

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2017.

Ivana Koret

606/MB

**STABILNOST POLIFENOLNIH
SPOJEVA
U EUTEKTIČNIM OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, a u sklopu HRZZ projekta broj 9556 „Zelena otapala za zelene tehnologije“.

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković, te doc.dr.sc. Kristini Radošević na uloženom vremenu i trudu i nesebičnoj pomoći, te na svemu što su me naučile pri izradi ovog diplomskog rada.

Također želim zahvaliti ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pruženoj pomoći i savjetima pri odradi eksperimentalnog dijela rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski 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: Biotehnologija

STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA U EUTEKTIČNIM OTAPALIMA

Ivana Koret, 606/MB

Sažetak: Obzirom na bogat sadržaj polifenolnih spojeva, komina grožđa ima mogućnost primjene u brojnim industrijama kao prirodan izvor antioksidansa. Kako bi se izolirali polifenolni spojevi iz komine koriste se različite konvencionalne metode ekstrakcije koje se sve više zamjenjuju alternativnim načinima. Jedan od alternativnih pristupa je odabir tzv. zelenih otapala kao medija za ekstrakciju. Kao dobar izbor pokazala su se eutektična otapala koja su ekološki u potpunosti prihvatljiva i ne djeluju štetno na ljudsko zdravlje. U ovom radu ispitano je osam eutektičnih otapala kao mogućih za primjenu u ekstrakciji komine grožđa, obzirom na ukupne polifenole i antocijane. Također, ispitana je i stabilnost tako pripremljenih ekstrakata kroz vrijeme i pri različitim temperaturama. Eutektična otapala pokazala su se učinkovitijima u ekstrakciji polifenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju etanolom i zakiseljenim etanolom, što ukazuje na mogućnost zamjene klasičnih organskih otapala eutektičnim otapalima u ekstrakciji polifenolnih spojeva iz komine grožđa i drugih biljnih materijala.

Ključne riječi: antocijani, ekstrakcija, eutektična otapala, komina grožđa, polifenoli

Rad sadrži: 40 stranica, 17 slika, 3 tablice, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
2. Izv.prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Doc.dr.sc. Kristina Radošević
4. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjena)

Datum obrane: 7. travnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

STABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Ivana Koret 606/MB

Abstract: Due to the rich content of polyphenols, grape pomace may be applied in many industries as a natural source of antioxidants. In order to isolate polyphenolic compounds from the pomace, various conventional extraction methods have increasingly been replaced by alternative methods. For this reason, it is good to apply alternative methods of extraction, where deep eutectic solvents have showed to be a good choice, because they are ecologically entirely acceptable and do not adversely affect human health. One alternative approach is to select the green solvent as the extraction medium. This paper examined eight eutectic solvents as possible for use in the extraction of pomace of grapes, considering the total polyphenols and anthocyanins. Also, the stability is assessed both extracts prepared in time and at different temperatures. Deep eutectic solvents have proved to be more effective in the extraction of polyphenolic compounds compared to conventional extraction of ethanol and acidified ethanol, which indicates the possibility of potentially replacing conventional organic solvents with deep eutectic solvents in the extraction of polyphenols from grape pomace and other plant materials.

Keywords: anthocyanins, deep eutectic solvents, extraction, grape pomace, polyphenols

Thesis contains: 40 pages, 17 figures, 3 tables, 38 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, Associated Professor

Reviewers:

1. Ph.D. Karin Kovačević Ganić, Full Professor
2. Ph.D. Ivana Radojčić Redovniković, Associated Professor
3. Ph.D. Kristina Radošević, Assistant Professor
4. Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor

Thesis defended: 7 April, 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI.....	2
2.1.1. FENOLNE KISELINE.....	3
2.1.2. FLAVONOIDI.....	3
2.1.3. ANTOCIJANI.....	4
2.1.4. GROŽĐE KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA	5
2.1.4.1. Osnovna svojstva grožđa.....	5
2.1.4.2. Komina grožđa.....	6
2.1.4.3. Polifenolni spojevi komine grožđa	7
2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIFENOLA.....	7
2.2.1. ANTIOKSIDATIVNO I ANTIKANCEROGENO DJELOVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA7	
2.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	10
2.3.1. OTAPALA ZA EKSTRAKCIJU	12
2.3.2. EUTEKTIČNA OTAPALA (<i>eng. Deep eutectic solvents – DES</i>).....	13
2.3.2.1. Svojstva eutekličnih otapala.....	13
2.3.2.2. Primjena eutekličnih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva	15
2.3.3. STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	15
2.3.3.1. Stabilnost antocijana.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci komine grožđa	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Uređaji i oprema.....	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Sinteza eutekličnih otapala.....	18
3.2.1. Priprema ekstrakta komine grožđa	19
3.2.2. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu (FC) reagensom.....	19
3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana.....	20
3.2.4. Određivanje stabilnosti.....	21
3.3. OBRADA PODATAKA	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova	22
4.2. ANTOCIJANI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova	24
4.3. STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova	25

4.3.1.	Stabilnost ukupnih polifenola.....	25
4.3.2.	Stabilnost antocijana u ekstraktima komine grožđa	30
5.	ZAKLJUČCI.....	36
6.	LITERATURA.....	37

1. UVOD

Danas je sve veća potražnja za namirnicama koje su bogate biološki aktivnim spojevima zbog njihovog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi. Među biološki aktivne spojeve spadaju i polifenolni spojevi koje su najvažnije fitokemikalije prisutne u grožđu jer sudjeluju u mnogim biološkim procesima i važni su za zdravlje ljudi (Shrikhande, 2000). Polifenolni spojevi su u biljnoj hrani važni zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja vezanog uz sposobnost hvatanja slobodnih radikala te općenito pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Rice-Evans i sur., 1997).

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala je prvi korak u upotrebi fitokemikalija u pripremi dodataka prehrani, farmaceutskih proizvoda ili kozmetičkih proizvoda. Ekstrakcija organskim otapalima je postupak koji se najčešće koristi u pripremi biljnih ekstrakata zbog jednostavnosti, učinkovitosti i široke upotrebe (Dai i Muper, 2010). Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje takve metode zahtijevaju. Stoga, zelena otapala pokušavaju zamijeniti tradicionalna organska otapala, a među njima istakle su se ionske kapljevine i euteklična otapala (Dai i Muper, 2010). Euteklična otapala su posljednjih godina zaokupila pažnju velikog broja znanstvenika kao potencijalna nova vrsta zelenog otapala (Durand i sur., 2013).

Euteklična otapala (eng, Deep eutectic solvents, DES) su smjese dva ili više spoja koja mogu biti tekuća ili kruta, koja u određenom omjeru mogu tvoriti tekućinu. Ako su supstrati za sintezu eutekličnih otapala primarni metaboliti onda se oni nazivaju prirodnim eutekličnim otapalima (Natural deep eutectic solvents, NADES).

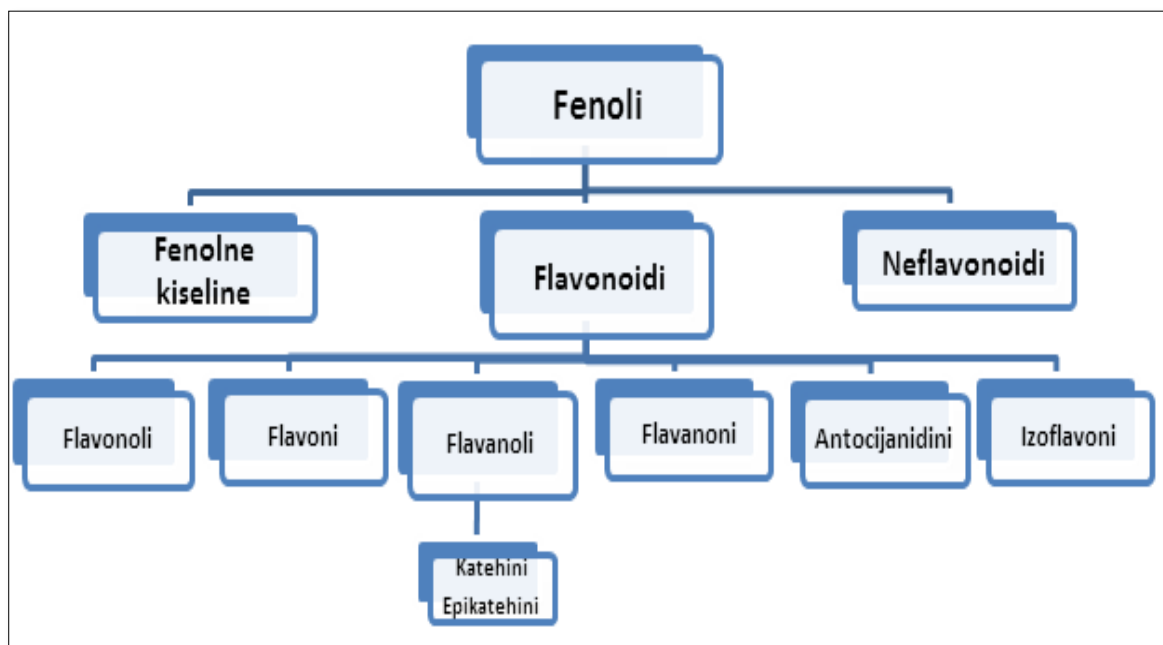
Cilj ovog rada bio je pratiti stabilnost polifenolnih spojeva iz komine grožđa sorte Plavac mali u ekstraktima koji su pripremljeni primjenom osam različitih eutekličnih otapala (betain:limunska kiselina, betain:jabučna kiselina, kolin klorid:limunska kiselina, kolin klorid:prolin:limunska kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza:glicerol i prolin:jabučna kiselina) i konvencionalnih otapala (voda, 70% etanol i zakiseljeni 70% etanol).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima (voće, povrće, žitarice, čajevi, začini itd.). Utječu na senzorska svojstva (boja, aroma i okus), otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima te indirektno utječu na rast biljke i štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja. Polifenolni spojevi uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Jašić, 2010).

Prema broju i rasporedu ugljikovih atoma klasificiraju se u fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide (slika 1). Najčešće imaju vezane razne šećerne skupine ili organske kiseline (Wahle i sur., 2010).



Slika 1. Podjela polifenolnih spojeva (Wahle i sur., 2010)

2.1.1. FENOLNE KISELINE

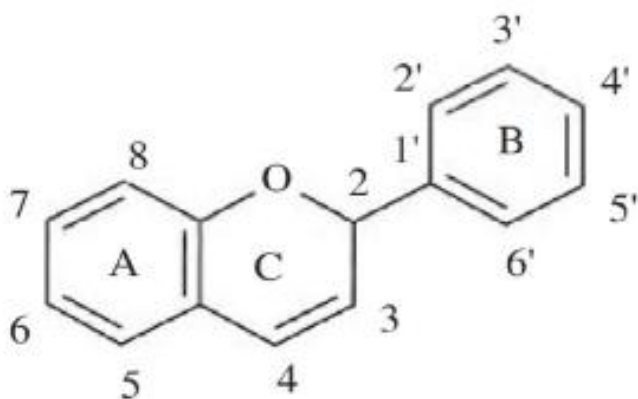
Fenolne kiseline su velika grupa polifenolnih spojeva koji se nalaze u hrani biljnog porijekla. Imaju različite uloge u biljkama uključujući asimilaciju hranjivih sastojaka, sintezu proteina, aktivnost enzima i fotosintezu.

Dijele se na derivate cimetine i hidroksibenzojeve kiseline. Najzastupljeniji hidroksi derivati benzojeve kiseline su: p-hidroksibenzojeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Manji udio fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina vezana esterskom, eterskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulama (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni) (Dai i Mumper, 2010; Wahle i sur., 2010).

2.1.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su biljni sekundarni metaboliti nastali kondenzacijom cimetine kiseline s tri malonil-CoA (Bloor, 2001). Osnovnu strukturu tvori difenilpropanski kostur ($C_6-C_3-C_6$), dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom koji sadrži kisik (slika 2), a razlikuju se u rasporedu hidroksil-, metoksi- i glikozidnih skupina te u vezi između A i B prstenova (Balasundram i sur., 2006). Podijeljeni su 5 podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli i antocijanidini.

Obojeni flavonoidi odgovorni su za boju u mnogim vrstama voća i povrća, ali brojni bezbojni flavonoidi su također prisutni u prirodi. Flavonoidi štite biljke od UV zračenja, kukaca i sisavaca biljojeda. Osim toga, oni pokazuju antimikrobno i antioksidativno djelovanje i povoljno djeluju kod raznih oboljenja u ljudi (Haslam, 1989; Harborne i Williams, 2000; Yilmaz i Toledo, 2004).

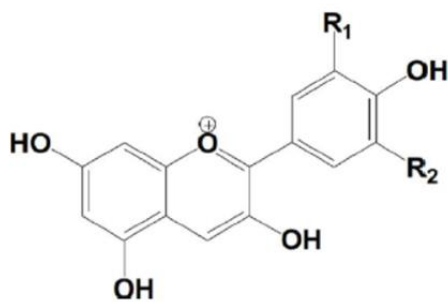


Slika 2. Kemijska struktura flavonoida (Jackson, 2008)

2.1.3. ANTOCIJANI

Antocijani predstavljaju veliku skupinu u vodi topljivih biljnih pigmenata koji su odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju voća i povrća. U biljakama se antocijani nalaze pričvršćeni na nekoliko drugih molekula, kao što su šećeri i druge skupine flavonoida, te se tako poboljšava njihova stabilnost i boja. Antocijani su glikozidi antocijanidina s karakterističnom kemijskom strukturom flavonoida C6-C3-C6 (slika 3). U prirodi je do sad poznato 6 antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin, a vezanjem šećera na ove osnovne antocijanidine nastaju molekule antocijana (Jašić, 2010).

Pelargonidin kao najstabilniji antocijanidin je i najviše zastupljen u prirodi. Relativno su nestabilni spojevi, ali samoudruživanjem i intermolekularnom pigmentacijom postaju stabilniji. Tijekom ekstrakcije, prerade i skladištenja može doći do degradacije antocijana pa je potrebno znati sve faktore koji utječu na njihovu stabilnost. Značajni su zbog njihove antioksidativne aktivnosti, koja igra ključnu ulogu u prevenciji neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, tumorskih oboljenja i dijabetesa (Ovandi i sur., 2009).



Antocijanidin	R ₁	R ₂
Cijanidin	-OH	-H
Delfinidin	-OH	-OH
Pelargonidin	-H	-H
Malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃
Peonidin	-OCH ₃	-H
Petunidin	-OH	-OCH ₃

Slika 3. Kemijska struktura i nazivi do sada poznatih antocijana (Tsao, 2009).

2.1.4. GROŽĐE KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA

2.1.4.1. Osnovna svojstva grožđa

Grožđe (*Vitis L.*) (slika 4) je plod vinove loze i jedna od najvažnijih voćnih kultura diljem svijeta koja ima dugu povijest uzgoja i primjene. Odličan je izvor vitamina C i vitamina skupine B (osim B12), koji su važni za izmjenu ugljikohidrata i povoljno utječu na živčani sustav. Od minerala, grožđe sadrži kalij, fosfor, kalcij, magnezij, mangan, natrij, bakar, cink i željezo.



Slika 4. Grožđe (Anonymous 1, 2012)

Pokožica bobice grožđa sastoji se od dvije anatomski različite regije. Vanjski dio pokožice čini epiderma, a unutarnji hipoderma. Na epidermi se nalazi nekolicina puči koje zrenjem gube funkciju, postaju plutaste i u njima se nakupljaju polifenolni spojevi. Većina stanica hipoderme također akumulira flavonoide te antocijane u krajnjim slojevima hipoderme (Jackson, 2008).

Polifenolni spojevi su najvažnije fitokemikalije koje se nalaze u grožđu jer sudjeluju u važnim biološkim procesima i važni su za zdravlje ljudi (Shrikhande, 2000). Najveći udio polifenolnih spojeva u grožđu se nalazi u pokožici bobice. U grožđu se najčešće nalaze polifenolni spojevi koji sadrže antocijanine (pigment), flavanole, flavonole, stilbene i fenolne kiseline (proantocijanidini, elaginska kiselina, mircetin, kvercetin, kaempferol i resveratrol) (Spacil i sur., 2008). Najčešće identificirani antocijani u pokožici grožđa su 3-*O*-monoglukozidi i 3-*O*-acilirani monoglukozidi sastavljeni od 5 najčešćih antocijanidina: delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin, a najzastupljeniji je malvidin-3-glukozid (Revilla i sur., 2001).

Uz grožđe se veže niz povoljnih djelovanja na živa bića kao što su da čisti organizam, čuva zdravlje srca i krvnih žila, topi masne naslage, sprječava upalne procese, poboljšava metabolizam, pomaže kod artritisa i reume, štiti od mnogih vrsta tumora, poboljšava rad bubrega i pluća, sprečava nastanak bubrežnih kamenaca, pomaže kod bronhitisa i kašlja, pospješuje probavu i regulira rad crijeva, poboljšava pamćenje i koncentraciju, usporava starenje i poboljšava san (Anonymous 2, 2012).

Znanstvenim istraživanjem pokazano je da ekstrakti pokožice grožđa imaju sinergistički učinak s doksorubicinom pri inhibiciji rasta estrogen receptor pozitivnih MCF-7 stanica, kao i estrogen receptor negativnih MDA-MB468 stanica, na temelju čega je zaključeno da ekstrakti grožđa mogu povećati učinkovitost tog lijeka (Sharma i sur., 2004; Kaur i sur., 2009).

2.1.4.2. Komina grožđa

Kom, drop ili trop je kruti dio što zaostaje nakon cijedenja ili tiještenja masulja grožđa ili drugog voća, odnosno slada (u proizvodnji piva). Komina može biti neprevrela (u pravilu takva se komina dobije neposredno nakon tiještenja grožđa odnosno masulja bijelog grožđa),

djelomice prevrela (npr. neposredno nakon otakanja mošta u vrenju s masulja crnog grožđa) ili prevrela. I neprevrela i djelomice prevrela komina se na odgovarajući način skladište, eventualno sulfitira i ostavlja određeno vrijeme da zaostali šećer prevrije. Nakon toga komina se destilira. Komina se najčešće koristi za pripremu rakije nakon čega zaostaje predestilirana komina iz koje se mogu izdvojiti sjemenke (za proizvodnju ulja), soli vinske kiseline (za proizvodnju vinske kiseline u prehrani i farmaciji), bojila iz kožice (za slastičarsku industriju), dok se ostatak dodaje stočnoj hrani ili smjesi za proizvodnju komposta. Komina sadrži najmanje 40% suhe tvari i obično oko 5,5 litara apsolutnog alkohola u 100 kg (Anonymous 2, 2013).

2.1.4.3. Polifenolni spojevi komine grožđa

U sastavu komine grožđa nalazimo brojne polifenolne spojeve u prvom redu flavonoide (antocijani, flavanoli i flavonoli) te u manjem udjelu neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te stilbene) (Rodriguez i sur., 2006).

Njihov udio ovisi o različitim čimbenicima kao što su: sorta grožđa, klimatski i agrotehnički uvjeti, sastav tla te tehnologija proizvodnje vina (Mazza i sur., 1999). Prema istraživanjima, u komini grožđa najzastupljeniji antocijani su malvidin-3-O-glukozid te peonidin-3-O-glukozid, dok su ostali prisutni u manjim koncentracijama (Amico i sur., 2004; Amico i sur., 2008). Polifenolni spojevi prisutni u komini grožđa pokazali su se kao jaki antioksidansi, jači od vitamina C i E te karotenoida, te također, kao odlična alternativa biljnog podrijetla koja može zamijeniti popularne, sintetičke antioksidanse koji se najčešće koriste u proizvodnji hrane iako postoje naznake o njihovom toksičnom učinku na jetru te pospješivanju mutageneze (Wichi, 1988).

2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIFENOLA

2.2.1. ANTIOKSIDATIVNO I ANTIKANCEROGENO DJELOVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

Kad iz nekog razloga (nedostatak prirodnih antioksidansa, mutacije DNA, kronične bolesti, nagomilavanje oštećenih makromolekula) obrambeni mehanizmi zakažu i kada stanice ili čak cijeli organizam preplave slobodni radikali, nastaje patološko stanje koje

nazivamo oksidacijski stres (Lovrić, 2001). Polifenolni spojevi iz biljaka posljednjih su godina privukli veliku pažnju znanstvenika kao potencijalna antioksidativna sredstva, jer stupaju u interakcije sa slobodnim radikalima i neutraliziraju ih. Njihov antioksidativni efekt dokazan je među ostalim u origanu, timijanu, đumbiru, papru, cimetu itd. (Santos-Dinniesi sur., 2012).

Epidemiološka istraživanja su pokazala da populacije koje konzumiraju velike količine biljne hrane bogate polifenolima (tablica 1) imaju mali postotak tumorskih bolesti bilo koje vrste. I monofenolni i polifenolni spojevi iz različitih biljaka pokazuju mogućnost inhibicije inicijacije, rasta i širenja tumora u humanim stanicama *in vitro* i u pokusnim životinjama *in vivo* (Wahle i sur., 2010). Antitumorska svojstva do sada su dokazana za više polifenolnih spojeva, flavanola, flavanona (naringenin), izoflavona (daidzein, genistein), tanina itd. (Wahle i sur. 2010, Aharoni, 2007).

Tablica 1. Izvor i djelovanje polifenolnih spojeva (Jašić, 2010)

KOMPONENTA	IZVOR	DJELOVANJE
Fenolne kiseline poput galne	Jabuke, citrusi, breskva	Imaju antioksidativnu sposobnost i doprinose zdravlju srca
Kafeinska kiselina	glog, artičoka, kruške, bosiljak, timijan, origano, jabuka.	Ima antioksidativnu sposobnost i doprinose zdravlju srca
Resveratrol	Crno grožđe	Ima visoku antioksidativnu sposobnost
Elagična kiselina	Grožđe, orašasti plodovi, jagode, ribizl, maline,	Reducira rizik pojave raka, inhibira vezanje karcinogena na DNA, reducira razinu LDL kolesterola i povisuje razinu HDL kolesterola
Kvercetin	Luk	Ima visoku antioksidativnu sposobnost
Kurkumin	đumbir,šafnan, kurkuma	Blokira oksidaciju LDLa, antioksidans
Cianidin	Crna riža, bobičasto i jagodasto šumsko voće	Antikarcinogeno djelovanje
Flavonoli (kaempferol,miricetin)	Luk, jabuke, čaj, brokula	Neutralizira slobodne radikale koji mogu oštetiti ćelije, odnosno oni su ćelijska antioksidativna odbrana
Antocijanidini (cianidin,delfinidin,malvidin, pelargonidin)	različito jagodasto i bobičasto voće (trešnje, crveno voće, crveni grejp)	Imaju antioksidativnu moć i doprinose poboljšanju moždane aktivnosti
Flavanoli i flavan-3-oli (katehini,epikatehini, teaflavini, proantocijanidini)	čaj,čokolada, jabuke,kakao	Doprinose poboljšanju funkcije srca
Flavanoni	Citrusi	Neutralizira slobodne radikale koji mogu oštetiti stanice, jaki antioksidansi

Inhibitorni efekt prirodnih polifenolnih spojeva na karcinogenezu i rast tumora moguć je preko dva mehanizma, modifikacijom ravnoteže između pro-oksidativnih i antioksidativnih molekula i utjecajem na osnovne stanične funkcije (stanični ciklus, apoptoza, upalni procesi, angiogeneza i metastaziranje tumora) (Dai i Mumper, 2010).

Mnoga *in vivo* istraživanja pokazuju da unos flavonoida smanjuje rizik nastanka raka želuca, debelog crijeva i dojke (Jašić, 2010).

Flavonoidi maskiraju mjesta vezanja kancerogenih tvari na DNA štiteći na taj način nasljedni materijal od mogućeg utjecaja kancerogenih tvari. Mnoge *in vivo* studije pokazuju da unos flavonoida smanjuje rizik nastanka raka želuca, debelog crijeva i dojke. Flavonoidi (crveni, zeleni, narančasti, žuti i tamno plavi pigmenti) iz bobičastog i tropskog te citrusnog voća, kao i povrća koji samostalno ili udruženo djeluju antioksidacijski protiv slobodnih radikala i na taj način bitno smanjuju rizik od oštećenja DNA strukture i pojave raka (Jašić, 2010).

Polifenolni spojevi mogu inhibirati formiranje i rast tumora indukcijom zaustavljanja staničnog ciklusa i indukcijom apoptoze. Regulacija staničnog ciklusa u stanicama tumora je promijenjena, ali bilo kakav utjecaj polifenolnih spojeva na specifične proteine staničnog ciklusa potencijalno može zaustaviti neprekidnu proliferaciju tumorskih stanica. Spojevi koji induciraju apoptozu idealni su lijekovi protiv tumora. Polifenolni spojevi utječu na rast tumorskih stanica indukcijom apoptoze u mnogim tumorskim staničnim linijama (stanicama tumora debelog crijeva, jetre, prostate i pluća i stanicama melanoma, neuroblastoma i leukemija stanicama) (Dai i Mumper, 2010).

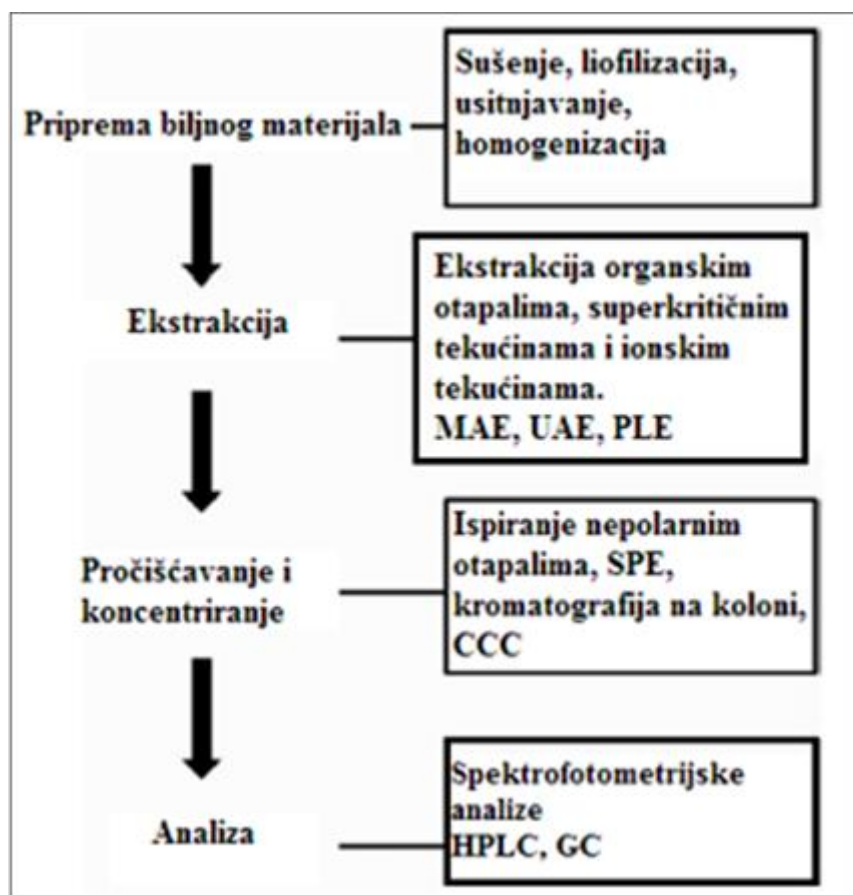
Dokazan je i sinergistički efekt različitih polifenolnih spojeva s drugim ne-fenolnim antioksidansima i pokazalo se da kombinacija polifenolnih spojeva i drugih antioksidansa ima veći antioksidativni efekt od svake komponente pojedinačno (Dai i Mumper, 2010).

2.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala je prvi korak u upotrebi fitokemikalija u pripremi prehrambenih suplemenata, sastojaka prehrambenih proizvoda, farmaceutskih ili kozmetičkih proizvoda. Polifenoli se mogu ekstrahirati iz svježeg, zamrznutog ili osušenog biljnog materijala. Prije ekstrakcije biljni uzorci se suše na zraku ili liofiliziraju, nakon čega se usitnjavaju, melju i homogeniziraju. Proces sušenja može utjecati na kemijski sastav biljnog materijala, liofilizacijom se u biljnom materijalu zadržavaju veće količine polifenolnih spojeva nego sušenjem na zraku (Dai i Mumper, 2010).

Ekstrakcija otapalima je postupak koji se najčešće koristi u pripremi biljnih ekstrakata zbog jednostavnosti, efikasnosti i široke upotrebe. Prinos kemijske ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru uzorka i otapala te o kemijskom sastavu i fizikalnim osobinama biljnog materijala (Dai i Mumper, 2010).

Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*eng.* microwave-assistend extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* ultrasonic-assisted extractions, UAE), te metode ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (*eng.* pressurized liquid extraction, PLE) (slika 5) (Vinatour, 2001).



Slika 5. Postupak ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnog materijala (Dai i Mumper, 2010)

Na učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnih materijala utječe temperatura, pri kojoj se provodi proces ekstrakcije, i duljina ekstrakcije. Povećanjem temperature ekstrakcije smanjuje se viskoznost i površinska napetost otapala čime se povećava brzina ekstrakcije, ali brojni polifenolni spojevi hidroliziraju i oksidiraju pri temperaturama iznad 70 °C, kao npr. antocijani. Ako se ekstrakcija provodi kroz dulji vremenski period (više od nekoliko sati) povećava se mogućnost oksidacije polifenolnih spojeva što smanjuje prinos polifenolnih spojeva u ekstraktu (Dai i Mumper, 2010).

Biljni ekstrakt nakon postupka ekstrakcije sadrži velike količine ugljikohidrata i lipidnih spojeva. Razne se metode koriste za pročišćavanje biljnog ekstrakta i koncentriranje polifenolnih spojeva. Za uklanjanje lipidnih spojeva sirovi ekstrakt se ispiri s nepolarnim otapalima kao što su heksan, diklormetan ili kloroform (Dai i Mumper, 2010). Za uklanjanje polarnih spojeva kao što su šećeri i organske kiseline koristi se ekstrakcija na krutoj fazi (*eng. solid phase extraction – SPE*). SPE metoda često se koristi jer je brza, ekonomična, osjetljiva i može biti automatizirana. Nakon što se vodena otopina ekstrakta propusti kroz kolonu u kojima se nalazi kruta faza, kolona se ispiri zakiseljenom vodom kako bi se uklonili šećeri, organske kiseline i drugi spojevi topivi u vodi. Polifenolni spojevi se nakon toga eluiraju metanolom ili vodenom otopinom acetona (Dai i Mumper, 2010). Nakon pročišćavanja ekstrakti polifenolnih spojeva analiziraju se i kvantificiraju ovisno o ciljanoj primjeni polifenolnih spojeva nakon ekstrakcije iz određenog biljnog materijala.

Tradicionalne spektrofotometrijske metode omogućuju jednostavno i brzo kvantificiranje skupina polifenolnih spojeva u uzorcima biljnih ekstrakata, ali zbog kompleksnosti biljnih polifenolnih spojeva i različite reaktivnosti prema reagensima, široki spektar metoda se koristi za ispitivanje različitih polifenolnih spojeva. Iz tog su razloga razvijene moderne kromatografske metode za analizu i kvantifikaciju polifenolnih spojeva, kao što su plinska kromatografija (*eng. Gas chromatography – GC*) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. High performance liquid chromatography – HPLC*) koja se danas najčešće koristi za analizu polifenolnih spojeva. HPLC metoda omogućava istovremenu analizu svih komponenata od interesa zajedno s njihovim derivatima i razgradnim produktima (Dai i Mumper, 2010).

2.3.1. OTAPALA ZA EKSTRAKCIJU

Topljivost polifenolnih spojeva ovisi o kemijskoj strukturi biljnog materijala i o polarnosti otapala koje se koristi za ekstrakciju. Otapala kao što su metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije najčešće se koriste za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala, često pomiješani s vodom u različitim omjerima. Odabir pravog otapala utječe na količinu ekstrahiranih polifenolnih spojeva. Metanol se pokazao kao bolje otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva manje molekularne mase, dok se za ekstrakciju flavanola veće molekulske mase kao najbolje otapalo pokazala vodena otopina acetona. U pripremi

ekstrakata bogatih antocijanima koriste se zakiseljena otapala, najčešće metanol i etanol. Takva vrsta otapala razbija membranu biljnih stanica istovremeno otapajući antocijane. Potrebno je pažljivo dozirati kiselinu u otapalu kako ne bi došlo do hidrolize acilnih skupina ili šećera vezanih na antocijane (Dai i Mumper, 2010).

Osim organskih otapala koja se klasično koriste u ekstrakciji sve su popularnija tzv. alternativna otapala. Jedno od njih je već ranije spomenuta voda, zatim superkritične ili subkritične tekućine (*eng.* supercritical (subcritical) fluid extraction) poput superkritičnog ugljikovog dioksida i u posljednjih desetak godina sve popularnije ionske kapljevine i eutektična otapala (DES) (Dai i Mumper, 2010).

2.3.2. EUTEKTIČNA OTAPALA (*eng.* *Deep eutectic solvents* – DES)

Eutektična su otapala posljednjih godina zaokupila pažnju velikog broja znanstvenika kao potencijalna nova vrsta zelenog otapala prikladnog za kemijske/enzimske katalize, elektro-kemijske procese, ekstrakcije ili pretvorbu biomase. Eutektična otapala imaju slična svojstva kao ionske kapljevine, ali i neke prednosti. DES zadržavaju mnoga svojstva ionskih kapljevina kao što su nehlapljivost. Osim toga, posjeduju i nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne ionske kapljevine kao što su:

- (1) jednostavna priprava i skladištenje;
- (2) isplativost zbog jeftinih početnih sirovina;
- (3) biorazgradivost;
- (4) netoksičnost;
- (5) neosjetljivost na vlagu;
- (6) širok opseg očekivane industrijske primjenjivosti zbog navedenih prednosti (Durand i sur., 2013).

2.3.2.1. Svojstva eutektičnih otapala

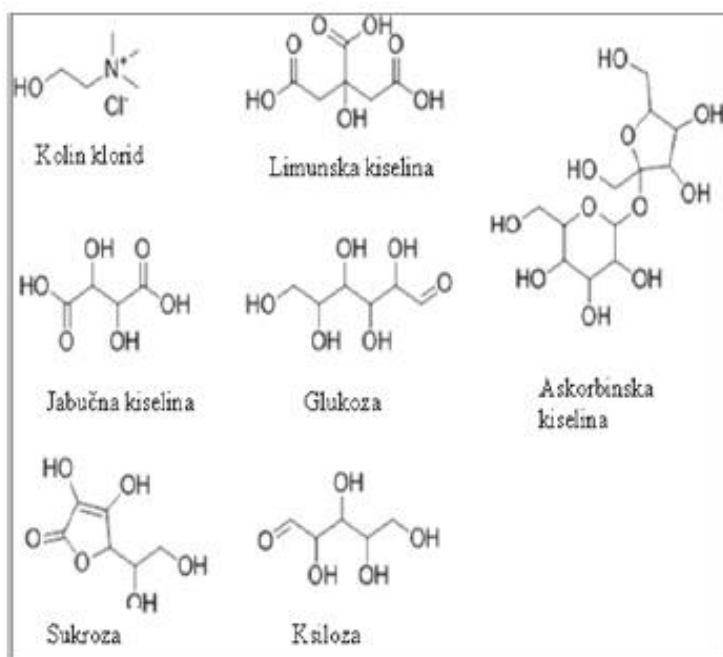
Eutektična otapala su smjese 2 ili 3 jeftine i sigurne komponente koje su sposobne povezati se jedna s drugom, preko vodikove veze, kako bi formirale eutektično otapalo.

Komponente koje izgrađuju eutektična otapala su kationske soli i donori vodikove veze (*eng. hydrogen bond donors – HBD*) kao što su alkoholi, kiseline ili amidi. Točka tališta eutektičnih otapala često je oko sobne temperature odnosno točka tališta eutektične smjese manja je od točki tališta komponenata pojedinačno (Morrison i sur., 2009).

U većini slučajeva, eutektično otapalo dobiva se miješanjem kvaterne amonijeve soli metalnim solima ili donorom vodika koji ima sposobnost formiranja kompleksa s halogenidnim anionom kvaterne amonijeve soli. Kolin- klorid se najčešće koristi za sintezu eutektičnih otapala zbog svoje niske cijene i netoksičnosti te biorazgradivosti, a donori vodika u takvoj smjesi mogu biti urea, glicerol, monosaharidi ili karboksilne kiseline kao što je prikazano na slici 6 (Zhang i sur., 2012).

Eutektična otapala nisu hlapljiva, nezapaljiva su, biorazgradiva i kompatibilna s enzimima. Osim toga, sinteza takvih otapala je 100 % učinkovita na razini atoma, jednostavna za izvedbu i nije potrebno pročišćavanje (Zhang i sur., 2012).

Gustoća eutektičnih otapala veća je od vode, a polarnost je viša od većine konvencionalnih polarnih organskih otapala (metanola, acetonitrila ili dimetil sulfoksida). Kiselost ili bazičnost eutektičnog otapala ovisi o kemijskoj strukturi komponenata, posebno o molekuli donoru vodikove veze, što znači da postoje bazična, neutralna i kisela eutektična otapala (Durand i sur., 2013).



Slika 6. Komponente koje mogu tvoriti eutektična otapala (Paiva i sur., 2014)

2.3.2.2. *Primjena eutektičnih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva*

Učinkovitost ekstrakcije nekog spoja eutektičnim otapalima ovisi o svojstvima samog otapala. Istraživanje u kojem je provedena ekstrakcija polifenolnih spojeva šafranike, koristeći različita eutektična otapala (mliječna kiselina:glukoza, glukoza:kolinklorid i fruktoza:glukoza:saharoza) utvrđeno je da eutektična otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva, zato jer se uspostavljaju stabilne i jake vodikove veze između polifenolnih spojeva i komponenata u otapalu (Dai i sur., 2013; Paiva i sur., 2014).

U ekstrakciji katehina (C), (+) epikatehin galata (ECG) i (-) epikatehin galata (EGCG) iz kineskog zelenog čaja korištena su eutektična otapala koja se sastoje od kolin-klorida i različitih donora vodikove veze. Nakon što su određeni najbolji uvjeti ekstrakcije (vrijeme, temperatura, vrsta eutektičnog otapala i omjer otapala i biljnog materijala), učinkovitost ekstrakcije navedenih polifenolnih spojeva redom je bila 82,7 %, 92,3 % i 97 %. U usporedbi s drugim otapalima koja se uobičajeno koriste u ekstrakciji katehinskih spojeva (etanol, metanol), eutektična otapala pokazala su se kao potencijalno veoma korisna otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti (Zhang i sur, 2014).

2.3.3. STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA

Sadržaj antioksidanasa u tkivu svježeg voća i povrća može biti promijenjen starenjem, agrotehničkim tretiranjem ili skladištenjem. Načini stresa, rukovanje i tretmani kojima su izloženi voće i povrće poput: visoke temperature, radijacije UV-C zrakama, čimbenicima koji utječu na starenje, modificirane atmosfere ili sredstava za sprječavanje posmeđivanja, također mogu utjecati na sadržaj antioksidanasa odnosno polifenola u prehrambenim proizvodima. S obzirom na pozitivno djelovanje polifenola na ljudski organizam, velika je pozornost posvećena njihovom očuvanju u prehrambenim proizvodima tijekom procesiranja i skladištenja proizvoda (Zhang i sur, 2014).

2.3.3.1. Stabilnost antocijana

Glikozilne jedinice i acilne grupe vezane na aglikon, te njihovo mjesto vezanja imaju značajan utjecaj na stabilnost i reaktivnost antocijana. Mjesto supstitucije na antocijanidinu, te broj i pozicija hidroksilnih i metoksilnih grupa na aglikonu utječu na kemijsko ponašanje antocijana. Povećana hidroksilacija na aglikonu stabilizira antocijanidin pa je tako delfinidin stabilniji od cijanidina u zakiseljenom metanolu (Dao i sur.,1998).

Prisutnost hidroksilnih i metoksilnih skupina ne utječe samo na stabilnost antocijana, već i na njihovu boju. Boja antocijana se mijenja od ružičaste prema plavoj kako se broj hidroksilnih skupina povećava (Mazza i Brouillard, 1987).

Glikozilnom supstitucijom postiže se stabilnija molekula antocijana, ali na stabilnost utječe i sama pozicija glikozilacije te vrsta glikozilne jedinice (Timberlake i Bridle, 1996). Povećanje temperature u pH intervalu 2-4 izaziva gubitak glikozilnih jedinica antocijana hidrolizom glikozidne veze, što dovodi do gubitka boje antocijana s obzirom da su aglikoni manje stabilni od svojih glikozidnih oblika.

U vrlo kiselom mediju crveni flavilium kation je dominantan oblik. Povećanjem pH (tablica 2) dolazi do smanjenja intenziteta boje i koncentracije flavilium kationa zbog hidratacije preko nukleofilnih veza, te nastaje bezbojni karbinolni oblik. Također dolazi do brzog gubitka protona s flavilium kationa kako pH dalje raste i nastaje obojeni kinoidalni oblik.

Tablica 2. Ovisnost boje i strukture antocijana o pH (Mazza i Brouillard, 1987)

pH	Struktura i boja antocijana
<2	antocijan kation (crven)
2 - 4,5	kation + leukobaza (crven + bezbojna)
4,5	Leukobaza
4,5 - 8	antocijan kao hidrobaza (ljubičast)
8 - 10	antocijan kao anion hidrobaze (plav)
>10	halkon (žut)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci komine grožđa

U eksperimentalnom radu korišteni su uzorci komine grožđa sorte Plavac mali (berba 2015).

3.1.2. Kemikalije

- Betain, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, PBF
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Folin-Ciocalteu-reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, Kemika, Zagreb, RH
- Glukoza, Kemika, Zagreb, RH
- Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kolin-klorid ($\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidrogensulfat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Prolin, Kemika, RH

3.1.3. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga, HC 240 Tehnica
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)

- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Sjeckalica, Rondo 500, Tefal, Francuska
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex, Bandelin electronic, Njemačka
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. METODE

3.2.1. Sinteza eutektičnih otapala

Za potrebe istraživanja pripravljeno je osam različitih DES-ova s udjelima vode 30% : betain:limunska kiselina, betain:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, te kolin klorid:limunska kiselina (tablica 3). Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom u kojoj se pomiješaju komponente eutektičnog otapala u molarnim omjerima kako je navedeno u tablici 3, uz udjel vode 30 %. Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj mješalici do 3 sata na temperaturi od 40 do 60 °C uz neprestano miješanje, a reakcija je gotova kada se dobije bistro, tekuće i homogeno eutektično otapalo.

Tablica 3. Eutektična otapala korištena u radu

Eutektično otapalo (DES)	Molarni omjer komponenata	Kratica
Betain:Limunska kiselina	1:1	B:Cit
Kolin klorid:Limunska kiselina	2:1	Ch:Cit
Betain:Jabučna kiselina	1:1	B:Ma
Prolin:Jabučna kiselina	1:1	Pro:Ma
Kolin klorid:Prolin:Jabučna kiselina	1:1:1	Ch:Pro:Ma
Jabučna kiselina:Glukoza:Glicerol	1:1:1	Ma:Glu:Gly
Kolin klorid:Jabučna kiselina	1:1	Ch:Ma
Jabučna kiselina:Glukoza	1:1	Ma:Glu

3.2.1. Priprema ekstrakta komine grožđa

Komina grožđa je odvagana i usitnjena sjeckalicom. Uz gore navedena eutektična otapala, za ekstrakciju su korištena i tri konvencionalna otapala: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol. Odvaganoj komini grožđa (1,5 g) dodano je 10 mL određenog otapala te su tako priređene smjese stavljene u ultrazvučnu kupelj na 60 °C i provedena je ekstrakcija u trajanju od jednog sata. Nakon ekstrakcije smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 6000 o min⁻¹ i odvojen je supernatant od taloga, uklonjen pomoću Buchnerovog lijevka te spremljen do analize na + 4 °C.

3.2.2. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu (FC) reagensom

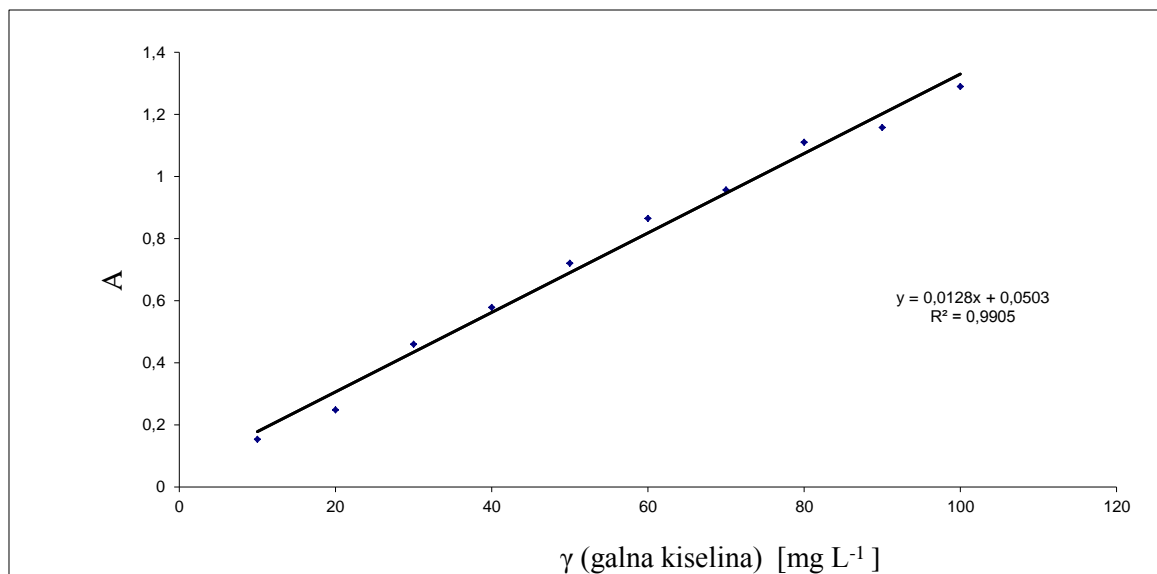
FC reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Nastalo obojenje proporcionalno je udjelu polifenolnih spojeva.

- **Postupak određivanja**

Pripremljene ekstrakte komine grožđa potrebno je 20 puta razrijediti destiliranom vodom. U posebnu epruvetu otpipetira se 0,25 mL razrijeđenog uzorka te se doda 1,25 mL FC reagensa prethodno razrijeđenog 10 puta. Nakon 5 min na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL Na₂CO₃ (75 g L⁻¹) te termostatira u vodenoj kupelji 5 min pri 50 °C. Reakciju je potrebno brzo zaustaviti u ledenoj kupelji te na UV/VIS-spektrofotometru mjeriti apsorbanciju pri $\lambda = 760$ nm (Singleton i sur., 1999).

- **Izrada baždarnog dijagrama**

Priredi se otopina standarda galne kiseline koncentracije 500 mg L⁻¹ te njena razrjeđenja tako da dobivene koncentracije redom iznose 10, 20, 30, 40 i 50 mg L⁻¹. Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nanese se na ordinatu koordinatnog sustava, dok se koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹) nanese na apscisu. Pomoću računala se nacrtava baždarni pravac (slika 7). Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva.



Slika 7. Baždarni dijagram za galnu kiseline s pripadajućim baždarinom pravcem koeficijentom determinacije (R^2)

3.2.3. 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 (Ribereau- Gayon i Stonestreet, 1966).

Postupak određivanja je priprema otopine uzorka u koju se dodaje 1 mL uzorka, 1 mL etanola (96%) s 0,1% klorovodične kiseline i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Otopini uzorka se u jednoj paraleli dodaje 4 mL destilirane vode, a u drugoj 4 mL 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata. Nakon 15 minuta u obje otopine se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm.

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

$$Ac = (875 \times (D1 - D2)) / \gamma \quad [1]$$

pri čemu je:

Ac – maseni udio antocijana u uzorku (mg g^{-1} s.t.)

875 – faktor preračunavanja

D1 – apsorbancija uzorka s 4 mL destilirane vode

D2 – apsorbancija uzorka s 4 mL 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata

γ – masena koncentracija komine u ekstraktu (g L^{-1})

3.2.4. Određivanje stabilnosti

Određivanje stabilnosti temelji se na mjerenju ukupnih polifenola i antocijana u novo pripremljenim ekstraktima koji sadrže DES-ove kroz određeno vrijeme i na određenoj temperaturi. Svaki od novo pripremljenih ekstrakata sa DES-ovim, čuvali smo na tri različite temperature (sobna temperatura, RT, +4 °C i -18 °C) te spektrofotometrijski određivali udjele polifenola i antocijana nakon 3, 7, 15, 30 i 60 dana. Ovisno o dobivenim rezultatima određivali smo stabilnost koju smo izrazili kao c/c_0 gdje je :

$$c/c_0 = A/A_0 \quad [2]$$

pri čemu je:

A_0 = početna apsorbancija uzorka

A = apsorbancija uzorka nakon određenog vremena na određenoj temperaturi

3.3. OBRADA PODATAKA

Sva mjerenja su provedena u triplicatu, tako da su rezultati prikazani kao prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazana zajedno sa standardnom devijacijom $\pm S.D.$ ($n=3$). Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini vjerojatnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tradicionalna otapala kojima se najčešće izvode postupci ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnih materijala štetna su za okoliš i opasna po zdravlje ljudi. Zato se danas provode mnogobrojna istraživanja kojima se nastoji što više koristiti alternativna otapala u ekstrakciji fitokemikalija kako bi se smanjio utjecaj tradicionalnih otapala na okoliš (Zhang i sur, 2014).

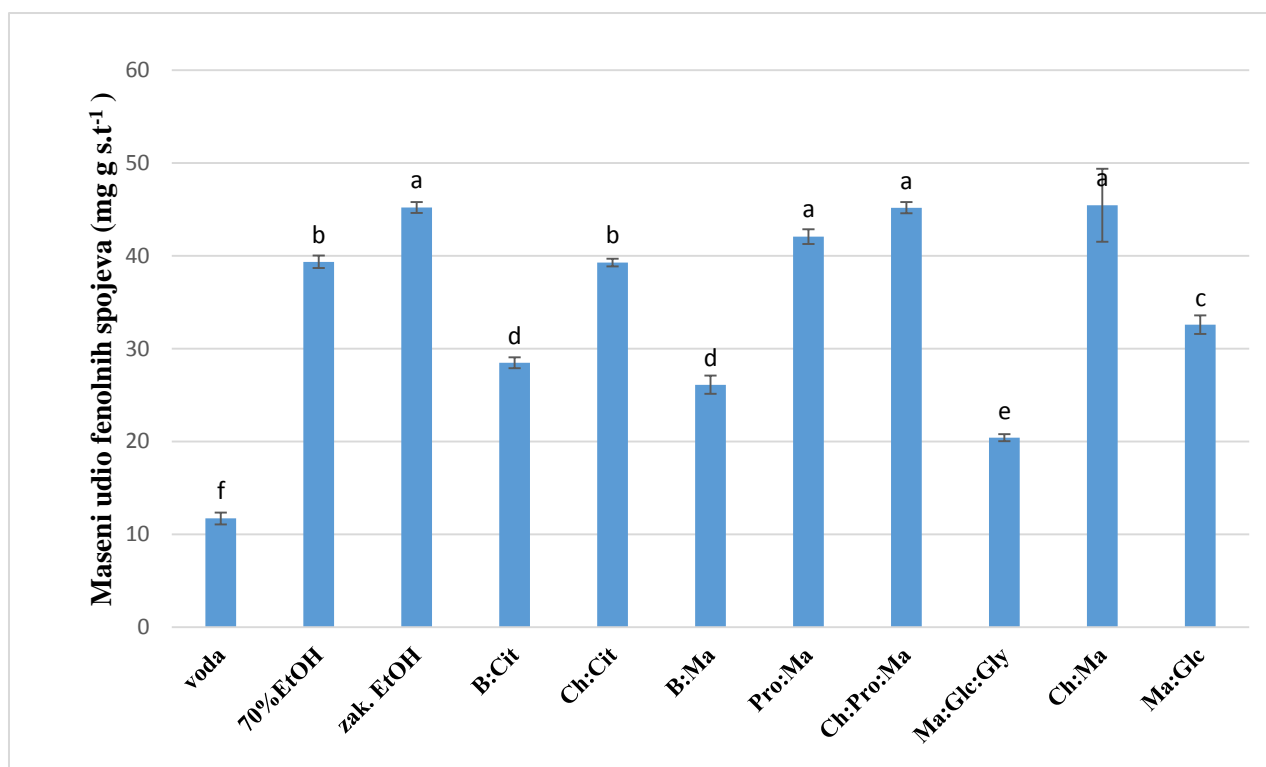
Potrebno je pronaći otapala koja će pokazati jednaku ili veću učinkovitost ekstrakcije i veću stabilnost ekstrahiranih spojeva u usporedbi s klasičnim otapalima. Iz tog razloga u ovom radu je ispitivana stabilnost polifenolnih spojeva u ekstraktima koji su pripremljeni različitim eutektičnih otapalima. Pripremljeni ekstrakti čuvani su tijekom 60 dana, a uzorci su analizirani nakon određenog vremena (3, 7, 15, 30 i 60 dana) pri tri različite temperature: RT (sobna temperatura), + 4 °C i - 18 °C.

Analizirani ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali pripremljeni su primjenom osam različitih eutektičnih otapala kako slijedi: betain:limunska kiselina, kolin klorid:limunska kiselina, betain:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:jabučna kiselina i jabučna kiselina:glukoza. Isto tako, analizirani su i ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali pripremljeni u konvencionalnim otapalima: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol.

U različito pripremljenim ekstraktima komine grožđa, određeni su udjeli ukupnih polifenola i udio antocijana. Ukupni polifenoli određeni su u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom uz galnu kiselinu kao standard, dok su ukupni antocijani određeni u reakciji vezanja hidrogensulfitnog iona na 2' položaj pri čemu se obojeni kation antocijana prevodi u bezbojni leuko oblik.

4.1. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova

Kvantitativna metoda određivanja ukupnih polifenolnih spojeva provedena je u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Rezultati mjerenja izraženi su u mg galne kiseline po gramu suhe tvari (s.t.) uzorka. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), te su prikazani na slici 8.



Slika 8. Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-k) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu, B: Cit= ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, Ch: Cit= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina, B: Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro: Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, Ch: Pro: Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, Ma: Glc: Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, Ch: Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma: Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

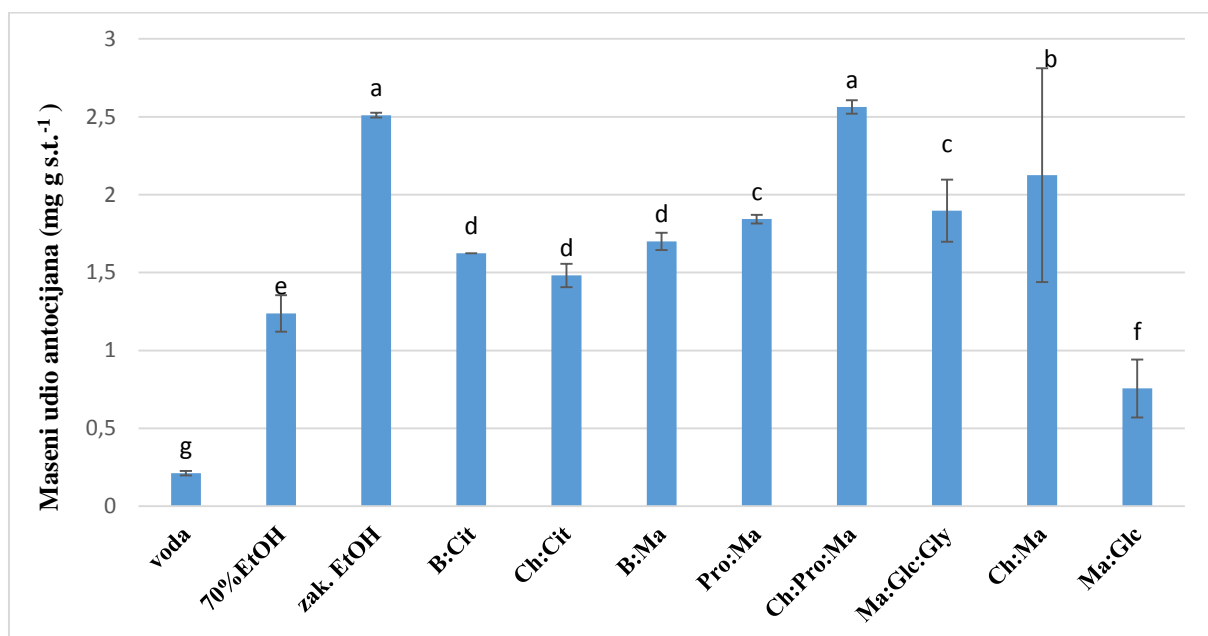
Dobiveni rezultati analize, izraženi na ekvivalent galne kiseline, pokazali su da se sa eutektičnim otapalom kolin klorid:jabučna kiselina ekstrahiralo najviše polifenolnih spojeva ($45,18 \pm 3,93$ mg g⁻¹ s.t.). Vrlo slična količina polifenola je ekstrahirana i upotrebom otapala prolin:jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina. Primjenom konvencionalnih otapala, zakiseljenog 70% etanola ($45,20 \pm 0,58$ mg g⁻¹ s.t.), dobiveni su slični rezultati ekstrakcije polifenolnih spojeva kao i kod ekstrakcije pomoću tri prethodno navedena eutektična otapala. Eutektičnim otapalom jabučna kiselina:glukoza:glicerol je ekstrahirano najmanje polifenolnih spojeva ($20,40 \pm 0,39$ mg g⁻¹ s.t.) jednako kao što je i najmanje polifenola ekstrahirano primjenom vode u usporedbi sa ostalim konvencionalnim otapalima.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakcija pomoću eutektičnih otapala Ch:Ma, Pro:Ma i Ch:Pro:Ma ima vrlo visoku učinkovitost te da bi mogli zamjeniti uporabu zakiseljenog 70% etanola pri ekstrakciji polifenolnih spojeva.

Usporedbom učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva eutektičnim otapalima i 70 %-tnim etanolom te vodom (slika 8) možemo zaključiti da je primjenom svih eutektičnih otapala, postignuta bolja ekstrakcija nego s 70 %-tnim etanolom i vodom.

4.2. ANTOCIJANI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova

Spektrofotometrijska metoda određivanja antocijana provodi se vezanjem hidrogensulfitnog iona na 2' položaj čime se prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Rezultati mjerenja izraženi su u mg antocijana po g suhe tvari (s.t.) uzorka i prikazani su na slici 9 te izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3).



Slika 9. Maseni udio antocijana u ekstraktima komine grožđa *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-k) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu, B:Cit= ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, Ch:Cit= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina, B:Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, Ma:Glc:Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, Ch:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma:Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

Rezultati mjerenja pokazuju da euteklično otapalo kolin klorid:prolin:jabučna kiselina najbolje ekstrahira antocijane ($2,56 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$), a jabučna kiselina:glukoza najslabije ekstrahira antocijane ($0,76 \pm 0,19 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$).

Za usporedbu učinkovitosti ekstrakcije konvencionalnim i alternativnim otapalima, komina Plavca malog ekstrahirana je i zakiseljenim etanolom (1 % 12 M HCl i 70 % etanol), jer su Revilla i sur. (1998) u istraživanju zaključili da je kiselost otapala ključni faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije antocijana. Etanol se koristi kao otapalo u konvencionalnim načinima ekstrakcije antocijana. Rezultati pokazuju da Ch:Pro:Ma ima veću učinkovitost ekstrakcije antocijana od zakiseljenog 70 % EtOH. Ostala ispitana euteklična otapala imaju manju sposobnost ekstrakcije antocijana od zakiseljenog 70% EtOH.

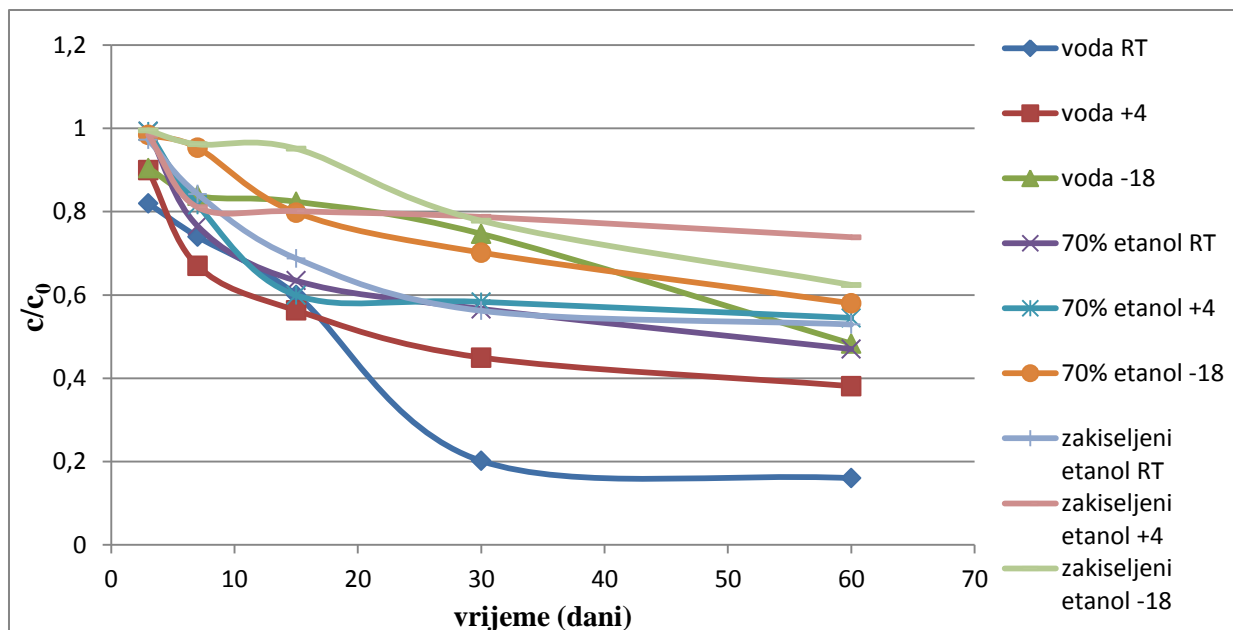
Primjenom konvencionalnih otapala, najviše je antocijana ekstrahirano zakiseljenim 70% etanolom, čime se može potvrditi i gore navedeno iz prethodnih istraživanja. To je da kiselost otapala jedan od ključnih faktora ekstrakcije antocijana pa su rezultati u skladu sa očekivanim. Najmanje antocijana ekstrahirano je primjenom vode ($0,21 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$).

4.3. STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENIM PRIMJENOM DES-ova

Ukupni polifenoli kao i antocijani određivani su spektrofotometrijski u više vremenskih točaka, odnosno nakon 3, 7, 15, 30 i 60 dana od pripreve ekstrakata, pri čemu su dobiveni rezultati pokazali stabilnost ukupnih polifenola i antocijana u ekstraktima pripremljenim kako sa eutekličnim otapalima tako i primjenom konvencionalnih otapala.

4.3.1. Stabilnost ukupnih polifenola

Posljednjih godina velika je pozornost istraživača usmjerena na biološki aktivne sastojke hrane, posebice polifenole koji imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Očuvanje prirodnih bioaktivnih sastojaka vrlo je važno za njihovu daljnju primjenu. Različiti tehnološki parametri, posebice visoka temperatura, mogu u velikoj mjeri utjecati na degradaciju prirodnih sastojaka i smanjenje njihova udjela, ali i na tvorbu sekundarnih, najčešće, nepoželjnih sastojaka.

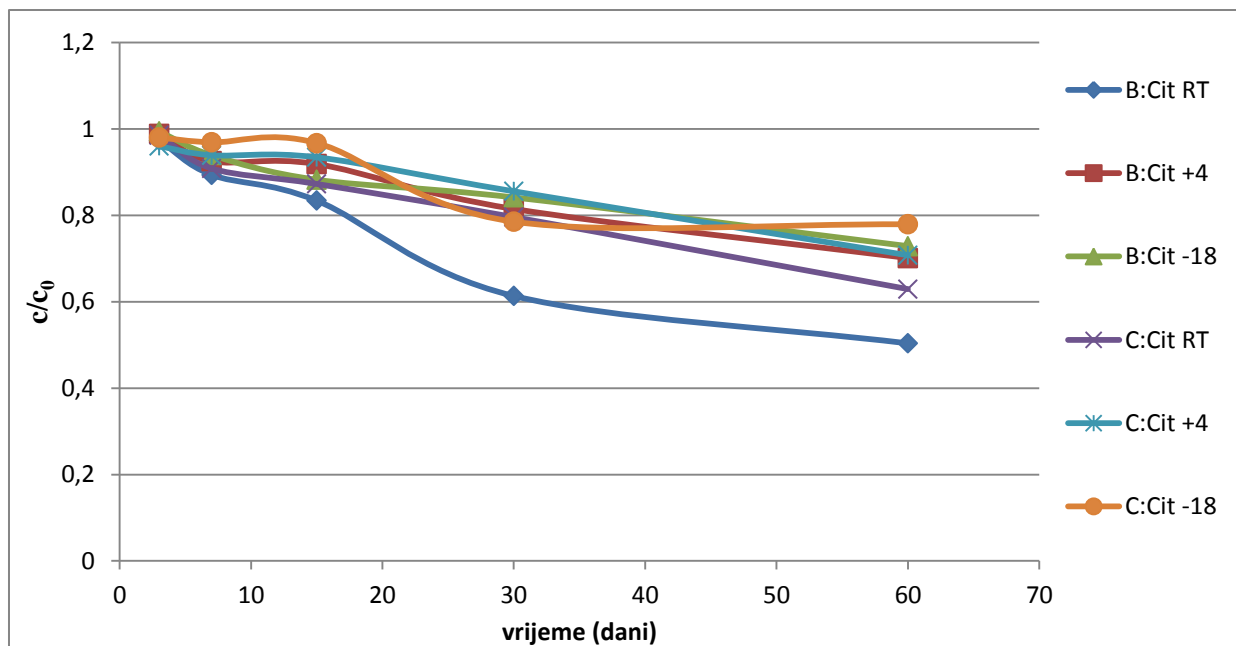


Slika 10. Stabilnost ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima pripremljenih sa vodom, 70% etanolom i zakiseljenim 70% etanolom *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3),

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu

Slika 10 prikazuje stabilnost ekstrakata pripremljenih sa konvencionalnim otapalima ovisno o vremenu na sve tri temperature (RT, + 4 °C i - 18 °C). Iz rezultata možemo vidjeti da daleko najveću stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa zakiseljenim 70% etanolom (0,78) koja se zadržala svih 60 dana mjerenja pri svim temperaturama dok najmanju stabilnost, pokazuju ekstrakti pripremljeni s vodom (0,19). Također je vidljivo da stabilnost polifenolnih spojeva kod svih ekstrakata tijekom vremena polako pada. Ovisnost temperature pokazuje da je stabilnost kod većine ekstrakata visoka pri temperaturi od -18 °C, iz čega možemo zaključiti da kiselost kao i niža temperatura pogoduju većoj stabilnosti polifenola tijekom čuvanja i skladištenja ekstrakata komine grožđa. Prikazani rezultati ukazuju na to da što je vrijednost c/c_0 bliža jedinici to je stabilnost polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa bolja.



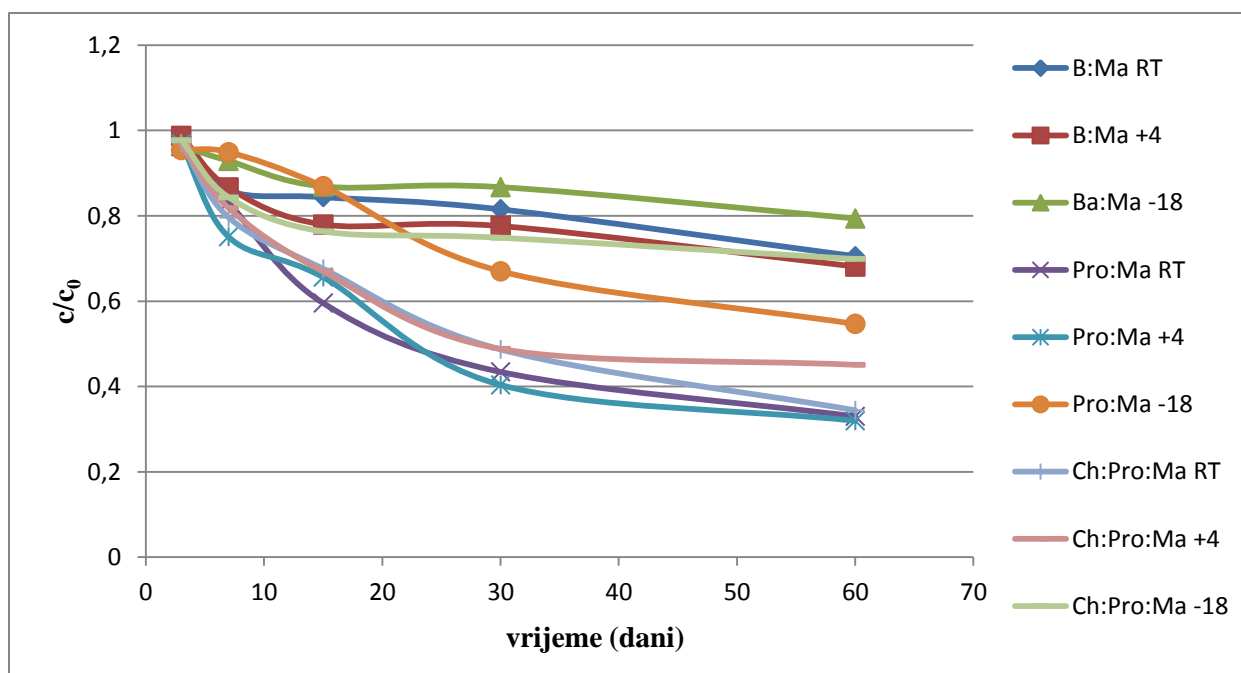
Slika 11. Stabilnost ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima pripremljenih sa eutektičnim otapalima koji sadrže limunsku kiselinu *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** B:Cit= ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, Ch:Cit= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina

Na slici 11 prikazani su rezultati stabilnosti ekstrakata koji su pripremljeni limunskom kiselinom. Visoka stabilnost zamijećena je kod većine prikazanih ekstrakata prvih 15 dana mjerenja. Tijekom vremena, stabilnost pada, ali se ne gubi u potpunosti. Najveću stabilnost ukupnih polifenola pokazuju ekstrakti pripremljeni sa C:Cit čuvani na + 4 °C (0,78) i - 18 °C (0,80), dok najmanju stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa B:Cit čuvani na sobnoj temperaturi (RT) (0,50). Stoga, iz navedenoga možemo zaključiti da rezultati prikazani na slici 11 ukazuju na visoku stabilnost polifenolnih spojeva u većine ekstrakata pripremljenih sa limunskom kiselinom, osobito tijekom prvih 15 dana i to na temperaturi od - 18 °C.

U usporedbi sa konvencionalnim otapalima, ekstrakti pripremljeni sa C:Cit i B:Cit, tijekom vremena pokazuju bolju stabilnost ukupnih polifenolnih spojeva pri svim temperaturama skladištenja. Stabilnost polifenolnih spojeva u ekstraktima pripremljenim sa zakiseljenim 70% etanolom nakon 7 dana mjerenja postepeno pada, dok je kod ekstrakata pripremljenih sa B:Cit i C:Cit stabilnost relativno konstantna tijekom svih 60 dana.

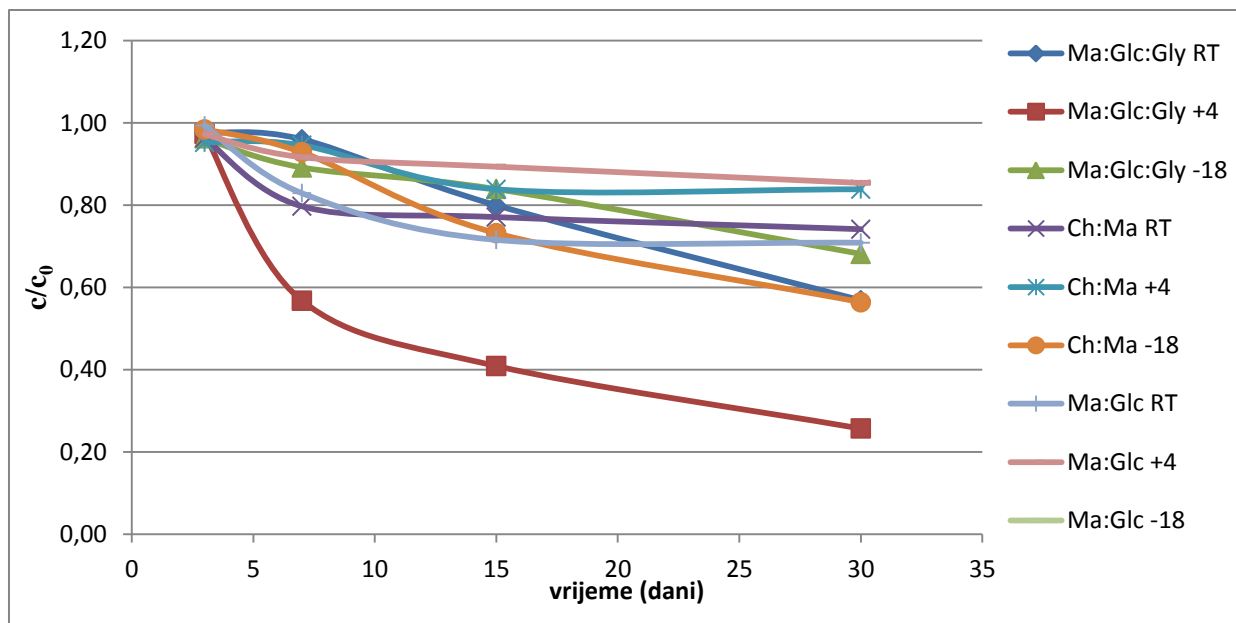


Slika 12. Stabilnost ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima pripremljenih sa eutektičnim otapalima koji sadrže jabučnu kiselinu *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** B:Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klori:prolin:jabučna kiselina

Slike 12 i 13 prikazuju stabilnost polifenola kod ekstrakata koji su pripremljeni primjenom NADES-a s jabučnom kiselinom tijekom 60 dana mjerenja pri sve tri temperature. Na slici 12 je vidljivo da najveću stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa B:Ma čuvani na - 18 °C (0,80) koja je tijekom vremena relativno konstantna. Visoku stabilnost pokazuju i ekstrakti pripremljeni sa B:Ma čuvani na sobnoj temperaturi i pri + 4°C, kao i ekstrakt pripremljen sa Pro:Ma čuvan na - 18 °C (0,60). Prilično nisku stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa Ch:Pro:Ma (0,35) čuvani na sve tri navedene temperature.



Slika 13. Stabilnost ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima pripremljenih sa eutekničnim otapalima koji sadrže jabučnu kiselinu *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** Ma:Glc:Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, Ch:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma:Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

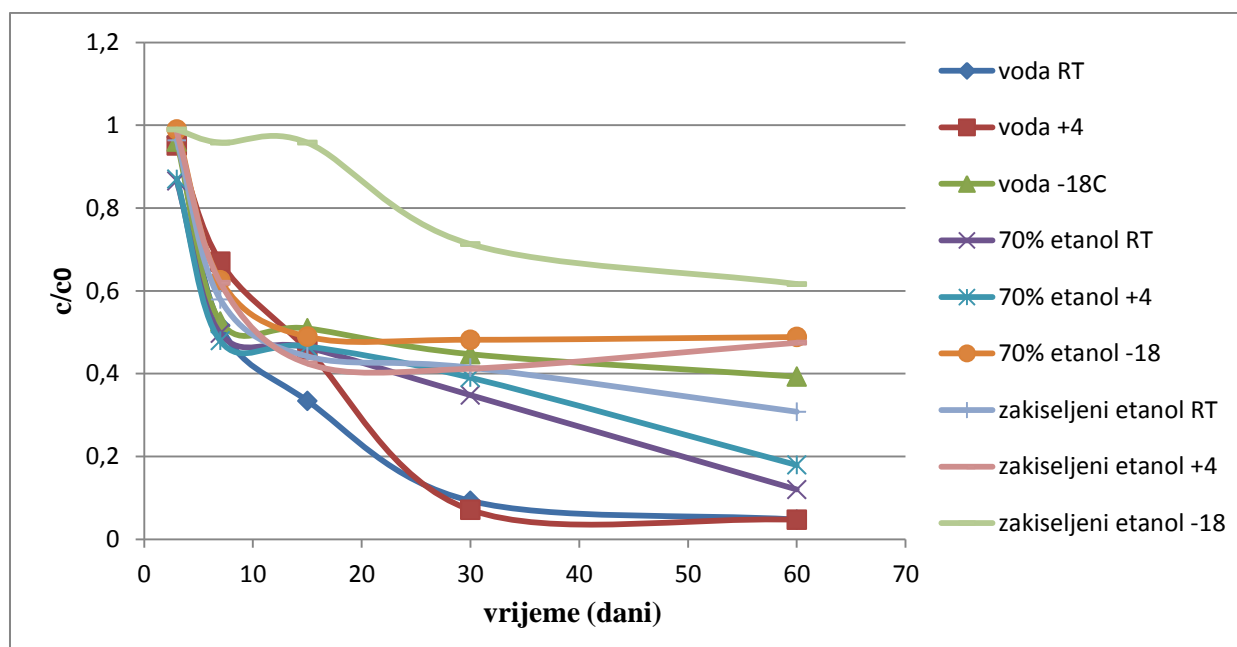
Na slici 13 vidljivo je da je kod većine ekstrakata stabilnost polifenola relativno visoka i vrlo slična (u rasponu od 0,8 do 0,9) te postepeno pada tijekom vremena skladištenja, osim kod ekstrakta čuvanog na +4°C pripremljenog sa Ma:Glc:Gly (0,25) gdje je primjećena veoma niska stabilnost polifenolnih spojeva već nakon 7. dana čuvanja. Najbolja stabilnost, kao i kod ostalih uzoraka u prethodno navedenim rezultatima, zamijećena je pri temperaturi - 18 °C.

Stoga, iz svega gore navedenog možemo reći da ekstrakti koji su čuvani u zamrzivaču na -18 °C pokazuju puno veću stabilnost ukupnih polifenola u odnosu na ekstrakte čuvane na sobnoj temperaturi (RT) i u hladnjaku (+4 °C). Također možemo reći da stabilnost kod svih uzoraka prilično visoka na početku mjerenja, tj. da tijekom trajanja skladištenja postepeno opada.

Najveću stabilnost ukupnih polifenola kroz svih 60 dana mjerenja, pokazuju ekstrakti pripremljeni sa C:Cit, a najmanju ekstrakti pripremljeni sa Ma:Glc:Gly. Primjenom konvencionalnih otapala, najveću stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa zakiseljenim 70% etanolom. Voda u usporedbi sa svim otapalima pokazuje najmanju stabilnost (0,19) ukupnih polifenola, manju i od eutekčnih otapala.

4.3.2. Stabilnost antocijana u ekstraktima komine grožđa

Antocijanini su vrlo nestabilni. Na njihovu stabilnost utječu: koncentracija, svjetlo, utjecaj a_w (aktivnost vode) i molekularni kopigmentacijski efekti. Svjetlost je značajan faktor destabilizacije. Ispitivanja su pokazala da stabilnost antocijana raste kad se smanjuje aktivnost vode (a_w) dok je promjena boje posljedica reakcije antocijana nastalim kinonima. Brzina destrukcije antocijana ovisi o pH, jer se ubrzava pri višoj pH vrijednosti. Brzina degradativnih reakcija antocijana slijedi brzinu degradativnih reakcija šećera do furfurala pa tako koncentracije fruktoze, arabinoze, laktoze i sarboze imaju veći degradativni učinak od glukoze, saharoze i maltoze (Anonymous 3, 2013).

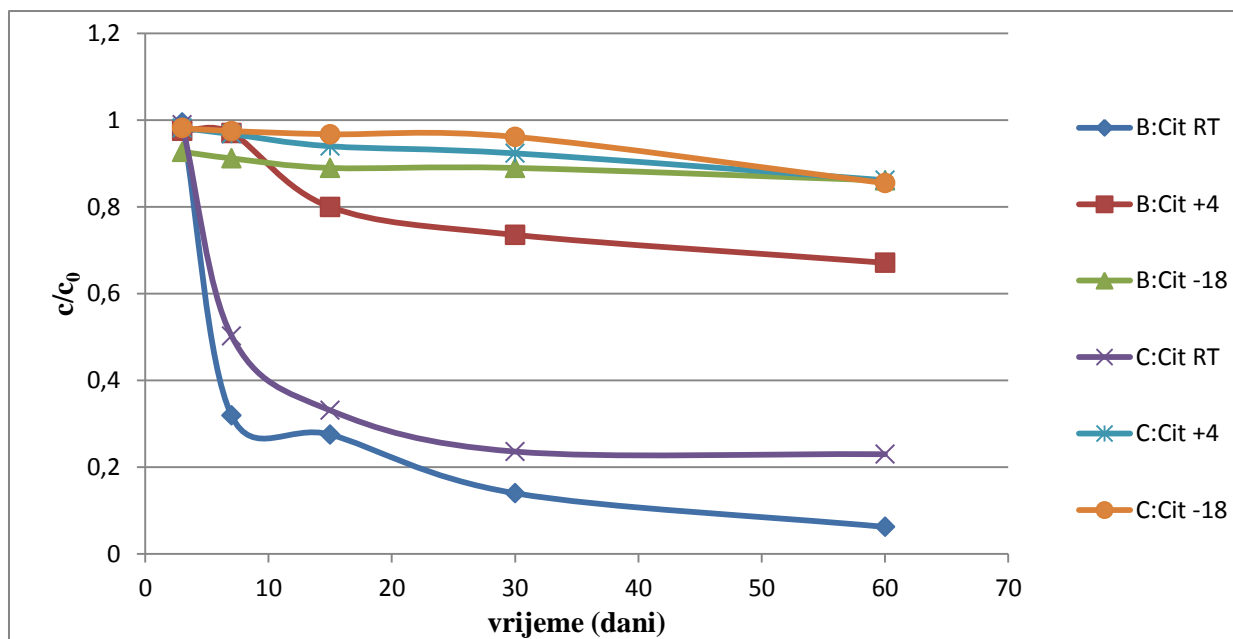


Slika 14. Stabilnost antocijana u ekstraktima pripremljenih sa vodom, 70% etanolom i zakiseljenim 70% etanolom *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu

Rezultati mjerenja na slici 14 prikazuju stabilnost antocijana u ekstraktima pripremljenim konvencionalnim otapalima kroz 60 dana čuvanja na sve tri temperature (RT, +4 °C i -18 °C). Iz navedenih rezultata zamjećujemo da ekstrakti čuvani pri -18 °C i pripremljeni sa zakiseljenim 70% etanolom (0,65) pokazuju visoku stabilnost ukupnih antocijana u odnosu na sva ostala otapala. Ekstrakti pripremljeni ostalim otapalima pokazuju prilično nisku stabilnost, pri čemu najmanju pokazuju oni pripremljeni sa vodom (0,10) pri sve tri ispitivane temperature.



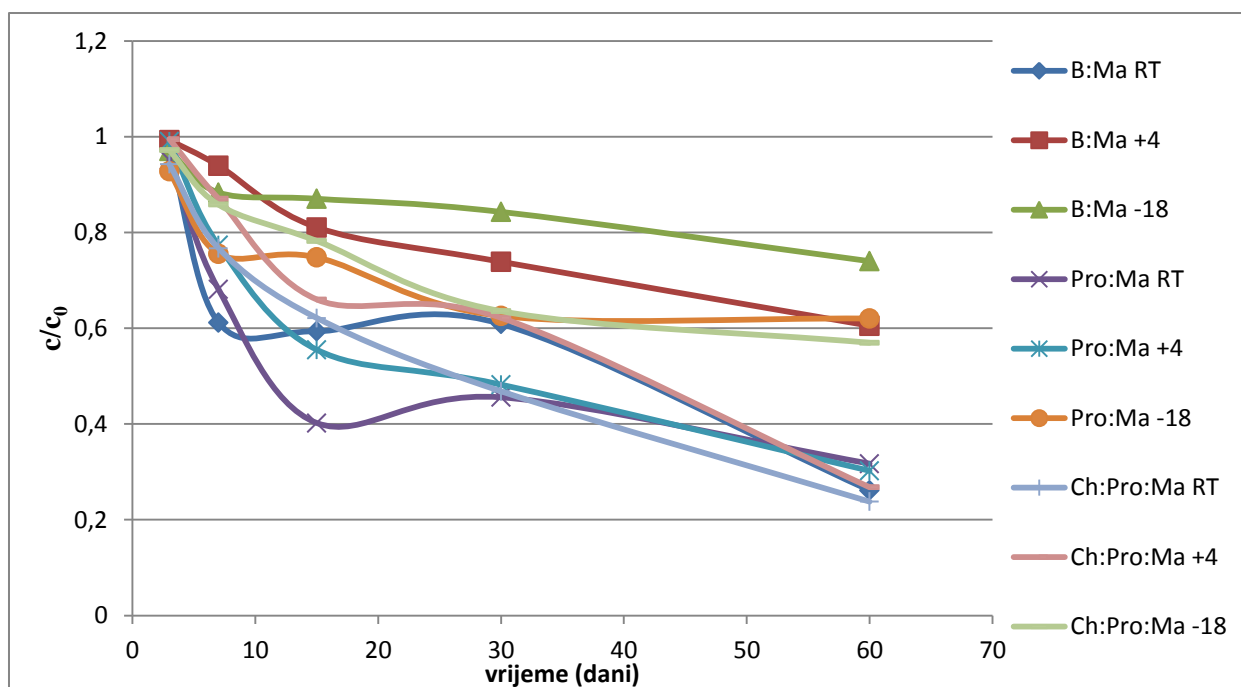
Slika 15. Stabilnost antocijana u ekstraktima pripremljenih sa eutektičnim otapalima koji sadrže limunsku kiselinu *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** B:Cit= ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, Ch:Cit= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina

Slika 15 prikazuje stabilnost ukupnih antocijana u ekstraktima pripremljenim sa limunskom kiselinom. Visoku stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa C:Cit čuvani na +4 °C (0,90) i -18 °C (0,90), kao i ekstrakti pripremljeni sa B:Cit čuvani na -18 °C. Stabilnost je tijekom vremena kod sva tri navedena ekstrakta relativno konstantna. Nisku stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa B:Cit (0,10) i C:Cit (0,21) pri RT kao i oni pripremljeni sa B:Cit pri +4 °C.

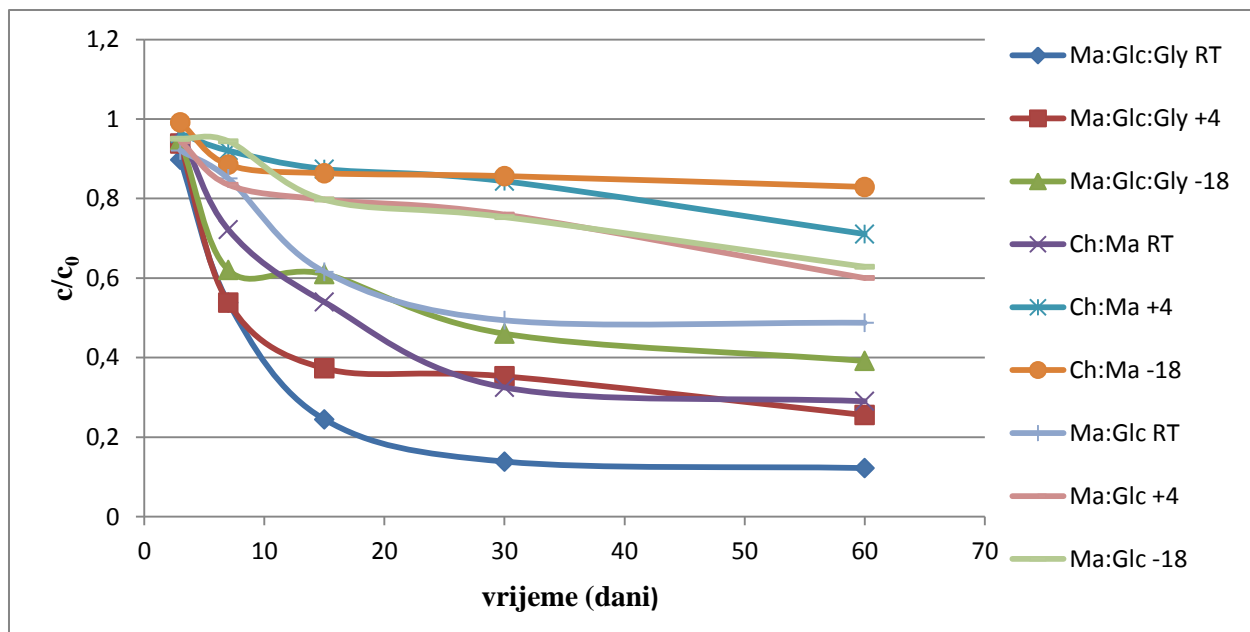
U usporedbi sa konvencionalnim otapalima, stabilnost antocijana tijekom svih 60 dana je veća kod ekstrakata pripremljenih sa C:Cit i B:Cit, dok je stabilnost kod konvencionalnih otapala visoka samo prvih 7 dana mjerenja, a nakon toga značajno opada.



Slika 16. Stabilnost antocijana u ekstraktima pripremljenih sa eutektičnim otapalima koji sadrže jabučnu kiselinu *, **
 * rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)
 ** B:Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina

Slike 16 i 17 pokazuju rezultate stabilnosti ukupnih antocijana u ekstraktima pripremljenim DES-ovima koji sadrže jabučnu kiselinu tijekom svih 60 dana, pri sve tri temperature čuvanja. Stabilnost je kod svih ekstrakata najveća u prvim danima skladištenja dok s vremenom opada.

Slika 16 pokazuje da najveću stabilnost ukupnih antocijana imaju ekstrakti čuvani pri -18 °C pripremljeni sa B:Ma (0,76), Pro:Ma (0,63) i Ch:Pro:Ma (0,58). Kod preostale dvije temperature čuvanja stabilnost je relativno niska te je s vremenom sve niža (< 0,40). Vrlo nisku stabilnost ukupnih antocijana pokazuju ekstrakti pripremljeni sa Pro:Ma (0,32) pri sobnoj temperaturi.



Slika 17. Stabilnost antocijana u ekstraktima pripremljenih sa eutektičnim otapalima koji sadrže jabučnu kiselinu *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3)

** Ma:Glc:Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, Ch:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma:Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

Na slici 17 možemo zamijetiti slično kao i kod prethodno prikazanih rezultata. Stabilnost ukupnih antocijana u ekstraktima opada tijekom vremena čuvanja te je najveće pri temperaturi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Visoku stabilnost pokazuju ekstrakti pripremljeni sa Ch:Ma pri temperaturi skladištenja $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,75) i $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,83) kao i ekstrakti pripremljeni sa Ma:Glc (0,60 i 0,63) pri istim temperaturama ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vrlo nisku stabilnost ukupnih antocijana pokazuju ekstrakti pripremljeni sa Ma:Glc:Gly ($< 0,40$) pri sve tri ispitane temperature skladištenja.

Iz gore navedenoga možemo zaključiti da stabilnost ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa tijekom vremena čuvanja opada kao i stabilnost ukupnih polifenola. Isto tako zamijećeno je da je stabilnost ukupnih antocijana kod većine ekstrakata najveća pri temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U usporedbi stabilnosti antocijana i polifenolnih spojeva, vidljivo je da ipak nešto veću stabilnost tijekom vremena skladištenja pokazuju polifenolni spojevi. To se posebice ističe kod ekstrakata koji sadrže šećere, koji su jedan od faktora degradacije antocijana.

Ukupni rezultati pokazuju da je stabilnost ekstrahiranih spojeva ukupnih polifenola i antocijana koji su određivani vrlo visoka kod svih uzoraka pri svim temperaturama nakon 3 dana čuvanja. Tijekom vremena skladištenja, stabilnost ekstrahiranih spojeva je sve niža.

Rezultati pokazuju da je stabilnost ekstrahiranih spojeva ovisno o temperaturi, najveća kod uzoraka čuvanih u zamrzivaču na -18 °C. Iz navedenog možemo zaključiti da je niska temperatura kao i niži pH medij povoljniji i povoljno djeluje na stabilnost kako polifenola tako i antocijana.

Iz rezultata je vidljivo da su najveću stabilnost ukupni polifenoli i antocijani tijekom svih 60 dana čuvanja pri svim ispitanim temperaturama zadržali ekstrakti pripremljeni B: Cit i C: Cit, a primjenom konvencionalnih otapala ekstrakti pripremljeni zakiseljenim 70% etanolom. Najmanju stabilnost ukupnih polifenola kao i antocijana pokazuju ekstrakti pripremljeni sa Ma: Glc: Gly pri sve tri temperature, dok kod konvencionalnih otapala voda pokazuje najmanju stabilnost.

U istraživanju Dai i sur. (2014) također je pokazano da prirodna eutektična otapala (NADES) pokazuju veću stabilnost prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva iz šafranike u usporedbi sa vodom i 40% etanolom pri različitim uvjetima, kao što su visoka temperatura, svjetlost i vrijeme skladištenja. Također je dokazano i da NADES-i koji su sadržavali šećere zbog velike viskoznosti i jakih vodikovih veza između otopljene tvari i molekula otapala doprinose velikoj stabilnosti ekstrahiranih polifenolnih spojeva.

Rezultati u ovom radu pokazuju da se eutektičnim otapalima mogu postići vrlo dobri rezultati ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljnih materijala, koji bi zbog svojih antioksidativnih i antitumorskih svojstava mogli biti sastojci prehrambenih proizvoda, dodataka prehrani ili lijekova, posebno kad su ekstrahirani „zelenim otapalom“ kao što su prirodna eutektična otapala, sigurna za okoliš i ljudsku upotrebu.

Učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljaka primjenom NADES-a može se poboljšati optimiranjem ostupka ekstrakcije, prilagodbom trajanja i temperature ekstrakcije, te odabirom manje viskoznih i kiselijih eutektičnih otapala, što će svakako biti predmet daljnjih istraživanja u ovom području.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa sorte Plavac mali najučinkovitija je sa eutektnim otapalom kolin klorid:jabučna kiselina te potom kolin klorid:prolin:jabučna i kolin klorid:jabučna kiselina.
2. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali najučinkovitija je upotrebom eutektnog otapala kolin klorid:prolin:jabučna kiselina te kolin klorid:jabučna kiselina.
3. Eutektna otapala pokazala su se učinkovitijim u ekstrakciji polifenolnih spojeva i antocijana u odnosu na klasičnu ekstrakciju etanolom i zakiseljenim etanolom.
4. Najveću stabilnost ekstrahiranih polifenola i antocijana tijekom 60 dana skladištenja pri tri temperature čuvanja, pokazuju ekstrakti pripremljeni otapalima betain:limunska kiselina i kolin klorid:limunska kiselina.
5. Primjenom konvencionalnih otapala najveću stabilnost ekstrahiranih polifenola i antocijana tijekom 60 dana skladištenja, pri tri temperature čuvanja, pokazuju ekstrakti pripremljeni sa zakiseljenim 70% etanolom.
6. Eutektna otapala su se također pokazala pogodnijim za stabilnost polifenolnih spojeva i antocijana u odnosu na klasična otapala kao što su etanol i zakiseljeni etanol.
7. Nešto je veća stabilnost polifenolnih spojeva u odnosu na antocijane, posebice kod ekstrakata koji sadrže glukozu.
8. Rezultati istraživanja ukazuju na mogućnost zamjene klasičnih organskih otapala eutektnim otapalima za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa, a obzirom na učinkovitost ekstrakcije i stabilnost ekstrahiranih spojeva.

6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2012) Grožđe, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gro%C5%BE%C4%91e_Crna_%C4%8Darolija.JPG/>, pristupljeno 25.06.2016.
- Anonymous 2 (2013) Komina grožđa, <<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-vocnih-rakija>>, pristupljeno 02.07.2016.
- Anonymous 3 (2013) Stabilnost antocijana, <<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti>>, pristupljeno 02.07.2016.
- Aharoni, A. (2007) The plant phenolic compounds: Introduction & The Flavonoids. <http://www.weizmann.ac.il/plants/aharoni/PlantMetabolomeCourse/May092007.pdf>, Pristupljeno 25.06.2016.
- Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., Tringali, C. (2004) Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar “Nerello Mascalese”. *Food Chem.* **88**, 599–607.
- Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., Tringali, C. (2008) Polyphenolenriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* **99**, 5960–5966.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.
- Bloor, S. J. (2001) Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Meth. in Enzym.* **335**, 3–14.
- Brennecke, J. F., Maginn, E. J. (2001) Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing. *AIChE Journal* **47**, 2384-2389.
- Dai, J. i Mumper, R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.
- Dai, Y. T., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2014) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278.

- Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **115**, 379-385.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504.
- Haslam, E. (1989) Plant polyphenols- vegetable tannins revisited. Cambridge University Press, Cambridge
- Hertzog, D.I., Tica, O.S. (2012) Molecular mechanisms underlying the anticancerous action of flavonoids. *Curr. Healt Sci. J.* **38**, 145-149.
- Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.
- Jašić, M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. <<http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic> Uvod_u_aktivne_bioloski_aktivne_komponente_hrane.pdf >, pristupljeno 02.07.2016.
- Kaur, M., Agarwal, C., Agarwal, R. (2009) Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract and Other Grape-Based Products. *J. Nutr.* **139**, 1806–1812.
- Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **55**, 279-290.
- Kumar, S., Pandey, A.K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Sci. World J.* **196**, 1-16.
- Lovrić, J. (2001) Slobodni radikali i oksidativni stres. U: Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. (Bradamante V, Lacković Z. ured) Medicinska naklada, Zagreb, str. 1-12.
- Mazza, G., Brouillard, R. (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **25**, 207-225.
- Morrison, H. G., Sun, C. C., Neervannan, S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* **378**, 136–139.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L. (2014) Natural deep eutectic solvents – solvents for 21st century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

- Revilla, E., Garcí'a-Beneytez, E., Cabello, F., Martí'n-Ortega, G., Ryan, J.M. (2001) Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A*, **915**, 53–60.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401-436.
- Rodriguez, M. R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687-693.
- Santos Dinnies, R., Shetty, K., Cecchini Lourenço, A., Da Silva Miglioranza, L.H. (2012) Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semin. Cienc. Agrar.* **33**, 655-666.
- Seeram, N. P., Nair, M. G. (2002) Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins and catechins, *J. Agr. Food Chem.* **50**, 5338-5312.
- Sharma, G., Tyagi, A. K., Singh, R. P., Chan, D. C., Agarwal, R. (2004) Synergistic anticancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res. Tr.* **85**, 1-12.
- Shrikhande, A.J. (2000) Wine by-products with health benefits. *Food Res. Internat.* **33**, 469-474.
- Spacil, Z., Novakova, L., Solich, P. (2008) Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* **76**, 189–199.
- Timberlake, C. F., Bridle, P. (1966) Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solutions. *Nature, (London)* **212**, 158-159.
- Tsao, R., McCallum, J. (2009.) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: *Chemistry, Nutritional Value and Stability*. L.A. de la Rosa, E. Alvarez Parrilla, E., and G. Gonzalez -Aguilar, eds Ames, IA: Blackwell Publishing, pp. 131-153.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.

Wahle, KW., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S.D. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **698**, 36-51.

Wichi, H. P. (1988) Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 717-723.

Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2004) Health aspects of functional grapeseed constituents. *Trends in Food Sci. Tech.* **15**, 422–433.

Zhang, Q., Vieger, K., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rew.* **41**, 7108-7146.