Izolacija i identifikacija antocijana iz komine grožđa primjenom eutektičnih otapala

Habjanec, Tena

Master's thesis / Diplomski 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:159:410681

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2017.

Tena Habjanec
603/ MB

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA ANTOCIJANA IZ KOMINE GROŽĐA PRIMJENOM EUTEKTIČNIH OTAPALA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inžinjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, a u sklopu HRZZ projekta broj 9550 „Zelena otapala za zelene tehnologije“.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovog rada, velikom strpljenju, upornosti i savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj radnoj atmosferi, razumijevanju i savjetima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Diplomski rad**
Prehrambeno–biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA ANTOCIJANA IZ KOMINE GROŽĐA PRIMJENOM EUTEKTIČNIH OTAPALA

Tena Habjanec 603/MB

Sažetak: Razvoj zelenih otapala važan je zadatak za industriju, pa se stoga se u posljednje vrijeme intenzivno istražuju eutektična otapala zbog njihovih poželjnih karakteristika kao što su niska toksičnost i biorazgradivost. Eutektična otapala zbog mogućnost prilagodbe njihovih svojstava odabirom početnih sirovina, privukla su pozornost u sintetskoj kemiji i biokatalizi, separacijskim postupcima, ali kao i medij za ekstrakciju prirodnih spojeva. U ovom radu pripremljeni su ekstrakti komine grožđa s osam različitih eutektičnih otapala i s etanolom, zakiseljenim etanolom i vodom. Nakon ekstrakcije provedena je HPLC analiza kako bi se identificirali antocijani koji se nalaze u tako pripremljenim ekstraktima komine grožđa. Eutektična otapala kolin klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, prolin: jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina pokazuju bolju sposobnost ekstrakcije od za tu namjenu najčešće korištenog organskog otapala, zakiseljenog etanola.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 10 slika, 9 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i digitalnom (CD) obliku pohranjen u: Knjižnici 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:. Siječanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTHOCYANINS FROM GRAPE POMACE USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Tena Habjanec 603/MB

Abstract: Development of the green solvents is a very important task for the industry, so lately eutectic solvents have been intensivly studied because of their desirable characteristics, such as low toxicity and biodegradability. Eutectic solvents has drawn attention in sintetic chemistry and biocatalysis, not only because of their possibility to select the initial raw material with separation procedures but also as a media for extraction of natural compounds. Therefore, in this work, grape pomace extracts are prepared with eight different deep eutectic solvents and ethanol, acidified ethanol and water. Extracts of grape pomace in choline chlorid:malic acid and choline chlorid:proline:malic acid and proline:malic acid have better efficiency of antocyanins extraction what indicates that they are good candidates for further development and usage in the green extraction

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

Thesis contains: 40 pages, 10 figures, 9 table, 55 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: *PhD. Ivana, Radojčić Redovniković, Associate Professor*

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

Thesis defended: January, 2017

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. NUSPRODUKTI PROIZVODNJE VINA 2
2.1.1. Polifenolni sastav komine 6
2.1.2. Flavonoidi komine 7
2.1.3. Antocijani 8
2.2. Potencijal biološki aktivnih tvari grožđa u liječenju tumorskih oboljenja 10
2.3. IZOLACIJA I EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA 11
2.4. Zelena otapala 13
2.4.1. Svojstva eutektičnih otapala 14
2.4.1.1. Primjena eutektičnih otapala 16
2.4.1.2. Upotreba eutektičnih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. Materijali 19
3.1.1. Uzorci komine grožđa 19
3.1.2. Kemikalije 19
3.1.3. Uređaji i oprema 20
3.2. Eksperimentalne metode 20
3.2.1. Priprema eutektičnih otapala 20
3.2.2. Priprema ekstrakta komine grožđa 21
3.2.3 Određivanje antocijana u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) 22
3.3. Obrada podataka 23
4. REZULTATI I RASPRAVA 24
5. ZAKLJUČCI 35
6. LITERATURA 36

1. UVOD

Polifenolni sastav biljnih materijala predmet je brojnih studija pa tako i analizi grožđa *Vitis vinifera*. Najviše polifenolnih spojeva u grožđu se nalazi u sjemenkama i pokožici bobice, a najbrojniji su protoantocijani i antocijani. Protoantocijani (tanini) u grožđu su polimeri flavan-3-ola, a antocijani se nalaze najčešće kao monoglukozidi pet antocijanidina: delfinidina, cijanidaina, petunidina, peonidina i najčešćeg malvidina; te manjih udjela njihovih derivata. Protoantocijani i antocijani su zaslužni za kemijska i senzorička svojstva te boju grožđa i vina, a imaju i nutritivne vrijednosti te su pokazali pozitivna svojstva u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala prvi korak je u upotrebi fitokemikalija u pripremi prehrambenih dodataka, sastojaka prehrambenih proizvoda, farmaceutskih proizvoda ili kozmetičkih proizvoda. Revilla i suradnici su u istraživanju usporedili učinkovitost ekstrakcije antocijana iz pokožice grožđa korištenjem raznih metoda, koje uključuju upotrebu različitih neutralnih i kiselih otapala te različitu duljinu trajanja ekstrakcije. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da je kiselost otapala ključni faktor koji utječe na količinu ekstrahiranih ukupnih antocijana.

Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje takve metode zahtijevaju. Unutar grane kemije, koja se naziva Zelena kemija, otapala zauzimaju vrlo važno mjesto. Da bi se otapalo kvalificiralo kao zeleni medij, mora zadovoljiti različite zahtjeve kao što su dostupnost, netoksičnost, biorazgradivost, mogućnost recikliranja, nezapaljivost i niža cijena s obzirom na druga otapala. Početkom 21. stoljeća počela su se koristiti eutektična otapala, koja zbog svojih povoljnih i dobrih svojstava pronalaze sve češću primjenu u kemijskoj sintezi, biotransformacijama i ekstrakcijama.

Cilj ovog rada bila je identifikacija i kvantifikacija antocijana ekstrahiranih pomoću različitih eutektičnih otapala. Otapala korištena u radu su 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. Ekstrakcija je provedena i klasičnim otapalima: voda, etanol i zakiseljeni etanol, zbog usporedbe učinkovitosti ekstrakcije pomoću eutektičnih organskih otapala.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUSPRODUKTI PROIZVODNJE VINA

Vinova loza je višegodišnja biljka penjačica koja pripada velikoj porodici Vitaceae. Rod *Vitis* sa zemljopisnog stajališta može se podijeliti na tri skupine, a to su američka skupina roda *Vitis*, istočnoazijska skupina roda *Vitis* i europsko-azijska skupina roda *Vitis* kojoj pripada vrsta *Vitis vinifera* L. Smatra se da je kultivacija započela u drugoj polovici 4. tisućljeća prije Krista na području Bliskog Istoka odakle se proširila na jugoistočni Mediteran, Palestinu, Libanon i Jordan, a zatim u prvoj polovici 3. tisućljeća po Aziji i Grčkoj te na Cipar, Kretu i Egipat (Imazio, i sur., 2006) Ovisno o sortama, grožđe može biti namijenjeno za konzumaciju u svježem obliku, za preradu u vino, za dobivanje destilata, proizvodnju koncentrata i sokova, za sušenje (grožđice), kompote, marmelade, džemove, za lozne podloge i dekorativne svrhe (Mirošević, 1996). Vinova loza je jedna od najzastupljenijih voćarskih kultura što pokazuju statistički podaci FAO-a. Proizvodnja grožđa 2013. godine iznosila je oko 77 180 000 tona, a 5 vodećih zemalja proizvođača grožđa u 2013. godini bili su Kina, Italija, SAD, Španjolska i Francuska. U Hrvatskoj je proizvodnja grožđa 2013. godine iznosila 181 096 tona te je u posljednjih 10 godina u stalnom padu, a osobito ako pogledamo statističke podatke u zadnjih 20 godina, proizvodnja grožđa pala je za više od 50 % za razliku od svjetske proizvodnje koja je u stalnom porastu (FAOSTAT, 2015). Oko 80 % proizvedenog grožđa preradi se u vino (El Gengaihi i sur., 2013) pri čemu zaostane značajna količina nusproizvoda (otpada), odnosno organskog otpada i otpadnih voda te dolazi do otpuštanja stakleničkih plinova i stvaranja anorganskih ostataka. Organski otpad čini komina koja sadrži sjemenke, pulpu, pokožicu, peteljke i lišće (Teixeira i sur., 2014). Nusproizvodi čine 20 % ukupne mase grožđa prerađenog u vino (El Gengaihi i sur., 2013).

Slika 1. Vinova loza (Anonymous 1, 2016)

Komina grožđa čini 62 % organskog otpada, vinski talog čini 14 %, stabljike 12 % otpada, a ostatak je nevodeni talog. Samo se manje količine ovih ostataka recikliraju (Cotoras i sur., 2014). Komina grožđa vrijedna je sirovina bogata polifenolnim spojevima, etanolom, vinskom kiselinom, limunskom kiselinom, uljem sjemenki grožđa, dijetalnim vlaknima i dr. te se može koristiti kao sirovina za izolaciju navedenih skupina spojeva s potencijalnom primjenom u proizvodnji funkcionalne hrane. Također se može koristiti i pri proizvodnji alkoholnih pića dodatnim procesom fermentacije i destilacije (Teixeira i sur., 2014). Može se također kompostirati, poslužiti kao stočna hrana te kao biogorivo. Važna skupina spojeva u komini grožđa su antocijani, pigmenti koji se koriste za dobivanje boja, dok se npr. ulje sjemenki grožđa koristi kao sastojak brojnih kozmetičkih proizvoda djelujući na obnavljanje oštećenih tkiva i njegu kože (Nerantzis i Tataridis, 2006.)

Ovisno o metodi proizvodnje i rukovanju otpadom, udio sjemenki u komini prosječno iznosi 38 do 52 % suhe tvari komine. Sjemenke sadrže do 40 % vlakana, 16 % eteričnih ulja, 11 % proteina, 7 % polifenolnih spojeva poput tanina te šećere i minerale. Polifenoli sjemenki grožđa čine 60 do 70 % ukupnih polifenola koji se ekstrahiraju iz komine (Teixeira i sur., 2014). Pokožica čini oko 65 % komine grožđa te je bogat izvor polifenola, najvećim udjelom antocijana i fenolnih kiselina koji se akumuliraju tijekom procesa zrenja (Teixeira i sur., 2014).

Polifenolni spojevi koji su zastupljeni u dijelovima komine (pokožici, sjemenkama) mogu imati potencijalno pozitivno djelovanje na zdravlje, a to se očituje kroz antioksidacijsku aktivnost,

prevenciju kardiovaskularnih bolesti, upalnih procesa i sl. Na koncentraciju polifenolnih spojeva komine i njihovu biološku aktivnost utječu brojni faktori kao što su postupci proizvodnje vina, vrijeme između nastanka i obrade otpada te metode recikliranja i ponovnog korištenja nusprodukata. Zbog svega navedenog upotreba nusprodukata kao izvora bioaktivnih spojeva u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji može biti alternativa za zbrinjavanje nusprodukata proizvodnje vina (Teixeira i sur., 2014). Bioaktivni spojevi komine ili obrađena komina dodaju se u prehrambene proizvode se kako bi se povećao udio vlakana i poboljšala probavljivost proizvoda, udio proteina, količina polifenolnih spojeva, poboljšalo vezanje vode u tim proizvodima te smanjio stupanj oksidacije.

Kemijski sastav komine je vrlo složen i ovisan o sorti, ekološkim faktorima, agrotehničkim mjerama, stupnju zrelosti, itd. Značajne razlike u kemijskom sastavu prisutne su između različitih dijelova komine. Jedan od nusproizvoda koji nastane tijekom proizvodnje mošta (soka od grožđa) je komina grožđa (slika 2) (Teixeira i sur., 2014). Sastoji se od prešane kože, oštećenih stanica pulpe, sjemenka i stabljika. Sjemenke čine oko 40 % komine dok pokožica i pulpa čine oko 60 %. Tablica 1 pokazuje kemijski sastav komine grožđa, dok tablica 2 pokazuje masene udjele dijelova grožđa.

Slika 2. Komina grožđa (Anonymous 2, 2016)

Tablica 1. Udjeli grožđa (Yair, 1997)

SASTOJAK	Maseni udio (%)
Voda	53 - 82
Pentoze i pentozani	1 – 1,2
Heksoze malo Saharoza / Škrob / Celuloza	3,5
Pektin, smole i sluzi	0,9
Kiseline	0,13 – 0,67
Tanini	0,01 – 2,3
Tvari boje	1,0 – 15,4
Fermenti malo Vitamini malo Dušični spojevi	0,8 – 1,9
Masti	1,5
Pepeo	1,7 – 2,0

Tablica 2. Maseni udjeli dijelova grožđa (Yair, 1997)

MASENI UDJELI DIJELOVA GROŽĐA	RASPON (%)	PROSJEK (%)
SOK	70 – 80	75
POKOŽICA	10 – 20	16
PETELJKA	2 – 6	5
SJEMENKA	0 – 5	4

2.1.1. Polifenolni sastav komine

Do danas je poznato više od 8 000 polifenolnih spojeva u različitim biljnim izvorima, voću, povrću, svim vrstama začinskog i aromatskog bilja itd. Osnovnu kemijsku strukturu polifenolnih spojeva čine 2 aromatska prstena povezanih pomoću 3 atoma ugljika, tako tvoreći treći prsten C na koje može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina koje mogu biti metoksilirane i glikozidirane s monosaharidima, oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine te imaju veliku sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004; Ignat i sur., 2011). Polifenolni spojevi su nosioci senzorskih karakteristika (boja, okus, gorčina, trpkost) vina i brojnih drugih funkcija u biljnom tkivu: zaštita od UV zračenja, pigmentacija, obrana od nametnika, privlačenje oprašivača, raspršivanje sjemena i dr. Proces maceracije omogućuje prijelaz polifenolnih spojeva iz komine u mošt međutim dio ipak ostaje vezan za staničnu stjenku i zaostaje u komini u kojoj čine 4 % ukupne suhe tvari komine. U tablici 3 prikazani su udjeli ekstraktibilnih polifenola u svježem grožđu. Više od 80 % ubranog grožđa koristi se za proizvodnju vina, a od ukupne biomase grožđa nakon proizvodnje vina, 20-25 % čini komina u kojoj zaostaje više od 70 % ukupnih polifenola iz grožđa. Kod proizvodnje bijelih vina, komina se odvaja odmah nakon prešanja, a kod crvenih vina prolazi djelomičnu maceraciju i fermentaciju i zatim se odvaja. Komparativne studije komina grožđa bijelih i crvenih vina pokazale su da komina grožđa crvenih vina sadrži veću količinu polifenola, flavonoida, antocijana i da ima veći antioksidativni potencijal (Deng i sur., 2011).

Tablica 3. Raspodjela udjela ekstratibilnih polifenola u svježem grožđu (Chedea i sur., 2011)

DIO BOBICE GROŽĐA	% EKSTRATIBILNIH POLIFENOLA U SVJEŽEM GROŽĐU
PULPA	10
POKOŽICA	28 - 35
SJEMENKA	60 - 70

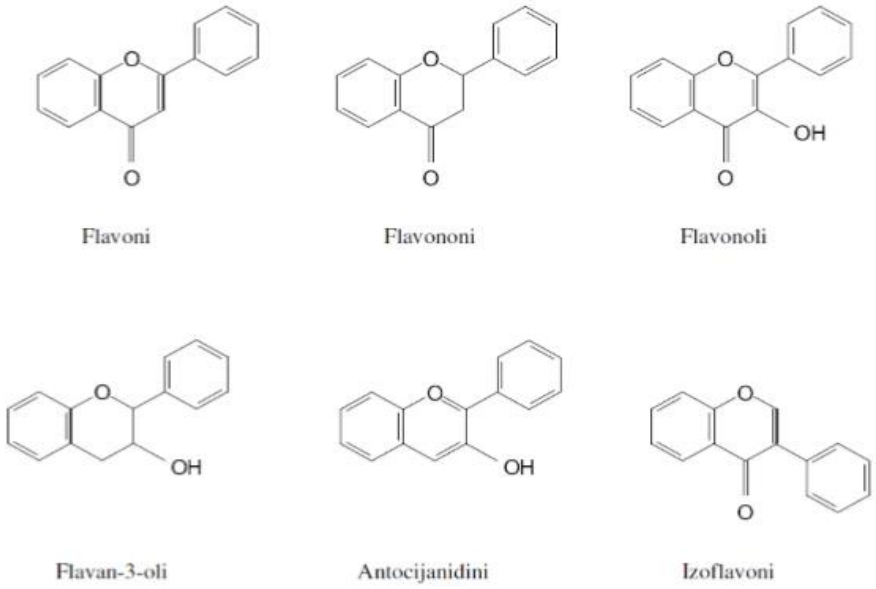
Glavne polifenolne komponente komine su antocijani, flavonoli i njihovi glikozidi (kvercetin, kampferol, miricetin i rutin), katehin i epikatehin te njihovi esteri, oligomerni procijanidini,

stilbeni (resveratrol) i fenolne kiseline (galna, elaginska, kafeinska, ferulinska, i kumarinska kiselina te ester klorogenske kiseline) (Rajha i sur., 2014).

Polifenolni spojevi se prije svega odlikuju svojim antioksidacijskim djelovanjem koje omogućuje njihova aromatska struktura, zbog koje dolazi do delokalizacije elektrona i postojanja više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona, a time inaktiviraju slobodne radikale.

2.1.2. Flavonoidi komine

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se međusobno razlikuju prema oksidaciji piranskog prstena, a u tu skupinu spadaju flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli te antocijani (Slika 3). Flavonoidi se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Naravno da i velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide, koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalsku aktivnost. Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a kao sastavni dio hrane, imaju sličnu ulogu i u drugim živim bićima.



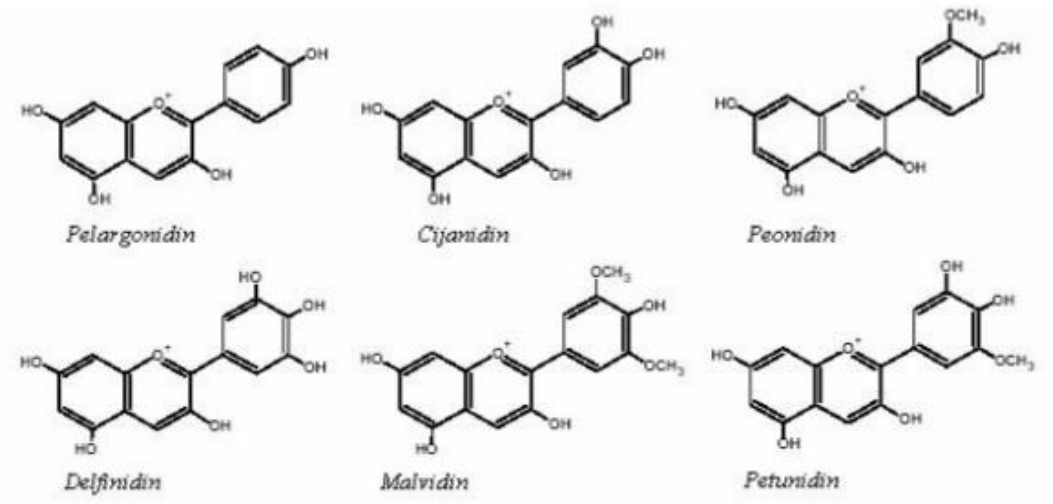
Slika 3. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Flavonoli koji se sintetiziraju u biljci su najčešće kampferol, kvercetin, mircetin i metilirani oblici te oni čine jednu trećinu polifenolnih spojeva pokožice grožđa (Naczk i Shahidi i 2004). Formiranje glikozida flavona i flavonola ovisi o prisutnosti svijetla. Oni su odgovorni za zaštitu biljke od UV svijetla zbog čega se uglavnom nalaze u lišću i pokožici biljaka, a značajne koncentracije pronađene su i u pulpi, dok se u podzemnim dijelovima biljke nalaze samo u tragovima (Naczk i Shahidi i 2004). Flavan-3-oli, se u pokožici grožđa javljaju u monomernoj (katehini), oligomernoj i polimernoj (procijanidini) strukturi odnosno kao kondenzirani tanini koji mogu biti sastavljeni od čak 17 jedinica flavan-3-ola u jednoj molekuli. Pet najznačajnijih flavan-3-ola u grožđu su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-) galokatehin, (-)-epigalokatehin i katehin-3-*O*-galat. Procijanidini su glavni nosioci gorčine crnih vina (He i sur., 2008). Antocijanidini su osnovne strukture antocijana bez vezanih šećera (aglikoni).

2.1.3. Antocijani

Antocijani (od grčkog anthos=cvijet i kianos=plava) su pigmenti odgovorni za nijanse narančaste, ružičaste, ljubičaste i plave boje u cvijeću i plodovima nekih biljaka. Glavni su sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većine cvjetnih latica, voća i povrća (Anderson i Jordheim, 2006). Antocijani su biljni pigmenti koji se mogu ekstrahirati iz biljnog materijala i koristiti kao boje. Iako imaju veliki potencijal primjene u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, njihova uloga je ograničena zbog njihove nestabilnosti i niskog postotka separacije. Drugo značajno svojstvo antocijana je njihova antioksidacijska aktivnost koja ima važnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i raka. Temeljnu strukturu antocijana čini 2-benzil-1-benzopirilium kation (flavilium ion) čiji su položaji 3,5,7,4' hidroksilirani (slika 4). Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikolizaciji s različitim šećerima (Tsao i McCallum 2009.).

Glavne razlike između antocijana su broj hidroksilnih skupina, broj šećera vezanih na njihovu strukturu, alifatskih ili aromatskih karboksila vezanih na šećer u molekuli te položaj tih veza. Također se razlikuju po broju i poziciji hidroksi i metoksi skupina u B-prstenu molekule.



Slika 4. Kemijska struktura antocijana (Rein, 2005)

U biljkama se uglavnom nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer (Anderson i sur., 2006). Ako se glikonska jedinica antocijana hidrolizira, aglikon, odnosno nešećerni produkt hidrolize, naziva se antocijanidin (Balasundram i sur., 2006). U antocijanima najčešće se nalazi glukoza koja se može vezati na C-3 ili C-5 položaj molekule antocijanidina i na taj način povećati kemijsku stabilnost i topljivost antocijana. Osim toga, glukozni dio može biti esterificiran kiselinama (*p*-kumarinskom, kafeinskom kiselinom i drugima) obično na C-6 položaju što utječe na svojstva antocijana kao što su otpornost na svjetlost, toplinu, visoki pH, poboljšanje kakvoće i stabilnosti boje. Različite boje potječu od -H, -OH i -OCH3 skupina. Plavo obojenje je intenzivnije što ima više –OH skupina, a ljubičasto što je više -OCH3 skupina (Balasundram i sur. 2006.). U uzorcima komine antocijani predstavljaju najzastupljeniju skupinu polifenolnih spojeva (Kammerer i sur., 2004).

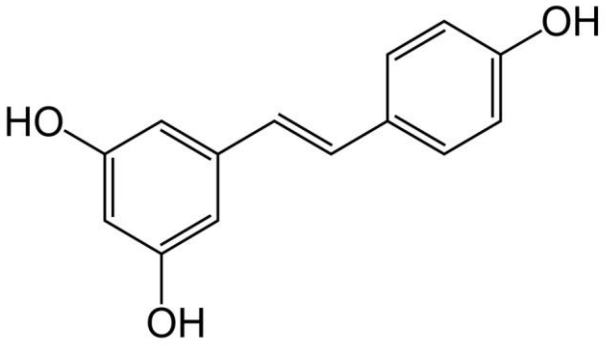
Prema istraživanjima, u komini i pokožici grožđa najzastupljeniji antocijani su malvidin-3-O-glukozid te peonidin-3-O-glukozid, dok su ostali prisutni u manjim koncentracijama (Amico i sur., 2004). Glikozilnom substitucijom postiže se veća stabilnost molekula antocijana, što ovisi i o poziciji vezanja šećera te o vrsti šećera.

Količine antocijana u komini crnih sorta grožđa kreću se od 287 do 4527 mg u 100 g metanolnog ekstrakta, dok su vrijednosti za flavonole od 104 do 464 mg u 100 g istog ekstrakta.

2.2. Potencijal biološki aktivnih tvari grožđa u liječenju tumorskih oboljenja

Glavna skupina fitokemikalija prisutnih u grožđu pripadaju skupini polifenolnih spojeva. Pokožica grožđa sadrži obilje različitih spojeva koji daju senzorska svojstva bobicama i vinu. Mnoge studije pokazale su da polifenoli, zbog antioksidativnih svojstava smanjuju učestalost teških bolesti, kao što su tumorska i kardiovaskularna oboljenja.

Resveratrol (slika 5) je polifenol koji ima jaki antioksidativni učinak i istražuje se kao tvar s izrazitim potencijalom za kemoprevenciju. Provedena istraživanja pokazala su da inhibira aktivnost enzima ciklooksigenaze u različitim vrstama tumora. Njegova sposobnost da inhibira rast nekih tumorskih staničnih linija ukazuje na to da spoj ima inhibitorno djelovanje na promociju i progresiju tumora (Schneider i sur., 2000).



Slika 5. Strukturna formula resveratrola (Anonymous 3, 2008)

Niz studija s flavanolima (katehin i epikatehin) i fenolnim kiselinama (galna kiselina i elaginska kiselina) ukazuju na njihovu antioksidativnu aktivnost *in vivo* i *in vitro*. Antioksidativno djelovanje flavonoida je usko povezano s antitumorskom aktivnošću tih spojeva, te povoljnim djelovanjem kod kardiovaskularnih bolesti i nekih kožnih poremećaja (Yilmaz i Toledo, 2004). Istraživanje Xia i sur. (2010) pokazalo je da ekstrakt pokožice grožđa inducira apoptozu stanične linije tumora prostate, dok polifenoli iz grožđanog soka izazivaju značajnu inhibiciju sinteze DNA u stanicama tumora dojke (Xia i sur., 2010). Znanstvenim istraživanjem također je pokazano 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 (Kaur i sur., 2009). U istraživanju Kaur i sur. (2009) sposobnost metastaziranja 4T1 stanica tumora dojke inhibirana je djelovanjem proantocijanidina iz sjemenki grožđa, dok je istraživanjem iz 2008. godine pokazano da ekstrakti pokožice grožđa induciraju apoptozu LoVo, HT29 i SW480 humanih tumorskih staničnih linija te se smatra da je moguća primjena ovih ekstrakata za kontrolu rasta stanica tumora debelog crijeva (Kaur i sur., 2009).

2.3. IZOLACIJA I EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je prvi i ujedno vrlo važan korak izolacije polifenolnih spojeva iz biljnog materijala, a za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije. Metode ekstrakcije polifenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Polifenolni spojevi se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli, ali najčešće u stanju u kojem se koristi za upotrebu. Odabirom prikladne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva treba voditi računa o topljivosti spojeva koje želimo ekstrahirati te odabrati pogodno otapalo. Ekstrakcija otapalima je najčešće upotrebljavana tehnika izolacije polifenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011), a sve češće se koriste metode kao što su ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, mikrovalovima, ubrzana ekstrakcija otapalima i kao jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija pomoću hladne plazme (Teixeira i sur., 2013). Brojne su prednosti ovih metoda poput brzine, selektivnosti, ekološke prihvatljivosti, upotrebe manjih količina otapala, većeg prinosa od klasične ekstrakcije, i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije (Rostagno i Prado, 2013). Klasičnom ili konvencionalnom ekstrakcijom smatra se ekstrakcija pomoću refluksa. Ekstrakcija pod refluksom se izvodi tako da se biljni materijal uranja u otapalo u tikvici s okruglim dnom koja je spojena na povratno hladilo. Otapalo se zagrijava do vrenja, a kako se otapalo kondenzira, tako se reciklira u tikvicu (Rostagno i Prado, 2013). Klasična ekstrakcija je najčešće korištena tehnika za izdvajanje polifenolnih spojeva iz komine. Ekstrakcija uključuje nekoliko procesa kao što su difuzija otapala u stanice biljnog materijala, otapanje metabolita u otapalu, difuziju otapala s otopljenim tvarima izvan stanica te ispiranje.

Čimbenici koji utječu na ekstrakciju su temperatura, veličina čestica, gibanje i vrsta otapala, dužina vremena ekstrakcije i pH-vrijednost (Rostagno i Prado, 2013).

U poželjna svojstva otapala za ekstrakciju ubrajaju se selektivnost otapala za spojeve koje se želi ekstrahirati, veliki ekstrakcijski kapacitet, nereaktivnost s biljnim materijalom, neškodljivost za ljude i opremu, potpuna hlapljivost i niska cijena. Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnog materijala su alkoholi (metanol, etanol i njihove vodene otopine), a zatim aceton i etil acetat. Istražujući utjecaj otapala na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz vinske komine, pokožice i sjemenki grožđa Cheng i sur. (2006) su dokazali da se primjenom metanola kao otapala može ekstrahirati oko 20 % više polifenolnih spojeva nego etanolom, dok su Lapornik i sur. (2005) dokazali da se primjenom alkoholnog otapala (etanola i metanola), iz ekstrakta dobivenog od komine grožđa, dobije pet puta više polifenolnih spojeva nego korištenjem vode kao otapala.

Izolacija antocijana iz biljnih izvora uobičajeno se provodi upotrebom različitih polarnih otapala uz dodatak organske ili anorganske kiseline (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Postoje istraživanja koja ukazuju da ekstrakcijom aciliranih antocijana u kiselim uvjetima može doći do njihove djelomične ili potpune hidrolize (Van Wyk i Winter, 1994). Također korištenje zakiseljenih otapala može uzrokovati stvaranje antocijana iz flavanola i proantocijanidina prirodno prisutnih u pokožici grožđa te takva reakcija u konaĉnici dovodi do precjenjivanja količine ukupnih antocijana mjerenih kolorimetrijskim metodama koja se koriste u tu svrhu (Hemingway, 1989). Revilla i sur. (1998) su u istraživanju usporedili učinkovitost ekstrakcije antocijana iz pokožice grožđa korištenjem raznih metoda koje uključuju upotrebu različitih neutralnih i kiselih otapala te različitu duljinu trajanja ekstrakcije. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da je kiselost otapala ključni faktor koji utijeće na količinu ekstrahiranih ukupnih antocijana.

Metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju, poput ekstrakcije otapalima, vrućom vodom, lužinama i sl., mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti zbog visokih temperatura, drugog vremena ekstrakcije ili loše određenih sigurnosnih kriterija tijekom zračenja. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006), jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Chemat i sur. 2008). Tijekom tretiranja ultrazvukom kavitacije dolazi do bubrenja stanica te probijanje

staničnih stjenki (Vinatoru, 2001), što omogućuje visoke brzine difuzije kroz staničnu stjenku te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice.

Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacija na stanični materijal, točnije stanične stjenke, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena učinkovitost. Industrijska važnost primjene ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (nadalje u tekstu UAE – „Ultrasound assisted extraction“) u tehnologiji prerade hrane jest od interesa u smislu povećanja ekstrakcije komponenti iz biljnog i životinjskog materijala. Tehnologijom UAE možemo potencijalno povećati ekstrakciju određenih komponenti, kao što su polifenoli (Springett, 2001), antocijani (Springett, 2001), aromatske tvari (Vinatoru, 2001) i ulja (Chemat i sur., 2004), kada se ultrazvuk koristi kao predtretman obrade namirnice.

2.4. Zelena otapala

Posljednjih se godina u akademskoj sredini, a i u široj zajednici intenzivno istražuju novi, sigurniji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koji se zasnivaju na prihvatljivom kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva, opisani kao zelena kemija (Cvjetko, 2012). Pojam zelena kemija definira se kao dizajniranje proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu odnosno stvaranje škodljivih i opasnih supstancija.

Danas u industriji parfema, kozmetike, lijekova, medicinskih proizvoda, hrane, bio-goriva ili u industriji finih kemikalija nema industrijskog procesa koji ne uključuje neku vrstu ekstrakcije u kojima se upotrebljavaju hlapljiva organska otapala (Chemat i sur, 2012). Većina konvencionalnih organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna, a njihovo recikliranje i ponovna uporaba povezana je s energetski zahtjevnom destilacijom uz znatne gubitke te unakrsnu kontaminaciju (Anastas i Eghbali, 2010). „Zelena“ ekstrakcija se bazira na pronalasku i dizajnu ekstrakcijskog procesa koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda, i osigurati siguran i visokokvalitetan ekstrakt. Kako bi zadovoljili prethodnu definiciju, tijekom procesa se potrebno držati šest inovativnih principa „zelene“ ekstrakcije:

1. pronalazak novih izvora biljnih materijala i korištenje obnovljivih izvora biljnog materijala

2. upotreba alternativnih otapala: bio-otapala, ionskih tekućina, vode, superkritičnog CO_2
3. smanjenje utroška energije ponovnim korištenjem i korištenje inovativnih tehnologija
4. proizvodnja ko-produkata umjesto otpada
5. smanjenje volumena procesa i provođenje sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa
6. biorazgradivi i nedenaturirani ekstrakt bez kontaminanata kao produkt na kraju procesa (Chemat i sur., 2012).

Prema načelima zelene kemije, odabir prikladne zamjene za organska otapala temelji se na sigurnosti radnika (toksičnost, kancerogenost, mutagenost, apsorpcija putem kože i respiratornog sustava), sigurnosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost, potencijal stvaranja peroksida), sigurnosti okoliša (ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivosti procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne uporabe) (Alfonsi i sur., 2008). Kao nova zelena otapala podrazumijevaju se bio-otapala, ionske kapljevine, voda, superkritične tekućine, reakcijski sustavi bez prisustva otapala i eutektična otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Polarnost vode omogućuje njezinu upotrebu kao otapala u ekstrakciji organskih molekula koje su topljive u vodi kao što su proteini, šećeri i organske kiseline, kao i anorganskih spojeva. Ekstrakcija pod tlakom vrućom vodom (*eng.* Pressurized hot water extraction - PHWE) ili super kritična voda je jedna od naj obećavajućih ekstrakcijskih tehnika, zbog jednostavne manipulacije dielektrične konstante vode, promjenom temperature i tlaka. Povećanjem temperature vode na 250 ºC i pri tlaku od 4 MPa vrijednost dielektrične konstante vode iznosi 27, što je slično kao kod etanola, čime voda postaje prikladna za ekstrakciju spojeva niske polarnosti (Teo i sur., 2010).

2.4.1. Svojstva eutektičnih otapala

Eutektična otapala su smjese između 2 ili 3 jeftine i sigurne komponente koje su sposobne povezati se vodikovim vezama, i formirati 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, odnosno točka tališta eutektične smjese često je pri sobnoj temperaturi manja je od točki tališta komponenata pojedinačno (Morrison i sur., 2009). Pripremaju se vrlo jednostavo i brzo, bez prethodnog ili

naknadnog procesa pročišćavanja. Većina eutektičnih otapala imaju točku tališta ispod 70 ºC što je rezultat snažnih interakcija između komponenata. Pretpostavlja se da HBD djeluje kao kompleksirajući agens i povezuju se sa anionima soli i smanjuje interakciju aniona s kationima, što dovodi do smanjenja točke tališta eutektične smjese. Nakon odvage određenih masa, donor vodikove veze i kationska soli se zajedno pomiješaju u tikvici (ovisno o higroskopnosti kemikalija potrebno je spriječiti dodir s vlagom iz zraka). Nakon toga se tikvice zagrijavaju, uz konstantno miješanje, dok ne dobijemo bezbojno tekuće otapalo (obično oko 2 h na 60 ºC). Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi svake od komponenata eutektičnog otapala. Viskoznost eutektičnog otapala može se prilagoditi, ovisno o prirodi kationske soli, vrsti HBD, molarnom omjeru komponenata, sadržaju vode i temperaturi, ali je viskoznost DES-a značajno veća od ostalih uobičajenih otapala i slična ionskim kapljevinama. Većina eutektičnih otapala postiže najnižu viskoznost upravo u točki taljenja (eutektična točka). 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). Do sada su najčešće sintetizirana otapala koja sadrže alkohole, kiseline, amide, amine ili šećere kao molekule donore vodikove veze, a kolin–klorid se najčešće koristi kao kationska sol, jer je jeftin, dostupan u velikim količinama, biorazgradljiv i ne toksičan te u kombinaciji sa sigurnim HBD daje održivo i biokompatibilno otapalo (Durand i sur., 2013). Kada su komponente koje izgrađuju eutektično otapalo primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina) takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičnim otapalima (NADES), koji u potpunost zadovoljavaju uvjete „zelene“ kemije (Dai i sur., 2013a). NADES se mogu sintetizirati miješanjem koncentriranih vodenih otopina koje sadrže pojedine komponente, miješanjem otopljene jedne od komponenti u kojoj se druga komponenta otopi ili miješanjem krutina dviju komponenti koje se naknadno zagrijavaju do taljenja. U sintezi prirodnih eutektičnih otapala moguć je veliki broj kombinacija, pa su mogućnosti primjene ove vrste otapala velike (Francisco i sur., 2013).

2.4.1.1. Primjena eutektičnih otapala

Eutektična otapala imaju mogućnost doniranja i primanja protona i elektrona, što im omogućava veliki kapacitet otapanja. To ih svojstvo čini odličnim kandidatom za otapanje širokog raspona molekula uključujući soli, proteine, lijekove, aminokiseline, surfaktante, šećere i polisaharide. DES-ovi otapaju pojedine metalne okside, mogu se koristiti u elektrokemijskim procesima. Neka istraživanja dokazala su mogućnost otapanja CO_2 u eutektičnim otapalima što daje mogućnost da se DES-ovi koriste u pročišćavanju plinova, katalizi i kemijskom fiksiranju CO_2. Još jedna zanimljiva upotreba eutektičnih otapala je u ekstrakciji glicerola iz biodizela. DES se može koristiti kao medij za povećanje kontakta između reaktanata čime se povećava učinkovitost organske sinteze i katalize (homogene i heterogene) (Durand i sur., 2013). Zbog svoje prilagodljivosti, netoksičnosti i biorazgradljivosti, eutektična otapala su pronašla svoju primjenu u području biomedicine. S obzirom da mogu otapati lijekove i time povećavaju njihovu topljivost i apsorpciju, u kombinaciji s ibuprofenom, mentolom, biorazgradljivim prirodnim polimerima i superkritičnim CO_2, mogu biti dio sistema dostave lijekova, te se koristiti u tkivnom inženjerstvu i drugim biomedicinskim postupcima (Tuntarawongsa i Phaechamud, 2012). Prirodna eutektična otapala češće se koriste za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnog materijala zbog potencijalno toksičnih djelovanja sintetskih ionskih kapljevina i klasičnih otapala.

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

Kristalizacija eutektičnih otapala na sobnoj temperaturi često predstavlja problem prilikom provođenja procesa ekstrakcije. Svojstva eutektičnih otapala, kao što su biorazgradivost, prihvatljivi farmaceutski profili toksičnosti i snage otapanja i polarnih i nepolarnih komponenti, čine eutektična otapala potencijalnim zelenim otapalima za ekstrakciju prirodnih spojeva. Sadrže komponente koje su prisutne u našoj svakodnevnoj upotrebi, pa su stoga lako dostupne, jeftine i sigurne (Dai i sur., 2013b).

2.4.1.2. Upotreba eutektičnih otapala u ekstrakciji polifenolnih spojeva

Istraživanja su pokazala da eutektična otapala imaju visoki potencijal za ekstrakciju polifenolnih spojeva, što je povezano sa stvaranjem vodikovih veza između polifenolnih spojeva i molekula DES-a. Fizikalna svojstva DES-a, kao što su polarnost i viskoznost, imaju veliki utjecaj na ekstrakciju. Optimizacijom svih parametara (viskoznost, polarnost i temperatura) istraživači su postigli velike prinose ekstrakcije polifenolnih spojeva u usporedbi s upotrebom konvencionalnih otapala kao što su voda i etanol (Dai i sur., 2013a). Primjer je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz šafranike (lat. *Carthamus tinctorius L.*) gdje su kao otapalo korištena prirodna eutektična otapala: mliječna kiselina-glukoza (LGH), prolin-jabučna kiselina (PMH), saharoza-kolin klorid (SuCH), glukoza-kolin klorid (GCH), sorbitol- kolin klorid (SoCH), 1,2-propandiol- kolin klorid (PCH) i fruktoza-glukoza- saharoza (FGSH), 7 otapala različite polarnosti, viskoznosti i učinkovitosti otapanja spojeva, u različitim koncentracijama, a ekstrakcija je provođena kroz različite vremenske periode. U usporedbi s ekstraktima dobivenim korištenjem etanola i vode, ekstrakti prirodnih eutektičnih otapala bili su najintenzivnije boje. Eutektična otapala SuCH, PMH i LGH bolje su ekstrahirala polifenolne spojeve u usporedbi s etanolom i vodom. Na koncentraciju ekstrahiranih polifenolnih spojeva utjecao je i udio vode u eutektičnom otapalu, tako da se moglo zaključiti da eutektična otapala s većim udiom vode bolje ekstrahiraju polarne komponente, a otapala s manjim udjelom vode bolje ekstrahiraju manje polarne komponente. Na prinos ekstrakcije nije značajno utjecalo vrijeme ekstrakcije niti omjer biljnog materijala i volumena otapala (Dai i sur., 2013b). 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.

Istraživanje koje su proveli Duan i sur. (2016.) pokazalo je da su prinosi ekstrakcije DES-ovima u usporedbi sa metanolom veći, što objašnjavaju superiornim otapajućim kapacitetom DES-ova. Najveći ekstrakcijski kapacitet pokazali su DES-ovi na bazi kolin klorida. Također provedena je i ekstrakcija ikarina, flavonoida iz *Epimedi Folium*. Rezultati su pokazali da učinkovitost ekstrakcije ovisi o vrsti eutektičnog otapala. Ikarin je pokazao visoku

ekstratibilnost u otapalima na bazi prolina, dok je u otapalima na bazi šećera i alkohola razina ekstrakcije bila niža. Eutektična otapala poput prolin:jabučna kiselina i betain:jabučna kiselina pokazala su se boljima za ekstrakciju ikarina od metanola.

Budući da je sposobnost ekstrakcije DES-ova povezana sa njihovim fizikalno kemijskim svojstvima, kao što su polarnost, viskoznost, pH i interakcije vodikovih veza, mogućnost ekstrakcije polifenolnih spojeva povezuje se njihovom mogućnošću stvaranja vodikovih veza. Kako bi se prirodna eutektična otapala našla u široj primjeni za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnog materijala, potrebno je provesti još mnoga istraživanja uvjeta ekstrakcije, odabira komponenata eutektičnih otapala, metoda sinteze otapala, načina provedbe ekstrakcije te kako navedeni parametri utječu na učinkovitost procesa ekstrakcije (Dai i sur., 2013a).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci komine grožđa

U eksperimentalnom dijelu korišteni su uzorci komine grožđa Plavac mali, berba 2015.

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda, PBF
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Folin-Ciocalteau-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 (≥ 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
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Prolin, Kemika, RH
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

3.1.3. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- HPLC, Agilent 1100 Series, Agilent, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga, HC 240 Tehtnica, Železniki, Slovenija
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Sjeckalica, Rondo 500, Tefal, Francuska
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex, Bandelin electonic, Njemačka
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, Velika Britanija

3.2. Eksperimentalne metode

3.2.1. Priprema eutektičnih otapala

Odvaga svih kemikalija korištenih u ovom eksperimentu provodila se na analitičkoj vagi. Kemikalije od kojih su pripravljena eutektična otapala prije sinteze nisu bila pročišćavana. Za potrebe istraživanja pripravljeno je osam različitih DES-ova s udjelima vode od 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 4). Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom u kojoj se pomiješaju čvrste-čvrste ili čvrste-tekuće komponente eutektičnog otapala u molarnim omjerima kako je navedeno u tablici 4, uz udjel vode od 30 %. Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj mješalici do 3 sata na temperaturi od 40 do 60 ºC uz neprestano miješanje, a reakcija je gotova kada se dobije bistro, tekuće i homogeno eutektično otapalo.

Tablica 4. 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

3.2.2. Priprema ekstrakta komine grožđa

Za pripremu ekstrakata korištena je komina grožđa koja je odvagana i usitnjena sjeckalicom. Uz prethodno navedenih osam eutektičnih otapala, za ekstrakciju su korištena i tri konvencionalna otapala: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol. Odvaganoj količini komine grožđa (1,50 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 pomoću Büchnerovog lijevka odvojen je supernatant od taloga, te spremljen do analize na +4 °C.

3.2.3 Određivanje antocijana u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografska analiza provedena je na HPLC uređaju Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz module binarne pumpe (Bin Pump SL G1312B), degazera (G1379B), autosampler-a (HiP-ALS G1367B), termostata autosamoler-a (FC/ALS Term G1330B), modula kolone (TCC SL G1316B) te uz detekciju na PDA detektoru (DAD SL G1315C). Slobodni antocijani razdvojeni su na Nucleosil C18 koloni (Phenomenex, Torrance, California, SAD) dimenzija 250 mm x 4 mm, 5 µm koja je pokazala najbolje karakteristike prilikom razdvajanja navedenih spojeva. Injektirano je 60 µL filtriranog ekstrakta. Pokretane faze korištene pri razdvajanju bile su otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95/5; v/v) i otapalo B (voda/mravlja kiselina; 95/5; v/v), pri protoku od 1 $mLmin^{-1}$ i temperaturi od 40 °C. Slobodni antocijani detektirani su pri valnoj duljini od 520 nm na PDA detektoru. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je prema uvjetima prikazanim u tablici 5. Analiza je provedena u duplikatu.

Tablica 5. Određivanje slobodnih antocijana primjenom HPLC-UV metode u komini grožđa

HPLC uvjeti				
Kolona		Nucleosil C18 (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) 250 mm x 4 mm, 5 µm		
Mobilna faza	**Otapalo A** (v/v)	voda/mravlja kiselina, 95:5		
	Otapalo B (v/v)	acetonitril/mravlja kiselina, 95:5		
Volumen injektiranja (µL)		60		
Temperatura injektiranja (°C)		20		
Protok (mL/min)		1		
Temperatura (°C)		40		
Vrijeme run-a (min)		35		
Gradijentalno eluiranje		**Time** (min)	**Otapalo %A**	**%B**
		0	90	10
		25	65	35
		26	0	100
		28	0	100
		29	90	10
		35	90	10

Identifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spoja i standarda, Kvantifikacija analiziranih spojeva provedena je primjenom metode vanjskog standarda malvidin-3-glukozid klorida kao najzastupljenijeg slobodnog antocijana, a dobivene koncentracije izražene su u mgL^{-1}.

Parametri validacije HPLC metode za određivanja slobodnih antocijana u komini grožđa uključujući područje linearnosti, jednadžbu regresijskog pravca (y=ax +b), koeficijent determinacije (R^2), limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) na PDA detektoru prikazani su u tablici 6. Otopina standarda malvidin-3-glukozid klorida pripremljena je 8 različitih koncentracija te je injektirana u triplikatu na temelju čega su dobiveni podaci za područje linearnosti, jednadžbu regresijskog pravca i R^2.

Tablica 6. Parametri validacije HPLC metode za određivanje slobodnih antocijana u komin grožđa

Spoj	**Područje linearnosti** (mg/L)	**Jednadžba regresije**	**R^2**	**LOD** (mg/L)	**LOQ** (mg/L)
Malvidin-3-*O*-glukozid klorid	0,24-490	34,025 x + 15,663	0,9999	0,025	0,085

LOD: limit detekcije; LOQ: limit kvantifikacije

3.3. Obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u paralelama, tako da su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (± S.D.). Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 8.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini $p<0,05$.

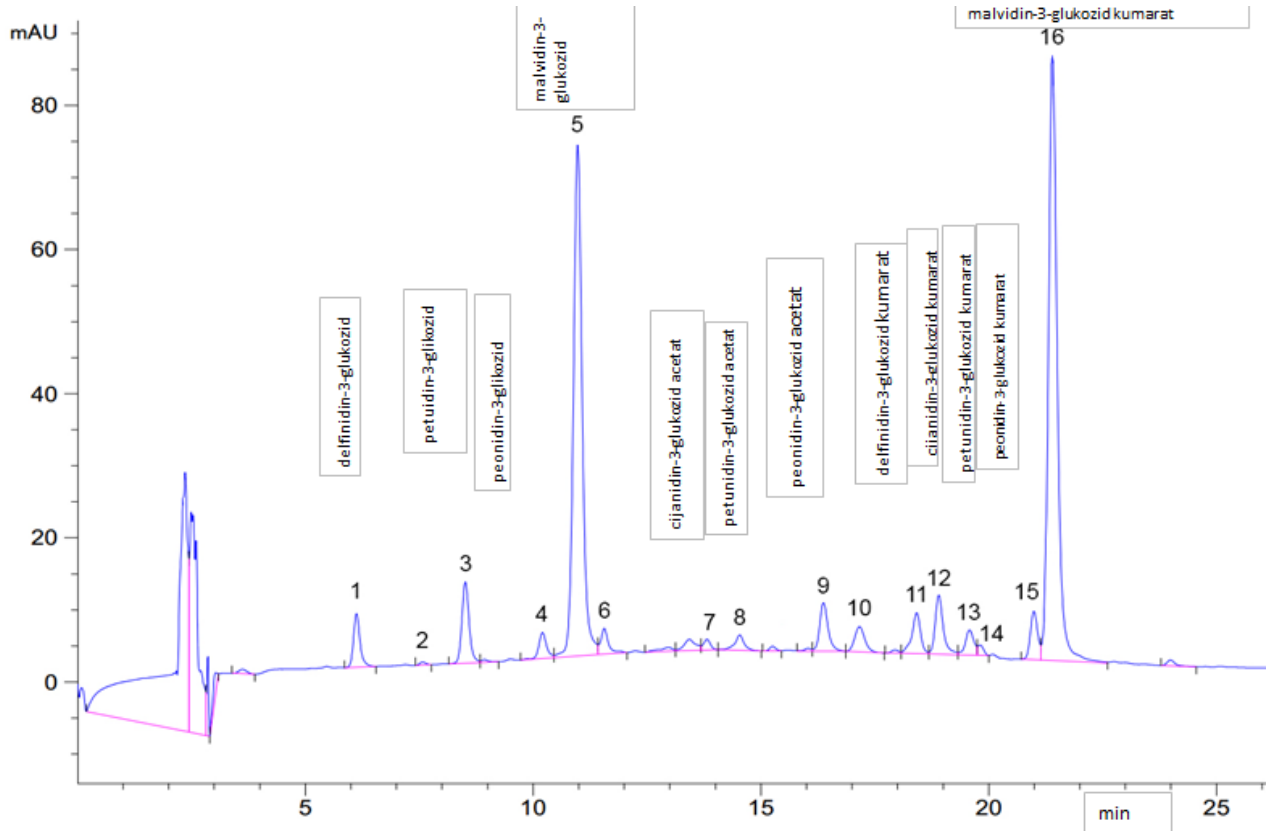
4. REZULTATI I RASPRAVA

U literaturi je opisan niz pozitivnih učinaka antocijana na zdravlje ljudi: snažni su inhibitori rasta tumorskih stanica debelog crijeva, imaju antimutagenu aktivnost tako što inhibiraju enzime za promutagenu aktivaciju, stimuliraju izlučivanje inzulina iz β-stanica gušteraće i smanjuju koncentraciju šećera u krvi, smanjuju razinu glukoze u urinu i sprječavaju peroksidaciju lipida u urinu i krvi (Ghosh i Konishi, 2007). Osim toga, zbog iznimne važnosti antocijana u tehnologiji vina, kompleksnosti njihove strukture i nerazjašnjenih mehanizama interakcija u kojima sudjeluju, još se uvijek istražuju metode njihove ekstrakcije iz komine grožđa. Najčešće se ekstrahiraju klasičnim metodama koje se temelje na upotrebi organskih otapala koja su hlapljiva i štetna za okoliš. Razvojem zelene kemije počela se istraživati primjena DES-ova, kao zamjene za organska otapala u ekstrakcijama, zbog njihovih dobrih svojstava.

U ovom radu su pripremljeni ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali primjenom osam različitih eutektičnih otapala: 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. Također su analizirani ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali pripravljeni u konvencionalnim otapalima: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol. U različito pripremljenim ekstraktima komine grožđa, identificirani su i kvantificirani antocijani pomoću tekućinske kormatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Od svih kromatografskih tehnika tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi polifenola. Do sada su metodama koje uključuju analizu HPLC-om identificirane i kvantificirane brojne polifenolne supstancije u vinu. Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra, stoga se rutinska detekcija tih spojeva u analizi HPLC-om temelji na mjerenju apsorbancije ultraljubičastog i vidljivog (Vis) zračenja, pomoću UV-Vis detektora.

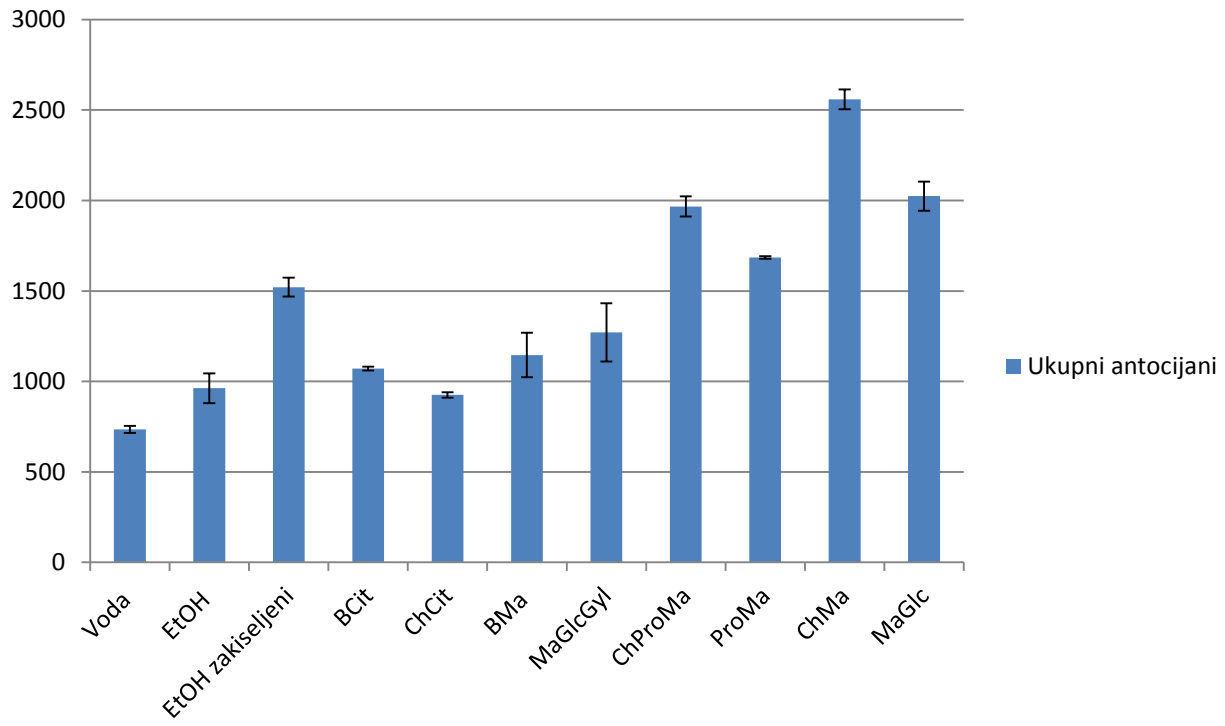
Na slici 6 prikazan je tipičan kromatogram antocijana iz liofiliziranog uzorka pokožice Plavca malog koristeći otapalo betain:limunska kiselina. Identificirani su: delfinidin-3-glukozid, petunidin-3-glikozid, peonidin-3-glukozid, malvidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid acetat, petuidin-3-glukozid acetat, peonidin-3-glukozid acetat, delfinidin-3-glukozid kumarat, cijanidin-3-glukozid kumarat, petuidin-3-glukozid kumarat, peonidin-3-glukozid kumarat,

malvidin-3-glukozid kumarat. Na slici je vidljivo da se najveća ekstrakcija postiže kod spojeva sa malvidinom, kao što su malvidin-3-glukozid i malvidin-3-glukozid kumarat, dok je se najmanja ekstrakcija postiže kod antocijana koji na molekulu šećera imaju vezan petuidin, kao što su petuidin-3-glikozid, petuidin-3-glukozid kumarat i petuidin-3-acetat.



Slika 6. Tipičan kromatogram ekstrakta antocijana pokožice grožđa sa otapalom betain: limunska kiselina*

* 1=delfinidin-3-glukozid, 3=petunidin-3-glikozid, 4=peonidin-3-glukozid, 5=malvidin-3-glukozid, 7=cijanidin-3-glukozid acetat, 8=petuidin-3-glukozid acetat, 9=peonidin-3-glukozid acetat, 11=delfinidin-3-glukozid kumarat, 12=cijanidin-3-glukozid kumarat,13=petuidin-3-glukozid kumarat, 15=peonidin-3-glukozid kumarat, 16=malvidin-3-glukozid kumarat



Slika 7. Ukupni antocijani ekstrahirani iz uzorka komine grožđa*

*Voda= vodeni ekstrakt, EtOH=etanolni ekstrakt. EtOH zakiseljeni= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu, Ch:Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid: jabučna kiselina, B:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću betain: limunske kiseline, Ch:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću kilin klorid: limunske kiseline, B:Ma=ekstrakt pripremljen pomoću betain:jabučne kiseline, Ma:Glc:Gly=ekstrakt pripremljen pomoću jabučna kiselina:glukoza:glicerol, Ma:Glc=ekstrakt pripremljen pomoću jabučna kiselina:glukoza

Rezultati određivanja ukupnih antocijana (slika 7) pokazuju da eutektično otapalo kolin klorid: jabučna kiselina najbolje ekstrahira antocijane (2558,83 ± 54,45 µg g^{-1}), a kolin klorid: limunska kiselina najslabije (925,61 ± 15,37 µg g^{-1}). Etanol se koristi kao otapalo u klasičnim načinima ekstrakcije antocijana. Rezultati pokazuju da DES Ch:Ma nešto bolje ekstrahira antocijane od zakiseljenog 70 % EtOH. Osim Ch:Ma bolju sposobnost ekstrakcije od zakiseljenog etanola pokazuju i Ma:Glc, Pro:Ma i Ch:Pro:Ma.

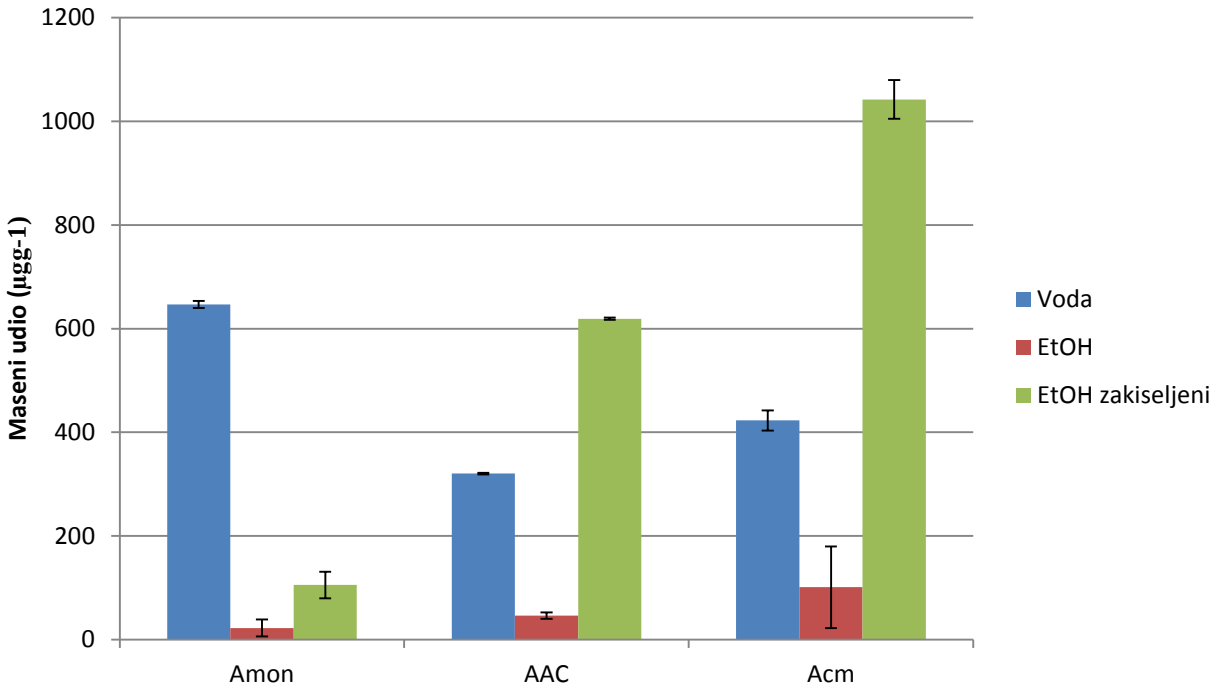
Stabilnost kationa antocijana, a time i karakterističnog obojenja, pri niskim pH vrijednostima vrlo je važno svojstvo u postupku njihove izolacije tj. ekstrakcije. Izolacija antocijana iz biljnih izvora uobičajeno se provodi upotrebom različitih polarnih otapala uz dodatak organske ili anorganske kiseline (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Postoje istraživanja koja ukazuju da

ekstrakcijom aciliranih antocijana u kiselim uvjetima može doći do njihove djelomične ili potpune hidrolize (Van Wyk i Winter, 1994). Također korištenje zakiseljenih otapala može uzrokovati stvaranje antocijana iz flavanola i proantocijanidina prirodno prisutnih u pokožici grožđa te takva reakcija u konačnici dovodi do netočnih rezultata, tj. previsoke koncentracije ukupnih antocijana mjerenih kolorimetrijskim metodama (Hemingway, 1989). Revilla i sur. (1998) su u istraživanju usporedili učinkovitost ekstrakcije antocijana iz pokožice grožđa korištenjem raznih metoda koje uključuju upotrebu različitih neutralnih i kiselih otapala te različitu duljinu trajanja ekstrakcije. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da je kiselost otapala ključni faktor koji utječe na količinu ekstrahiranih ukupnih antocijana. Prema istraživanju (Revilla i sur., 1998.) u kojem su se za ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa koristile razne vrste otapala (80% metanol, 75% aceton, otopina metanola s 1% udjelom HCl-a) uvidjelo se da se najviše antocijana ekstrahiralo koristeći otapalo metanol s 1% udjelom HCl-a. Također su Bakker i Timberlake (1985) u svom istraživanju o ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa dokazali da se više antocijana ekstrahira koristeći metanol s 2% mravlje kiseline kao otapala za ekstrakciju. Iz toga se može zaključiti da se dodatkom kiseline poboljšava ekstrakcija antocijana. Kromatografskom analizom slobodnih antocijana u ekstrahiranim uzorcima uočeno je da se korištenjem zakiseljenih otapala u ekstrakciji značajno povećava količina neaciliranih antocijana, posebno malvidin-3-glukozida koji je najznačajniji antocijan prisutan u pokožici grožđa dok se količina aciliranih antocijana značajno smanjuje što ukazuje na njihovu hidrolizu u kiselim uvjetima.

Identifikacija i kvantifikacija antocijana u svim ekstraktima komine grožđa provedena je pomoću vanjskog standarda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC-om. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti identificirani su sljedeći spojevi: antocijanin monoglukozidi (Dp, delfinidin-3-glukozid; Cy, cijanidin-3-glukozid; Pt, petunidin-3-glukozid; Pn, peonidin-3glukozid; Mv, malvidin-3-glukozid), antocijanin-acetil glukozidi (malvidin-3-acetil glukozid) te antocijanin-kumaril glukozidi (peonidin-3-kumaril glukozid i malvidin-3–kumaril glukozid). Malvidin 3-glukozid kumarat najzastupljeniji je antocijan u pokožici grožđa sorte Plavac mali (1033,03 ± 6,14 $\mu g g^{-1}$). Istraživanje Ćurko i sur. (2014) pokazuje da je malvidin-3-glukozid prevladavajući antocijan s masenim udjelom od 41 % u sortama Plavac mali i Babić u pkožici grožđa, dok je u ovom istraživanju drugi najzastupljeniji antocijan (991,24 ± 37,75 $\mu g\ g^{-1}$).

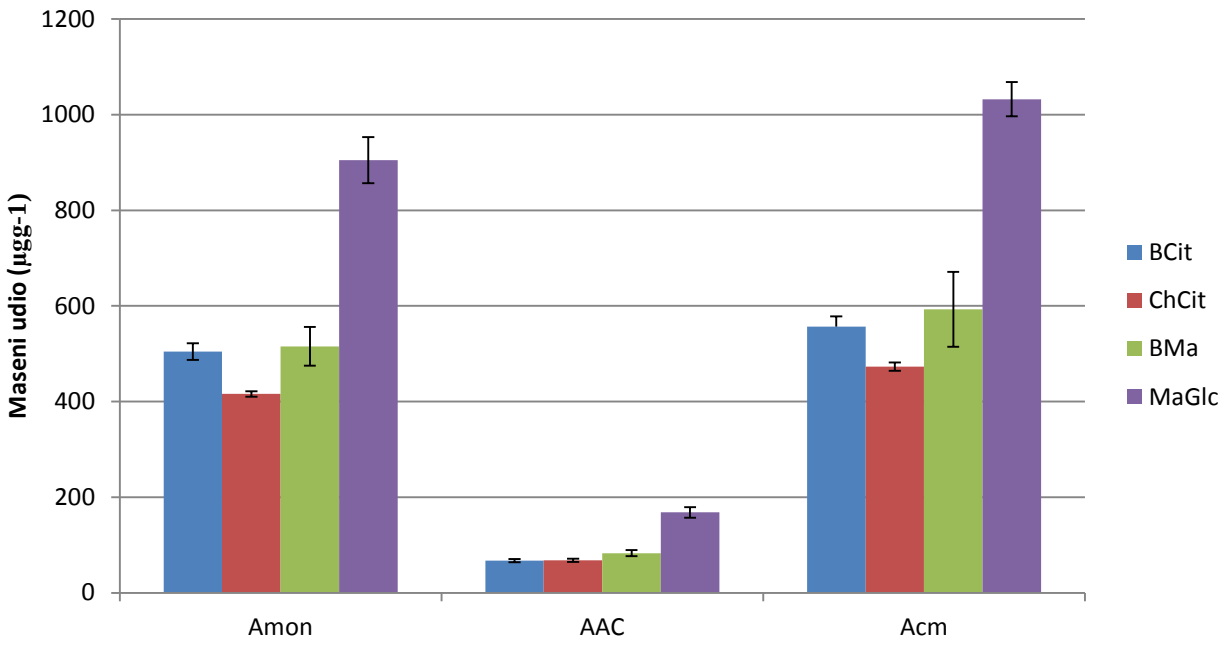
Radi lakše usporedbe učinkovitosti ekstrakcije antocijana pomoću DES-ova rezultati analize provedene korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koji su prikazani na

sljedećim slikama (slike 8-10), prikazani su kao suma antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), suma antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) te suma antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozida (ACm).



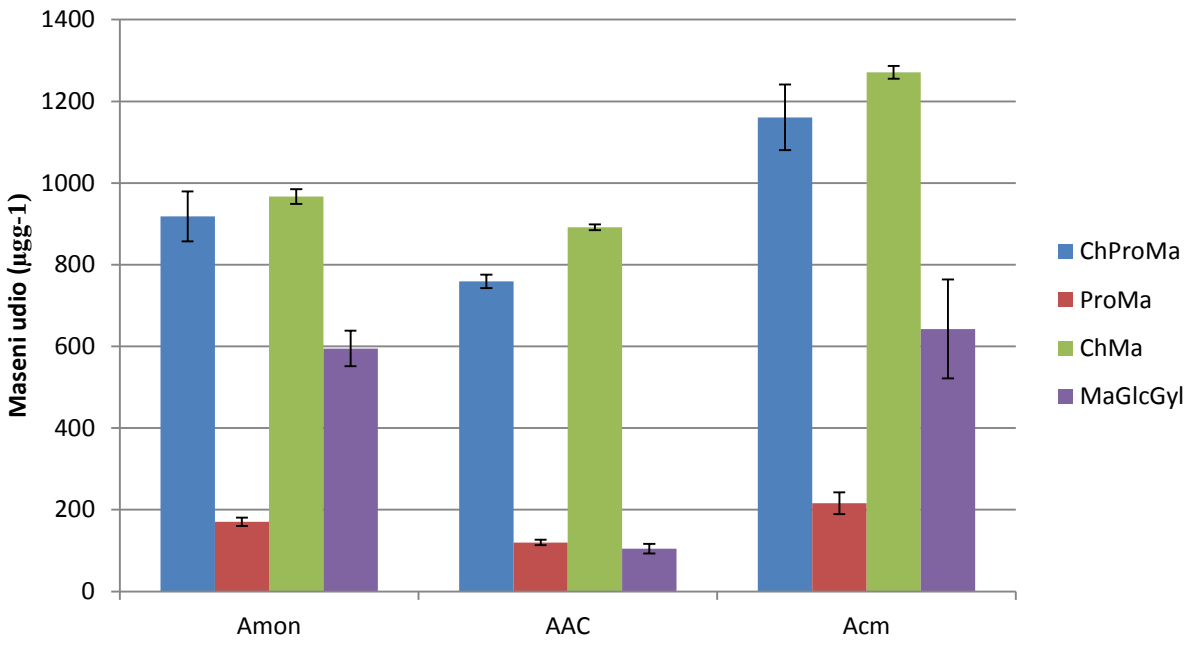
Slika 8. Maseni udio antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) i antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozida (ACm) u estraktima komine grožđa pomoću otapala*

* H_2O= vodeni ekstrakt, EtOH= etanolni ekstrakt. EtOH zakiseljeni= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu



Slika 9. Maseni udio antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) i antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozida (ACm) u estraktima komine grožđa pomoću eutektičnog otapala*

*B:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću betain: limunske kiseline, Ch:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću kolin klorid: limunske kiseline, B:Ma=ekstrakt pripremljen pomoću betain:jabučne kiseline, Ma:Glc=ekstrakt pripremljen pomoću jabučna kiselina:glukoza



Slika 10. Maseni udio antocijanin-3-*O*-monoglukozida (AMon), antocijanin-3-*O*-acetilmonoglukozida (AAC) i antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozida (ACm) u estraktima komine grožđa pomoću eutektičnog otapala*

*Ch:Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid: jabučna kiselina, Ma:Glc:Gyl=ekstrakt pripravljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol

Tablice 7, 8 i 9 prikazuju masene udjele antocijana u komini grožđa Plavca malog.

Tablica 7. Maseni udio antocijana u ekstraktima pokožice grožđa Plavca malog * **

Antocijani (μg g^{-1})	Voda	EtOH	EtOH zakis.
delfinidin-3-glukozid	0,037±0,00	0±0,00	0,018±0,001
petunidin-3-glukozid	68,921±2,33	75,669±7,02	47,31±4,08
peonidin-3-glukozid	17,19±1,43	0,00±0,00	0,00±0,00
malvidin-3-glukozid	560,64±2,82	244,659±9,47	375,53±21,65
peonidin-3-glukozid acetat	0,00±0,00	23,21±3,08	56,03±2,26
malvidin-3-glukozid acetat	22,36±1,37	22,89±3,05	44,88±0,04
delfinidin-3-glukozid kumarat	12,206±2,09	20,35±0,60	67,48±0,95
cijanidin-3-glukozid kumarat	0,00±0,00	27,13±1,02	57,46±0,81
peonidin-3-glukozid kumarat	0,00±0,00	58,21±7,48	113,19±3,19
malvidin-3-glukozid kumarat	93,047±17,20	513,40±69,78	804,18±32,41

*rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=2) vrijednosti sa istim slovom (a-c) statistički se ne razlikuju (P<0,05) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.=suha tvar

**H_2O=vodeni ekstrakt, EtOH=etanolni ekstrakt. EtOH zakiseljeni=ekstrakt pripremljen u zakiseljenom etanolu

Tablica 8. Maseni udio antocijana u ekstraktima pokožice grožđa Plavca malog* **

Antocijani (μg g^{-1})	BCit	ChCit	BMa	MaGlcGyl
delfinidin-3-glukozid	0,033±0,003	0,026±0,000	0,034±0,003	0,040±0,004
petunidin-3-glukozid	55,50±3,15	43,75±1,29	57,56±4,50	60,07±2,30
peonidin-3-glukozid	18,68±1,27	14,86±1,48	20,84±1,35	24,07±1,99
malvidin-3-glukozid	430,33±12,77	357,31±3,00	436,98±34,87	510,50±56,72
delfinidin-3-glukozid acetat	5,21±0,35	7,95±0,57	0,00±0,00	2,63±0,29
cijanidin-3-glukozid acetat	13,63±1,16	5,76±0,15	11,80±0,95	10,78±3,33
petunidin-3-glukozid acetat	7,54±0,19	10,01±2,22	6,25±0,40	7,67±1,52
peonidin-3-glukozid acetat	2,58±0,63	27,76±1,87	39,93±3,97	36,59±3,64
malvidin-3-glukozid acetat	38,46±1,08	16,39±1,61	24,81±1,88	47,07±3,35
delfinidin-3-glukozid kumarat	22,52±2,64	28,10±0,03	30,51±3,21	28,57±3,29
cijanidin-3-glukozid kumarat	28,79±3,47	35,04±1,06	40,93±4,77	32,44±4,64
peonidin-3-glukozid kumarat	4,21±1,71	27,48±1,19	33,28±4,07	36,30±3,47
malvidin-3-glukozid kumarat	500,94±13,68	382,42±6,36	488,21±66,20	545,49±109,63

*rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=2) vrijednosti sa istim slovom (a-c) statistički se ne razlikuju (P<0,05) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

**B:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću betain: limunske kiseline, Ch:Cit=ekstrakt pripremljen pomoću kolin klorid: limunske kiseline, B:Ma=ekstrakt pripremljen pomoću betain:jabučne kiseline, Ma:Glc:Gyl=ekstrakt pripravljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol

Tablica 9. Maseni udio antocijana u ekstraktima komine grožđa Plavca malog[*,**]

Antocijani (μg g^{-1})	ChProMa	ProMa	ChMa	MaGlc
delfinidin-3-glukozid	0,060±0,001	0,052±0,001	0,125±0,005	0,060±0,002
petunidin-3-glukozid	100,37±1,03	91,77±1,49	130,72±4,44	105,68±4,36
peonidin-3-glukozid	31,64±1,79	24,67±0,44	38,75±1,28	24,86±5,39
malvidin-3-glukozid	786,19±7,42	642,92±16,20	991,24±37,75	774,28±38,63
delfinidin-3-glukozid acetat	0,00±0,00	21,35±0,35	44,67±0,59	26,12±4,10
cijanidin-3-glukozid acetat	32,18±0,57	15,33±0,95	6,53±0,77	3,21±0,85
petunidin-3-glukozid acetat	22,74±0,54	4,79±0,10	28,45±1,01	16,34±0,47
peonidin-3-glukozid acetat	58,88±4,95	17,45±4,11	86,30±3,69	66,37±3,43
malvidin-3-glukozid acetat	56,84±10,31	61,08±1,37	50,31±1,18	56,07±2,03
delfinidin-3-glukozid kumarat	62,96±14,02	49,69±1,03	72,23±2,55	59,11±2,74
cijanidin-3-glukozid kumarat	71,12±2,47	66,89±6,86	99,23±5,90	82,36±0,69
peonidin-3-glukozid kumarat	50,14±4,12	45,57±1,37	66,31±1,00	58,62±2,06
malvidin-3-glukozid kumarat	782,60±60,52	729,40±17,34	1033,03±6,14	832,10±30,49

[*]rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=2) vrijednosti sa istim slovom (a-c) statistički se ne razlikuju (P<0,05) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

[**]Ch:Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Pro:Ma=ekstrakt pripravljen u prolin:jabučna kiselina, Ch:Ma=ekstrakt pripravljen u kolin klorid: jabučna kiselina, Ma:Glc=ekstrakt pripremljen pomoću jabučna kiselina:glukoza

Antocijani su polarne molekule i bolje se otapaju u polarnijim otapalima. DES-ovi koji se sastoje od organskih kiselina su najpolarniji stoga pokazuju najveću učinkovitost ekstrakcije antocijana, dok DES-ovi sa šećerima i polialkoholima su manje polarni i pokazuju manju učinkovitost (Dai i sur., 2013b). Temeljem rezultata navedenog istraživanja u eksperimentalnom dijelu ovog rada koristili smo DES-ove s organskim kiselinama.

Osim polarnosti, na ekstrakciju antocijana utječe i pH vrijednost s obzirom da stabilnost i struktura antocijana ovisi o pH. Upravo zbog tog svojstva, kiseli DES-ovi ekstrahirali su najveću količinu antocijana. Količina ekstrahiranih antocijana opada s opadanjem kiselosti otapala (Dai i sur., 2014).

Tablica 8 prikazuje razrede antocijana ekstrahirane pomoću vode, etanola i zakiseljenog etanola. Kao što se vidi iz tablice, najbolje otapalo za ekstrakciju antocijanin-3-(6-O-p-kumaroil) monoglukozida i antocijanin-3-O-acetil monoglukozida je zakiseljeni etanol, dok je kod antocijanin-3-O-monoglukozida najbolje otapalo voda. Isto tako vidljivo je da se etanol pokazao kao najlošije otapalo.

Iz tablice 9 vidljivo je da su odnosi ekstrahiranih AMon i ACm u navedenim otapalima (B:Cit, Ch:Cit, B:Ma i Ma:Glc) otprilike jednaki s time da je najbolje otapalo jabučna kiselina:glukoza (Ma:Glc). Neovisno o otapalima koncentracija ekstrahiranih antocijanin-3-O-acetil monoglukozida (AAC) je višestruko manja od koncentracije ekstrahiranih antocijanin-3-O-monoglukozida (Amon), iako se i tu kao najbolje otapalo pokazalo Ma:Glc.

Na slici 10 prikazani su rezultati ekstrakcije u kolin klorid:prolin:jabučnoj kiselini, prolin:jabučnoj kiselini, kolin klorid:jabučnoj kiselini i jabučna kiselina:glukoza:glicerolu. Kod svih razreda antocijana kao dva najbolja otapala pokazala su se Ma:Glc:Gyl i Ch:Pro:Ma.

Iz slika 8, 9 i 10 vidi se da je uspješnost ekstrakcije antocijanin-3-(6-*O*-p-kumaroil) monoglukozida podjednaka kod svih otapala, osim kod vode gdje je najbolje ekstrahiran antocijanin-3-*O*-monoglukozid.

Općenito, najbolji prinos ektrakcije postignut je za antocijanin-3-(6-*O*-*p*-kumaroil) monoglukozid i iznosi 1270,80 ±15,59 μg g^{-1}, s otapalom kolin klorid:jabučna kiselina. Zakiseljeni etanol koji se koristi u klasičnim ekstrakcijama najbolje je ekstrahirao malvidin-3-glukozid kumarat u koncentraciji od 804,18±32,41 μg g^{-1}.

Klasičnim otapalima poput vode, etanola i zakiseljenog etanola nije ekstrahiran delfinidin-3-glukozid acetat, cijanidin-3-glukozid acetat i petunidin-3-glukozid acetat, dok su primjenom eutektičnih otapala ekstrahirani navedeni antocijani.

Jabučna kiselina se u kombinaciji s kolin kloridom, glukozom, glicerolom i glukozom te kolin klorid i prolinom, pokazala boljom opcijom od limunske kiseline. Limunska kiselina u kombinaciji s kolin kloridom i betainom pokazuje bolju sposobnost ekstrakcije od jabučne kiseline s prolinom. Usporedbom uspješnosti ekstrakcije pomoću Pro:Ma i Ch:Pro:Ma vidi se da kolin klorid pozitivno utječe na ekstrakciju antocijana.

Na temelju rezultata određivanja ukupnih antocijana (slika 7) i mjerenja razreda antocijana (slike 8-10) u ekstraktima komine grožđa može se zaključiti da je najuspješnije otapalo za ekstrakciju ChCl:Ma za sve klase. Najmanju sposobnost pokazuje voda, što je i očekivano. Takav rezultat je u skladu s nekoliko studija koje su pokazale kako je ekstrakcija biološki aktivnih spojeva 10-100 puta učinkovitija u eutektičnim otapalima nego u vodi ili lipidima (Dai i sur., 2013b; Bi i sur., 2013).

Istraživanje koje su proveli Radošević i sur. (2015) pokazuje da DES-ovi koji sadrže organske kiseline kao donore veza, bolje ekstrahiraju antocijane od DES-ova kod kojih je alkohol donor vodikova veza, što je posljedica činjenice da se antocijani bolje ekstrahiraju pri nižim pH vrijednostima.

Temeljem rezultata dobivenih analizom prikazanom u ovom radu pokazano je da su Ch:Pro:Ma, Pro:Ma, Ch:Ma, Ma:Glc bolja otapala, odnosno da je došlo do bolje ekstrakcije antocijana nego kod zakiseljenog etanola, koji se inače koristi u klasičnim ekstrakcijama antocijana. Kako bi se u potpunosti mogao izbaciti zakiseljeni etanol, što je cilj „zelene kemije“, potrebno je provesti dodatna istraživanja.

Također, ovim radom pokazano je da se eutektičnim otapalima mogu postići vrlo dobri rezultati ekstrakcije antocijana iz biljnih materijala, te da bi se tako pripravljeni ekstrakti zbog antioksidativnih i antitumorskih svojstava antocijana, mogli koristiti kao dodaci prehrani ili lijekovima, posebno kad su ekstrahirani „zelenim otapalom“ kao što su prirodna eutektična otapala, sigurna za okoliš i ljudsku upotrebu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Temeljem dobivenih rezultata pokazano je da su Ch:Pro:Ma, Pro:Ma, Ch:Ma, Ma:Glc bolja otapala, odnosno da je došlo do bolje ekstrakcije antocijana, nego kod zakiseljenog etanola, koji se inače koristi u klasičnim ekstrakcijama antocijana.

2. Najslabija ekstrakcija antocijana postiže se upotrebom kolin klorid:limunske kiseline.

3. Sva eutektična otapala su bila približno jednako uspješna u ekstrakciji antocijanin-3-(6-*O*-p-kumaroil) monoglukozida, dok je antocijanin-3-*O*-monoglukozida najuspješnije ekstrahiran vodom.

4. Jabučna kiselina se u kombinaciji s kolin kloridom, glukozom, glicerolom i glukozom, te kolin klorid i prolinom, pokazala boljom opcijom za ekstrakciju od limunske kiseline.

5. Limunska kiselina u kombinaciji sa kolin kloridom i betainom pokazuje bolju sposobnost ekstrakcije od jabučne kiseline sa prolinom.

6. LITERATURA

Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T., Kleine, P., Knight, C., Nagy, M., Perry, D., Stefaniak, M. (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem.* **10**, 31–36.

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.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.

Anderson, O. M. i Jordheim, M. (2006) The anthocyanins. U: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications (Anderson, O. M. i Markham, K. R., ured.), CRC Press, BocaRaton, str. 472-551.

Anonymous 1 (2016) Plavac mali, <http://www.peljesac-vino.hr/plavacmali.html>. Pristupljeno 02. rujan 2016.

Anonymous 2 (2016) Komina grožđa, < http://www.beviamo.co/blog/uncategorized/wines-veneto/> . Pristupljeno 02. rujan 2016.

Anonymous 3 (2016) Kemijska struktura resveratrola, <https://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>. Pristupljeno 02. rujan 2016.

Bakker, J., Timberlake, C.F. (1985) The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography, *J. Sci. of Food and Agr.* **36,** 1315-1324

Balasundram, N.; Sundram, K. and Samman, S. (2006), Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, **99**, 191-203.

Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006) Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace, *Ultrason. Sonochem*. **13**, 511-516.

Chedea, V.S., Echim, C., Braicu, C., Andjelkovic, M., Verhe R., Socaciu, C. (2011). Composition in polyphenols and stability of the aqueous grape seed extract from the Romanian variety “Merlot Recas”. *J. Food Biochem.* **35**, 92-108.

Chemat, F., Tomao, V., Virot, M. (2008) Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: Handbook of food analysis instruments, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötleş, str. 85- 103.

Cheng, Z., Su, L., Moore, J, Zhou, K., Luther, M., Yin, J. Yu, L. (2006) Effects of Post-harvesting treatmant and heat stress on availabillity of antioxidants. J. *Agric. Food Chem.* **54**, 5623-5629.

Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, E. (2014) In Vitro and in Vivo Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained from Grape (Vitis vinifera) Pomace. *Molecules* **19**, 21154-21167.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63** (5-6), 163−171.

Cvjetko, M. (2012) Priprava, primjena u biotransformacijama i citotoksičnost odabranih imidazolijevih ionskih tekućina. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Ćurko, N., Ganić, K.K., Gracin, L., Đapić, M., Jourdes, M., Teissedre, P.L. (2014) Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem.* **145**, 15-22.

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

Dai, Y. T., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in Carthamus tinctorius L. *Anal. Chem.* **85**, 6272− 6278.

Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int*. **44**, 2712-2720.

Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European J. Lipid Sci. Tech.* **115**, 379-385.

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. *Glob. J. Pharma.* **7**, 465-473

FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistic Division, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Pristupljeno 22.08.2016.

Francisco, M., van den Bruinhorst, A., Kroon, M. C. (2013) Low transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 3074−3085.

Ghosh, D., Konishi, T. (2007) Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: Role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr.* **200**:8–16

He, S., Sun, C.R., Pan, Y.J. (2008) Red wine polyphenols for cancer prevention. *Int J. Mol. Sci.* **9**, 842–853.

Hemingway, R. W. (1989) Reactions at the interflavonoid bond of proanthocyanins. U Chemistry and significance of condensed tannins (Hemingway, R.W i Karchesy, J.J. ured.), Plenum Press, New York.

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

Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Scienza, A., Failla, O. (2006) Chloroplast mischrosatellites to investigate the origin of grapevine, *Genet. resour. Crop Ev.* **53**, 1003-1011.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agr. Food Chem.***52**, 4360–4367.

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. *Arh Hig Rada Toksikol* **55**, 279-290.

Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.*, **71**, 214–222.

Mirošević, N. (1996) Vinogradarstvo, 2. prošireno izdanje, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

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.

Naczk, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chrom.* A. **1054** (1-2), 95-111.

Nerantzis, E.T., Tataridis, P. (2006) Integrated Enology - Utilization of winery by-products into high added value products. *J. Sci. and Tech.* **3**, 1–12

Rajha, H.N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R.G., Vorobiev, E. (2014) A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Res. Int.* **65**, 462-468.

Radošević, K, Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe*.**112**, 46-53.

Rein, MJ. (2005) Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Disertacija. Sveučilište Helsinki, Helsinki.

Revilla, E., Ryan, J. M., Martin-Ortega, G. (1998) Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. J. *Agric. Food Chem.* **46**, 4592-4597.

Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2000) Handbook of Enology, 2.izd., John Wiley & Sons, New York.

Rostagno, M. A., Prado, J. M. (2013) *Natural product extraction: Principles and applications*. Cambridge, UK: RSC Pub.

Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Tahsin Yilmaz, M. (2011) RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars:

Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices, *Food Chem.*, 126, 1749-1758

Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. (2000) Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Caner Lett.* **158**, 85-91.

Springett, B. (2001) Effect of agronomic factors on grape quality for wine production. In: Raw Ingredient Quality in Processed Foods. (Springett, M.B. (Ured.)) Maryland: Aspen Publishers, str. 125−146.

Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., GarciaViguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sc*i. **15**, 15638-15678.

Teo, C.C., Tana, S.N., Yong, J.W., Hew, C.S., Ong, E.S. (2010) Pressurized hot water extraction (PHWE). *J. Chrom. A* **1217**, 2484–2494.

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., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153.

Tuntarawongsa, S., Phaechamud, T. (2012) Polymeric eutectic drug delivery system. *J. Met. Mater. Miner.* **22**, 27−32.

Van Wyk, B. E. Winter, P. J. D. (1994) Chemotaxonomic value of anthocyanins in Podalyria and Virgilia (tribe Podalyrieae: Fabaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **22**(8), 813-818.

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

Xia, E., Deng, G., Guo, Y., Li, H. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622-646.

Yair, M. (1997) Concepts in Wine Chemistry, Wine Appreciation Guild, San Francisco, California, USA, str. 228

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