

# Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa primjenom prirodnih eutektskih otapala

---

Šango, Marina

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:159:443411>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Marina Šango**

6965/PT

**EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE  
GROŽĐA PRIMJENOM PRIRODNIH EUTEKTIČKIH  
OTAPALA**

**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

**Sveučilište u Zagrebu**

**Završni rad**

**Prehrambeno - biotehnološki fakultet**

**Prediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### **EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE GROŽĐA PRIMJENOM PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA**

***Marina Šango, 0058205591***

**Sažetak:** Komina grožđa kao nusproizvod u proizvodnji vina bogat je izvor polifenolnih spojeva. Polifenolni spojevi imaju pozitivan utjecaj na ljudski organizam prvenstveno zbog antioksidativnog djelovanja te postoji interes za njihovu izolaciju u svrhu dobivanja visokovrijednog proizvoda. Posljednjih godina interes znanstvenika je usmjeren na primjenu prirodnih eutektičkih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva. Za razliku od konvencionalnih otapala, prirodna eutektička otapala su netoksična, nezapaljiva i pokazuju održivost u ekonomskom i ekološkom pogledu. U ovom radu pripremljeno je 6 prirodnih eutektičkih otapala s ciljem pronalaska najučinkovitijeg otapala za ekstrakciju ukupnih antocijana i ukupnih polifenola iz komine grožđa. U zaključku, utvrđeno je da je kolin klorid:limunska kiselina najselektivnije otapalo za ukupne polifenole i ukupne antocijane iz komine grožđa dok je najmanji ekstrakcijski učinak pokazalo otapalo jabučna kiselina:glicerol za ukupne antocijane a jabučna kiselina:glukoza:glicerol za ukupne polifenole.

**Ključne riječi:** antocijani, komina grožđa, polifenoli, prirodna eutektička otapala, zelena ekstrakcija

**Rad sadrži:** 27 stranica, 8 slika, 4 tablice, 46 literaturna navoda

**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:** 08.rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTION CARD

**University of Zagreb**

**Bachelor thesis**

**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**

### **APPLICATION OF NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS IN EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE POMACE**

***Marina Šango, 0058205591***

**Abstract:** Grape pomace is by- product in winemaking and it is rich source of polyphenolic compounds. Polyphenolic compounds have positive impact on human health primarily due to their antioxidant activity and there is an interest in their isolation in order to obtain high-quality product. In recent years, interest of scientists has been focused on application of natural deep eutentic solvents in extraction of polyphenolic compounds. Unlike convention solvents, natural deep eutentic solvents are non-toxic, non-flammable and show enviromental and economic sustainability. In this paper, it was prepared six natural deep eutentic solvents with goal of discovering the most efficient solvent for extraction of total anthocyanins and total polyphenols from grape pomace. In conclusion, it was established that choline chloride:citrate acid was the most selective solvent for total polyphenols and total anthocyanins from grape pomace while the lowest extraction effect showed malic acid:glycerol for total anthocyanins and malic acid:glucose:glycerole for total polyphenols.

**Keywords:** anthocyanins, green extraction, natural deep eutectic solvents, grape pomace, polyphenols

**Thesis contains:** 27 pages, 8 figures, 4 tables, 46 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and digital version is deposited in Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb**

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

**Assistance:** Manuela Panić, mag. ing.

**Thesis defended:** September 8<sup>th</sup> 2017.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Komina grožđa.....	2
2.1.1. Sastav komine grožđa.....	2
2.1.1.1. Polifenolni spojevi.....	2
2.2. Zelena otapala.....	6
2.2.1. Eutektička otapala.....	7
2.2.1.1. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Komina grožđa.....	12
3.1.2. Kemikalije.....	12
3.1.3. Uređaji i oprema.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala.....	13
3.2.2. Priprava ekstrakata komine grožđa.....	14
3.2.3. Određivanje polifenolnih spojeva Folin Ciocalteu reagensom.....	14
3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa dobivenih pomoću eutektičkih otapala.....	17
4.2. Određivanje ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa dobivenih pomoću eutektičkih otapala.....	19
5. ZAKLJUČCI.....	22
6. LITERATURA.....	23

# 1. UVOD

Tijekom proizvodnje vina zaostaje 20% nusproizvoda – komine grožđa koja se sastoji od peteljki, pokožice i sjemenki (El Gengaihi i sur., 2013) i uz to je bogat izvor polifenolnih spojeva, a naročito antocijana pri čemu se ističe malvidin-3-*O*-glukozid. Osim polifenolnih spojeva sadrži vlakna, organske kiseline i ulja iz sjemenki (Nerantzis and Tataridis, 2006) te se njezinom daljnjom obradom može ostvariti dodatna vrijednost proizvodnog procesa i eventualno razviti novi proizvod. Polifenolni spojevi pokazuju izuzetno pozitivna svojstva na ljudsko zdravlje budući da imaju antioksidacijsku aktivnost, antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno djelovanje (Kazazić, 2004).

Zbog velikog potencijala komine grožđa, težilo se je pronalasku metoda izolacije polifenolnih spojeva. Klasične metode ekstrakcije osim što su vremenski dugotrajne iziskuju i velike količine hlapljivih organskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015) i zato se zelena ekstrakcija eutektičkim otapalima nametnula kao logično rješenje. Za razliku od organskih otapala, u sastavu eutektičkih otapala su prirodne komponente kao što su organske kiseline, aminokiseline i šećeri, a ista se smatraju netoksičnima iako je njihov citotoksični i genotoksični učinak još uvijek potrebno istražiti (Paiva i sur., 2014). Eutektička otapala u kemijskom smislu su smjese akceptora vodika kao što je kvartarna amonijeva sol i nenabijenog donora vodika (amina, šećera, alkohola i dr.) u određenom molarnom omjeru (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

U ovom radu pripremljeno je 6 prirodnih eutektičkih otapala (betain:jabučna kiselina, betain:limunska kiselina, kolin - klorid:limunska kiselina, kolin - klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, jabučna kiselina:glukoza) s ciljem pronalaska najselektivnijeg otapala za ekstrakciju ukupnih antocijana i polifenolnih spojeva iz komine grožđa.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Komina grožđa**

U postupku prerade grožđa u proizvodnji vina nakon muljanja i ruljanja grožđa kao nusproizvod zaostaje masulj koji osim groždanog soka sadrži i pokožicu, sjemenke i peteljku. Prešanjem masulja zaostaje suha tvar - komina grožđa koja čini 20 % ukupno prerađenog grožđa (El Gengalhi i sur., 2013). Dakle, na globalnoj razini proizvede se oko 9 milijuna tona komine koju je potrebno adekvatno zbrinuti kako ne bi došlo do nepovoljnog utjecaja na okoliš tim više što komina kao bogat izvor polifenolnih spojeva ima velik biološki potencijal. Iz nje se mogu ekstrahirati ulja i polifenola (pretežno antocijani, flavanoli, flavonoli, resveratrol i fenolne kiseline). Zbog visoke antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva iz komine grožđa, ekstrakti komine grožđa našli su primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Teixeira i sur., 2014).

#### **2.1.1. Sastav komine grožđa**

Uzimajući u obzir pojedinačne frakcije komine grožđa udio sjemenki iznosi od 38 % do 52 % suhe tvari. Sjemenke se sastoje prvenstveno od 40 % vlakana, 16 % esencijalnih ulja, 11 % proteina te 7 % kompleksnih polifenolnih spojeva kao što su tanini. S druge strane pokožica čini 65 % komine te je bogat izvor polifenolnih spojeva čiji sastav ovisi o prethodnom procesu vinifikacije i metodi ekstrakcije (odabiru otapala, temperaturi i vremenu ekstrakcije) (Teixeira i sur., 2014). Peteljka se u najvećoj mjeri sastoji od vlakana prije svega lignina i celuloze i osim toga sadrži visok postotak nutritivno vrijednih minerala kao što je dušik i kalij. Ona se može kompostirati u svrhu dobivanja visokokvalitetnog gnojiva za agronomske potrebe i pogodna je za vinogradska tla s malom količinom organskog materijala (Nerantzis i Tataridis, 2006).

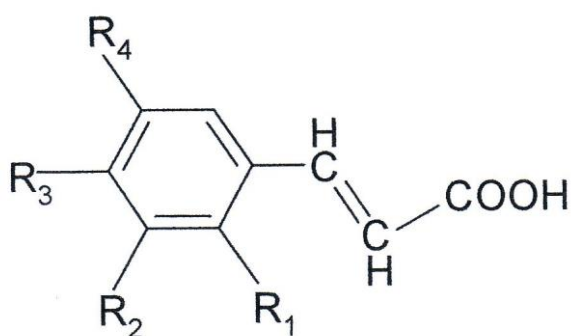
##### **2.1.1.1. Polifenolni spojevi**

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji utječu na senzorska svojstva (boja, miris, tekstura i okus), a strukturno su aromatski spojevi na koje je vezana jedna ili više OH - skupina i predstavljaju široku skupinu spojeva od najjednostavnijih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998; Belasundram i sur., 2006). Oni su najčešće konjugirani s mono i polisaharidima vezanima za jednu ili više fenolnih grupa ali se pojavljuju i u obliku funkcionalnih derivata kao što su esteri i metil esteri (Belasundram i sur., 2006). Polifenolni spojevi imaju i funkciju antioksidansa koji se vežu na slobodne radikale tako da doniraju elektron ili vodikov atom. Konjugiranost sustava i stupanj

hidroksilacije doprinose njihovoj visokoj antioksidacijskoj aktivnosti (Tsao, 2010). Glavne skupine polifenolnih spojeva su flavonoidi, fenolne kiseline, tanini, stilbeni i lignini (Belasundram i sur., 2006).

Fenolne kiseline se dijele na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve pri čemu hidroksicimetne čine veći dio nusproizvoda u vinskoj industriji (Teixeira i sur., 2014). Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina raste sa stupnjem hidroksilacije kao što je slučaj s trihidroksiliranom galnom kiselinom. Međutim, supstitucija hidroksilne skupine s metoksilnom na 3- i 5- položaju smanjuje aktivnost. Također, monohidroksibenzojeve kiseline s –OH skupinom u *ortho*- i *para*- položaju ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost za razliku kad je –OH skupina u *meta*- položaju (Rice-Evans i sur., 1996).

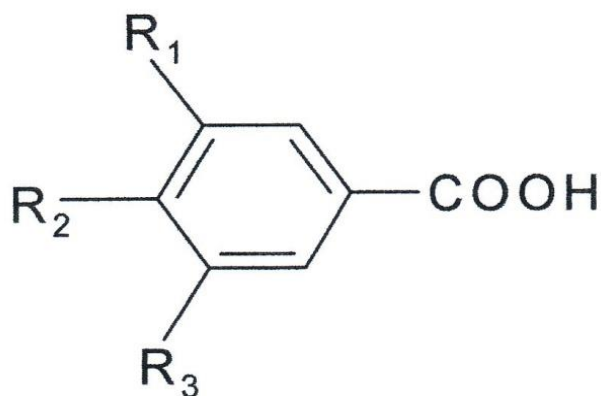
Hidroksicimetne kiseline (slika 1) imaju C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturu. Najčešće se javljaju u konjugiranom obliku odnosno u obliku glikoziliranih derivata ili estera kininske, šikiminske ili pak tartarne kiseline. Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima grožđa s tim da je najveća koncentracija izmjerena u pokožici grožđa. One za razliku od hidroksibenzojevih imaju veću antioksidacijsku aktivnost i to zahvaljujući CH=CH-COOH skupini koja omogućava veću mogućnost doniranja vodikova atoma i stabilizaciji radikala od COOH kod hidroksibenzojevih. (Rice-Evans i sur., 1996).



**Slika 1.** Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)

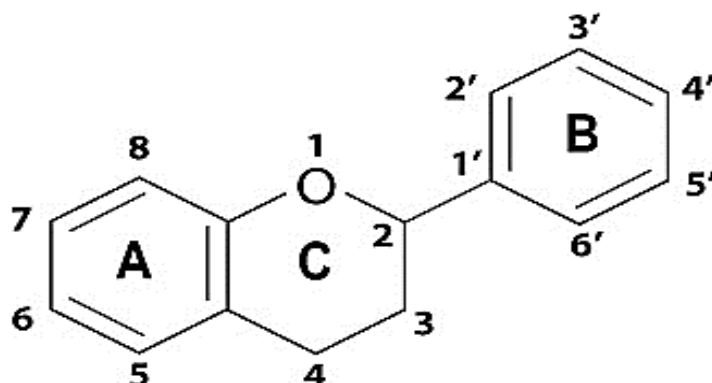
Hidroksibenzojeve kiseline imaju C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> strukturu što je vidljivo na slici 2. Ovoj skupini pripadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina (Bravo, 1998). Galna kiselina je najzastupljeniji derivat hidroksibenzojevih kiselina u sjemenkama, peteljci i pokožici grožđa a nju odmah slijedi siringinska, koja dominira u peteljci, i protokatehinska u sjemenkama (Di Lecce i sur., 2014; Teixeira i sur., 2014).





**Slika 2.** Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

Flavonoidi (slika 3) su niskomolekularni spojevi s 15 C atoma koji sadrže difenilpropanski kostur povezan s piranskim prstenom u sredini (Pietta, 2000). Flavonoidi se razlikuju s obzirom na povezanost B i C prstena ali i stupanj nezasićenosti, stupanj oksidacije i broj i položaj OH skupine u C prstenu pa se zato i dijele na flavonole, flavone, flavanone, izoflavone, flavanole i antocijane (He i Giusti, 2010; Ignat i sur., 2011).



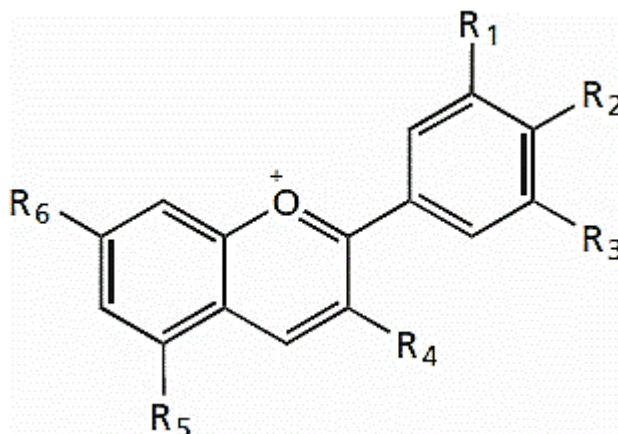
**Slika 3.** Kemijska struktura flavonoida (Lillo i sur., 2008)

Flavonole karakterizira prisutnost dvostruke veze između  $C_2$  i  $C_3$  i hidroksilna skupina na poziciji 3 (Teixeira i sur., 2014). Oni mogu reagirati s antocijanima u cilju nastajanja stabilnijih pigmenata i s fenolnim kiselinama pri čemu doprinose kopigmentaciji (Shrikhande, 2000). Fitokemijski profil komine je prilično jednostavan, s kvercetin-3-O-glukoronidom kao dominantnim spojem (Teixeira i sur., 2014).

Flavoni se od flavanola razlikuju po odsutnosti hidroksilne skupine, a koncentracija u komini grožđa je niska, s iznimkom luteolina (Garrido i Borges, 2013; Teixeira i sur., 2014). Flavanoli ili flavan-3-oli se odlikuju hidroksilnom skupinom na  $C_3$  položaju i nemaju karbonilnu skupinu na  $C_4$ . Uspoređujući koncentraciju flavan-3-ola u različitim dijelovima komine ustanovljeno je da katehin dominira i u bijelom i u crnom grožđu pri čemu znatno

više dopinosi sastavu peteljki nego sjemenki i pokožice (Teixeira i sur., 2014). Flavanoni se od prijašnjih skupina razlikuju po ketonskoj grupi na C<sub>4</sub> i hidroksilnoj na poziciji C<sub>3</sub> (Ignat i sur., 2011).

Daleko najvažniju skupinu spojeva u komini crnog grožđa čine antocijani, (slika 4) topljivi pigmenti u vodi, koji se nalaze u staničnom soku i vakuolama i daju crveno, plavo i ljubičasto obojenje ovisno o pH vrijednosti (Ignat i sur., 2011), ali u nešto manjoj mjeri i o stupnju hidroksilacije, metilaciji aromatskih prstenova, glikolizaciji i odnosu šećer : acilirani šećer (Tsao, 2010). Njihova temeljna struktura bazira se na 2-benzil-1-benzopirilijevu kationu koji je hidroksiliran na položajima 3, 5, 7 i 4' (Tsao i McCallum, 2009). Antocijani se najčešće nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čine antocijanidin i šećer (uglavnom se radi o monosaharidima poput glukoze, galaktoze, ramnoze i arabinoze) (Castaneda-Ovando i sur., 2009), a međusobno se razlikuju po broju hidroksilnih skupina, prirodi i broju šećera vezanih na njihovu strukturu, alifatskom ili aromatskom karboksilu vezanom na šećer u molekuli i položaju ovih veza (Kong i sur., 2003; Castaneda-Ovando i sur., 2009). U komini grožđa najzastupljeniji antocijan je malvidin-3-*O*-glukozid a odmah iza njega slijedi peonidin-3-*O*-glukozid (Teixeira i sur., 2014).



**Slika 4.** Osnovna struktura antocijana (Anonymous 1, 2009)

Osim fenolnih kiselina koje isto pripadaju grupi neflavonoidnih spojeva tu se nalaze još i stilbeni, tanini i lignini.

Stilbeni su mala skupina fenilpropanoida koji imaju 1,2-difeniletilenski kostur. Većina stilbena pronađena u grožđu pripada derivatima *trans*-resveratrola (Chong i sur., 2009).

Tanini su visokomolekularni spojevi topljivi u vodi koji se dijele na kondenzirane i hidrolizirane tanine. Kondenzirani tanini ili proantocijanidini koji su uobičajeni spojevi u komini sastoje se od monomernih podjedinica flavan-3-ola, katehina, epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehina (Souquet i sur., 1996), a naziv su dobili zbog nastanka antocijana njihovim oksidativnim cijepanjem.

Lignani su fitoestrogeni prisutni u sjemenkama, žitaricama, uljima a nešto manje u proizvodima od grožđa kao aglikoni, glikozidi, esterificirani glikozidi ili bio-oligomeri (Gerstenmeyer i sur., 2013), a sastoje se od međusobno spojene dvije fenilpropanoidne jedinice vezane između  $\beta$ - položaja u bočnim lancima (Willfor i sur., 2006).

## 2.2. Zelena otapala

Napredak ljudskog razvoja očituje se i u razumnom raspolaganju prirodnim resursima Zemlje pri čemu se podrazumijevaju neobnovljivi izvori kao što je nafta, ali i čista voda, zrak i dr. Sve više istraživanja usmjereno je k pronalaženju novih rješenja usmjerenih na upotrebu alternativnih izvora energije, a posebni se naglasak stavlja na održivost procesa. Zelena kemija ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje (Kudlak i sur., 2015).

Kao sve važnije polje zelene kemije ističe se zelena ekstrakcija čiji cilj je otkriće novih ekstrakcijskih procesa koji smanjuju potrošnju energije te primjenu alternativnih otapala iz obnovljivih prirodnih izvora i dr. (Chemat i sur., 2012). Alternativnim otapalima nastoje se zamijeniti hlapljiva organska otapala koja su štetna za okoliš i ljude koji njima rade (Paiva i sur., 2014).

Kemičari P. Anastas i J. Warner su osmislili 12 principa na kojima se temelji zelena kemija te su njima određeni i kriteriji koje trebaju imati alternativna, zelena otapala što je vidljivo u tablici 1 (Gu i Jerome, 2013).

**Tablica 1.** Kriteriji idealnog otapala (Gu i Jerome, 2013)

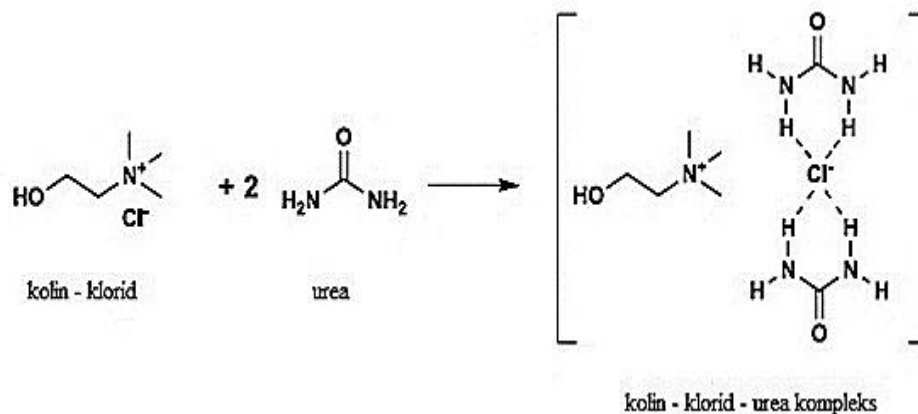
<b>Br.</b>	<b>Kriterij</b>
<b>1.</b>	Dostupnost
<b>2.</b>	Niska cijena
<b>3.</b>	Mogućnost reciklacije
<b>4.</b>	Čistoća; u cilju izbjegavanja pročišćavanja

<b>5.</b>	Sinteza; energetski učinkovit proces
<b>6.</b>	Netoksičnost
<b>7.</b>	Biorazgradivost; razgradnjom ne smiju nastajati toksična metaboliti
<b>8.</b>	Učinkovitost
<b>9.</b>	Stabilnost; termički i elektro (mehanički)
<b>10.</b>	Nezapaljivost
<b>11.</b>	Jednostavnost skladištenja i transporta
<b>12.</b>	Obnovljivost

### 2.2.1. Eutektička otapala

Eutektička otapala (eng. *Deep Eutentic Solvents*, DES), smjese vodikova akceptora kao što je netoksična amonijeva sol i nenabijenog vodikovog donora (amini, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline), su nova generacija alternativnih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). U tablici 2 mogu se vidjeti najčešći tipovi eutektičkih otapala i moguće kombinacije spojeva koji ih tvore. Mogućnost doniranja i primanja protona i elektrona omogućuje im stvaranje vodikove veze i na taj način se povećava kapacitet otapanja (Paiva i sur., 2014). Zbog sličnih fizikalno–kemijskih svojstava i velikog broja mogućih struktura eutektična otapala svrstavaju se u četvrtu generaciju ionskih kapljevina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015) iako je upitno mogu li se smatrati ionskim kapljevinama obzirom da su sastavljena od neutralnih molekula povezanih vodikovim vezama. Neke od prednosti uporabe eutektičkih otapala su uporaba jeftinih komponenti, jednostavna priprema, slaba ili neznatna toksičnost i održivost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Njihova točka tališta je znatno niža od bilo kojeg pojedinačnog organskog spoja koji čini smjesu. Kao primjer je smjesa dvije krutine: uree ( $T_M=133\text{ °C}$ ) i kolin klorida ( $T_M=302\text{ °C}$ ) u molarnom omjeru 2:1 (slika 5), a temperatura tališta navedenog eutektičkog otapala je  $12\text{ °C}$  (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Kudlak i sur.,

2015). Usprkos mnogobrojnim prednostima kao njihov najveći nedostatak ističe se visoka viskoznost (0,2 – 0,5 Pa s na 40 °C) (Dai i sur., 2013b) koja je posljedica jakih unutarmolekularnih interakcija (mreža vodikovih veza i Van der Waalsove inerakcije) koje smanjuju pokretljivost slobodnih molekula DES-a (Zhang i sur., 2012).



**Slika 5.** Priprava eutektičkog otapala kolin klorid:urea (1:2) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016b)

**Tablica 2.** Tipovi eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

TIP	OPIS	PRIMJER
Tip 1	metal + organska sol	ZnCl <sub>2</sub> + kolin klorid
Tip 2	hidrat metalna sol + organska sol	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O + kolin klorid
Tip 3	donor vodikove veze + organska sol	Kolin klorid + urea
Tip 4	donor vodikove veze + metalna sol	MCl <sub>x</sub> +urea/etilen glikol/acetamid

Prirodna eutektička otapala (eng. Natural Deep Eutentic Solvents, NADES) baziraju se na prirodnim komponentama, primarnim metabolitima kao što su šećeri (glukoza, fruktoza i dr.), organske kiseline (limunska, jabučna, mliječna i dr.), polialkoholi i kvaterne amonijeve soli (npr. kolin - klorid). Nalaze se u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi i ponekad i pri temperaturama nižim od 0°C, imaju podesivu viskoznost, održivi su i mogu otapati i polarne i nepolarne metabolite. Mogu se koristiti u čistom obliku ili s određenim postotkom vode s tim da su nepolarne komponente bolje topive u čistom NADES-u. Prirodna eutektička otapala pokazuju niz prednosti uključujući nisku cijenu, niski toksikološki profil, lako dostupne komponente te jednostavnu sintezu (Owzcarek i sur., 2016; Paiva i sur., 2014). Netoksična i jeftina amonijeva sol kolin klorid je najčešće korištena komponenta u smjesi NADES-a kao nabijeni akceptor vodika a te se je našla u širokoj upotrebi u kombinaciji s spojevima koji imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza (Kudlak i sur., 2015).

Stabilnost NADES-a ovisi o molarnom omjeru pojedinih komponenti od kojih se NADES sastoji. Primjerice, u slučaju otapala kolin klorid:glukoza, kod omjera 2:5 NADES je stabilan međutim kod omjera 2:1, 1:1 ili 1:4 s vremenom se u otapalu pojavljuje kristalični talog. To se događa zato što kloridni ion iz kolin klorida tvori dvije vodikove veze sa dvije OH skupine šećera a sličnu pojavu vidimo i kad je u pitanju smjesa kolin klorida s karboksilnom kiselinom. Stabilnost NADES-a također ovisi o broju vodikovih veza koje NADES može tvoriti, njihovoj poziciji kao i prostornoj strukturi. Primjerice, veću stabilnost pokazuju otapala šećera s limunskom kiselinom nego ona s jabučnom kiselinom budući da limunska kiselina ima karboksilnu skupinu više u odnosu na jabučnu a samim time i mogućnost stvaranja većeg broja vodikovih veza (Dai i sur., 2013a). Popescu i Constantin (2014) su objasnili stabilnost NADES-a na temelju prostorne strukture. Naime, ispitivali su stabilnost kolin klorid u kombinaciji s limunskom kiselinom i s malonskom kiselinom. Ustanovili su da eutektičko otapalo s limunskom kiselinom nakon nekog vremena gubi na stabilnosti budući da nastaje gusti gel. S druge strane otapalo kolin klorida s malonskom pokazuje veću stabilnost duže vrijeme. Uzrok tome vidimo u kemijskoj strukturi limunske kiseline koja je donor tri protona dok je malonska donor dva protona (Popescu i Constantin, 2014; Cvjetko Bubalo i sur., 2016b).

#### 2.2.1.1. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva

Usprkos tome što su organska otapala pokazala izvrsnu sposobnost otapanja i ekstrakcije polifenolnih spojeva, svojstvo zapaljivosti i visoke toksičnosti rezultiralo je

usmjerenjem pažnje znanstvenika na razvoj novih metoda ekstrakcije koje uključuju alternativna otapala bezopasna za okoliš kao što su eutektička otapala.

To je navelo Peng i sur. (2016) da ispituju potencijal 12 različitih DES-ova baziranim na kolin kloridu, oksalnoj kiselini i mliječnoj kiselini radi ekstrakcije klorogenske kiseline (5-CQA), kafeinske kiseline (CA), 3,5-dikafeoilkininske kiseline (3,5-DCQA), 3,4-dikafeoilkininske kiseline (3,4-DCQA) i 4,5-dikafeoilkininske kiseline (4,5-DCQA) iz *Lonicerae japonicae*. Istraživanje je pokazalo da učinkovitost ekstrakcije ovisi o molarnom odnosu komponenata koje tvore prirodno eutektičko otapalo. Također, učinkovitost ekstrakcije ovisi i o udjelu vode u NADES-u. Peng i sur. (2016) su utvrdili da se iskorištenje ekstrakcije povećalo za faktor 1,6-3,6 sa dodatkom 10 % vode u NADES (Peng i sur. 2016).

Jeong i sur. (2015) su ispitivali ekstrakciju antocijana iz komine grožđa i pritom su koristili 10 DES-ova baziranih na kolin kloridu u kombinaciji s različitim vrstama donora vodikove veze kao što su karboksilne kiseline (D – jabučna kiselina, L – jabučna kiselina, limunska kiselina), šećerni alkoholi (glicerol, maltitol), monosaharidi (D(-)- glukoza, D(-)- fruktoza, D(-)- galaktoza, D(-)- riboza) i disaharidi (saharoza, D(+)- maltoza). Utvrdili su da kombinacije kolin klorida s limunskom kiselinom, maltitolom, fruktozom i D(+)- maltozom ekstrahiraju veće količine ukupnih antocijana u usporedbi s MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) te se može zaključiti da učinkovitost ekstrakcije ovisi i o sastavu NADES-a (Jeong i sur., 2015).

Prilikom određivanja najpogodnijeg otapala za ekstrakciju, viskoznost predstavlja jedan od najvažnijih parametara. Naime, veličina molekula, molarni omjer, udio vode i temperatura mogu znatno utjecati na povećanje viskoznosti što smanjuje fluidnost rezultirajući slabijim ekstrakcijskim učinkom. Fluidnost se može objasniti i „teorijom rupa“ koja pretpostavlja da prilikom taljenja ionski spoj sadrži prazne prostore koji nastaju zbog termičkih fluktuacija u gustoći. Prema tome, viskoznost je povezana sa slobodnim volumenom i mogućnosti pronalaska praznina odgovarajuće veličine u koje bi se mogle smjestiti molekule namijenjene otapanju. Ona se može smanjiti povećanjem temperature npr. povećanjem temperature s 20 °C na 40 °C viskoznost otapala kolin klorid/glukoza/voda smanji se za 2-3 puta. Osim viskoznosti, polarnost je još jedan važan parametar DES-ova. DES-ovi bazirani na organskim kiselinama su najpolarniji a slijede ih oni bazirani na aminokiselinama i šećerima dok su DES-ovi bazirani na alkoholima pokazali najmanju polarnost. Primjerice, za ekstrakciju polarnijih spojeva, kao što su polifenolnih spojevi, kao najselektivniji DES-ovi pokazat će se oni bazirani na organskim kiselinama zbog slične polarnosti. Na polarnost otapala moguće je utjecati dodatkom vode koja ukoliko je dodana

u većoj količini uzrokuje pucanje vodikovih veza i na taj način mijenja početnu strukturu DES-a (Ramos-Ruegas i sur., 2016).

Osim odabira otapala, bitan je odabir odgovarajuće metode i uvjeta ekstrakcije. Posljednjih godina, u ekstrakciji polifenolnih spojeva sve više se koriste ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija ultrazvukom, ekstrakcija zagrijavanjem i ekstrakcija potpomognuta enzimima. Korištenje ovih metoda ekstrakcije dovelo je do smanjenja volumena otapala, cijene ekstrakcije te vremena potrebnog za ekstrakciju (Ramos Ruegas i sur., 2016). To je potaknulo Cvjetko Bubalo i sur. (2016a) da usporede učinak dviju spomenutih metoda ekstrakcije, ekstrakciju mikrovalovima i ekstrakciju ultrazvukom, prilikom ekstrakcije antocijana i flavanola iz pokožice grožđa. U njihovom istraživanju ekstrakcija je u oba slučaja provedena u istom temperaturnom (30-90 °C) i vremenskom rasponu (15-90 min). Međutim, ispitivanjem tih dviju metoda utvrđeno je ekstrakcija ultrazvukom postiže veća iskorištenja navedenih spojeva u odnosu na ekstrakciju mikrovalovima (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a). Unatoč tome, ne treba zanemariti činjenicu da ultrazvučni valovi uzrokuju i degradaciju polifenolnih spojeva i proizvodnju slobodnih radikala. S druge strane ekstrakcija mikrovalovima pogoduje DES-ovima s obzirom da polarna otapala imaju veću dielektričnu konstantu od nepolarnih i prema tome mogu mogu apsorbirati veću količinu energije mikrovalova (Ramos i Ruegas i sur., 2016).

Dakle, ekstrakcija ovisi o više procesnih parametara koje je nužno uskladiti zajedno s uvjetima ekstrakcije i odabirom odgovarajuće metode u cilju postizanja najučinkovitije ekstrakcije s najvećim iskorištenjem ekstrahiranih spojeva.



## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. Materijali**

#### 3.1.1. Komina grožđa

U radu se koristila liofilizirana i usitnjena komina grožđa sorte Plavac mali.

#### 3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda, PBF
- Etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Folin – Ciocalteau, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glicerol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glukoza, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin klorid (98 %), Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD
- Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Limunska kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol, Merck, Dormstadt, Njemačka
- Mravlja kiselina (98-100%), T.T.T.
- Natrijev hidrogensulfit (15 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat (75 %)

#### 3.1.3. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Büchnerov lijevak
- Epruvete Falcon, 50 mL
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, pipete, tikvice s okruglim dnom, stakleni lijevak, odsisna boca)
- Laboratorijska tresilica, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Mikrofilter
- Mikropipete (100  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL )
- Papirnate lađice za vaganje
- Stalak za epruvete

- Ultrazvučna kupelj, Sonorex, Bandelin electronic, Njemačka
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYS™10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Prirodna eutektička otapala su sintetizirana dodatkom preračunate količine komponenata prema molarnim omjerima (tablica 3) u tikvicu s okruglim dnom uz dodatak 30 % (v/v) vode. Tikvica s reakcijskom smjesom je stavljena na magnetsku miješalicu gdje je pri 50 °C miješana tijekom 2 sata sve dok nije nastala homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Zatim su pripremljena otapala zatvorena parafilmom te skladištena na tamnom mjestu do korištenja za biokatalizu. Svakome od pripremljenih NADES-ova izmjerena je pH vrijednost pomoću multimetra pH/ion meter S220, Mettler Toledo pri temperaturi od 0-100 °C.

**Tablica 3.** Prirodna eutektička otapala korištena u radu

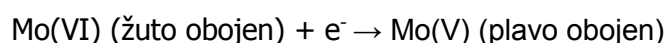
<b>Prirodno eutektičko otapalo</b>	<b>Molarni omjer</b>	<b>Kratice</b>
Betain:jabučna kiselina	1:1	BMa
Betain:limunska kiselina	1:1	BCit
Kolin klorid:limunska kiselina	2:1	ChCit
Jabučna kiselina:glukoza:glicerol	1:1:1	MaGlcGly
Kolin klorid:jabučna kiselina	1:1	ChMa
Jabučna kiselina:glukoza	1:1	MaGlc

### 3.2.2. Priprava ekstrakata komine grožđa

Na analitičkoj vagi izvagano je 0,3 g komine grožđa te je dodano 10 mL prirodnog eutektičkog otapala s 30 % vode (tablica 3). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji (250 W/50-60 Hz) Na 60 °C, 60 min. Nakon ekstrakcije, ekstrakt se centrifugira 15 min pri 5000 o min<sup>-1</sup>. Pošto centrifugiranjem nije odvojena sva komina, filtrat se dodatno pročišćava vakuum-filtracijom uz upotrebu mikrofiltera (0,22 µm). Nakon filtracije, ekstrakti su čuvani na +4 °C do daljnje analize.

### 3.2.3. Određivanje polifenolnih spojeva Folin Ciocalteu reagensom

Folin Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Nastali intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva. Tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Singleton i sur., 1999).



#### *Postupak određivanja*

Pripremljeni ekstrakti komine grožđa razrijeđeni su 50 puta destiliranom vodom. U epruvetu se otpipetira 0,25 mL razrijeđenog uzorka te se doda 1,25 mL FC reagensa. Nakon 5 min na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g L<sup>-1</sup>) te se otopina termostatira u vodenoj kupelji 5 min pri 50 °C. Reakcija se brzo zaustavi u hladnoj kupelji. Na UV/VIS spektrofotometru mjeri se apsorbancija pri λ=760 nm (Singleton i sur., 1999).

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda galne kiseline kao najzastupljenijeg polifenola u komini grožđa. Priredi se otopina standarda galne kiseline koncentracije 500 mg L<sup>-1</sup> te njena razrjeđenja koncentracija 10, 20, 30, 40 i 50 mg L<sup>-1</sup>. Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nanesu se na ordinatu koordinatnog sustava a koncentracije galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>) nanesu se na apcisu. Pomoću računala nacrtat će se baždarni pravac. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima.

### *Izračunavanje*

Ukupni polifenolni spojevi se računaju kao ekvivalent galne kiseline prema jednadžbi baždarnog pravca:

$$Y = ax + b \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

x – koncentracije galne kiseline (mg mL<sup>-1</sup>)

### 3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Metoda za određivanje ukupnih antocijana temelji se na činjenici da se hidrogensulfitni ion veže na 2' položaju i prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Paralelni uzorak istovremeno se tretira destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka (Riberreau – Gayon i Stonestreet, 1966).

#### *Postupak određivanja*

U epruvetu se dodaje 100 µL uzorka, 100 µL etanola (96 %) s 0,1 % klorovodične kiseline i 2 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Otopini uzorka u jednoj paraleli dodaje se 400 µL destilirane vode, a u drugoj 400 µL 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata. Nakon 15 min u obje otopine se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm.

Rezultati se izražavaju kao mg antocijana po g suhe tvari (s.tv.) uzorka:

$$Ac = 875 * (D1 - D2) \quad [2]$$

pri čemu je:

Ac – maseni udio antocijana u uzorku (mg L<sup>-1</sup> s.tv.)

875 – faktor preračunavanja

D<sub>1</sub> - apsorbancija uzorka s destiliranom vodom

D<sub>2</sub> - apsorbancija uzorka s 15 % otopinom natrijevog hidrogensulfata

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

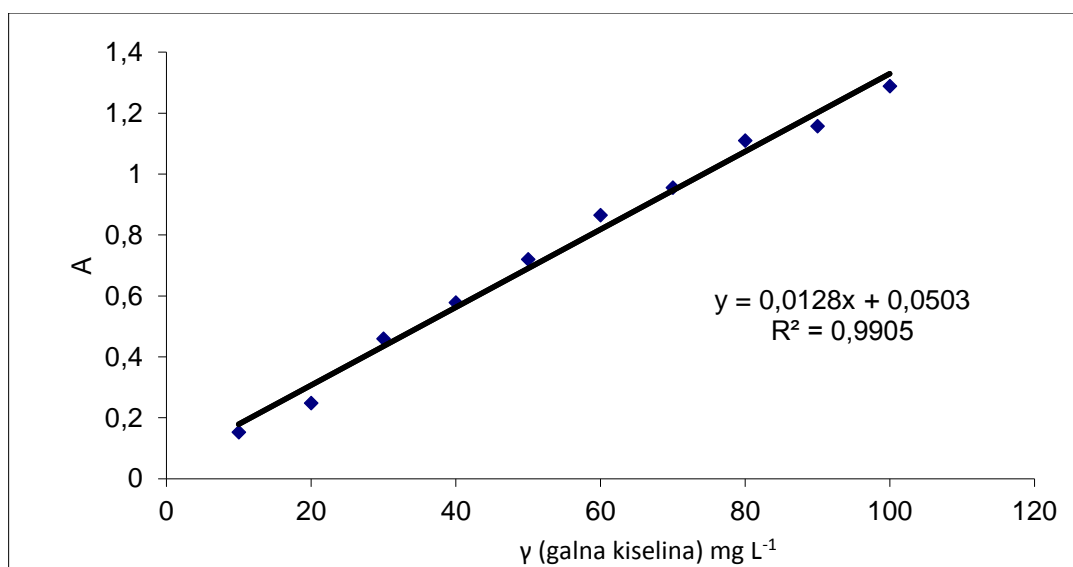
Razvoj zelene kemije predstavlja jedno od revolucionarnih otkrića 21. stoljeća u cilju zaštite okoliša i potrošača, a istodobno povećanja konkurentnosti industrija za prihvaćanjem ekonomičnijih, inovativnijih i ekoloških rješenja (Chemat i sur., 2012). Interes znanstvenika se zato usmjerio na pronalaženje novih, alternativnih otapala koja bi zamijenila toksična i hlapljiva organska otapala. U fokusu njihovih istraživanja našla su se prirodna eutektička otapala koja pripadaju novoj generaciji zelenih otapala. U literaturi je dostupan velik broj istraživanja primjene NADES-ova u ekstrakciji polifenolnih spojeva te se navodi da se optimiranjem njihovih svojstava (viskoznost, temperatura i polarnost) povećava ekstraktibilnost u odnosu na konvencionalna otapala poput etanola i vode (Paiva i sur., 2014). Osim toga izuzetna stabilnost polifenolnih spojeva u NADES-u baziranom na šećerima omogućuju njihovu eventualnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Cvjetko i sur., 2016a).

U ovom radu je ispitana mogućnost ekstrakcije 6 prirodnih eutektičkih otapala (betain:jabučna kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glicerol, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:limunska kiselina, betain:limunska kiselina) s ciljem pronalaženja najselektivnijeg otapala za ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva i ukupnih antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali. Otapala su pripremljena uz dodatak 30 % vode budući da se dodatkom vode smanjuje viskoznost otapala što omogućuje bolji prijenos mase između otapala i krutine a posljedično i bolje iskorištenje reakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a). Osim postotka vode, na viskoznost izravno utječe i temperatura (Dai i sur., 2013) pa je ekstrakcija komine grožđa provedena pri  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  s ciljem smanjenja viskoznosti i učinkovitije ekstrakcije. Međutim, neophodno je da se temperatura održava u rasponu od  $50 - 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  s obzirom da visoke temperature uzrokuju termičku razgradnju polifenolnih spojeva (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a).

Ukupni polifenolni spojevi su određeni u reakciji s Folin – Ciocalteu kao reagensom, a ukupni antocijani određeni su u reakciji vezanja hidrogensulfidnog iona na 2' položaj pri čemu se crveno obojeni kation prevodi u bezbojnu leuko bazu.

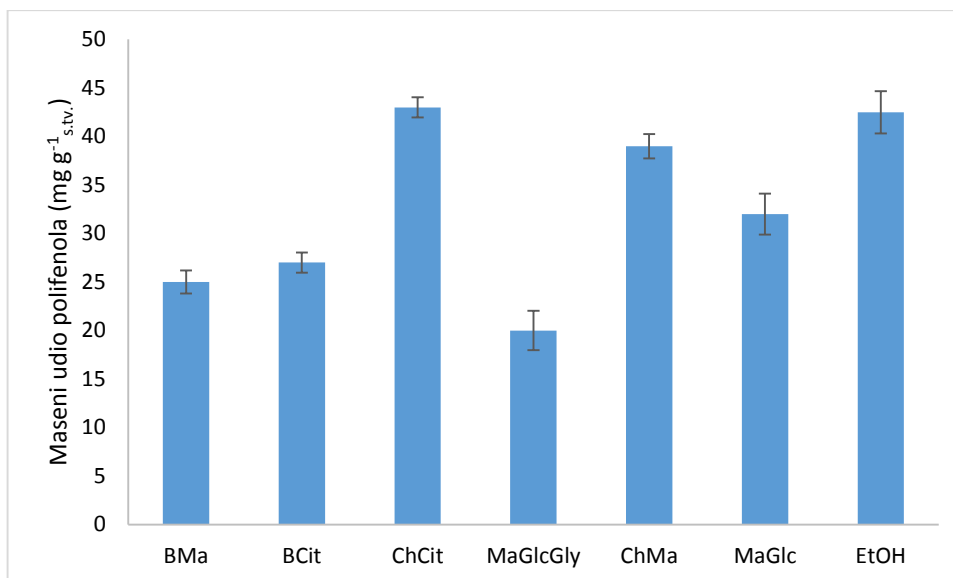
#### 4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima kome grožđa dobivenih pomoću eutektičkih otapala

Ukupni polifenolni spojevi u ekstraktima pripremljenima s prirodnim eutektičkim otapalima su određeni Folin-Ciocalteu reagensom a dobiveni rezultati su izraženi kao mg galne kiseline po gramu suhe tvari, uz galnu kiselinu kao standard. Na slici 6 nalazi se baždarni pravac koji predstavlja ovisnost koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) o apsorbanciji (nm).



**Slika 6.** Baždarni pravac galne kiseline

Ekstrakcija polifenolnih spojeva provedena je na  $60^\circ \text{C}$  u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 1 h. Djelovanjem kavitacije došlo je do bubrenja a zatim i razaranja staničnih stijenki biljnog materijala što je omogućilo veće prodiranje otapala u materijal a samim time i veći prijenos mase. Ultrazvučna metoda ekstrakcije ima velik potencijal primjene budući da skraćuje vrijeme ekstrakcije i smanjuje količinu upotrijebljenog otapala (Drmić i Režak Jambrak, 2010).



**Slika 7.** Maseni udjeli polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa, \*, \*\*

\*rezultati su srednja vrijednost ± S.D (n= 3), s.tv.= suha tvar

\*\* BMa= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:jabučna kiselina, BCit= ekstrakt pripremljen u otapalu betain: limunska kiselina, ChCit= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin klorid:limunska kiselina, MaGlcGly= ekstrakt pripremljen u otapalu jabučna kiselina:glukoza:glicerol, ChMa= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin klorid:jabučna kiselina, MaGlc= ekstrakt pripremljen u otapalu jabučna kiselina:glukoza, EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu

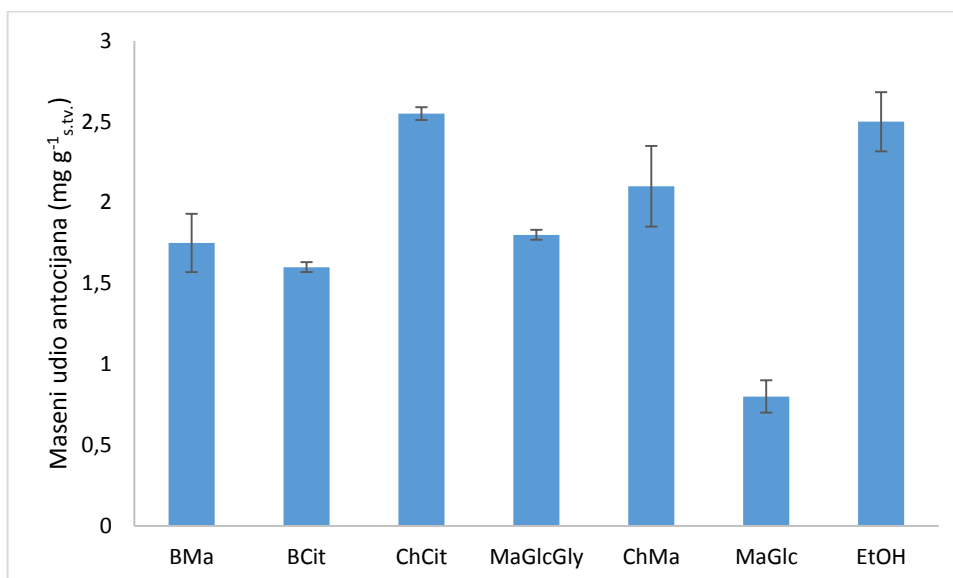
Na temelju dobivenih rezultata (slika 7) može se utvrditi da je otapalo ChCit pokazalo najbolji ekstrakcijski učinak ( $43,00 \pm 1,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) kod ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine grožđa. Također, može se ustanoviti da je s zakiseljenim (70 %, v/v) etanolom ekstrahirana približno jednaka količina polifenolnih spojeva ( $42,50 \pm 2,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) kao i s otapalom ChCit. Unatoč tome što postiže veći ekstrakcijski učinak od ostalih NADES-ova, etanol se nastoji zamijeniti s više ili jednako učinkovitim ali ekološki prihvatljivijim otapalima. Otapalo BCit je selektivnije ekstrahiralo ukupne polifenolne spojeve ( $27,00 \pm 1,03 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) u odnosu na BMa ( $25,00 \pm 1,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) što pokazuje da betain u kombinaciji s limunskom kiselinom selektivnije ekstrahira ukupne polifenolne spojeve nego kad je isti u kombinaciji s jabučnom kiselinom. Kao najmanje selektivno prirodno eutektičko otapalo od svih ispitanih otapala pokazalo se otapalo MaGlcGly ( $20,00 \pm 2,03 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ).

U literaturi su poznata brojna istraživanja bazirana na ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a; Radošević i sur., 2016). Tako su Radošević i sur. (2016) proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa, a ekstrakti su promatrani s obzirom na ekstrakciju pojedinačnih polifenola. Najveća efikasnost ekstrakcije (+) katehina postignuta je s otapalom ChFru a zatim slijede ChMa > ChXyl > ChGlc > ChGly. Kao i u našem slučaju otapalo kolin klorida i organske kiseline je među najproduktivnijim otapalima dok se otapalo kolin klorida i glicerola pokazalo kao najmanje selektivno.

Međutim, osim (+) katehina u pokožici grožđa nalazi se još jedan važan flavonoid – kvercetin-3-*O*-glukozid. Najveća količina ekstrahiranog kvercetin-3-*O*-glukozida postignuta je s otapalima kako slijedi: ChFru > ChXyl > ChGly > ChMa > ChGlc. Radi usporedbe ekstrakcija je provedena i s vodenom otopinom metanola (70 %, v/v) (Radošević i sur., 2016). Istraživanjem je utvrđeno da su NADES-ovi dostojna zamjena konvencionalnim otapalima s tim da je barem jedan NADES postigao veće iskorištenje ekstrakcije polifenolnih spojeva u odnosu na metanol. Može se zaključiti da se ti rezultati podudaraju s našima gdje se otapalo ChCit pokazalo selektivnije od zakiseljenog etanola (70 %, v/v) dok druga otapala pokazuju sličnu ili nižu selektivnost. Naime, NADES-ovi imaju sposobnost doniranja i primanja protona i elektrona što im omogućuje tvorbu vodikovih veza s polifenolnim spojevima i posljedično povećava kapacitet otapanja istih (Radošević i sur., 2016).

#### 4.2. Određivanje ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa dobivenih pomoću eutektičkih otapala

Koncentracija ukupnih antocijana određena je u reakciji vezanja hidrogensulfidnog iona na 2' položaj, a rezultati su izražani u mg antocijana po g suhe tvari (s.tv.) (slika 8).



**Slika 8.** Maseni udjeli ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa \*,\*\*

\*rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=3), s.tv.=suha tvar

\*\* BMa= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:jabučna kiselina, BCit= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:limunska kiselina, ChCit= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin klorid:limunska kiselina, MaGlcGly= ekstrakt pripremljen u otapalu jabučna kiselina:glicerol:glukoza, ChMa= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin klorid:jabučna kiselina, MaGlc= ekstrakt pripremljen u otapalu jabučna kiselina:glicerol, EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu (70 %, v/v)

Na temelju prikazanih rezultata (slika 8) zaključuje se da je ChCit najselektivnije otapalo za ekstrakciju ukupnih antocijana iz komine grožđa ( $2,55 \pm 0,04$  mg g<sup>-1</sup> s.tv.) od



svih ispitanih prirodnih eutektičkih otapala. Prisutnost većeg broja hidroksilnih i karboksilnih skupina omogućuju stvaranje jačih vodikovih veza uspostavljenih na više mjesta čime se poboljšava stabilnost otapala (Dai i sur., 2013a). Budući da limunska kiselina ima karboksilnu skupinu više od jabučne, za pretpostaviti je da je to razlog zašto je otapalo u čijem su sastavu kolin klorid i limunska kiselina ekstrahiralo više ukupnih antocijana nego otapalo kolin klorida i jabučne kiseline ( $2,10 \pm 0,25 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ). Zakiseljeni (70 %, v/v) etanol koji se primjenjuje u klasičnim ekstrakcijama pokazao je nešto slabiji ekstrakcijski učinak ( $2,50 \pm 0,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) od otapala ChCit. S prirodnim eutektičkim otapalom MaGlc ekstrahirana je najmanja količina ukupnih antocijana ( $0,80 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ) (slika 8). MaGlc je najgušće otapalo korišteno u ovom radu ( $1,331 \text{ g cm}^{-3}$ ) što je u skladu sa spomenutom ovisnošću uspješnosti ekstrakcije o viskoznosti otapala.

Polarnost otapala je važno svojstvo koje utječe na uspješnost ekstrakcije antocijana. Prirodna eutektička otapala bazirana na organskim kiselinama su najpolarnija ( $44,81 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). S druge strane šećeri i polialkoholi su najmanje polarni s polarnošću sličnoj metanolu ( $51,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) (Dai i sur., 2013a). Budući da su organske kiseline polarne molekule kao i antocijani, NADES-ovi u čijem su sastavu, ekstrahirali su znatno veću količinu antocijana od onih koja sadrže šećer ili alkohol (slika 8). Cvjetko Bubalo i sur. (2016a) su proveli ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa te dobili slične rezultate pri čemu je korišteno 5 otapala: kolin klorid:oksalna kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina:prolin, kolin klorid:glicerol i kolin klorid:sorboza. Sukladno pravilu "polarno se otapa u polarnom" najveća količina antocijana ekstrahirana je s otapalom kolin klorid:oksalna kiselina, nešto manja s kolin klorid:jabučna kiselina dok su se kao najslabija ekstrakcijska sredstva pokazala otapala na bazi kolin-klorida s alkoholom glicerolom i šećerom sorbozom (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a).

**Tablica 4.** Izmjerena pH vrijednost prirodnih eutektičkih otapala s 30 % vode (v/v)

<b>NADES</b>	<b>pH</b>
<b>BMa</b>	3,27
<b>BCit</b>	2,60
<b>ChCit</b>	0,93
<b>MaGlcGly</b>	1,15
<b>ChMa</b>	0,67
<b>MaGlc</b>	0,49

Također, pH vrijednost otapala (tablica 4) je važan faktor koji utječe na ekstrakciju budući da se antocijani nalaze u različitim kemijskim oblicima ovisnima o pH vrijednosti. Pri pH=1 prisutni su u obliku crvenog flavilium kationa, kod pH između 2 i 4 u obliku plave kinoidalne baze, a pri pH između 5 i 6 u obliku bezbojne karbinolne pseudobaze. Pri pH vrijednostima iznad 7 antocijani se razgrađuju (Castaneda-Ovando i sur., 2009). Dakle, količina ekstrahiranih antocijana smanjuje se opadanjem kiselosti otapala (Dai i sur., 2014). S obzirom na ta saznanja ne iznenađuju rezultati prikazani u ovom radu, jer su otapala koja sadrže organske kiseline, ChCit (pH vrijednost= 0,931) i ChMa (pH vrijednost=0,670) ekstrahirala najveću koncentraciju antocijana (slika 8). Međutim, kod koncentracije antocijana određene spektrofotometrijski, treba pripaziti na činjenicu da upotrebom zakiseljenih otapala dolazi do nastajanja antocijana iz flavanola i proantocijanidina što doprinosi visokoj koncentraciji antocijana, a posljedično i lažnih rezultata prilikom određivanja antocijana kolorimetrijskim metodama (Revilla, 1998) pa je metodu potrebno provjeriti primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Rezultatima dobivenima analizom pripremljenih ekstrakata najselektivnije otapalo za ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva i antocijana je prirodno eutektičko otapalo ChCit s 30 % (v/v) vode od svih ispitanih prirodnih eutektičkih otapala s vrijednostima većima od referentnog otapala – zakiseljenog etanola. Može se zaključiti da su prirodna eutektička otapala konkurentna konvencionalnim otapalima za ekstrakciju, a ekološki su prihvatljivija. U daljnjim istraživanjima, potrebno je identificirati i kvantificirati profil polifenola i antocijana HPLC-om te ispitati biološku aktivnost pripremljenih ekstrakata kako bi se potvrdila literaturna činjenica o biološkom učinku ekstrakata bogatih polifenolnim spojevima.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakcija ukupnih polifenolnih spojeva iz komine grožđa sorte Plavac mali najučinkovitija je primjenom otapala kolin klorid:limunska kiselina (ChCit) a najmanje učinkovito otapalo je jabučna kiselina: glicerol:glukoza (MaGlyGlc).
2. Ekstrakcija ukupnih antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali najučinkovitija je s otapalom kolin klorid:limunska kiselina (ChCit) dok se kao najmanje učinkovito otapalo pokazalo jabučna kiselina:glukoza (MaGlc) zbog visoke viskoznosti.
3. pH vrijednost prirodnih eutektičkih otapala utječe na ekstrakciju ukupnih antocijana koji se bolje ekstrahiraju s prirodnim eutektičkim otapalima u sastavu s organskim kiselinama nego s alkoholima i šećerima.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 (2009) Osnovna struktura antocijana <[www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/rapid-separation-of.html](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/rapid-separation-of.html)>, Pristupljeno 22.08.2017.

Belasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 – 203.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317 – 333.

Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.M., Galan-Vidal, C.A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**: 859 – 871.

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

Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* **117**: 143 – 155.

Cvjetko-Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić-Redovniković, I., Jokić, S. (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. (2016a) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutentic solvents. *Food Chemistry* **200**: 159 – 166.

Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2016b) Metode pripreve eutektičkih otapala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 164 – 168.

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

Dai, Y., Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013b) Natural Deep Eutentic Solvents as New Extraction Media for Phenolic Metabolite in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry* **85**: 6272 – 6278.

Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2014) Natural deep eutentic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry* **159**: 116 – 121.

Di Lecce, G., Arranz, S., Jauregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventos, R.M. (2014) Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albarino grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry* **145**: 874 – 882.

Drmić, H., Režak Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2**: 22 – 33.

El Gengaihi, S., Aboul Ella, F.M., Hassan, E.M., Shalaby, E.A., Abou Baker, D.H. (2013) Phytochemical Investigation and Radical Scavenging Activity of Wastes of Some Grape Varieties Grown in Egypt. *Global Journal of Pharmacology* **7**: 465 – 473.

Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Research International* **54**: 1844 – 1858.

Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, H, Sontag, G. (2013) Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chemistry* **138**: 1847 – 1855.

Gu, Y., Jerome, F. (2013) Bio – based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco – efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chemical Society Reviews* **42**: 9550 – 9570.

He, J., Giusti, M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Natural Products* **1**: 163 – 187.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821 -1835.

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 eutentic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research* **38**: 2143 – 2152.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **55**: 279 – 290.

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923 – 933.

Kudlak, B., Owczarek, K., Namiesnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents. A review. *Environmental Science Pollution Research* **22**: 11975 – 11992.

Lillo, C., Lea, U.S., Ruoff, P. (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment* **31**: 587 – 601.

Macheix, J.J, Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, str. 153 - 160.

Nerantzis, E.T., Tataridis, P. (2006) Integrated Enology – Utilization of winery by-products into high added value products. *Journal of Science and Technology* **1**: 1 – 13.

Owczarek, K., Szczepanska, N., Plotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., Shyshchak, O., Bratychak, M., Namiesnik, J. (2016) Natural Deep Eutentic Solvents in Extraction Process. *Chemistry & Chemical Technology* **10**: 601 – 606.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L. (2014) Natural deep eutectic solvents – solvents for 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063 – 1071.

Peng, X., Duan, M.H., Yao, X.H., Zhang, Y.H., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2016) Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutentic solvent. *Separation and Purification Technology* **157**: 249 – 257.

Pietta P. (2000.) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: 1035 -1042.

Popescu, A.M., Constantin, V. (2014) Synthesis, Characterization and Thermophysical Properties of Three Neoteric Solvents-Ionic Liquids Based on Choline Chloride. *Chemical Research in Chinese Universities* **30**: 119 – 124.

Radošević, K., Ćurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko-Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Natural deep eutentic solvents as beneficial extracants for enchancement of plant extracts bioactivity. *LWT Food Science and Technology* **73**: 45 – 51.

Revilla, E., Ryan, J.M., Martin-Ortega, G. (1998) Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4592 – 4597.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tannins du vin rouge et determination de leur structure. *Chimica Analytica Paris* **44**: 897 – 901.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**: 933-956.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**: 401 – 436.

Ruesgas-Ramon, M., Cruz Figueroa-Espinoza, M., Durand, E. (2016) Application of Deep Eutentic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**: 3591 – 3601.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela – Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 178.

Shrikhande, A.J. (2000) Wine by-products with health benefits. *Food Research International* **33**: 469 – 474.

Souquet, J.M., Labarbe, B., Guerneve, C.L., Cheynier, V., Moutouner, M. (1996) Polymeric proanthocyanidins from grape pomace. *Phytochemistry* **43**: 509 – 512.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Science* **15**: 15638 – 15678.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231 – 1246.

Tsao, R., McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability, De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ur., Blackwell Publishing Ltd. str. 131-153.

Willfor, S., Smeds, A., Holmboma, B. (2006) Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*. **1112**: 64 – 77.

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



## 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.*

Marina Šango

Marina Šango