

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

MARIJELA BAŠIĆ i HELENA VIBOVEC

**Usporedba učinkovitosti ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa
Plavac mali ionskim tekućinama i klasičnim postupcima ekstrakcije**

Zagreb, 2013.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod vodstvom dr.sc. Karin Kovačević-Ganić, izv. prof. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.“

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	3
3. TEORIJSKI DIO.....	5
3.1. VINOVA LOZA.....	7
3.2. PLOD VINOVE LOZE (GROŽĐE)	8
3.2.1. Anatomska građa bobice grožđa	8
3.2.2. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa	10
3.2.3. Kemijski sastav bobice grožđa	11
3.3. FENOLNI SPOJEVI	12
3.3.1. Antocijani	14
3.3.2. Tanini (proantocijanidini).....	17
3.3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva	18
3.4. IONSKE TEKUĆINE	21
3.4.1. Razvoj ionskih tekućina	21
3.4.2. Svojstva ionskih tekućina	22
3.4.3. Priprema ionskih tekućina	23
3.4.4. Primjena ionskih tekućina	24
3.4.5. Ekstrakcija ionskim tekućinama.....	25
3.4.6. Ionske tekućine i <i>zelena kemija</i>	26
4. MATERIJAL I METODE.....	26
4.1. MATERIJAL.....	28
4.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice grožđa.....	28
4.1.2. Ionske tekućine.....	29
4.1.3. Standardi i reagensi	30
4.1.4. Oprema i aparatura	31
4.2. METODE	32
4.2.1. Ekstrakcija antocijana i tanina iz pokožice grožđa ionskim tekućinama.....	32
4.2.2. Ekstrakcija antocijana iz pokožice grožđa metanolom uz dodatak klorovodične kiseline..	32
4.2.3. Ekstrakcija tanina iz pokožice grožđa u dvije faze (aceton i metanol).....	32
4.2.4. Određivanje ukupnih antocijana.....	33
4.2.5. Određivanje ukupnih tanina	34
4.2.6. Određivanje slobodnih antocijana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ...	35

4.2.7. Statistička analiza	37
5. REZULTATI	38
5.1. UDJEL UKUPNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	40
5.2. UDJEL UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	43
5.3. UDJEL SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	45
5.4. STATISTIČKA ANALIZA SASTAVA SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	50
6. RASPRAVA	52
6.1. UDJEL UKUPNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	54
6.2. UDJEL UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	56
6.3. UDJEL SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	57
6.4. STATISTIČKA ANALIZA SASTAVA SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA.....	59
7. ZAKLJUČCI	60
8. POPIS LITERATURE.....	62
9. ZAHVALE	70
10. SAŽETAK.....	72
11. SUMMARY.....	74

1. UVOD

Ionske tekućine definiraju se kao organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C. Primjena ionskih tekućina postala je predmetom intenzivnih istraživanja posljednjih petnaestak godina. Ionske su tekućine poznate i kao nova „zelena“ otapala u kemiji koja bi mogla postati alternativa hlapljivim i škodljivim klasičnim organskim otapalima. Svoju su primjenu između ostalog našle i kao otapala za ekstrakciju u pripremi uzoraka za kromatografsku analizu.

Specifični polifenolni sastav biljnih materijala predmet je brojnih studija pa tako i u tehnologiji i analitici vinagdje su suantocijani i tanini (proantocijanidini) od iznimnog značaja. Antocijani su važni jer su upravo oni zaslužni za crnu boju vina te postoji mogućnost korištenja profila antocijana kao kemotaksonomskog kriterija za utvrđivanje razlika između vrsta grožđa što bi omogućilo kontrolu patvorenja vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Tanini također pridonose organoleptičkim svojstvima vina, a najveći utjecaj imaju na trpkoću i gorčinu vina.

Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje takve metode zahtijevaju. Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije od kojih je jedna i ekstrakcija korištenjem ionskih tekućina (Dai i Mumper, 2010). Ionske tekućine odlikuju se poželjnim svojstvima za otapala kao što su nizak ili zanemariv tlak pare, topljivost brojnih organskih i anorganskih spojeva u njima, visoka toplinska stabilnost, visoki toplinski kapacitet, visoka provodljivost te nezapaljivost. Iako se niti jedna ionska tekućina ne odlikuje svim navedenim karakteristikama, ono što ih razlikuje od ostalih otapala i po čemu su posebne je mogućnost dizajniranja njihove strukture u cilju dobivanja željenih svojstava koja bi omogućila povećanje njihove efikasnosti (Poole, 2004).

Zbog kompleksnosti strukture polifenolnih spojeva i zahtijevnih analitičkih metoda objavljen je mali broj radova koji se bave ekstrakcijom polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa klasičnim načinima ekstrakcije. Istraživanja vezana uz ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala primjenom ionskih tekućina tek su u začetku, tako da postoji tek mali broj objavljenih radova vezanih uz tu tematiku, gdje su uglavnom određivani standardi polifenolnih spojeva, a nije se radila njihova ekstrakcija iz biljnog materijala. Određivani su standardi polifenolnih spojeva jednostavnije strukture (galna kiselina, elaginska kiselina), dok su kompleksne i polimerne flavonoidne strukture ($C_6C_3C_6$) kao što su antocijani i tanini potpuno neistraženi.

S obzirom da se u posljednjih dvadesetak godina sve više pažnje pridaje razvoju i primjeni procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš u radu će se istražiti mogućnost zamjene klasičnih postupaka ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa sorte Plavac mali organskim otapalima s ekstrakcijom pomoću ionskih tekućina različite strukture.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je ispitati mogućnost korištenja ionskih tekućina kao alternative klasičnim metodama ekstrakcije organskim otapalima. Korištenje ionskih tekućina omogućilo bi provođenje ekstrakcija prema principima zelene kemije u cilju smanjenja potrošnje organskih otapala te potencijalno smanjenje duljine trajanja ekstrakcije.

Specifični ciljevi rada su utvrditi učinkovitost ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa sorte Plavac mali primjenom različitih imidazolijevih ionskih tekućina u odnosu na organska otapala. Jedan od ciljeva rada je i odrediti postoje li svojstva ionskih tekućina koja direktno utječu na efikasnost ekstrakcije antocijana i tanina.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. VINOVA LOZA

Vinova loza (*lat. Vitis vinifera*) je višegodišnja biljka penjačica iz porodice *Vitaceae* koja potječe s područja Bliskog Istoka odakle se proširila po čitavom svijetu. Listovi su različitih oblika i različite zelene boje što ovisi o vrsti vinove loze. Vinova loza cvate od lipnja do srpnja, a cvatnja traje samo 4 do 5 dana. Plod vinove loze (grožđe) je u obliku grozda, a vrijeme dozrijevanja ploda ovisi o sorti i podneblju gdje raste stoga u našem podneblju grožđe dozrijeva od srpnja do listopada. Vinova loza je najveći voćni usjev na svijetu, a procjenjuje se da godišnja proizvodnja grožđa iznosi oko 65 milijuna tona (FAO, 1998). Oko 80% godišnjeg usjeva se koristi za proizvodnju vina, a ostatak se koristi za konzumaciju. Razlikujemo dvije velike skupine grožđa, europska i sjeverno-američka vrsta. Europsko grožđe pripada vrsti *Vitis vinifera L.* i čini oko 95% proizvedenog grožđa dok sjeverno-američko grožđe pripada vrstama *Vitis labrusca* i *Vitis rotundifolia*. Europski tip grožđa karakterizira relativno debela pokožica koja prianja uz čvrstu i slatku pulpu (Jackson, 2008).

3.2. PLOD VINOVE LOZE (GROŽĐE)

Većina grožđa vrste *Vitis vinifera* najbolje uspijeva u području s mediteranskom klimom gdje su duga i relativno suha ljeta te blage zime (Nelson, 1991). U istraživanju korištena je crna sorta Plavac mali (*Vitis vinifera L.*). Plavac mali je hrvatska autohtona sorta koja je ujedno i najvažnija crna sorta u Hrvatskoj. Uspijeva u obalnom dijelu te na otocima srednje i južne Dalmacije jer su mu za postizanje najbolje kvalitete potrebna područja koja su okrenuta prema moru i do kojih dopire najviše direktnih i reflektiranih sunčevih zraka (Maletić i sur., 2004).

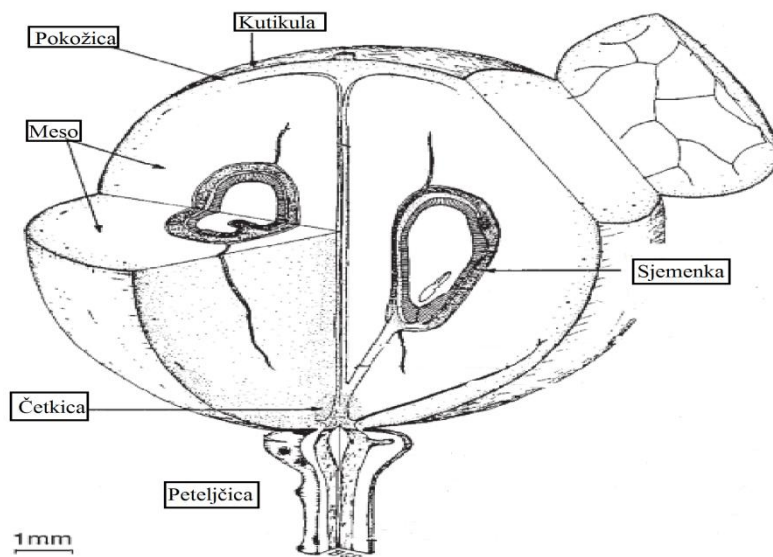
3.2.1. Anatomska građa bobice grožđa

Tijekom razvoja bobice grožđa dolazi do transformacije plodnice u perikarp. Na slici 1 je prikazana pojednostavljena građa bobice grožđa. Perikarp se sastoji od egzokarpa koji čini vanjski dio bobice grožđa (pokožica), mezokarpa (središnji dio) i endokarpa (unutarnji dio). Mezokarp i endokarp čine pulpu, a unutar pulpe se nalaze sjemenke.

Tkivo perikarpa tvori više od 65% volumena bobice. Pokožica bobice grožđa (egzokarp) se sastoji od dvije anatomski različite regije. Vanjski dio pokožice čini epiderma, a unutarnji dio čini hipoderma. Epiderma sadrži jedan sloj spljoštenih stanica u obliku diska sa nepravilno valovitim krajevima. To su ujedno i stanice u kojima se ne odvija fotosinteza već se u njihovim vakuolama nalaze kapljice ulja. Ovisno o vrsti, mogu razviti zadebljanu ili lignificiranu stjenku. Na epidermi se nalazi nekolicina puči koje s vremenom tj. zrenjem gube funkciju, postaju plutaste i u njima se akumuliraju polifenoli. Iznad epiderme se nalazi kutikula sa debelim slojem voska. Na njoj se nalaze mikrofisure i mikropore preko kojih se odvija transpiracija. Hipoderma se sastoji od više slojeva usko nabijenih mezofilnih stanica, a njihov broj ovisi o vrsti grožđa. Stanice su spljoštene i imaju zadebljane kutove stjenke. U ranom stadiju razvoja, stanice imaju fotosintetsku ulogu, a nakon dozrijevanja (véraison) plastidi gube klorofil i škrob i počinju akumulirati kapljice ulja. Takvi modificirani plastidi postaju mjesto sinteze i skladištenja terpena i norizoprenoida. Većina stanica hipoderme također akumulira flavonoide dok su antocijani, prisutni u vrstama crnog grožđa, akumulirani u njenim krajnjim slojevima.

Kod mezokarpa bobice razlikujemo vanjski dio koji se nalazi između hipoderme i perifernih vaskularnih vlakana i unutarnji dio koji je ograničen perifernim i aksilarnim vaskularnim nitima. Većina stanica mezokarpa je okruglog, jajastog oblika i sadrže velike vakuole koje mogu pohraniti fenole, dok iste rijetko sudjeluju u fotosintezi. Sloj stanica koji predstavlja granicu između mesnatog dijela bobice i sjemene lože se često naziva unutarnja epiderma. Septum je središnji dio gdje se spajaju dva oplodna listića tučka.

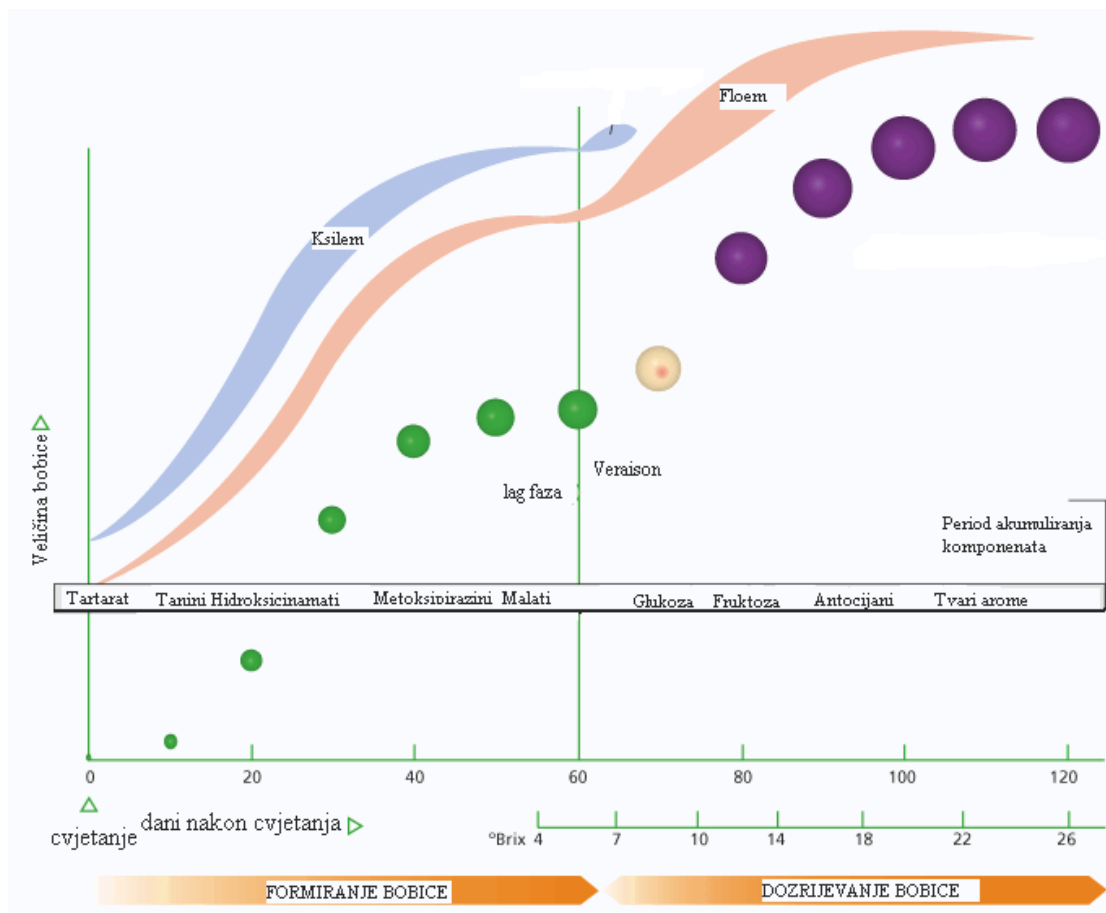
Razvoj sjemenki je povezan sa sintezom regulatora rasta koji su neophodni za razvoj voća, a broj sjemenki djelomično ovisi o veličini voća. Glavni dio sjemenke čini endosperm koji služi kao izvor hrane embriju jer sadrži ulje, škrob, bjelančevine te mineralne tvari. Endosperm je okružen parom integumenata od kojih se samo jedan značajnije razvija. Embrij zauzima najmanji dio volumena sjemenke. Građen od dva klicina listića (kotiledona), epikotila (gornji dio izdanka) i sjemenskog korjenčića na vrhu hipokotila (donji dio izdanka) (Jackson, 2008).



Slika 1. Građa bobice grožđa (Jackson, 2008).

3.2.2. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa

Razvoj bobice sastoji se od dvije faze rasta (Slika 2). Prva faza razvoja bobice traje otprilike 60 dana nakon cvatnje. Tijekom tog perioda formira se bobica i stvaraju se zametci sjemenki. Prvih nekoliko tjedana dolazi do brzog dijeljenja stanica i na kraju tog perioda unutar bobice uspostavlja se konačan broj stanica. Tijekom prve faze razvoja bobice dolazi do akumulacije spojeva kao što su minerali (Possner i Kliewer, 1985), aminokiseline (Stines i sur., 2000), mikronutrijenti i spojevi arome (metokspirazini) (Allen i Lacey, 1999). Bobica se opskrbljuje hranjivim tvarima preko vaskularnog sistema koji se sastoji od ksilema i floema. Drugu fazu razvoja bobice ili dozrijevanja (*véraison*) karakterizira pojava boje i omekšavanje bobice grožđa. Bobica grožđa predstavlja osnovno mjesto gdje se odvija biosinteza sekundarnih metabolita koji su od velike važnosti za kakvoću vina (Gholami i sur., 1995).



Slika 2. Formiranje bobice i dozrijevanje grožđa (Coombe i McCharty, 2000).

3.2.3. Kemijski sastav bobice grožđa

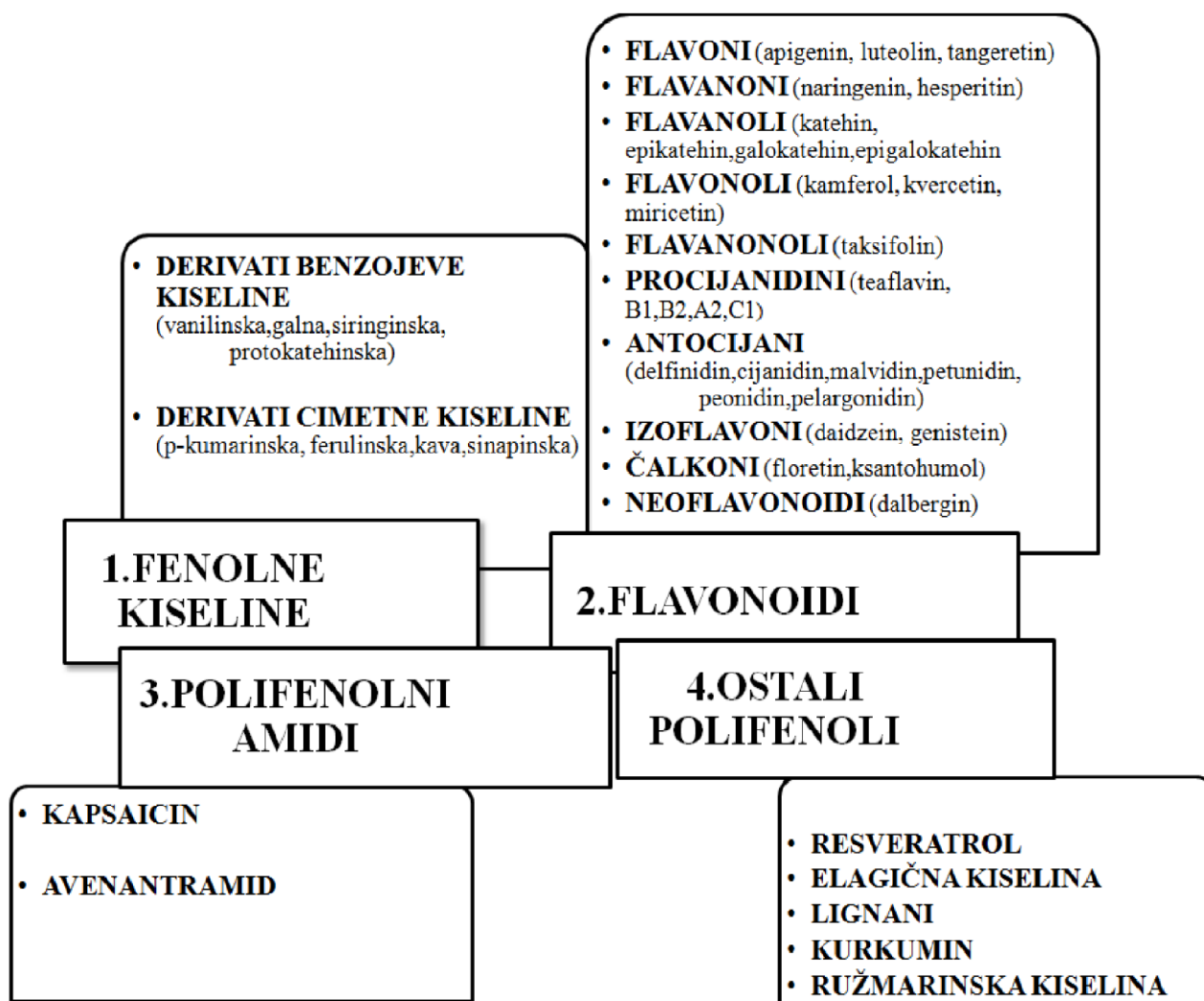
Na kemijski sastav grožđa utječu brojni čimbenici, a neki od njih su zrelost, vrsta, područje u kojem raste te godina berbe (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Saharoza je kvantitativno najznačajniji organski sastojak u voću. Tijekom ranog razvoja bobice grožđa dio ugljikohidrata sudjeluje u fotosintezi pri čemu se dobiva energija koja je potrebna za daljnji razvoj bobice. Tijekom zrenja dolazi do akumulacije šećera i to najviše u vakuolama stanica pulpe. Tijekom zrenja još dolazi i do redukcije kiselosti. Vinska i jabučna kiselina čine 70-90% ukupnih kiselina bobice. U grožđu nalazimo neke organske kiseline (npr. limunska), fenolne kiseline, aminokiseline i masne kiseline.

Od prisutnih mineralnih tvari u bobici grožđa najznačajniji je kalij. Kalij utječe na sintezu i ionizaciju kiselina tijekom zrenja. Čimbenici koji utječu na akumulaciju kalija u bobici nisu dobro poznati. Njegova količina se povećava nakon dozrijevanja, pogotovo u pokožici. Pokožica zauzima 10% mase bobice, a sadrži 30-40% ukupnog sadržaja kalija koji se ponaša kao regulator osmotskog potencijala stanice. Pektinske tvari se nalaze u staničnoj stjenci i daju čvrstoću stanicama. Tijekom zrenja dolazi do razgradnje pektina uslijed djelovanja enzima ili uslijed smanjenja koncentracije kalcija u staničnoj stjenci, a posljedica toga je mekšanje bobica.

Mekšanje dovodi do lakšeg izdvajanja soka iz pulpe te fenolnih spojeva i tvari arome iz pokožice. Lipidi su prisutni u grožđu kao masne kiseline, kutin, fosfolipidi i glikolipidi membrane, kutikularni i epikutikularni vosak te kao ulja u sjemenkama. Tijekom zrenja u grožđu raste koncentracija u vodi topljivih proteina, a najčešće je to glutation. Od slobodnih aminokiselina prisutne su primarno prolin i arginin (Jackson, 2008).

3.3. FENOLNI SPOJEVI

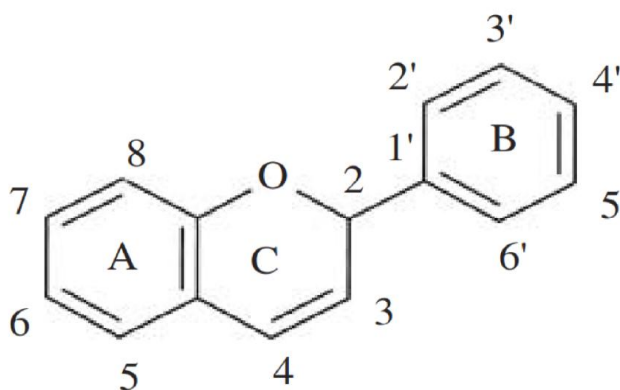
Polifenoli su važni organski spojevi koji su prisutni u voću. Važnost polifenolnih spojeva je bila uglavnom vezana uz organoleptička svojstva (boja, trpkost, gorčina, okus), a posljednjih desetljeća je prepoznata njihova nutritivna vrijednost jer istraživanja pokazuju da imaju pozitivne učinke na zdravlje. Njihov blagotvoran učinak na organizam proizlazi iz sposobnosti vezanja slobodnih radikala (antioksidansi), kelatnog djelovanja (vezanje dvovalentnih kationa) te inaktivacije određenih enzima zbog čega im se pripisuju antikancerogena, antiteratogena, protuupalna, antimikrobna, antialergijska i mnoga druga svojstva (Valls i sur., 2009). To je mnogobrojna skupina spojeva koja uključuje velik broj podgrupa spojeva, ali svima je zajedničko svojstvo da su topljivi u vodi i staničnom soku. One se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima. Na slici 3 su prikazane skupine unutar polifenola i njihovi glavni predstavnici.



Slika 3. Podjela polifenola (Tsao, 2010).

Kod grožđa, izuzevši fenolne spojeve sjemenke, najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u pokožici bobice (Jackson, 2008). Polifenolni spojevi su vrlo važni u tehnologiji crnih vina jer utječu na boju vina i daju karakterističan okus. Pigmentacija crnih sorti je ograničena na epidermu i vanjske slojeve hipoderme pokožice (Walker i sur., 2006), a potječe od antocijana (Jackson, 2008). Bijelo grožđe sadrži manje ukupnih fenola od crnog grožđa i ne sadrži antocijane. Boja bijelog grožđa potječe od karotenoida, ksantofila i flavonola kao što je npr. kvercetin. Karotenoidi se akumuliraju u plastidima, a flavonoli u vakuolama (Jackson, 2008).

Predmet našeg istraživanja su bili antocijani i tanini (proantocijanidini) koji pripadaju skupini flavonoida. Flavonoide karakterizira C6-C3-C6 struktura kao što je prikazano na slici 4. Sastoje se od dva fenolna prstena (A i B) koji su povezani preko centralnog piranskog prstena (C). Flavonoidi mogu postojati kao slobodni ili kao polimeri vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili njihovom kombinacijom. Njihova primarna funkcija u biljkama je prva linija obrane protiv patogenih mikroorganizama, štetnih insekata i biljojeda (Jackson, 2008).



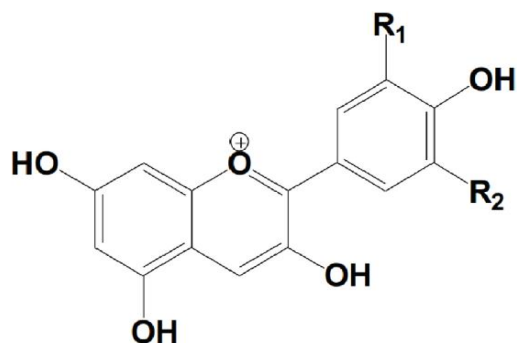
Slika 4. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Jackson, 2008).

3.3.1. Antocijani

Antocijani su najveća i najvažnija grupa vodotopivih pigmenata u prirodi (Clifford i sur., 2000), s preko šest stotina različitih spojeva. Riječ antocijan svoje podrijetlo ima u dvjema grčkim riječima, *anthos* što znači cvijet i *kyanos* što znači tamno plavo. Oni su glavni sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većini cvjetnih latica, voća i povrća te određenih žitarica (Anderson, 2006). Temeljnu strukturu antocijana čini 2-benzil-1-benzopirilium kation (flavilium ion) čiji su položaji 3,5,7,4' hidroksilirani. Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikozilaciji sa različitim šećerima (Tsao, 2009).

Antocijani se u biljkama, pa tako i u sortama *Vitis vinifera*, uglavnom nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer (Anderson, 2006). U strukturi antocijana jedan ili više položaja mogu biti zamijenjeni molekulom monosaharida (glukozom, galaktozom, ramnozom, ksilozom, ili arabinozom), disaharida ili trisaharida (Clifford i sur., 2000). U antocijanima najčešće nalazimo glukozu koja se može vezati na C-3 i/ili C-5 položaj molekule antocijanidina i na taj način se povećava kemijska stabilnost i topljivost antocijana. Osim toga, glukozni dio u molekuli antocijana može biti esterificiran kiselinama (p-kumarinskom, kafeinskom kiselinom ili alifatskom octenom kiselinom) obično na C-6 položaju (Jackson, 2008) što utječe na svojstva antocijana poput otpornosti na toplinu, svjetlo, SO₂, visoki pH, poboljšanje kakvoće i stabilnosti boje (Clifford i sur., 2000).

U grožđu su antocijani u većini slučajeva prisutni u pokožici. Iznimke su bojadiseri tj. sorte grožđa koje sadrže antocijane i u pulpi. Najčešće identificirani antocijani u pokožici grožđa i vinu iz porodice *Vitis vinifera* su 3-O-monoglukozidi i 3-O-acilirani monoglukozidi sastavljeni od 5 najčešćih antocijanidina a to su delphinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin (Slika 5). Raspodjela i koncentracija antocijana u grožđu ovisi o vrsti, zrelosti, klimatskim uvjetima, području proizvodnje te prinosu. U grožđu je malvidin-3-glukozid najzastupljeniji antocijan.



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 5. Kemijska struktura antocijana (Tsao, 2010).

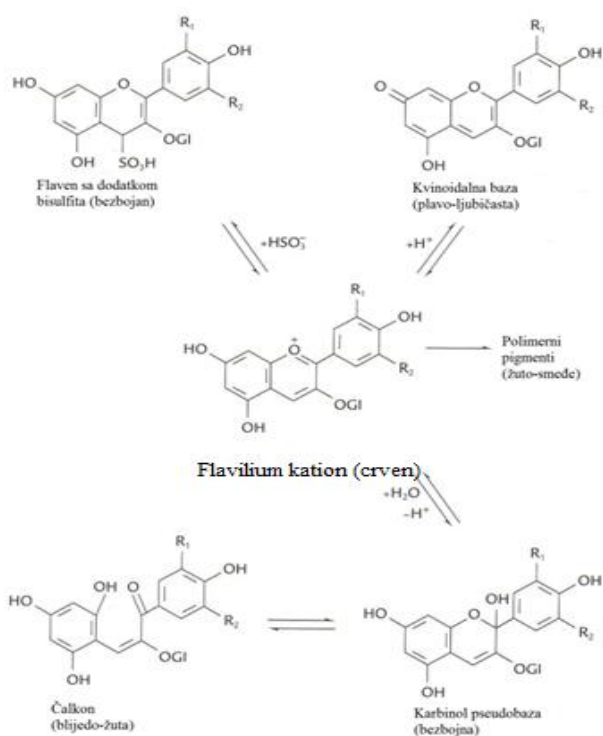
Antocijani su vrlo osjetljivi spojevi i na njihovu stabilnost utječu brojni čimbenici poput pH, temperature, svjetla, prisutnosti drugih fenolnih spojeva, enzima, iona metala, šećera, askorbinske kiseline, kisika i sumporova dioksida.

Antocijani su od iznimne važnosti u kemiji i tehnologiji vina iz više razloga. Jedan od njih je mogućnost korištenja profila antocijana vina kao kemotaksonomskog kriterija kako bi se ustanovile razlike između vrsta grožđa, lokalizacija vinograda i prinosa, godišta, tehnika proizvodnje vina. Vrste grožđa se mogu karakterizirati na više načina. Jedan se temelji na povezanosti između ukupne i individualne koncentracije antocijana, a drugi se temelji na acetil ili cinamol transferaznoj aktivnosti u grožđu. Acetil ili cinamolil transferazna aktivnost se određuje s obzirom na prisutnost, odnosno odsutnost, antocijana aciliranih octenom ili p-kumarinskom kiselinom (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Drugi razlog je utjecaj na boju vina. Dakle, antocijani su uz enološku praksu odgovorni za boju vina. Enološka praksa podrazumijeva tehnologiju proizvodnje vina, temperaturu skladištenja, vrijeme skladištenja i izloženost kisiku.

Antocijani grožđa najstabilniji su u kiselom mediju i pri sobnoj temperaturi, tada se nalaze u crvenoj kationskoj flavilium formi (Brouillard i sur., 2003) koja je odgovorna za boju grožđa i mladih vina. Pri pH vina, koji prema Mazzi (1995) iznosi između 3,2 i 3,9, antocijani grožđa dolaze većinom kao bezbojni, karbinol oblik. Dodatak bisulfita uzrokuje reakcije sulfidnih iona s antocijanskim flavilium ionom dajući bezbojne oblike. Ovaj je kemizam poznat kao efekt posvjetljivanja (Cheynier i sur., 2006). Ovisnost strukture antocijana o pH sredine prikazana je na slici 6.

Razlog smanjenja koncentracije antocijana tijekom čuvanja i starenja vina je njihova reaktivnost s drugim fenolnim sastojcima (najčešće flavanolima) jer na taj način postaju stabilniji, a to rezultira promjenom boje vina (plavkasto-crvena boja mladih vina postaje smečkasto-crvena boja kod zrelih vina). Postoji nekoliko načina konverzije antocijana u nove, stabilnije spojeve. Prvi tip konverzije je direktna reakcija sa flavanolima, drugi tip je reakcija sa flavanolima uz posredovanje acetaldehida, a treći tip je cikloadicija antocijana sa nekim metabolitima kvasaca koji sadrže polarnudvostruku vezu (Atanasova i sur., 2001). Prema Ribereau-Gayonu i sur. (2000) u mladim vinima koncentracija antocijana je između 100 i 1500 mg L⁻¹, a starenjem vina njihova koncentracija drastično opada čak do 50 mg L⁻¹.

Antocijani utječu na kemijska i organoleptička svojstva vina jer osim interakcija sa fenolnim spojevima, reagiraju i sa proteinima i ugljikohidratima (Mazza, 1995).

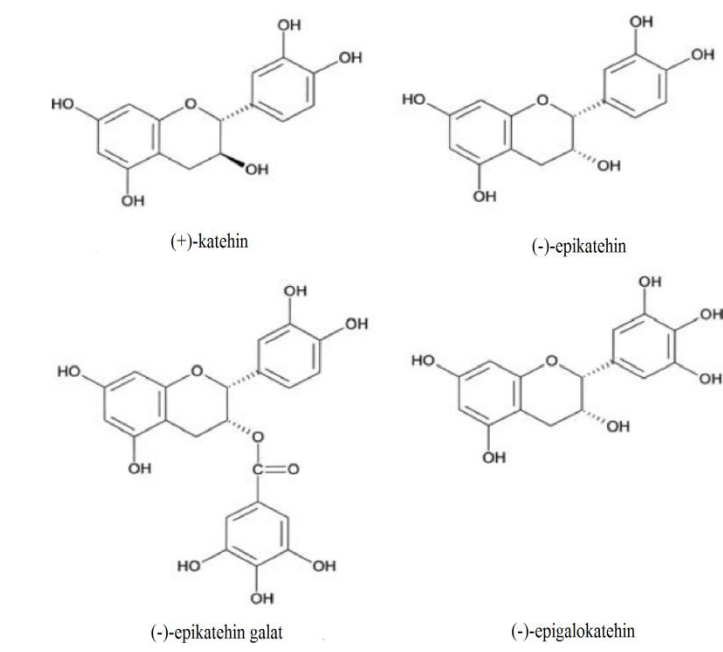


Slika 6. Utjecaj pH na strukturu antocijana (Jackson, 2008).

3.3.2. Tanini (proantocijanidini)

Tanini ili proantocijanidini nastaju polimerizacijom flavanola (katehina). Mogu se klasificirati na više načina, s obzirom na flavonoidne monomere, vezanje, esterifikaciju drugih komponenata ili funkcionalna svojstva. Najčešći strukturni oblik tanina sadrži samo jednovalentne ugljikove veze između flavonoidnih podjedinica. Na slici 7 su prikazani tipični flavan-3-oli u grožđu, a to su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehingalat i najrjeđi (-)-epigalokatehin (Jackson, 2008). Većina flavanola i polimernih tanina se sintetizira u sjemenkama i stabljici, a samo 15-20% se sintetizira u pokožici (Bourzeix i sur, 1986; Downey i sur, 2003).

Tanini karakteristični za grožđe i vino su procijanidini B tipa u kojima dolazi do povezivanja C-4 položaja piranskog prstena gornjeg flavonoida s C-8 položajem na A prstenu donjeg flavonoida. Procijanidini B1, B2, B3 i B4 se razlikuju samo u poretku početnih i završnih katehinskih i epikatehinskih jedinica. Povezivanje flavonoida između C-4 i C-6 položaja omogućava grananje inače linearnog procijanidinskog polimera. Procijanidini A nastaju povezivanjem C-4 i C-8 položaja ili povezivanjem C-2 položaja sa hidroksilnom grupom na C-7 položaju, ali takvi procijanidini su rijetki (Jackson, 2008).



Slika 7. Kemijska struktura najčešćih flavan-3-ola u taninima grožđa (Jackson, 2008).

Postoje strukturne razlike između tanina iz različitih dijelova bobice tako da nisu isti tanini koji se nalaze u pokožici, pulpi ili sjemenkama. Tanini sjemenke su manje polimerizirani od proantocijanidina pokožice. Također postoje razlike u tipu i koncentraciji tanina između različitih vrsta grožđa (Kovac' i sur, 1990). U mladim vinima većina ekstrahiranih tanina su dimeri ili trimeri, a tijekom starenja vina dolazi do povezivanja tanina sa monomernim flavonoidima pri čemu nastaju veliki polimeri (Jackson, 2008). Tanini su značajni u tehnologiji vina jer utječu na organoleptička svojstva vina tako što pridonose trpkoci i gorčini vina. Molekulska masa tanina je povezana sa trpkocom jer tanini veće molekulske mase više pridonose trpkoci dok mehanizmi povezanosti veličine molekula i gorčine još uvijek nisu u potpunosti istraženi. (Gawel, 1998). Također, imaju ulogu u dugoročnoj stabilnosti boje vina jer ulaze u reakcije sa antocijanima kao što su primjerice kopigmentacija ili kondenzacija (Somers, 1971).

3.3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili suhих uzoraka biološkog materijala. Često se prije same ekstrakcije biljni materijal usitnjava i homogenizira čemu mogu prethoditi operacije sušenja. Sušenje se može provoditi na zraku ili se provodi pri niskim temperaturama (liofilizacija) (Dai i Mumper, 2010).

Ekstrakcija polifenolnih spojeva najčešće se provodi klasičnim metodama ekstrakcije, koja uključuju razna organska otapala, te se upravo ekstrakcija otapalima smatra najraširenijom metodom pripreme uzorka za kromatografsku analizu (Chen i sur., 2008.). Sve metode ekstrakcije otapalima baziraju se na miješanju uzorka sa prikladnim otapalom i/ili prevođenje uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobno slabo topljiva. Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala s obzirom na polarnost, vrijeme ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Dai i Mumper, 2010). Metode ekstrakcije koje se koriste za ekstrakciju raznih polifenolnih spojeva međusobno se razlikuju s obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva sa različitom strukturom i svojstvima. Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju (Valls i sur., 2009). Najčešće korištena otapala su metanol, aceton, etanol, acil acetat te njihove kombinacije koje se u različitim omjerima miješaju s vodom a upravo pravilan odabir otapala utijeće na iskorištenje ekstrakcije

polifenola. Klasične metode ekstrakcije kao što su maceracija i soxhletova ekstrakcija pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije kao što su to 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).

MAE je proces u kojem je korištena energija mikrovalova za poboljšanje difuzije analita iz uzorka u otapalo. A najveća prednost metode je smanjenje trajanja ekstrakcije te manje količine korištenih otapala. Neki polifenolni spojevi, kao što su tanini i antocijani, ipak nisu pogodni za MAE zbog moguće degradacije pri uvjetima ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Liazid i sur, 2007).Mehanizam UAE temelji se na energiji koja se oslobađa implozijom kavitacijskih mjehurića pod utjecajem zvučnih valova niske frekvencije i viske snage pri čemu dolazi do razaranja stanične membrane i povećanja brzine difuzije polifenolnih spojeva iz uzorka u otapalo (Laborde i sur., 1998).Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom je novija metoda ekstrakcije polifenola koja se odvija u uvjetima visokog tlaka i temperature a moguće je korištenje otapala (npr. voda) koja su pri atmosferskim uvjetima neefikasna. Ju i Howard su u svojem istraživanju pokazali da je PLE u ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa, korištenjem zakiseljene vode pod tlakom i pri temperaturama od 80-100°C jednako efikasna kao i zakiseljeni 60%-tni metanol koji se uobičajeno upotrebljava za ekstrakciju antocijana (Ju i Howard,2003).

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 tekućeg ugljikova dioksida i u posljednjih desetak godina sve popularnije ionske tekućine (Dai i Mumper, 2010).

3.3.3.1. *Ekstrakcija antocijana*

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 stvaranjem antocijana iz flavanola i proantocijanidina prirodno prisutnih u pokožici grožđa te takva reakcija u konačnici 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 efikasnost 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. Upotreba metanola uz dodatak 2% klorovodične kiseline pokazuje najvišu efikasnost ekstrakcije. Također korištenje metanola uz dodatak 1% klorovodične kiseline ima značajnu višu efikasnost ekstrakcije od metoda koje uključuju upotrebu metanola bez dodatka klorovodične kiseline. 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. Kako ne bi došlo do značajnije hidrolize aciliranih antocijana preporuča se korištenje otapala uz dodatak klorovodične kiseline do 1%.

3.4. IONSKE TEKUĆINE

Ionske tekućine (*eng.* ionic liquids, IL) definiraju su kao organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C za koje se u stručnoj literaturi rabe i drugi izrazi poput rastopljene soli (*eng.* molten salts), tekuće organske soli (*eng.* liquid organic salts) ili fuzionirane soli (*eng.* fused salts). Ionske tekućine poznate su već gotovo cijelo stoljeće iako su predmet intenzivnih istraživanja postale tek u posljednjih 15 godina (Poole, 2004). Ionske su tekućine poznate i kao nova „zelena“ otapala u kemiji koja bi mogla postati alternativa hlapljivim i škodljivim klasičnim organskim otapalima. Za razliku od klasičnih organskih otapala građenih od molekula, ionske su tekućine građene od različite kombinacije kationa i aniona o kojima ovise i njihova specifična fizikalno-kemijska svojstva. U ionskim tekućinama su najčešće dugački, nesimetrični organski kationi poput imidazolijeva, pirolidinijeva, piridinijeva, amonijeva ili pak fosfonijeva kationa dok su najčešći anioni halogenidi (npr. [Br], [Cl]), tetrafluorborat [BF₄], heksafluorfosfat [PF₆] i mnogi drugi (Han i Row, 2010).

3.4.1. Razvoj ionskih tekućina

Prva zabilježena ionska tekućina je etil-amonijev nitrat s točkom tališta na 12 °C koju je sintetizirao P. Walden za vojne potrebe (Walden, 1914) dok je moderna povijest ionskih tekućina započela tek polovicom 20. stoljeća kada su F. Hurly i T. Weir primijenili alkilpiridinijev kloraluminat za jednostavniji i jeftiniji način galvanizacije aluminija (Hurly, 1951).

Ionske se tekućine s obzirom na strukturu, svojstva i vrijeme otkrivanja mogu podijeliti na ionske tekućine prve, druge i treće generacije (Wilkes, 2002; Kärkkäinen, 2007). Ionske tekućine prve generacije su soli sačinjene od kloroaluminatnih ili klorferatnih aniona s odgovarajućim organskim kationima (različito supstituirani imidazolijevi i piridinijevi kationi) koje zbog izrazite higroskopnosti te osjetljivosti na vodu i zrak nisu našle širu primjenu. Ionske tekućine druge generacije koje ne sadrže halogenide, zbog svojih svojstava kao što su stabilnost u prisutnosti vode i vlage, niske temperature tališta, dobre kemijske i toplinske stabilnosti te niske viskoznosti, našle su mnogo rašireniju primjenu od ionskih tekućina prve generacije (Kärkkäinen, 2007). Ionske tekućine treće generacije poznate su i kao funkcionalne ionske tekućine koje u strukturi sadrže neku funkcionalnu skupinu (npr. -OH, -SH, -NH₂, -SO₃Cl itd.) ili su kiralne. Očekuje se da će se primjena funkcionalnih ionskih tekućina sve više proširiti na području kemije (Kirchner, 2009).

Nazivi ionskih tekućina prema IUPAC-ovoj nomenklaturi su obično dugi jer se imenuju kationski i anionski dio soli. Uobičajeni način označavanja ionskih tekućina je primjenom uglatih zagrada u formatu [kation][anion] ali se u literaturi koriste kartice koje su nedosljedne te bi bilo korisno razviti ujednačen sustav kratica (Dzyuba, 2002).

3.4.2. Svojstva ionskih tekućina

Specifična fizikalno-kemijska svojstva različitih ionskih tekućina proizlaze iz velikog broja različitih kombinacija aniona i kationa stoga je teško definirati jedinstvena svojstva za sve ionske tekućine. Bez obzira na razlike među njima, postoji nekoliko zajedničkih karakteristika koje odlikuju većinu ionskih tekućina. Ionske tekućine većinom su bezbojne te relativno visoke viskoznosti, imaju vrlo nizak gotovo nezamjetljiv tlak pare pri atmosferskim uvjetima, teško su hlapljive te se smatraju vrlo dobrim otapalima za širok spektar organskih, anorganskih i polimernih materijala. Karakteristike poput viskoznosti, površinske napetosti i gustoće ovise o duljini alkilnih lanaca, obliku ili simetriji kationa dok su svojstva poput toplinske stabilnosti i miješanja sa vodom ili organskim otapalima uglavnom ovisne o prirodi aniona (Han i Row, 2010).

Niska temperatura tališta najistaknutija je karakteristika ionskih tekućina, smatra se da je posljedica male vrijednosti energije kristalne rešetke zbog velikih i asimetričnih kationa te s druge strane aniona pravilne strukture (Earle i Seddon, 2000), dok je gornja granica tekućeg stanja ionskih tekućina vezana prije uz termičku razgradnju, koja se ovisno o prirodi kationa i aniona, kreće u rasponu od 250 - 450 °C nego uz isparavanje (Ajam, 2005).

Ionske tekućine se mogu dizajnirati kako bi se postigla željena svojstva. Procjenjuje se da su u literaturi opisani postupci pripreve za oko 10^3 različitih ionskih tekućina, a čak je 1/3 tih spojeva komercijalno dostupna (IoLiTec, 2011). Upravo zbog toga ionske se tekućine često nazivaju i *dizajniranim otapalima* (eng. designer solvents). Pogodnim svojstvima ionskih tekućina smatraju se nizak tlak pare, nezapaljivost, visoka topljivost organskih, anorganskih i polimernih materijala, dobra provodljivost, dobra toplinska stabilnost i smanjena viskoznost koja omogućuje lakše miješanje (Jastorff i sur., 2003).

3.4.3. Priprema ionskih tekućina

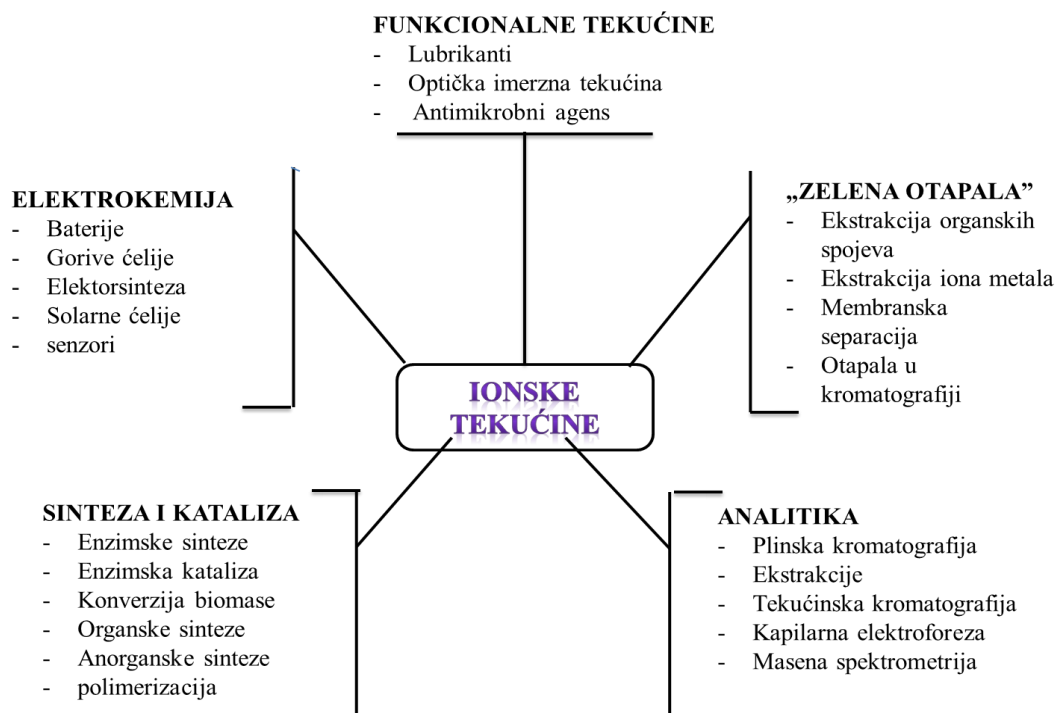
Klasična priprema ionskih tekućina u pravilu je jednostavna, iako nerijetko dugotrajna, uz iscrpnu izolaciju i pročišćavanje kako bi se pripremle ionske tekućine zadovoljavajuće čistoće (Deetlefs i Seddon, 2010). Postupak pripreme ionskih tekućina najčešće se odvija u dva koraka. Prvi je korak priprema željenog kationa reakcijom kvaternizacije tercijarnog amina ili fosfina s odgovarajućim alkilirajućim reagensom dok se u drugom koraku provodi izmjena aniona solima ili kiselinama koje sadrže željeni anion (Deetlefs i Seddon, 2010). Kvaternizacija se odvija uz dovođenje topline (50-80 °C) a reakcija se najčešće odvija u organskom otapalu iako je moguće provesti reakcije bez prisutnosti otapala. Nakon kvaternizacije, komponente reakcijske smjese koje nisu reagirale ispiru se s organskim otapalom te se suše u visokom vakuumu. Ako je halogenidna sol krutina, pročišćavanje se provodi rekristalizacijom iz acetonitrila (Kärkkäinen, 2007; Deetlefs i Seddon, 2010). Nastala halogenidna ili sulfonatna sol može se izravno primijeniti kao ionska tekućina, no češće se anion izmjenjuje postupcima izmjene aniona kako bi se pripravila ionska tekućina s odgovarajućim anionom (Deetlefs i Seddon, 2010).

Klasične metode pripreme ionskih tekućina imaju mnogo nedostataka poput dugog trajanja reakcije, visokih temperatura pri kojima se reakcija provodi te primjene velike količine alkil –halogenida i organskih otapala. Stoga se posljednjih desetak godina proučavaju sinteze ionskih tekućina s učinkovitijim prijenosom topline, poput sinteze potpomognute mikrovalnim zračenjem (Deetlefs i Seddon, 2003), ultrazvukom (Namboodiri i Varma, 2002) te sinteze u mikrostrukturiranim uređajima (Hu i sur., 2008).

3.4.4. Primjena ionskih tekućina

Ionske tekućine su predmet brojnih znanstvenih istraživanja, a poseban naglasak je na brojnim mogućnostima primjene ionskih tekućina. Ionske tekućine su svoju primjenu našle u organskim sintezama (Duchet i sur., 2010), elektrokemiji (Zanoni i sur., 2010), ekstrakcijama (Fontanals i sur., 2009), katalizi (Seddon, 1997) te procesima polimerizacije (Kubisa, 2009).

Posljednjih su godina mnoga znanstvena istraživanja vezana za primjenu ionskih tekućina u separacijskim procesima. Han i Row su na temelju dotadašnjih istraživanja opisali primjenu ionskih tekućina kao modifikatora mobilne faze (metanolu ili acetonitrilu) u svrhu poboljšanja separacije tekućinske kromatografije, korištenje ionskih tekućina kao otapala za ekstrakciju u pripremi uzoraka (Ekstrakcija organskih i metalnih kontaminacija, Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnih izvora), primjenu ionskih tekućina kao površinski vezane stacionarne faze u tekućinskoj ili plinskoj kromatografiji te pripremu modificiranih membrana u svrhu veće selektivnosti transporta organskih spojeva (Han i Row, 2010).



Slika 8. Primjena ionskih tekućina (Sun i Armstrong, 2010; Freemantle, 2010; Kärkkäinen, 2007).

3.4.5. Ekstrakcija ionskim tekućinama

Jedna od novijih metoda ekstrakcije je upravo ekstrakcija ionskim tekućinama i to ponajprije onima kojima je temperatura vrelišta niža od sobne temperature ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) (*eng.* room-temperature ionic liquids, RTIL). Neke ionske tekućine su pogodne kao zamjena za organska otapala kod uobičajene tekuće-tekuće ekstrakcije upravo zbog svojstva netopljivosti u vodi što omogućuje stvaranje dvofaznog sustava s jedne, te visoke topljivosti brojnih organskih spojeva u ionskim tekućinama, s druge strane. Ionske tekućine kao „zelena otapala“ smanjuju potrošnju otapala, smanjuju izloženost hlapljivim organskih otapalima te su većinom ekološki prihvatljiva. Poželjna svojstva ionskih tekućina koje se primjenjuju kao otapala su nizak ili zanemariv tlak para, topljivost brojnih organskih i anorganskih spojeva u njima, visoka toplinska stabilnost, visoki toplinski kapacitet, visoka provodljivost te nezapaljivost. Iako se ni jedna ionska tekućina ne odlikuje svim navedenim karakteristikama već je ranije spomenuto da postoji mogućnost dizajniranja željenih ionskih tekućina različitim kombinacijom aniona i kationa ili pak kombinacijom više ionskih tekućina (Poole, 2004).

Ionskim tekućinama, kojima osnovu čini imadizol, moguće je postići jednaku ili čak veću efikasnost ekstrakcije polifenolnih spojeve u odnosu na klasična otapala (Lu i sur., 2008). Primjena ionskih tekućina, kojima osnovu čini imadizol, kao otapala za ekstrakciju brojnih bioaktivnih spojeva sumirali su Han i Row (2010), a neki od primjera su, ekstrakcija polifenolnih spojeva iz lišća guave (*lat. Psidium guajava Linn.*) i ekstrakcijafenolnih alkaloida iz indijskog lotusa (*lat. Nelumbo nucifera Gaertn.*). Ekstrakcija je u oba slučaja bila potpomognuta mikrovalnim zračenjem. Kao što je i u ovim navedenim primjerima slučaj, primjena ionskih tekućina kao otapala za ekstrakciju često se kombinira s novim metodama ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima (Lu i sur., 2008) ili pak ultrazvukom (Sun i sur., 2012).

3.4.6. Ionske tekućine i zelena kemija

Pojam *zelena kemija* prvi put je upotrijebljen 1991. godine a definira se kao dizajniranje kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu odnosno stvaranje škodljivih i opasnih supstancija (US EPA, 2013). Zelena kemija temelji se na 12 načela koja uključuju primjenu sigurnijih pomoćnih sredstava (npr. otapala), primjenu ekološki prihvatljivih sinteza, primjenu obnovljivih sirovina, korištenje ekološki prihvatljivih proizvoda i sl. (Anastas i Warner, 1998). Klasična organska otapala koja se uobičajeno koriste u separacijskim procesima, koje se sa načelima zelene kemije te se sve više pažnje posvećuje traženju alternative za navedena organska otapala. Prema smjernicama zelene kemije, idealno otapalo treba biti kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, jednostavno za upotrebu te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe.

Upravo su ionske tekućine zbog svojih svojstava kao što su neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost te mogućnost recikliranja privukle najveću pozornost kao alternativa klasičnim organskim otapalima u cilju poboljšanja postojećih procesa s ekološkog aspekta (Kärkkäinen, 2007). Iako se zbog škodljivih i lako hlapljivih organskih otapala koje se koriste kao sirovine u pripremi ionskih tekućina one ne mogu smatrati u potpunosti *zelenim* kemikalijama danas se sve više istražuju ekološki prihvatljive metode pripreme ionskih tekućina. Sinteza ionskih tekućina potpomognuta alternativnim oblicima zagrijavanja (mikrovalno zračenje i ultrazvuk) u konačnici dovodi do boljeg iskorištenja reakcije uz nastajanje manje količine otpada (Deetlefs i Seddon, 2010), također se ispituju i novi putevi sinteze koji ne uključuju primjenu sirovina koje nemaju zeleni karakter. Iako bi se uporabom ionskih tekućina smanjilo onečišćenje zraka, one mogu nakon primjene ali i slučajnim izlivanjem, dospjeti u tlo, površinske i podzemne vode te se tako nakupljati u prirodi i višim organizmima, a zbog upitne biorazgradivosti mogu negativno utjecati na čitav ekosustav (Coleman i Gathergood, 2010), stoga je prije njihove proizvodnje i uporabe u industrijskom mjerilu, potrebno provesti detaljnije studije procjene njihova rizika za okoliš (Pham i sur., 2010).

4. MATERIJAL I METODE

4.1.MATERIJAL

4.1.1. Liofilizirani uzorci pokožice grožđa

U radu su korišteni su liofilizirani uzorci pokožice grožđa sorte Plavac mali. Uzorci su dobiveni odvajanjem pokožice grožđa od pulpe. Ovako pripremljena pokožica je podvrgnuta postupku liofilizacije.

Postupak liofilizacije

50 g pokožice grožđa sorte Plavac mali je smrznuto na -20 °C prije liofilizacije. Liofilizacija je provedena u liofilizatoru Alpha 1-2 LD plus na -80 °C tijekom 2 dana. Nakon liofilizacije uzorak pokožice je samljeven i homogeniziran te uskladišten do analize.

4.1.2. Ionske tekućine

Ionske tekućine korištene u radu sintetizirane su u *Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije*, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Tablica 1. Šifra, naziv, koncentracija i pH ionskih tekućina korištenih u radu.

Šifra	Ionska tekućina	c (mol L ⁻¹)	pH
A_0.5	1-etil-3-metilimidazol bromid	0.5	4.86
A_1.5	1-etil-3-metilimidazol bromid	1.5	4.86
A_2.5	1-etil-3-metilimidazol bromid	2.5	4.95
B_0.5	1-butil-3-metilimidazol bromid	0.5	6.33
B_1.5	1-butil-3-metilimidazol bromid	1.5	6.11
B_2.5	1-butil-3-metilimidazol bromid	2.5	6.1
C_0.5	1-pentil-3-metilimidazol bromid	0.5	6.95
C_1.5	1-pentil-3-metilimidazol bromid	1.5	6.90
C_2.5	1-pentil-3-metilimidazol bromid	2.5	6.58
D_0.5	1-heptil-3-metilimidazol bromid	0.5	8.19
D_1.5	1-heptil-3-metilimidazol bromid	1.5	7.85
E_0.5	1-decil-3-metilimidazol bromid	0.5	9.00
E_1.5	1-decil-3-metilimidazol bromid	1.5	8.96
F_0.5	1-butil-3-metilimidazol sulfit	0.5	5.35
F_1.5	1-butil-3-metilimidazol sulfit	1.5	5.37
F_2.5	1-butil-3-metilimidazol sulfit	2.5	5.38
G_0.5	1-heksil-3-metilimidazol nitrat	0.5	5.95
G_1.5	1-heksil-3-metilimidazol nitrat	1.5	5.98
G_2.5	1-heksil-3-metilimidazol nitrat	2.5	6.00
H_0.5	1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetat	0.5	6.30
H_1.5	1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetat	1.5	6.45
H_2.5	1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetat	2.5	6.50
I_0.5	1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat	0.5	1.85
I_1.5	1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat	1.5	1.54
I_2.5	1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat	2.5	1.36

4.1.3. Standardi i reagensi

Za izradu ionskih tekućina, spektrofotometrijsko određivanje ukupnih antocijana i tanina korišteni su reagensi najmanje *pro analysis* stupnja čistoće, a za analizu slobodnih antocijana visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) svi reagensi i standardi bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

- Acetonitril, *pro chromatography*, Panreac, Barcelona, Španjolska
- Orto-fosforna kiselina, Fluka, Neu-Ulm, Njemačka
- Kalijev dihidrogen fosfat, Poch, Gliwice, Poljska
- Natrijev hidrogensulfit, Acros organics, Geel, Belgija
- Etanol, p.a., Carlo Erba, Rodano, Italija
- Metanol, *pro chromatography*, Carlo Erba, Rodano, Italija
- Aceton, p.a., Carlo Erba, Rodano, Italija
- Klorovodična kiselina (37%), p.a., Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
- Delfinidin-3-glukozid, Polyphenols, Sandnes, Norveška
- Peonidin-3-glukozid, Polyphenols, Sandnes, Norveška
- Petunidin-3-glukozid, Polyphenols, Sandnes, Norveška
- Cijanidin-3-glukozid, Polyphenols, Sandnes, Norveška
- Malvidin-3-glukozid, Polyphenols, Sandnes, Norveška

4.1.4. Oprema i aparatura

- liofilizator, Alpha 1-2 LD_{plus}, Christ, Njemačka
- analitička vaga, Mettler Toledo, Švicarska
- vortex, MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka
- tresilica, Fischer Biobloch Scientific, Illkirch, France
- centrifuga, Hettich EBA20, Tuttlingen, Njemačka
- rotavapor, Büchi R-205, Büchi Corporation, New Castle, DE, SAD
- pH metar, wtw series inolab ph/c ond 720, WTW Inc College Station, Texas, SAD
- ultrazvučna kupelj, Transoic 460, Elma, Njemačka
- UV-VIS spektrofotometar, Unicam Helios β, SAD
- filtri za filtraciju uzoraka, 25mm Diameter, Nylon Membranes, 0.45 μm Supelco, Supelco Park, Bellefonte, SAD
- kolona, Nucleosil C-18, 5 μm, 250 × 4,60 mm I.D., Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD
- tekućinski kromatograf Varian Pro Star (Varian, Walnut Creek, SAD)
sastavljen iz:
 - Varian Pro Star Solvent Delivery System 230
 - Varian Pro Star Photodiode Array detector 330
 - Star Chromatography Workstation Version 5
 - Varian Pro Star Column Valve Module 500

4.2. METODE

4.2.1. Ekstrakcija antocijana i tanina iz pokožice grožđa ionskim tekućinama

0,2 g liofilizirane pokožice sorte Plavac mali odvažuje se u epruvetu za ekstrakciju volumena 15 mL te se doda 5 mL ionske tekućine. Sve se dobro promiješa (Vortex) i stavi na tresilicu kroz 3 sata, pri sobnoj temperaturi. Nakon završene ekstrakcije na tresilici, uzorak se centrifugira (5000 okretaja) kroz 15 minuta. Sadržaj epruvete nakon centrifugiranja filtrira se u tikvicu od 5 mL nakon čega se provodi daljnja analiza.

4.2.2. Ekstrakcija antocijana iz pokožice grožđa metanolom uz dodatak klorovodične kiseline

Ekstrakcija antocijana organskim otapalom provedena je na isti način kao prethodno opisana ekstrakcija ionskim tekućinama, a kao otapalo za ekstrakciju korišten je 70 % metanol s 1 % klorovodične kiseline (pH = 1,25). 0,2 g liofilizirane pokožice sorte Plavac mali odvažuje se u epruvetu za ekstrakciju volumena 15 mL te se doda 5 mL metanola s 1% klorovodične kiseline. Sve se dobro promiješa (Vortex) kroz 10 sekundi i stavi na tresilicu kroz 3 sata, pri sobnoj temperaturi. Nakon završene ekstrakcije na tresilici, uzorak se centrifugira (5000 okretaja) kroz 15 minuta. Sadržaj epruvete nakon centrifugiranja filtrira se u tikvicu od 5 mL nakon čega se provodi daljnja analiza.

4.2.3. Ekstrakcija tanina iz pokožice grožđa u dvije faze (acetone i metanol)

Ekstrakcija tanina organskim otapalima provedena je u dva koraka, uz korištenje dva različita otapala. Uzorak liofilizirane pokožice se odvažuje (0,2 g) te se doda 5 mL 80 % acetona. Sve se dobro promiješa (Vortex) kroz 10 sekundi i stavi na tresilicu kroz 3 sata, pri sobnoj temperaturi. Nakon završene ekstrakcije na tresilici, uzorak se centrifugira (5000 okretaja) kroz 15 minuta te se provede dekantiranje acetonske frakcije. Nakon dekantiranja, u epruvetu sa zaostalim krutim uzorkom doda se 5 mL 60 % metanola te se postupci ponavljaju kao i kod ekstrakcije acetonom. Metanolna frakcija se dekantira te pomiješa sa acetonskom frakcijom nakon čega slijedi uparavanje na rotavaporu (220 rotacijamin⁻¹) pri 30°C. Upareni uzorak se otopi u 5 mL metanola nakon čega se provodi daljnja analiza.

4.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Metoda za određivanje ukupnih antocijana temelji se na činjenici da se hidrogensulfidni ion veže na 2' položaju i prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno se paralelni uzorak tretira destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka.

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 se u obje otopine mjeri apsorbancija na 520 nm (Ribereau- Gayon i Stonestreet, 1965).

Rezultati se izražavaju kao mg antocijana L⁻¹ uzorka:

$$A_c = 875 \times (D_1 - D_2)$$

Gdje je:

A_c – masena koncentracija antocijana u uzorku (mg L⁻¹)

875 – faktor preračunavanja

D_1 – apsorbancija uzorka s 4 ml destilirane vode

D_2 – apsorbancija uzorka s 4 ml 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata

4.2.5. Određivanje ukupnih tanina

Metoda za određivanje ukupnih tanina temelji se na hidrolizi tanina pri temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau- Gayon i Stonestreet, 1966). Spektrofotometrijski se određuje razlika obojenja pri 550 nm između hidroliziranog zagrijanog i nezagrijanog uzorka. Razlika apsorbancije pokazuje količinu tanina.

Postupak određivanja je priprema uzoraka na način da se ekstrakti razrijede 50 puta, u dvije tube za hidrolizu dodaje se po 2 mL razrijeđenog ekstrakta, 1 mL destilirane vode i 3 mL klorovodične kiseline (37 %) te se tube hermetički zatvore. Jedna tuba se ostavlja na sobnoj temperaturi dok se druga stavlja u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta tuba se izvadi iz vodene kupelji te se ohladi ledom. U obje tube dodaje se 500 µL etanola (96 %) te se mjeri apsorbancija pri 550 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu (Ribereau- Gayon i Stonestreet, 1965).

Rezultati su izraženi kao masena koncentracija tanina u uzorku razrijeđenom 50 puta.

$$Ac = 19,33 \times (D_1 - D_2)$$

Gdje je:

Ac – masena koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku

19,33 – faktor preračunavanja

D₁ – apsorbancija negrijanog uzorka

D₂ – apsorbancija grijanog uzorka

4.2.6. Određivanje slobodnih antocijana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Vrsta i udio pojedinih slobodnih antocijana u uzorcima određeni su uz pomoć tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) metodom po Berente i sur., 2000.

Priprema otopine standarda

Prije analize samih uzoraka pripremljene su otopine standarda (delfinidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, petunidin-3-glikozid, malvidin-3-glukozid), u pet različitih koncentracija, koji su podvrgnuti kromatografskoj analizi te je iz ovisnosti površine pikova o masenoj koncentraciji nacrtan baždarni pravac te izračunata pripadajuća jednadžba pravca i koeficijent determinacije.

Kromatografski uvjeti

- kolona: Nucleosil C-18, 250 × 4,60 mm, 5 μm (Phenomenex)
- temperatura kolone: 25 °C
- pokretna faza: A [acetonitril : pufer (10 mmol L⁻¹ kalijev hidrogenfosfat + fosforna kiselina, pH 1,60) = 5 : 95]
B [acetonitril : pufer = 50 : 50]
- eluiranje: gradijentno
- gradijent :

t (min)	A (%)	B (%)	protok (mL min⁻¹)
0	90	10	1
30	55	45	1
31	0	100	1
34	0	100	1
35	90	10	1
40	90	10	1

- detektor: PDA, 520 nm
- vrijeme trajanja 40 min
- injektirani volumen: 20 μL
- vrijeme uravnoteženja kolone: 5 min

Uzorci su prije instrumentalne analize profiltrirani kroz filter Nylon Membranes dijametra 25 mm, veličine pora 0.45 μm (Supleco, Bellefonte, SAD).

Identifikacija i kvantifikacija antocijana

Identifikacija i kvantifikacija antocijana provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja standarda te njihovom usporedbom. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih antocijana izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravca pripadajućih standarda.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravca standardnih antocijana i koeficijenti determinacije.

Standardi	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije (R^2)
Cijanidin-3-glukozid	$y=171993x$	$R^2=0,9999$
Delfinidin-3-glukozid	$y=163136x$	$R^2=0,9998$
Peonidin-3-glukozid	$y=160776x$	$R^2=0,9999$
Petunidin-3-glukozid	$y=191500x$	$R^2=0,9999$
Malvidin-3-glukozid	$y=123920x$	$R^2=0,9999$

4.2.7. Statistička analiza

Izračunate su srednje vrijednosti svih eksperimentalnih podataka te je izračunata standardna devijacija (SD) i interval pouzdanosti (CI). Obrada podataka provedena je primjenom programa Microsoft Excel 2010.

Provedena je analiza glavnih komponenata (Principal component analysis) primjenom programa Statistica V.7 software (Statsoft Inc. Tulsa, SAD).

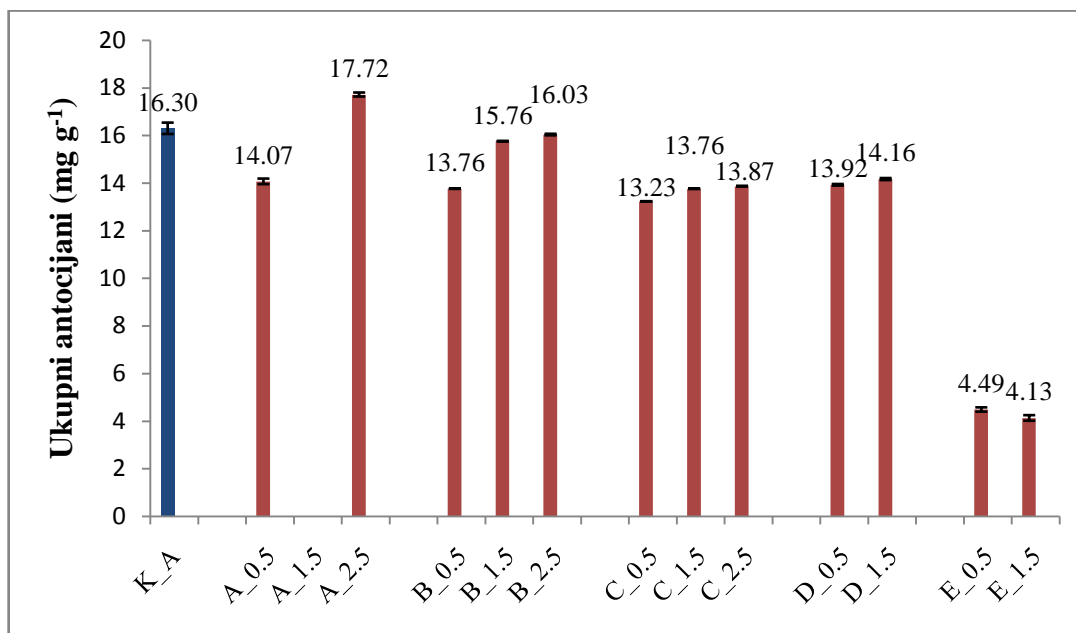
5. REZULTATI

Rezultati spektrofotometrijske analize ukupnih antocijana grafički su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije (Slika 9 - Slika 13). Grafovi prikazuju usporedbu ekstrakcije ukupnih antocijana različitim ionskim tekućinama u odnosu na ekstrakciju kontrolnim organskim otapalom (70 % metanol s 1% klorovodične kiseline).

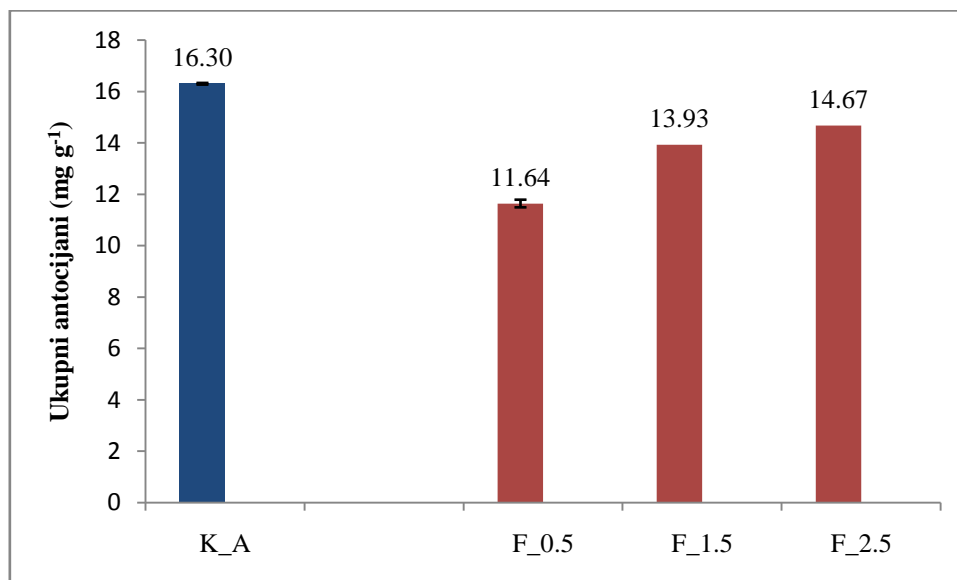
Rezultati spektrofotometrijske analize ukupnih tanina grafički su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije (Slika 14 - Slika 17). Grafovi prikazuju usporedbu ekstrakcije ukupnih tanina različitim ionskim tekućinama u odnosu na ekstrakciju kontrolnim organskim otapalima (80 % aceton i 60 % metanol).

Kromatografska analiza provedena je radi određivanja sastava i količine pojedinih antocijana u uzorku pokožice grožđa sorte Plavac mali. Rezultati kromatografske analize grafički su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz prikaz standardne devijacije (Slika 18 – Slika 25). Određeno je po pet različitih koncentracija svakog standardnog spoja te su iz dobivene površine pikova i koncentracije pojedinog spoja izračunate jednadžbe baždarnih pravaca (Tablica 2) koje su korištene u kvantifikaciji slobodnih antocijana u uzorcima. Grafovi prikazuju usporedbu ekstrakcije ukupnih antocijana različitim ionskim tekućinama u odnosu na ekstrakciju kontrolnim organskim otapalom (70 % metanol zakiseljen 1 % klorovodičnom kiselinom).

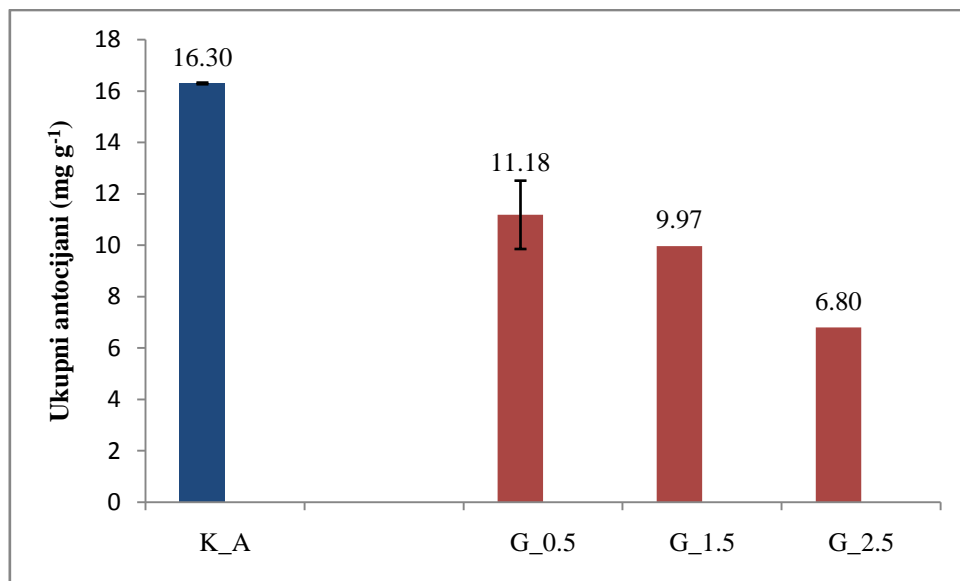
5.1. UDJEL UKUPNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTIMA POKOŽICE GROŽĐA



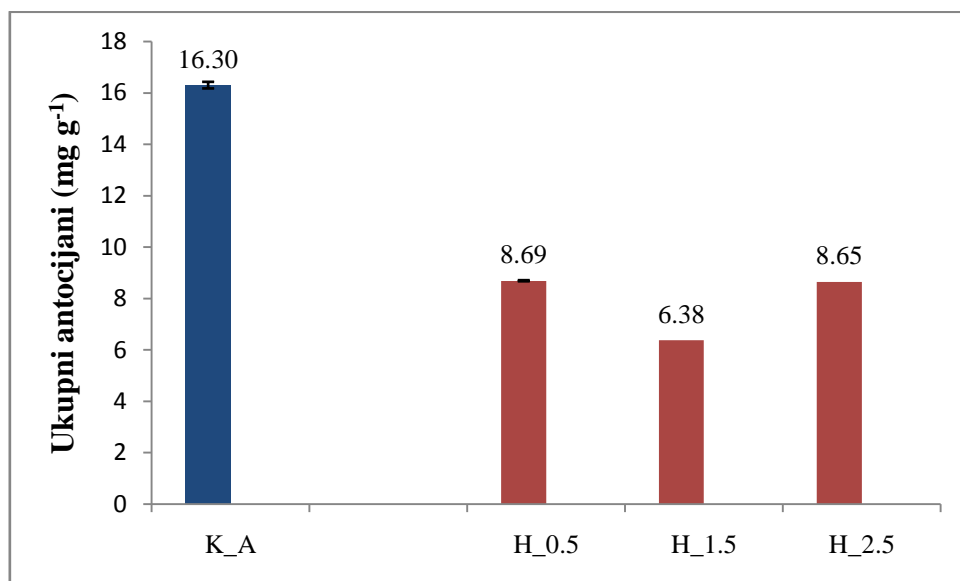
Slika 9. Usporedba udjela ukupnih antocijana dobivenih alkil-metilimidazol bromidima i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



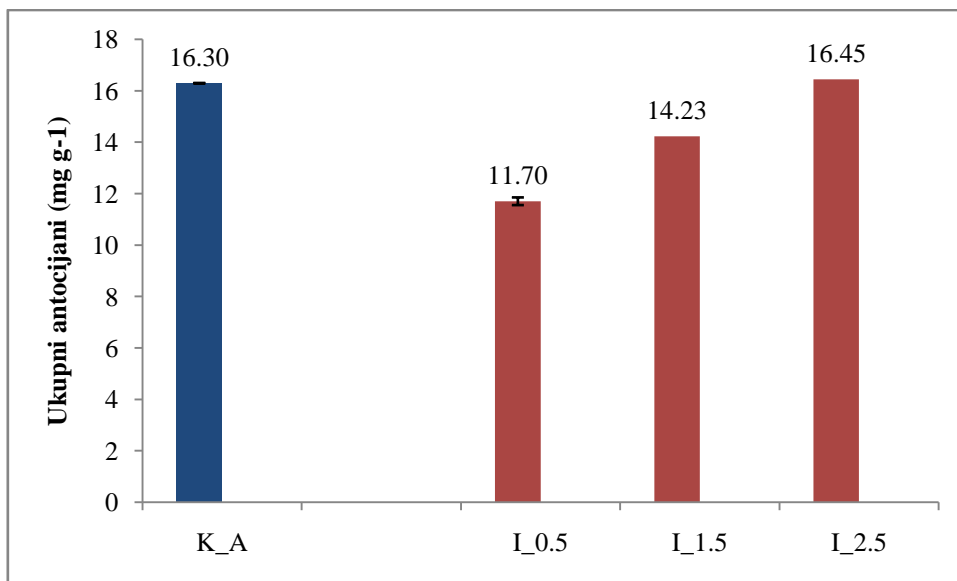
Slika 10. Usporedba udjela ukupnih antocijana 1-butil-3-metilimidazol sulfatom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



Slika 11. Usporedba ekstrakcije ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol nitratom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

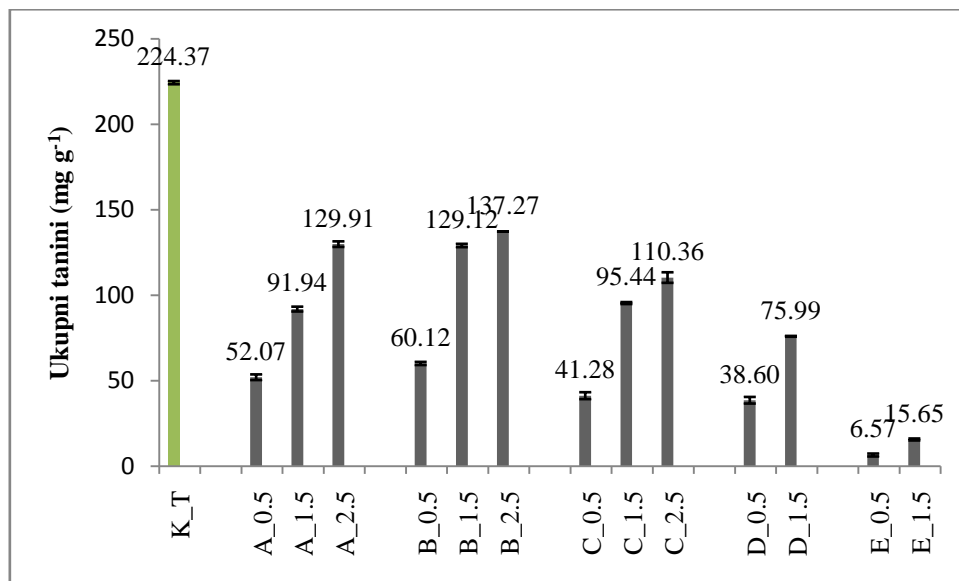


Slika 12. Usporedba ekstrakcije ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetatom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

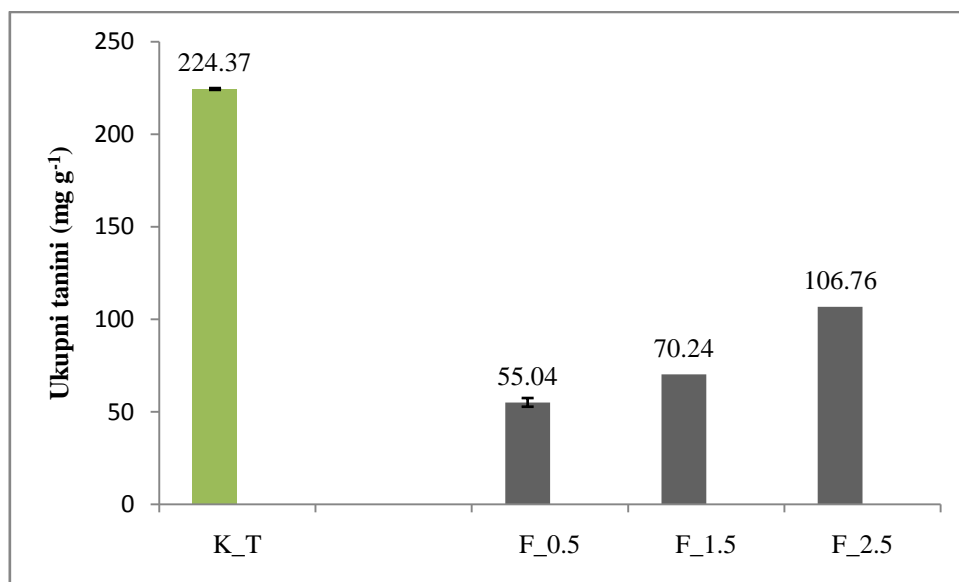


Slika 13. Usporedba ekstrakcije ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfatom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

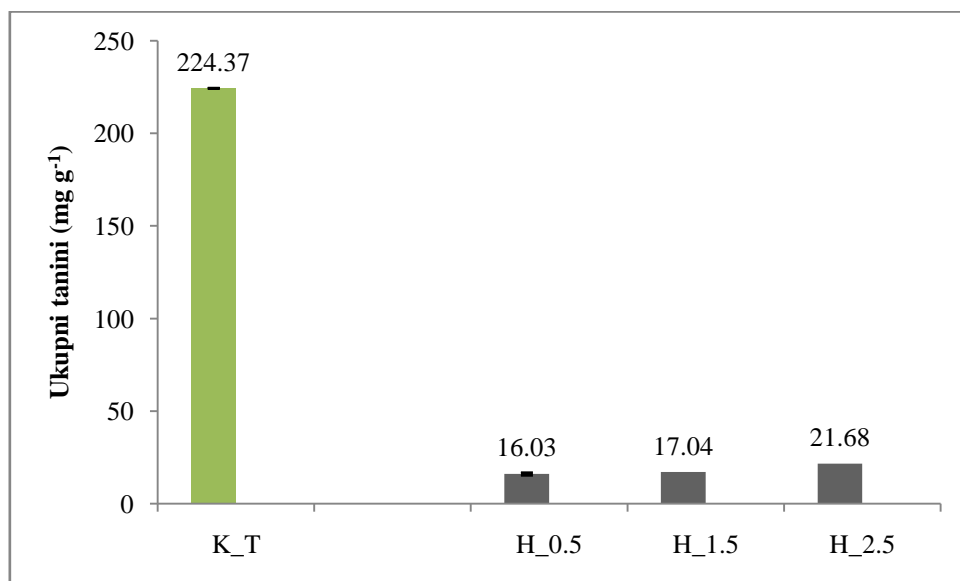
5.2. UDJEL UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA



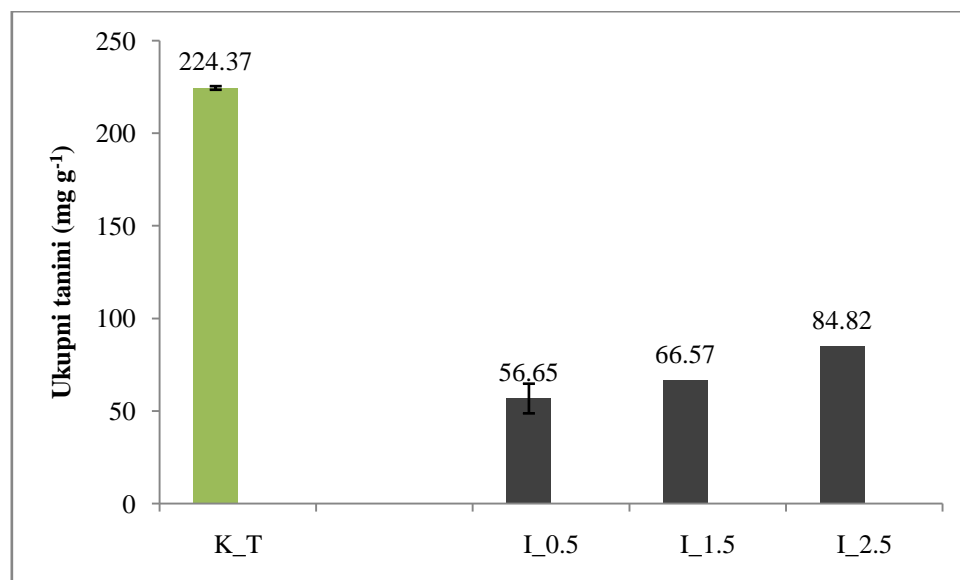
Slika 14. Usporedba ekstrakcije ukupnih tanina alkil-metilimidazol bromidima i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalima.



Slika 15. Usporedba ekstrakcije ukupnih tanina 1-butil-3-metilimidazol sulfitom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalima.

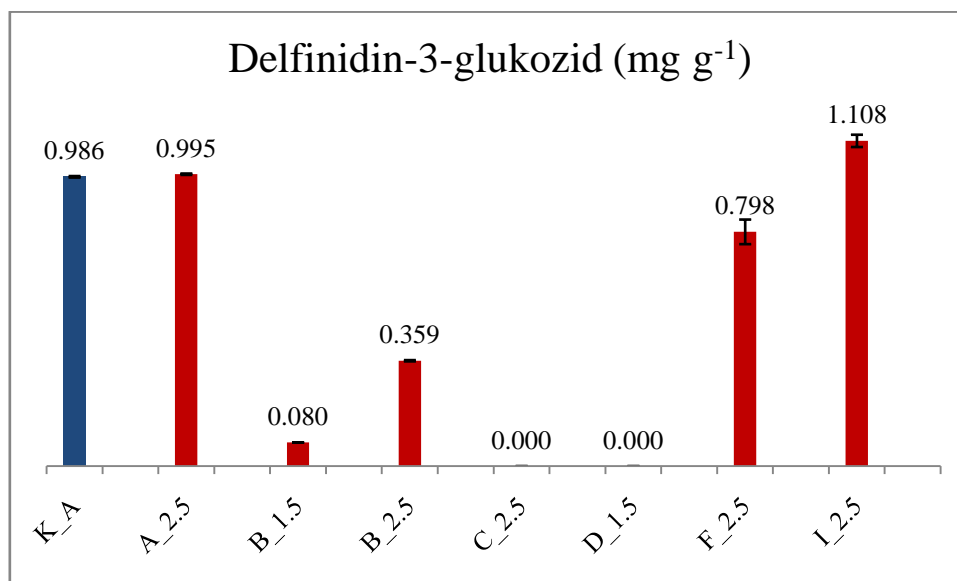


Slika 16. Usporedba ekstrakcije ukupnih tanina 1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetatom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalima.

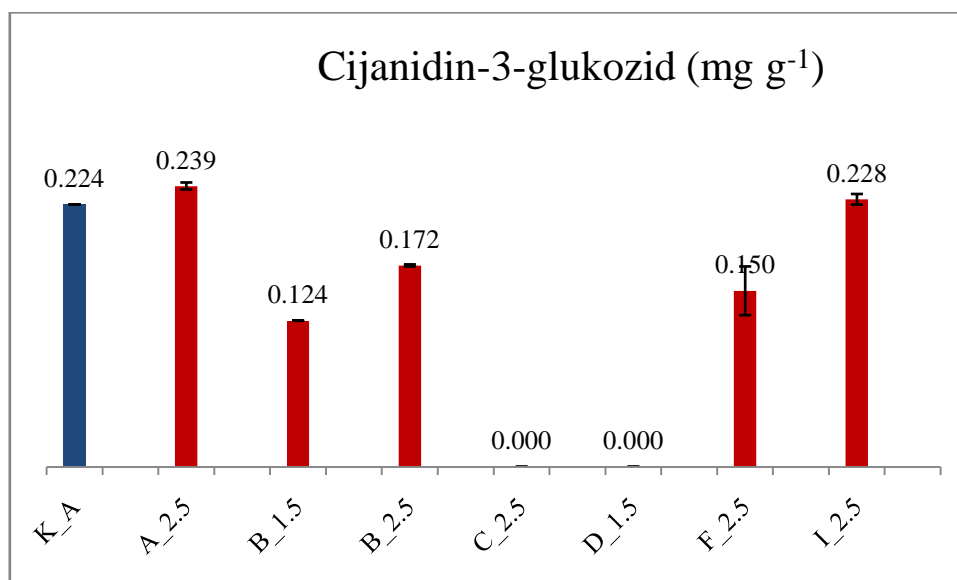


Slika 17. Usporedba ekstrakcije ukupnih tanina 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfatom i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalima.

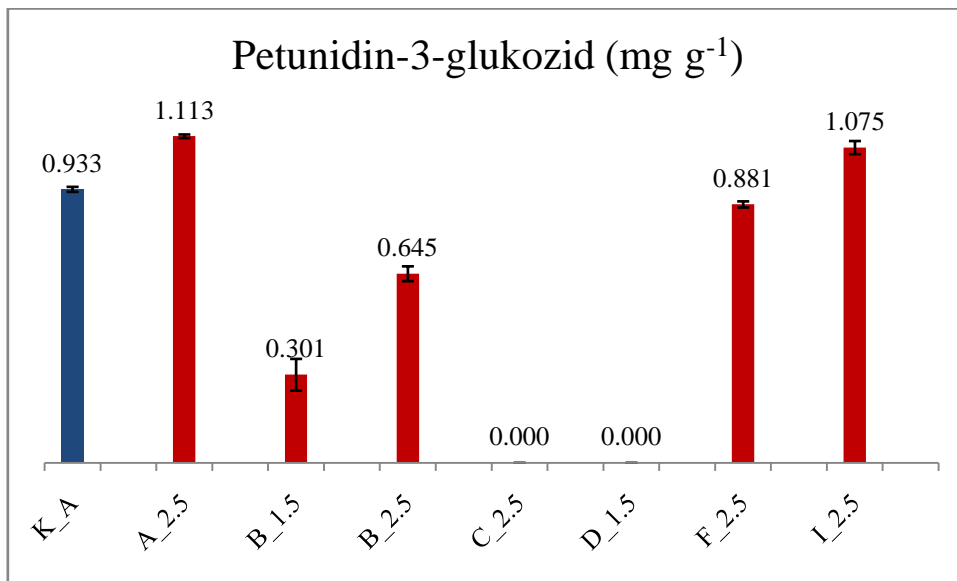
5.3.UDJEL SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA



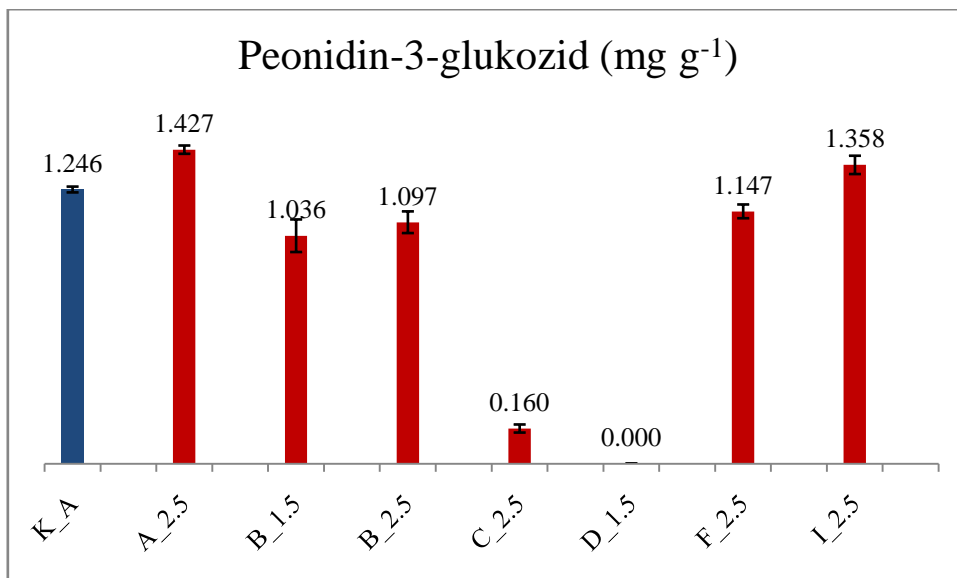
Slika 18. Usporedba ekstrakcije delfinidin-3-glukoziada različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



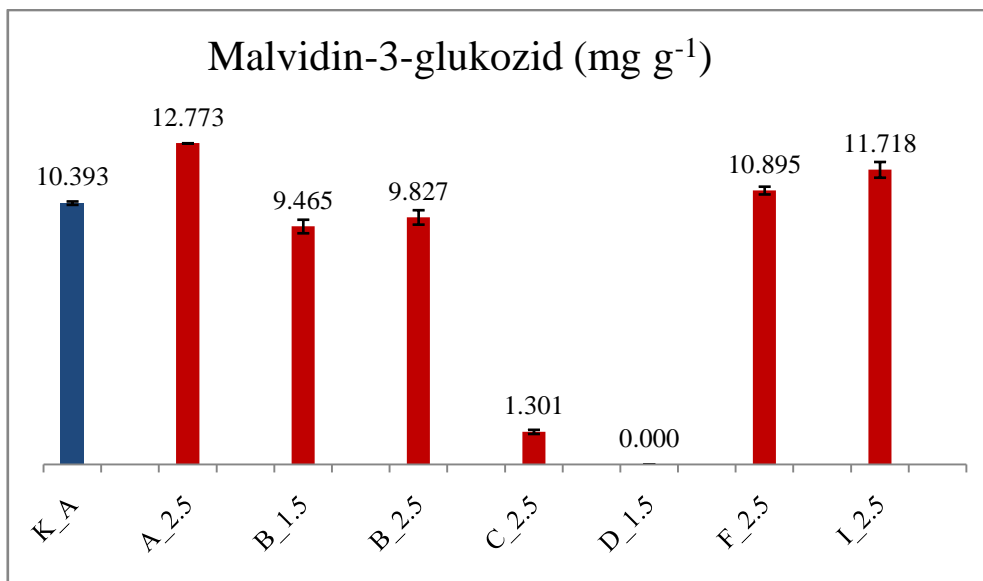
Slika 19. Usporedba ekstrakcije cijanidin-3-glukoziada različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



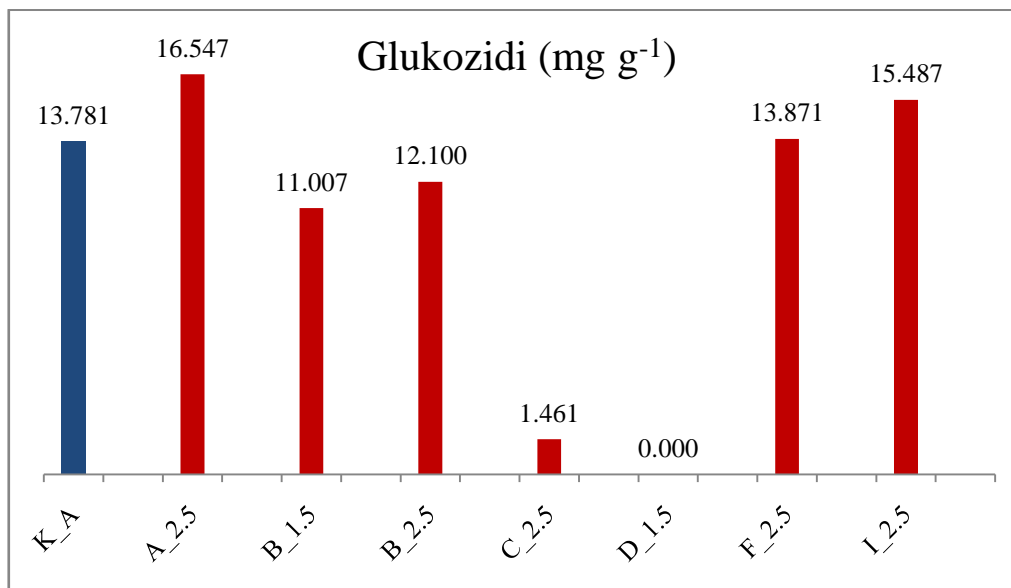
Slika 20. Usporedba ekstrakcije petunidin-3-glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



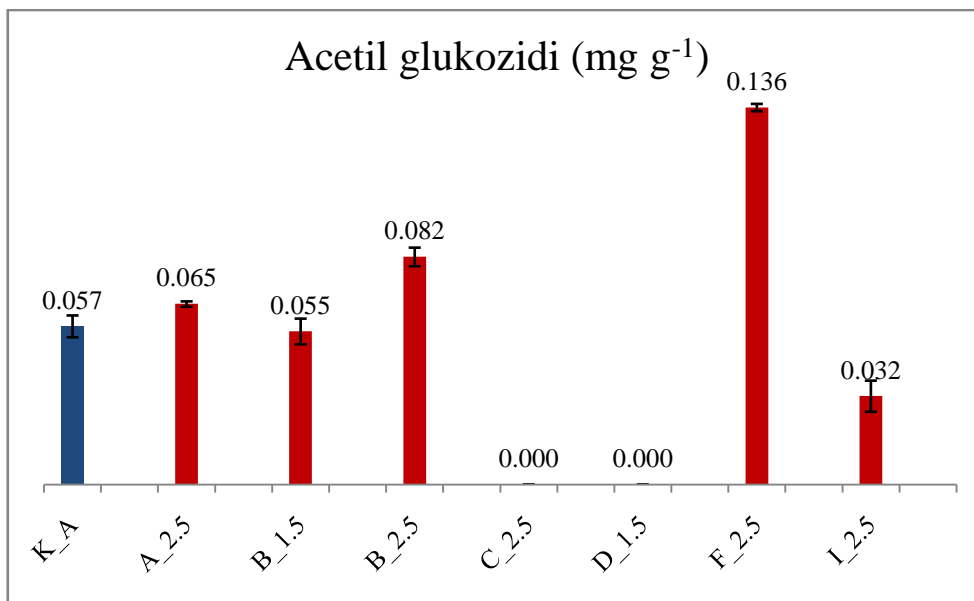
Slika 21. Usporedba ekstrakcije peonidin-3-glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



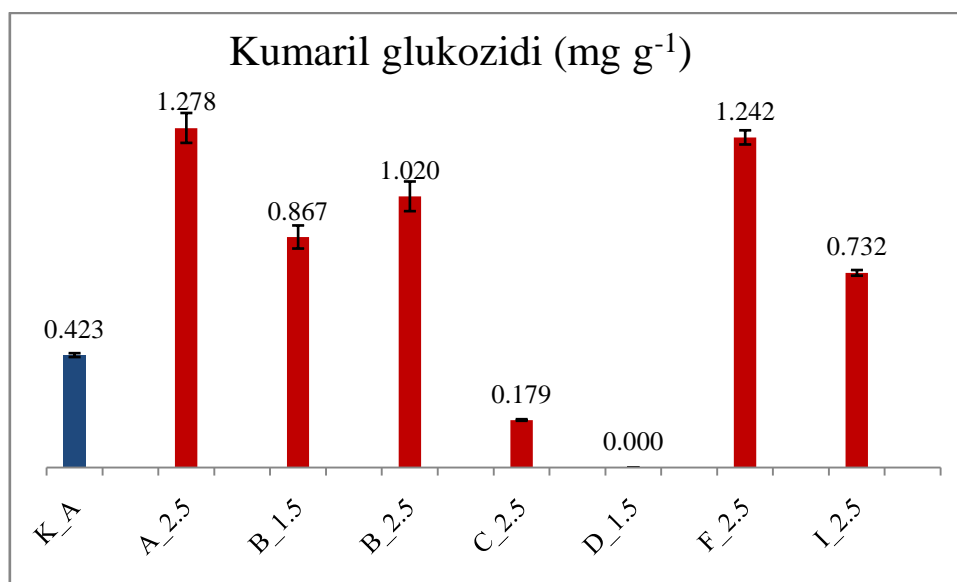
Slika 22. Usporedba ekstrakcije malvidin-3-glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.



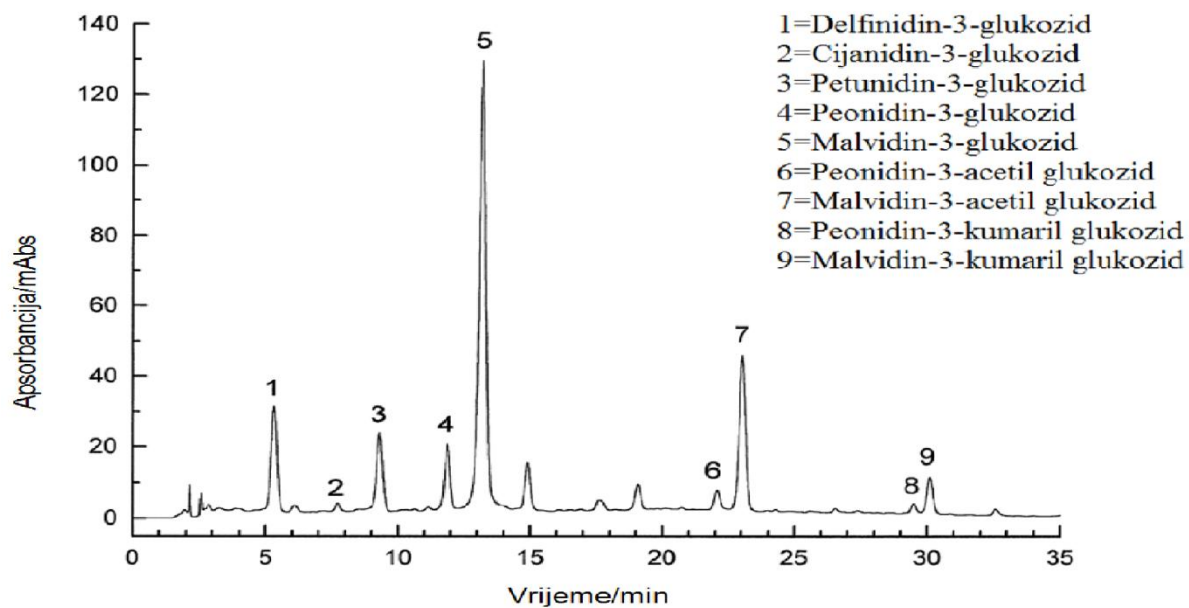
Slika 23. Usporedba ekstrakcije ukupnih antocijan glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom



Slika 24. Usporedba ekstrakcije ukupnih acetil glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

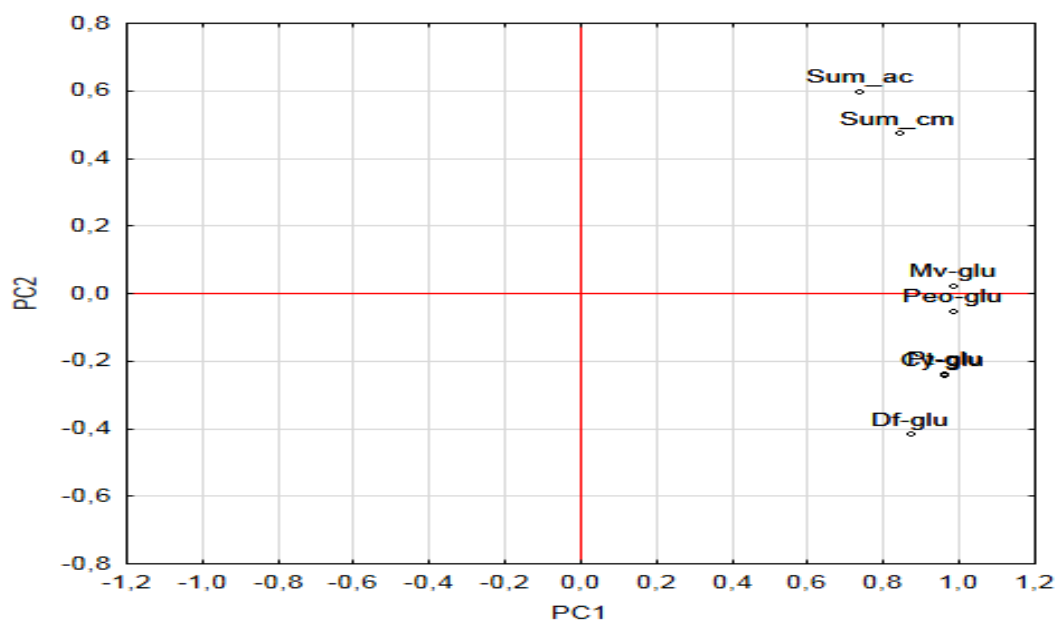


Slika 25. Usporedba ekstrakcije ukupnih kumaril glukozida različitim ionskim tekućinama i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

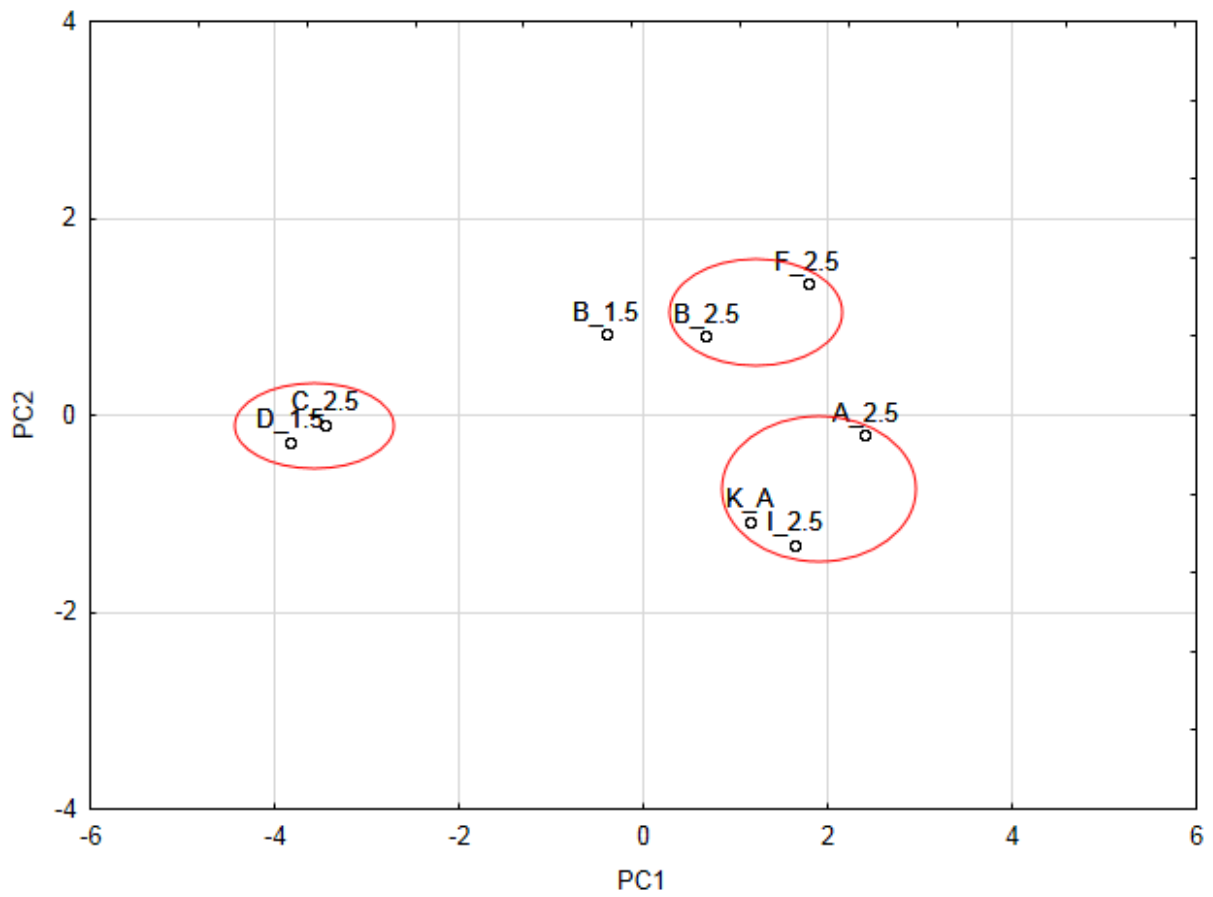


Slika 26. Kromatogram slobodnih antocijana u uzorku ekstrakta pokožice grožđa sorte Plavac mali dobivenog klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom.

5.4. STATISTIČKA ANALIZA SASTAVA SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA



Slika 27. Projekcija varijabli u prostoru osnovnih komponenata (PC1 i PC2) sastava slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice grožđa. *Sum_ac - acetil glukozidi, sum_cm - kumaril glukozidi, Mv-glu - malvidin-3- glukozid, Peo-glu - peonidin-3-glukozid, Pt-glu - petunidin-3-glukozid, Cy-glu – cijanidin-3-glukozid i Df-glu - delfinidin-3-glukozid



Slika 28. Projekcija uzoraka u prostoru osnovnih komponenta (PC1 i PC2) sastava slobodnih antocijana u ekstraktu pokožice grožđa.

6. RASPRAVA

Plavac mali je autohtona i najrasprostranjenija crna sorta vinove loze u Hrvatskoj čije je vino prvo vino u Hrvatskoj sa zaštićenim geografskim podrijetlom. Grožđe i vino sorte Plavac malikarakterizira visok udjel polifenolnih spojeva.

Važnost polifenolnih spojeva koji se nalaze u grožđu te kasnije u vinu direktno je vezana uz organoleptička svojstva, iako je posljednjih desetljeća prepoznata i njihova nutritivna vrijednost (Valls i sur., 2009). Kod grožđa, izuzevši polifenolne spojeve sjemenke, najveći udio polifenolnih spojeva se nalazi u pokožici bobice iz koje tijekom maceracije grožđa prelaze u vino (Jackson, 2008). Od svih polifenolnih spojeva, za tehnologiju proizvodnje crnih vina antocijani su od iznimne važnosti jer su upravo oni zaslužni za crnu boju vina. Osim toga, u novije vrijeme, se istražuje mogućnost korištenja profila antocijana kao kemotaksonomskog kriterija za utvrđivanje razlika između vrsta grožđa što bi omogućilo kontrolu patvorenja vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Druga važna skupina polifenola koji direktno utječu na organoleptička svojstva vina su tanini (proantocijanidini). Tanini su nosioci trpkocće i gorčine, te imaju ulogu u dugoročnoj stabilnosti boje vina jer s antocijanima ulaze u reakcije kopigmentacije (Somers, 1971).

Zbog iznimne važnosti antocijana i tanina u tehnologiji vina, kompleksnosti njihove strukture i nerazjašnjenih mehanizama interakcija u kojima sudjeluju, još se uvijek istražuju optimalne metode njihove ekstrakcije iz pokožice 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 ionskih tekućina, kao zamjene za organska otapala u ekstrakcijama, zbog njihovih poželjnih svojstava kao što su niska temperatura tališta (Earle i Seddon, 2000), nizak tlak pare, nezapaljivost, visoka topljivost organskih, anorganskih i polimernih materijala, dobra provodljivost, dobra toplinska stabilnost i smanjena viskoznost koja omogućuje lakše miješanje (Jastorff i sur., 2003). Najvažnija prednost u odnosu na organska otapala je mogućnost kreiranja njihove strukture čime se može utjecati na njihova fizikalno-kemijska svojstva koja uvjetuju efikasnost ekstrakcije. Tek su zadnjih godina započela istraživanja primjene ionskih tekućina u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, stoga još uvijek ima vrlo malo literaturnih podataka o upotrebi ionskih tekućina za ekstrakciju polifenolnih spojeva. Istraživanja Lu i sur.(2008) utvrdila su da je ekstrakcijom polifenolnih spojeva korištenjem ionskih tekućina kojima osnovu čini imidazol, moguće postići jednaku ili čak veću efikasnost u odnosu na ekstrakciju klasičnim otapalima.

6.1. UDJEL UKUPNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA

U svrhu usporedbe ekstrakcije ukupnih antocijana imidazolijevim ionskim tekućinama u odnosu na ekstrakciju klasičnim organskim otapalom provedena je spektrofotometrijska analiza dobivenih ekstrakata.

U radu je korišteno dvadeset i pet ionskih tekućina čiju osnovu čine imidazolijeve soli. Na slici 9 prikazana je usporedba udjela ukupnih antocijana dobivenih alkil-metilimidazol bromidima i klasičnom ekstrakcijom organskim otapalom (K_A) gdje je kao otapalo korišten 70 % metanol zakiseljen sa 1% klorovodičnom kiselinom. Na slici je vidljivo da su se ionske tekućine 1-etil-3-metilimidazol bromid (A_0.5, A_2.5) i 1-butil-3-metilimidazol bromid (B_0.5, B_1.5, B_2.5) pokazale najprikladnijima za ekstrakciju ukupnih antocijana iz pokožice grožđa dok je ionskom tekućinom A_2.5 ekstrahiran veći udjel ukupnih antocijana u odnosu na K_A. Povećanjem koncentracije ionskih tekućina iz skupina A i B dolazi do značajnijeg porasta efikasnosti ekstrakcije. Nadalje, ionske tekućine 1-pentil-3-metilimidazol bromid (C_0.5, C_1.5, C_2.5) i 1-heptil-3-metilimidazol bromid (D_0.5, D_1.5) pokazuju nižu efikasnost ekstrakcije u odnosu na K_A te ne dolazi do značajnijeg povećanja učinkovitosti ekstrakcije s porastom koncentracije. Ionske tekućine 1-decil-3-metilimidazol bromid (E_0.5, E_1.5) nisu se pokazale prikladnim za ekstrakciju ukupnih antocijana. Može se uočiti da duljina alkilnog lanca ima značajan utjecaj na efikasnost ekstrakcije na način da se povećanjem alkilnog lanca iznad 4 C-atoma smanjuje učinkovitost ekstrakcije (Sun i sur., 2012). Na slici 10 prikazana je usporedba ekstrakcije ukupnih antocijana 1-buti-3-metilimidazol sulfitom (F_0.5, F_1.5, F_2.5) i K_A iz koje je vidljivo da se korištenjem navedenih ionskih tekućina ekstrahiralo manje antocijana u odnosu na K_A, ali se može primjetiti da se s povećanjem koncentracije povećava efikasnost ekstrakcije. Usporedbom slike 9 i slike 10 može se uočiti razlika u efikasnosti ekstrakcije ionskim tekućinama koje sadrže 1-butil-3-metilimidazol kation s obzirom na vrstu aniona. Vidljivo je da ionska tekućina sa bromidnim anionom (B) pokazuje veću efikasnost od ionske tekućine sa sulfidnim anionom (F).

Na slici 11 prikazana je usporedba ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol nitratom (G_0.5, G_1.5, G_2.5) i K_A pri čemu je vidljivo da je njihova učinkovitost manja u odnosu na K_A te da učinkovitost pada s porastom koncentracije. S obzirom na smanjenu učinkovitost ekstrakcije, ionska tekućina G nije prikladna za ekstrakciju ukupnih antocijana. Na slici 12 je prikazana usporedba ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol

trifluoracetatom (H_0.5, H_1.5, H_2.5) i K_A pri čemu je vidljivo da je njihova efikasnost ekstrakcije značajno slabija u odnosu na K_A. Na temelju slika 11 i 12 zaključujemo da su ionske tekućine G i H neprikladne za ekstrakciju ukupnih antocijana.

Na slici 13 prikazana je usporedba ekstrakcije ukupnih antocijana 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfatom (I_0.5, I_1.5, I_2.5) i K_A pri čemu je vidljivo da je navedena ionska tekućina prikladna za ekstrakciju ukupnih antocijana te da se s povećanjem koncentracije povećava efikasnost ekstrakcije. Ionskom tekućinom I je već pri koncentraciji 2.5 mol L⁻¹ ekstrahiran veći udio ukupnih antocijana u odnosu na K_A. Iz navedenih rezultata vidljivo je da ionske tekućine G, H i I u strukturi sadrže isti kation, a međusobno se razlikuju po vrsti aniona što navodi na zaključak da upravo o njima ovisi učinkovitost ekstrakcije.

6.2. UDJEL UKUPNIHTANINA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA

Ekstrakcija tanina ionskim tekućinama provedena je u cilju usporedbe efikasnosti sa klasičnom ekstrakcijom koja uključuje dugotrajnu ekstrakciju u dva koraka korištenjem dvaju različitih organskih otapala acetona i metanola. Aceton se koristi kako bi se ekstrahirali tanini niže molekulske mase dok se metanol koristi za ekstrakciju tanina veće molekulske mase. Korištenjem ionskih tekućina u ekstrakciji tanina skratilo bi se vrijeme ekstrakcije sa 6 na 3 sata te potrošnja organskih otapala. Ionske tekućine korištene u radu nisu pokazale značajnu učinkovitost u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije organskim otapalima (K_T) što je vidljivo na slici 14, 15, 16 i 17. Tijekom određivanja ukupnih tanina ekstrahiranih 1-heksil-3-metilimidazol nitratom pri različitim koncentracijama (G_0.5, G_1.5, G_2.5) nije došlo do formiranja obojenih antocijanidina tijekom hidrolize pri 100 °C pa se nije mogla provesti spektrofotometrijska analiza. Iako se nijedna ionska tekućina nije pokazala prikladnom za ekstrakciju tanina može se uočiti trend povećanja efikasnosti s povećanjem koncentracije ionske tekućine. Kao i kod antocijana može se primjetiti da duljina alkilnog lanca ima važnu ulogu u učinkovitosti ekstrakcije (Sun i sur., 2012).

Korištene ionske tekućine međusobno se razlikuju u efikasnosti ekstrakcije ukupnih tanina s obzirom na koncentraciju, pH, duljinu alkilnog lanca, a samim time i s obzirom na viskoznost te ionsku strukturu koja podrazumjeva kombinaciju različitih aniona i kationa. Primjena ionskih tekućina kao otapala za ekstrakciju često se kombinira s novim metodama ekstrakcije, poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Sun i sur., 2012) koja se može primijeniti u ekstrakciji antocijana i tanina, što bi moglo imati utjecaj na povećanje efikasnosti ekstrakcije. Ionske tekućine korištene u radu pokazale su se prikladnijima za ekstrakciju ukupnih antocijana dok su se za ukupne tanine pokazale neprikladnima što ukazuje da je potrebno kreirati ionske tekućine za svaku pojedinu skupinu polifenolnih spojeva.

6.3. UDJEL SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA

Na temelju spektrofotometrijskih rezultata ekstrakcije ukupnih antocijana odabrane su ionske tekućine koje su pokazale jednaku ili čak bolju učinkovitost ekstrakcije u odnosu na kontrolno organsko otapalo uzevši u obzir negativno odstupanje od 10% uz iznimku ionske tekućine C_2.5 koja pokazuje nešto veće negativno odstupanje. Ionske tekućine koje su pokazale negativno odstupanje uzete su u obzir jer korištenje zakiseljenih otapala (K_A) može uzrokovati oslobađanje antocijana iz flavanola i proantocijanidina prirodno prisutnih u pokožici grožđa te takva reakcija u konačnici dovodi do precjenjivanja količine ukupnih antocijana mjerenih kolorimetrijskim metodama (Hemingway, 1989). Provedena je kromatografska analiza primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti slobodnih antocijana ekstrahiranih odabranim ionskim tekućinama.

Na slici 18, 19, 20 i 21. prikazane su usporedbe ekstrakcije delfinidin-3-glukozida, cijanidin-3-glukozida, petunidin-3-glukozida, peonidin-3-glukozida odabranim ionskim tekućinama i K_A pri čemu je vidljivo da su ionske tekućine A_2.5 i I_2.5 pokazale veću učinkovitost ekstrakcije u usporedbi sa K_A dok se ionske tekućine B_1.5, B_2.5, C_2.5 i D_1.5 nisu pokazale prikladnim za ekstrakciju navedenih slobodnih antocijana. Na slici 22 prikazana je usporedba ekstrakcije malvidin-3-glukozida, prisutnog u pokožici grožđa u najvećem udjelu, odabranim ionskim tekućinama i K_A pri čemu je vidljivo da su ionske tekućine A_2.5, F_2.5 i I_2.5 pokazale učinkovitiju ekstrakciju od K_A. Ionske tekućine B_1.5, B_2.5, C_2.5 i D_1.5 nisu se pokazale prikladnim za ekstrakciju malvidin-3-glukozida. Ionske tekućine C_2.5 i D_2.5 su u potpunosti neprikladne za ekstrakciju slobodnih antocijana usprkos relativno visokoj učinkovitosti ekstrakcije ukupnih antocijana.

Na slici 23 prikazana je usporedba ekstrakcije ukupnih antocijan glukozida odabranim ionskim tekućinama i K_A pri čemu je vidljivo da su ionske tekućine A_2.5, F_2.5 i I_2.5 učinkovitije od K_A za ekstrakciju ukupnih antocijan glukozida. Dok su se ionske tekućine B_1.5, B_2.5, C_2.5 i D_1.5 pokazale neprikladnima za ekstrakciju ukupnih antocijan glikozida iz pokožice grožđa Plavac mali.

Na slici 24 prikazana je usporedba ekstrakcije ukupnih acetil glukozida odabranim ionskim tekućinama i K_A pri čemu je vidljivo da su ionske tekućine A_2.5, B_2.5 i F_2.5 učinkovitije od K_A dok se ionske tekućine B_1.5, C_2.5, D_1.5 i D_2.5 nisu pokazale prikladnim za ekstrakciju acetil glukozida. Ekstrakcijom aciliranih antocijana u kiselim

uvjetima može doći do njihove djelomične ili potpune hidrolize (Van Wyk i Winter, 1994) što može biti slučaj kod ekstrakcije klasičnim organskim otapalom koje ima vrlo nizak pH dok ionske tekućine koje su pokazale bolju efikasnost ekstrakcije acetil glukozida imaju pH u rasponu od 4,95 do 6,1. Iste ionske tekućine pokazale su se učinkovitima i kod ekstrakcije kumaril glukozida (Slika 25) kod koje je i I_2.5 pokazala značajniju efikasnost usprkos vrlo niskoj pH vrijednosti (1.36).

6.4. STATISTIČKA ANALIZA SASTAVA SLOBODNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTU POKOŽICE GROŽĐA

PCA metodom analiziran je sastav slobodnih antocijana u ekstraktima pokožice primjenom klasičnog organskog otapala (zakiseljeni metanol) te ionskih tekućina (K_A, A_2.5, B_1.5, B_2.5, C_2.5, D_1.5, F_2.5, I_1.25) kako bi se utvrdilo koja je od navedenih otopina najpogodnija kod ekstrakcije slobodnih antocijana. Utvrđeno je kako prve dvije svojstvene komponente PC1 (82,22%) i PC2 (12,52%) zajedno opisuju 94,74% ukupne varijance. Iz grafičkog prikaza projekcije varijabli u prostoru (slika 27), vidljivo je kako prva komponenta (PC1) dobro pozitivno korelira sa malvidin-3-glukozidom (Mv-glu) (0,983), peonidin-3-glukozidom (Peo-glu) (0,979), petunidin-3-glukozidom (Pt-glu) (0,960), cijanidin-3-glukozidom (Cy-glu) (0,956), delfinidin-3-glukozidom (Df-glu) (0,867), kumaril glukozidima (Sum_cm) (0,838) i acetil glukozidima (Sum_ac) (0,736). Prema grafičkom prikazu uzoraka (slika 28) vidljivo je kako je došlo do stvaranja definiranih grupa uzoraka s obzirom na os PC1, gdje su se uzorci K_A, I_2.5, B_2.5, F_2.5, A_2.5 izdvojili s desne strane obzirom na veći udio svih analiziranih varijabli (malvidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid, petunidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, delfinidin-3-glukozid, kumaril glukozidi i acetil glukozidi), dok su se uzorci B_1.5, C_2.5 te D_1.5 izdvojili s lijeve strane osi PC1 s obzirom na niži udio prethodno navedenih varijabli. Nadalje, uočavamo grupiranje uzoraka s obzirom na os PC2, gdje su se uzorci K_A, I_2.5 te A_2.5 izdvojili u trećem kvadrantu s obzirom na veći udio pojedinačnih antocijan glukozida (malvidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid, petunidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, delfinidin-3-glukozid), dok su se uzorci B_2.5 i F_2.5 izdvojili u prvom kvadrantu s obzirom na veći udio aciliranih antocijan glukozida (kumaril glukozidi i acetil glukozidi).

Iz navedenog se može zaključiti kako su ionske tekućine D_1.5 i C_2.5 (grupa 1) manje pogodne za ekstrakciju antocijana od preostalih tekućina, ionske tekućine A_2.5 te posebice I_2.5 pokazale su se vrlo slične klasičnom organskom otapalu (grupa 2), dok su se ionske tekućine B_2.5 te F_2.5 (grupa 3) izdvojile obzirom na bolju ekstraktibilnost aciliranih antocijana.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Za ekstrakciju ukupnih antocijana iz pokožice grožđa u odnosu na klasičnu ekstrakciju zakiseljenim metanolom pokazala se najučinkovitijom ionska tekućina 1-etil-3-metilimidazol bromid u koncentraciji od $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $\text{pH} = 4.95$, a nakon nje 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat u koncentraciji od $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $\text{pH} = 1.36$.
2. Rezultati su pokazali da ionske tekućine sa bromidnim i hidrogensulfitnim anionom pokazuju veću efikasnost od ionskih tekućina sa sulfitnim anionom, dok su se ionske tekućine sa nitratnim i trifluoracetatnim anionom pokazale neprikladne za ekstrakciju ukupnih antocijana iz pokožice grožđa.
3. Koncentracija kao i duljina alkilnog lanca su se također pokazale kao važan čimbenik u efikasnosti ekstrakcije ukupnih antocijana iz pokožice grožđa tako da se sa povećanjem koncentracije povećava učinkovitost ekstrakcije, dok se sa povećanjem alkilnog lanca iznad 4C-atoma njena učinkovitost smanjuje.
4. Ionske tekućine primjenjene u ovome radu nisu se pokazale prikladne za ekstrakciju ukupnih tanina iz pokožice grožđa u odnosu na klasičnu ekstrakciju organskim otapalima acetonom i metanolom što ukazuje da je potrebno kreirati ionske tekućine za svaku pojedinu skupinu polifenolnih spojeva.
5. Ionske tekućine 1-etil-3-metilimidazol bromid, 1-butil-3-metilimidazol sulfit i 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat u koncentraciji od $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ pokazale su se učinkovitijima u ekstrakciji glukozidnih antocijana u odnosu na klasičnu ekstrakciju metanolom uz dodatak 1% klorovodične kiseline.
6. Korištenjem ionskih tekućina u koncentraciji od 2.5 mol L^{-1} postiže se bolja efikasnost ekstrakcije acetil-glukozida u odnosu na klasičnu ekstrakciju metanolom uz dodatak 1% klorovodične kiseline jer ne dolazi do hidrolize acetil-glukozida uzrokovane

niskom pH vrijednošću. Ionske tekućine 1-butil-3-metilimidazol bromid, 1-etil-3-metilimidazol bromid i 1-butil-3-metilimidazol sulfit pokazale su senajučinkovitijima.

7. Korištenjem 1-butil-3-metilimidazol bromida u koncentracijama od 1.5 i 2.5 mol L⁻¹ te 1-etil-3-metilimidazol bromida, 1-butil-3-metilimidazol sulfita i 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfata u koncentraciji od 2.5 mol L⁻¹ kao otapala za ekstrakciju antocijanapostiže se bolja efikasnost ekstrakcije kumaril-glukozida u odnosu na klasičnu ekstrakciju metanolom uz dodatak 1% klorovodične kiseline.
8. Ionske tekućine 1-pentil-3-metilimidazol bromid, 1-heptil-3-metilimidazol bromid, 1-decil-3-metilimidazol bromid i 1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetat u svim koncentracijama nisu se pokazale učinkovite u ekstrakciji slobodnih i ukupnih antocijana u odnosu na klasičnu ekstrakciju zakiseljenim metanolom.
9. Rezultati istraživanja utvrdili su mogućnost zamjene klasičnih organskih otapala imidazolijevim ionskim tekućinama kod ekstrakcije kompleksnih polifenolnih spojeva antocijana iz pokožice grožđa sorte Plavac mali. Ionske tekućine međusobno se razlikuju u efikasnosti ekstrakcije ukupnih antocijana s obzirom na koncentraciju, pH, duljinu alkilnog lanca, a samim time i viskoznost te ionsku strukturu koja podrazumijeva kombinaciju različitih aniona i kationa.
10. Statistička analiza je pokazala da su se kao najučinkovitije izdvojile sljedeće ionske tekućine: 1-etil-3-metilimidazol bromid, 1-butil-3-metilimidazol bromid, 1-butil-3-metilimidazol sulfit i 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat u koncentraciji od 2,5 mol L⁻¹ te se one mogu koristiti kao zamjena klasičnom otapalu pri ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa.

8. POPIS LITERATURE

Ajam, M. (2005) Metathesis and hydroformylation reactions in ionic liquids. Magistarski rad, Sveučilište u Johannesburgu.

Allen, M. S., Lacey, M. J. (1999) Methoxypyrazines of grapes and wines. U: Chemistry of Wine Flavor (Waterhouse, A. L. i Ebeler S. E., ured.) American Chemical Society, Washington DC, str. 31-38.

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.

Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and practice, Oxford University Press, New York.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheyneir, V., Moutounet, M. (2001) Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta.* **458**, 15-27.

Berente, B., García, D., Reichenbacher, M., Danzer, K. (2000) Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *J. Chromatogr. A.* **871**, 95-103.

Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N., Desfeux, N. (1986) Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. O.I.V.* **59**, 1171-1254.

Brouillard, R., Chassaingf, S., Fougerousse, A. (2003) Why are grape fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?. *Phytochemistry.* **64**, 1179-1186.

Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., Qui, C. (2008) Sample preparation. *J. Chromatogr. A.* **1184**, 191-219.

Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 298-305.

Clifford, M.N. (2000) Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1063-1072.

Coleman, D. i Gathergood, N. (2010) Biodegradation studies of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 600-637.

Coombe, B. G. i McCarthy, M. G. (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine R.* **6**, 131-135.

Dai, J. i Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.

Deetlefs, M. i Seddon, K. R. (2003) Improved preparations of ionic liquids using microwave irradiation. *Green Chem.* **5**, 181-186.

Deetlefs, M. i Seddon, K. R. (2010) Assessing the greenness of some typical laboratory ionic liquid preparations. *Green Chem.* **12**, 17-30.

Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P. (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J. Grape Wine Res.* **9**, 15–27.

Duchet, L., Legeay, J. C., Carrié, D., Paquin, L., Vanden Eynde, J. J., Bazureau, J. P. (2010) Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles using ionic liquid-phase organic synthesis (IoLiPOS) methodology. *Tetrahedron.* **66**, 986–994.

Dzyuba, S. V. (2002) Synthesis properties and applications of ionic liquids. Tehničko Sveučilište u Teksasu, SAD.

Earle, M. J. i Seddon, K. R. (2000) Ionic liquids: Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1391-1398.

Fan, Y. C., Hu, Z. L., Chen, M. L., Tu, C. S., Zhu, Y. (2008) Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chin. Chem. Lett.* **19**, 985–987.

FAO Production Yearbook (1998) Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.

Fontanals, N., Ronka, S., Borrull, F., Trochimczuk, A. W., Marcé, R. M. (2009) Supported imidazolium ionic liquid phases: A new material for solid-phase extraction. *Talanta*. **80**, 250–256.

Freemantle, M. (2010) An introduction to ionic liquids, The Royal Society of Chemistry, UK.

Gawel, R. (1998) Red wine astringency: A review. *Aust J. Grape Wine Res.* **4**, 73–95.

Gholami, M., Hayasaka, Y., Coombe, B. G., Jackson, J. F., Robinson, S. P. Williams, P. J. (1995) Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Aust. J. Grape Wine R.* **1**, 19-24.

Han, D. i Row, K. H. (2010) Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules*. **15**, 2405-2426.

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.

Hurley, F. H. i Wier, T. P. (1951) Electrodeposition of metals from fused quaternary ammonium salts. *J. Electrochem. Soc.* **98(5)**, 203-206.

IoLiTec (2011) Custom Synthesis, <<http://www.iolitec.de/en/Ionic-Liquids/custom-synthesis.html>>. Pristupljeno 25. ožujka 2013.

Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.

Jastorff, B., Störmann, R., Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Oberheitmann, B., Hoffmann, W., Hoffmann, J., Nuchter, M., Ondruschka, B., Filser, J. (2003) How hazardous are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem.* **5(2)**, 136-142.

Ju, Z. Y. i Howard, L. R. (2003) Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5207-5213.

Karkkainen J. (2007) Preparation and Characterization of Some Ionic Liquids and their use in the Dimerization Reaction of 2-Methylpropene. *Acta Univ. Oul. A.* **480**.

Kirchner, B. (2009) Ionic liquids. *Top. Curr. Chem.* **290**, Springer.

Kovac', V., Bourzeix, M., Heredia, N., Ramos, T. (1990) Étude des catéchines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs. *Rev.Fr. Oenol.* **125**, 7–15.

Kubisa, P. (2009) Ionic liquids as solvents for polymerization processes - Progress and challenges. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 1333–1347.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **1140**, 29-34.

Lu, Y., Ma, W., Hu, R., Dai, X., Pan, Y. (2008) Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera Gaertn.* *J. Chromatogr. A.* **1208**, 42-46.

Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Piljac, J., Dangel, G. S., Vokurka, A., Lacombe, T., Mirošević, N., Meredith, C. P. (2004) Zinfandel, Dobričić and Plavac mali: The Genetic Relationship among Three Cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. *Am. J. Enol. Vitic.* **55(2)**, 174-180.

Mezza, G. (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci.* **35(4)**, 341-371.

Moreno-Arribas, M. V. i Polo, C. M. (2009) Wine chemistry and biochemistry, Springer, New York.

Namboodiri, V. V. i Varma, R. S. (2002) Solvent-Free Sonochemical Preparation of Ionic Liquids. *Org. Lett.* **4 (18)**, 3161–3163.

Nelson, K. E. (1991) The grape. U: Quality and Preservation of Fruits (Eskin, N. A. M., ured.), CRC Press, Boca Ration, str. 125.

Pham, T. T., Campbell, B. M., Garnett, S., Aslin, H., Hoang, M. H. (2010) Importance and impacts of intermediary boundary organizations in facilitating payment for environmental services in Vietnam. *Environ. Conserv.* **37 (1)**, 64-72.

Poole, C. F. (2004) Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent propoities of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A.* **1037**, 49-82.

Possner, D. R. E. i Kliewer, W. M. (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis.* **24**, 229-240.

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.

Ribereau-Gayon, P. i Stonestreet, E. (1965) Determination of anthocyanins in red wine. *B. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.

Ribéreau-Gayon, P. i Stonestreet, E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal. Paris.* **48(4)**, 188-196.

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

Seddon, K. R. (1997) Ionic liquids for clean technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 351–356.

Somers, T. C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*. **10**, 2175–2186.

Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., van Heeswijck, R. (2000) Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. U Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine R.* **6**, 150-158.

Sun, P. i Armstrong, D. W. (2010) Ionic liquids in analitical chemistry. *Anal Chim Acta.* **661**, 1-16.

Sun, X., Jin, Z., Jang, L., Hao, J., Zu, Y., Wang, W., Liu, W. (2012) Ultrasonic-assisted extractions of procyanidins using ionic liquid solution from *Larix gamelini* Bark. *Int. J. Mol. Sci.* **13(4)**, 5163-5178.

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

Tsao, R. i 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.

US EPA (2013) Green Chemistry, <http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/epa_gc.html>. Pristupljeno 25. ožujka 2013.

Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7143-7172.

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

Walden, P. (1914) Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bull. Acad. Imper. Sci.* **1800**, 1182-192.

Walker, A. R., Lee, E., Robinson, S. P. (2006) Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *PlantMol. Biol.* **62**, 623–635.

Wilkes, J. (2002) A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem.* **4**, 73-80.

Zanoni, M. V. B., Rogers, E. I., Hardacre, C., Compton, R. G. (2010) The electrochemical reduction of the purines guanine and adenine at platinum electrodes in several room temperature ionic liquids. *Anal. Chim. Acta.* **659**, 115–121.

9. ZAHVALE

Iskrene zahvale upućujemo dr.sc. Karin Kovačević Ganić, izv. prof. kao mentorici rada na pruženoj prilici za stjecanje dodatne prakse rada u laboratoriju i pomoći tijekom izrade i pisanja rada.

Veliko hvala asistenticama dipl.ing. Natki Ćurko i mag.ing. Marini Đapić na velikoj potpori i pomoći tijekom izrade rada.

Hvala dr.sc. Marini Cvjetko Bubalo na izradi i ustupanju ionskih tekućina korištenih u ovom radu.

10. SAŽETAK

Usporedba učinkovitosti ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa sorte Plavac mali ionskim tekućinama i klasičnim postupcima ekstrakcije

Marijela Bašić i Helena Vibovec

SAŽETAK

Ionske tekućine su organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C. Zahvaljujući razvoju zelene kemije posljednjih godina postale su predmet intenzivnih znanstvenih istraživanja. Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje takve metode zahtijevaju. Ono što ionske tekućine razlikuje od ostalih otapala i po čemu su posebne je mogućnost dizajniranja njihove strukture u cilju dobivanja željenih svojstava koja bi omogućila povećanje njihove efikasnosti. Cilj rada bio je ispitati mogućnost korištenja ionskih tekućina, kao alternative klasičnim metodama ekstrakcije organskim otapalima, u ekstrakciji ukupnih i slobodnih antocijana i ukupnih tanina iz pokožice grožđa sorte Plavac mali. U radu je korišteno dvadeset i pet imidazolijevih ionskih tekućina koje se međusobno razlikuju po koncentraciji, pH vrijednosti, duljini alkilnog lanca, viskoznosti te ionskoj strukturi koja podrazumijeva kombinaciju različitih aniona i kationa. Iz pokožice grožđa sorte Plavac mali provedena je ekstrakcija antocijana klasičnom ekstrakcijom sa zakiseljenim metanolom i ionskim tekućinama. Ukupni tanini ekstrahirani su acetonom i metanolom te ionskim tekućinama. Za određivanje ukupnih antocijana i ukupnih tanina korištene su spektrofotometrijske metode dok je za određivanje slobodnih antocijana korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Najučinkovitije izdvojile su se sljedeće ionske tekućine: 1-etil-3-metilimidazol bromid, 1-butil-3-metilimidazol bromid, 1-butil-3-metilimidazol sulfid i 1-heksil-3-metilimidazol hidrogensulfat u koncentraciji od 2,5 mol L⁻¹ te se one mogu koristiti kao zamjena klasičnom otapalu pri ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa. Ionske tekućine 1-pentil-3-metilimidazol bromid, 1-heptil-3-metilimidazol bromid, 1-decil-3-metilimidazol bromid i 1-heksil-3-metilimidazol trifluoracetat nisu se pokazale učinkovite. Ionske tekućine primjenjene u ovome radu nisu se pokazale prikladne za ekstrakciju ukupnih tanina iz pokožice grožđa u odnosu na klasičnu ekstrakciju organskim otapalima acetonom i metanolom što ukazuje na potrebu kreiranja ionskih tekućina za svaku pojedinu skupinu polifenolnih spojeva.

Ključne riječi: antocijani, ekstrakcija, ionske tekućine, pokožica grožđa, tanini

11. SUMMARY

Comparison of extraction efficiency of anthocyanins and tannins from grape skin of species
Plavac mali by ionic liquids and classic organic solvents

Marijela Bašić and Helena Vibovec

SUMMARY

Ionic liquids are defined as organic salts with melting point above 100 °C. In the last few years they became subject of intensive scientific researches with the help of green chemistry development. Classic extraction methods have demonstrated low efficiency, they can be potentially harmful for environment because they use high quantities of organic solvents and they are long-term methods. Main advantage of ionic liquids in comparison to other solvents is the possibility to manipulate their structure design with a purpose of getting preferred characteristics that would lead to intensification of their efficiency. The aim of this research was to examine the possibility to usage ionic liquids in extraction of total anthocyanins and tannins from the grape skin species Plavac mali as alternative to classic extraction methods with organic solvents. In the research twenty five imidazolium ionic liquids which differ according to concentration, pH, alkyl chain length, viscosity and ionic structure which implies combination of different cations and anions were used. Extraction of anthocyanins and tannins from grape skin species Plavac mali with acidified methanol and ionic liquids has been performed. Total tannins were extracted using acetone and methanol and using ionic liquids. Spectrophotometric methods were used to determine total anthocyanins and tannins and high-performance liquid chromatography was used to determine anthocyanins. Ionic liquids with the highest efficiency were: 1-ethyl-3-methylimidazolium bromide, 1-butyl-3-methylimidazolium bromide, 1-butyl-3-methylimidazolium sulphite and 1-hexyl-3-methylimidazolium hydrogensulphite in concentration 2.5 mol L⁻¹ and they can be used as alternative for classic organic solvents in extraction anthocyanins from grape skin. Ionic liquids 1-pentyl-3-methylimidazolium bromide, 1-heptyl-3-methylimidazol bromide, 1-decyl-3-methylimidazolium bromide and 1-hexyl-3-methylimidazolium trifluoroacetate were characterized as inefficient. In general, in comparison to classic extraction with organic solvents, ionic liquids used in this research did not demonstrate better performance meaning better extraction efficiency of total tannins from grape skin. Obtained results indicate that it is necessary to design more specific ionic liquids for each polyphenol group in order to achieve process optimum.

Key words: anthocyanins, extraction, ionic liquids, grape skin, tannins