

59. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije

PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLOV IZ UPORABLJENIH KAVNIH OSTANKOV S TOPILOM ETANOL-VODA IN GLOBOKIM EVTEKTIČNIM TOPILOM

Avtorica: Arina Zhdanova

Mentorica: Natalija Jančič, prof.

Šola: II. gimnazija Maribor

Raziskovalno področje: Ekologija z varstvom okolja

Sekundarno raziskovalno področje: Kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Maribor, 2025

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
2. TEORETIČNI DEL	3
2.1. Polifenoli	3
2.2. Ekstrakcija polifenolov	5
2.3. Spektrofotometrija.....	5
2.4. Folin-Ciocalteau-ov reagent.....	6
2.5. Voda in etanol	7
2.6. Globoko evtektično topilo.....	8
2.7. Pregled objav	10
3. EKSPERIMENTALNI DEL.....	13
3.1. Metodologija	13
3.1.1. Materiali in oprema	13
3.1.2. Postopek dela.....	13
3.1.3. Varnostni ukrepi	18
3.2. Rezultati	18
3.2.1. Kalibracijska krivulja z vodo.....	18
3.2.2. Kalibracijska krivulja z globokim evtektičnim topilom.....	20
3.2.3. Ekstrakcija s topilom etanol-voda	20
3.2.4. Ekstrakcija z globokim evtektičnim topilom (sečnina in holin klorid)	25
3.3. Razprava.....	27
3.3.1. Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije polifenolov	28
3.3.2. Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenolov	29
3.3.3. Primerjava etanola in DES kot topila za ekstrakcijo polifenolov.....	29
3.3.4. Razlaga hipotez.....	30
4. ZAKLJUČEK	32
5. DRUŽBENA ODGOVORNOST	34
6. LITERATURA	35
7. VIRI SLIK	38
8. PRILOGE.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Polifenol resveratrol (Top 100 polyphenols. What are they and why are they important?, 2025).....	3
Slika 2: Vezava hidroksilne skupine na aromatski obroč v polifenolih (R predstavlja aromatski obroč, O kisik, H vodik, puščice poudarjajo dipolne momente).....	3
Slika 3: Redoks reakcija Folin-Ciocalteu-ovega reagenta (The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern, 2023)	6
Slika 4: Struktura galne kisline (Gallic Acid, n.d.).....	7
Slika 5: Lewisova struktura vode (Shutterstock, n.d.)	7
Slika 6: Struktura etanola (Ethanol, 2025).....	8
Slika 7: Struktura holin klorida in sečnine (Research gate, n.d.).....	9
Slika 8: Analiza vzorcev galne kisline z DES (lastni vir).....	17
Slika 9: Oprana oborina v vzorcih z DES (lastni vir)	18
Slika 10: Priprava vzorcev pred (desno) in po (levo) dodajanju natrijevega karbonata (lastni vir).....	22
Slika 11: Filtracija vzorcev (lastni vir)	25

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Kalibracijska krivulja z vodo.....	19
Graf 2: Kalibracijska krivulja galne kisline z DES.....	20
Graf 3: Vpliv časa na ekstrakcijo polifenolov s topilom etanol-voda (koncentracija polifenolov)	21
Graf 4: Vpliv časa na ekstrakcijo polifenolov s topilom etanol-voda (ΔM).....	21
Graf 5: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol- voda (koncentracija polifenolov)	23
Graf 6: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol- voda (ΔM).....	23
Graf 7: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (koncentracija polifenolov).....	24
Graf 8: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (ΔM)	24
Graf 9: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije z DES (koncentracija polifenolov).....	26
Graf 10: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije z DES (ΔM)	26
Graf 11: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije z DES (koncentracija polifenolov).....	27
Graf 12: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije z DES (ΔM).....	27

POVZETEK

Ta raziskovalna naloga primerja učinkovitost ekstrakcije polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov s topiloma etanol-voda (25 % etanola; v/v) in z globokim eutektičnim topilom ali DES (ang. deep eutectic solvent), sestavljenim iz mešanice sečnine in holin klorida v razmerju 2:1. Preverili smo vpliv časa ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 25 minut), temperature (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C) in mase kavnih ostankov (0,3 g, 0,5 g, 0,7 g, 0,9 g, 1,1 g) na učinkovitost ekstrakcije, ki je bila izražena kot ekvivalent galne kisline (GAE) v % suhe mase. Koncentracija polifenolov v vzorcih je bila določena s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteu-ovega reagenta. Rezultati kažejo, da je topilo etanol-voda dosledno ekstrahiralo višje koncentracije polifenolov kot DES, predvidoma zaradi manjše viskoznosti in boljših interakcij med topilom in polifenoli. Vendar se je ekstrakcija z DES izboljšala s temperaturo, kar kaže na njegovo možnost uporabe pri visokih temperaturah. DES še vedno ostaja alternativa za ekstrakcijo.

Ključne besede: ekstrakcija, polifenoli, globoko eutektično topilo, etanol, kavni ostanki, Folin-Ciocalteu-ov reagent, ekvivalenčna metoda galne kisline

ABSTRACT

This research compares the extraction efficiency of polyphenols from coffee residues used with an ethanol-water solvent (25% ethanol; v/v) and a deep eutectic solvent or DES (deep eutectic solvent) consisting of a 2:1 mixture of urea and choline chloride. The effect of extraction time (5, 10, 15, 20, 25 min), temperature (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C) and mass of coffee residue (0,3 g, 0,5 g, 0,7 g, 0,9 g, 1,1 g) on the extraction efficiency, expressed as gallic acid equivalent (GAE) % dry weight, was examined. The concentration of polyphenols in the samples was determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu reagent. The results show that the ethanol-water solvent consistently extracted higher concentrations of polyphenols than DES, presumably due to lower viscosity and better solvent-polyphenol interactions. However, DES extraction improved with temperature, indicating its applicability at high temperatures. DES still remains an alternative for extraction.

Keywords: extraction, polyphenols, deep eutectic solvent, ethanol, coffee residues, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid equivalence method

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila mentorici. Njena pomoč in usmerjanje skozi celotni raziskovalni proces sta mi bila v veliko pomoč. Vedno je poskušala odgovoriti na moja vprašanja ter hitro pregledala in komentirala moje zapise – tudi zgodaj zjutraj in med počitnicami. Čeprav je imela pouk šele ob 10. uri, bi profesorica prihajala v šolo že ob 7. uri zjutraj, da bi mi omogočila izvedbo eksperimentov. Vse, kar je storila zame, da sem lahko izvedla raziskovalno nalogo na najboljši način je nemogoče v celoti izraziti v zahvali. Zato upam, da ona razume koliko jaz cenim njeno pomoč.

Iskrena zahvala tudi gre ostalim profesoricam kemije, ki so ustvarili prijetno in spodbudno vzdušje v laboratoriju ter z menoj in mentorico debatirale vsebine moje raziskovalne naloge.

Rada bi se zahvalila tudi babici in dedku, od katerih sem podedovala ljubezen do kave in kemiji, kar me je spodbudilo k delu.

1. UVOD

Kava je svetovni fenomen — pijača, ki jo uživa večina ljudi po vsem svetu. Dnevno se po svetu zaužije približno 2,25 milijarde skodelic kave (Allen, 2024). Večina ljudi med jutranjim pitjem običajne skodelice kave ne razmišlja o tem, kaj se zgodi s kavno usedlino, ki jo po pripravi kave odvržejo, niti ni seznanjena z obsegom odpadkov, ki nastanejo kot posledica te navade. V resnici iz ene tone zelene kave nastane približno 650 kg odpadne kavne usedline, letno pa več kot 15 milijonov ton tega odpadka (Murthy & Madhava Naidu, 2012).

Kava je tudi pomemben vir antioksidantov in pogosto predstavlja glavni vir zaužitih antioksidantov v prehrani ljudi (Liang & Kitts, 2014). Pomembno skupino teh spojin predstavljajo polifenoli. Antioksidanti so spojine, ki so izjemno nagnjene k oksidaciji in s tem preprečujejo oksidacijo pomembnih spojin v človeškem telesu. To dosežejo z odstranjevanjem in nevtralizacijo prostih radikalov, ki so izjemno nestabilne spojine. Zaradi svoje visoke reaktivnosti lahko poškodujejo celične membrane ter druge anatomske strukture. Prosti radikali nastanejo kot posledica oksidacijskih procesov (BetterHealth, 2001). Poleg antioksidativnega delovanja polifenoli izkazujejo tudi številne druge fiziološke učinke, med katerimi so protivnetni, protimikrobni, protialergijski, protikarcinogeni in antihipertenzivni učinki (Russel, 2019). Polifenoli se pogosto uporabljajo v kozmetični industriji za svoje učinke lajšanja znakov staranja ter zmanjševanja proizvodnje melanina, v živilski predvsem za predelavo živil ter izboljšanje kakovosti mesa (Cheng et. al, 2024).

Jasno je, da kava vsebuje številne pomembne in koristne snovi, ki morda ne preidejo v celoti v napitek, ki ga uživamo. Če polifenoli ostanejo v kavni usedlini, je optimizacija njihove ekstrakcije ključnega pomena. Na ta način lahko prispevamo k izboljšanju zdravja in zmanjšanju količine odpadkov, kar posledično pripomore k bolj odgovornemu in trajnostnemu ravnanju z naravnimi viri.

V tej raziskovalni nalogi bomo preučili optimalne pogoje za povečanje učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojin iz uporabljenih kavnih ostankov. Osredotočili se bomo na ekstrakcijo s topiloma etanol in globoko evtektično topilo ter poskušali določiti najprimernejše parametre za ta proces. Na osnovi tega smo oblikovali naslednje raziskovalno vprašanje:

Kako čas ekstrakcije, temperatura, količina uporabljenih kavnih ostankov in izbira topila vplivajo na učinkovitost ekstrakcije polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov?

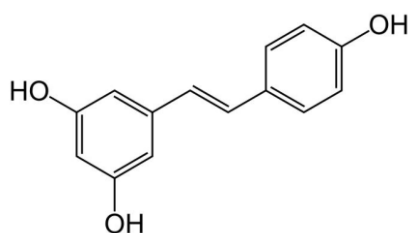
Hipoteze, ki smo jih oblikovali pred raziskovanjem so naslednje:

1. S povečanjem časa ekstrakcije se bo učinkovitost ekstrakcije povečala.
V prejšnjih raziskavah in objavah je bil daljši čas ekstrakcije povezan z večjo koncentracijo ekstrahiranih polifenolov (npr. Ramón-Gonçalves et al., 2019). Ta hipoteza temelji tudi na predpostavki, da daljši čas omogoča večji stik z uporabljenimi kavnimi ostanki.
2. Pri višjih temperaturah ekstrakcije, se bo učinkovitost ekstrakcije povečala.
Ta hipoteza izhaja iz dejstva, da se topnost mnogih spojin povečuje, saj lahko toplotna energija prekine intermolekularne sile, ki obstajajo med molekulami topljenca, kar omogoča učinkovitejše raztapljanje v topilo. Med te intermolekularne sile spadajo vodikove vezi in π - π interakcije, ki so prisotne v polifenolih in katerih oslabitev pripomore k večji učinkovitosti ekstrakcije.
Višje temperature tudi zmanjšajo viskoznost topila, kar omogoča lažji prodor topila v material (v tem primeru kavne ostanke) in učinkovitejše izločanje ciljnih spojin. Hitrejša difuzija pripomore k večji količini polifenolov, ekstrahiranih v določenem časovnem obdobju.
3. Z večjo količino porabljenih kavnih ostankov se bo učinkovitost ekstrakcije povečala, vendar le do določene mere.
Večja količina kavnih ostankov pomeni več polifenolov, ki jih je mogoče ekstrahirati. Vendar ima vsako topilo svojo točko nasičenosti, pri kateri ne more več učinkovito ekstrahirati dodatnih količin topljenca (v našem primeru polifenolov).
4. Ekstrakcija polifenolov z etanolom bo učinkovitejša kot ekstrakcija z globokim evtektičnim topilom.
Etanol je lahko bolj učinkovito topilo, saj ima podobno polarnost kot molekule polifenolov, kar omogoča boljše raztapljanje polifenolov v etanolu. Etanol je tudi manj viskozno topilo kot globoko evtektično topilo, kar omogoča hitrejšo difuzijo topljenca v topilo, saj manj viskozno topilo lažje prodre v snov, iz katere želimo ekstrahirati določeno spojino.

2. TEORETIČNI DEL

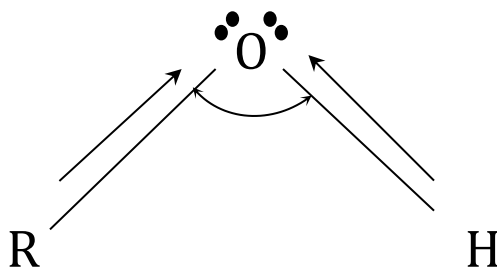
Polifenoli so naravno prisotne organske spojine, ki jih najdemo v številnih rastlinskih materialih in so poznane po svojih antioksidativnih lastnostih. Pomembni so zaradi svojega potenciala v prehrani, medicini in industriji. V teoretičnem delu se bomo osredotočili na kemijsko strukturo polifenolov in topil, ki se lahko uporabijo za njihovo ekstrakcijo. Opisali bomo tudi analitske metode, ki so uporabne za kvantifikacijo skupnih polifenolov v vzorcih in pregledali pretekle raziskave na tem področju.

2.1. Polifenoli



Slika 1: Polifenol resveratrol (*Top 100 polyphenols. What are they and why are they important?*, 2025)
<https://foodwatch.com.au/blog/super-foods/item/top-100-polyphenols-what-are-they-and-why-are-they-important.html>

Polifenoli so velika družina naravno prisotnih fenolov, ki se deli na štiri glavne skupine: fenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane (Quideau et al., 2011). Ta pojem ni dobro opredeljen, vendar v splošnem velja, da so polifenoli organske snovi z več hidroksilnimi skupinami in aromatskimi obroči. Glede na strukturo lahko polifenole opredelimo kot zmerno polarne spojine. Zaradi prisotnosti hidroksilnih skupin so polifenoli polarne spojine, saj kisik nase potegne elektrone, kar omogoča izjemna elektronegativnost kisika. Prisotnost aromatskih obročev prispeva k nepolarnosti polifenolov. V kolikšni meri so molekule polifenolov polarne, je odvisno od števila aromatskih obročev in hidroksilnih skupin (Manach C. et al., 2004).



Slika 2: Vezava hidroksilne skupine na aromatski obroč v polifenolih (*R* predstavlja aromatski obroč, *O* kisik, *H* vodik, puščice predstavlajo dipolne momente) (lastni vir)

White—Bate-Smith—Swain—Haslam (WBSSH) definicija polifenolov trdi, da je polifenol zmerno vodotopna spojina z molsko maso 500-4000 Da, z več kot 12 fenolnimi hidroksilnimi skupinami in 5-7 aromatskimi obroči na 1000 Da (Russel, 2019). Stéphane Quideau pa je opredelil polifenol kot sekundarni metabolit, ki izhaja iz fenilpropanoidne in poliketidne biosintezne poti in ima v osnovni kemijski strukturi več kot en fenolni obroč (Quideau S., 2013).

Glavna razlika med fenoli in polifenoli je v tem, da so fenoli aromatske spojine, ki vsebujejo en benzenov obroč s hidroksilno skupino (-OH), polifenoli pa so aromatske spojine, ki vsebujejo več fenolnih skupin v svoji strukturi (Quideau S., 2013).

V aromatskih obročih polifenolov pride do delokalizacije π -elektronov. π -elektroni so elektroni, ki sestavljajo π -vezi. Te vezi nastanejo kot posledica prekrivanja p-orbital ob straneh okoli medjedrske osi atomskih orbital. π -elektroni ustvarjajo območje večje elektronske gostote nad in pod ravnino obroča (Oxford Resources for IB DP Chemistry: Course Book, 2023) in molekulam omogočajo, da vstopajo v nekovalentne interakcije (π - π zlaganje) ter vzpodbujajo nastanek indukcijskih sil. Pod pojmom π - π zlaganje razumemo privlačne nekovalentne interakcije med π -vezmi (oz. π -interakcije) aromatskih obročev zaradi prekrivanja orbital. Zaradi tega π - π zlaganja, polifenoli lahko sodelujejo z drugimi aromatskimi spojinami ali površinami. Indukcijske sile so sile, ki delujejo med molekulami na podlagi pojava začasnega dipola v aromatskem obroču zaradi bližine polarne molekule. Če topilo vsebuje polarne molekule, kot je holin klorid, lahko pride do interakcij s polifenoli preko induciranih dipolov. To pojasnjuje, zakaj so polarna topila učinkovita pri raztapljanju polifenolov—indukcijske sile povečajo združljivost med polarnim topilom in aromatskimi obroči polifenolov, za ekstrakcijo pa je ključna prav ta lastnost—dobra topnost v določenem topilu (Vollhardt, Schore, 1999).

Poleg indukcijskih sil so v interakcijah polifenolov s topili prisotne tudi vodikova vez in ionsko-dipolne interakcije. Polifenoli vsebujejo skupine -OH, ki lahko tvorijo vodikove vezi z donorji vodikovih vezi, če jih vsebuje topilo (npr. alkoholi); te vezi lahko izboljšajo topnost polifenolov v topilu, kar poveča učinkovitost ekstrakcije (Oxford Resources for IB DP Chemistry: Course Book, 2023). Do ionsko-dipolnih interakcij pride, ko se ionske spojine (kot holin klorid) srečajo s polifenoli, ionski delci se lahko vežejo na negativno nabite dele polifenolov (hidroksilne skupine) ali na delce z začasnim dipolnim momentom. Ta vezava zmanjša energijo, potrebno za premik polifenola v topilo, saj ionska komponenta stabilizira dipolne momente polifenola in olajša prenos (Belford, 2022).

2.2. Ekstrakcija polifenolov

Ekstrakcija je proces ločevanja določene spojine iz zmesi z uporabo topila tako, da se želena spojina prenese v to topilo. Obstajata dve različici ekstrakcije: tekočina-tekočina (angl. liquid-liquid), ko sta zmes, v kateri se nahaja želena spojina, ter topilo v tekočem agregatnem stanju in tekočina-trdna snov (angl. liquid-solid), ko je zmes trdna snov, topilo pa je tekočina. Za ta proces je ključno, da se snov, ki jo želimo ločiti, dobro raztaplja v topilu, ki se uporablja pri ekstrakciji (Nichols, 2022).

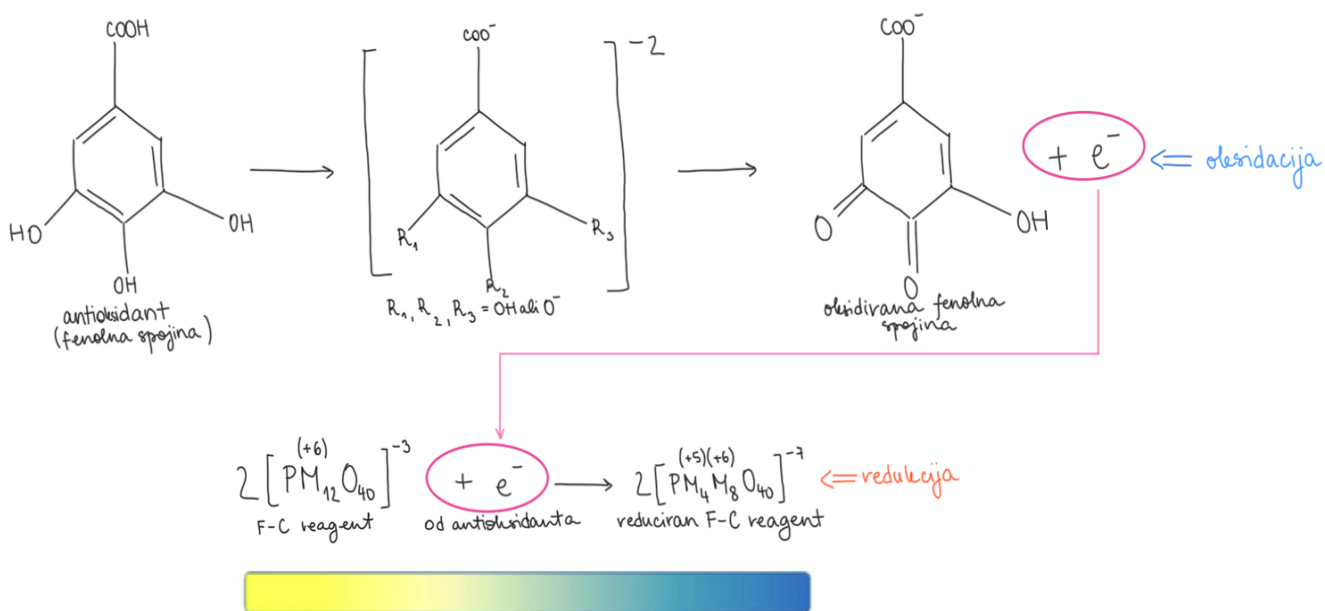
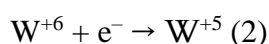
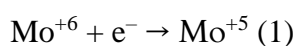
2.3. Spektrofotometrija

UV-vis spektrofotometer je analitična naprava s katero se da izmeriti absorbanco svetlobe na območju UV (angl. ultravijoličnega, ultraviolet) in vidnega (vis, kar je okrajšano "visible" v angleščini in pomeni viden) elektromagnetnega spektra. Vzorec, ki ga analiziramo, lahko vpadno svetlobo absorbira, prepušča ali odbije. Spektrofotometer nato izmeri intenziteto vpadne svetlobe preko teh območij valovanja in intenziteto svetlobe, ki jo vzorec prepušča. Meritve naprava primerja z referenčnim vzorcem, ki je ponavadi prozorna tekočina, na primer voda. Po Beer-Lambertovem zakonu je absorbanca vzorca premo sorazmerna z njegovo koncentracijo, zato lahko s spektrofotometričnimi metodami izmerimo koncentracijo določenih spojin v vzorcih. Največji prednosti analize vzorcev s to napravo sta, da UV-Vis spektrofotometer omogoča nedestruktivno analizo vzorcev in da ta naprava omogoča hitro ter učinkovito analizo, ki raziskovalcem omogoča pridobitev rezultatov v nekaj sekundah. Pomanjklivosti te metode pa so, da ni zelo selektivna, in da na natančnost rezultatov lahko vpliva razpršena svetloba (King, 2025).

V našem primeru smo uporabili UV-vis spektrofotometer za meritev absorpcije v območju vidnega spektra, oz. v območju valovnih dolžin, ki jih lahko zazna človeško oko (od 380 do 750 nm). Vsaka valovna dolžina pripada barvi na vidnem elektromagnetnem spektru, ta barva pa je obratna od tiste ki jo zazna človek. Te barve na spektru niso popolnoma razdeljene z mejami, ampak se določijo pasovi, ki predstavljajo spekter ene barve. Snov, ki vidno svetlobo absorbira, je obarvana. Več kot je snovi v vzorcu, manjša bo prepustnost določene valovne dolžine vidne svetlobe in večja bo absorbanca. Po prej omenjenem Beer-Lambertovem zakonu, je absorbanca vzorca premo sorazmerna s koncentracijo vzorca, zato večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo polifenolov v vzorcu (Porabimanj INFO, 2023).

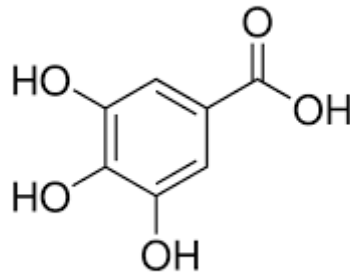
2.4. Folin-Ciocalteu-ov reagent

Folin-Ciocalteu-ov reagent, oz. Folinov fenolni reagent (FCR), je zmes fosfomolibdata, fosfotungstata, natrijevega tungstata, fosfomolibdične kisline v fosforjevi kislini, litijevega sulfata in bromida. Ta reagent se uporablja v kolorimetrični analizi fenolnih in polifenolnih spojin, kar se tudi imenuje ekvivalenčna metoda galne kisline (angl. gallic acid equivalence method, GAE). FCR reagira z reducenti (antioksidanti), pri tem pa tvori topni modri kompleks, saj reducent deluje kot donor elektronov, Folin-Ciocalteu-ov reagent pa reagira kot oksidant, pri čimer se reagent reducira in spremeni barvo iz rumene v modro. Ta sprememba v barvi je posledica redukcije molibdena (enačba 1), in volframa (enačba 2). Velikost barvnega premika je premo sorazmerna z redukcijsko aktivnostjo fenolnih spojin (Pérez et al., 2023; Bouhzam I. et al., 2023).



Slika 3: Redoks reakcija Folin-Ciocalteu-ovega reagenta (*The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern*, 2023)

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/>

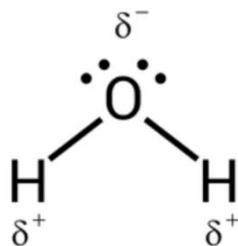


Slika 4: Struktura galne kisline (Gallic Acid, n.d.) <https://www.mpbio.com/in/gallic-acid>

Galna kislina ($C_7H_6O_5$) je bela trdna snov brez vonja, ki se opredeljuje kot fenolna kislina, torej spada med fenolne spojine. Ima aromatski obroč in številne hidroksilne skupine, zato je reprezentativna molekula za polifenole. Galna kislina reagira na podoben način kot polifenoli, na primer v reakciji s Folin-Ciocalteu-ovim reagentom se obarva modro (U.S. National Library of Medicine, 2025). Uporaba galne kisline kot standarda omogoča doslednost med različnimi študijami in laboratoriji pri poročanju o vsebnosti polifenolov. Rezultati so običajno izraženi v ekvivalentih galične kisline (angl. gallic acid equivalent, GAE), kar omogoča primerjavo skupne vsebnosti polifenolov v različnih vzorcih, in je zato uporabljen kot standard za kalibracijsko krivuljo. Gre za *in vitro* kolorimetrično analizo (poli)fenolnih antioksidantov, z UV-Vis spektrofotmetrom (Singleton et al., 1999).

Natrijev karbonat (Na_2CO_3) je anorganska spojina, ki je v svoji trdni obliki bela, brez vonja in je dobro topna v vodi. Ko se raztopi v vodi, natrijev karbonat hidrolizira in tvori hidrogenkarbonatne in hidroksidne ione. Hidroksidni ioni povečajo bazičnost raztopine (U.S. National Library of Medicine, 2025). Natrijev karbonat ustvari bazično okolje, ki je potrebno za reakcijo FCR s polifenoli, torej deluje kot katalizator. Pri reakciji se ne porabi in omogoča pospeševanje reakcije (Pérez et al., 2023).

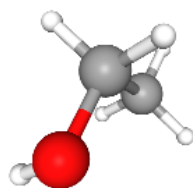
2.5. Voda in etanol



Slika 5: Lewisova struktura vode (Shutterstock, n.d.) <https://www.shutterstock.com/search/h2o-molecule-104-5>

Voda (H₂O) je polarna anorganska spojina, ki je prozorna, brez vonja in okusa. Molska masa te spojine je 18,01 g/mol, vrelišče 99,97 °C (običajno zaokroženo na 100 °C) in tališče 0 °C (U.S. National Library of Medicine, 2025).

Etanol (C₂H₅OH) je najpogosteje uporabljeno organsko topilo (Eicher, Clinical Neurotoxicology, 2009). Je prozorna, brezbarvna vnetljiva tekočina, ki se popolnoma meša z vodo (Wyman, Encyclopedia of Energy, 2004). Etanol ima molsko maso (M) 46,07 g/mol in vrelišče 78,24 °C. Ta spojina je zaradi hidroksilne skupine (-OH) na koncu ogljikove verige, pri čimer je kisik na sliki 6 označen z rdečo barvo, polarna, vendar ima zaradi svoje etilne skupine (-CH₂CH₃) tudi neparne lastnosti, in zato etanol spada med amfifilne snovi. (U.S. National Library of Medicine, 2025). Etanol je dobro topilo, saj lahko raztopi ne le številne polarne, temveč tudi neparne spojine, ker ima etanol tako polarne kot neparne lastnosti. Še posebej velja za primerno topilo za ekstrakcijo polifenolov zaradi njihove podobne polarnosti. Hidroksilne skupine etanola in polifenolov tvorijo vodikove vezi, kar stabilizira raztapljanje polifenolov v etanolu (Nguyen et al., 2020).



Slika 6: Struktura etanola (Ethanol, 2025) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>

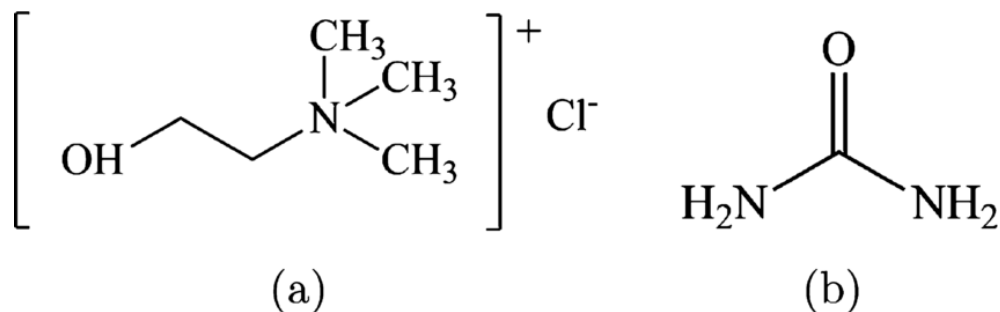
2.6. Globoko evtektično topilo

Evtetične raztopine so homogene raztopine z nižjim tališčem v primerjavi s svojimi sestavinami. Globoka evtektična topila (DES; angl. deep eutectic solvents) so zmesi, nastale iz evtektične zmesi Lewisove-Brønstedove kisline in baze, ki lahko vsebujejo različne anione in/ali katione. Tovrstne spojine se običajno dobijo s kompleksacijo kvartarne amonijeve soli s kovinsko soljo ali donorjem vodikove vezi. Za DES je značilno, da vsebujejo velike, nesimetrične ione, ki imajo nizko mrežno entalpijo in zato nizka tališča (Smith et al., 2014).

Evtetično topilo, ki je bil uporabljeno v tem eksperimentu, je bila mešanica sečnine in holin klorida. Sečnina (urea; H₂NCONH₂) je organska diamidna spojina, kar pomeni da vsebuje dve amidni skupine (-NH₂), vezani na karbonilno skupino (-CO). Gre za brezbarvno kristalinično snov s tališčem okoli 132.7 °C. Urea je dobro topna v vodi, in nima niti kislih niti bazičnih lastnosti. Gre za polarno molekulo zaradi razlike v elektronegativnosti med vodikom, dušikom,

ogljikom in kisikom. Molska masa (M) sečnine je 60,06 g/mol (U.S. National Library of Medicine, 2025).

Holin klorid ($[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]^+\text{Cl}^-$) je organska spojina, ki je sestavljena iz holinovitih kationov ($[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]^+$) ter kloridnih anionov (Cl^-). Gre za bifunkcionalno spojino, torej vsebuje dve funkcionalni skupini, hidroksilno skupino (-OH) ter kvarterni amonij ($[\text{NR}_4]^+$), kjer je R alkilna skupina (alkan, ogljikovodik tvorjen samo iz ogljika in vodika, kateremu manjka en vodikov atom), arilna skupina (aromatični obroč) ali organska skupina (organski substituent z eno ali več prostimi valencami na ogljikovem atomu) (The International Union of Pure and Applied Chemistry, n.d.). Holin klorid je bela, v vodi topna sol, ki se uporablja predvsem v krmi za živali (Frauenkron et al., 2001). Molska masa (M) holin klorida je 139,62 g/mol in tališče 305 °C. (U.S. National Library of Medicine, 2025).



Slika 7: Struktura holin klorida in sečnine (Research gate, n.d.) https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-a-choline-chloride-and-b-urea_fig1_328891728

V globokem eutektičnem topilu, urea deluje kot Lewisova baza zaradi amidnih skupin in karbonilne funkcionalne skupine, saj ima vsak dušikov atom osamljen par elektronov, ki jih lahko donira v vez. Sečnina reagira s spojino, ki lahko sprejme elektrone (Lewisova kislina), da nastane koordinatna kovalentna vez. Dušik lažje donira nevezne elektronske pare v vez kot kisik, saj je dušik manj elektronegativen od kisika. Holin klorid deluje kot Lewisova kislina, saj sprejema dušikove samske elektrone, zaradi svojih kloridnih ionov. Čeprav imajo kloridni ioni zapolnjen oktet, lahko delokalizirajo elektrone in tako sodelujejo pri tvorbi vezi, kar stabilizira DES. Delokalizirani elektroni stabilizirajo snov, ker omogočijo razpršitev energije okoli velikega območja, namesto da bi jo zadrževali v manjšem območju (UT Dallas, n.d.; Oxford Resources for IB DP Chemistry: Course Book, 2023). Kloridni ioni tudi omogočajo nastanek vodikove vezi s pomočjo naboja (angl. charge-assisted hydrogen bond; CAHB) med molekulami holina klorida in sečnine. CAHB opisuje pojav močnejše vodikove vezi zaradi prisotnega naboja na enem izmed vključenih atomov, kar omogoča večji elektrostatični privlak med atomom, ki donira in atomom, ki sprejme vodikovo vez. Na splošno, vodikova vez nastane med vodikom in izjemno elektronegativnim elementom, ki ima proste elektrone. Obstajata dve

vrsti takšnih medmolekulskih sil: pozitivni CAHB in negativni CAHB. V primeru DES, ki je sestavljen iz ureje in holin klorida gre za slednjo, kar pomeni, da ima atom, ki sprejme, oz. kloridni ioni holina klorida, negativni naboj. S polnim negativnim nabojem (-1), kloridni ioni veliko močnejše sodelujejo z vodikom, ki ima delni pozitivni naboj, kot nevtralni atom z le delnim negativnim nabojem (npr. kisik v vodi). Zato, je elektrostatski privlak močnejši v negativnem CAHB, kot v nevtralni vodikovi vezi, kar stabilizira globoko evtektično topilo. Vodikove vezi s pomočjo naboja so po jakosti primerljive s kovalentno vezjo (Wang et al., 2023). Urea tvori vodikove vezi z amidnimi skupinami, ki predstavljajo donorje vodikove vezi. Vodikove vezi lahko tvori z drugimi molekulami sečnine ter s hidroksilno skupino holin klorida. Te močne medmolekulske sile (vodikove vezi) porušijo pravilne kristalne mreže sečnine in holin klorida, kar jima prepreči tvorbo trdnih struktur in znatno zniža tališče zmesi, kar je značilno za evtektične sisteme. Kot je bilo prej povedano, tališče čiste sečnine je 132,7 °C, holin klorida pa je 305 °C, vrelišče DES pa je izjemno visoko, sestavine tega globokega evtektičnega topila se v resnici razgradijo preden lahko zavre, torej višja od tališča svojih sestavin. Vrelišče DES je v resnici določeno z razmerjem med njegovimi sestavinami (Arriaga & Aizpuru, 2019). Nastali DES je zelo polaren zaradi ionske narave holin klorida in številnih polarnih funkcionalnih skupin v sečnini, stopnja polarnosti pa je tudi odvisna od tega razmerja (Oxford Resources for IB DP Chemistry: Course Book, 2023).

Ker je globoko evtektično topilo polarna spojina, je primerno topilo za raztapljanje polarnih in zmerno polarnih raztopin, kot so polifenoli. Polifenoli vsebujejo številne hidroksilne skupine, ki lahko sodelujejo z amidnimi in karbonilnimi skupinami sečnine, kloridnimi ioni holin klorida, ki lahko sprejmejo vodikove vezi, kar stabilizira polifenole. Struktura tega evtektičnega topila zagotavlja združljivo okolje za aromatske obroče polifenolov, saj lahko delno polarna sečnina interagira z elektronsko bogatimi aromatskimi obroči preko šibkih interakcij π - π zlaganja in preko interakcij, ki jih povzročajo dipoli. Polarnost sečnine ji omogoča interakcijo s π -elektronskim oblakom aromatskih obročev v polifenolih, kar povzroči rahel dipol v elektronskem oblaku aromatskega obroča, kar stabilizira interakcijo in povečuje topnost z zmanjšanjem odbojnosti ter destabilizacije zaradi topila.

2.7. Pregled objav

V raziskavi *Ekstrakcija, identifikacija in kvantifikacija polifenolov iz porabljene kavne usedline s kromatografskimi metodami in kemometričnimi analizami* (Extraction, identification

and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses) avtorjev Ramón-Gonçalves, Gómez-Mejía, Rosales-Conrado, León-González in Madrid leta 2019 so avtorji preučevali tekočinsko-trdno ekstrakcijo polifenolov. Ekstrakcijo so izvajali v topilu etanol:voda (25:75, v/v).

Za določitev optimalnih pogojev ekstrakcije polifenolov so uporabili analizo večkratnega odziva (multiple response analysis; MRA), saj se ti pogoji razlikujejo glede na vrsto polifenolov (Ramón-Gonçalves et al., 2019).

Ugotovili so, da je bila koncentracija polifenolov v ekstraktih veliko večja kot v posušениh ostankih. Optimalni pogoji za ekstrakcijo polifenolnih spojin za posušene kavne ostanke so bili 15 min ekstrakcije pri 60°C ter uporaba etanola v nizki prostorninski koncentraciji, med 15 % in 20 % (Ramón-Gonçalves et al., 2019).

Cilj raziskave *Ekstrakcija bioaktivnih spojin iz uporabljenih kavnih zrn z uporabo vodnih raztopin etanola in acetona (Extraction of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds Using Ethanol and Acetone Aqueous Solutions)*, ki so jo izvedli leta 2023 avtorji Bouhzam, Cantero, Aldaco, Bala, Fullana-i-Palmer in Puig, je bil primerjati sposobnost ekstrakcije bioaktivnih spojin (polifenolov, klorogenske kisline in kofeina) s topiloma etanol-voda in aceton-voda iz uporabljenih kavnih ostanikov (Bouhzam et al., 2023).

Pred ekstrakcijo so kavne ostanke posušili. Ekstrakcijo so v obeh primerih izvedli pri sobni temperaturi, pri masni koncentraciji $5,7 \frac{g}{L}$ kavnih ostanikov v topilu, in z ekstrakcijskim časom 1 minute. Primerjali so topila s koncentracijami etanola (v/v) 0 % (samo voda), 20 %, 40 % in 60 % ter analizirali vzorce s pomočjo ekvivalenčne metode galne kisline.

Ugotovili so, da med koncentracijami polifenolov pri topilih z 20 % in 40 % etanola ni bilo bistvenih razlik, vendar se je pri 60 % etanola njihova vsebnost zmanjšala. Zato raziskovalci priporočili, da se za ekstrakcijo polifenolov uporablja 20 % etanol (Bouhzam et al., 2023).

Globoka evtektična topila na osnovi holin-klorida in betaina za zeleno ekstrakcijo nutracevitičnih spojin iz izrabljene mlete kave (Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground) avtorjev Fanali, Della Posta, Dugo, Gentili, Mondello in De Gara leta 2020 je članek, ki poroča, katera globoka evtektična topila, pri katerih je sprejemnik vodikove vezi holin klorid ali betain, so najučinkovitejša pri ekstrakciji nutracevitičnih spojin iz uporabljenih kavnih ostanikov. Poleg

tega so preučevali tudi optimalno razmerje DES proti vodi (g/mL). Uporabili so metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) (Fanali et al., 2020).

Ugotovili so, da je najbolj učinkovito globoko evtektično topilo bilo betain:trietilenglikol (molarno razmerje 1:2). Optimalno razmerje vode in DES pa je bilo 1:2.33, kar pomeni, da voda predstavlja tretjino cele raztopine (Fanali et al., 2020).

Raziskava z naslovom *Naravna globoka evtektična topila kot zelena ekstrakcija polifenolov iz porabljene mlete kave z izboljšano bioaktivnostjo (Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities)*, avtorjev García-Roldán, Piriou in Jauregi iz leta 2023 proučuje uporabo globokih evtektičnih topil betain:trietilen glikol in holin klorid:1,2-propandiol za ekstrakcijo polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov. Prav tako preučuje njun vpliv na antioksidativno in protimikrobno delovanje ekstraktov ter primerja učinkovitost ekstrakcije z DES z ekstrakcijo s standardnimi naravnimi topili (vročo vodo in hidroalkoholno raztopino) (García-Roldán et al., 2023).

Ugotovili so, da so evtektična topila enako učinkovita pri ekstrakciji polifenolov kot standardna metoda, ekstrakcija z organskimi topili. Protimikrobna aktivnost ekstraktov, pridobljenih z DES, je bila desetkrat večja od aktivnosti etanolnih in vodnih ekstraktov (García-Roldán et al., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. Metodologija

3.1.1. Materiali in oprema

Materiali:

- Ostanki uporabljene kave (pridobljeno iz lokalne gostilne)
- Deionizirana voda
- Galna kislina, Sigma Life Science
- Etanol (99,9 %), Honeywell
- Urea (>99,5 %), Zorka Šabac
- Holin klorid (>98,0 %), TCI
- Folin-Ciocalteu-ov reagent, Merck
- Natrijev karbonat (≥ 99.8 %), Honeywell

Oprema:

- Merilne bučke, 50 mL
- Merilne bučke, 500 mL
- Merilni valj, 300 mL
- Pipete (2 mL, 5 mL, 25 mL)
- Lijak
- Merilne čaše, 50 mL
- Magnetna mešala
- Filter papir
- Avtomatska pipeta, WINLAB
- Tehnica, Kern ABJ
- Grelna plošča, Wisd Laboratory Instruments
- UV-vis spektrofotometer, Vernier

3.1.2. Postopek dela

Uporabili smo ekvivalenčno metodo galne kisline, ker gre za standard, ki omogoča primerjavo naših rezultatov z rezultati drugih raziskav. Metodo priprave kavnih ostankov smo prevzeli iz raziskave *Naravna globoka eutektična topila kot zelena ekstrakcija polifenolov iz porabljene mlete kave z izboljšano bioaktivnostjo (Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities)* avtorjev García-Roldán et

al. (2023). Metoda analize in priprave vzorcev je bila prevzeta iz raziskave *Ekstrakcija, identifikacija in kvantifikacija polifenolov iz porabljene kavne usedline s kromatografskimi metodami in kemometričnimi analizami (Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses)* avtorjev Ramón-Gonçalves et al (2019), vendar so bila razmerja komponent spremenjena.

3.1.2.1. Priprava topila etanol-voda

Na podlagi objav smo za prvo ekstrakcijsko topilo izbrali 25 % (v/v) raztopino etanola. V raziskavi Ramón-Gonçalves et al. (2019) so uporabili enako razmerje etanola in vode, medtem, ko so v raziskavi Bouhzam et al. (2023) so ugotovili da je optimalni volumski odstotek etanola v vodi za ekstrakcijo polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov v območju 20-40 %, kamor spada tudi 25 %.

Topilo smo pripravili tako, da smo v 1-litrsko bučko prelili 250 mL 99,99 % etanola, ki smo ga izmerili z merilnim valjem. Nato smo bučko napolnili z vodo do oznake.

3.1.2.2. Priprava globokega evtektičnega topila

Globoko evtektično topilo, uporabljeno v tej raziskavi, je bilo sestavljeno iz sečnine in holin klorida v množinskem razmerju 2:1. To razmerje je bilo izbrano, saj velja za optimalno razmerje za raztapljanje (Shumilin et al., 2023). Iz tega sledi:

$$\frac{n(\text{holin klorid})}{n(\text{sečnina})} = \frac{1}{2} \quad (3)$$

V enačbi 3 in nadaljnjem izračunu “n(holin klorid)” predstavlja množino holin klorida, “n(sečnina)” pa predstavlja množino sečnine.

Če izrazimo iz enačbe 3 množino sečnine dobimo naslednjo enačbo (enačba 4):

$$n(\text{sečnina}) = 2 n(\text{holin klorid}) \quad (4)$$

Pri enačbi 4 upoštevamo, da je množina snovi enaka razmerju med maso in molsko maso snovi (oz. $n = \frac{m}{M}$, kjer je “m” masa snovi in “M” njena molska masa). Iz tega izrazimo maso sečnine in dobimo enačbo 5:

$$\frac{m(\text{sečnina})}{M(\text{sečnina})} = 2 \cdot \frac{m(\text{holin klorid})}{M(\text{holin klorid})}$$

$$m(\text{sečnina}) = \frac{2 \cdot m(\text{holin klorid}) \cdot M(\text{sečnina})}{M(\text{holin klorid})} \quad (5)$$

Nato izračunamo maso sečnine, ki jo potrebujemo, če imamo 1,00 g holin klorida (oz. $m(\text{holin klorid}) = 1,00 \text{ g}$). Vrednosti za molsko maso sečnine in holin klorid so navedene v

poglavju 2.6. *Globoko evtektično topilo*. Z upoštevanjem teh vrednosti v enačbi 5 dobimo, da je masno razmerje sečnine in holin klorida v DES 0,860 g sečnine:1,00 g holin klorida.

Za izračun mase obeh komponent, ki ju potrebujemo za pripravo 400 g topila, uporabimo križni račun, kot je prikazano z enačbo 6.

$$\frac{m(\text{sečnina})}{m(\text{holin klorid}) + m(\text{sečnina})} = \frac{m_1}{400 \text{ g}} \quad (6)$$

V enačbi 6 “ m_1 ” predstavlja maso sečnine v 400 g DES. Če izrazimo “ m_1 ” z enačbo 6, dobimo enačbo 7:

$$m_1 = \frac{400 \text{ g} \cdot m(\text{sečnina})}{m(\text{holin klorid}) + m(\text{sečnina})} \quad (7)$$

Ko vstavimo prej izračunane vrednosti ($m(\text{sečnina}) = 0,860 \text{ g}$, $m(\text{holin klorid}) = 1,00 \text{ g}$) v enačbo 7, dobimo, da je m_1 enaka 184,9 g. Da bi določili maso holin klorida v 400 g globokega evtektičnega topila (m_2), od skupne mase topila (400 g) odštejemo vrednost mase sečnine (enačba 8):

$$m_2 = 400,0 \text{ g} - m_1 \quad (8)$$

Ko vstavimo vrednost $m_1 = 184,9 \text{ g}$, dobimo, da je $m_2 = 215,1 \text{ g}$, kar pomeni, da je masa sečnine 184,9 g, masa holin klorida pa 215,1 g.

Sečnino in holin klorid smo segreli na indukcijski plošči ter hkrati mešali, dokler nista tvorila homogene, prozorne zmesi. Ta zmes predstavlja globoko evtektično topilo.

Ko se je topilo ohladilo, smo pripravili 60 % (v/v) raztopino (kot v raziskavi García-Roldán et al., 2023). V ta namen smo izmerili 300 mL DES v merilnem valju in ga kvantitativno prenesli v merilno bučko s prostornino 500 mL. Na koncu smo v bučko dolili vodo do oznake.

3.1.2.3. Priprava standardnih raztopin galne kisline in natrijevega karbonata

Standardno raztopino galne kisline z masno koncentracijo $5 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ smo pripravili tako, da smo 0,500 g galne kisline raztopili v 100 mL deionizirane vode.

Raztopino natrijevega karbonata z masno koncentracijo smo pripravili tako, da smo 7,50 g natrijevega karbonata raztopili v 100 mL deionizirane vode.

3.1.2.4. Priprava kave in ekstrakcija polifenolov

Uporabljeni kavni ostanki so bili posušeni pri 80 °C v pečici, premešani in shranjeni v zaprtem prostoru.

Vzorci so bili pripravljani tako, da smo odpipetirali 25 mL topila v 50 mL čašo in čašo postavili na grelno ploščo z magnetnim mešalom, ki je mešal s konstantno hitrostjo 200 obratov na

minuto (rpm). Ko je topilo doseglo temperaturo, pri kateri smo želeli ekstrahirati polifenole, smo dodali določeno maso kavnih ostankov in mešali vsebino čaše pri vzdrževani temperaturi. Po določenem času smo čaše, ki vsebujejo vzorce, postavili v mrzlo vodo. Nato smo ostanke kave ločili od raztopine s filtriranjem. Po filtraciji zmesi v 50 mL merilne bučke, smo bučke napolnili z vodo do oznake.

Pri raziskovanju vpliva časa ekstrakcije na koncentracije ekstrahiranih polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov smo izbrali naslednje časovne intervale: 5, 10, 15, 20 in 25 minut. Pri tem je bila temperatura ekstrakcije 60 °C, masa kavnih ostankov pa je bila 0,3 g.

Pri raziskovanju vpliva temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenolov, so bile izbrane temperature 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C in 60 °C. Pri tem je bil čas ekstrakcije 15 minut, masa kave pa je bila 1,1 g. Raziskovanje vpliva temperature pri 20 °C je potekalo pri sobni temperaturi ob konstantnem mešanju.

Raziskovanje vpliva mase kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije polifenolov iz kave smo preučevali pri masah 0,3 g, 0,5 g, 0,7 g, 0,9 g in 1,1 g. Pri tem je bil čas ekstrakcije 15 minut, temperatura ekstrakcije pa je bila 60 °C.

Vzorci s topilom etanol-voda so bili ponovljeni trikrat za vsako vrednost določene neodvisne spremenljivke. Vzorci z DES so bili ponovljeni dvakrat.

3.1.2.5. Postopek določevanja koncentracije polifenolov v vzorcih

V epruveto smo dodali 5 mL vode, 100 µL Folin-Ciocalteu-ovega reagenta in 200 µL vsakega vzorca. Dve minuti po dodatku vzorca, smo dodali v epruveto še 1 mL natrijevega karbonata. Nato smo epruveto potopili za 15 minut v banjico z vodo, ki je imela temperaturo 40 °C. Po 15 minutah smo vzorce ohladili na sobno temperaturo in takoj izmerili absorbanco z UV-vis spektrofotometrom. Vzorci so bili izmerjeni pri valovni dolžini 764,7 nm.

3.1.2.6. Priprava kalibracijske krivulje

Pripravili smo si različne koncentracije raztopin galne kisline. V 50 mL merilne bučke smo dodali različne volumne (1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL) standardne raztopine galne kisline, da smo dobili raztopine različnih koncentracij: $0,1 \frac{g}{L}$, $0,2 \frac{g}{L}$, $0,3 \frac{g}{L}$, $0,4 \frac{g}{L}$ in $0,5 \frac{g}{L}$. Pri vzorcu s koncentracijo $0 \frac{g}{L}$ je bila namesto galne kisline uporabljena deionizirana voda. V epruvete smo dodali 60 µL vsake raztopine galne kisline in v vsako dodali še 100 µL Folin-Ciocalteuovega reagenta (FCR) ter 5 mL vode. Po dveh minutah od dodatka FCR raztopinam galnih kislin smo

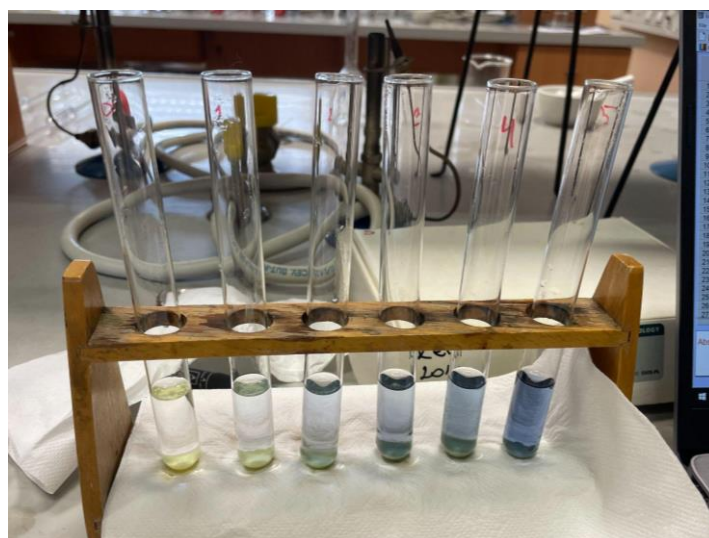
dodali 1 mL 75,0 g/L raztopine natrijevega karbonata (Na_2CO_3). Epruvete smo nato potopili v vodno kopel s temperaturo 40 °C in jih tam pustili 15 minut.

Po 15 minutah smo vzorce ohladili na sobno temperaturo in izmerili absorbanco z UV-vis spektrofotometrom pri valovni dolžini 764,7 nm.

Pri merjenju vzorcev, ki so potekali z ekstrakcijo DES, smo opazili, da se je ob mešanju nizke koncentracije DES in FCR pojavila oborina. Del polifenolov bi lahko bil prisoten tudi v oborini, zato smo si za merjenje koncentracij polfenolov v vzorcih z DES pripravili novo umeritveno krivuljo.

Priprava raztopin je potekala na enak način kot pri ustvarjanju kalibracijske krivulje z vodo, le da je v raztopino bil dodan tudi DES, v istem razmerju DES:voda, kot je bilo razmerje v vzorcih po ekstrakciji.

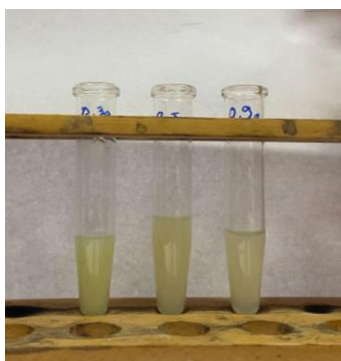
Ta umeritvena krivulja je bila pripravljena tako, da smo pripravili 6 raztopin z različnimi koncentracijami galne kisline, na enak način kot pri prejšnji umeritveni krivulji: $0 \frac{\text{g}}{\text{L}}$, $0,1 \frac{\text{g}}{\text{L}}$, $0,2 \frac{\text{g}}{\text{L}}$, $0,3 \frac{\text{g}}{\text{L}}$, $0,4 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ in $0,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}$. V 50 mL merilne bučke smo dodali ustrezno količino standardne raztopine galne kisline, nato prilili 25 mL mešanice voda-DES in bučko dopolnili do oznake. Postopek naprej je potekal isto, kot pri pripravi kalibracijske krivulje z vodo.



Slika 8: Analiza vzorcev galne kisline z DES (lastni vir)

Po analizi vzorcev smo odlili odvečni supernatant in oborine spreli z destilirano vodo. Opazili smo, da je bila v vseh primerih oborina rumene barve, brez modrih odtenkov. To lahko vidimo

na sliki 9. To kvalitativno opažanje prideve do domneve, da je bila koncentracija polifenolov v oborini zelo majhna ali ničelna in je bila konstantna pri vseh vzorcih.



Slika 9: Oprana oborina v vzorcih z DES (lastni vir)

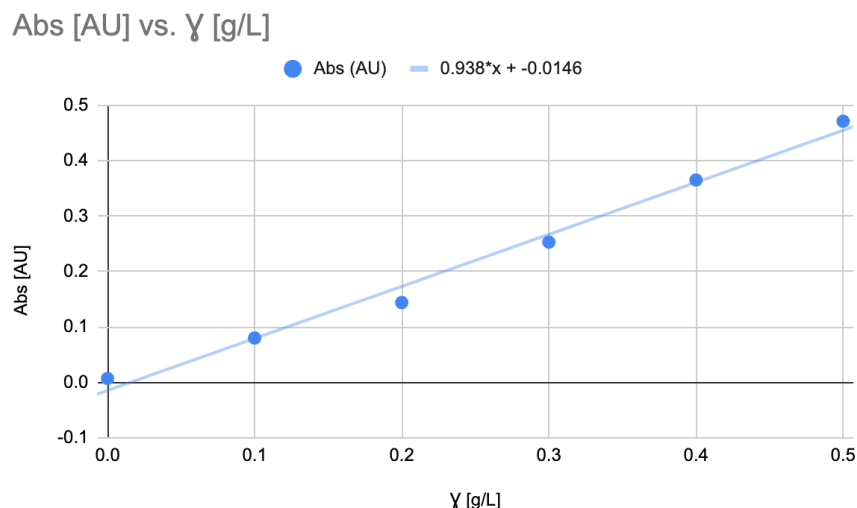
3.1.3. Varnostni ukrepi

- Epruvete s Folin-Ciocalteu-ovim reagentom so bile odlite v ločeno zbirno posodo.
- Evtetično topilo je bilo pred izlivanjem močno razredčeno.
- Pri izvedbi eksperimentov je bil ves čas uporabljen laboratorijski plašč. Vse kemikalije in pripomočki so bili uporabljeni skladno z navodili proizvajalca.
- Delo s Folin-Ciocalteu-ovim reagentom, etanolom in holin kloridom je potekalo z zaščitnimi rokavicami.
- Segrevanje topil je bilo izvedeno v prostoru z ustreznim prezračevanjem, da bi preprečili izhajanje hlapnih snovi. Etanol ni bil v stiku z ognjem, segrevanje je potekalo nadzorovano in na zadostni razdalji od oči.

3.2. Rezultati

3.2.1. Kalibracijska krivulja z vodo

Vse izmerjene vrednosti so zabeležene v tabeli 1 v prilogi. S pomočjo podatkov smo narisali kalibracijsko krivuljo, ki je prikazana na grafu 1.



Graf 1: Kalibracijska krivulja z vodo

Določili smo enačbo premice:

$$\text{Abs} = 0.938\Upsilon - 0.0146 \text{ (enačba 9);}$$

kjer Abs predstavlja absorbanco vzorca, Υ pa masno koncentracijo galne kisline vzorca v $\frac{g}{L}$.

Obrnjena enačba, ki izraža Υ je:

$$\Upsilon = \frac{\text{Abs} + 0.0146}{0.938} \left[\frac{g}{L} \right] \text{ (enačba 10).}$$

Kalibracijske krivulje bile narejene s 60 μL volumna različnih raztopin galne kisline, vzorci ekstrakcij pa s 200 μL . Za realno koncentracijo polifenolov v vzorcih smo dobljeno koncentracijo Υ pomnožili s faktorjem $\frac{60}{200}$. Dejanska koncentracija polifenolov v vzorcih je predstavljena z Γ (enačba 11).

$$\Gamma = \frac{60}{200} \cdot \Upsilon \text{ (11)}$$

Da bi določili maso polifenolov v vzorcu, smo koncentracijo polifenolov pomnožili s prostornino merilne bučke (0,050 L), v katerih so bile ustvarjene raztopine filtratov ekstrahiranih polifenolov. Dobimo, da je masa polifenolov (enačba 12):

$$M = \Gamma \cdot 0.050 \text{ L [g] (12);}$$

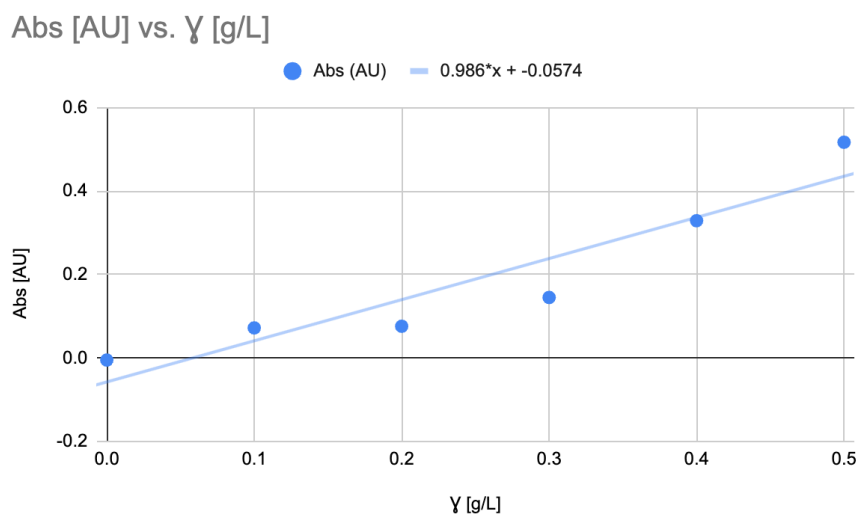
kjer M predstavlja maso polifenolov v vzorcu.

Razmerje med M in maso uporabljenih kavnih ostankov, izraženo z ΔM predstavlja ekvivalent galne kisline (GAE) v % suhe mase, kar omogoča primerjavo z drugimi podobnimi raziskavami, kjer so uporabljali različne količine kave oz. kavnih ostankov. Izračun ΔM je prikazan z enačbo 13.

$$\Delta M = \frac{M}{m(\text{kave})} [\%] \text{ (13)}$$

3.2.2. Kalibracijska krivulja z globokim evtaktičnim topilom

Rezultati meritev absorbanc z UV-vis spektrofotometrijo so zabeleženi v tabeli 2 v prilogi. S pomočjo podatkov, lahko narišemo kalibracijsko krivuljo, ki je prikazana z grafom 2.



Graf 2: Kalibracijska krivulja galne kisline z DES

Določili smo enačbo premice:

$$\text{Abs} = 0.986\Upsilon - 0.0574 \text{ (enačba 14);}$$

kjer Abs predstavlja absorbanco vzorca, Υ pa koncentracijo galne kisline vzorca v $\frac{g}{L}$.

Obrnjena enačba, ki izraža Υ je:

$$\Upsilon = \frac{\text{Abs} + 0.0574}{0.986} \left[\frac{g}{L}\right] \text{ (enačba 15).}$$

Na enak način kot pri kalibracijski krivulji z vodo smo izračunali dejansko koncentracijo polifenolov v vzorcu, tako da smo pomnožili Υ s faktorjem $\frac{60}{200}$. Ta koncentracija je predstavljena z Γ (11).

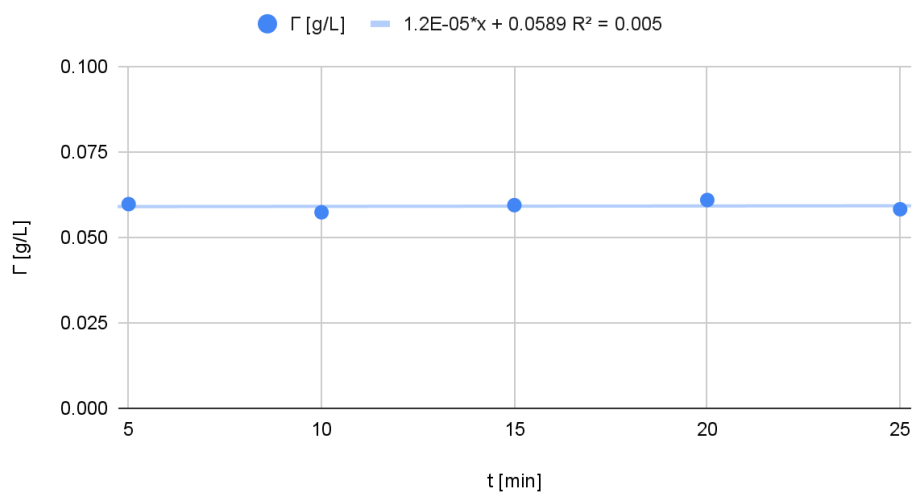
Masa polifenolov v vzorcu se izračuna preko enačbe 12, ki je predstavljena v poglavju 3.2.1. Po enačbi 13 smo izračunali ΔM .

3.2.3. Ekstrakcija s topilom etanol-voda

Ekstrakcija polifenolov je potekala po postopku, opisanem v poglavju 3.1.2 z uporabo topila etanol-voda.

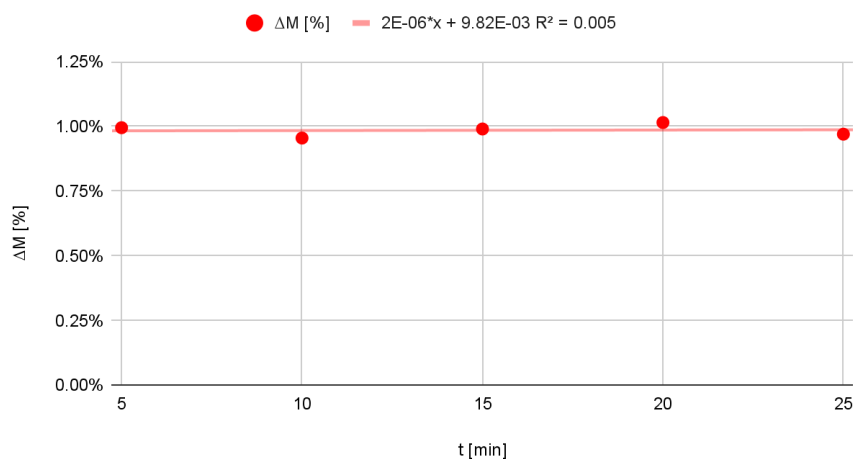
Podatki, pridobljeni pri raziskovanju vpliva časa ekstrakcije, so prikazani v tabeli 3 v prilogi, grafih 3 ter 4. S pomočjo izmerjenih absorbanc smo izračunali koncentracijo polifenolov $\left[\frac{g}{L}\right]$, z uporabo enačbe 11.

Γ [g/L] vs. t [min]



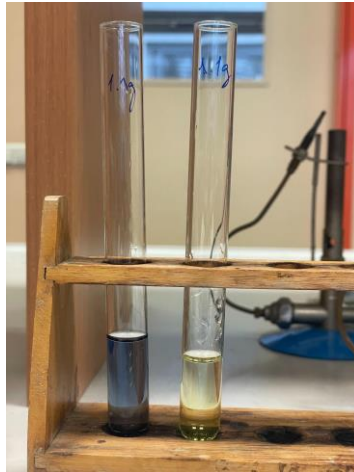
Graf 3: Vpliv časa na ekstrakcijo polifenolov s topilom etanol-voda (koncentracija polifenolov)

ΔM [%] vs. t [min]



Graf 4: Vpliv časa na ekstrakcijo polifenolov s topilom etanol-voda (ΔM)

Koeficient linearne korelacije grafa 3 je enak 0,005. Na podlagi tega rezultata lahko zaključimo, da čas ekstrakcije nima vpliva na količino ekstrahiranih polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov. S tem zavračamo prvo hipotezo, ki trdi, da se bo učinkovitost ekstrakcije povečala s povečanjem časa.



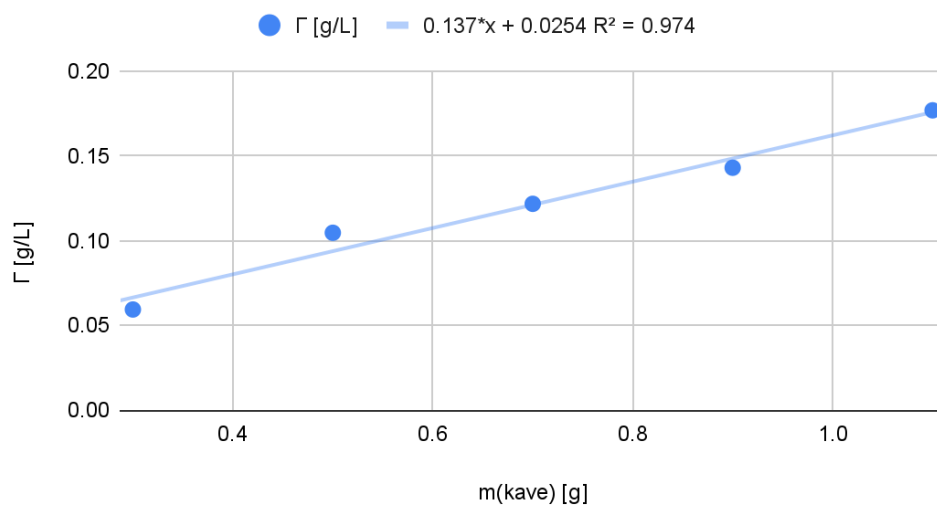
Slika 10: Priprava vzorcev pred (desno) in po (levo) dodajanju natrijevega karbonata (lastni vir)

Podatki, ki so bili pridobljeni pri raziskovanju vpliva mase kavnih ostankov in temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov, so prikazani v tabeli 4 in 5, v prilogi ter grafih 5 in 6 za vpliv mase kavnih ostankov, grafih 7 in 8 za vpliv temperature ekstrakcije. “ T ” v grafih 5 in 7 predstavlja koncentracijo polifenolov v vzorcih z določeno maso kavnih ostankov ali vzorcev pripravljenih pri isti temperaturi ekstrakcije. Vrednost “ T ” je bila izračunana z enačbo 11, na enak način kot pri raziskovanju časa. “ $m(\text{kave})$ ” se nanaša na maso posušenih kavnih ostankov, izmerjeno v gramih. “ T ” označuje temperaturo, pri kateri je potekala ekstrakcija polifenolov, izmerjena v °C. V tabeli 4 in v nadaljnjih sklicevanjih, “ Abs ” predstavlja povprečno absorbanco vseh vzorcev z določeno maso kavnih ostankov ali vzorcev pripravljenih pri isti temperaturi ekstrakcije. Abs je vsota vseh poskusov, izvedenih z določeno vrednostjo neodvisne spremenljivke, deljena s številom poskusov (v tem primeru 3). Izračunana je po naslednji enačbi (enačba 16):

$$\underline{Abs} = \frac{Abs_1 + Abs_2 + Abs_3}{3} \quad (16);$$

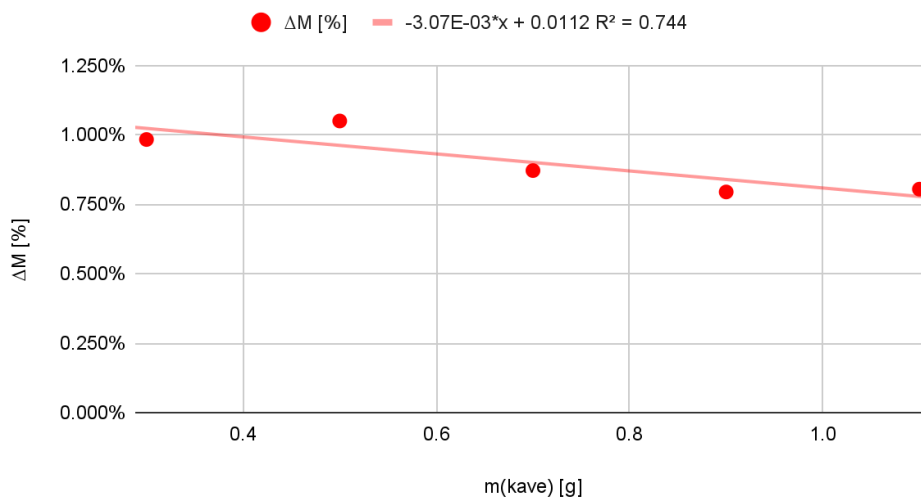
kjer Abs_1 , Abs_2 , Abs_3 predstavljajo vrednosti absorbancc različnih poskusov z določeno vrednostjo neodvisne spremenljivke. Te vrednosti so prikazane v tabeli 4.

Γ [g/L] vs. m(kave) [g]



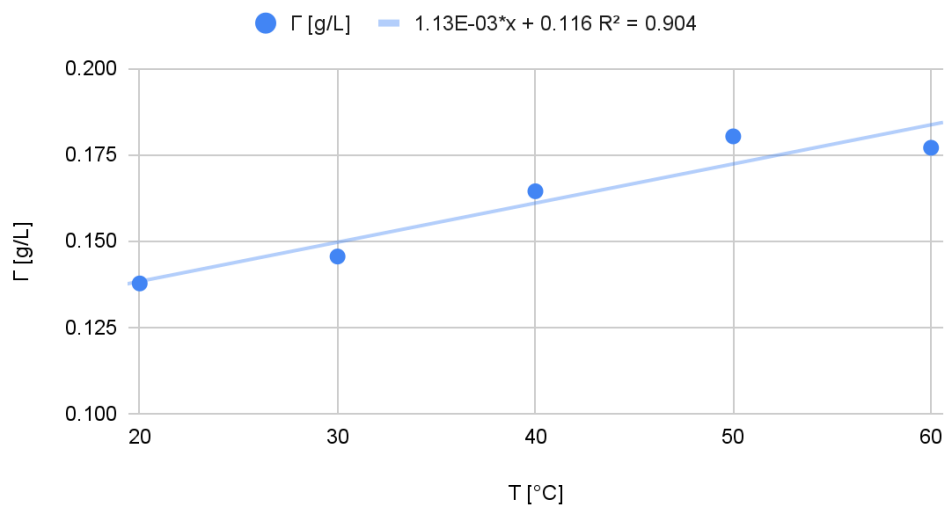
Graf 5: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (koncentracija polifenolov)

ΔM [%] vs. m(kave) [g]



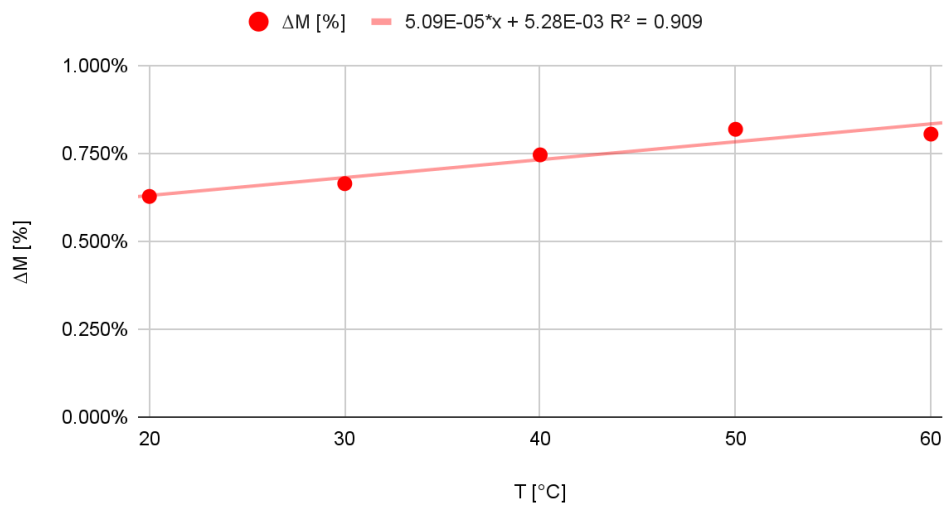
Graf 6: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (ΔM)

Γ [g/L] vs. T [°C]



Graf 7: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (koncentracija polifenolov)

ΔM [%] vs. T [°C]



Graf 8: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda (ΔM)

3.2.4. Ekstrakcija z globokim evtektičnim topilom (sečnina in holin klorid)



Slika 11: Filtracija vzorcev (lastni vir)

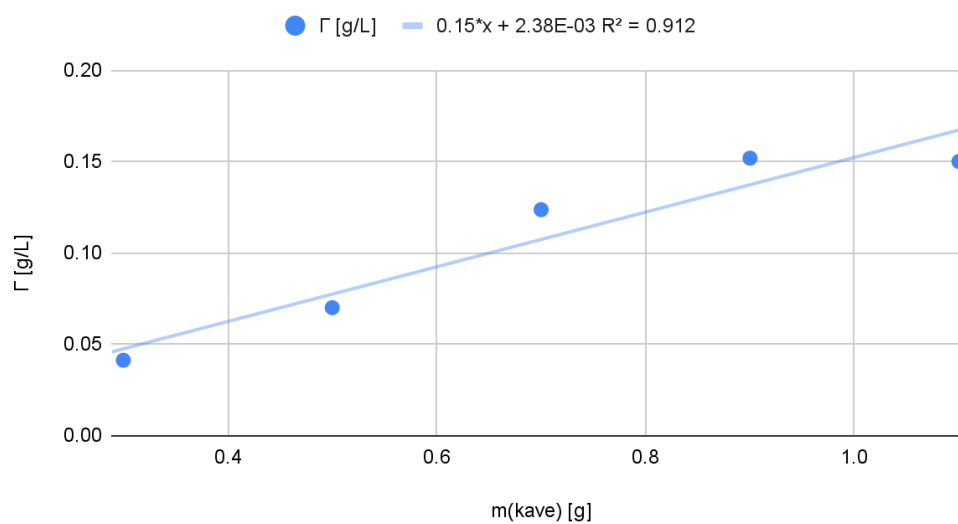
Ekstrakcija polifenolov z globokim evtektičnim topilom sečnina in holin klorid je potekala po postopku, opisanem v poglavju 3.1.2,

Odločili smo se, da pri tem topilu ne bomo eksperimentirali z vplivom časa ekstrakcije, saj smo s pomočjo topila etanol-voda ugotovili, da spremembe časa ekstrakcije polifenolov ne vplivajo na učinkovitost ekstrakcije. Pri raziskovanju vpliva mase kavnih ostankov in temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov, so bili zbrani podatke, ki so prikazane v tabeli 6 in 7 v prilogi ter grafih 9 in 10 za vpliv mase kavnih ostankov, grafih 11 in 12 za vpliv temperature. “ Γ ” se nanaša na koncentracijo polifenolov, ki se nahaja v analiziranem vzorcu izračunana s pomočjo kalibracijske krivulje na osnovi DES (enačba 15 in 11). \underline{Abs} je vsota vseh poskusov, izvedenih z določeno vrednostjo neodvisne spremenljivke, deljena s številom poskusov (v tem primeru 2). Izračunana je po naslednji enačbi (enačba 17):

$$\underline{Abs} = \frac{Abs_1 + Abs_2}{2} \quad (17);$$

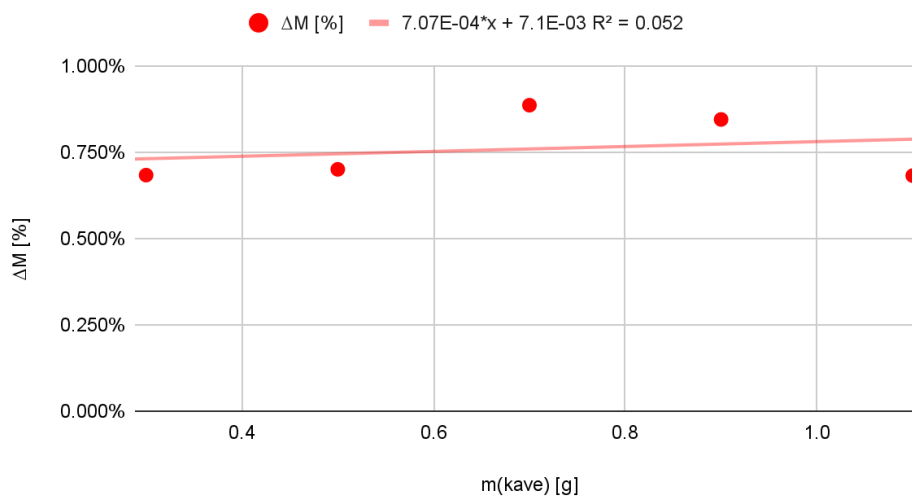
pri čimer Abs_1 , Abs_2 sta vrednosti absorbanc različnih poskusov z določeno vrednostjo neodvisne spremenljivke. Te vrednosti so prikazane v tabeli 6.

Γ [g/L] vs. m(kave) [g]



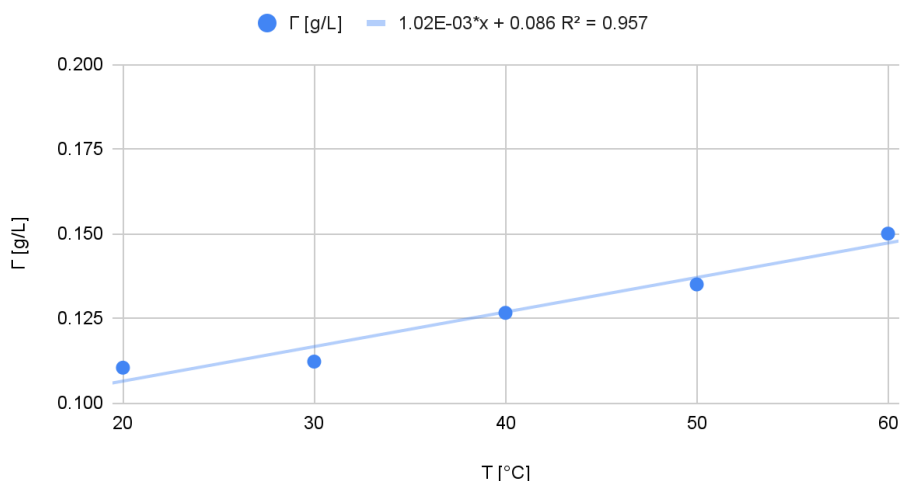
Graf 9: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije z DES (koncentracija polifenolov)

ΔM [%] vs. m(kave) [g]



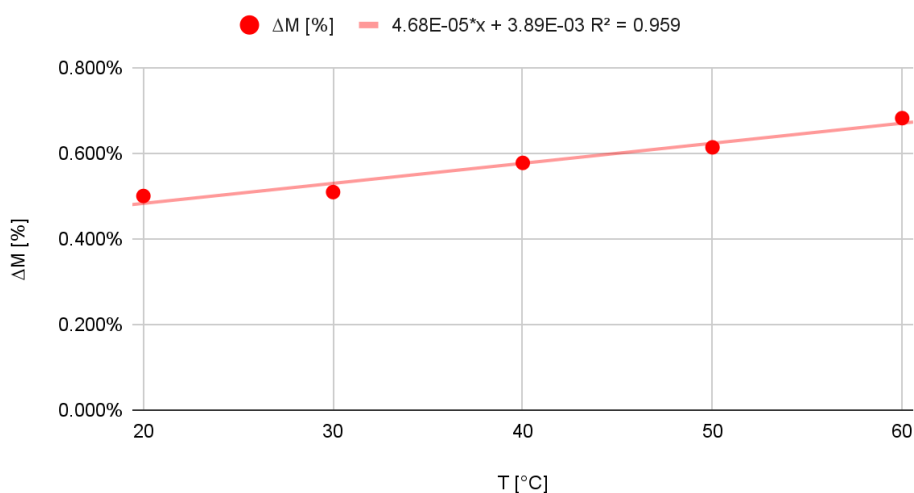
Graf 10: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije z DES (ΔM)

Γ [g/L] vs. T [°C]



Graf 11: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije z DES (koncentracija polifenolov)

ΔM [%] vs. T [°C]



Graf 12: Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije z DES (ΔM)

3.3. Razprava

V tem poglavju so analizirani in interpretirani rezultati ekstrakcije polifenolov iz uporabljenih kavnih ostankov pri uporabi različnih eksperimentalnih pogojev. Obravnavani so vplivi mase kavnih ostankov in temperature ekstrakcije na učinkovitost pridobivanja polifenolov ter primerjava med učinkovitostjo dveh topil – etanol-voda in globokim evtektičnim topilom (DES).

3.3.1. Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov na učinkovitost ekstrakcije polifenolov

Rezultati, pridobljeni pri spreminjanju mase uporabljenih kavnih ostankov (prikazani v tabelah 5 in 7 ter grafih 5, 6, 9 in 10), kažejo na naraščajoči trend koncentracije polifenolov ($\frac{g}{L}$) v odvisnosti od naraščajoče mase kave pri enaki količini topila za obe preizkušeni topila – etanol in DES. Takšen rezultat je bil pričakovan (hipoteza 3), saj večja količina kavnih ostankov vsebuje več razpoložljivih polifenolov za ekstrakcijo.

Pomembna razlika je bila opažena pri ekstrakciji z DES, kjer se je pri 1,1 g kavnih ostankov koncentracija ekstrahiranih polifenolov zmanjšala v primerjavi z 0,9 g. Nasprotno pa je ekstrakcija z etanolom pri 1,1 g kavnih ostankov še vedno prinesla višjo koncentracijo polifenolov. To nakazuje, da DES hitreje doseže nasičenost, kar omejuje njegovo ekstrakcijsko zmogljivost pri večjih masah kavnih ostankov, medtem ko etanol ostaja učinkovit.

Pri uporabi različnih mas kavnih ostankov je etanol dosegel višjo učinkovitost ekstrakcije polifenolov kot DES. Najboljši rezultat ekstrakcije z etanolom je bil dosežen pri 0,5 g kavnih ostankov pri 60 °C, kjer je razmerje med maso polifenolov in maso uporabljenih kavnih ostankov znašalo 1,047 %. Pri ekstrakciji z DES je bila najvišja dosežena vrednost 0,883 % pri 0,7 g kavnih ostankov pri 60 °C. Ti rezultati kažejo na večjo splošno učinkovitost etanola v primerjavi z DES, saj omogoča večji izkoristek ekstrakcije pri povečanem razmerju med maso kavnih ostankov in topila.

Zgornja opažanja lahko razložimo z dejstvom, da je etanol kot zmerno polarno topilo po polarnosti podoben polifenolom. Polifenoli lahko tudi tvorijo vodikove vezi z molekulami vode in etanola, kar povečuje njihovo topnost. DES raje tvori intermolekulske interakcije s svojimi sestavnimi molekulami (sečnino in holin kloridom), namesto z molekulami polifenolov, kar zmanjšuje njegovo ekstrakcijsko učinkovitost. Možno je tudi, da je razmerje med vodo in etanolom (25 % v/v) bolj optimalno za ekstrakcijo kot razmerje sestavin v DES-voda. Mešanica etanol-voda je tudi manj viskozna, kar omogoča boljše vpijanje topila v kavno usedlino in hitrejšo difuzijo polifenolov iz kavnih ostankov. Nasprotno je mešanica DES-voda gostejša in bolj viskozna kot etanol-voda, kar ovira proces prenosa polifenolov v topilo.

Zmanjšanje koncentracije ekstrahiranih polifenolov pri 1,1 g kavnih ostankov v primerjavi z 0,9 g pri uporabi DES kot topila nakazuje, da DES pri večjih masah vzorca doseže nasičenost. Odvečni polifenoli, ki se ne morejo raztopiti, se najverjetneje začnejo vezati nazaj na kavno usedlino. Nasprotno se je pri uporabi etanola koncentracija polifenolov pri 1,1 g še vedno povečala ali ostala enaka, kar kaže na večjo zmogljivost etanola za raztapljanje polifenolov.

3.3.2. Vpliv temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenolov

Pridobljeni rezultati koncentracij polifenolov v odvisnosti od temperature ekstrakcije (prikazani v tabelah 5 in 7 ter grafih 7, 8, 11 in 12) kažejo, da se koncentracija polifenolov in razmerje med maso polifenolov ter maso uporabljenih kavnih ostankov povečujeta z naraščajočo temperaturo ekstrakcije pri obeh topilih. Pri DES se ta trend nadaljuje do najvišje testirane temperature (60 °C), medtem ko pri etanolu koncentracija polifenolov pri 60 °C nekoliko upade v primerjavi z vrednostjo 50 °C. To nakazuje, da morda obstaja optimalna temperatura ekstrakcije, po kateri se učinkovitost ekstrakcije z etanolom začne rahlo zmanjševati, medtem ko se učinkovitost ekstrakcije z DES še naprej izboljšuje.

Ta padec pri etanolu nakazuje na možen obstoj optimalne temperature ekstrakcije. Znižana učinkovitost ekstrakcije pri višjih temperaturah pa bi lahko bila tudi posledica nižjega vrelišča etanola (78 °C; U.S. National Library of Medicine, 2025) v primerjavi z DES (več kot 130 °C; Arriaga & Aizpuru, 2019). Čeprav ekstrakcija ni potekala pri temperaturi višji od 60 °C, se hitrost izhlapevanja etanola pri tej temperaturi bistveno poveča. To bi lahko spremenilo razmerje med vodo in etanolom v topilu, kar bi znižalo učinkovitost ekstrakcije. DES ima višjo temperaturo vrelišča, kar pomeni, da bistveno manj izhlapeva pri isti temperaturi, kar omogoča stabilno in izboljšano ekstrakcijo.

Splošno povečanje učinkovitosti ekstrakcije pri višjih temperaturah pripisujemo več dejavnikom. Višje temperature oslabijo vodikove vezi med polifenoli ter molekulske sile, ki zadržujejo polifenole v matriki kave. Z višjo temperaturo se zmanjša tudi viskoznost DES, kar omogoča lažjo difuzijo polifenolov v topilo. Poleg tega se pri višjih temperaturah poveča kinetična energija molekul, kar dodatno pospeši proces ekstrakcije

3.3.3. Primerjava etanola in DES kot topila za ekstrakcijo polifenolov

Ekstrakcija z etanolom je bila v vseh primerih učinkovitejša od ekstrakcije z DES, z največjo razliko pri 50 °C, kar kaže na to, da je etanol v splošnem boljše topilo za ekstrakcijo polifenolov iz kavnih ostankov. Kljub temu se učinkovitost DES pri višjih temperaturah izboljša in postane potencialno uporabna alternativa.

Da bi topilo DES predstavljalo učinkovito alternativo etanolu, je potrebno raziskati tudi potencialne metode regeneracije tega topila, saj je glavni cilj ekstrakcije polifenolov njihova nadaljnja uporaba. Etanol se po ekstrakciji običajno regenerira s preprosto destilacijo, vendar je treba upoštevati, da so polifenoli občutljivi na višje temperature (Volf et al., 2014). Zato je priporočljivo uporabiti destilacijo pod znižanim tlakom ali izparevanje pod znižanim tlakom z uporabo rotacijskega uparjalnika (rotavapor).

Za regeneracijo DES obstajajo tri glavne metode: ponovna ekstrakcija (angl. back extraction), protitopilska kristalizacija (angl. antisolvent crystallization) in adsorpcijska kromatografija (angl. adsorption chromatography) z mikroporozno smolo. V nekaterih primerih, zlasti pri uporabi NADES (naravnih globokih evtektičnih topil) kot ekstrakcijskega topila, regeneracija ni nujna. NADES se lahko uporabljajo kot sistemi za shranjevanje in stabilizacijo polifenolov ali kot formulacijski sistemi za distribucijo polifenolov v zdravilih in kozmetičnih izdelkih. Kadar je regeneracija zaželeno, je mogoče DES reciklirati z uporabo ultrafiltracije, pri čimer se učinkovitost topila ne spremeni. Zato vemo, da je uporaba DES kot topila za ekstrakcijo polifenolov dobra alternativa drugim topilom za pridobivanje teh bioaktivnih snovi, saj se lahko topilo tudi ponovno uporabi (Zhou et al., 2023).

Ponovna ekstrakcija je metoda ločevanja snovi v vodni raztopini, kjer se snov raztopi v topilu, v katerem je še bolj topna. Ta metoda je razmeroma enostavna in ohranja celovitost polifenolov, vendar je zaradi nepopolnega prenosa lahko manj učinkovita (Fele Žilnik & Likozar, 2019).

Protitopilska kristalizacija je metoda, pri kateri se začetni mešanici doda topilo, v katerem je topljenec netopen, da bi zmanjšali topnost. Ta metoda omogoča pridobitev polifenolov visoke čistosti, vendar lahko pride do izgub, če pogoji kristalizacije niso optimalni (RM@Schools, n.d.).

Adsorpcijska kromatografija je oblika tekočinske kromatografije, pri kateri se snovi ločujejo glede na svoje lastnosti adsorpcije na stacionarni fazi z uporabo mikroporozne smole. Ta metoda ponuja visoko selektivnost, vendar zahteva dodatne korake obdelave in skrbno izbiro adsorbentov (Rifai et al., 2018).

Vsaka od teh metod ima prednosti in slabosti. Kljub temu je protitopilska kristalizacija najbolj primerna za industrijsko uporabo, saj omogoča pridobitev polifenolov z visoko čistostjo in je najlažja za izvedbo.

3.3.4. Razlaga hipotez

Prva hipoteza, ki smo jo postavili pred začetkom raziskovanja, je trdila, da se bo z daljšim časom ekstrakcije učinkovitost ekstrakcije povečala. Ta hipoteza je bila zavrnjena, saj pri spreminjanju časa ni bilo opaziti pomembnih sprememb v koncentraciji polifenolov. Opažene so bile le manjše razlike, ki niso sledile določenemu trendu in jih lahko prepisemo merilni negotovosti ter morebitnim eksperimentalnim napakam. Razmerje med maso ekstrahiranih polifenolov in maso uporabljenih kavni ostankov kaže na stabilnost ekstrakcije. To nakazuje,

da čas ne vpliva na učinkovitost ekstrakcije polifenolov pri konstantni temperaturi in količini suhih kavnih ostankov. Verjeten razlog za to je, da se polifenoli raztopijo že v zelo kratkem času (manj kot 5 min), zato podaljševanje ekstrakcijskega časa po tej točki ne prispeva pomembno k povečanju njihove količine.

Druga hipoteza je trdila, da se bo učinkovitost ekstrakcije povečala z višjo temperaturo ekstrakcije. To hipotezo lahko potrdimo, saj se je pri obeh topilih pojavil trend naraščanja koncentracije ekstrahiranih polifenolov z višanjem temperature. Iz rezultatov lahko sklepamo, da obstaja tudi mejna vrednost temperature do katere se učinkovitost ekstrakcije večja. Ta je verjetno odvisna od lastnosti topila, njegovega vrelišča ter viskoznosti.

Tretja hipoteza je predvidevala, da se bo učinkovitost ekstrakcije povečala z večjo količino uporabljenih kavnih ostankov, vendar le do določene mere. To hipotezo lahko potrdimo, saj so rezultati pokazali, da se pri ekstrakciji z DES učinkovitost začela zmanjševati po določeni količini uporabljenih kavnih ostankov, oziroma da je topilo doseglo nasičenje.

Četrta hipoteza, ki je trdila, da bo uporaba etanola kot topila za ekstrakcijo polifenolov bolj učinkovita kot uporaba globokega evtektičnega topila, je bila potrjena. V večini primerov je bila koncentracija ekstrahiranih polifenolov z etanolom višja kot pri ekstrakciji z DES, še posebej pri ekstrahiranih z večjimi količinami kavne usedline. To lahko pripišemo podobnosti v polarnosti med etanolom in polifenoli ter nižji viskoznosti etanola v primerjavi z DES. Vendar pa se je DES izkazal za učinkovitejše topilo pri višjih temperaturah.

4. ZAKLJUČEK

Kava, kot ena najpogosteje uživanih pijač na svetu, ustvari veliko količino organskih odpadkov, ki še vedno vsebujejo številne koristne spojine. Zaradi velikega potenciala teh ostankov je optimizacija ponovne uporabe ključnega pomena za uresničevanje ciljev krožnega gospodarstva. Kavni ostanki vsebujejo veliko polifenolov, znanih po svojih močnih antioksidativnih lastnostih, ki se lahko uporabijo v farmaciji, kozmetiki in drugih industrijah. Zato smo se odločili raziskati potencial ekstrakcije polifenolov iz kavni ostankov. Ob tem je pomembno tudi, da običajna organska topila, ki se pogosto uporabljajo za ekstrakcijo bioaktivnih spojin, predstavljajo okoljsko tveganje kot onesnaževalci. V tej raziskavi smo zato primerjali učinkovitost ekstrakcije z etanolom in z globokim evtektičnim topilom (DES), ki velja za okolju prijaznejšo alternativo

Raziskovalni parametri ekstrakcije so bili čas ekstrakcije (5, 10, 15, 20, 25 minut), masa uporabljenih kavni ostankov (0,3 g, 0,5 g, 0,7 g, 0,9 g, 1,1 g) in temperatura ekstrakcije (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C). Ekstrakcijo smo izvedli z obema topiloma. Analizo vzorcev smo izvedli s spektrofotometrično metodo z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta, pri čemer so bili rezultati izraženi kot ekvivalenti galne kisline (GAE) v % suhe mase. Metodologijo smo izbrali na podlagi obstoječih raziskav o ekstrakciji bioaktivnih spojin s topili etanol–voda in DES–voda

Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da je mešanica etanol–voda učinkovitejše topilo za ekstrakcijo polifenolov iz uporabljenih kavni ostankov v primerjavi z DES iz sečnine in holin klorida (2:1). Etanol je pri različnih masah in temperaturah zagotavljal višje koncentracije polifenolov ter višje razmerje med maso ekstrahiranih polifenolov in maso uporabljenih kavni ostankov. Vendar se je DES izkazal za učinkovitejšega pri višjih temperaturah. Največja učinkovitost ekstrakcije z etanolom je bila dosežena pri 50 °C, vendar je pri 60 °C rahlo upadla, kar lahko pripišemo nižjemu vrelišču etanola. Nasprotno pa je učinkovitost DES naraščala tudi nad 50 °C, kar nakazuje, da je DES primernejše topilo za ekstrakcijo pri višjih temperaturah. Kljub temu je DES dosegel nasičenje pri manjši količini kave kot etanol, kar kaže na omejitve v njegovi topnosti. Zato se etanol-voda izkaže za boljše topilo pri nižjih temperaturah.

Na podlagi rezultatov so optimalni pogoji ekstrakcije s topilom etanol-voda:

- 1,1 g uporabljenih kavni ostankov;
- Temperatura ekstrakcije: 50 °C.

Optimalni pogoji za ekstrakcijo z DES (sečnina:holin klorid 2:1):

- 0,9 g uporabljenih kavnih ostankov;
- Temperatura ekstrakcije: višja ali enaka 60 °C.

Kljub večji splošni učinkovitosti ekstrakcije z etanolom, je ekstrakcija z DES dosegla primerljive in v določenih pogojih celo višje koncentracije polifenolov, zlasti pri višjih temperaturah. kjer je celo preseгла učinkovitost mešanice etanol-voda. To kaže, da je DES učinkovito in potencialno trajnostno topilo za ekstrakcijo polifenolov iz kave, predvsem v primerih, ko je uporaba etanola omejena

V prihodnjih raziskavah bi bilo smiselno preučiti vpliv spreminjanja razmerja med sečnino in holin kloridom na učinkovitost ekstrakcije, kot tudi raziskati druge vrste evtektičnih topil. Poleg tega bi bilo zanimivo optimizirati ekstrakcijo drugih organskih snovi, kot je kofein, ter opraviti analizo pridobljenih polifenolov, da bi natančneje določili njihovo sestavo in razmerje. Prav tako bi bilo koristno primerjati rezultate z ekstrakcijo iz sveže, neuporabljene kave, da bi ugotovili, koliko polifenolov zaužijemo ob pitju kave in kako učinkovita je uporaba ostankov v primerjavi s svežo surovino.

Povečanje obsega postopka ekstrakcije iz kavnih ostankov ima potencialno industrijsko vrednost za uporabo v kozmetični, farmacevtski in živilski industriji. Postopek je dovolj preprost, da se lahko prilagodi industrijski rabi s standardno opremo, kot so reaktorji z mešalniki ali kontinuirani ekstrakcijski sistemi. Etanol ostaja praktična izbira zaradi učinkovitosti, razpoložljivosti in možnosti reciklaže z destilacijo. DES pa je zaradi biološke razgradljivosti in manjše toksičnosti posebej primeren za okoljsko bolj ozaveščena podjetja in nišne aplikacije, kjer so okoljski standardi strožji.

Uporaba kavnih ostankov kot poceni in dostopne surovine zmanjšuje stroške in podpira trajnostne proizvodne prakse. Z ustrezno optimizacijo, vključno z reciklažo topil, rekuperacijo toplote in avtomatizacijo, bi se ta postopek lahko integriral v obstoječe proizvodne linije, s čimer bi se okrepil model krožnega gospodarstva. Čeprav bi uvedba ekstrakcije v industrijskem merilu zahtevala naložbe v opremo in nadzor nad pogoji, ta strategija predstavlja privlačno možnost za podjetja, ki želijo zmanjšati količino odpadkov in ustvarjati izdelke z dodano vrednostjo.

5. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskava pomembno prispeva k trajnostnemu razvoju, saj preučuje inovativne pristope k ponovni uporabi izrabljene kavne usedline – enega glavnih virov organskih odpadkov – za zdravstvene, kozmetične in druge namene. Spodbuja ponovno uporabo pomembnih bioaktivnih spojin, ki bi bile sicer zavržene, s čimer prispeva k bolj trajnostni rabi naravnih virov. Pridobivanje polifenolov iz izrabljene kave bi zmanjšalo količino odpadkov in ponudilo okolju prijaznejšo možnost v primerjavi z njihovim pridobivanjem iz svežih rastlinskih materialov, kar bi zmanjšalo vplive na okolje, povezane s pridelavo, zbiranjem in predelavo.

Študija dodatno izpostavlja pomen uporabe okolju prijaznejših topil, kot so globoka evtektična topila, ki so biološko razgradljiva in manj škodljiva za okolje v primerjavi s konvencionalnimi organskimi topili. Z vključevanjem načel krožnega gospodarstva raziskava ponazarja, kako je mogoče industrijske odpadke pretvoriti v uporabne surovine, kar ne le spodbuja trajnost, temveč odpira tudi nove gospodarske priložnosti.

Navsezadnje prispeva k večji ozaveščenosti o trajnostni proizvodnji bioaktivnih spojin in spodbuja okoljsko odgovorno delovanje v znanstvenih in industrijskih procesih kot delu širšega trenda razvoja odgovornejšega upravljanja z viri in okolju prijaznejših tehnologij.

6. LITERATURA

1. *2024 coffee statistics: Consumption, preferences, & spending*. Full-Service Market Research Company. (n.d.). <https://www.driveresearch.com/market-research-company-blog/coffee-survey/>
2. *Antisolvent crystallization*. RM@Schools. (n.d.). https://rmschools.isof.cnr.it/wp-content/uploads/2024/02/EN_1_Antisolvent-Crystallization-TEACHER-CARD.pdf
3. Arriaga, S., & Aizpuru, A. (2019). Innovative non-aqueous phases and partitioning bioreactor configurations. *Advances in Chemical Engineering*, 299–348. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2018.12.004>
4. Belford, R. (2022, avgust 31). *11.2: Ion-Dipole forces*. Chemistry LibreTexts. https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Arkansas_Little_Rock/Chem_1403%3A_General_Chemistry_2/Text/11%3A_Intermolecular_Forces_and_Liquids/11.02%3A_Ion-Dipole_Forces
5. Bylikin, S., Horner, G., Jimenez Grant, E., & Tarcy, D. (2023). *Chemistry: Course companion. 2023 edition*. Oxford University Press.
6. Department of Health & Human Services. (2001, april 23). *Antioxidants*. Better Health Channel. <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/healthyliving/antioxidants>
7. Encyclopædia Britannica, inc. (2024, December 6). *Urea*. Encyclopædia Britannica. <https://www.britannica.com/science/urea>
8. Fele Žilnik, L., & Likozar, B. (2019). Back-extraction process operation and modeling through thermodynamic equilibrium solubility of valeric acid in aqueous and organic phase mixtures. *Separation and Purification Technology*, 222, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.04.033>
9. Frauenkron, M., Melder, J., Ruider, G., Rossbacher, R., & Höke, H. (2001). Ethanolamines and propanolamines. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.a10_001
10. The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (n.d.). *Quaternary ammonium compounds (Q05003)*. IUPAC. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/Q05003>
11. *Kako izgleda Spekter Elektromagnetnega sevanja različnih sijalk?*. Porabimanj INFO. (2023, julij 25). <https://www.porabimanj.info/vidna-svetloba/>
12. King, A. (2025, januar 2). *What is a UV-vis spectrophotometer?*. DeNovix. <https://www.denovix.com/what-is-a-uv-vis-spectrophotometer/>
13. Liang, N., & Kitts, D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
14. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
15. *Miscible definition & meaning*. Merriam-Webster. (n.d.). <https://www.merriam-webster.com/dictionary/miscible>

16. Murthy, P. S., & Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
17. Nguyen, N. Q., Nguyen, M. T., Nguyen, V. T., Le, V. M., Trieu, L. H., Le, X. T., Khang, T. V., Giang, N. T., Thach, N. Q., & Hung, T. T. (2020). The effects of different extraction conditions on the polyphenol, flavonoids components and antioxidant activity of *polyscias fruticosa* roots. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 736, 022067. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/736/2/022067>
18. Nichols, L. (2022, april 7). 4.2: Overview of Extraction. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/04:_Extraction/4.02:_Overview_of_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04:_Extraction/4.02:_Overview_of_Extraction)
19. Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The chemistry behind the Folin–CIOCALTEU method for the estimation of (poly)phenol content in food: Total phenolic intake in a Mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
20. Quideau, S. (2013). Plant polyphenols. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001913.pub2>
21. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical Properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
22. Rifai, N., Horvath, A. R., Wittwer, C., & Hoofnagle, A. N. (2018). *Principles and applications of clinical mass spectrometry: Small molecules, peptides, and pathogens*. Elsevier.
23. Russel, S. (2019). *Dietary Polyphenols and Their Perceived Health Benefits* (thesis). DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln, Lincoln.
24. Shumilin, I., Tanbuz, A., & Harries, D. (2023). Deep eutectic solvents for efficient drug solvation: Optimizing composition and ratio for solubility of β -cyclodextrin. *Pharmaceutics*, 15(5), 1462. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051462>
25. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 152–178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
26. Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESS) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
27. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Choline chloride*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Choline-Chloride>
28. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Ethanol*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>
29. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Gallic acid*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-Acid>

30. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Sodium carbonate*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Carbonate>
31. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Urea*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Urea>
32. U.S. National Library of Medicine. (2025). *Water*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/water>
33. UT Dallas. (n.d.). Electron delocalization and resonance. https://personal.utdallas.edu/~scortes/ochem/OChem1_Lecture/Class_Materials/06_electr_delocal_res.pdf
34. Volf, I., Ignat, I., Neamțu, M. & Popa, V. (2014). *Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols*. Chemical Papers. <https://doi.org/68.10.2478/s11696-013-0417-6>.
35. Vollhardt, K. P. C., & Schore, N. E. (2007). *Organic Chemistry: Structure and Function*. Freeman.
36. Wang, Y., Zhang, J., Du, C., Jin, Y., Wu, X., He, K., Yang, Y., & Li, X. (2024). Effects of charge-assisted hydrogen bond on sorption and co-sorption of pharmaceutical contaminants on carbonaceous materials: Spectroscopic and theoretical studies. *Science of The Total Environment*, 908, 168375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168375>
37. Zhou, M., Fakayode, O. A., & Li, H. (2023). Green extraction of polyphenols via deep eutectic solvents and assisted technologies from agri-food by-products. *Molecules*, 28(19), 6852. <https://doi.org/10.3390/molecules28196852>

7. VIRI SLIK

Slika 1: *Chemical structure of resveratrol*. (2011). Foodwatch. Pridobljeno 9.02.2025, na <https://foodwatch.com.au/blog/super-foods/item/top-100-polyphenols-what-are-they-and-why-are-they-important.html>.

Slika 3: *Redox reaction of Folin-Ciocalteu Reagent*. (2023). National Library of Medicine. Pridobljeno 9.02.2025, na <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10682990/>.

Slika 4: *Gallic acid*. (n.d.). MP Biomedicals. Pridobljeno 9.02.2025, na <https://www.mpbio.com/in/gallic-acid>.

Slika 5: *Angular or bent shape of water (H₂O)*. (n.d.). Shutterstock. Pridobljeno 9.02.2025, na <https://www.shutterstock.com/search/h2o-molecule-104-5>.

Slika 6: *3D Conformer, ball and stick ethanol model*. (2025). Pridobljeno 9.02.2025, na <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>.

Slika 7: *Chemical structure of choline chloride and urea*. (n.d.) Pridobljeno 9.02.2025, na https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-a-choline-chloride-and-b-urea_fig1_328891728.

8. PRILOGE

γ [$\frac{g}{L}$]	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Abs [AU]	0,007	0,080	0,144	0,253	0,365	0,471

Tabela 1: Absorbanca galne kisline v vodi

γ [$\frac{g}{L}$]	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Abs [AU]	- 0,005	0,072	0,076	0,145	0,329	0,517

Tabela 2: Absorbance vzorcev različnih koncentracij galne kisline v DES

t [min]	5	10	15	20	25
Abs [AU]	0,172	0,165	0,171	0,176	0,167
γ [$\frac{g}{L}$]	0,199	0,191	0,198	0,203	0,194
Γ [g/L]	0,0597	0,0573	0,0594	0,0609	0,0582
M [g]	0,0030	0,0029	0,0030	0,0030	0,0029
ΔM [%]	0,995	0,955	0,990	1,015	0,970

Tabela 3: Vpliv časa na ekstrakcijo polifenolov s topilom etanol-voda

	m(kave) [g]					T [°C]				
	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	20	30	40	50	60
Abs ₁ [AU]	0,171	0,253	0,328	0,485	0,524	0,409	0,467	0,517	0,562	0,524
Abs ₂ [AU]	/	0,311	0,380	0,382	0,531	0,398	0,416	0,520	0,541	0,531
Abs ₃ [AU]	/	0,375	0,394	0,431	0,562	0,442	0,437	0,459	0,544	0,562
$\frac{Abs}{[AU]}$	0,171	0,313	0,367	0,433	0,539	0,416	0,440	0,499	0,549	0,539

Tabela 4: Absorbance vzorcev z različnimi masami uporabljenih kavnih ostankov in različnimi temperaturami ekstrakcije z uporabo topila etanol-voda

	m(kave) [g]					T [°C]				
	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	20	30	40	50	60
$\frac{Abs}{[AU]}$	0,171	0,313	0,367	0,433	0,539	0,416	0,440	0,499	0,549	0,539

$Y \left[\frac{g}{L}\right]$	0,198	0,349	0,406	0,477	0,590	0,459	0,485	0,548	0,601	0,590
$\Gamma \left[\frac{g}{L}\right]$	0,059	0,105	0,122	0,143	0,177	0,138	0,146	0,164	0,180	0,177
M [g]	0,00297	0,00524	0,00609	0,00716	0,00885	0,00689	0,00728	0,00822	0,00902	0,00885
ΔM [%]	0,990	1,047	0,870	0,795	0,805	0,626	0,661	0,747	0,820	0,805

Tabela 5: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov in temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije s topilom etanol-voda

	m(kave) [g]					T [°C]				
	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	20	30	40	50	60
Abs₁ [AU]	0,067	0,173	0,311	0,432	0,450	0,269	0,354	0,229	0,360	0,450
Abs₂ [AU]	0,089	0,170	0,387	0,451	0,421	0,340	0,268	0,488	0,412	0,421
$\frac{Abs}{AU}$	0,078	0,172	0,349	0,442	0,436	0,305	0,311	0,359	0,386	0,436

Tabela 6: Absorbance vzorcev z različnimi masami uporabljenih kavnih ostankov in različnimi temperaturami ekstrakcije z uporabo topila DES

	m(kave) [g]					T [°C]				
	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	20	30	40	50	60
$\frac{Abs}{AU}$	0,078	0,172	0,349	0,442	0,436	0,305	0,311	0,359	0,386	0,436
$Y \left[\frac{g}{L}\right]$	0,137	0,233	0,412	0,506	0,500	0,368	0,374	0,422	0,450	0,500
$\Gamma \left[\frac{g}{L}\right]$	0,0411	0,0699	0,124	0,152	0,150	0,110	0,112	0,127	0,135	0,150
M [g]	0,00206	0,00350	0,00618	0,00759	0,00750	0,00552	0,00561	0,00633	0,00675	0,0075
ΔM [%]	0,685	0,699	0,883	0,843	0,682	0,502	0,510	0,575	0,614	0,682

Tabela 7: Vpliv mase uporabljenih kavnih ostankov in temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije z DES