

# Primjena prirodnih eutektičnih otapala u ekstrakciji antocijana

---

Čulo, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:715007>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ivana Čulo**

6633/PT

**PRIMJENA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U  
EKSTRAKCIJI ANTOCIJANA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Zelena otapala za zelene tehnologije

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno–biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### PRIMJENA PRIRODNIH EUTEKTIČIH OTAPALA U EKSTRAKCIJI ANTOCIJANA

*Ivana Čulo, 0058202334*

**Sažetak:** S ciljem zaštite okoliša, povećan je broj istraživanja u kojima se razvijaju zeleni procesi. Takvi procesi, između ostalog, podrazumijevaju korištenje otapala koja nisu štetna za okoliš i ljude koji njima rukuju i zamjena su za hlapljiva organska otapala sa tehnološkim svojstvima istima organskim otapalima. Jedana od alternativnih otapala su prirodna eutektička otapala, smjese 2 ili 3 tvari povezane vodikovim vezama. U ovom radu korišteno je 6 različitih prirodnih eutektičkih otapala za ekstrakciju antocijana iz liofilizirane komine grožđa sorte Plavac mali, a pripremljeni ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). S masenim udjelom po gramu komine većim od zakiseljenog etanola kao konvencionalnim otapalom za ekstrakciju antocijana, najselektivnije otapalo za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa bilo je kolin-klorid:limunska kiselina ( $2550 \pm 101,5 \mu\text{g g}^{-1} \text{ s.tv}$ ).

**Ključne riječi:** antocijani, ekstrakcija, HPLC kromatografija, prirodna eutektička otapala

**Rad sadrži:** 26 stranica, 7 slika, 7 tablica, 31 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Pomoć pri izradi:** Manuela Panić, mag. ing.

**Datum obrane:** 8. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of biochemical Engineering**

**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

**USE OF NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS IN EXTRACTION OF ANTHOCYANINS**

*Ivana Čulo, 0058202334*

**Abstract:** With the aim of protecting the environment, there is a growing number of researches in which green processes are being developed. Such processes, among other things, imply the use of non-polluting solvents that are replace for volatile organic solvents, which are toxic for environment and people who handle them. An example of alternative solvents are natural deep eutectic solvents, mixtures of 2 or 3 substances bonded with hydrogen bonds. In this experiment, 6 different natural eutectic solvents were used for the extraction of anthocyanins from the lyophilized grape pomace of Plavac mali, and the prepared extracts were analyzed using the high performance liquid chromatography (HPLC). With the weight ratio per gram of pomace higher than the acidified ethanol as a conventional solvent for the extraction of anthocyanins, the most selective solvent in extracting anthocyanins from the grape pomace was choline chloride: citric acid ( $2550 \pm 101.5 \mu\text{g g}^{-1} \text{ s.tv}$ ).

**Keywords:** anthocyanins, extraction, HPLC chromatography, natural deep eutectic solvents

**Thesis contains:** 26 pages, 7 figures, 7 tables, 31 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** Ph.D. Ivana Radojčić Redovniković, Associated Professor

**Tehnickal support and assistance:** Manuela Panić, mag. ing.

**Defence date:** September 8<sup>th</sup> 2017

# Sadržaj

<b>1.UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1.ZELENA KEMIJA .....	2
2.1.1.Zelena ekstrakcija.....	3
2.1.2.Zelena otapala .....	5
2.1.3.Superkritični i subkritični fluidi .....	5
2.1.4.Ionske kapljevine .....	6
2.1.5.Eutektička otapala .....	7
2.2.KOMINA GROŽĐA .....	8
2.2.1.Polifenolni spojevi komine grožđa .....	9
<b>3.EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
3.1.MATERIJALI.....	11
3.1.1.Komina grožđa .....	11
3.2. METODE RADA .....	12
3.2.1.Sinteza prirodnih eutektičkih otapala .....	12
3.2.2.Priprema ekstrakata komine grožđa .....	12
3.2.3.Određivanje pojedinačnih i ukupnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	12
3.2.4.Obrada podataka.....	15
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>16</b>
<b>5.ZAKLJUČCI</b> .....	<b>23</b>
<b>6.LITERATURA</b> .....	<b>24</b>

## 1. UVOD

Gotovo svaki industrijski proces proizvodnje zahtijeva neku vrstu ekstrakcije prilikom koje se primjenjuju velike količine organskih otapala. Većina organskih otapala je zapaljiva, hlapljiva, a često i toksična te odgovorna za onečišćenje okoliša i efekt staklenika. Ta sveprisutnost organskih otapala, čija primjena ima niz nedostataka, kako za ljude koji s njima rade, tako i za okoliš, potaknula je znanstvenike na istraživanje alternativnih otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš (Kudlak i sur., 2015; Chemat i sur., 2012). Razvoj alternativnih otapala posljednjih godina usmjeren je ka prirodnim ionskim kapljevinama i eutektičkim otapalima koja su pokazala najveći potencijal u području zelene kemije. Jedno od područja primjene eutektičkih otapala je zelena ekstrakcija.

Cilj zelene ekstrakcije je zamjena tradicionalnih postupaka ekstrakcije zelenom ekstrakcijom kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovine, otapala i energije. Kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije, koriste se neškodljive i učinkovite tehnologije poput ekstrakcije ultrazvukom ili mikrovalovima te zelenih otapala. Jedan od principa zelene ekstrakcije je i pronalazak novih izvora biljnih materijala i uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala kao i uporaba otpada iz industrije kao izvora različitih prirodnih komponenti (Chemat i sur., 2012), a u ovom radu kao sirovina za ekstrakciju prirodnih komponenti je korištena komina grožđa. Komina grožđa je otpad nastao obradom grožđa u proizvodnji vina koji čini 20 % od ukupne sirovine grožđa korištene za proizvodnju, a u sastavu komine dokazano je prisustvo biološki aktivnih spojeva koji imaju povoljan utjecaj na ljudski organizam (Teixeira i sur., 2014).

Cilj ovog rada je utvrditi učinkovitost prirodnih eutektičkih otapala u ekstrakciji antocijana iz komine grožđa. Primjenom 6 različitih prirodnih eutektičkih otapala provjerit će se mogućnost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva - antocijana u uzorcima liofilizirane i usitnjene komine grožđa. Za određivanje koncentracije antocijana nakon provedenog procesa ekstrakcije korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Zelena kemija**

Definicija pojma zelena kemija odnosi se na dizajn i osmišljavanje procesa u kojima je korištenje škodljivih i opasnih supstancija smanjena ili se uopće ne koriste. Definicija koncepta zelene kemije prvi put se spominje u devedesetim godinama prošlog stoljeća i od tada sve više dobiva na važnosti. Područje zelene kemije pokazuje kako je moguće osmisliti profitabilne proizvode i procese koji nisu štetni za ljudsko zdravlje i okoliš. Principi osmišljavanja zelene kemije temelje se na 12 načela koje su osmislili znanstvenici Paul Anastas i John Warner 1998. godine (tablica 1) (Anastas i Eghbali, 2010), a temelj su ideje o smanjenju ili uklanjanju opasnih ili škodljivih tvari iz procesa sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata bez smanjenja učinkovitosti i profitabilnosti (Jukić i sur., 2004).

**Tablica 1.** 12 načela zelene kemije (Anastas i Eghbali, 2010; Jukić i sur., 2004)

Broj	Načelo
1	Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.
2	Tok kemijske sinteze treba osmisliti tako da se ulazna sirovina maksimalno iskoristi ulazna sirovina u konačnom proizvodu.
3	Kada je moguće, osmisliti procese sinteze tako da ne koriste i ne proizvode tvari koje imaju ili mogu imati toksičan učinak na zdravlje čovjeka i okoliš.
4	Kemijske produkte potrebno je osmisliti tako da im se održi djelotvornost, a smanji toksičnost.
5	Uporabu pomoćnih tvari poput otapala i tvari za separaciju, treba zaobići kad god je moguće.
6	Energetski zahtjevi trebaju biti svedeni na minimum tako da se kad god je moguće provode na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku.
7	Treba koristiti obnovljive sirovine kad je to tehnički i ekonomski isplativo.
8	Nepotrebna proširenja procesa kao što su zaštita funkcionalnih skupina i privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa, potrebno je zaobići.
9	Katalitički reagensi selektivni koliko je moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
10	Kemijske produkte treba osmisliti tako da se nakon procesa ne nakupljaju, nego razgrađuju na tvari neškodljive za okoliš.
11	Treba razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa da se spriječi nastajanje opasnih tvari.
12	Za procese je potrebno odabirati tvari s najmanjom mogućnosti izazivanja nesreće (štetna isparavanja, eksplozije, zapaljenje).

### **2.1.1. Zelena ekstrakcija**

Jedan od ciljeva zelene kemije je i zamjena tradicionalnih metoda ekstrakcije zelenom ekstrakcijom. Ekstrakcija je jedan od najčešće korištenih procesa u industriji i gotovo ne postoji proizvodni proces koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije (Chemat i sur., 2012). Konvencionalni procesi ekstrakcije u industrijskom mjerilu imaju velike nedostatke kao što su



nepotpuno iskorištenje ekstrakta, uporaba iznimno velike količine organskih otapala te visoka potrošnja energije uzrokovana izrazito dugim vremenom ekstrakcije i intenzivnim zagrijavanjem i/ili miješanjem tijekom ekstrakcije (Rombaut i sur., 2014; Chemat i sur., 2012). Stoga je cilj zelene kemije zamjena tradicionalnih metoda ekstrakcije zelenom ekstrakcijom. Proces zelene ekstrakcije definiran je kao proces koji se temelji na pronalaženju i dizajniranju procesa ekstrakcije kojima će se smanjiti potrošnja energije, omogućiti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati ekološki prihvatljiv i visoko kvalitetan ekstrakt tj. produkt (Chemat i sur., 2012).

Poznata su tri glavna rješenja za dizajniranje i vođenje laboratorijskih i industrijskih procesa zelene ekstrakcije, kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije, a to su:

1. poboljšanje i optimizacija postojećih procesa,
2. inovacije u procesima i postupcima i
3. inovacije u otkrivanju novih otapala.

Jedan od principa zelene ekstrakcije podrazumijeva smanjenje potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija (npr. aktivacija mikrovalovima i/ili ultrazvukom, primjena alternativnih otapala kao što su super i subkritični fluidi (CO<sub>2</sub> i voda), ionske kapljevine, eutektička otapala). U sljedećim odlomcima je pobliže objašnjena ekstrakcija primjenom ultrazvuka i mikrovalova, a u idućem poglavlju primjena zelenih alternativnih otapala.

#### *Ekstrakcija primjenom ultrazvučnih valova (UAE)*

Proces ekstrakcije uz aktivaciju ultrazvukom temelji se na korištenju ultrazvučnih valova. Ultrazvuk uzrokuje zagrijavanje materije, ali prema drugačijem mehanizmu. Učinak ultrazvuka proizlazi iz jedinstvenog fenomena kavitacije. Kavitacija se sastoji u formiranju, rastu i pucanju mjehurića mikrometarske veličine, koji se generiraju zbog sniženja tlaka na kritičnu vrijednost. Implozija mjehurića dovodi do ekstremnih uvjeta – lokalne temperature od nekoliko tisuća kelvina i tlaka od nekoliko stotina atmosfera, praćenih udarnim valovima izrazito kratkog trajanja (Cravotto i Cintas, 2007). Ovaj efekt osim zagrijavanja, osigurava i dovoljno energije za razbijanje stanične stijenke materijala čime se u otapalo otpušta stanični sadržaj. Proces je jednostavan, siguran, brz, ekološki prihvatljiv sa smanjenom upotrebom skupih organskih otapala i ekonomski isplativ.

#### *Ekstrakcija primjenom mikrovalova (MAE)*

Mikrovalovi su neionizirani elektromagnetski valovi i obuhvaćaju frekvencije od 300 MHz do 300 GHz. Koriste se prilikom ekstrakcije kod materijala koji su sposobni primljenu energiju elektromagnetskog zračenja djelomično prevesti u toplinu. Za razliku od konvencionalnog

zagrijavanja koje se temelji na kondukciji i konvekciji, pri čemu dolazi do velikog gubitka topline u okoliš, zagrijavanje korištenjem mikrovalnog zračenja je selektivno i ciljano te se zbog toga toplina iz sustava gotovo ne gubi (Mandal i sur., 2007).

### **2.1.2. Zelena otapala**

Jedan od glavnih problema zelene kemije odnosi se na sintezu ekološki prihvatljivih otapala (Kudlak i sur., 2015), jer se otapala svakodnevno koriste u brojnim industrijskim procesima i čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % emisija hlapivih organskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Anastas i Eghbali, 2010). Mnoga konvencionalna otapala su toksična i zapaljiva, a njihova svojstva hlapivosti i topljivosti doprinijela su zagađenju zraka, vode i zemlje (Anastas i Eghbali, 2010). Organska otapala predstavljaju jednu od najvećih opasnosti zagađenja okoliša. Zbog toga su istraživanja usmjerena k razvijaju rješenja kojima bi se eliminirala i ograničila upotreba štetnih organskih otapala i zamijenila sa novim ekološki prihvatljivim otapalima. Tako su u području primjene tradicionalnih otapala pronađena nova otapala poput vode i ugljikovog dioksida u superkričnom stanju. Isto tako, s ciljem zamjene organskih otapala krenulo se je s istraživanjem ionskih kapljevine i eutektičkih otapala koja su se po zahtjevima zelene kemije pokazala boljima u odnosu na klasična organska otapala (Kudlak i sur., 2015).

### **2.1.3. Superkrični i subkrični fluidi**

Fluidi zagrijani iznad kritične temperature i komprimirani iznad kritičnog tlaka su poznati kao superkrični fluidi. Superkrični fluidi imaju svojstva plinova i tekućina. U superkričnom stanju gustoća je približna kao kod tekućina, viskoznost je gotovo kao kod plinova, dok je difuzivnost dva reda veličine veća nego u tipičnim tekućinama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

#### *Superkrični CO<sub>2</sub>*

Superkrični CO<sub>2</sub> je najčešći superkrični fluid korišten u obradi hrane, zbog niskih kritičnih konstanti ( $T_k=31,1$  °C,  $p_k=7,38$  MPa), netoksičan je, nije eksplozivan, lako je dostupan, može se lako ukloniti iz proizvoda i ima GRAS (eng. Generally recognized as safe) status. Učinkovitost superkričnog CO<sub>2</sub> kao otapala može se sažeti u nekoliko pravila:

1. Otapa nepolarne ili blago polarne spojeve.
2. Moć otapanja molekula s malom molekularnom masom je velika i smanjuje se povećanjem molekularne mase.
3. Proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli nisu topivi.

4. Superkritični CO<sub>2</sub> ima sposobnost separacije spojeva koji su slabo hlapivi, imaju veću molekularnu masu i/ili imaju veću polarnost povećanjem tlaka. (Brunner, 2005).

#### *Voda (superkrtična i subkrtična)*

Ekološki najprihvatljivijim otapalom smatra se voda, jer je ekonomski isplativa, nije zapaljiva i nije toksična (Castro-Puyana i sur., 2017). Voda je vrlo polarno otapalo pa se uglavnom koristi za ekstrakciju spojeva s visokom polarnosti. Kao visoko polarno otapalo ne može se primjenjivati u ekstrakciji spojeva s malom polarnosti i nepolarnih spojeva, pri standardnim uvjetima (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Činjenica da voda mijenja fizikalno-kemijska svojstva promjenom temperature daje joj važnost kao otapalu. Pri povišenoj temperaturi i tlaku uz uvjete ekstrakcije mijenja se i dielektrična konstanta vode, koja utječe na polarnost vode kao otapala. Tako je dielektrična konstanta vode na 200 °C jednaka dielektričnoj konstanti metanola na sobnim uvjetima. Povišenjem temperature voda postaje otapalo s manjom polarnosti (Castro-Puyana i sur., 2017). Kod temperature od 250 °C i tlaku 50 bara voda se nalazi u subkritičnom stanju, a pri temperaturi 400 °C i tlaku 5000 bara nalazi se u superkritičnom stanju. Područja primjene vode u subkritičnom stanju sve su brojnija u odnosu na vodu u superkritičnom stanju. Ekstremni uvjeti superkritične vode pogoduju procesima oksidacije, hidrolize i razgradnje spojeva pa joj je primjena ograničena na vrlo stabilne komponente (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

#### **2.1.4. Ionske kapljevine**

Ionske kapljevine su organske soli koje su sastavljene od kationa koji mogu biti različito supstituirane organske molekule koje sadrže pozitivno nabijen dušikov, sumporov ili fosforov atom iz anorganskog ili organskog aniona (npr. tetrafluorborat, heksafluorofosfat, nitrat, sulfat, bis[(trifluormetil)sulfonil]imid, acetat, alkil sulfat i alkil sulfonat) (Janiak, 2013). Pri sobnoj temperaturi su u tekućem stanju, a točka tališta im je ispod 100 °C. Zbog pozitivnih svojstva (tablica 2) kao što su neznatna hlapljivost, te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, ionske kapljevine se posljednja dva desetljeća intenzivno proučavaju kao zelena zamjena za tradicionalna i škodljiva organska otapala (Zhao, 2006).

**Tablica 2.** Izabrana svojstva ionskih kapljevina (Kudlak i sur., 2015)

Parametar	Obilježje
Tlak pare	Pri standardnim uvjetima je nizak tlak pare u usporedbi s klasičnim organskim otapalima s visokim tlakom pare (VOC). Zbog toga ionske kapljevine ne isparavaju i njihova točka tališta je visoka pa mogu zamijeniti VOC u organskim sintezama s različitim temperaturnim rasponima.
Topivost i miješanje	Ionske kapljevine imaju veliku sposobnost stvaranja di- i polifaznih sustava, što olakšava njihovu izolaciju iz reakcijskog sustava. Imaju dobru sposobnost otapanja organskih i anorganskih otapala. Glavni faktor koji utječe na topivost i miješanje je vrsta vezanog aniona ionske kapljevine.
Kiselost/lužnatost	Ionske kapljevine imaju svojstva kiselina i lužina, odnosno mogu biti proton donori i proton akceptori, ovisno o vezanom kationu ili anionu.
Termalna stabilnost	Ionske kapljevine su puno stabilnije i manje sklone otapanju kod visokih temperatura u usporedbi s klasičnim organskim otapalima. Stabilnost ovisi o vezanom kationu ili anionu. Neke široko primijenjene ionske kapljevine stabilne su pri temperaturama od 400 °C.

Prvotna očekivanja od ionskih kapljevina bila su velika, i u tehnološkom smislu su opravdana, no neki parametri kao što su: slaba biokompatibilnost, problem razgradnje i odlaganja ionskih kapljevina nakon provođenja procesa, njihova toksičnost te cijena sinteze otapala (koja je 5 - 20 puta veća od sinteze organskih otapala) ne uklapaju se u načela zelene kemije. Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine te je razvoj alternativnih otapala posljednjih godina usmjeren ka prirodnim ionskim kapljevinama i eutektičkim otapalima koja su pokazala najveći potencijal u području zelene kemije (Kudlak i sur., 2015; Paiva i sur., 2014).

### 2.1.5. Eutektička otapala

Eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES) su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina, gdje su navedene komponente povezane jakim vodikovim vezama. Postoji nekoliko tipova DES-ova (tablica 3), a ukoliko su za pripremu DES-a korištene sirovine

prirodnog podrijetla govorimo o prirodnom eutektičkom otapalu (eng. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) (Paiva i sur, 2014).

**Tablica 3.** Vrste eutektičkih otapala, (Kudlak i sur., 2015)

Eutektičko otapalo	Sastav	Primjer
Tip I	metalna sol + organska sol	ZnCl <sub>2</sub> + kolin-klorid
Tip II	hidrat metalne soli + organska sol	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O + kolin-klorid
Tip III	organska sol + donor vodikove veze	Kolin-klorid + urea
Tip IV	metalna sol + donor vodikove veze	ZnCl <sub>2</sub> + urea

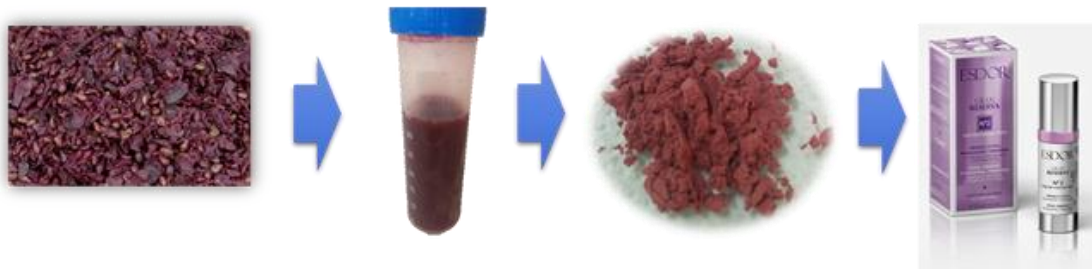
Eutektička otapala imaju točku tališta nižu nego svaka komponenta zasebno (Zhang i sur., 2012). Ukoliko se kolin-klorid (Ch) i urea pomiješaju u molarnom omjeru 1:2 nastaje DES s točkom tališta od 12 °C (što je značajno niža temperatura u odnosu na točke tališta pojedine komponente – Ch 302 °C, odnosno urea 133 °C) (Abbott i sur., 2003). Većina DES-ova ima gustoću veću od vode, a ona ovisi o strukturnoj organizaciji molekula pa smjesa ZnCl<sub>2</sub> - urea (1:3,5) ima gustoću 1,63 g cm<sup>-3</sup>, a smjesa ZnCl<sub>2</sub>-acetamid (1:4) ima gustoću 1,36 g cm<sup>-3</sup>. Viskoznost DES-a također je relativno visoka pri sobnoj temperaturi, veća od 0,1 Pas, a posljedica je smanjene mobilnosti slobodnih grupa zbog vodikovih veza između komponenti, elektrostatskih i van der Waalsovih interakcija između iona te malih praznina u strukturi. Zbog relativno visoke viskoznosti, većina DES-ova ima malu provodljivost (manju od 2 mS cm<sup>-1</sup>) na sobnoj temperaturi (Zhang i sur., 2012). Kod primjene DES-ova u ekstrakcijama kruto-tekuće, problem je velika viskoznost otapala zbog otežanog prijenosa mase između krutine i tekućine. Viskoznost DES-ova je obrnuto proporcionalna temperaturi i može biti 20-1000 puta veća od vode (Dai i sur., 2013b). Naime, određeni udio vode u DES-u olakšava manipulaciju otapalom, smanjuje se viskoznost te je bolji prijenos mase između otapala i krutine (Dai i sur, 2013a; Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Općenito, struktura DES-ova određuje njihova fizikalno-kemijska svojstva koja znatno utječu na učinkovitost ekstrakcije (Paiva i sur., 2014; Kudlak i sur., 2015; Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Dai i sur., 2013b).

## 2.2.Komina grožđa

Vinova loza latinskog naziva *Vitis vinifera* je trajna penjačica iz porodice lozica (*Vitaceae*). Sastoji se od drvenaste stabljike sa dugim listovima i plodovima. Plodovi vinove loze su bobice

okruglastog oblika i slatko-kiselog okusa. Plod se sastoji od pokožice, pulpe i sjemenke koje imaju različite koncentracije polifenolnih spojeva (Anonymous 1).

Prerodom grožđa u vino kao glavni nusproizvodi nastaju: komina grožđa, organski otpad koja sadrži sjemenke, pulpu i pokožicu, peteljke i lišće, otpadna voda, staklenički plinovi i anorganski otpad (Teixeira i sur., 2014). Ovisno o uvjetima berbe grožđa, otpad može imati udio od 13,5 do 14,5 % te dosegnuti 20 % totalnog volumena grožđa. Procijenjeno je da se na svakih 6 L vina proizvede 1 kg komine koja se većinom koristi za prehranu stoke i kao kompost (Mendes i sur., 2013). Komina se sastoji od vode, proteina, lipida, ugljikohidrata, vitamina, minerala i spojeva s važnim biološkim svojstvima poput vlakana, vitamina C i polifenolnih spojeva. Sastav ostatka ovisi o vrsti vinove loze, klimi i procesu kultiviranja (Sousa i sur., 2014). Gledajući odvojeni sastav komine grožđa sjemenke čine 38 % do 52 % suhe tvari iako su dodatna istraživanja pokazala da je taj udio puno manji, odnosno 15 %. Prema istraživanju sjemenke sadrže do 40 % vlakana, 16 % esencijalnih ulja, 11 % proteina, 7 % složenih polifenolnih spojeva kao što su tanini i sastojke poput šećera i minerala. Pokožica grožđa u prosjeku čini 65 % suhe tvari komine grožđa i bogata je polifenolnim spojevima. Zbog velikog sadržaja polifenolnih spojeva, kominu grožđa moguće je primijeniti kao prirodni izvor antioksidansa u farmakološkoj, kozmetičkoj (slika 1) i prehrambenoj industriji (Teixeira i sur., 2014).

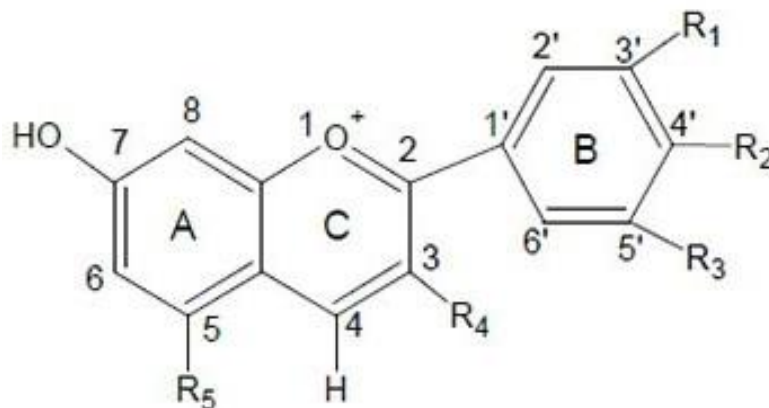


**Slika 1.** Primjena komine grožđa (Anonymous 2)

### **2.2.1. Polifenolni spojevi komine grožđa**

Polifenoli su spojevi koji u svojoj strukturi imaju više od jedne fenolne hidroksilne grupe vezane za jedan ili više benzenskih prstena. Od polifenolnih spojeva najčešće se proučavaju flavonoidi. Po molekularnoj strukturi podijeljeni su u sedam razreda: flavone, flavanone, flavonole, izoflavone, antocijanidine/antocijane, flavanole i dihidrohalkone (Yu i Ahmedna, 2012). Antocijani, katehini, procijanidini, flavonol glikozidi, fenolne kiseline i stilbeni su polifenolni spojevi identificirani u komini grožđa (Kammerer i sur., 2004). Polifenolni sastav komine grožđa ovisi o vrsti koja se kultivira, području uzgoja, klimi i vremenu fermentacije.

Tako crvene vrste grožđa obično imaju veće koncentracije antocijana u odnosu na bijele vrste (Yu i Ahmedna, 2012). U komini se nalaze velike koncentracije kondenziranih tanina, poznatih kao proantocijanidini, a njihov udio u sastavu komine ima kvantitativno važnu ulogu (21 % - 52 % suhe tvari) (Teixeira i sur., 2014).



**Slika 2.** Strukturna formula antocijana (Han i Xu, 2015)

Antocijani su visoko topivi flavonoidi odgovorni za crvenu boju u grožđu i vinima. Sastoje se od aglikona antocijanina (cijanidina, delfinidina, peonidina, malvidina, petunidina, pelargonidina) aromatskog prstena povezanog na heterociklički prsten koji sadrži kisik, koji je također vezan ugljik-ugljik vezom na treći aromatski prsten (slika 2) (Teixeira i sur., 2014).

Antocijani pridonose većem antioksidativnom kapacitetu u voću (90%) u odnosu na flavanole, flavan-3-ole i fenone kiseline (10 %) (Teixeira i sur., 2014). Spojevi su koji lako oksidiraju što ih čini dobrim antioksidansima. Njihova antioksidativna aktivnost temelji se na njihovoj strukturi zbog koje imaju svojstvo donora elektrona ili vodikovog atoma reaktivnim slobodnim radikalima (Castañeda-Ovando i sur, 2009), a zbog pozitivnih učinaka na zdravlje (redukcija oksidativnog stresa, sprječavanje nastanka slobodnih radikala, smanjenje rizika od karcinoma, regulacija kolesterola) zanimljivi su za procese ekstrakcije.

Ekstrakcije antocijana iz komine provodile su se korištenjem otapala koja su toksična i skupa, poput kiselina, metanola, acetona i kloroforma. Tako ekstrahirane antocijane potrebno je izložiti procesu detoksikacije prije inkorporacije u prehrambene proizvode. Zato se istražuju metode koje koriste alternativna otapala (Monrad i sur., 2010).

## **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1.Materijali**

#### **3.1.1.Komina grožđa**

U radu se koristila komina grožđa sorte Plavac mali (berba 2012). Komina grožđa se podvrgnula postupku liofilizacije. Liofilizirani uzorci su se samljeli i takvi se koristili u ekstrakciji.

#### **3.1.2.Kemikalije**

- 96% etanol, Kefo, Slovenija
- Destilirana voda, PBF, RH
- Glicerol, Kemika, RH
- Glukoza, Kemika, RH
- Jabučna kiselina, Kemika, RH
- Klorovodična kiselina, Kemika, RH
- Kolin-klorid ( $\geq 97\%$ ), Sigma-Aldrich, SAD
- Limunska kiselina, Gram-mol d.o.o., RH

#### **3.1.3.Uređaji**

- Analitička vaga, Kern, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, slovenija
- HPLC, Agilent 1100 Series, Agilent, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (menzure, čaše, pipete, odmjerne tikvice, lijevci, Büchnerov lijevak, filteri, mikrofilteri, stalak za epruvete, epruvete)
- Magnetska mješalica, RTC Basic, IKA Werke
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex, Bandelin electronic, Njemačka
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK



## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala su sintetizirana dodavanjem proračunate količine komponenata prema određenim omjerima u tablici 4 u tikvicu s okruglim dnom uz dodatak 30 % (v/v) vode. Tikvica sa reakcijskom smjesom stavljena je na magnetsku miješalicu pri uvjetima od 50 °C na 2 sata, dok smjesa nije postala homogena, prozirna i bezbojna. Pripremljena otapala zatvorena su parafilmom i skladištena na tamnom mjestu do korištenja za pripremu ekstrakata. Svakome od pripremljenih NADES-ova izmjerena je pH vrijednost pomoću multimetra pH/ion meter S220, Mettler Toledo pri temperaturi od 0-100 °C.

**Tablica 4.** Popis eutektičkih otapala korištenih u eksperimentu

<b>Eutektičko tapalo (DES)</b>	<b>Molarni omjer komponenata</b>	<b>Kratice</b>
Betain:jabučna kiselina	1:1	BMa
Jabučna kiselina:glukoza	1:1	MaGlc
Jabučna kiselina:glukoza:glicerol	1:1:1	MaGlcGly
Kolin-klorid:limunska kiselina	2:1	ChCit
Betain:limunska kiselina	1:1	BCit
Kolin-klorid:jabučna kiselina	1:1	ChMa

### 3.2.2. Priprema ekstrakata komine grožđa

Korištenjem analitičke vage izvagana je masa uzorka komine grožđa od 0,3 g, a zatim je dodano 10 ml pripremljenog prirodnog eutektičkog otapala s 30% (v/v) vode ili zakiseljenog etanola. Tako je pripremljena smjesa stavljena je u ultrazvučnu kupelj (250 W/50-60 Hz) na temperaturu 60 °C na 60 min. Nakon toga ekstrakt se centrifugira 15 min pri 5000 o min<sup>-1</sup>. Poslije centrifugiranja slijedi vakuum filtracija. Dobiveni ekstrakt skladišten je na +4 °C do daljnje analize.

### 3.2.3. Određivanje pojedinačnih i ukupnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza antocijana u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom. Identifikacija i kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda.

## **Kromatografska analiza:**

### **Kromatografski uvjeti:**

Kolona: Phenomenax C18, Kinetex, 150x4,6 mm I.D., 2,6  $\mu\text{m}$

Pokretna faza: A- 5 % otopina mravlje kiseline u vodi

B- 5 % otopina mravlje kiseline u etanolu

Eluiranje: gradijentno

Gradijent:

<b>Vrijeme (min)</b>	<b>Otapalo A (%)</b>	<b>Otapalo B (%)</b>
0	90	10
15,5	65	35
16	0	100
17	0	100
18	90	10

Injektirani volumen: 10  $\mu\text{L}$

Temperatura injektiranja: 20  $^{\circ}\text{C}$

Protok: 1  $\text{mL min}^{-1}$

Temperatura kolone: 40  $^{\circ}\text{C}$

Vrijeme analize: 22 min

Detektor: Photodiode Array

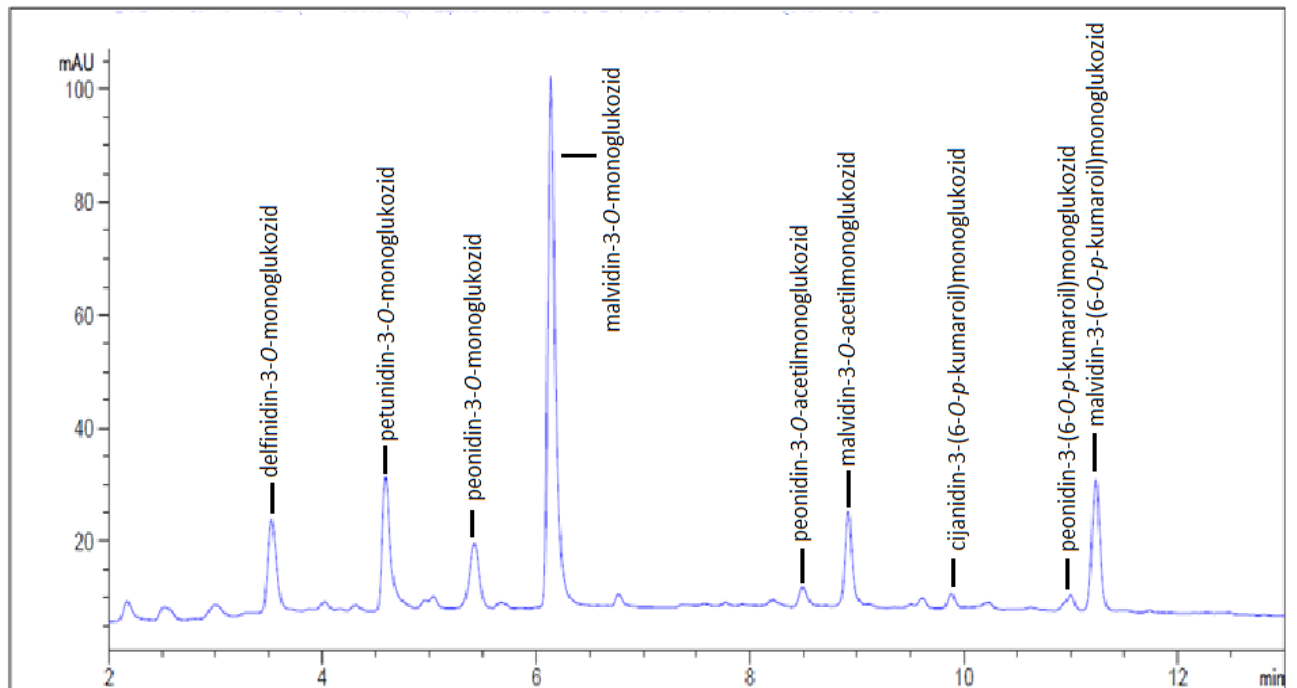
### **Priprema uzorka:**

Uzorak se profiltrira kroz filter veličine pora 0,25  $\mu\text{m}$ , politetrafluoretilen (Macherey-Nagel Gmb & Co. KG, Njemačka).

### **Identifikacija i kvantifikacija:**

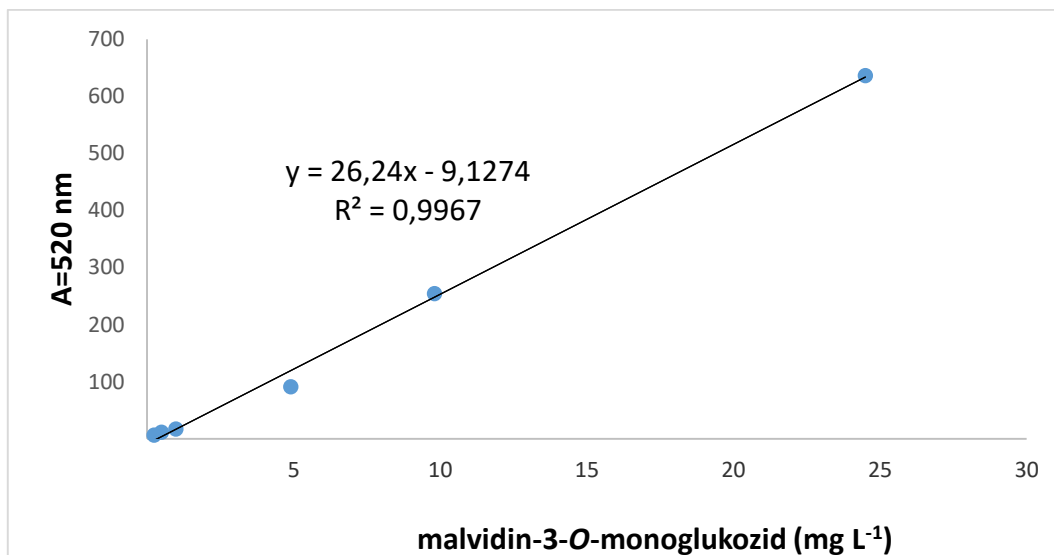
Kromatogrami antocijana određeni su na 520 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize određivani su spektri u ultraljubičastom području (od 200 do 600 nm).

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektara. Tipični kromatogram ekstrakata antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali dobivenog pomoću NADES-a prikazan je na slici 3:



**Slika 3.** Tipičan kromatogram antocijana iz ekstrakta komine grožđa dobiven pomoću NADES-a ChCit s 30 % (v/v) vode u ultrazvučnoj kupelji. Reakcijski uvjeti: 60 min, 60 °C.

Kvantifikacija analiziranih spojeva provedena je metodom vanjskog standarda malvidin-3-*O*-monoglukozid klorida. To je najzastupljeniji slobodni antocijan u komini grožđa sorte Plavac mali. Površina pikova i masena koncentracija su postavljene kao ovisne veličine te je nacrtan baždarni pravac sa pripadajućom jednadžbom. Iz jednadžbe baždarnog pravca izračunata je kvantitativna vrijednost antocijana (slika 4).



**Slika 4.** Baždarni pravac malvidin-3-*O*-monoglukozyda

Ukupni antocijani određeni su preko zbroja kvantitativnih vrijednosti pojedinačnih antocijana.

### 3.2.4. Obrada podataka

Mjerenja su provedena u paralelama. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz koje su navedene i vrijednosti standardne devijacije ( $\pm$  SD).

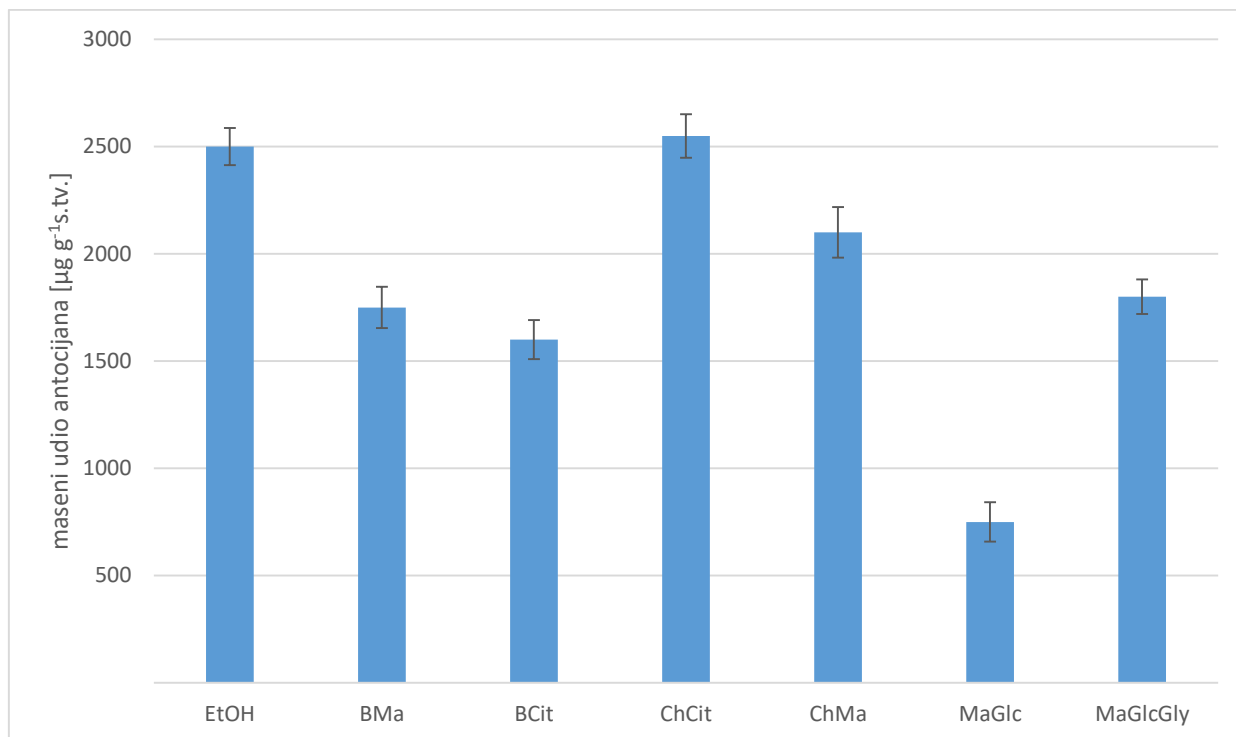
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Antocijani su polifenolni spojevi s izrazitom biološkom aktivnošću. Upravo zbog još uvijek visokih koncentracija antocijana u komini grožđa, potrebno ih je izdvojiti kako bi se otpad prehrambene industrije dodatno iskoristio i kako bi mu se dodala vrijednost. Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije biljnih polifenola su povezani s potrošnjom velikih količina organskih otapala, kao i uz veliku potrošnju energije te nedovoljno iskorištenje ekstrakta (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Chemat i sur., 2012). Zbog toga, posljednjih godina se istražuje mogućnost korištenja alternativnih otapala kao i ostali principi zelene ekstrakcije. U ovom eksperimentalnom radu su korišteni sljedeći principi zelene ekstrakcije: (1) uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala, (2) uporaba alternativnih otapala, (3) smanjenje utroška energije primjenom alternativnih tehnologija i (4) uporaba nusprodukta kao izvora bioaktivnih komponenti.

U ovom radu sintetizirano je 6 prirodnih eutektičkih otapala (BMa, MaGlc, MaGlcGly, ChCit, BCit, ChMa) i primijenjeno za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa. Osim NADES-ova, pripremljen je i ekstrakt korištenjem konvencionalnog otapala zakiseljenog etanola (60 % + 0,8 % HCl), kao referentnog otapala. Za identifikaciju i kvantifikaciju antocijana u ekstraktima komine grožđa korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

Korištenjem HPLC kromatografije identificirani su sljedeći spojevi: delfinidin-3-*O*-monoglukozid, petunidin-3-*O*-monoglukozid, peonidin-3-*O*-monoglukozid, malvidin-3-*O*-monoglukozid, kao skupina antocijan monoglukozida, peonidin-3-*O*-acetilmonoglukozid, malvidin-3-*O*-acetilmonoglukozid, kao skupina antocijan acetyl glukozida te cijanidin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil)monoglukozid, peonidin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil)monoglukozid, malvidin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil)monoglukozid kao skupina antocijan kumaroil glukozida (slika 3).

Antocijani su relativno nestabilne molekule i lako oksidiraju. Osjetljivi su na mnoge faktore, poput pH koji utječe na stabilnost i boju (Teixeira i sur., 2014). Kod pH vrijednosti 1 većinom su prisutni u obliku crvenog flavijevog kationa, a kod pH između 2 i 4 imaju oblik plavih kvinoidal oblika. Povećanjem pH vrijednosti između 5-6 prelaze u oblik bezbojne karbinolne pseudobaze, a ako se pH poveća iznad 7 antocijani se razgrađuju (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Prema tome kod nižih pH vrijednosti povećan je učinak ekstrakcije (Dai i sur., 2014). Rezultati dobiveni određivanjem ukupnih antocijana pokazuju da je najučinkovitija ekstrakcija postignuta korištenjem otapala ChCit s masenim udjelom antocijana ( $2550 \pm 101,5 \mu\text{g g}^{-1}$  s.tv.) (slika 5).



**Slika 5.** Koncentracija ukupnih antocijana\*

\*EtOH -ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu (60 % + 0,8 % HCl), BMa -ekstrakt pripremljen korištenjem betain:jabučne kiseline, BCit -ekstrakt pripremljen korištenjem betain:limunske kiseline, ChCit -ekstrakt pripremljen korištenjem kolin-klorid:limunske kiseline, ChMa -ekstrakt pripremljen korištenjem kolin-klorid:jabučne kiseline, MaGlc -ekstrakt pripremljen korištenjem jabučna kiselina:glukoza, MaGlcGly -ekstrakt pripremljen korištenjem jabučna kiselina:glukoza:glicerol

Visoka koncentracija antocijana ekstrahirana je i primjenom konvencionalnog otapala, zakiseljenog etanola ( $2500 \pm 86,9 \mu\text{g g}^{-1} \text{s.tv.}$ ), dok je najmanja koncentracija antocijana ( $750 \pm 91,7 \mu\text{g g}^{-1} \text{s.tv.}$ ) u slučaju ekstrakta koji je pripremljen kombinacijom jabučna kiselina:glukoza (MaGlc). Iz određenih pH vrijednosti iz tablice 5 vidimo da otapalo ChCit ima nisku pH vrijednost i veliku učinkovitost ekstrakcije. Usporedbom pH vrijednosti otapala ChCit (0,931) i MaGlc (0,494) vidljivo je da je otapalo MaGlc kiselije. Iako bi zbog niske pH vrijednosti bilo za očekivati da je otapalo MaGlc najučinkovitije za ekstrakciju antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009), prevelika kiselost okoline uzrokovati razgradnju aciliranih antocijana i 3-monozid antocijana zbog reakcije hidrolize (Kapasalakidis i sur., 2006).

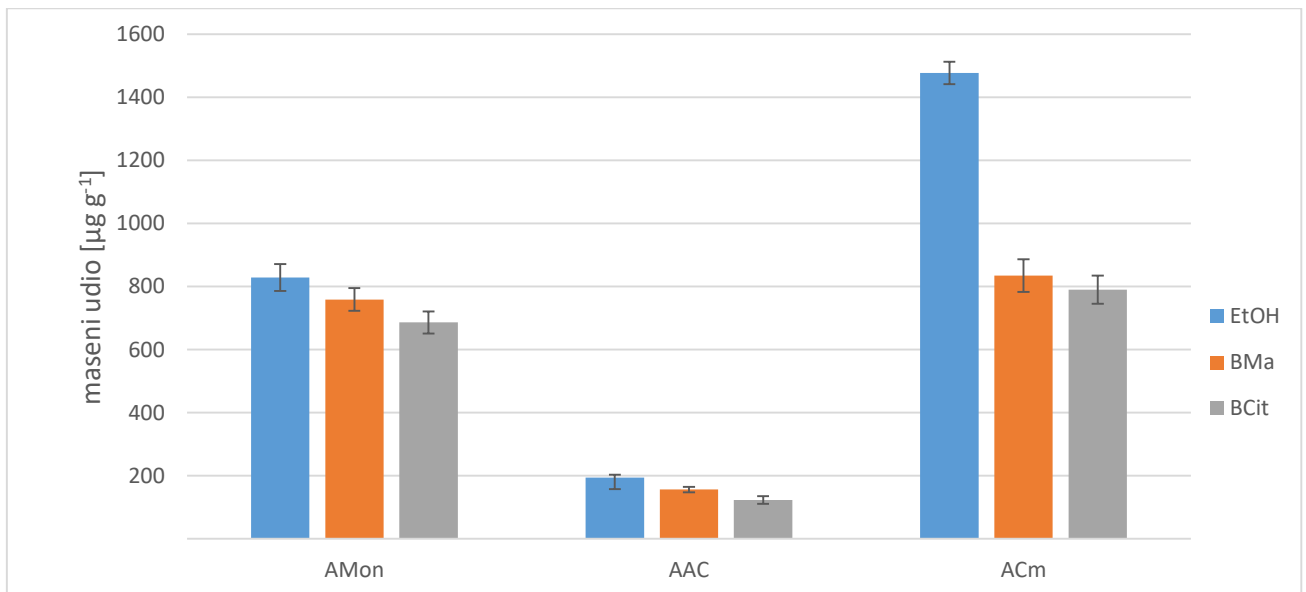
**Tablica 5.** pH vrijednosti pripremljenih eutektskih otapala

NADES	udio vode (%)	pH
BMa	30	3,270
MaGlc	30	0,494
MaGlcGly	30	1,145
ChCit	30	0,931
BCit	30	2,603
ChMa	30	0,670

Na učinkovitost ekstrakcije utječe i polarnost otapala. Polarnost NADES-ova pokriva velik raspon, te se mogu koristiti za ekstrakciju velikog broja spojeva. NADES-ovi koji kao komponente sadrže organske kiseline su najpolarniji, dok su NADES-ovi sa sastavom aminokiselina manje polarni. Najmanju polarnost imaju NADES-ovi koji sadrže šećere i polialkohole (Dai i sur., 2013a). Cvjetko Bubalo i sur. (2016) proveli su istraživanje u kojem je za ekstrakciju antocijana korišteno pet različitih NADES-ova (kolin-klorid:glicerol (ChGly), kolin-klorid:oksalna kiselina (ChOa), kolin-klorid:sorboza (ChSor), kolin-klorid:malična kiselina (ChMa), kolin-klorid:prolin:malična kiselina (ChProMa). Najveća količina ekstrahiranih antocijana postignuta je kako slijedi: ChOa>ChMa>ChMaPro>ChGly>ChSor, tj. najboljim otapalima pokazala su se NADES-ovi ChOa i ChMa, koji sastavu imaju organske kiseline (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Antocijani su polarne molekule pa su bolje topljive u polarnim otapalima prema pravilu "slično se otapa u sličnom" pa se razlika u učinkovitosti ekstrakcije, kako u istraživanju Cvjetko Bubalo i sur. (2016) tako i u ovom radu (slika 5) može objasniti razlikom u polarnosti primijenjenih NADES-ova. Polarnost antocijana ovisi o strukturi odnosno stupnju metilacije B prstena (delfinidin < cijanidin < petunidin < peonidin < malvidin) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Tako je prema istraživanju koje su proveli McCalluma i sur. (2007) u pokožici grožđa kao sastavnici komine odvojeno je 37 antocijana, a identificirano je 25 koristeći LC-MS. Od antocijana identificiranih u komini grožđa, u pet slučajeva se radilo o 3-*O*-monoglukozidima delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina; drugih pet se odnosilo na acetilglukozide navedenih antocijana. Malvidin-3-*O*-monoglukozid je identificiran kao dominantan antocijan (Yu i Ahmedna, 2012).

Radi lakše usporedbe učinkovitosti ekstrakcije antocijana pomoću NADES-ova, rezultati analize provedene korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koji su prikazani na slikama 6-7 prikazani su kao suma antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), suma

antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) te suma antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozida (ACm).

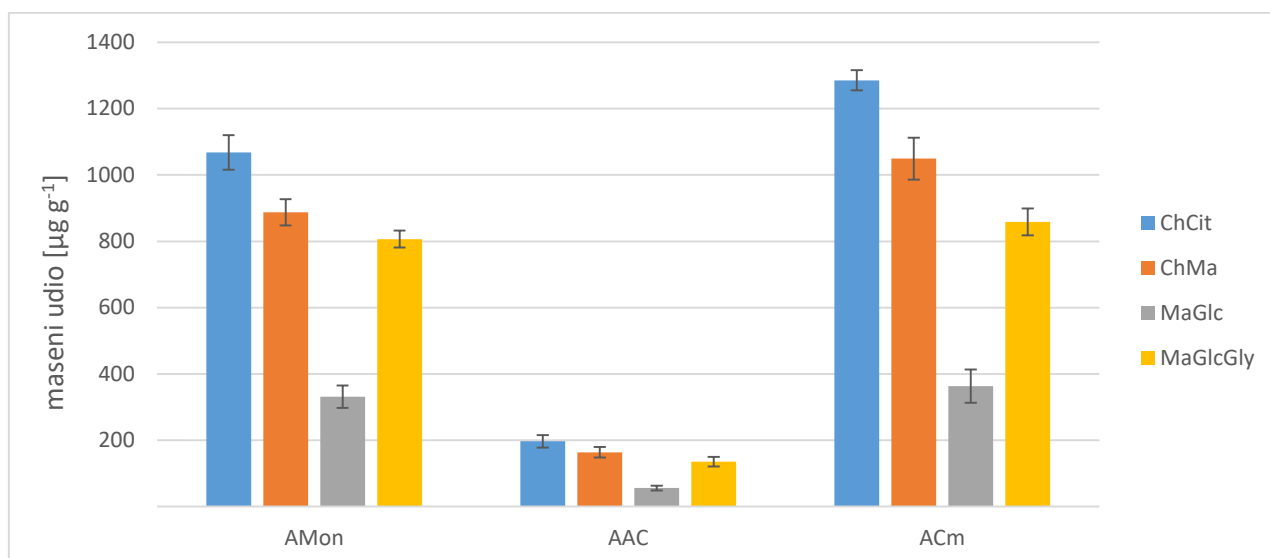


**Slika 6.** Prikaz masenih udijela antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) i antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozida (ACm) u ekstraktima komine grožđa pripremljenih pomoću otapala EtOH, BMa, BCit\*

\*EtOH -ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu (60 % + 0,8 % HCl), BMa -ekstrakt pripremljen korištenjem betain:jabučne kiseline, BCit -ekstrakt pripremljen korištenjem betain:limunske kiseline

Na slici 6 prikazani su rezultati ekstrakcije u zakiseljenom etanolu, betain: jabučnoj kiselini i betain: limunskoj kiselini. Kod svih skupina antocijana kao najbolje otapalo pokazao se zakiseljeni etanol.





**Slika 7.** Prikaz masenih udijela antocijanin-3-*O*-monoglukozi (AMon), antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozi (AAC) i antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi (ACm) u ekstraktima komine grožđa pripremljenih pomoću otapala ChCit, ChMa, MaGlc, MaGlcGly\*

\*ChCit -ekstrakt pripremljen korištenjem kolin-klorid:limunske kiseline, ChMa -ekstrakt pripremljen korištenjem kolin-klorid:jabučne kiseline, MaGlc -ekstrakt pripremljen korištenjem jabučna kiselina:glukoza, MaGlcGly -ekstrakt pripremljen korištenjem jabučna kiselina:glukoza:glicerol

Na slici 7 prikazan je prinos ekstrakcije korištenjem otapala kolin-klorid:limunska kiselina, kolin-klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza:glicerol. Najboljim otapalom za sve skupine antocijana pokazalo se otapalo kolin-klorid:limunska kiselina.

Iz slika 6 i 7 vidi se da je uspješnost ekstrakcije antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi najveća kod svih otapala.

**Tablica 6.** Maseni udjeli antocijana iz ekstrakta uzorka komine grožđa

Maseni udio antocijana [ $\mu\text{g g}^{-1}$ s.tv.]	EtOH	BMa	BCit
delfinidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	60,53±8,43	74,38±6,61	59,22±5,73
petunidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	88,30±14,2	106,53±10,23	88,56±10,99
peonidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	58,94±6	57,05±3,05	43,12±5,43
malvidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	621,13±13,88	521,15±16,19	495,49±12,8
peonidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozi	103,77±0,37	84,38±0,41	67,06±3,31
malvidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozi	90,56±8,31	72,09±8,38	56,66±8,93
cijanidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	146,59±9,48	97,69±15,48	79,43±6,51
peonidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	111,33±12,73	80,64±14,44	64,55±0,93
malvidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	1218,85±13,6	656,09±21,76	645,92±36,97

Tablica 6 prikazuje razrede antocijana ekstrahirane pomoću zakiseljenog etanola, betain:citratne kiseline, betain:jabučne kiseline, i kao najbolje otapalo za ekstrakciju antocijanin-3-*O*-monoglukozi, antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozi, antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi pokazao se EtOH, dok je najlošije otapalo BCit.

**Tablica 7.** Maseni udjeli antocijana iz ekstrakta uzorka komine grožđa

Maseni udio antocijana [ $\mu\text{g g}^{-1}$ s.tv.]	ChCit	ChMa	MaGlc	MaGlcGly
delfinidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	89,98 $\pm$ 9,33	71,86 $\pm$ 4,03	28,53 $\pm$ 6,04	69,90 $\pm$ 4,29
petunidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	132,91 $\pm$ 15,4	110,44 $\pm$ 9,29	42,34 $\pm$ 6,91	103,54 $\pm$ 4,88
peonidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	62,41 $\pm$ 4,77	49,94 $\pm$ 5,86	18,46 $\pm$ 2,92	46,73 $\pm$ 1,55
malvidin-3- <i>O</i> -monoglukozi	782,37 $\pm$ 22,63	655,11 $\pm$ 20,2	241,61 $\pm$ 18	586,33 $\pm$ 14,8
peonidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozi	102,80 $\pm$ 7,34	82,31 $\pm$ 8,42	30,11 $\pm$ 3,82	72,72 $\pm$ 4,21
malvidin-3- <i>O</i> -acetilmonoglukozi	93,89 $\pm$ 11,74	81,12 $\pm$ 7,52	25,58 $\pm$ 3,68	62,72 $\pm$ 10,32
cijanidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	124,57 $\pm$ 4,78	98,68 $\pm$ 9,62	35,99 $\pm$ 7,67	86,41 $\pm$ 1,32
peonidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	100,88 $\pm$ 12,06	80,57 $\pm$ 3,78	27,88 $\pm$ 2,2	68,19 $\pm$ 5
malvidin-3-(6- <i>O-p</i> -kumaroil)monoglukozi	1060,19 $\pm$ 13,49	869,95 $\pm$ 49,71	299,50 $\pm$ 40,46	703,45 $\pm$ 34,19

Iz tablice 7, koja prikazuje razrede antocijana ekstrahirane pomoću kolin-klorid:limunske kiseline, kolin-klorid:jabučne kiseline, jabučne kiseline:glukoza, jabučne kiseline:glukoza:glicerol, vidi se da je najbolje otapalo za ekstrakciju antocijanin-3-*O*-monoglukozi, antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozi, antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi ChCit, dok je MaGlc uvjerljivo najlošije otapalo.

U cjelini, najbolji prinos ekstrakcije postignut je za skupinu antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi i to malvidin-3-(6-*O-p*-kumaroil)monoglukozi (1218,85  $\pm$  13,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.tv.) korištenjem otapala EtOH. Iako je zakiseljeni EtOH kao otapalo najučinkovitije za skupinu antocijanin-3-(6-*O-p*-kumaroil) monoglukozi, za ostale skupine antocijana ChCit je najučinkovitije otapalo, kao i za ekstrakciju ukupnih antocijana. Slično su u svojem istraživanju dokazali Jeong i sur. (2015). DES-ovi na bazi kolin-klorida te donora vodikove veze -limunske kiseline, maltitola, fruktoze ili maltoze korišteni su u ekstrakciji antocijana, a najučinkovitijim otapalom za ekstrakciju ukupnih antocijana pokazalo se otapalo ChCit. Istraživanjem je dokazano da su eutektička otapala sigurna, održiva i učinkovita za ekstrakciju antocijana (Jeong i sur., 2015).

Ovaj rad doprinosi razvoju novih, konkurentnih i ekološki prihvatljivih procesa u ekstrakciji bioloških aktivnih spojeva, s naglaskom na

primjenu prirodnih eutektskih otapala u izolaciji antocijana iz nusprodukta prehrambene industrije – komine grožđa.

## 5.ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Kolin-klorid:limunska kiselina pokazala se kao najbolje otapalo od svih ispitivanih otapala za ekstrakciju ukupnih antocijana.
2. Kolin-klorid:limunska kiselina najučinkovitije je otapalo za ekstrakciju antocijanin-3-*O*-monoglukozi (AMon) i antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozi (AAC)
3. Zakiseljeni etanol je bolje otapalo od najučinkovitijeg NADES-a kolin-klorid:limunske kiseline kod ekstrakcije antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozi (ACm).

## 6.LITERATURA

Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* **7**: 70-71.

Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. *Chemical Society Reviews* **39**: 301–312.

Anonymous 1, Priroda i biljke <<http://www.plantea.com.hr/vinova-loza/>> Pristupljeno 16. kolovoza 2017.

Anonymous 2, High Pressure Processes Group - Encapsulation of polyphenols from grape marc extract using different natural carriers, <<http://hpp.uva.es/encapsulation-of-polyphenols-from-grape-marc-extract-using-different-natural-carriers/>>, pristupljeno 16. kolovoza 2017.

Brunner G., (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* **67**: 21–33.

Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A., i Galán-Vidal C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**: 859–871.

Castro-Puyana M., Marina M. L., Plaza M. (2017) Water as Green Extraction Solvent: Principles and Reasons for its Use. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **5**: 31-36.

Chemat F., Vian M. A., Cravotto G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 8615–8627.

Cravotto G., Cintas P. (2007) The combined use of microwaves and ultrasound: improved tools in process chemistry and organic synthesis. *Chemistry* **13**: 1902-1909.

Cvjetko Bubalo M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., (2015) Green solvents for green technologies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**: 1631-1639.

Cvjetko Bubalo M., Ćurko N., Tomašević M., Kovačević Ganić K., Radojčić Redovniković I., (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry* **200**: 159-166.

Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta* **766**: 61-68.

- Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013b) Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *Journal of Natural Products* **76**: 2162-2173.
- Dai Y., Verpoorte R., Choi Y. H. (2014) Natural deep eutectic solvent provide enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry* **159**: 116-121.
- Han F. L. i Xu Y. (2015) Effect of the Structure of Seven Anthocyanins on Self-association and Colour in an Aqueous Alcohol Solution. *South African Journal of Enology and Viticulture* **36**: 105–116.
- Janiak C. (2013) Ionic Liquids for the Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Zeitschrift für Naturforschung B: Journal of Chemical Science* **68b**: 1059–1089.
- Jeong K. M., Zhao J., Jin Y., Heo S. R., Han S. Y., Yoo D. E., Lee J., (2015) Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research* **38**: 2143-2152.
- Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) „Zelena“ kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kemija u industriji* **53**: 217-224.
- Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**: 4360–4367.
- Kapasakalidis P. G., Rastall R. A. i Gordon M. H. (2006) Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 4016–4021.
- Kudlak B., Owczarek K., Nemiśnik J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review. *Environmental Science Pollution Research* **22**: 11975–11992.
- Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. (2007) Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews* **1**: 7–18.
- Mendes J. A. S., Prozil S. O., Evtuguin D. V., Lopes L. P. C. (2013) Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional, *Industrial Crops and Products* **43**: 25–32.

Monrad J. K., Howard L. R., King J. W., Srinivas K., Mauromoustakos A., (2010) Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 2862–2868.

Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063–1071.

Rombaut N., Tixier A. S., Bily A., Chemat F. (2014) Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining* **8**: 530–544.

Sousa E. C., Uchoa-Thomaz A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M., Lima A., Martins C. G., Alexandrino C. D., Ferreira P. A. T., Rodrigues A. L. M., Rodrigues S. P., Silva J. N., Rodrigues L. L. (2014) Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology* **34**: 135-142.

Teixeira A., Baenas N., Dominguez-Perles R., Barros A., Rosa E., Moreno A. D., Gracia-Viguera C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 15638-15678.

Yu J., Ahmedna M. (2012) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology* **48**: 221–237.

Zhang Q., Oliveira Vigier K., Royer S., Jerome F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108–7146.

Zhao M. (2006), Innovative applications of ionic liquids as “green” engineering liquids. *Chemical Engineering Communications* **193**: 1660-1677.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Ivana Čulo*

---

ime i prezime studenta