

Ispitivanje primjene odabranih agruma kao kiselo-baznog indikatora

Prebeg, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:182:092705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Paula Prebeg

ISPITIVANJE PRIMJENE ODABRANIH AGRUMA
KAO KISELO-BAZNOG INDIKATORA

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2023.

SAŽETAK

U današnjim laboratorijima, upotreba indikatora se bazira više na sintetskim indikatorima, nego na indikatorima dobivenim iz biljnih materijala. Istraživanjem biljnog materijala, povrća i voća, kao eventualnih kiselo-baznih indikatora te prihvaćanjem naučenih činjenica o istima kemija se povezuje sa svakodnevnim životom te se na taj način lakše predočava laicima. Upravo iz tih razloga ovaj rad za cilj ima ispitivanje eventualne primjene biljnog materijala (točnije, citrusa) kao kiselo-baznog indikatora. U ispitivanjima je korištena kora i sok šest vrsti citrusa u kombinaciji s pojedinim otapalima (hladna voda, vrela voda, etanol, aceton, metanol). Ispitivanja su provedena u nekoliko faza, odmah nakon pripreme indikatora (pri sobnoj temperaturi), nakon 24 h stajanja na sobnoj temperaturi, nakon sedam dana stajanja u hladnjaku te nakon 14 dana stajanja u hladnjaku. Dobiveni rezultati potvrđuju potencijal pojedinog citrusnog voća za izradu prirodnih pH indikatora. Najperspektivnijim za izradu prirodnih indikatorima su se pokazali kora limete te kora pomela.

KLJUČNE RIJEČI: citrusi, pH indikator, etanol, voda, aceton, metanol

ABSTRACT

In today's laboratories, the use of indicators is based more on synthetic indicators than on indicators obtained from plant materials. By researching plant material, vegetables and fruits, as potential acid-base indicators, and by accepting the learned facts about them, chemistry is connected to everyday life and, for that reason easier to present to laymen. Precisely for these reasons, this paper aims to examine the possible application of plant material (more precisely, citrus) as an acid-base indicator. The tests used the peel and juice of six types of citrus fruits in combination with solvent (cold water, hot water, ethanol, acetone, or methanol). The tests were carried out in several stages, immediately after the preparation of the indicator (at room temperature), after 24 hours of standing at room temperature, after seven days of standing in the refrigerator and after 14 days of standing in the refrigerator. The obtained results confirm the potential of some of used citrus fruit for the preparation of natural pH indicators. Lime peel and pomelo peel showed the most promising result.

KEY WORDS: citrus fruit, pH indicator, ethanol, water, acetone, methanol

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Kiselo-bazni indikatori.....	2
2.1.1. Sintetski pH indikatori.....	2
2.1.2. pH indikatori priređeni iz biljnog materijala	4
2.1.2.1. Pigmenti u biljkama.....	6
2.2. Citrusi.....	7
2.2.1. Limun, <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	7
2.2.2. Naranča, <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	9
2.2.3. Pomelo, <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merrill	11
2.2.4. Crveni grejp, <i>Citrus × paradisi</i> Macfad.	13
2.2.5. Limeta, <i>Citrus × aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	14
2.2.6. Mandarina, <i>Citrus reticulata</i> Blanco	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Ispitivani biljni materijali.....	18
3.2. Kemikalije i pribor	18
3.3. Priprema otopina, uzoraka biljnog materijala i plan rada	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1. Limun, <i>Citrus limon</i> (L.) Burm f.....	20
4.2. Naranča, <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	22
4.3. Pomelo, <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merrill.....	25
4.4. Grejp, <i>Citrus × paradisi</i> Macfad.	28
4.5. Limeta, <i>Citrus × aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	30
4.6. Mandarina, <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	33
4.7. Rezultati nakon 7 dana	35
4.8. Rezultati nakon 14 dana	37
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURNA VRELA	41

1. UVOD

Osim uporabe kiselo-baznih indikatora u laboratorijima, indikatori se također koriste u edukacijske svrhe u školama. S obzirom da su sintetizirani indikatori relativno dostupni, prirodni indikatori, odnosno indikatori pripremljeni od biljnih materijala, nisu toliko u uporabi. Međutim, često iz ekonomskih razloga sintetski indikatori nisu dostupni za edukacijske svrhe, čime prirodni indikatori postaju zanimljiva zamjena. Upravo iz tih razloga rad je baziran na ispitivanju indikatora pripremljenih od pristupačnog voća. Na taj način kemija se približava svakodnevici te se pojednostavljuje učenje takvog gradiva.

Cilj rada bio je ispitati mogu li se citrusi, kora i sok, koristiti kao kiselo-bazni indikator, te imaju li odabir otapala i vrijeme utjecaj na to. Pri tome naglasak je bio na ekonomičnosti, na jednostavnosti pripreme i na ekološkoj održivosti. Plan je bio pripremiti indikatore koji se lako mogu pripremiti u školi, sa što manjim troškovima, koje je jednostavno skladištiti i koji povezuju gradivo kemije sa svakodnevnim životom.

Na početku ovoga rada istaknuti su razni kiselo-bazni indikatori, kako sintetski tako i prirodni indikatori. Sažeto su prikazane karakteristike nekih od indikatora, struktura, upotreba kao i promjene boje. Od indikatora koji se najviše koriste spomenuti su bromtimol plavo, timolftalein, fenol crveno i metiloranž. Također, spomenuta su svojstva i nekih od alternativnih prirodnih indikatora kao što su kurkuma, cikla, šipak i jagoda.

U nastavku se nalazi sažeti pregled informacija o citrusnom voću korištenom u radu. Nakon toga, dan je prikaz korištenih metoda te plan i postupak rada. Ispitivanja su provedena sa šest citrusnih plodova u kombinaciji s četiri otapala. Dobiveni rezultati su prikazani slikama i analizirani. Rezultati ispitivanja pokazali su kako neki od ovako pripremljenih indikatora mogu poslužiti kao kiselo-bazni indikator. Svi ispitani citrusi pokazuju približno slične rezultate no limeta se ipak pokazala kao najbolji kiselo-bazni indikator, a kao otapalo najjasnije rezultate je dao metanol.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kiselo-bazni indikatori

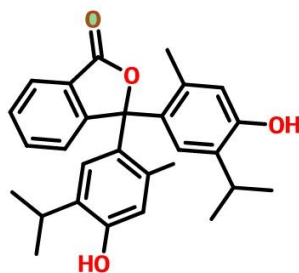
Kiselo-bazni ili pH indikatori se koriste u kemiji za određivanje kiselosti ili bazičnosti otopine, odnosno pH vrijednosti. Rade na način da mijenjaju boju ovisno o pH vrijednosti otopine [1]. Naime, pH indikator je tvar koja može donirati ili prihvatiti proton, čime se promijeni struktura indikatora a time i boja tvari. Na primjer, indikator koji je slaba kiselina disocira i nastaje konjugirana baza kiseline. Budući da slaba kiselina i konjugirana baza imaju različite boje, promjena boje upućuje na pH medija [2].

Vrlo je jednostavno odabrati odgovarajući pH indikator za vodene otopine, odabire se onaj indikator koji ima najintenzivniju promjenu boje. Upotreba indikatora u mnogim organskim otapalima teža je nego u otopinama koje sadrže vodu, budući da u organskim otapalima promjena boje ne nastupi uvijek brzo niti je jasno izražena. Daljnji razvoj kemije stoga ima za cilj olakšati predviđanje ponašanja indikatora u takvom okruženju (npr. organskom otapalu) [2].

2.1.1. Sintetski pH indikatori

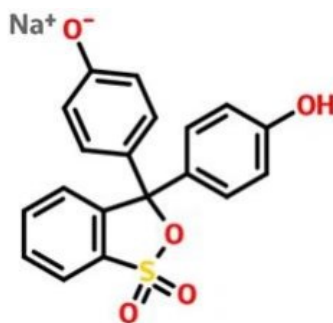
Većina kemijskih indikatora koji se trenutno koriste za određivanje pH mogu se nazvati sintetičkim (klasičnim) indikatorima. Radi se o kemijskim spojevima koji se pripremaju u laboratoriju, a neki su i mješavina spojeva (na primjer, univerzalni pH indikator) [3]. Neki od često korištenih indikatora dani su u nastavku teksta.

Timolftalein je ftaleinska boja (Slika 1.) koja mijenjanja boju od bezbojne do indigo plave. Ovaj indikator je bezbojan pri $\text{pH} < 9,3$, dok između $\text{pH} 9,3$ i $10,5$ pokazuj indigo plavu boju [4].



Slika 1. Struktura timolftaleina [5].

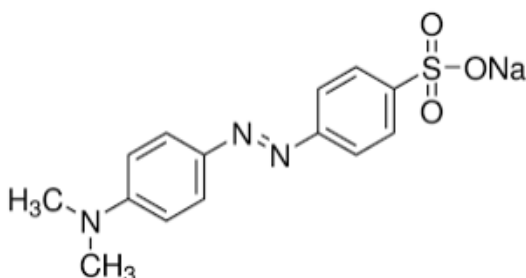
Fenol crveno, poznato i kao fenolsulfonftalein, indikator je koji ima vidljivu promjenu boje iz žute u crvenu u pH rasponu od 6,2 do 8,2. Iznad pH 8,2 boja se mijenja u ljubičasto--crvenu. Pri niskom pH, fenol crveno je bezbojno i slično *zwitterionu*. To jest, ima jednu negativnu sulfatnu skupinu i jednu pozitivnu ketonsku skupinu. Kako se pH povećava, ketonska skupina gubi proton, zbog čega otopina izgleda žuto. Povećanje pH iznad 8,2 uzrokuje gubitak vodika iz hidroksilne skupine, što rezultira crvenom bojom. (Slika 2) [6].



Slika 2. Struktura fenol crvenog [7].

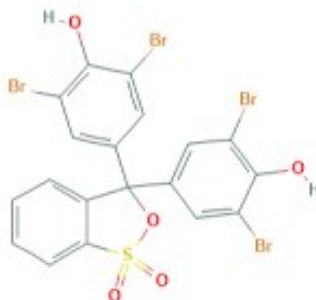
Metiloranž je azo boja (Slika 3.) koja mijenja boju iz žute u crvenu ovisno o pH okoline. Često se koristi u kiselo-baznim titracijama. U vrlo kiselim uvjetima gdje je $\text{pH} < 3,1$, indikator daje crvenu boju. S druge strane, kada je $\text{pH} > 4,4$, boja postaje narančasta, dok u bazičnoj sredini postaje žuta [8].

Iako se metiloranž rijetko koristi u industriji bojanja tekstila, često se koristi u druge svrhe, kao što je tinta za pisane. Što je još važnije, studije su pokazale da ovaj spoj sadrži tvari koje mogu uzrokovati trajne ili privremene promjene u strukturi ljudske DNA i dovesti do karcinogenosti [8].



Slika 3. Struktura metiloranža [9].

Bromotimol plavo u svojoj strukturi ima tri benzenska prstena. Za jedan od prstena vezan je sumpor, dva atoma kisika vezana su za sumpor dvostrukim vezama dok je treći atom kisika vezan za sumpor jednostrukom vezom. Dva atoma broma vezani su za drugi i treći benzenski prsten koji na sebe imaju vezane hidroksilne skupine (Slika 4.) [10].



Slika 4. Struktura indikatora bromtimol plavo [11].

Bromtimol plavo je žut u kiselim uvjetima, postaje plav u bazičnim uvjetima te zelen u neutralnim uvjetima. Osim kao indikator, bromtimol plavo se također koristi u industriji pigmenata i boja [12].

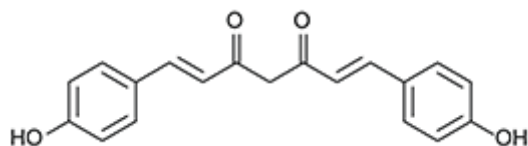
Iako imaju široku upotrebu, sintetski indikatori imaju i nekoliko nedostataka. Mnogi su skupi, što otežava njihovu upotrebu u školi, a neki su štetni za okoliš. Osim toga, neki indikatori mogu naštetiti korisnicima izazivajući tegobe poput proljeva, hipoglikemije, plućnog edema i pankreatitisa, uzrokujući bolove u trbuhu, osipe i druge zdravstvene probleme. Iz tih razloga, alternativni (prirodni) pH indikatori pripremljeni iz različitih dijelova biljaka, uključujući cvijeće, plodove i lišće, predstavlja ekonomičniju i ekološku prihvatljiviju varijantu indikatora [3].

2.1.2. pH indikatori priređeni iz biljnog materijala

pH indikatori dobiveni iz prirodnih izvora jeftiniji su i lakše dostupni od sintetskih. Aktivni sastojci prirodnih indikatora su pigmenti koji mijenjaju boju ovisno o pH okoline. Biljne materijale koji mogu poslužiti kao indikatori, u dosta slučajeva, možemo pronaći u svome okruženju, vrtu te dvorištu. Neke od takvih biljaka su: kurkumua (*Curcuma longa* L.), cikla (*Beta vulgaris* L.) i šipak (*Rosa canina* L.) [13].

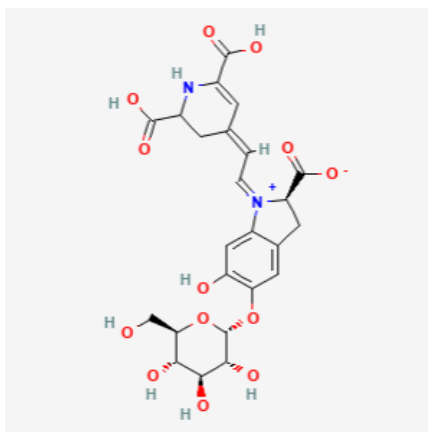
Kurkuma (*Curcuma longa* L.) odličan je izbor za zamjenu sintetičkih indikatora. Aktivni sastojak kurkume je kurkumin (Slika 5), žuti pigment koji izgleda žuto u kiseloj sredini. U

bazičnim uvjetima boja otopine se mijenja u crvenu [14].



Slika 5. Struktura kurkumina [15].

Cikla (*Beta vulgaris* L.) sadrži pigment betalain. Betalain je heterociklički spoj (Slika 6.) i u vodi topljivi dušični pigment koji daje boju od crvene do ljubičaste ovisno o tome je li otopina kisela ili bazična [16].



Slika 6. Struktura betalaina [17].

Šipak (Slika 7.) je plod divlje ruže (*Rosa canina* L.) bogat vitaminima. Koristi se kao čaj, ali su poznati i pripravci poput vina i pekmeza [18].



Slika 7. Plod svježeg šipka [18].

Svježi plod šipka daje narančastu boju u cijelom pH rasponu, a njegova intenzivna promjena boje vidljiva je samo u jako bazičnim sredinama. Međutim, čaj od šipka daje crveno obojenje u izrazito kiselim uvjetima, pri niskim pH vrijednostima, a zatim se postupno gubi boja do pH = 11. Nakon pH = 11 otopina postaje siva, pri pH = 13 zelena, a pri pH = 14 žuta [19].

2.1.2.1. Pigmenti u biljkama

Tvari koje daju boju biljkama i životinjama nazivaju se pigmenti. Razlikujemo četiri glavne skupine pigmenata u biljaka: klorofili, karotenoidi, flavonoidi i betalaini. Pigmenti podliježu specifičnim promjenama povezanim s fiziološkim procesom sazrijevanja biljke (npr., vezano za zrenje ploda). Najčešći obrasci promjena koje nastaju tijekom zrenja ploda su pad koncentracije klorofila i povećanje koncentracije drugih pigmenata, kao što su karotenoidi, flavonoidi i betalaini [21-23].

Klorofil je poseban pigment koji sudjeluje u procesu fotosinteze. Javlja se u dva različita oblika (klorofil *a* i *b*), ima kemijsku formulu tetrapirola i glavni je pigment u svim zelenim biljkama. Karotenoidi su pigmenti odgovorni za žutu, narančastu i crvenu boju. Poznato je više od 700 vrsta ovih pigmenata, a ljudsko tijelo može apsorbirati i razgraditi preko 50 [23]. Od velike su važnosti za zdravlje budući da su neki od njih antioksidansi, prekursori vitamina A, smanjuju učestalost kardiovaskularnih problema, raka te drugih kroničnih i degenerativnih bolesti [24]. Reprezentativni karotenoid je β -karoten, koji se uz klorofil uglavnom nalazi u zelenim biljkama. Likopen je karotenoid koji rajčicama daje crvenu boju. Trebamo napomenuti crveni fikoksantin i fukoksantin, karotenoide koji se nalaze u crvenim i smeđim algama [23].

Antocijani mnogim cvjetovima, povrću i voću daju crvenu, ružičastu i plavu boju. Dubina i intenzitet boje ovisi o broju metoksi i hidroksilnih skupina. Obično se nalaze u kožici voća, ali i u mesu (pulpi) nekih plodova poput jagoda, trešanja i višanja [23]. Unutar roda *Citrus*, antocijanini se nalaze uglavnom u mesu, a ponekad i u kori sorti naranče (*Citrus sinensis* L. Osbeck) koje se nazivaju krvave ili pigmentirane ili crvene naranče. Štoviše, antocijanini su čak izraženi u mladim izdancima i cvjetnom tkivu limuna (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), citriona (*Citrus medica* L.) i drugih vrsta citrusa [25].

2.2. Citrusi

Citrusi, rod obitelji Rutaceae ili rutvice, su među najvažnijim voćkama u svijetu zbog velikog prehrambenog, ljekovitog i kozmetičkog značaja. Uzgajaju se u tropskim i suptropskim regijama diljem svijeta, s proizvodnjom od oko 102 milijuna tona godišnje. Citrusi su cijenjeni zbog svoje lijepe boje, ugodnog okusa i mirisa. S povećanom proizvodnjom, napretkom u skladištenju i tehnologiji te dostupnošću tijekom cijele godine, citrusi su postali važan dio prehrambene industrije [26].

Citrusi su bogati vitaminima A, C i E, mineralima, flavonoidima, kumarinima, limonoidima, karotenoidima, pektinom i dr. Ove fitokemikalije imaju različite zdravstvene prednosti, primjerice imaju antioksidacijsko, protuupalno, antikancerogeno i antimikrobno djelovanje [26]. Citrusi korišteni u ovom radu su limun (*Citrus limon* (L.) Burm f.), naranča (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill), crveni grejp (*Citrus × paradisi* Macfad), limeta (*Citrus × aurantifolia* (Christm.) Swingle), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco).

2.2.1. Limun, *Citrus limon* (L.) Burm. f.

Najvažniji predstavnik citrusa je limun, *Citrus limon* (L.) Burm. F. (Slika 8.), a klasifikacija limuna prikazana je u Tablici 1. [28].

Tablica 1. Sistematska klasifikacija limuna, *C. limon* (L.) Burm. f. [28].

CARSTVO:	Plantae
KOLJENO:	Magnoliophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	Citrus
VRSTA:	<i>Citrus limon</i>

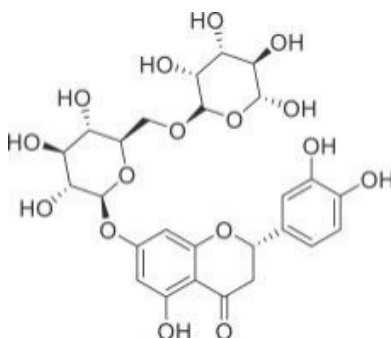
Plod limuna je dugačak, ovalni, šiljasti i zelen, a dozrijevanjem požuti. Ispod kore limuna nalazi se tanak, voskom obložen egzokarp (sloj između vanjske kore limuna i bijelog dijela

kore), koji je vanjski dio mezokarpa (bijeli dio kore limuna). Sadrži uljne vezikule i karotenoidne pigmente koji kori daju prepoznatljivu žutu boju. Unutarnji dio mezokarpa, poznat i kao albedo, sastoji se od spužvastog bijelog parenhima. Endokarp (pulpa) je segmentiran pomoću bijelog tkiva mezokarpa [27].



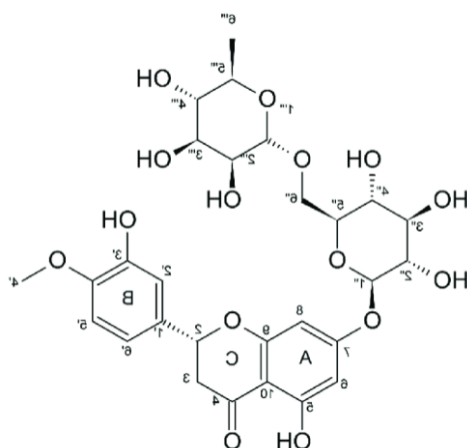
Slika 8. Plod limuna [28].

Najvažnija skupina bioaktivnih spojeva u plodu i soku limuna su flavonoidi kao što su: flavononi (eriodiktiol, hesperidin, hesperetin, naringin), flavoni (apigenin, diosmin), flavonoli (kvercetin) i njihovi derivati. U kori limuna, mogu se naći i drugi flavonoidi: flavonoli – limocitrin i spinacetin, te flavoni – orientin i viteksin. Neki flavonoidi, poput neohesperidina, naringina i hesperidina, karakteristični su za plod limuna. U usporedbi s drugim vrstama citrusa, limun ima najveći sadržaj eriocitrina (Slika 9.) [27].



Slika 9. Struktura eriocitrina [29].

Jedan od spomenutih flavonoida je hesperidin (Slika 10.). On je topljiv je u vodi tek pri visokom pH ili u prisustvu dimetil sulfoksida i piridina, dajući žute i bistre otopine. Djelomično je topljiv u metanolu i ledenoj octenoj kiselini, a gotovo netopljiv u acetonu, kloroformu i benzenu [31].



Slika 10. Struktura hesperidina [31].

Upravo flavonoidi su pigmenti koji igraju ključnu ulogu u mijenjanju boje s promjenom pH. Ova promjena boje temelji se na promjenama u konjugiranim dvostrukim vezama u molekulama flavonoida, koje reagiraju s ionima vodika (H^+) ili hidroksidnim ionima (OH^-) prisutnim u otopini. Ovisno o tome koje atome flavonoidi privuku ili predaju, mijenja se valna duljina svjetla koja se apsorbira i reflektira, što rezultira promjenom boje [31].

2.2.2. Naranča, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Naranča, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, (Tablica 2.) je najrasprostranjenija vrsta citrusa koja se uzgaja diljem svijeta. Porijeklom je iz Azije, ali je uobičajena u pacifičkim i tropskim regijama svijeta. Plodovi (Slika 11.) su žute ili narančaste boje [32].



Slika 11. Stablo i plod naranče [34].

Plod se sastoji od dva različita dijela: perikarpa ili kore, i endokarpa ili pulpe. Kora ima

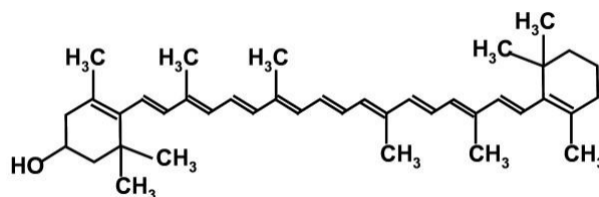
epidermu koja se sastoji od sloja epidermalnih stanica i mnogo malih žlijezda koje sadrže aromatična ulja koja joj daju jedinstven miris. Sastoji se od egzokarapa koji se sastoji od stanica parenhima i kutikule. Albedo ili mezokarp nalazi se ispod žute kore i sastoji se od cjevastih stanica. Plod obično ima slatku pulpu i može sadržavati sjemenke, a okus varira od kiselog do slatkog. Naranča sadrži biljni pigment β -kriptoksantin (Slika 12.) koji joj daje jedinstvenu narančastu boju [32].

Tablica 2. Sistematska klasifikacija naranče, *C. sinensis* (L.) Osbeck [33].

CARSTVO:	Plantae
KOLJENO:	Magnoliophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	Citrus
VRSTA:	<i>Citrus sinensis</i>

Narančasta kora ploda rezultat je β -kriptoksantina i β -citaurina (karotenoidi). Pigmenti koji doprinose stvaranju β -citaurina su β -kriptoksantin i zeaksantin. Biosinteza karotenoida pridonosi promjeni boje naranče od zelene do narančaste, povećava se količina β -kriptoksantina i zeaksantina dok se smanjuje sadržaj klorofila i β -karotena. Sok naranče sadrži nekoliko karotenoida koji mu daju boju, ali najvažniji je β -kriptoksantin [35].

β -kriptoksantin je oksigenirani karotenoid koji je u voću i povrću često prisutan u slobodnom i esterificiranom obliku. Raspodjela slobodnog β -kriptoksantina i estera β -kriptoksantina ovisi o vrstama biljaka i okolišnim uvjetima, kao što su sezona, tehnike prerade i temperature skladištenja [36]. Ovi pigmenti, kao i drugi karotenoidi, sadrže konjugirane dvostruke veze koje reagiraju s ionima vodika ili hidroksidnim ionima prisutnim u otopini. Reakcija s tim ionima mijenja apsorpcijske karakteristike pigmenta, što rezultira promjenom boje. U kiselom dijelu spektra boja je žuta, u neutralnom narančasta, dok je u izrazito bazičnom dijelu spektra crvena [31].



Slika 12. Struktura β -kriptoksantina [37].

2.2.3. Pomelo, *Citrus maxima* (Burm.) Merrill

Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill) ima najveći plod među citrusima (Tablica 3.). Iako se često koristi u različitim procesima za stvaranje drugih agruma križanjem, ističe se svojom „originalnošću“ jer sam nije rezultat križanja. Poznat i kao tajlandski ili kineski pomelo, simbolizira sreću i prosperitet u kineskoj kulturi [38].

Tablica 3. Sistematska klasifikacija pomela, *C. maxima* (Burm.) Merrill [38].

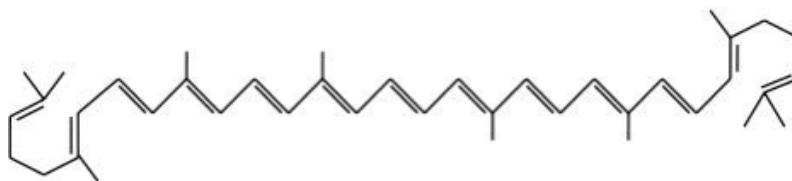
CARSTVO:	Plantae
KOLJENO:	Tracheophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	Citrus
VRSTA:	<i>Citrus maxima</i>

Plod pomela (Slika 13.) značajno se razlikuje od ostalih citrusa. To je najveći agrum, s promjerom 15-25 centimetara. Prosječna težina ploda iznosi 1-2 kilograma, no neki primjerci mogu doseći i 5 kilograma. Također, kora ploda je znatno deblja, dok sama pulpa nije kisela već slatka. Oblik ploda varira od ovalnog do kruškastog, a boja kore se kreće od zelene do limun-žute. Pulpa može biti bijela, roza ili crvena [38].



Slika 13. Plod pomela, *C. maxima* (Burm.) Merrill [38].

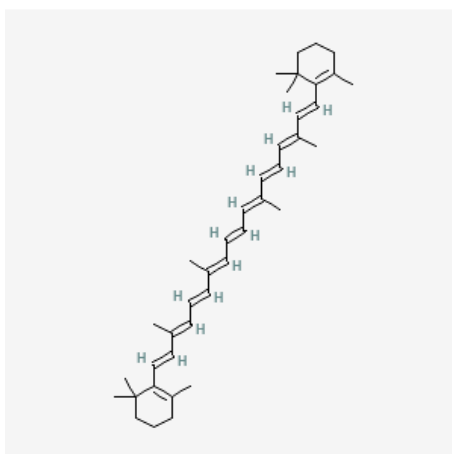
Karotenoidi, posebno likopen, izvor su ružičaste do crvenkaste boje pulpe pomela. Likopen je lipofilni crveno obojeni karotenoid, sastavljen od osam izoprenskih jedinica (oktaprena) povezanih pravilnim vezama od glave do repa, osim u sredini molekule gdje je vezanje rep uz rep, što dovodi do simetrične strukture (Slika 14.). Likopen je prototip drugih karotenoida koji se mogu formirati ciklizacijom, oksidacijom ili redukcijom. Prisutnost sustava od 11 konjugiranih dvostrukih veza daje likopenu sposobnost apsorpcije svjetlost u UV-VIS području [39].



Slika 14. Struktura likopena [39].

Zrela kora pomela bogata je karotenoidima. Karotenoidi koji se nalaze u agrumima ne samo da doprinose boji voća, već imaju i biološke učinke, uključujući antioksidacijski i antikancerogeni. Otkriveno je 11 karotenoida u kori pomela, uključujući fitoen, fitofluen, *zeta*-karoten, likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, β -kriptoksantin, zeaksantin, 9-*cis*-violaksantin i luteoksantin, od kojih je najznačajniji i najzastupljeniji β -karoten [40].

β -karoten, $C_{40}H_{56}$, poznat kao provitamin A, sastoji se od izoprenskih jedinica i dvije retinilne skupine (Slika 15.). Prisutnost dugih lanaca konjugiranih dvostrukih veza daje mu specifične boje. To je antioksidans koji se može pronaći i u žutom, narančastom i zelenom lisatom povrću i voću. U kiselom okruženju je žućkaste do blago narančaste boje (neutralni medij), a u izrazito bazičnom mediju dolazi do vidljive tamno narančaste, odnosno crvene boje [41].



Slika 15. Struktura β -karotena [41].

2.2.4. Crveni grejp, *Citrus × paradisi* Macfad.

Crveni grejp (*Citrus × paradisi* Macfad.) vrsta je voćke iz roda agruma (*Citrus*), potporodice Aurantioideae, porodice rutvica (*Rutaceae*) (Tablica 4.) [42].

Tablica 4. Sistematska klasifikacija grejpa, *C. × paradisi* Macfad [42].

CARSTVO:	Plantae
DIVIZIJA:	Magnoliophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	<i>Citrus</i>
VRSTA:	<i>Citrus paradisi</i>

Plod grejpa (Slika 11.) je velik, okruglast ili kruškolik, tanke blijedožute kore, a meso je mekano, s mnogo mirisnog soka, ugodna gorko-kiselo-slatkastog okusa. Plod obično sadržava malo poliembrionalnih sjemenki [42].

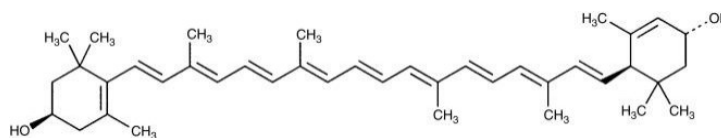
Podrijetlo grejpa nije dovoljno istraženo, a pretpostavlja se da potječe s otoka Barbadosa. Danas se najviše proširio na srednjoamerički arhipelag, a rasprostranjen je i na Floridi, uz pomelo. U RH grejp se ranije nije uzgajao, ali kako se na tržištu počeo pojavljivati u sve većim količinama, tako su se potrošači sve više navikavali na to voće, posebno na njegov

sok [42].



Slika 16. Plod grejpa [42].

Crveni grejp može sadržavati velike količine linearnih karotena, uglavnom fitoena, fitofluena i crvenog likopena u kori i pulpi. Nadalje, razine karotenoida slične su u kori i pulpi crvenog grejpa, suprotno ostalim agrumima koji pokazuju mnogo veći sadržaj karotenoida u kori nego u pulpi. Kora nezrelog agruma sadrži uglavnom lutein i manje udjele drugih karotenoida (zeaksantin, β - i α -karoten). Na početku zrenja ploda, sadržaj luteina opada i gotovo nestaje paralelno s izraženim povećanjem obojenih karotenoida, uglavnom β,β -ksantofila [43]. Glavna razlika između ksantofila (Slika 17.) i karotena je u tome što ksantofili sadrže atome kisika u obliku hidroksilne skupine ili epoksida, dok su karoteni po sastavu molekule samo ugljikovodici bez kisika [44].



Slika 17. Struktura ksantofila [44].

2.2.5. Limeta, *Citrus × aurantifolia* (Christm.) Swingle

Citrus × aurantifolia (Christm.) Swingle je biljka koja se uzgaja u mnogim zemljama širom svijeta i raste u vrućim subtropskim ili tropskim područjima poput južne Floride, Indije, Meksika, Egipta i zapadne Indije. Ova biljka pripada porodici Rutacea (Tablica 5.) [45].

Tablica 5. Sistematska klasifikacija limete, *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle [45].

CARSTVO:	Plantae
KOLJENO:	Magnoliophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	Citrus
VRSTA:	<i>Citrus × aurantifolia</i>

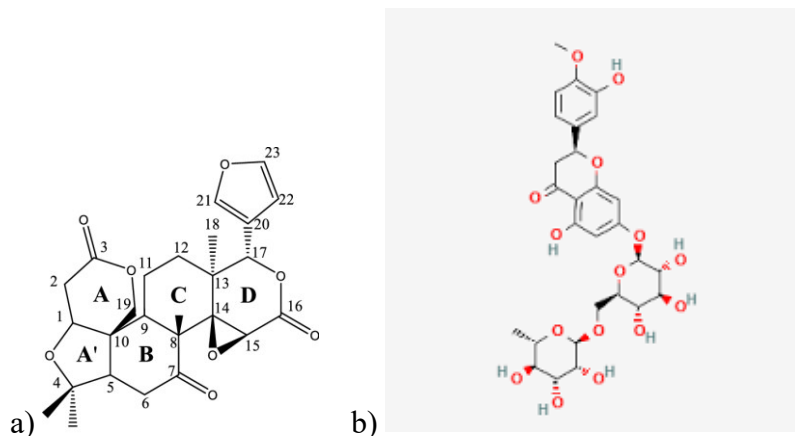
Plodovi limete su kuglastog do ovalnog oblika i promjera oko 3-6 cm, ponekad s papilom na vrhu. Plodovi su žuti kad su zreli, ali se obično beru zeleni. Kora voća je vrlo tanka s gusto žljezdastim segmentima i pulpnim vezikulama žuto-zelene boje. Voćni sok je kiseo i mirisan, kiseliji od limunovog s intenzivnijim aromatičnim mirisom. Limeta sadrži biljne pigmente koji joj daju prepoznatljivu zelenu boju. Ti pigmenti su skupina klorofila, točnije klorofil *b*. U mesu i kori limete također još možemo pronaći karotenoide te flavonoide, kao što ih nalazimo u ostalim plodovima citrusa [45].



Slika 18. List i plod limete [46].

Kora limete je bogat izvor flavonoida (npr. hesperidin) i limonoida (npr. limonin) koji joj daju prepoznatljivu zelenu boju. Kao što je prethodno napisano, flavonoidu djeluju kao pH indikatori s obzirom da otpuštanje vodikov iona ili prihvaćanje hidroksidnog iona dovodi do promjene boje u izrazito bazničnom dijelu pH skale (pH = 13 i pH = 14) [47]. Limonin (Slika 19.) je prirodni tetraciklički triterpenoidni spoj iz skupine limonoida. To je sekundarni metabolit prisutan u limeti. Hesperidin (Slika 20.) je flavanon glikozid koji se nalazi u svim vrstama agruma i posjeduje širok raspon farmakoloških svojstava. Limonin i hesperidin iz

kore ne prelaze u pulpu limete stoga pulpa nema gorak okus, ali se u pulpi ipak mogu naći u mnogo manjim količinama [47].



Slika 19. Struktura a) limonina [48] i b) hesperidina [49].

2.2.6. Mandarina, *Citrus reticulata* Blanco

Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) je zimzeleno drvo koje pripada porodici rutvica, Rutaceae (Tablica 6.). Plod (Slika 21.) je okrugao, lagano spljošten, mesnat i sočan, s tankom narančastom korom. Ova biljka privlači pčele kao medonosna biljka, a prinos meda može doseći 15-20 kg po košnici [50].

Tablica 6. Sistematska klasifikacija mandarine, *C reticulata* Blanco [50].

CARSTVO:	Plantae
KOLJENO:	Magnoliophyta
RAZRED:	Magnoliopsida
RED:	Sapindales
PORODICA:	Rutaceae
ROD:	Citrus
VRSTA:	<i>Citrus reticulata</i>

Mandarina potječe iz istočne Azije, posebno iz Kine i južnog Vijetnama, a u Europu je donesena tijekom 19. stoljeća. Uglavnom se uzgaja u područjima oko Mediterana.

Mandarina sadrži karotenoide koji daju specifičnu boju kori i mesu, a uz karotenoide u mandarinu pronalazimo još i flavonoide i klorofile [50].

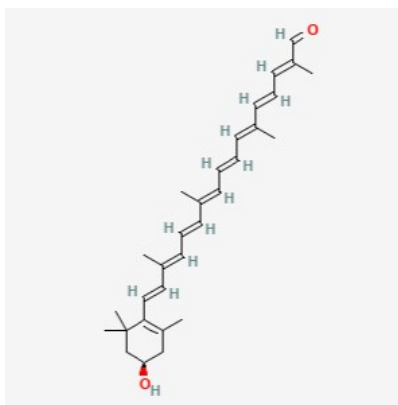


Slika 21. Plod mandarine [50].

Flavedo nezrelog agruma ima sastav koji nalikuje zelenom vegetativnom tkivu i akumulira uglavnom lutein i manje količine drugih karotenoida (zeaksantin, neoksantin, β - i α -karoten). Tijekom sazrijevanja, lutein se smanjuje ili gotovo nestaje usporedno s izraženim povećanjem obojenih karotenoida, uglavnom β,β -ksantofila (izomeri violksantina i β -kriptoksantina), koji su dominantni spojevi pronađeni u narančasto obojenom zrelom citrusnom voću [51].

Zanimljivo je da se u kori mandarina tijekom sazrijevanja akumuliraju C_{30} apokarotenoidi specifične za citruse, uglavnom β -citraurin, dobiven enzimskim cijepanjem zeaksantina i β -kriptoksantina, a njihov je sadržaj u visokoj korelaciji s narančasto-crvenkastom pigmentacijom kore [51].

U pulpi mandarine najvažniji pigment je β -karoten te flavonoidi poput hesperidina koji soku daju prepoznatljivu narančastu boju. Uz njih još nalazimo i vitamine A i C, koji imaju vrlo važan farmakološki učinak [51].



Slika 22. Struktura β -citraurina [52].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitivani biljni materijali

Citrusno voće korišteno u ovom radu su limun (*Citrus limon* (L.) Burm f.), naranča (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill), crveni grejp (*Citrus × paradisi* Macfad), limeta (*Citrus × aurantifolia* (Christm.) Swingle), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco). Pri ispitivanju je korišten sok i kora. Sok je bio svježi i neprerađen, a kora je ekstrahirana odabranim otapalima. Ispitivanja su provedena nakon 24 sata stajanja, nakon tjedan dana stajanja kore u otapalima te nakon 14 dana stajanje kore u otapalima u hladnjaku.

3.2. Kemikalije i pribor

Kemikalije koje su korištene u izvođenju eksperimentalnog dijela ovog istraživanja su analitičke čistoće, voda koja je korištena je deionizirana i demineralizirana. Kemikalije uključuju: etanol, C_2H_5OH ($M = 46.07$ g/mol, Kemika), metanol, CH_3OH ($M = 32.04$ g/mol, Kemika), aceton, C_3H_6O ($M = 58.08$ g/mol, Kemika), natrijev hidroksid, $NaOH$ ($M = 39.99$ g/mol, Kemika) i klorovodičnu kiselinu, HCl ($M = 36.36$ g/mol, Kemika).

Od kemijskog pribora korišteni su: nož, škare, kapalice, jažice, keramički tarionik s tučkom, epruvete, parafilm, pinceta, stakleni štapić. Uređaju koji su korišteni u radu su analitička vaga, uređaj za ultračistu vodu (TKA, WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME), vortex miješalica i pH metar (METTLER TOLEDO, SevenEasy).

3.3. Priprema otopina, uzoraka biljnog materijala i plan rada

Otopine su pripravljene prema prethodno opisanom postupku [9]. Sok voća je svježe iscijeđen te se koristio u daljnjim ispitivanjima. Kora voća je oprana, usitnjena je nožem ili škarama na komadiće. 0,5 g kore voća je stavljeno u epruvetu te je dodan 1 mL otapala.

Sok voća je odmah ispitan po pripremi, dok su otopine ostavljene da odstoje 24 sata i onda ispitane. Nakon ispitivanja otopina, dodano je otapala do 5 mL te biljnog materijala do 2,5 g i ostavljeno još 7 dana da odstoje. Nakon tjedan dana otopine su ispitane kako bi se odredila njihova svojstva kao mogućih kiselo-baznih indikatora. Isto je ponovljeno nakon 14 dana. Plan rada nakon je prikazan u Tablici 7.

Tablica 7. Plan rada

	vrela voda			hladna voda			aceton			etanol			metanol		
Limun	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d
Naranča	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d
Pomelo	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d
Grejp	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d
Limeta	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d
Mandarina	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14	24	7	14
	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d	h	d	d

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Limun, *Citrus limon* (L) Burm f.

Rezultati ispitivanja limuna, točnije limunovog soka i kore u odabranim otapalima (nakon 24 sata), kao mogućeg pH indikatora su prikazani na Slikama 23.-28.



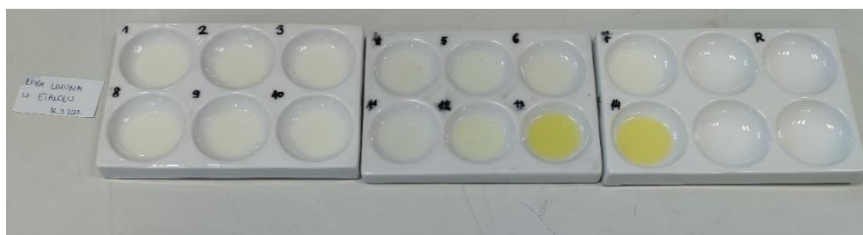
Slika 23. Sok limuna kao indikator.

Prema dobivenim rezultatima, sok limuna nije pokazao indikatorska svojstva. Pri vrlo niskim pH vrijednostima, kao i pri vrlo visokom, sok limuna ne pokazuje nikakvu promjenu boje u odnosu na boju indikatora (Slika 23.) što nas dovodi do zaključka kako limunov sok nije alternativa u zamjeni sintetskih kiselo-baznih indikatora.



Slika 24. Indikator pripremljen od kore limuna i acetona.

Prema rezultatima, indikator pripremljen od kore limuna i acetona u kiselom i blago bazičnom mediju, pri rasponu pH = 1-11, pokazuje istu boju (Slika 24.). Pri pH = 12, otopina poprima blago (slabo primjetnu) žućkastu boju, pri pH = 13 jasno žutu boju, a pri pH = 14 intenzivno žuto-narančastu boju.



Slika 25. Indikator pripremljen od kore limuna i etanola.

Nadalje, indikatorska otopina pripremljena od kore limuna i etanola pri $\text{pH} = 1-11$ daje istu boju (Slika 25.). Pri $\text{pH} = 12$, otopina poprima blago žućkastu boju (jedva primjetnu), pri $\text{pH} = 13$ daje žutu boju, dok pri $\text{pH} = 14$ poprima intenzivnu žuto-narančastu boju.



Slika 26. Indikator pripremljen od kore limuna i hladne vode.

Indikatorska otopina pripremljena od kore limuna i hladne vode daje rezultate slične prethodnim otapalima. Tek pri $\text{pH} = 12$ dolazi do lagane promjene boje te otopina postaje blijedo žućkasta, a pri $\text{pH} = 13$ vidljiva je jasna promjena boje u žutu. Pri $\text{pH} = 14$ vidi se izrazito žuto-narančasto obojenje.



Slika 27. Indikator pripremljen od kore limuna i metanola.

U slučaju metanola, indikatorska otopina kore limuna daje iste rezultate kao i u otapalima

prije. Pri pH = 1-11, nema vidljive promjene boje nego je u cijelom rasponu ista (Slika 27). U bazičnom mediji pri pH = 13 dolazi do vidljive promjene boje u žutu, dok u vrlo bazičnom mediju, pH = 14, otopina je jarke žuto-narančaste boje.



Slika 28. Indikator pripremljen od kore limuna vrele vode.

Indikatorska otopina kore limuna i vrele vode u rasponu pH = 1-12 ne daje rezultate (ista boja u cijelom rasponu, Slika 28.). Pri pH = 13 otopina je jasne žute boje. Pri pH = 14 indikatorska otopina poprima izrazitu žuto-narančastu boju, kao što je bio slučaj i s otapalima prije.

Indikatorska otopina pripremljena od kore limuna daje gotovo iste rezultate, neovisno o otapalu. Otopina se može koristiti kao indikator vrlo bazičnog medija, pH = 13 i pH = 14, no pri ostalim pH vrijednostima ne pokazuje razliku boje u odnosu na boju samog indikatora. Prema dostupnoj literaturi, u kori i soku limuna mogu se naći flavonoidi. Karakteristično obojenje koje pojedinom pH mediju daju flavonoidi (crveno u kiselom, ljubičasto u neutralnom, plavo u bazičnom i žuto u jako bazičnom mediju), u ovom slučaju je izostalo. Vidljivo je samo žuto obojenje u jako bazičnom mediju, koje bi moglo biti rezultat kopigmentacije.

4.2. Naranča, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Ispitivanje soka naranče i kore naranče u odabranim otapalima (nakon 24 h) prikazano je na Slikama 29.-34.

Rezultati pokazuju kako sok naranče daje jednake rezultate u gotovo cijelom pH spektru, pH = 1-13 (Slika 29.). Pri pH = 14 vidi se intenzivnija promjena boje u fluorescentno narančastu.



Slika 29. Sok naranče kao indikator.

U odnosu na boju soka naranče (izdvojena jažica, desni kut), boja u pH otopinama je svjetlija te manje intenzivna. Prema ovim rezultatima, dolazimo do zaključka kako sok naranče, također, nije potencijalni pH indikator.



Slika 30. Indikator pripremljen od kore naranče i acetona.

Rezultati ispitivanja kore naranče i acetona pokazuju kako pri vrijednostima $\text{pH} = 1-11$ nema promjene boje koja bi ukazala na različit pH otopine (otopina je blijedo žute boje, Slika 30.). Pri $\text{pH} = 12$ vidi se promjena te boja postaje intenzivnije žuta u odnosu na boju prije. U vrlo bazičnim uvjetima, $\text{pH} = 13-14$, daje intenzivno žutu boju.



Slika 31. Indikator pripremljen od kore naranče i etanola.

U slučaju etanola (Slika 31.), rezultati pokazuju kako se boja ne mijenja u rasponu $\text{pH} = 1-11$, kao i u slučaju acetona. Pri $\text{pH} = 12$ otopina poprima žutu boju, dok se u $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} =$

14 najjasnije vidi promjena jer dolazi do izrazito žutog obojenja.



Slika 32. Indikator pripremljen od kore naranče i hladne vode.

Kod hladne vode nema promjena boje u rasponu $\text{pH} = 1-12$ (Slika 32.). Do vidljive promjene boje dolazi tek pri $\text{pH} = 13$ gdje je obojenje izrazito žuto kao i pri $\text{pH} = 14$.



Slika 33. Indikator pripremljen od kore naranče i metanola.

S metanolom kao otapalom, rezultati koje smo dobili, također, pokazuju da ne dolazi do promjene boje u kiselim i blago bazičnim uvjetima (Slika 33.). Do vidljive promjene boje dolazi pri $\text{pH} = 12$, dok je u izrazito bazičnim uvjetima žuta boja najintenzivnija ($\text{pH} = 13-14$).



Slika 34. Indikator pripremljen od kore naranče i vrele vode.

Kao i kod hladne vode, u slučaju vrele vode u rasponu $\text{pH} = 1-12$ ne dolazi do promjene boje

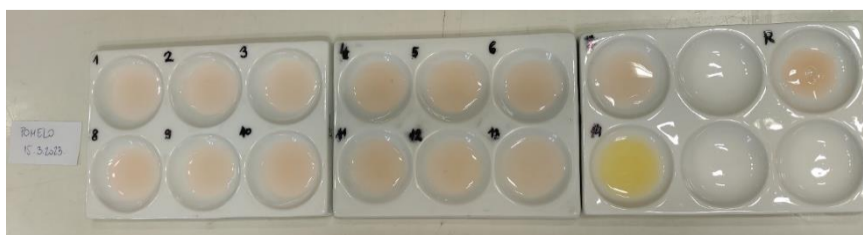
(Slika 34.). Vidljiva promjena nastaje tek pri pH = 13 te se ne razlikuje od obojenja koje se dobije pri pH = 14. Pri obje vrijednosti vidi se jasno žuto obojenje.

Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako indikatorski pripremljeni od kore naranče i raznih otapala mogu poslužiti isključivo kao indikatori bazičnih uvjeta pri pH = 13-14, no ne možemo razlikovati intenzitet boje jer su gotovo iste pri obje pH vrijednosti. Takve indikatorske otopine možemo koristiti kao kiselobazne indikatore zbog razlike u boji kiselog i jako bazičnog dijela spektra, no ne pokazuju točnu vrijednost bazičnog dijela pH skale.

Prema dostupnoj literaturi, glavni pigmenti koji bojaju koru i sok naranče su karotenoidi. Međutim, uočene promjene boje ne upućuju na karotenoide, budući da je obojenje karakteristično za njih izostalo. U kiselom mediju, karotenoidi daju žutu boju, u neutralnom narančastu, a u bazičnom crvenu. U radu je ovakvo obojenje izostalo, a uočena je intenzivna žuta boja u jako bazičnom mediju. Obzirom da u radu nije rađeno s čistim pigmentima i da nije izvršena analiza ekstrakata koji su ispitani kao mogući pH indikatori, ne može se sa sigurnošću utvrditi što je uzročnik uočenih promjena boja, kao i izostanka obojenja karakterističnog za karotenoide.

4.3. Pomelo, *Citrus maxima* (Burm.) Merrill

Rezultati ispitivanja koji se odnose na sok i koru pomela (nakon 24 h) prikazani su na Slikama 35.-40.



Slika 35. Sok pomela kao indikator.

Kao što je prikazano na Slici 35., sok pomela u rasponu pH = 1-13 ne pokazuje razliku u odnosu na boju samog indikatora (krajnje desna jažica). Tek u izrazito bazičnom mediju, pH = 14, boja otopine postaje žuta, pa bi kao takav mogao poslužiti samo kao indikator za taj pH. U pulpi te samim time i u soku pomela utvrđen je likopen. Međutim, ispitivanja su

pokazala da su karotenoidi nestabilni u kiselom mediju te da u bazičnom mediju dolazi do degradacije likopena. Obzirom na rad sa biljnim materijalom (smjesa pigmenata i drugih tvari), moguće je da su uočeni rezultati posljedica kopigmentacije.



Slika 36. Indikator pripremljen od kore pomela i acetona.

U slučaju indikatora pripremljenog od kore pomela i acetona, u rasponu pH = 1-11 vidljiva je ista boja (Slika 36.). Pri pH = 12 dolazi do malo jačeg obojenja, dok se pri pH = 13-14 vidi znatno intenzivnije žuto obojenje.



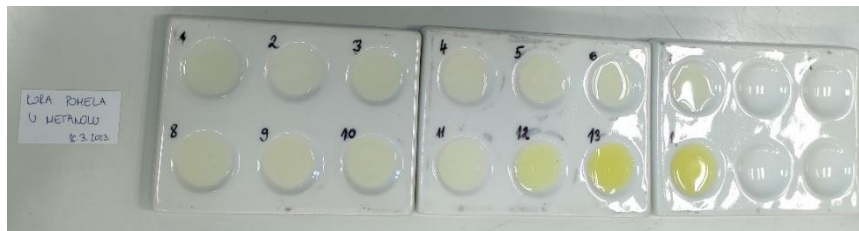
Slika 37. Indikator pripremljen od kore pomela i etanola.

Iste rezultate smo dobili ispitivanjem indikatora pripremljenog s korom pomela i etanolom. U rasponu pH = 1-11 ne dolazi do jasne promjene boje (Slika 37.) dok pri pH = 12 dolazi do blago žutog obojenja. U vrlo bazičnom mediju, pH = 13 i pH = 14 otopina poprima izrazito žutu boju.



Slika 38. Indikator pripremljen od kore pomela i hladne vode.

Indikator pripremljen s hladnom vodom ne pokazuje vidljive promjene boje pri pH = 1-11 (Slika 38.). Pri pH = 12 vidljiva je blaga promjena boje dok se pri pH = 13 i pH = 14 boja promijenila u izrazito žutu.



Slika 39. Indikator pripremljen od kore pomela i metanola.

U slučaju metanola, pri pH = 1-11 ne vidi se jasna promjena boje (Slika 39.), pri pH = 12 dolazi do laganog obojenja. Pri pH = 13 i pH = 14 dolazi do intenzivnog žutog obojenja.



Slika 40. Indikator pripremljen od kore pomela i vrele vode.

Pri korištenju vrele vode kao otapala, iz rezultata možemo očitati kako ne dolazi do promjene boje u rasponu pH = 1-11 (Slika 40.). Tek pri pH = 12 vidimo lagano obojenje. U vrlo bazičnom mediju, pH = 13-14, otopina poprima izrazito žutu boju.

Kao i do sada, prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti kako pomelo nije dobar izbor za pripremu alternativnog indikatora. Uočena je promjena u jako bazičnom mediju, pa pomelo ima određeni potencijal kao indikator. Ali je uočena promjena premala da bi bio zamjena sintetskim indikatorima. β -karoten inače daje narančastu boju kori pomela, no uočeni rezultati ne upućuju na karotenoide. Obzirom da je naglasak rada bio na što jednostavnijoj pripremi indikatora i na što manjim troškovima, sastav ekstrakata nije ispitan, a kako se radi o smjesi pigmenata, ne možemo točno reći koji pigment(i) pridonosi uočenim bojama.

4.4. Grejp, *Citrus × paradisi* Macfad.

Na Slikama 41.-46. prikazani su rezultati ispitivanja soka grejpa i kore grejpa (nakon 24 h stajanja) kao prirodnog kiselo-baznog indikatora.



Slika 41. Sok grejpa kao indikator.

Dodatkom soka u raspon $\text{pH} = 1-13$, ne dolazi do vidljive reakcije i promjene boje. U izrazito bazičnim uvjetima, $\text{pH} = 14$, boja otopine poprima blago žutu boju te je to jedina vidljiva promjena (Slika 41.). Sok grejpa može poslužiti kao indikator samo jako bazičnog medija budući da daje vidljivu reakciju isključivo pri $\text{pH} = 14$. Grejp sadrži veliku količinu likopena, čija se stabilnost i koncentracija smanjuju s porastom pH . Uočeno žuto obojenje pri $\text{pH} = 14$ vjerojatno nije posljedica prisustva likopena te se ne može točno reći koji spoj izaziva promjenu boje.



Slika 42. Indikator pripremljen od grejpa i acetona.

Korištenjem acetona rezultati pokazuju kako u rasponu $\text{pH} = 1-12$ nema vidljive promjene boje (Slika 42.). Blaga promjena boje se vidi tek pri $\text{pH} = 13$, a boja dobivena pri $\text{pH} = 14$ se ne razlikuje od one pri $\text{pH} = 13$.



Slika 43. Indikator pripremljen od kore grejpa i etanola.

U slučaju etanola, u rasponu pH = 1-12 nema promjene boje u odnosu na boju indikatora (Slika 43.). Do blage promjene u blijedo žutu boju dolazi tek dodatkom indikatora u jako bazičan medij. Pri pH = 13 i pH = 14 dolazi do vidljivih reakcija te je jasno vidljiva promjena boje otopine u žutu.



Slika 44. Indikator pripremljen od kore grejpa i hladne vode.

Hladna voda kao otapalo pokazuje kako u rasponu pH = 1-12 nema promjene boje, kao i u prethodnim slučajevima (Slika 44.). Pri pH = 13 i pH = 14 dolazi do vidljivog blago žutog obojenja, no boja nije jako intenzivna.



Slika 45. Indikator pripremljen od kore grejpa i metanola.

U slučaju metanola kao otapala, u rasponu pH = 1-12 nema vidljive promjene boje (Slika 45.). Do izražene promjene boje dolazi u bazičnom dijelu skale, pri pH = 13-14 dolazi do slabije vidljivog žutog obojenja.



Slika 46. Indikator pripremljen od kore grejpa i vrele vode.

Koristeći vrelu vodu kao otapalo pri $\text{pH} = 1-12$ ne dolazi do promjene obojenja (Slika 46.). Do vidljive promjene boje dolazi u izrazito bazičnim uvjetima pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$. Prema ovim rezultatima možemo zaključiti kako indikatorske otopine kore grejpa u raznim mogu poslužiti kao indikator jako bazičnog medija, budući da pri $\text{pH} = 13-14$ otopine poprime blago žutu boju. U kiselom, neutralnom i blago bazičnom mediju prisutna je ista boja, neovisno o otapalu, pa bi indikatori mogli poslužiti samo kao smjernica za jako bazičan medij, ali izostanak oboljenja ne može jasno upućivati ni na kiseli ni na neutralan medij. Kora grejpa sadrži veliku koncentraciju ksantofila koji joj daju boju. Međutim obojenje karakteristično za karotenoide je izostalo (u kiselom žuto, u neutralnom narančasto, u bazičnom crveno), pa se ne može reći da je uočena promjena boje rezultat prisutnih karotenoida.

4.5. Limeta, *Citrus× aurantifolia* (Christm.) Swingle

Rezultati ispitivanja limete, soka i kore (nakon 24 h), kao kiselo-baznog indikatora prikazani su na Slikama 47.-52.



Slika 47. Sok limete kao indikator.

Rezultati dobiveni sa sokom limete kao potencijalnim kiselo-baznim indikatorom nisu obećavajući. U rasponu $\text{pH} = 1-14$ ne dolazi do vidljive promjene boje, ali je vidljiva lagana

promjena u odnosi na referentnu otopinu (gornja desna jažica, Slika 47.). Sok limete sadrži flavonoide koji mijenjaju boju u cijelom pH rasponu. Međutim, u radu je ovo obojenje izostalo osim u izrazito bazičnom mediju. Ipak, moguće je da obojenje uočeno u bazičnom mediju ne potječe od flavonoida, ili ne potječe samo od flavonoida. Moguće je da se radi o kopigmentaciji.



Slika 48. Indikator pripremljen od kore limete i acetona.

Korištenjem acetona kao otapala možemo uočiti kako pri $\text{pH} = 1-12$ nema uočljive promjene boje (Slika 48.). Jasna promjena boje nastupa pri $\text{pH} = 13-14$ gdje dolazi do intenzivnog žutog obojenja otopina.



Slika 49. Indikator pripremljen od kore limete i etanola.

Rezultati s etanolom su slični i pokazuju da u rasponu $\text{pH} = 1-12$ nema vidljive promjene boje (Slika 49.). Pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ dolazi do intenzivnog žutog obojenja koje je jasno vidljivo.



Slika 50. Indikator pripremljen od kore limete i hladne vode.

S hladnom vodom kao otapalom, dobiveni rezultati pokazuju kako pri $\text{pH} = 1-12$ nema vidljivog obojenja (Slika 50.). Do vidljivog obojenja dolazi pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ gdje otopina poprima žutu boju.



Slika 51. Indikator pripremljen od kore limete i metanola.

U slučaju metanola dobiveni su drugačiji rezultati (Slika 51.). U rasponu $\text{pH} = 1-6$ nema vidljivih promjena, pri $\text{pH} = 7$ dolazi do intenzivnog žutog obojenja (vjerojatno posljedica kontaminacije te se treba zanemariti). Pri rasponu $\text{pH} = 8-11$ nema vidljive reakcije, pri $\text{pH} = 12$ dolazi do blago žuto obojenja, a pri $\text{pH} = 13-14$ do intenzivnog žutog obojenja.



Slika 52. Indikator pripremljen od kore limete i vrele vode.

Indikator pripremljen s vrelom vodom u rasponu $\text{pH} = 1-12$ ne daje vidljive promjene boje (Slika 52.). Do intenzivnog žutog obojenja dolazi pri vrijednostima $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti kako kora limete može poslužiti kao kiselo-bazni indikator za pH = 13-14, odnosno kao indikator jako bazičnih otopina.

Limeta u kori sadrži flavonoide koji inače pokazuju specifična obojenja u ovisnosti o pH medija. Ta obojenja ovdje nisu uočena, a obzirom da sastav indikatora nije ispitan, ne može se sa sigurnošću tvrditi koji pigment(i) je odgovoran za uočena obojenja.

4.6. Mandarina, *Citrus reticulata* Blanco

Rezultati dobiveni ispitivanjem soka i kore mandarine (nakon 24 h) kao kiselo-baznog indikatora prikazani su na Slikama 53.-58.



Slika 53. Sok mandarine kao indikator.

Korištenjem soka mandarine kao potencijalnog kiselo-baznog indikatora vidljivo je kako u rasponu pH = 1-13 nema razlike u boji. Pri pH = 14 dolazi do intenzivnijeg obojenja, no razlika je vrlo mala (Slika 53). Po tome možemo zaključiti kako sok mandarine nije potencijalni kiselo-bazni indikator jer ne daje jasne i vidljive razlike u promjeni boja ovisno o pH otopine. Iako sok i pulpa mandarine sadrže flavonoide i karotenoide (odnosno, pigmente koji promjenom boje mogu ukazati na pH medija), karakteristična obojenja su izostala a uočeno obojenje je isto u gotovo cijelom rasponu pH skale.



Slika 54. Indikator pripremljen od kore mandarine i acetona.

Rezultati upotrebe acetona i kore mandarine pokazuju da u rasponu pH = 1-12 dolazi do blagog obojenja pH otopina koje je isto u cijelom rasponu i ne odudara od boje indikatora (Slika 54.). Pri vrijednostima pH = 13 i pH = 14 otopina poprima jaču (izraženiju) žutu boju.



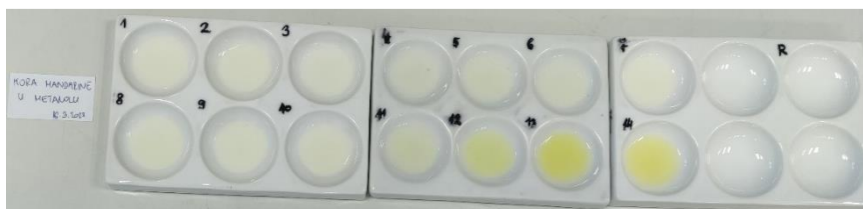
Slika 55. Indiktor pripremljen od kore mandarine i etanola.

U slučaju etanola vidljiva je ista boja u rasponu pH = 1-12 (Slika 55.), dok je pri pH = 13 i pH = 14 promjena boje izražena te se vidi žuto obojenje.



Slika 56. Indiktor pripremljen od kore mandarine i hladne vode.

Korištenjem hladne vode u pripremi indikatora, u rasponu pH = 1-12 nema vidljive promjene (Slika 56.). Do promjene boje u blago žutu dolazi pri pH = 13, a pri pH = 14 žuta boja je najintenzivnija.



Slika 57. Indiktor pripremljen od kore mandarine i metanola.

Metanol kao otapalo ne pokazuje promjenu boje u rasponu pH = 1-11 (Slika 57.). Pri pH =

= 12 dolazi do nježno žutog obojenja otopine, a pri pH = 13-14 promjena boje u žutu je jače izražena, odnosno intenzivnija.



Slika 58. Indikator pripremljen od kore mandarine i vrele vode.

Slično kao i u slučaju hladne vode, indikator pripremljen s vrelom vodom ne daje promjenu boje u rasponu pH = 1-12 (Slika 58.). Dodatkom indikatora u otopine pH = 13-14 dolazi do izrazito žutog obojenja.

Prema rezultatima proizlazi da indikatora pripremljen od kore mandarine i odabranih otapala nema velik potencijal primjene. Promjene boje vide se pri pH = 13-14 pa se indikator pripremljen od kore mandarine može koristiti kao indikator izrazito bazičnih otopina. Iako kora mandarine sadrži karotenoide (na primjer β -citaurina koji joj daje narančastu boju), obojenje koje asocira na karotenoide nije uočeno. Obzirom da indikatorima nije određen točan sastav, ne može se sa sigurnošću reći kojeg pigment (ili kombinacija pigmenta) dovodi do uočenih rezultata.

4.7. Rezultati nakon 7 dana

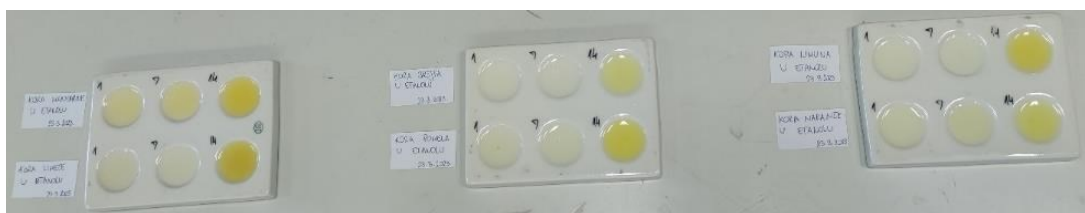
Rezultati ispitivanja dobiveni upotrebom otopina koje su stajale 7 dana u hladnjaku prikazani su na Slikama 59.-63. Usporedbom prethodnih rezultata s ovdje prikazanim, može se vidjeti ima li vrijeme utjecaj na indikatorski potencijal ovdje ispitanog citrusnog voća.



Slika 59. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i acetona.

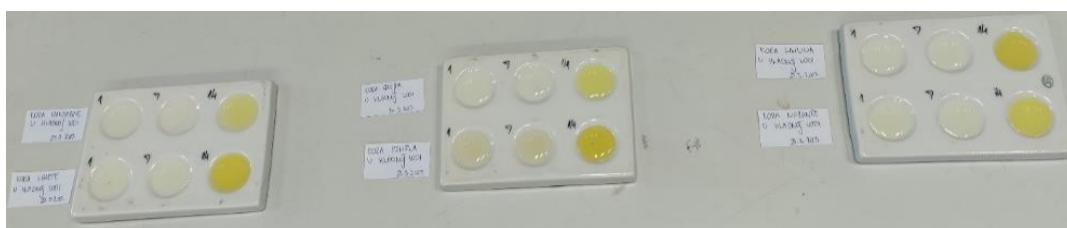
U slučaju acetona, indikatori ne daju promjenu boje pri pH = 1 i pH = 7 (Slika 59). Međutim,

pri pH = 14 javlja se intenzivno žuto obojenje (koje je malo slabijeg intenziteta u slučaju kore mandarine).



Slika 60. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i etanola.

U slučaju etanola, pri vrijednostima pH = 1 i pH = 7 nema vidljive promjene boje (Slika 60.). Pri pH = 14 otopina poprima vidljivo žuto obojenje, malo slabijeg intenziteta u slučaju kore grejpa i kore naranče.



Slika 61. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i hladne vode.

Rezultati dobiveni korištenjem hladne su slični (Slika 61.). Pri pH = 1 i pH = 7 ne dolazi do vidljive promjene boje, dok je pri pH = 14 otopina i ovaj put žute boje.



Slika 62. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i metanola.

Metanol kao otapalo pri pH = 1 i pH = 7 ne daje vidljive promjene boje (Slika 62.). Pri pH = 14 dolazi do vidljivog, izrazito žutog obojenja (malo nježnije nijanse u slučaju kore grejpa

i naranče). Izostanak obojenja pri pH = 7 u slučaju limete jasno potvrđuje kontaminaciju kao razlog obojenja prikazanog na Slici 51.



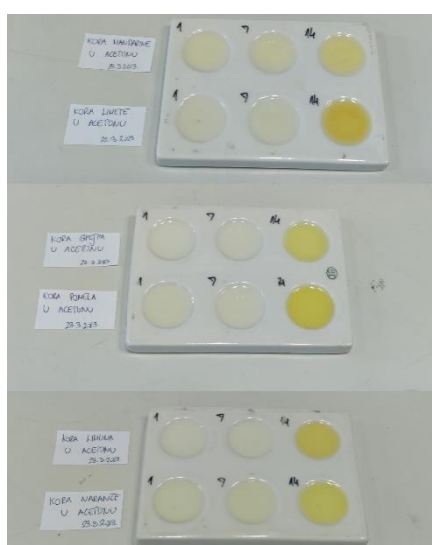
Slika 63. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i vrele vode.

Ni vrela voda kao otapalo pri pH = 1 i pH = 7, ne daje vidljive rezultate (Slika 63.). Isto tako, pri pH = 14 ponovo je promjena boje u žutu (malo slabiji intenzitet u slučaju kore mandarine, grejpa i naranče).

Dobiveni rezultati potvrđuju potencijal pripremljenih indikatora kao indikatora za isključivo jako bazični medij. Duže vrijeme ekstrakcije nije utjecalo na rezultate jer su obojenja ista kao i nakon stajanja od 24 sata.

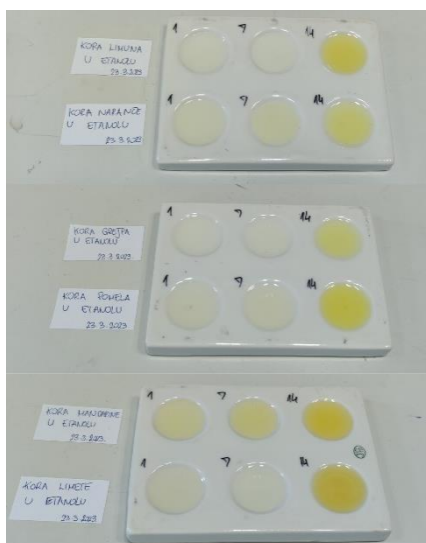
4.8. Rezultati nakon 14 dana

Rezultati ispitivanja dobiveni upotrebom otopina koje su stajale 14 dana u hladnjaku prikazani su na Slikama 64.-68.



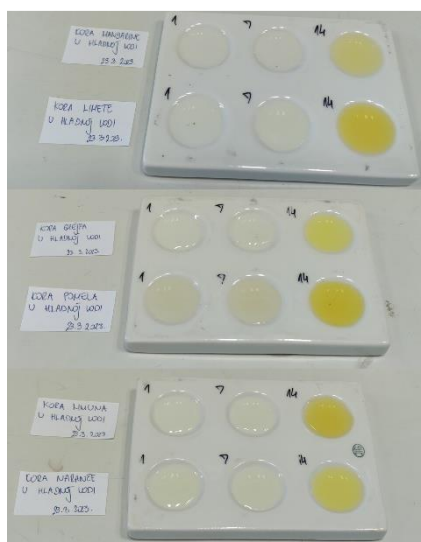
Slika 64. Indikatori pripremljeni od kore citrusa i acetona.

U slučaju acetona, nema promjene boje pri pH = 1 i pH = 7, no pri pH = 14 dolazi do tamnije žutog (narančastog) obojenja (Slika 64.).



Slika 65. Indikatori pripremljeni s etanolom.

Korištenjem etanola vidljivo je da pri pH = 1 i pH = 7 nema promjena boje. Tek pri pH = 14 vidljiva je promjena boje u izrazito tamno žutu do narančastu (Slika 65.)



Slika 66. Indikatori pripremljeni s hladnom vodom.

Kod hladne vode, pri pH = 1 i pH = 7 nema vidljivih promjena boje otopina, a pH = 14 boja otopine postaje izrazito žuta do narančasta (Slika 66.).



Slika 67. Indikatori pripremljeni s metanolom.

Ni s metanolom kao otapalom nisu izražene promjene boje pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 7$. Dodatkom indikatora pri $\text{pH} = 14$ vidimo dolazi do promjene boje u žuto-narančastu (Slika 67.).



Slika 68. Indikatorski pripremljeni s vrelom vodom.

Kao i kod hladne vode, indikator pripremljen s vrelom vodom ne pokazuje promjene u boji pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 7$. Pri $\text{pH} = 14$, odnosno u izrazito bazičnom mediju, vidimo promjenu koja se očituje žuto-narančastom bojom (Slika 68.).

Usporedbom dobivenih rezultata može se vidjeti da duže vrijeme ekstrakcije nije rezultiralo drugačijim rezultatima u odnosu na kraće vrijeme ekstrakcije. Indikatori i dalje pokazuju potencijal samo u izrazito bazičnom mediju dok u ostatku pH skale nema vidljivih promjena.

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitan potencijal citrusa (sok i kora) kao kiselo-baznih indikatora. Biljni materijal je ispitan svjež, kao sok i u obliku otopine pripremljene s odabranim otapalom (voda, metanol, aceton i etanol). Sok je ispitan odmah po pripremi, a otopine nakon 24 sata, 7 dana i 14 dana.

Rezultati pokazuju da svi ispitanii citrusi daju podjednaka obojenja te se mogu koristiti kao indikatori jako bazičnih otopina. Sok citrusa nije pokazao promjenu boje ni u jako kiselom, jako bazičnom ili neutralnom mediju (uz pojedine iznimke, sok od naranče pri $\text{pH} = 14$ daje intenzivnu žuto-narančastu boju). Kora citrusa, neovisno o vrsti i otapalu, pokazuje promjenu boje u jako bazičnom mediju, pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ (žuto obojenje).

Rezultati ispitivanja utjecaja vremena ekstrakcije dali su slične rezultate te su pokazali da se dužim stajanjem neće dobiti drugačiji ili intenzivniji indikator.

Ekstrakcija pigmenata je područje koje je detaljno istraženo, a istražuje se i danas. Nesumnjivo je da postoje bolji protokoli za ekstrakciju pigmenata od onih korištenih u ovom radu. Međutim, jedan od ciljeva rada bila je jednostavnost pripreme indikatora, a još jedan ekonomičnost, te je naglasak bio na provjeri indikatorskog potencijala voća. Korištenje pogodnijih protokola za ekstrakciju pigmenata moglo bi dati bolje rezultate, međutim i upotreba jednostavnih protokola korištenih u radu jasno ukazuje na ograničeni potencijal citrusa kao kiselo-baznih indikatora.

6. LITERATurna VRELA

- [1] <https://sciencing.com/common-acid-base-indicators-8375206.html> (5. 9. 2023.)
- [2] J. Barbosa, *Encyclopedia of Analytical Science* (2nd Edition), Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [3] <https://www.hindawi.com/journals/bri/2015/381721/> (5. 9. 2023.)
- [4] R.W. Sanis, K. Othmer *Enc. Chem. Tech.* 21 (2000), 1-21.
- [5] <https://sciencenotes.org/how-to-make-thymolphthalein-ph-indicator/> (5. 9. 2023.)
- [6] <https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/> (6. 9. 2023.)
- [7] <https://www.agilent.com/cs/library/applications/phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media-5994-3391EN-agilent.pdf> (6. 9. 2023)
- [8] L. Yu, W. W. Li, M. H. V. Lam, H. Q. Yu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011), 1119-1127.
- [9] K. Bilić, Istraživanje biljnog materijala kao potencijalnog kiselo-baznog indikatora, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2020.
- [10] <https://study.com/academy/lesson/bromothymol-blue-definition-uses-formula.html> (6. 9. 2023.)
- [11] N. Vivoda, Kurkumin u kliničkim istraživanjima, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2017.
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromothymol-blue> (6. 9. 2023.)
- [13] <https://www.toppr.com/guides/science/acids-bases-and-salts/natural-indicators-around-us/> (6. 9. 2023.)
- [14] S. Supharoek, K. Ponghong, W. Siriengkawut, K. Grudpan, *J. Food Drug. Anal.* 26 (2018), 583-590.
- [15] D. N. Karunaratne, G. Pamunuwa, *Food Additives*, IntechOpen, London, 2017.
- [16] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betalains> (6. 9. 2023.)
- [17] <https://krenizdravo.dnevnik.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/divljisipak-ljekovita-svojstva-i-uporaba> (6. 9. 2023.)
- [18] <https://chronicleflask.com/tag/natural-indicator/#:~:text=Strawberry%20juice%20acts%20as%20an,acid%2C%20about%20pH%203> (6. 9. 2023.)
- [19] https://www.profil-klett.hr/system/files/repozitorij/pdf/biljke_kao_kiselo_bazni_indikatori.pdf (6.9.2023.)

- [20] N. Misawa, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, Amsterdam, 2010.
- [21] J. Martin, M. J. Navas, A. M. Jimenez-Moreno, A. G. Asuero, *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*, IntechOpen, London, 2017.
- [22] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128132784000117> (26. 9. 2023.)
- [23] A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, R. B. Kakde, *Trop. J. Pharm. Res.* 7 (2008), 1089-1099.
- [24] <https://academic.oup.com/jxb/article/64/14/4461/685829?login=false> (25. 9. 2023.)
- [25] <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/24/8675> (25. 9. 2023.)
- [26] Z. Zou, W. Xi, Y. Hu, C. Nie, Z. Zhou, *Food Chem.* 196 (2016), 885-896.
- [27] https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/119?type=check_update& (6. 9. 2023).
- [28] <https://www.plantea.com.hr/limun/> (9. 9. 2023.)
- [29] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222009520> (26. 9. 2023.)
- [30] <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970498x> (26. 9. 2023.)
- [31] https://www.researchgate.net/publication/345991462_New_Sustainable_Process_for_Hesperidin_Isolation_and_Anti-Ageing_Effects_of_Hesperidin_Nanocrystals (26. 9. 2023.)
- [32] <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/247> (7. 9. 2023.)
- [33] <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailjiFrame.aspx?IdVrste=34315> (14. 9. 2023.)
- [34] <https://www.vrtlarica.hr/naranca-sadnja-uzgoj/> (14. 9. 2023.)
- [35] <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/299/1/012074> (26. 9. 2023.)
- [36] <https://link.springer.com/article/10.1007/s40495-019-00168-7> (26. 9. 2023.)
- [37] https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-b-cryptoxanthin_fig1_224956887 (26. 9. 2023)
- [38] <https://www.vrtlarica.hr/sadnja-uzgoj-pomela/> (14. 9. 2023.)
- [39] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/lycopene> (26. 9. 2023.)
- [40] <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12561> (26. 9. 2023.)
- [41] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280489> (26. 9. 2023.)
- [42] <https://www.vrtlarica.hr/grejp-sadnja-uzgoj/> (14. 9. 2023.)
- [43] J. Lado, P. Cronje, B. Alquezar, A. Page, M. Manzi, A. Gomez-Cadenas, A. D. Stead, L. Zacarias, M. J. Rodrigo, *Phys. Plant.* 154, 469 – 484.
- [44] <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/xanthophyll> (26. 9. 2023.)
- [45] <https://www.thepharmajournal.com/archives/2015/vol4issue8/PartA/4-7-11.pdf> (7. 9. 2023.)

- [46] <https://www.vrtlarica.hr/sadnja-uzgoj-limete/> (14. 9. 2023.)
- [47] <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/820> (26. 9. 2023.)
- [48] https://www.researchgate.net/figure/Structural-features-of-limonin-the-most-representative-limonoid-from-Citrus_fig1_346771265 (26. 9. 2023.)
- [49] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hesperidin> (26. 9. 2023.)
- [50] <https://www.plantea.com.hr/mandarina/> (14. 9. 2023.)
- [51] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01288/full> (26. 9. 2023.)
- [52] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Citraurin> (26. 9. 2023.)