema od divljih brusnica, soka od šumske brusnice i vina od maline nemaju perspektivu u ulozi alternativnih kiselo-baznih indikatora.
- Sok od šumske borovnice i vino od crvenog ribiza u oba otapala pokazuju dobar potencijal kao kiselo-bazni indikatori, dok indikator od soka od borovnice ima potencijal samo u metanolu (75 % metanol, 1 : 10).

Rezultati dobiveni u ovom radu, pokazuju potencijal primjene indikatora pripremljenih od odabranog biljnog materijala i odabranih otapala kao alternativnih kiselo-baznih indikatora. Budući da je biljni materijal za pripremu alternativnih kiselo-baznih indikatora rasprostranjen u gotovo svim predjelima svijeta, ovakvi indikatori imaju i veliku dostupnost. Za razliku od konvencionalnih indikatora, alternativni kiselo-bazni indikatori su jeftiniji te njihova priprema nije komplicirana, a skladištenje nije zahtjevno. Također, od ispitivanih otapala utvrđeno je da su pogodnija otapala etanol i metanol, pri razrjeđenjima 50 % i 75 %. Daljnja ispitivanja alternativnih indikatora koja bi uključivala istraživanje pogodnijih i manje opasnih otapala mogla bi rezultirati pripremom indikatora koji su potpuno sigurni za zdravlje i okoliš i koji su bez ikakvog otpadnog materijala koji bi se trebao skladištiti.

## 7. LITERATURNA VRELA

- [1] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, 7th Edition, Suanders College, Philadelphia, 1995.
- [2] <https://www.thoughtco.com/definition-of-acid-base-indicator-604738> (25. 5. 2022.)
- [3] <https://www.thoughtco.com/home-and-garden-ph-indicators-601971> (25. 5. 2022.)
- [4] [https://www.profil-klett.hr/system/files/repozitorij/pdf/biljke\\_kao\\_kiselo\\_bazni\\_indikatori.pdf](https://www.profil-klett.hr/system/files/repozitorij/pdf/biljke_kao_kiselo_bazni_indikatori.pdf) (25. 5. 2022.)
- [5] <http://www.compoundchem.com/2017/05/18/red-cabbage/> (25. 5. 2022.)
- [6] <https://www.intechopen.com/chapters/53528> (27. 5. 2022.)
- [7] [https://www.researchgate.net/figure/Basic-anthocyanin-structure\\_fig1\\_319107732](https://www.researchgate.net/figure/Basic-anthocyanin-structure_fig1_319107732) (27. 5. 2022.)
- [8] A. Amić, *Priroda*, **9-10** (2017), 28-34.
- [9] <https://www.chemedx.org/article/aqueous-red-cabbage-extracts-more-just-ph-indicator> (4. 6. 2022.)
- [10] <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2016.2524> (29. 5. 2022.)
- [11] <https://www.intechopen.com/chapters/55599> (4. 6. 2022.)
- [12] <https://nutricionizam.com/category/sastojci-hrane/fitotvari/> (21. 6. 2022.)
- [13] E. Boccalon, P. Sassi, L. Pioppi, A. Ricci, M. Marinozzi, G. Gorrasi, M. Nocchetti, *Appl. Clay Sci.* **227** (2022), 106592.
- [14] A. Etxabide, P. A. Kilmartin, J. I. Maté, *Food Control*, **121** (2021), 107645.
- [15] S. Huang, G. Wang, H. Lin, Y. Xiong, X. Liu, H. Li, *Sens. Acutuator*, **3** (2021), 100049.
- [16] S. Li, B. Wu, W. Fu, L. Reddivari, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019), 2588.
- [17] R. C. Strauch, M. F. Mengist, K. Pan, G G. Yousef, M. Iorizzo, A. F. Brown, *Food Chem.* **301** (2019), 125289.
- [18] S. Wang, P. Xia, S. Wang, J. Liang, Y. Sun, P. Yue, *Food Hydrocoll.* **96** (2019), 617-624.
- [19] H. Yong, X. Wang, X. Zhang, Y. Liu, Y. Qin, J. Liu, *Food Hydrocoll.* **94** (2019), 93-104.
- [20] B. Merz, C. Capello, G. C. Leandro, D. E. Moritz, A. R. Monteiro, G. A. Valencia, *Int. J. Biol. Macromol.* **153** (2020), 625-632.
- [21] R. Andretta, C. L. Luchese, I. C. Tessaro, J. C. Spada, *Food Hydrocoll.* **93** (2019), 317-324.

- [22] K. Halasz, L. Csoka, *Food Packag. Shelf Life* **16** (2018), 185-193.
- [23] M. Kurek, I. E. Garofulić, M. T. Bakić, M. Ščetar, V. D. Uzelac, K. Galić, *Food Hydrocoll.* **84** (2018), 238-246.
- [24] C. L. Luchese, V. F. Abdalla, J. C. Spada, I. C. Tessaro, *Food Hydrocoll.* **82** (2018), 209-218.
- [25] C. L. Luchese, N. Sperotto, J. C. Spada, I. C. Tessaro, *Int. J. Biol. Macromol.* **104** (2017), 11-18.
- [26] P. Zeng, X. Chen, Y. R. Qin, Y. H. Zhang, X. P. Wang, J. Y. Wang, Y. S. Zhang, *Food Res. Int.* **126** (2019), 108604.
- [27] B. Szadkowski, J. Rogowski, W. Maniukiewicz, E. Beyou, A. Marzec, *J. Ind. Eng. Chem.* **105** (2022), 446-462.
- [28] <http://phenol-explorer.eu/> (29. 5. 2022.)
- [29] S.Y. Wang, Z. Wei, G.J. Galletta, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002), 6534-6542.
- [30] K. Skupien, J. Oszmianski, *Eur. Food Res. Technol.* **219** (2004), 66-70.
- [31] S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000), 5331-5337.
- [32] P. Mattila, J. Kumpulainen, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002), 3660-3667.
- [33] B. Schuster, K. Herrmann, *Phytochemistry* **24** (1985) 2761-2764.
- [34] M. J. Cho, L.R. Howard, R. L. Prior, J. R. Clark, *J. Sci. Food Agric.* **84** (2004), 1771-1782.
- [35] L. Wada, O. Boxin, *J. Sci. Food Agric.* **50** (2002), 3495-3500.
- [36] K. R. Maatta-Riihinen, A. Kamal-Eldin, A. R. Torronen, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004), 6178-6187.
- [37] W. Mullen, A. J. Stewart, M. E. J. Lean, P. Gardner, G. G. Duthie, A. Crozier, *J. Sci. Food Agric.* **50** (2002), 5197-5201.
- [38] X. Wu, L. Gu, R. L. Prior, S. McKay, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004), 7846-7856.
- [39] K. R. Maatta, A. Kamal-Eldin, A. R. Torronen, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 6736-6744.
- [40] M. Ollanketo, M. L. Riekkola, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **23** (2000), 1339-1351.
- [41] I. C. W. Arts, B. van de Putte, P. C. H. Hollman, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000), 1746-1751.
- [42] S. Ehala, M. Vaher, M. Kaljurand, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005), 6484-6490.
- [43] W. Zheng, S. Y. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 502-509.

- [44] Y. Zuo, C. Wang, J. Zhan, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002), 3789-3794.
- [45] C. Garcia-Viguera, P. Zafrilla, F. A. Tomas-Barberan, *J. Sci. Food Agric.* **73** (1997), 207-213.
- [46] P. Wexler, *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd Edition, Academic Press, 2014.
- [47] <https://thechemco.com/chemical/methanol/> (31. 5. 2022.)
- [48] <https://www.britannica.com/science/methanol> (5. 6. 2022.)
- [49] M. Henriques, A. Silva, J. Rocha, *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* (A. Mendez-Vilas (ur.), Bajadoz: FORMATEX, 2007.
- [50] <https://www.eurokor.hr/109-kemijske-sirovine-i-proizvodi/18305-etanol> (5. 6. 2022.)
- [51] <https://www.solventis.net/products/alcohols/ethanol/> (31. 5. 2022.)
- [52] <https://www.cargill.com/pharmaceutical/pharma-products/pharmaceutical-ethanol> (5. 6. 2022.)
- [53] C. Capello, U. Fischer, K. Hungerböhler, *Green Chem.* **9** (2007), 927-934.
- [54] Z. Gao, *Kem. Ind.* **66** (2017), 655-659.
- [55] <https://www.chemicalsafetyfacts.org/acetone/> (21. 6. 2022.)
- [56] <https://ecolink.com/info/why-is-acetone-a-good-solvent/> (21. 6. 2022.)
- [57] [https://www.researchgate.net/publication/312554206\\_Polyphenols\\_methods\\_of\\_extraction](https://www.researchgate.net/publication/312554206_Polyphenols_methods_of_extraction) (21. 6. 2022.)

## 8. PRILOG

### 8.1. Životopis

<b>Osobni podaci</b>	
Ime i prezime	<b>Mia Samardžija</b>
Datum i mjesto rođenja	18. 7. 1997.
Adresa	Moslavačka 3a, 35 000 Slavonski Brod
e-mail	<a href="mailto:mia.samardzija@gmail.com">mia.samardzija@gmail.com</a>
<b>Obrazovanje</b>	
2020.-2022.	<b>Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer</b>  Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2016.-2020	<b>Preddiplomski sveučilišni studij kemije</b>  Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek  Završni rad: Sinteza metaloorganskih mreža
2012.-2016.	<b>Srednja škola Matije Antuna Reljkovića,</b>  Ul. Ivana Cankara 76, 35000, Slavonski Brod
<b>Radno iskustvo</b>	
2021.-2022.	Quizlet  Expert contributor for chemistry
2016.-2020.	Razni studentski poslovi
<b>Aktivnosti i sudjelovanja</b>	
2022.	2. Međunarodna studentska GREEN konferencija, Osijek
2022.	XIV. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb



2020.	Seminar „Primjena rekombinantne DNA tehnologije u biotehnologiji“, Medicinski fakultet, Osijek
2019.	23. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
<b>Osobne vještine</b>	
Materinski jezik	Hrvatski
Strani jezici	Engleski - aktivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
Vozačka dozvola	B kategorija