

Proantocianidini v ekstraktih grozdnih pešk

Raziskovalno področje: KEMIJA ali KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Avtor: Sofija HOJNIK, Hana ROZMAN

Mentor na šoli: dr. Boris Zmazek

Mentorici s FKKT: prof. dr. Maša Knez Marevci

dr. Taja Žitek Makoter

Šola: Gimnazija Ptuj

GIMNAZIJA PTUJ

Proantocianidini v ekstraktih grozdnih pešk

Raziskovalno področje: KEMIJA ali KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Šolsko leto: 2024/25

ZAHVALA

Zahvaljujeva se svojemu mentorju na Gimnaziji Ptuj, prof. Borisu Zmazku, za neprecenljivo podporo, usmerjanje in pomoč pri celotnem raziskovalnem procesu. Zahvaljujeva se tudi laborantki za kemijo, ge. Mojci Čeh, za pomoč v laboratoriju. Iskreno se zahvaljujeva tudi mentoricama na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Mariboru, prof. dr. Maši Knez Marevci in dr. Taji Žitek Makoter, za strokovno pomoč in pomoč pri spektrofotometrični analizi ekstraktov.

KAZALO VSEBINE

ABSTRACT.....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 Namen naloge	2
1.2 Raziskovalno vprašanje	2
1.3 Hipoteza in razlaga hipoteze	2
2. TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1 Grozdne peške	3
2.2 Antioksidanti	4
2.2.1 Polifenoli	5
2.2.1.1 Fenolne kisline	5
2.2.1.2 Flavonoidi.....	6
2.2.1.3 Polifenolni amidi	11
2.2.1.4 Ostali polifenoli	12
2.3 Antioksidanti v grozdju	12
2.4 Organogeli.....	13
3. METODE DELA.....	15
3.1 Priprava materiala.....	15
3.1.1 Liofilizacija.....	15
3.1.2 Mletje	15
3.2 Ekstrakcijske metode	15
3.2.1 Topla maceracija	16
3.2.2 Ekstrakcija po Soxletu	16
3.2.3 Ultrazvočna ekstrakcija	18
3.3 Odstranjevanje topila.....	18
3.4 Spektrofotometrične metode za določanje fenol v grozdju	18
3.5 Organogeli.....	19
4. EKPERIMENTALNO DELO.....	21
4.1 Priprava materiala.....	21
4.1.1 Aparature in materiali.....	21
4.1.2 Sušenje in mletje.....	21
4.1.3 Ekstrakcija s toplo maceracijo.....	21
4.1.4 Ekstrakcija po Soxhletu	22
4.1.5 Ultrazvočna ekstrakcija	22
4.2 Določanje vsebnosti proantocianidinov.....	22
4.2.1 Aparature in materiali.....	22
4.2.2 Spektrometrično določanje vsebnosti proantocianidinov v vzorcih.....	23
4.3 Priprava ekstrakta za organogel.....	24
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
5.1 Ekstrakcija	25
5.2 Določanje proantocianidov	25
6. ZAKLJUČEK	28
7. LITERATURA	29

KAZALO SLIK

Slika 1. Razdelitev antioksidantov.....	4
Slika 2. Derivati benzojske kisline.....	5
Slika 3. Derivati cimetine kisline.....	5
Slika 4. 2-fenilbenzopiran.....	6
Slika 5. Predstavniki tipičnih izoflavonov in neoflavonov, ki jih najdemo v hrani.....	7
Slika 6. Predstavniki kalkonov. ⁴⁴	7
Slika 7. Kemijske strukture flavanolov, flavanonov, flavonov in flavananolov. ⁴⁴	8
Slika 8. Trimerni propelargonidin.....	9
Slika 9. Flavanoli in procianidini. ⁴⁴	9
Slika 10. Tipični procianidini dimeri in teaflavin kot trimer. ⁴⁴	10
Slika 11. Kemijska struktura antocianidinov s flavilijevim kationom in antocianinov z vezano glukozo.	11
Slika 12. Polifenolni amidi.	11
Slika 13. Nekateri drugi polifenoli.	12
Slika 14. Soxhletov aparat deluje na principu povratnega hlajenja topila.	17
Slika 15. Rotavapor oz. vakuumski uparjalnik.	18
Slika 16. Prikaz absorpcije dela vpadne svetlobe (I_0) v vzorcu in prepuščene svetlobe (I).	19
Slika 17. Vzorci z ekstrakti pripravljene za merjenje koncentracije PAC.....	23
Slika 18. Prikaz deleža PAC v mg na gram ekstrakta za vse tri metode ekstrakcije: SOX- ekstrakcija po Soxhletu, UZ ultrazvočna ekstrakcija in TM – topla maceracija.	27
Slika 19. Kapsule z ekstraktom	24

POVZETEK

Grozdne peške, ki nastanejo kot stranski produkt pri pridelavi vina, so lahko dragoceni vir zdravilnih učinkovin. Njihova uporaba lahko pripomore k bolj trajnostnemu gospodarjenju. Bogate so s proantocianidini (PAC), bioaktivnimi spojinami z antioksidativnimi lastnostmi. Cilj najine naloge je bil primerjati učinkovitost različnih ekstrakcijskih metod za pridobivanje PAC iz grozdnih pešk. Uporabili sva toplo maceracijo, z ekstrakcijo po Soxhletu in ultrazvočno ekstrakcijo s 70 % etanolom. Vsebnost PAC v ekstraktih sva določili spektrofotometrično. Rezultati so pokazali, da je ultrazvočna ekstrakcija pri 40 °C zagotovila najvišji delež PAC v ekstraktu. Sledila je ekstrakcija po Soxhletu, medtem ko je bila topla maceracija (pri 60 °C) najmanj učinkovita. Naši rezultati kažejo, da je ultrazvočna ekstrakcija obetavna metoda za pridobivanje PAC iz grozdnih pešk. Prihodnje raziskave bi se morale osredotočiti na optimizacijo ekstrakcijskih parametrov, kot so temperatura, čas ekstrakcije in vrsta topila, za še večji izkoristek PAC ter na potencialno uporabo pridobljenih ekstraktov v živilski in farmacevtski industriji.

Ključne besede: grozdne peške, proantocianidini, ekstrakcija, ultrazvok, Soxhletov ekstraktor, topla maceracija

ABSTRACT

Grape seeds, which are a byproduct of wine production, can be a valuable source of health-promoting ingredients. Their use can contribute to more sustainable management. They are rich in proanthocyanidins (PACs), bioactive compounds with antioxidant properties. The aim of our study was to compare the effectiveness of different extraction methods for obtaining PACs from grape seeds. We used hot maceration, Soxhlet extraction, and ultrasound-assisted extraction with 70% ethanol. The PAC content in the extracts was determined spectrophotometrically. The results showed that ultrasound-assisted extraction at 40 °C provided the highest proportion of PACs in the extract. This was followed by Soxhlet extraction, while hot maceration (at 60 °C) was the least effective. Our results indicate that ultrasound-assisted extraction is a promising method for obtaining PACs from grape seeds. Future research should focus on optimizing extraction parameters such as temperature, extraction time, and solvent type for even greater PAC yield, and on the potential use of the obtained extracts in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: grape seeds, proanthocyanidins, extraction, ultrasound, Soxhlet extractor, hot macerate

1. UVOD

Vinska trta spada v družino *Vitaceae*. Po do sedaj znanih raziskavah naj bi trto gojili na Kavkazu že pred 4000 leti, na današnji tromeji med Turčijo, Rusijo in Iranom. Od tam naj bi se tudi razširila po celem svetu. Po pridelanih količinah sodi grozdje med svetovne prvake in prekaša skupni pridelek banan, pomaranč in jabolk, vendar gre večina za pridelavo vina. Glavni svetovni proizvajalci grozdja so ZDA, Kitajska, Italija in Evropa.¹

Grozdje velja za eliksir mladosti, ima čistilne, zdravilne in krepčilne učinke na telo. Že v stari Grčiji so liste in sok vinske trte uporabljali v tradicionalnem zdravljenju.² Evropski ljudski zdravilci so naredili mazilo iz soka vinske trte, ki so ga uporabljali za zdravljenje kožnih in očesnih bolezni. Grozdne liste so uporabljali za zaustavljanje krvavitev in vnetij. Nezrele grozdne jagode so bile uporabljene za zdravljenje angine, rozine pa so uporabljali pri zaprtjih in za žejo. Zrele grozdne jagode so uporabljali za zdravljenje različnih zdravstvenih težav, kot so vnetje oči, kože, ledvic in bolezni jeter.³

Nekatere sorte imajo v jagodah semena ali peške, druge pa so brez njih. Pri jagodah so užitne tudi kožica in peške, čeprav ljudje pogosto mislijo, da je žvečenje pečk škodljivo. Med tisočermi sortami vinske trte je le okoli 20 takšnih, ki dajejo veliko večino pridelka namiznega grozdja, namenjenega prehrani.⁴

Grozdje vsebuje veliko sladkorjev, predvsem sadnega (fruktoza) in grozdnega (glukoza), vitaminov skupine B, C in E ter številne minerale, zlasti kalij, fosfor, mangan, železo, kalcij in magnezij. Prehransko najučinkovitejše so rdeče, torej temno vijoličaste sorte grozdja s čim temnejše obarvano lupino.⁵ Poleg tega, da je grozdje bogat vir vitaminov in vlaknin, sta kožica in semena grozdja izjemno bogata s polifenoli.

Polifenoli so naravno prisotna mikrohranila, ki jih rastline nujno potrebujejo za svoj obstoj.⁶ Večina polifenolov sodi med močne antioksidante,^{7,8} imajo pa lahko tudi protivnetne učinke.^{9,10} Ravno to je pritegnilo pozornost številnih raziskovalcev, ki so dokazali njihovo potencialno vlogo pri preprečevanju in zdravljenju različnih patoloških stanj, povezanih z oksidativnim stresom in vnetnimi procesi¹¹. Mednje sodijo močno razširjene bolezni, kot so: rak¹², srčno-žilne in nenazadnje tudi nevrodegenerativne bolezni¹³.

Nekatere raziskave so v preteklosti pokazale, da ima prehrana lahko ključno vlogo pri ohranjanju zdravja, kar je sprožilo razvoj cele vrste prehranskih dopolnil.¹⁴ Zanimivo je, da so nekateri polifenoli značilni samo za določeno sadje ali zelenjavo, medtem ko večino lahko najdemo v več virih.¹⁵ Večina sadja in zelenjave vsebuje več kot eno značilno vrsto polifenolov.¹⁶ Tako je v kožicah grozdnih jagod več prisotnih antocianinov, medtem ko je v grozdnih peškah prisotni več kondenziranih taninov, imenovanih proantocianidini oziroma flavan-3-oli.¹⁷

Količina polifenolov je v isti rastlini lahko različna in je odvisna od posameznega dela rastline, klimatskih in rastnih razmer.¹⁸ Zato je težko oceniti dejansko količino naravno zaužitih polifenolov, kar je treba upoštevati, ko govorimo o pozitivnih učinkih polifenolov na naše zdravje.

Industrija se je v zadnjem času začela zanimati tudi za stranske produkte, ki nastanejo pri predelavi sadja in zelenjave (npr. oljčne pogače, čebulni listi, tropine, grozdne peške ipd.), saj so lahko bogat vir polifenolov in jih zato lahko uporabimo kot dodatke v funkcionalnih živilih ali kot prehranska dopolnila.¹⁸

Ker sva obe doma iz vinorodnih krajev, se vsako leto srečujeva z velikimi količinami grozdnih pešk, ki predstavljajo odpadke pri pridelavi vina. Zanimalo naju je, kako bi lahko te peške koristno uporabile za nadaljnjo uporabo.

1.1 Namen naloge

Namen najine raziskovalne naloge je preučiti možnosti uporabe grozdnih pečk kot surovine za izdelavo kreme za kožo ali kot prehranski dodatek v obliki tablet ali kapsul. Grozdne peške so namreč bogat vir bioaktivnih snovi, zlasti polifenolov, ki imajo antioksidativne lastnosti, ki delujejo zdravilno.

V nalogi želiva ugotoviti vsebnost antioksidantov, predvsem proantocianidinov v peškah treh rdečih sort grozdja: jurka, kvinton in izabela. Želiva ugotoviti najboljši način za ekstrakcijo bioaktivnih snovi iz grozdnih pešk. V ta namen sva uporabile tri različne metode ekstrakcije. Pridobljene ekstrakte sva uporabili za pripravo organogelov in pripravo kapsul kot prehranski dodatek bogat z antioksidanti. Topilo, ki sva ga uporabljale za ekstrakcijo, sva po ločevanju ekstrakta lahko ponovno uporabili. Tako sva poskrbeli, da v najinem procesu ni bilo škodljivih odpadnih snovi.

S tem raziskovalnim delom sva želeli pokazati, kako je mogoče naravne vire, ki predstavljajo zgolj stranski produkt oziroma odpadke, uporabiti za zdravje koristne produkte.

1.2 Raziskovalno vprašanje

Kako lahko bioaktivne sestavine pridobimo in kako se te sestavine lahko vključijo v koristne produkte iz grozdnih pečk ter katera metoda ekstrakcije je najučinkovitejša.

1.3 Hipoteza in razlaga hipoteze

Za ekstrakcijo proantocianidov bova uporabljali različne metode ekstrakcije. Sklepava, da se bo pri različnih metodah izločila različna količina proantocianidov. Predvidevava, da bo ultrazvočna ekstrakcija najučinkovitejša, saj ultrazvočno valovanje deluje na celične membrane, to pa pomeni boljše izločanje bioaktivnih snovi in lažji stik teh snovi s topilom. Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom bo verjetno učinkovitejša od same maceracije, ker se v Soxhletovem aparatu topne snovi v topilu odstranjujejo in shranjujejo v destilirki, grozdne peške pa v ciklih prihajajo v stik s čistim topilom.

2. TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Grozdne peške

Grozdne peške se uporabljajo kot prehransko dopolnilo in vir antioksidantov. So stranski proizvod pri proizvodnji vina, melase in sadnih sokov. Gre za del grozdja z najvišjo koncentracijo fenolnih spojin in antioksidantov, takoj za samim sadjem. Poleg visoko polimeriziranih proantocianidinov grozdne peške vsebujejo katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin in galično kislino.¹⁹ Semena predstavljajo med 3 in 6 % suhe teže grozdja. Same peške vsebujejo 11 % beljakovin, 35 % vlaknin in 7 % fenolnih spojin, mednje spadajo tudi tokoferoli in β -karoten. Grozdne peške vsebujejo 28–40 % vode, 28 % celuloze, 0,8–1,2 % dušikovih spojin, 4–6 % taninov, 10–25 % olja, 2–4 % mineralnih spojin in 25–45 % lignina. Standardizirani ekstrakt grozdnih pešk vsebujejo manj kot 6 % prostih flavonolnih monomerov in 74–80 % oligomernih proantocianidinov. V ekstraktu grozdnih pešk so najdeni številne fenolne spojine.²⁰

Prisotnost proantocianidinov je lahko vzrok za hiperglikemični učinek grozdnih pešk. Ugotovili so, da imajo proantocianidini antioksidativne lastnosti. Proantocianidini, ki jih včasih imenujemo močni antioksidanti, lahko preprečujejo diabetes z ohranjanjem aktivnosti beta celic.²¹ Glavne sestavine izvlečkov iz grozdnih pešk so epikatehin, flavonoidi in katehini, ki imajo farmakološke lastnosti, vključno z protivnetnimi, protirakavimi in antioksidativnimi učinki.²² Nedavna študija je pokazala, da dopolnila z izvlečki iz grozdnih pešk, bogata s kalcijem, lahko pomagajo pri krepitvi kosti pri osebah z osteoporozo. Proantocianidini v grozdnih peškah, ki zmanjšujejo oksidativni stres in spreminjajo aktivnost citokinov, lahko zavirajo razvoj kožnega raka. Ta zaščitni učinek na celice bi bil zelo koristen pri zdravljenju Alzheimerjeve bolezni. Antioksidanti v izvlečkih iz grozdnih pešk, ki ščitijo krvne žile pred poškodbami, so verjetno odgovorni za zmanjšanje srčnega utripa in sistoličnega krvnega tlaka. Poleg tega imajo izvlečki iz grozdnih pešk lahko pomembno vlogo pri zdravljenju številnih človeških bolezni, kot so zobna gniloba, preprečevanje okužb, diabetična retinopatija, izboljšanje nočnega vida, uravnavanje krvnega sladkorja, lajšanje kronične venske insuficience, učinek proti staranju ter zmanjšanje edema in ravni železa pri hemokromatozi.²³ Proantocianidini iz semen so pokazali širok spekter koristi za zdravje.²⁴

Izvleček iz grozdnih pešk je pokazal povečano antioksidativno aktivnost, kar je bilo pričakovati glede na visoko koncentracijo skupnih fenolov. Grozdne peške so pokazale višjo antioksidativno aktivnost (82,25 %). Na splošno je antioksidativna aktivnost naraščala skupaj s skupno količino fenolov v semenu. Antioksidativna aktivnost lupin grozdja je nižja kot pri grozdnih peškah, kar nakazuje povezavo med vsebnostjo taninov in antioksidativno aktivnostjo. Hidroacetonski izvleček iz grozdnih pešk je prekašal druge preučene izvlečke glede skupne vsebnosti fenolov in flavonoidov ter je imel najboljšo sposobnost odstranjevanja DPPH radikalov*. Grozdne peške so

* DPPH je kratica za organsko kemijsko spojino 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, ki je temno obarvana kristalinični snov. Sestavljena je iz prostih radikalnih molekul in se uporablja kot test za jakost antioksidativnih lastnosti.

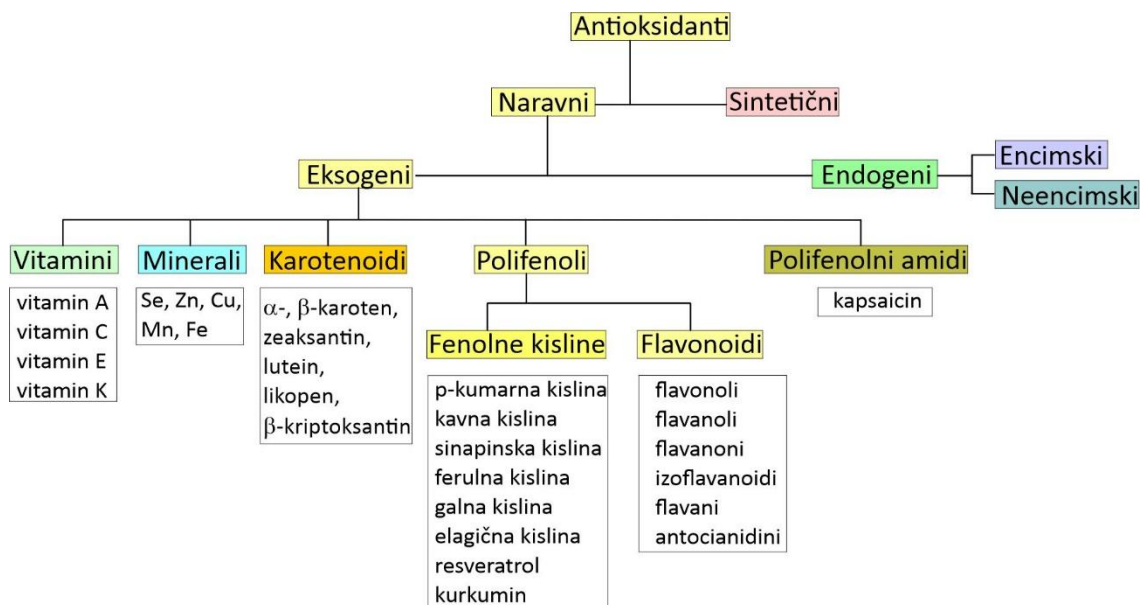
imele največjo reducirajočo moč in antioksidativno sposobnost med različnimi sortami in njihovimi deli, sledile so kožica in meso.²⁵

2.2 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo, preprečijo ali odstranijo možnost oksidativne poškodbe ciljnih molekul. Antioksidanti zmanjšujejo tudi DNA mutacije, maligne transformacije in ostale posledice celičnih poškodb. Antioksidativne lastnosti so odvisne od vrste antioksidanta, mehanizma delovanja, od njegovega sodelovanja z drugimi antioksidanti in v primeru vnosa zunanjih antioksidantov, še od njegove absorpcije v prebavilih, odmerka, pogostosti vnosa v telo, od presnove in izločanja iz telesa.^{26,27}

Antioksidanti se uporabljajo tudi v prehranskih izdelkih z namenom dosega daljšega roka uporabe, v kozmetiki za zaščito samih sestavin izdelka, podaljšanje roka uporabe in kot kozmetično aktivne sestavine, ki ščitijo kožo pred oksidativnimi poškodbami in staranjem. Uporabni so tudi v medicini, predvsem kot sredstva, ki zmanjšajo verjetnost za nastanek raka, za zdravljenje različnih bolezni jeter, nekateri pa naj bi se uporabljali tudi kot terapevtska sredstva za akutne poškodbe centralnega živčnega sistema, za upočasnitev nevrodegenerativne bolezni kot je Alzheimerjeva bolezen, za upočasnitev ateroskleroze in vseh ostalih stanj, ki so povezana z oksidativnimi poškodbami celic.^{28,29} Antioksidanti nevtralizirajo proste radikale z donacijo elektronov, kar preprečuje poškodbe tkiv in pomaga vzdrževati ravnotežje v telesu.

Čeprav so prehranski dodatki z antioksidanti na voljo, raziskave nakazujejo, da je uživanje naravne hrane bogate z antioksidanti najboljša izbira. Uravnotežena prehrana, ki vključuje sveže sadje, zelenjavo, oreščke in zelišča, je ključna za ohranjanje zdravja telesa in kože.³⁰ V nadaljevanju bova naredile pregled nad naravnimi spojinami, ki imajo lastnost antioksidanta.



Slika 1. Razdelitev antioksidantov.³¹

Antioksidante lahko razdelimo v več skupin: naravne in umetne, encimske in neencimske ter endogene in eksogene. Zadnji se nanašajo na to, ali nastajajo v telesu ali jih moramo zaužiti s hrano. Prehranske antioksidante lahko spet razdelimo v več skupin, od katerih so polifenoli in flavonoidi, največja skupina.³² Med prehranske antioksidante pa spadajo še vitamini, minerali, karotenoidi, organožveplove spojine in nekateri amidi (Slika 1).

2.2.1 Polifenoli

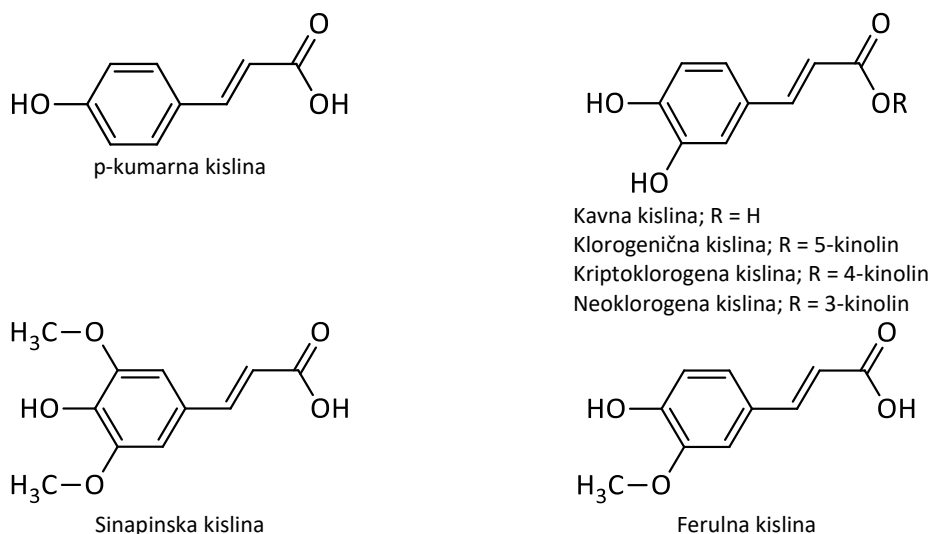
Polifenoli so ena najbolj številnih in široko razširjenih skupin naravnih produktov v rastlinskem kraljestvu. Trenutno je znanih več kot 8000 fenolnih struktur, med njimi pa je bilo identificiranih več kot 4000 flavonoidov.^{33,34} Polifenoli so naravne spojine, ki jih sintetizirajo izključno rastline, imajo močne antioksidativne lastnosti. Čeprav so polifenoli spojine zgrajene iz vsaj dveh benzenovih obročev in enega ali več hidroksilnih skupin,³⁵ je ta skupina spojin zelo raznolika in vsebuje več podskupin fenolnih spojin. Raznolikost in široka razširjenost polifenolov v rastlinah so privedle do različnih načinov kategorizacije teh naravnih spojin. Polifenoli so bili razvrščeni glede na njihov izvor, biološko funkcijo in kemijsko strukturo.³⁶ Večina polifenolov je v rastlinah v obliki glikozidov, torej vezani z različnimi sladkornimi enotami in acilnimi skupinami na različnih položajih polifenolnih skeletov. Polifenole lahko razdelimo glede na kemijsko strukturo aglikonov na fenolne kisline, flavonoide, polifenolne amide in ostale polifenole.

2.2.1.1 Fenolne kisline

Fenolne kisline so neflavonoidne polifenolne spojine, ki jih lahko nadalje razdelimo na dve glavni vrsti, derivate benzojske kisline (Slika 2.) in derivate cimetove kisline (Slika 3.). Medtem ko sadje in zelenjava vsebujeta številne proste fenolne kisline, so v žitih in semenih, zlasti v otrobih ali lupini, fenolne kisline pogosto v vezani obliki.³⁷ Te fenolne kisline je mogoče osvoboditi ali hidrolizirati le s kislino ali bazično hidrolizo ali z encimi. Med fenolnimi kislinami so pomembnejše hidroksicimete kisline: p-kumarna kislina, kavna, ferulna in sinapinska kislina. Najdemo jih lahko v skoraj vseh delih rastlin.³⁸



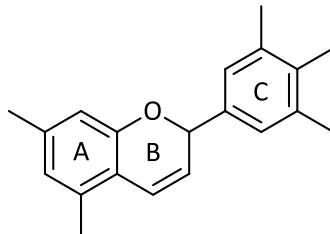
Slika 2. Derivati benzojske kisline



Slika 3. Derivati cimeteve kisline.

2.2.1.2 Flavonoidi

Flavonoidi so derivati 2-fenil-benzopirana (Slika 4.), ki je sestavljen iz pirana (obroč B), na katerega je kondenziran benzen (A), na drugem C-atomu pa je vezan benzenov obroč (C). Med sabo se razlikujejo po stopnji oksidacije piranovega obroča.



Slika 4. 2-fenilbenzopiran.

Flavonoidi imajo antikoagulacijsko, hepatoprotektivno, antibakterijsko, protivnetno, protitumorno in antioksidacijsko delovanje. Delujejo v lipidnem in hidrofilnem okolju. Reakcije v vodnem okolju jim omogočajo fenolne skupine, povezujejo pa tudi s polarnimi glavami membranskih ostankov. Na membrane se adsorbirajo z vodikovimi vezmi, ki jih tvorijo s polarnimi glavami fosfolipidov in na ta način ustvarijo okolje, ki omejuje dostop oksidantov do lipidnega dvosloja.³⁹ Ena izmed najbolj preučevanih lastnosti je njihova zmožnost obrambe pred oksidativnim stresom. Flavonoidi so namreč zaradi svojega redukcijskega potenciala do alkilnih peroksilnih radikalov idealni lovilec peroksilnih radikalov ter uspešni inhibitorji lipidne peroksidacije. Fenolne –OH skupine pa jim omogočajo tvorbo kompleksov z ioni prehodnih kovin, ki potem ne morejo vstopati v Fentonovo reakcijo, ki velja za glavni vir kisikovih zvrsti. Zaradi keliranja železovih ionov flavonoidi inhibirajo tudi od Fe^{2+} odvisno lipidno peroksidacijo.⁴⁰ Flavonoidi pa lahko intereagirajo tudi s sestavinami celice, kot so različni encimi, receptorji in transkripcijski faktorji, kar se kaže predvsem v regulaciji celičnega cikla.⁴¹

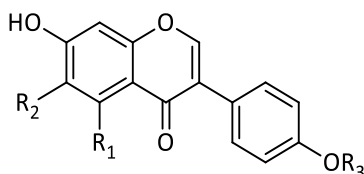
Zaradi različnega števila –OH skupin in različnega položaja le teh, je mogoče flavonoide nadalje razdeliti na različne podskupine, kot so antocianini, flavan-3-oli, flavononi, flavanoni in flavonoli. Medtem ko je v večini flavonoidov obroč C vezan na položaj C_2 obroča B, so v rastlinah najdene tudi nekateri flavonoidi, kot sta izoflavoni in neoflavonoidi, katerih obroč B je povezan na položaj C_3 oziroma C_4 obroča C. Med flavonoide uvrščamo tudi kalkone, ki pa nimajo heterocikličnega obroča C. V rastlinah so flavonoidi največkrat v glikozidni obliki, to je, da so vezani z ogljikovimi hidrati. Monosaharid se največkrat veže prek fenolne skupine na C_7 ali C_3 in nastanejo O-glikozidi. Lahko pa nastanejo tudi C-glikozidi, če se sladkorna komponenta veže na enega od ogljikovih atomov, ponavadi na C_6 ali C_8 . Sladkorna komponenta ponavadi vsebuje do tri monosaharidne enote. Najpogosteje se pojavljajo glukoza, galaktoza, ramnoza, aloza, arabinoza, ksiloza, apioza, glukoronska in galakturonska kislina.⁴² Biološke aktivnosti teh spojin, vključno z antioksidativno aktivnostjo, so odvisne tako od strukturnih razlik kot od vrste vezanih ogljikovih hidratov. Predstavljava osnovne strukture flavonoidov kot aglikone[†] (Slika 7.).

[†] Aglikon je spojina, ki ostane po tem, ko se glikozidu odstrani glikozilna skupina.

a) Izoflavoni, neoflavonoidi in kalkoni

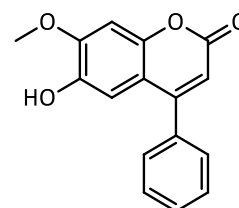
Izoflavone najpogosteje najdemo v družini stročnic. Ker so fižol, zlasti soja, pomemben del prehrane v številnih kulturah, imajo izoflavoni velik vpliv na človeško zdravje. Genistein in daidzein sta dva glavna izoflavona, ki jih najdemo v soji, skupaj z gliciteinom, biochaninom A in formononetinom (Slika 5.).⁴³ Najdemo pa jih tudi v rdeči detelji.⁴⁴ Vsi ti izoflavonski aglikoni se najpogosteje pojavljajo kot 7-O-glukozidi in 6"-O-malonil-7-O-glukozidi[‡]. Neoflavonoidi se v prehranskih rastlinah ne pojavljajo pogosto, vendar je dalbergin najbolj razširjen in relativno pogost neoflavonoid v rastlinah.

Izoflavoni



Daidzein: R₁ = H; R₂ = H; R₃ = H
 Genistein: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = H
 Glicitein: R₁ = H; R₂ = OCH₃
 Biochanin A: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = OCH₃
 Formononetin: R₁ = H; R₂ = H; R₃ = OCH₃

Neoflavon

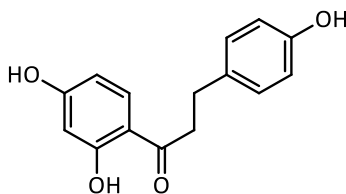


Dalbergin

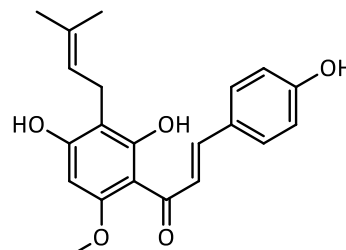
Slika 5. Predstavniki tipičnih izoflavonov in neoflavonov, ki jih najdemo v hrani.⁴⁵

Kalkone z odprtim obročem B najdemo v sadju, kot so jabolka in v hmelju ali pivu.⁴⁶ Izoflavoni imajo estrogenu podobno delovanje, zato jih lahko uporabljamo za preprečevanje raka na prostati, preprečevanje osteoporoze in za lajšanje postmenopavznih težav.

Kalkoni



Floretin



Xsantohumol

Slika 6. Predstavniki kalkonov.⁴⁵

b) Flavoni, flavonoli, flavanoni in flavanonoli

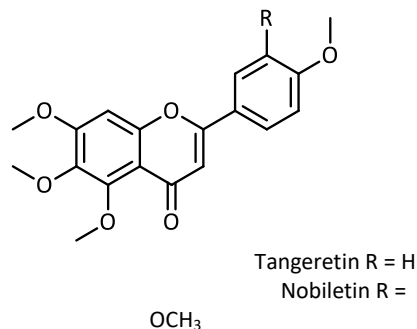
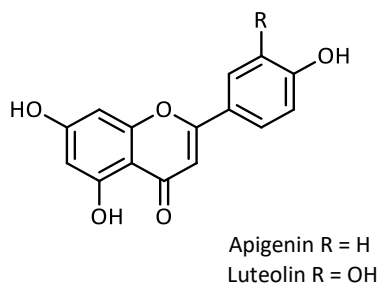
Ta podskupina flavonoidov je najbolj pogosta skupina prisotna v številnih rastlinah (Slika 7.). Flavoni in njihovi 3-hidroksi derivati flavonoli, vključno z njihovimi glikozidi, metoksidi in drugimi acilnimi produkti na vseh treh obročih, tvorijo največjo podskupino med vsemi polifenoli. Najpogostejša aglikona flavonola, kvercetin in kempferol, imata sama po sebi vsaj 279 oziroma 347 različnih glikozidnih kombinacij.⁴⁷ Število identificiranih flavanonov in njihovih 3-hidroksi derivatov (flavanonolov, tudi dihidroflavonoli), se je v zadnjih 15 letih znatno povečalo. Nekateri flavanoni imajo edinstvene vzorce substitucije, npr. prenilirani[§] flavanoni, furanoflavanoni,

[‡] 6"-O-malonil-7-O-glukozidi – sladkor, ki je vezan na C₇ izoflavona, ima na C₆ vezano propandiojsko kislino (malonsko kislino).

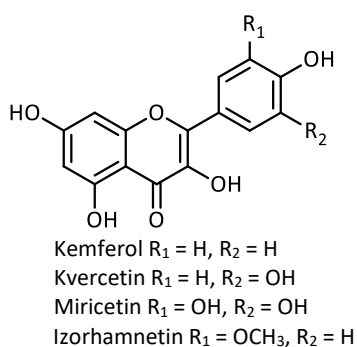
[§] Prenilizacija je kemijska ali encimska adicija hidrofobne stranske verige na molekulo.

piranoflavanoni, benzilirani flavanoni, kar daje veliko število substituiranih derivatov te podskupine. Dobro poznan flavanonol je taksifolin iz citrusov.⁴⁸

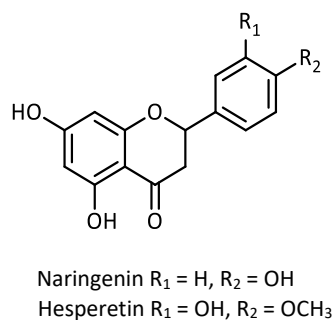
Flavoni



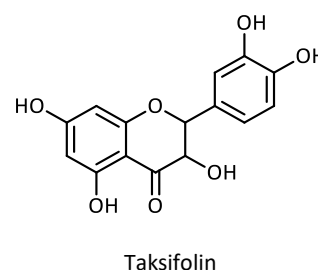
Flavanoli



Flavanoni



Flavanonoli



Slika 7. Kemijske strukture flavonolov, flavanonov, flavonov in flavanonolov.⁴⁵

c) Flavanoli in proantocianidini

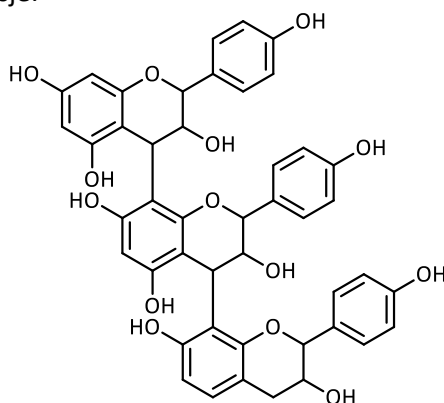
Flavanoli ali flavan-3-oli se pogosto imenujejo katehini. Za razliko od večine flavonoidov nimajo dvojne vezi med C₂ in C₃ ter karbonilne skupine na C₄ v C-obročju. To in hidroksilacija na C₃ omogoča flavanolom, da imata dva centra kiralnosti v molekuli (na C₂ in C₃), kar pomeni štiri možne diastereoizomere. Katehin je izomer s trans konfiguracijo, epikatehin pa izomer s cis konfiguracijo. Vsaka od teh dveh konfiguracij ima dva stereoizomera, to je (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin in (-)-epikatehin. (+)-katehin in (-)-epikatehin sta dva izomera, ki jih pogosto najdemo v prehranskih rastlinah (Slika 9.).

Flavanoli se nahajajo v številnih sadežih, zlasti v kožici grozdja, jabolk in borovnic. Monomerni flavanoli (katehin in epikatehin) ter njihovi derivati (npr. galokatehini) so glavni flavonoidi v čajnih listih in kakavovih zrnih (čokolada). Katehin in epikatehin lahko tvorita polimere, ki se pogosto imenujejo proantocianidini, saj kislina katalizira polimernih verig proizvede antocianidine.

Proantocianidine poznani tudi kot kondenzirane tanine, ki so, dimeri, oligomeri (2–7 monomernih enot) in polimeri flavan-3-olov, povezani z vezjo med C₄ in C₈ ali C₆. Znani so kot močni antioksidanti. Odvisno od načina povezav flavanolov lahko nastanejo oligomerni proantocianidini tipa A, kjer so monomeri povezani s C₂–O–C₇ ali C₂–O–C₅ vezjo, ali tipa B, kjer sta pogosti C₄–C₆ ali C₄–C₈ vezi. Procianidin C₁ je trimer. Prav tako lahko čajni flavanoli tvorijo med fermentacijo edinstvene dimere, kot je teaflavin (Slika 10.).

Delimo jih v procianidine, prodelfinidine in propelargonidine glede na to, kateri antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju v kislem: cianidin, delfinidin ali pelargonidin. Lastnosti so v veliki meri odvisne od stopnje polimerizacije molekul tanina in od narave osnovnih enot. Z večjim deležem polimerizacije se povečuje antioksidativna sposobnost, vendar le do določene stopnje

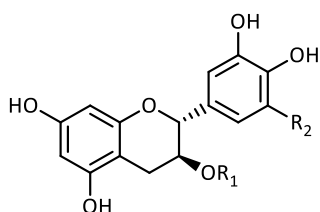
polimerizacije. Od večine ostalih polifenolov se razlikujejo zaradi njihovega polimernega značaja in po visoki molekularni masi, kar omejuje njihovo absorpcijo iz tankega črevesa, zato je njihovo delovanje omejeno na črevesje.



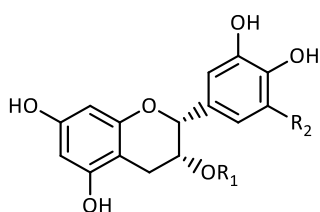
Slika 8. Trimerni propelargonidin.

Proantocianidini se pojavljajo v številnih rastlinskih virih, vključno z jagodami, grozdem, čajem in čokolado, ter so pomembni za zaščito rastlin pred škodljivci in boleznimi. Flavan-3-oli so pogosto prisotni v hrani, ki jo uživamo, kot so čaj, čokolada, sadje in vino, njihova vsebnost pa je lahko odvisna od različnih dejavnikov, vključno s kultivarjem, obdelavo in pripravo.⁴⁹

Flavanoli

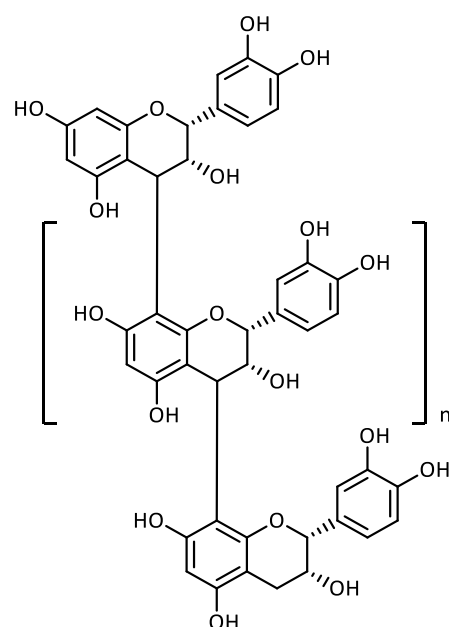


- (+)-katehin: $R_1 = R_2 = H$
- (+)-katehin galat: $R_1 = \text{galil}, R_2 = H$
- (+)-galokatehin: $R_1 = H, R_2 = OH$
- (+)-galokatehin galat: $R_1 = \text{galil}, R_2 = OH$



- (-)-epiatehin: $R_1 = R_2 = H$
- (-)-Epikatehin galat: $R_1 = \text{galil}, R_2 = H$
- (-)-Epigalokatehin: $R_1 = H, R_2 = OH$
- (-)-Epigalokatehin galat: $R_1 = \text{galil}, R_2 = OH$

Procianidini



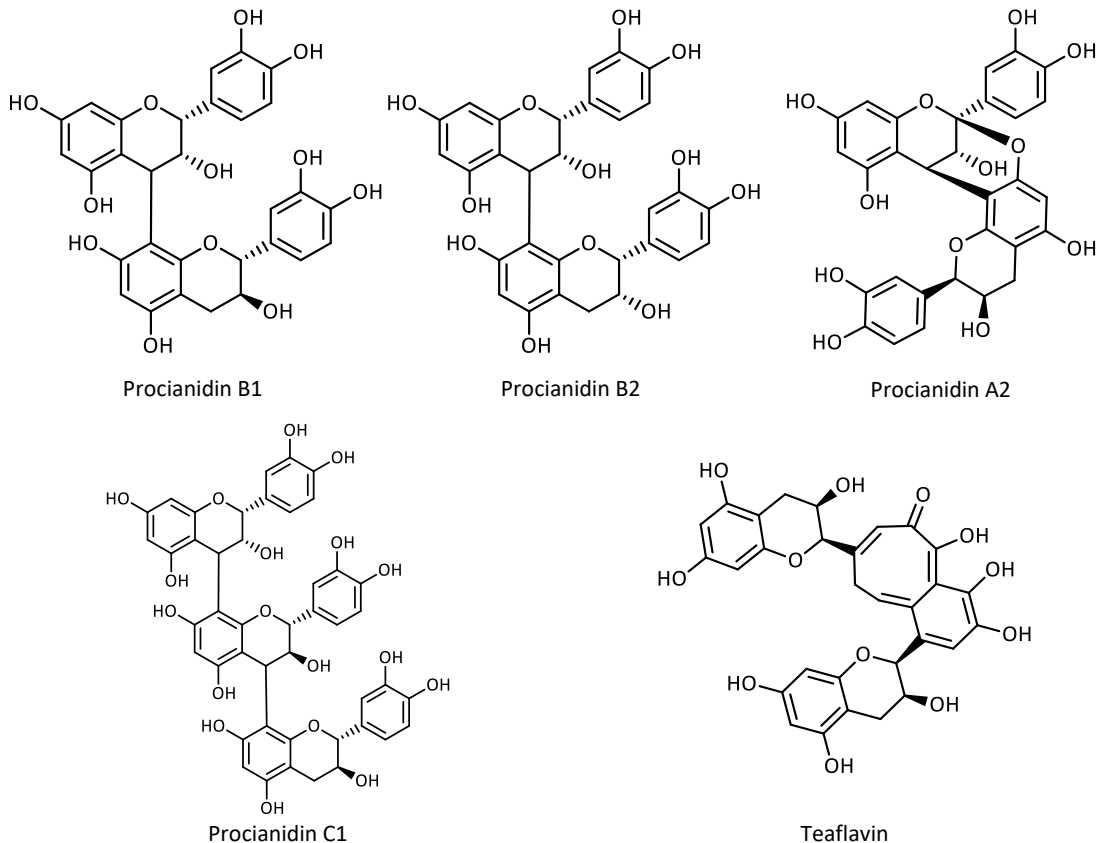
- Procianidin: $n = 3$
- Oligomerni procianidini: $n = 2-7$

Slika 9. Flavanoli in procianidini.⁴⁵

V študijah je bilo ugotovljeno, da flavan-3-oli lahko pozitivno vplivajo na vnetje in presnovne motnje. V kliničnih študijah so bili flavan-3-oli povezani z zmanjšanjem tveganja za različne bolezni, vključno z rakom, srčno-žilnimi boleznimi in presnovnim sindromom. Epidemiološke raziskave so pokazale, da je uživanje hrane, bogate s flavan-3-oli, povezano z nižjo pojavnostjo teh bolezni. Vendar pa je potrebnih še več raziskav, da bi natančno razumeli mehanizme delovanja flavan-3-olov in njihovo vlogo pri zdravju. Zaradi njihovih številnih pozitivnih lastnosti

in potencialnih koristi za zdravje flavan-3-oli pritegnejo pozornost raziskovalcev in prehranskih strokovnjakov. Raziskave se osredotočajo na razvoj učinkovitih prehranskih dopolnil, ki temeljijo na proantocianidinih, kar bi lahko prispevalo k izboljšanju zdravja in preprečevanju bolezni. Flavan-3-oli so tako pomembna komponenta zdrave prehrane in njihov vnos lahko pripomore k boljšemu zdravju ljudi.⁵⁰

Proantocianidini

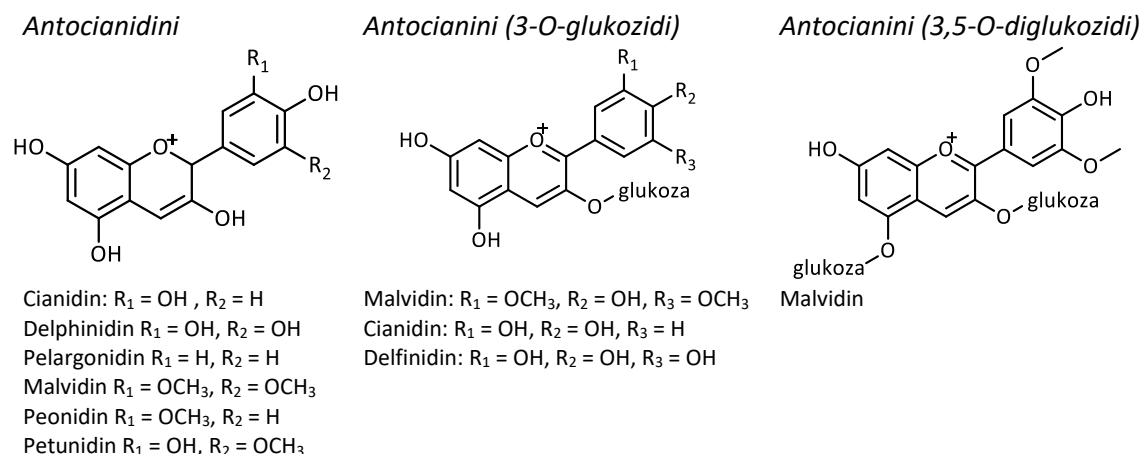


Slika 10. Tipični procianidini dimeri in teafavin kot trimer.⁴⁵

d) Antocianidini

Antocianidini so glavne sestavine rdečih, modrih in vijoličnih pigmentov večine cvetnih listov, sadja, zelenjave in nekaterih posebnih sort žit, npr. črnega riža (slika 7). Antocianidini v rastlinah večinoma obstajajo v glikozidni obliki, ki se pogosto imenujejo antocianini. Cianidin, delphinidin in pelargonidin so najbolj razširjeni antocianidini od obstoječih 31 antocianidinov.⁵¹ Dejansko 90 % antocianinov temelji na cianidinu, delphinidinu in pelargonidinu ter njihovih metiliranih derivatih. Skupno je znanih več kot 500 antocianinov, odvisno od števila in vezave hidroksilnih in metoksi skupin na B-obročju ter od tvorbe glikozida z različnimi monosaharidnimi enotami. Barva antocianinov je odvisna od pH, to je rdeča v kislem in modra v bazičnem okolju. Na barvo pa lahko vpliva tudi razporeditev hidroksilnih in metoksi skupin kot tudi prisotni ogljikovi hidrati. Antocianini so kemično stabilni v kisljih raztopinah. Ko je pH raztopine pod 3, ima kisikov atom v heterocikličnem obroču pozitiven naboj, nastane flavilijev kation. Razlika med antocianidini in antocianini je ta, da prvi nimajo vezanega sladkorja, medtem ko antocianini ga imajo. V grozdju imajo lahko antocianini vezan monosaharid ali disaharid na položaju 3 in 5. Tudi število hidroksilnih skupin (–OH) in metoksi skupin (–OCH₃) B obroča označuje antocianine (Slika 11.). Najbolj razširjen antocianin v grozdju je malvidin-3-O-glukozid, kar pomeni, da je glukoza vezana z glikozidno vezjo v položaju 3 in da ima B obroč 1 hidroksilno skupino in 2 metoksi skupini. Barva

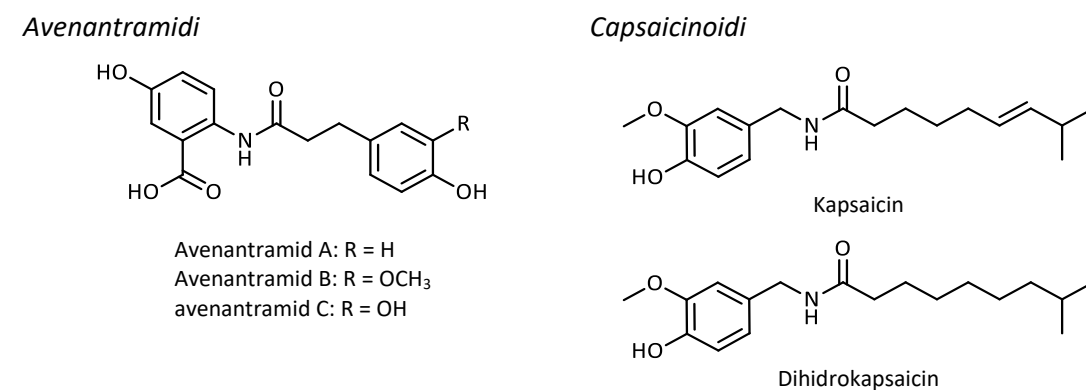
se razlikuje glede na kemijsko strukturo. Kot primer je delfinidin-3-O-glukozid ponavadi modro v primerjavi s cianidinom-3-O-glukozidom, ki je oranžen do rdečkast.



Slika 11. Kemijska struktura antocianidinov s flavilijevim kationom in antocianinov z vezano glukozo.⁵²

2.2.1.3 Polifenolni amidi

Nekateri polifenoli imajo lahko N-vsebujoče funkcionalne substituentne. Dve taki skupini polifenolnih amidov sta pomembni, ker sta glavni sestavini pogostih živil: kapsaicinoidi v čiliju in avenantramidi v ovsu (Slika 12.).⁵³ Kapsaicinoidi, kot je kapsaicin, so odgovorni za pekočnost čilija, vendar so bili ugotovljeni tudi kot močni antioksidanti in protivnetna sredstva, modulirajo pa tudi oksidativni obrambni sistem v celicah. Poročali so tudi o antioksidativnih aktivnostih avenantramidov, vključno z zaviranjem oksidacije LDL**.

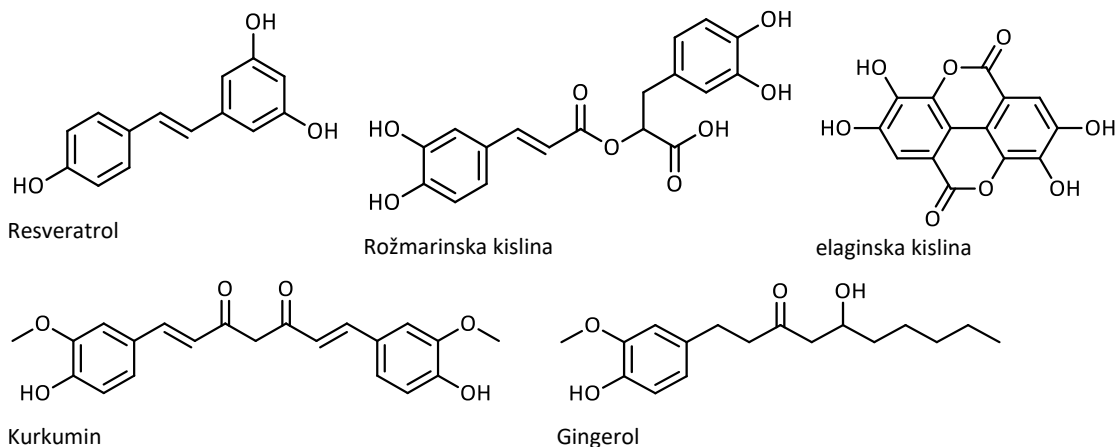


Slika 12. Polifenolni amidi.⁵⁴

** LDL - lipoprotein nizke gostote

2.2.1.4 Ostali polifenoli

Poleg fenolnih kislin, flavonoidov in polifenolnih amidov obstaja več neflavonoidnih polifenolov v hrani, ki jih štejemo za pomembne za človeško zdravje. Med njimi je resveratrol edinstven za grozdje in rdeče vino, elagična kislina in njeni derivati, ki se nahajajo v jagodičevju, npr. jagodah in malinah, ter v kožici različnih oreščkov. Lignani obstajajo v vezani obliki v lanu, sezamu in številnih žitih in so hidrolizni produkti. Kurkumin je močan antioksidant iz kurkume. Rožmarinska kislina je dimer kavne kisline, elaginska kislina pa dimer galne kisline (Slika 13.). Čeprav sta tako galna kot elagična kislina prisotni v prosti obliki, obstajajo tudi njuni glukozni estri v različnih rastlinah.



Slika 13. Nekateri drugi polifenoli.

2.3 Antioksidanti v grozdju

Grozdje je bogato s fenolnimi spojinami, te spojine pa so v glavnem razporejene po koži, stebelu, listih in semenu grozdja. Skupna koncentracija fenolnih spojin je bila približno 2178,8 mg/g GAE v semenih, 374,6 mg/g GAE v koži, 23,8 mg/g GAE v mesu in 351,6 mg/g GAE v listih (GAE - ekvivalent galne kisline). Skupna vsebnost fenolov v grozdnih kožicah je bila različna glede na sorto, sestavo tal, podnebje, geografski izvor in prakse gojenja ali izpostavljenost boleznim, kot so glivične okužbe. Spojine v glavnem vključujejo proantocianidine, antocianine, flavonole, flavanole, resveratrole in fenolne kisline. Proantocianidini so glavne fenolne spojine v grozdnih peškah in kožici grozdja. Antocianini so pigmenti in so odgovorni za barvo grozdnih plodov, meso pa ne vsebuje antocianov. V rdečem vinu so antocianidini in flavonoidi glavni dve skupini fenolnih spojin, katehin pa obilen flavonoid. Grozdni antocianini se biosintezirajo med zorenjem jagodičja do zrelosti letine. Antocianine lahko najdemo tudi v velikih količinah v listih na koncu rastne sezone. Podobno kot tanini tudi številni okoljski dejavniki, kot so izpostavljenost soncu, temperatura, stopnja zorenja, trgatev in sorta grozdja, vplivajo na količino in sestavo antocianinov v grozdju.

Preglednica 1. Fenolne spojine v različnih delih grozdja in njegovih izdelkih.^{55,56}

Viri	Fenolne spojine
seme	galna kislina, (+)-katehin, epikatehin, dimerni procianidin, proantocianidini
koža	proantocianidini, elaginska kislina, miricetin, kvercetin, kempferol, trans-resveratrol
list	miricetin, elaginska kislina, kempferol, kvercetin, galna kislina
steblo	rutin, kvercetin -3-O-glukuronid, trans-resveratrol, astilbin
rozina	hidroksicinska kislina, hidroksimetilfurfural
rdeče vino	malvidin-3-O-glukozid, peonidin-3-O-glukozid, cianidin-3-O-glukozid, petunidin-3-O-glukozid, katehin, kvercetin, resveratrol, hidroksicinska kislina

Zanimanje za fenolne spojine iz grozdja se osredotoča predvsem na njihove biološke dejavnosti, ki se povezujejo s koristmi za zdravje ljudi, kot so antioksidanti, kardioprotektivi, proti rakavi, protivnetni, antigeni in protimikrobni učinki.

2.4 Organogeli

Gel je poltrden ali trden sistem, v katerem neka snov ali snovi tvorijo ogrodje oz. tridimenzionalno strukturo, v to strukturo pa so umeščene manjše molekule ene ali več tekočin. Molekule tekočine so v gel vezane preko šibkih medmolekulskih interakcij ter lahko ob primernih pogojih to strukturo tudi zapustijo. Najbolj znani primer gela je želatina, v katerem polipeptidne molekule želatine tvorijo ogrodje, v katerega je ujeta voda.

Gel, ki vsebuje nepolarno topilo imenujemo organogel, gel s polarnim topilom pa hidrogel. Organogeli so torej tridimenzionalne strukture, sestavljene iz gelatorja in nepolarnega topila, ki pa lahko vsebujejo tudi molekule vod, ujete v strukture gelatorja. Organogelatorji imajo ključno vlogo pri oblikovanju organogela. Glede na sposobnost tvorjenja vodikove vezi jih delimo na tiste, ki je ne tvorijo, in tiste, ki tvorijo vodikove vezi. Med nekatere pogoste vrste organogelov uvrščamo: lecitin organogele, pluronik lecitin organogele (PLO), vrhunske lecitinske organogele (PrLO), limonen GP₁/PG organogele, organogele na osnovi mikroemulzije (MBG), stabilizirane z želatino, sorbitanske organogele, pridobljene iz maščobnih kislin, in polietilenske organogele.⁵⁷

3. METODE DELA

3.1 Priprava materiala

V sklopu raziskovalne naloge sva iz tropin grozdja, ki so ostale po mletju grozdja, nabrale grozdne peške, jih najprej posušile na zraku, nato pa še v postopku liofilizacije. Pred ekstrakcijo sva peške zmele z električnim mlinčkom za kavo v droben prah. Iz zmetih pešk sva v postopku ekstrakcije izločila v etanolu topne komponente, med njimi tudi proantocianidine. Določile sva uspešnost posamezne metode ekstrakcije. Iz pridobljenih ekstraktov sva pripravili organogel in ga kapsulirali. V nadaljevanju sva opisale našete postopke najinega dela.

3.1.1 Liofilizacija

Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je postopek, s katerim odstranimo vodo iz bioloških in organskih snovi, ki bi jih s segrevanjem poškodovali, hkrati pa ohranimo njihovo strukturo in sestavo. Postopek je počasen in porabi trikrat več energije kot konvencionalno sušenje, zato ga uporabljamo le za občutljive in drage produkte. Liofilizacija je torej postopek, pri katerem se led, ki je prisoten v zamrznjenih peškah, neposredno spremeni v vodno paro brez prehoda skozi tekoče stanje. Ta proces, znan kot sublimacija, omogoči, da se voda iz materiala odstrani brez tveganja za poškodbe dragocenih sestavin, kot so antioksidanti in druge biološko aktivne snovi. Po liofilizaciji sva dobile 180 g suhih grozdnih pešk.

3.1.2 Mletje

Posušene grozdne peške sva zmleli v električnem mlinčku za kavo, da bi dobile dobro zmleto snov, ki omogoča čim večjo površino grozdnih pešk in s tem največjo možno površino pešk, ki pride v stik s topilom, s tem pa tudi bolj učinkovit prehod topnih komponent iz grozdnih pešk v topilo-etanol.

3.2 Ekstrakcijske metode

Ekstrakcija je postopek, s katerim odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi v topilu topne komponente. Ekstrakcija temelji na različni topnosti sestavin zmesi v topilu. Če se spojina iz trdne zmesi v danem topilu raztaplja, potem se v topilo ekstrahira. Pogoj je, da je mnogo bolj topna v topilu kot ostale sestavine zmesi. Pridobljeno snov imenujemo ekstrakt. Postopek sestoji iz dveh zaporednih operacij: najprej spravimo zmes v intenziven stik s topilom, nato obe fazi ločimo. Postopek uporabljamo za pridobivanje olj iz plodov in semen ter za pridobivanje dišav in farmacevtskih substanc iz rastlin in sadežev. Kot topilo lahko uporabljamo hlapna organska topila, v določenih primerih pa tudi vodo. Tako lahko ločimo organske spojine od anorganskih, pridobivamo barvila iz naravnih virov ali si z ekstrakcijo vodotopnih spojin pripravimo napitek,

kot sta čaj in kava.⁵⁸ Poznamo več vrst ekstrakcij. Pri eksperimentalnem delu sva uporabili tri različne metode ekstrakcije, katerih cilj je bil prenos antioksidantov iz grozdnih pešk s pomočjo topila, etanola. Uporabili sva toplo maceracijo, ekstrakcijo s Soxletovim aparatom in ultrazvočno ekstrakcijo. Vsaka od teh tehnik je omogočila učinkovito pridobivanje biološko aktivnih snovi iz pešk, s čimer sva lahko raziskale njihov potencial za nadaljnjo uporabo v različnih aplikacijah. Zraven etanola bi antioksidante lahko ekstrahirali tudi z nekaterimi drugimi spojinami ali zmesmi, kot so: voda, metanol, metanol/mravljinska kislina, metanol/voda/ocetna. Odločile sva se za etanol, ki v manjših količinah ne predstavlja tveganja za zdravje.

3.2.1 Topla maceracija

Ekstrakcija z maceriranjem je ena najpreprostejših ekstrakcijskih tehnik, pri kateri se grobi in praškasti rastlinski material namoči v topilih, kot so metanol, etanol, etil acetat, heksan itd. Pogosto se uporablja za ekstrakcijo različnih bioaktivnih spojin iz rastlinskega materiala. Učinkovitost ekstrakcije je predvsem odvisna od vrste topila, njegove polarosti ter kombinacije časa in temperature. Omejitve pri tem postopku so lahko nizek izkoristek ekstrakcije in uporaba velike količine topila. Zaradi enostavnosti in učinkovitosti tega postopka so ga dolgo uporabljali za pridobivanje eteričnih olj in drugih bioaktivnih spojin. Poteka tako, da zmeljemo rastlinski material na manjše delce, da se poveča površina za mešanje z izbranim topilom in učinkovito ekstrakcijo spojin. Pripravljeni spojini zapremo, da preprečimo izhlapevanje topila, mešamo v različnih intervalih in filtriramo skozi filtrirni medij.

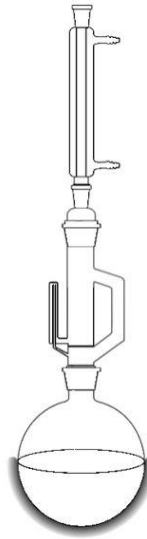
Topla maceracija je učinkovitejša, ker se pri višji temperaturi hitrost difuzije, kar omogoči, da se sestavine, v našem primeru antioksidanti, hitreje sprostijo v etanol. Vendar pa je pomembno, da temperatura ni previsoka, saj lahko prekomerno segrevanje poškoduje občutljive spojine in zmanjša učinkovitost ekstrakcije. Zato je ključnega pomena, da se proces izvaja pri nadzorovani temperaturi, ki optimizira prenos koristnih snovi, brez tveganja za njihovo razgradnjo.

3.2.2 Ekstrakcija po Soxletu

Bolje je ekstrahirati večkrat z manjšo količino topila kot enkrat z večjo. V ta namen za ekstrakcijo iz trdnih zmesi pogosto uporabljamo ekstrakcijski aparat po Soxletu (Slika 14). Soxhletov ekstraktor je leta 1879 izumil nemški kemik Franz von Soxhlet (1884-1926). Je laboratorijski aparat za ekstrakcijo sestavin trdnih snovi s pomočjo hlapljivega organskega topila. Soxletov aparat deluje na principu ponavljajoče se ekstrakcije, pri čemer topilo (v našem primeru etanol) kroži med ogrevanjem in hlajenjem, da učinkovito izloči bioaktivne snovi iz trdnih materialov.

Aparat sestavljajo: destilirka, ekstrakcijska komora in povratni hladilnik. Topilo segrevamo v destilirki, pare potujejo v povratni hladilnik, kjer se utekočinijo. Kondenzat nato kaplja v ekstrakcijsko komoro. V komori so grozdnje peške v tulcu iz filtrnega papirja, ki je pokrit z vato. Grozdnje peške tako prihajajo v stik z vročim topilom, v katerem se raztapljajo v topilu topne komponente. Ko raztopina napolni ekstrakcijsko komoro do višine odtoka, steče po principu natege nazaj v bučko in postopek se ponovi. Ekstrakt se nabira v bučki, v tulcu pa ostanejo netopne sestavine prvotne zmesi.⁵⁹ Ta ciklični proces omogoči, da se topilo natančno in učinkovito stika s peškami, kar poveča količino prenešenih sestavin v topilo. Tako se z vsakim ciklom ekstrakcije povečuje koncentracija antioksidantov in drugih topnih snovi v etanolu.

Pomembna prednost te ekstrakcije je boljši izkoristek ekstrakcije, saj omogoča popolno in dolgotrajno izpostavljanje pešk topilu, vendar je hkrati dolgotrajnejša in zahteva natančno kontrolo temperature, saj previsoka temperatura lahko poškoduje občutljive spojine.



Slika 14. Soxhletov aparat deluje na principu povratnega hlajenja topila.

3.2.3 Ultrazvočna ekstrakcija

Ultrazvočna ekstrakcija je prednostna tehnika za pridobivanje bioaktivnih spojin iz rastlin, saj dosega visokokakovostno ekstrakcijo v zelo kratkem času in z majhnimi stroški. Uporablja se v živilski, v farmacevtski in kemijski industriji. Ultrazvočna tehnologija ekstrakcije uporablja kavitacijo^{††}, ki jo proizvajajo ultrazvočni valovi in je posledica spremembe visokih in nizkih tlačnih valov, ki jih povzročajo ultrazvočni pretvorniki. Interakcija ultrazvočnih valov z raztopino vzorca povzroča intenzivno mešanje in posledično interakcijo med topilom in analiti; ta ekstremni stres premaga selektivnost membrane, perforira in moti celično steno ter tako doseže visokokakovostni transport med notranjimi celicami in okoliškim topilom.

3.3 Odstranjevanje topila

Topilo sva odstranili z rotavaporjem, kjer poteka hiter in učinkovit proces vakuumske destilacije. Vrtenje bučke poveča površino vzorca ter tako izboljša prenos toplote. Z uporabo vakuuma dosežemo nižjo točko vrelišča, kar omogoča izvedbo destilacij pri nižji temperaturi.



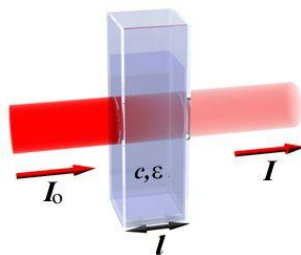
Slika 15. Rotavapor oz. vakuumski uparjalnik.

3.4 Spektrofotometrične metode za določanje fenol v grozdju

Spektrofotometrijo uvrščamo med molekulske absorpcijske spektrometrije. V to skupino sodita tudi kolorimetrija in fotometrija. Spektrofotometrija temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Molekulam, ki jih vzbujamo, se spremenijo elektronska stanja. K spektrofotometriji uvrščamo UV, vidno in IR spektrofotometrijo. Vidna spektrofotometrija (VIS) je pomembna za kvantitativno analizo. V spektrometriji merimo količino absorbirane

^{††} Kavitacija je hidrodinamični pojav, pri katerem se pojavijo mehurčki v kapljevini. To se po navadi zgodi, ko je kapljevina izpostavljena hitrim spremembam tlaka. Mehurčki se pojavijo na mestu, kjer je nizek tlak. Če se pojavi pri velikih tlakih, mehurčki potem implodirajo in pri tem ustvarijo močne udarne valove.

svetlobe v obarvani raztopini, ki je proporcionalna koncentraciji te snovi v raztopini. Del svetlobe, ki ga absorbira nek analit v raztopini, lahko povežemo s koncentracijo tega analita v raztopini.



Slika 16. Prikaz absorpcije dela vpadne svetlobe (I_0) v vzorcu in prepuščene svetlobe (I).

Skozi raztopino vodimo svetlobo točno določene valovne dolžine z intenziteto I_0 . Del svetlobe se v raztopini absorbira. Ker pri prehodu svetlobe skozi raztopino prihaja, razen do absorpcije svetlobe, še do drugih fizikalnih pojavov, umerimo intenziteto vhodnega žarka (I_0) s pomočjo slepega vzorca. Za homogeni vzorec velja, da je del prepuščene svetlobe, ki jo imenujemo transmitanca (T), enaka razmerju med intenziteto izhodnega žarka (I) in vhodnega žarka (I_0).

Enačba 1:
$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-kl}$$

k je konstanta, l je dolžina poti svetlobe v raztopini. V logaritmski obliki lahko zapišemo to enačbo kot:

Enačba 2:
$$\log T = \log \frac{I}{I_0} = -kl$$

Leta 1852 sta Beer in Bernard ugotovila, da podobna odvisnost velja tudi ob upoštevanju množinske koncentracije c . S kombiniranjem obeh zakonov dobimo Beerov zakon, ki opisuje povezavo transmitance s koncentracijo raztopine in dolžino poti:

Enačba 3:
$$\log T = \log \frac{I}{I_0} = -\epsilon cl$$

V kemijski praksi niso zaželeni eksponentne zveze med merjeno fizikalno količino in koncentracijo. Za praktično uporabo so najprimernejše linearne zveze. Eksponentno zvezo $T = 10^{-\epsilon cl}$ lahko prevedemo v linearno tako, da jo logaritmiramo in uvedemo pojem absorbance (A). Dobljeno zvezo imenujemo Beer-Lambertov zakon:

Enačba 4:
$$A = \epsilon cl$$

Beer-Lambertov zakon je osnova za spektrometrično določanje koncentracije neke snovi v vzorcu. Absorbanca je v linearni zvezi s koncentracijo snovi. Molarni absorpcijski koeficient ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$] in dolžina poti svetlobe skozi raztopino sta pri določanju koncentracije neke snovi konstantni. Dolžina poti v vidni in UV-spektrometriji je običajno 1 cm. Beerov zakon velja samo za monokromatsko svetlobo, ker je absorptivnost različna pri različnih valovnih dolžinah.

3.5 Organogeli

V naši raziskovalni nalogi sva za organogelator izbrali stearinsko kislino, ki spada med maščobne kisline, tako naš organogel spada med sorbitanske organogeje. Stearinska kislina je rumenkaste barve, ima nekoliko neprijeten vonj, je netopna v vodi, topna pa v olju in alkoholih. Nahaja se v

živalskih derivatih in rastlinskih maščobah. Uporablja se v kozmetičnih izdelkih, uporablja se kot dišava, sufkaktant in emulgator, kot osnova za izdelavo drugih maščobnih kislin, tudi kot sestavina v svečah, prehranskih dopolnilih itd.⁶⁰ Stearinska kislina je ena najpogostejših nasičenih maščobnih kislin v naši prehrani, kar je bil tudi eden izmed vzrokov za njeno izbiro. Pri formulaciji ekstrakta v organogel sva jo uporabili tudi zato, ker zelo dobro deluje kot sredstvo za stabilizacijo emulzije in ima učinkovite lastnosti zgoščevanja, kar sva opazili tudi sami.

4. EKPERIMENTALNO DELO

4.1 Priprava materiala

Grozdne peške sva pridobili iz ostankov grozdja, pri čemer sva grozdne peške najprej oprali in jih nato posušili na zraku. Tako sva dobile približno 220 g grozdnih pešk. Od tega sva 40 g najprej porabile za poskuse z ekstrakcijo, na katerih sva se naučile poteka posameznih faz ekstrakcije in odstranjevanja topila. Preostalih 180 g sva poslali posušile z liofilizatorjem in pri tem sva dobili 120 g suhih pešk, ki so zadoščale za dvakratno ekstrakcijo z vsemi tremi metodami, toplo maceracijo, ekstrakcijo po Soxhletu in ultrazvočno ekstrakcijo.

4.1.1 Aparature in materiali

Material:	Reagent:	Pribor:	Aparature:
Grozdne peške	70-% etanol Konoplino olje Stearinska kislina	Bučka z ravnim dnom Magnetno mešalo Merilni valj (100 ml) Kristalizirka Povratni hladilnik Nuča z nastavkom Bučka z okroglim dnom Žlička in spatula	Elektronska tehtnica Liofilizator Magnetno mešalo z grelcem Soxhlet aparat Rotavapor (rotacijski uparjalnik) Ultrazvočna kopel

4.1.2 Sušenje in mletje

120 g posušenih pešk sva zmelili v električnem kavnem mlinčku. Po 20 g grozdnih pešk sva uporabile za vsako ekstrakcijo, ki sva jo izvajale s 70 % etanolom pri vseh treh metodah ekstrakcije.

4.1.3 Ekstrakcija s toplo maceracijo

20 g posušenih grozdnih pešk sva zatehtali v čašo, dodali 100 mL topila (70 % etanol), magnet in čašo pokrili s parafilmom ter tako preprečili izhlapevanje topila. Ekstrakcijska zmes se je tako enakomerno mešala 15 minut pri konstantni temperaturi 60 °C in s stalnim mešanjem (400 onm). Po preteku časa sva mešanje ustavili, odstranili parafilmom in magnet ter ekstrakcijsko zmes prefiltrirali. Raztopino ekstrakta sva uparili, ostanek materiala na filter papirju pa zavrgli. Raztopino ekstrakta sva prelili v stehtano bučko z okroglim dnom. Bučko sva namestili na rotavapor in odparili topilo do suhega preostanka ekstrakta. Bučko z ekstraktom sva shranili v

eksikator, da se je osušil še preostale vlage. Bučko s suhim ekstraktom sva stehali in določili maso ekstrakta ter izračunali izkoristek ekstrakcije. Tako pripravljen suhi ekstrakt sva uporabili za nadaljnje analize.

4.1.4 Ekstrakcija po Soxhletu

20 g posušenih grozdnih pešk sva zatehtali v papirnati tulec, v bučko Soxhletovega aparata pa dodali 100 mL topila (70 % etanol). Topilo sva segrevali z grelnikom aparata, da je to izparevalo in kondenziralo v povratnem hladilniku, kondenzirano topilo pa je teklo v ekstrakcijsko komoro, kjer je bil papirnati tulec s peškami. Ko je količina topila v hladilniku dosegla določen nivo, se je po principu natege, topilo prečrpalo v bučko in postopek se je ponovil. Po trikratnem ciklu sva nehali segrevati, ker je topilo, ki je steklo iz ekstrakcijske komore v destilirko, bilo brezbarvno. Ekstrakcija je tako potekala 16 minut. Raztopino ekstrakta sva uparili, ostanek materiala na filter papirju pa zavrgli. Raztopino ekstrakta sva prelili v stehano bučko z okroglim dnom. Bučko sva namestili na rotavapor in odparili topilo do suhega preostanka ekstrakta. Bučko z ekstraktom sva shranili v eksikator, da se osuši še preostala vlaga. Bučko s suhim ekstraktom sva stehali in določili maso ekstrakta ter izračunali izkoristek ekstrakcije. Tako pripravljen suhi ekstrakt sva uporabili za nadaljnje analize.

4.1.5 Ultrazvočna ekstrakcija

20 g posušenih grozdnih pešk sva zatehtali v čašo, dodali 100 mL 70 % etanola ter čašo pokrili s parafilmom, da sva preprečili izhlapevanje topila. Čašo sva nato postavili v ultrazvočno kopel pri konstantni temperaturi 40°C. Po 15 minutah sva ultrazvočno kopel izključili, raztopino z ekstraktom sva najprej prefiltrirali, nato pa topilo odstranili v rotavaporju do suhega. Bučko z ekstraktom sva shranili v eksikator, da se je osušil še preostale vlage. Bučko s suhim ekstraktom sva stehali in določili maso ekstrakta ter izračunali izkoristek ekstrakcije. Tako pripravljen suhi ekstrakt sva uporabili za nadaljnje analize.

4.2 Določanje vsebnosti proantocianidinov

4.2.1 Aparature in materiali

Kemikalije:	Reagenti:	Pribor:	Aparature:
FeSO ₄ ·7H ₂ O, Klorovodikova kislina (HCl), Butanol-1-ol Destilirana voda.	FeSO ₄ (aq) v raztopini V(HCl):V(C ₄ H ₉ OH) = 2:3	Merilne bučke -500 ml,10 ml Avtomatska mikropipeta Merilni valj - 500 ml Stekleničke Spatula	Analitska tehtnica Grelna plošča Spektrofotometer

Reagent za spektrometrično določanje proantocianidinov (PAC) sva pripravili tako, da sva zatehtali 77 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 500 mL merilno bučko ter dodali do 500 mililitrske oznake zmes HCl in butan-1-ola v prostorninskem razmerju 2:3 (200 mL HCl, 300 mL butanola). Množinska koncentracija Fe^{2+} ionov je tako $5,54 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.2 Spektrometrično določanje vsebnosti proantocianidinov v vzorcih

Za začetek sva v bučko odmerili 10 ml ekstrakta in ga do oznake razredčili z etanolom, pri čemer sva bučko dobro zaprli, da preprečimo izhlapevanje metanola. Nato sva bučko z ekstraktom in etanolom postavili v ultrazvočno kopel, da se je ekstrakt popolnoma raztopil v etanolu, ki je služil kot topilo. Z uporabo avtomatske pipete sva v stekleničko prenesli 1 ml ekstrakta in dodali 10 ml pripravljenega reagenta. Reagent sva pripravili tako, da sva v merilnem valju zmešali 60 ml butan-1-ola, 40 ml HCl in 15,4 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Stekleničke sva nato postavili v vodno kopel in jih segrevali 15 minut pri temperaturi 95°C , da bi pospešili kemijsko reakcijo. Nato sva raztopine ohladili in izmerili absorbanco pri 540 nm. Kontrolni vzorec sva uporabili za umerjanje spektrofotometra.



Slika 17. Vzorci z ekstrakti pripravljene za merjenje koncentracije PAC.

Koncentracijo proantocianidinov (PAC) v raztopini ekstrakta sva izračunali na osnovi izmerjene absorbcije pri valovni dolžini 540 nm. Uporabili sva naslednje enačbe:

$$\text{Enačba 5:} \quad Abs_{540} = \epsilon \cdot l \cdot c_{(PAC)} \text{ ali } c_{(PAC)} = \frac{Abs_{540}}{\epsilon \cdot l}$$

$$\text{Enačba 6:} \quad \gamma_{(PAC)} = c_{(PAC)} \cdot M_{(PAC)} \cdot \frac{V_{(k.razt)}}{V_{(ekst)}} = Abs_{540} \cdot \frac{M_{(PAC)}}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V_{(k.razt)}}{V_{(ekst)}}$$

Kjer je:

$\gamma_{(PAC)}$ – masna koncentracija PAC v raztopini vzorca, g L^{-1} oz mg L^{-1} .

$c_{(PAC)}$ - množinska koncentracija PAC v raztopini vzorca, mol L^{-1} .

M - molska masa PAC (proantocianidinov), $277,9 \text{ g mol}^{-1}$

$V_{k.razt}$ - prostornina končne raztopine za analizo, 11 mL

V_{eks} - prostornina raztopine ekstrakta v končni raztopini za analizo, 1,0 mL

Abs - absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 540 nm

ϵ - absorpcijski koeficient (cianidin), $34700 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

l - premer oz. stranica kivete, 1 cm

Rezultate vsebnosti proantocianidinov izrazimo v mg PAC na g suhega ekstrakta ($w_{\text{PAC ekstrakt}}$) oz. v mg PAC na g materiala ($w_{\text{PAC material}}$).

$$\text{Enačba 7} \quad W_{(PAC \text{ ekstrakt})} = \frac{\gamma_{PAC}}{\gamma_{(ekst)}} \cdot 1000$$

$$\text{Enačba 8} \quad \gamma_{(ekst)} = \frac{m_{zatehte}}{V_{r.e.}} \cdot 1000$$

$$\text{Enačba 9} \quad W_{(PAC \text{ material})} = W_{(PAC \text{ ekstrakt})} \cdot \frac{\eta_{ekstrakcije}}{100}$$

Kjer je:

$\gamma_{(ekstrakta)}$ – masna koncentracija ekstrakta v raztopini (mg mL^{-1})

$m_{zatehte}$ - masa ekstrakta (mg), zatehtana za pripravo osnovne raztopine ekstrakta

V_{re} - prostornina raztopine ekstrakta (10 mL)

η - Izkoristek ekstrakcije (%)

w - mg PAC na g suhega ekstrakta

w_m - mg PAC na g materiala

4.3 Priprava ekstrakta za organogel

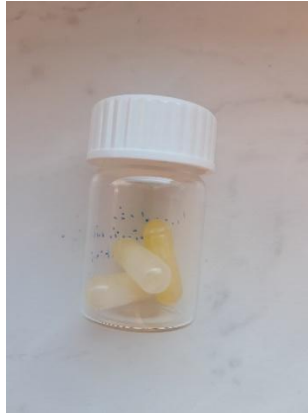
V raziskavi sva etanol uporabili kot topilo za ekstrakcijo bioaktivnih komponent in nato preučevali njegovo vlogo pri tvorbi organogela. Eksperimenti so zajemali različne koncentracije etanola, da bi ocenili njihov vpliv na nastanek in stabilnost organogela. Opazovali sva pogoje, pri katerih je organogel dosegel optimalne fizikalno-kemijske lastnosti, in analizirali spremembe v konsistenci glede na različne metode priprave.

Zaradi omejene količine ekstrakta sva mu dodali konopljno olje in 4 % stearinske kisline. Mešanico sva homogenizirali z magnetnim mešalom pri povišani temperaturi, da se je stearinska kislina popolnoma stopila. Med ohlajanjem in prenosom gela v kapsule sva opazili hitro strjevanje zmesi ekstrakta in gelatorja, kar je omogočilo hitro oblikovanje končnega produkta. Ohlajeno mešanico sva nato vnesli v kapsule pred popolno strditvijo in jih zaprli v plastično



škaflico (

Slika 18).



Slika 18. Kapsule z ekstraktom

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Ekstrakcija

Določili sva maso ekstrakta, ki sva jih dobili po ekstrakciji glede na tri različne načine ekstrakcije, topla maceracija (TM), ekstrakcija po Soxhletu (SOX) in ultrazvočna ekstrakcija (UZ) in po odstranitvi topila z rotavaporjem (Preglednica 2).

Preglednica 2. Tabela prikazuje mase praznih bučk in mase polnih bučk pred in po ekstrakciji in odstranitvi topila. Prikazane so mase ekstraktov in masni delež ekstrakta v suhi snovi (grozdne peške) po dveh ekstrakcijah: topla maceracija (TM), ekstrakcija po Soxhletu (SOX) in z ultrazvočna ekstrakcija (UZ).

Ekstrakcijska metoda	Prazna bučka	Polna bučka	$m_{\text{ekstrakta}}$ g	$w_{\text{ekstrakta}}$	$\eta_{\text{ekstrakta}}$ %
TM1	126,49100	127,85775	1,36675	0,0683375	6,83
TM2	196,68915	198,12684	1,43769	0,0718845	7,19
SOX1	154,34456	156,39961	2,05505	0,1046359	10,46
SOX2	195,48715	197,74325	2,25610	0,1128050	11,28
UZ1	170,73682	173,29514	2,55832	0,1279160	12,79
UZ2	196,68915	199,53245	2,84330	0,1421650	14,22

Izračunali sva naslednje izkoristke ekstrakcij: s toplo maceracijo v povprečju 7,01 odstotkov, za ekstrakcijo s Soxhletom 10,87 odstotkov, z ultrazvočno ekstrakcijo pa v povprečju 13,51 odstotka. Rezultati kažejo, da je najuspešnejša ekstrakcija potekla po metodi ultrazvočne ekstrakcije.

5.2 Določanje proantocianidov

Pripravljenim vzorcem ekstrakta za spektrofotometrično določanje proantocianidov sva izmerili absorbanco. Vsakemu vzorcu sva absorbanco izmerile trikrat. Rezultate kaže preglednica 3. Ponovno lahko vidimo, da je največja absorbanca v primeru ekstrakta, ki sva ga dobili z ultrazvočno ekstrakcijo, 0,03335, z ekstrakcijo po Soxhletu, 0,0132 in z ekstrakcijo s toplo maceracijo 0,00775. Iz Enačba 5 sva izračunale množinsko koncentracijo proantocianidina (PAC), iz Enačba 6 pa masno koncentracijo PAC. Izračunali sva še masno koncentracijo ekstrakta in masni delež PAC v ekstraktu. Rezultati so podani v preglednici 4.

Preglednica 3: Rezultati meritev absorbance za kontrolno raztopino in za vzorce, dobljen z vsemi tremi načini ekstrakcije. Prikazani so standardni odkloni za vse tri meritve vzorcev.

Vzorec	1. meritev	2. meritev	3. meritev	Povprečje	SD-st. odklon	RSD-relativni st. odklon
Kont.1	0,0014	0,0012	0,0013	0,0013	0,0001	8,410
Kont.2	0,0021	0,0024	0,0019	0,0021	0,0003	12,06
TM1	0,0112	0,0110	0,0116	0,0113	0,0003	3,00
TM2	0,0042	0,0041	0,0043	0,0042	0,0001	2,19
SOX1	0,0139	0,0159	0,0145	0,0147	0,0011	7,210
SOX2	0,0118	0,0114	0,0119	0,0117	0,0003	2,250
UZ1	0,0398	0,0397	0,0388	0,0394	0,0005	1,350
UZ2	0,0273	0,0272	0,0274	0,0273	0,0001	0,480

Preglednica 4: Izračunane vrednosti za množinsko koncentracijo PAC, masno koncentracijo PAC, maso uporabljenega ekstrakta, masno koncentracijo PAC v ekstraktu, masni delež PAC v ekstraktu in masni delež PAC v grozdnih peškah.

	Abs nm	c mol L ⁻¹	γ g L ⁻¹	m mg	$\gamma_{ekstr.}$ mg mL ⁻¹	$wPAC_{ekstr.}$	$wPAC_{mat.}$
TM1	0,0113	$3,25648 \cdot 10^{-7}$	0,000995475	50,46	5,046	0,197280	0,013481
TM2	0,0042	$1,21037 \cdot 10^{-7}$	0,000369999	50,45	5,045	0,073340	0,005272
SOX1	0,0147	$4,23631 \cdot 10^{-7}$	0,001294998	50,00	5,000	0,259000	0,027101
SOX2	0,0117	$3,37176 \cdot 10^{-7}$	0,001030713	50,31	5,031	0,204872	0,010244
UZ1	0,0394	$1,13545 \cdot 10^{-6}$	0,003470947	50,51	5,051	0,687180	0,109949
UZ2	0,0273	$7,86744 \cdot 10^{-7}$	0,002404996	50,51	5,051	0,476143	0,067691

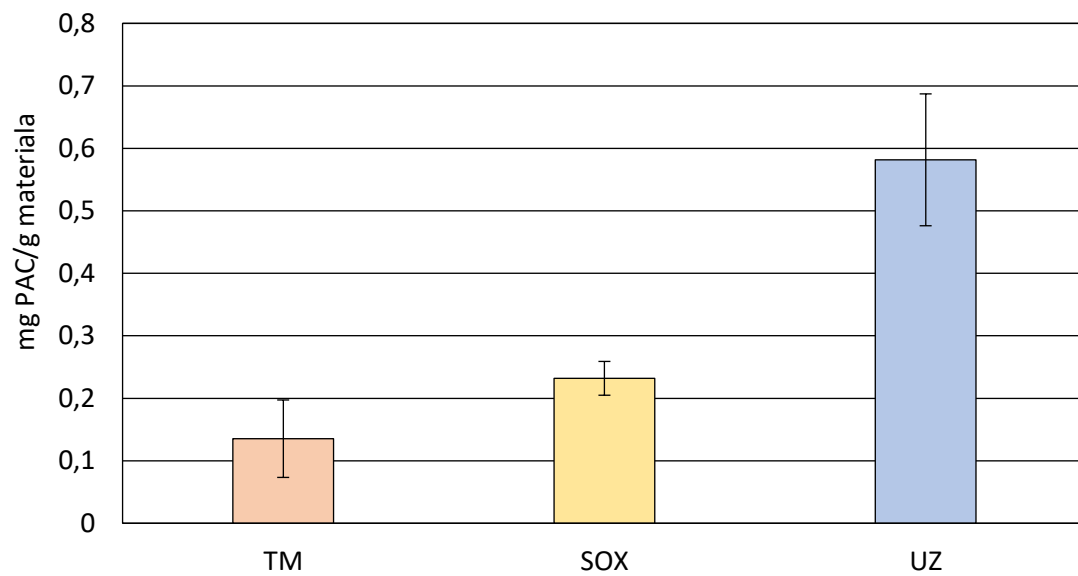
Iz izračunanih masnih deležev proantocianidinov v mg na g ekstrakta sva za vsako metodo ekstrakcije izračunale povprečne vrednosti PAC v gramu ekstrakta ter standardni odklon (SD) (Preglednica 5).

Preglednica 5: Masni deleži PAC v miligramih v gramu ekstrakta za različne metode ekstrakcije: MT, SOX in UZ. Njihove povprečne vrednosti in SD-standardni odklon.

Ekstrakcijska metoda	mg PAC / g ekstrakta	Povprečna vrednost	SD
M1	0,197280	0,135309889	0,061970063
M2	0,073340		
SOX1	0,259000	0,231935962	0,027063634
SOX2	0,204872		
UZ1	0,687180	0,581661377	0,10551878
UZ2	0,476143		

Povprečne vrednosti masnih deležev PAC in standardni odklon sva predstavili grafično (Slika 19) kjer lahko nazorno vidimo razliko v deležu PAC v različnih ekstraktih.

Največji delež ekstrakta sva dobili z ultrazvočno ekstrakcijo. Delež PAC je v ekstraktu, dobljen z ultrazvočno ekstrakcijo 2,5-krat večji od deleža PAC v ekstraktu, ki je bil dobljen z ekstrakcijo po Soxhletu in 4,3-krat večji od deleža PAC v ekstraktu, ki sva ga dobile s toplo maceracijo.



Slika 19. Prikaz deleža PAC v mg na gram ekstrakta za vse tri metode ekstrakcije: SOX- ekstrakcija po Soxhletu, UZ ultrazvočna ekstrakcija in TM – topla maceracija.

6. ZAKLJUČEK

Človek že od nekdaj izkorišča naravne vire za pridobivanje hrane, energije in drugih snovi. Pri tem nastajajo stranski produkti, ki jih pogosto ne znamo učinkovito uporabiti ali pa predstavljajo vir onesnaževanja okolja. V zadnjem času se povečuje obseg raziskav, katerih cilj je optimizacija uporabe teh odpadkov, ne le kot vira energije s termično obdelavo, temveč tudi kot surovine za nove produkte.

Na podlagi teh izhodišč sva se osredotočili na odpadke, ki nastajajo pri predelavi grozdja v vino in druge produkte. Grozdne tropine predstavljajo približno 20 % mase grozdja, kar ob upoštevanju globalne in regionalne proizvodnje grozdja predstavlja znaten obseg odpadnega materiala. Ker ta material vsebuje bioaktivne komponente, sva raziskovali možnost uporabe grozdnih pešk za proizvodnjo prehranskega dopolnila.

Ker so grozdne jagode bogate z antioksidanti, sva se osredotočili na ekstrakcijo proantocianidinov (PAC). Za ekstrakcijo sva uporabili etanol kot topilo in primerjali učinkovitost treh metod ekstrakcije: (i) topla maceracija, (ii) ekstrakcija s pomočjo Soxhletovega aparata in (iii) ultrazvočna ekstrakcija.

Grozdnje peške sva pred ekstrakcijo liofilizirali. Po ekstrakciji sva topilo odstranili z rotacijskim vakuumskim uparjalnikom. Količino PAC v ekstraktu sva določili spektrofotometrično na podlagi reakcije PAC z železovimi(2+) ioni.

Rezultati so pokazali, da je bila najučinkovitejša ultrazvočna ekstrakcija ($w = 0,5817$), sledila je Soxhletova ekstrakcija ($w = 0,2319$), najmanj PAC pa sva pridobili s toplo maceracijo ($w = 0,1353$). Pri manj učinkovitih metodah bi bilo smiselno optimizirati parametre, kot so število ciklov ekstrakcije (Soxhletova ekstrakcija) ter temperatura in čas ekstrakcije (topla maceracija). S tem pa sva tudi potrdile svojo hipotezo, da bo ultrazvočna ekstrakcija najučinkovitejša, najmanj pa topla maceracija.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo priporočljivo preučiti vpliv drugih parametrov, kot so koncentracija topila in uporaba alternativnih topil, ki morajo biti varna za uporabo v prehrani ali kozmetiki.

Raziskava je pokazala potencial uporabe grozdnih pešk kot vira prehranskega dopolnila. Poudariti je treba, da je bilo topilo mogoče večkrat uporabiti, kar je ekonomsko in okoljsko ugodno. Kljub temu, da je bil ekstrakt PAC namenjen uporabi kot prehransko dopolnilo, priporočava uživanje teh koristnih snovi predvsem v svežem sadju in zelenjavi. Uživanje prehranskih dopolnil z antioksidanti je priporočljivo le v primeru bolezenskih stanj in po posvetu z zdravnikom.

7. LITERATURA

- ¹ Podbršček R. 2004. *In vino veritas*. *Revija Radar*, 313: 3-15
- ² Gupta M., Dey S., Marbaniang D., Pal P., Ray S., Mazumder B., *Grape seed extract: having a potential health benefits*, *J Food Sci Technol* 57 (2020) 1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04113-w>.
- ³ Bodi zdrava št. 9, 9.9.2019
- ⁴ Colnarič J., Vrabl S. 1991. *Vinogradništvo*. Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 327 str.
- ⁵ Cortese D. 2000. *Sadje-moč naravne hrane*. Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 317-317
- ⁶ Bravo, L. (1998). *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. <https://doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>. dostopano: december 2024.
- ⁷ Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). *Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 166-171.
- ⁸ Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). *Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 675-683.
- ⁹ Fernandes, A., Falcao, A. S., Silva, R. F., Gordo, A. C., Gama, M. J., Brito, M. A., & Brites, D. (2006). *Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin*. *Journal of Neurochemistry*, 96(6), 1667-1679.
- ¹⁰ Yu, S., Wang, X., He, X., Wang, Y., Gao, S., Ren, L., & Shi, Y. (2016). *Curcumin exerts anti-inflammatory and antioxidative properties in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+))-stimulated mesencephalic astrocytes by interference with TLR4 and downstream signaling pathway*. *Cell Stress Chaperones*, 21(4), 697-705. <https://doi:10.1007/s12192-016-0695-3>.
- ¹¹ Vrhovšek U. 2001. *Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov*. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-109
- ¹² T. Žitek, *Vpliv ekstraktov iz naravnih materialov na metabolno aktivnost človeških melanomskih celic (WM-266-4)*, (2018). <https://dk.um.si/lzpisGradiva.php?id=71742> (accessed May 21, 2019). dostopano: december 2024.
- ¹³ Pogačnik, L., Silva, Rui. (2020). *Polifenoli – med zaščito nevronov in potencialno toksičnostjo*. *Acta agriculturae Slovenica*. 115. 377. [10.14720/aas.2020.115.2.1472](https://doi.org/10.14720/aas.2020.115.2.1472).
- ¹⁴ Virmani, A., Pinto, L., Binienda, Z., & Ali, S. (2013). *Food, nutrigenomics, and neurodegeneration – neuroprotection by what you eat!* *Molecular Neurobiology*, 48(2), 353-362. <https://doi:10.1007/s12035-013-8498-3>. Dostopano: december 2024.
- ¹⁵ D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. *Annali dell'Istituto Superiore Sanita*, 43(4), 348-361.
- ¹⁶ Lorenzo, J. M., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Marszalek, K., Es, I., Munekata, P. E. S., . . . Barba, F. J. (2019). *Understanding the potential benefits of thyme and its derived products for food industry and consumer health: From extraction of value-added compounds to the evaluation of*

bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2879-2895. <https://doi:10.1080/10408398.2018.1477730>. Dostopano: december 2024.

¹⁷ Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Duburdieu D. 2000. *Handbook of enology. Volume 2. The chemistry of wine stabilization and treatments*. Chichester, John Wiley & Sons: 353-393.

¹⁸ Marranzano, M., Rosa, R. L., Malaguarnera, M., Palmeri, R., Tessitori, M., & Barbera, A. C. (2018). Polyphenols: Plant Sources and Food Industry Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 24(35), 4125-4130. <https://doi:10.2174/1381612824666181106091303>. Dostopano: december 2024.

¹⁹ Fathi, F; Kouchaksaraee, RM; Ebrahimi, SN; Costa, ASG; Souto, EB; Prior, JAV; Oliveira, MBPP; Alves, RC. 2023. Enhanced-release of phenolic-enriched grape seed antioxidants through innovative cholesterol doped phytosomes. *SUSTAINABLE MATERIALS AND TECHNOLOGIES*, 37, DOI:10.1016/j.susmat.2023.e00673.

²⁰ Buddhisuharto, A. K., Pramastya, H., Insanu, M. & Fidrianny, I. (2021). An updated review of phytochemical compounds and pharmacology activities of artocarpus genus. *Biointerface Research1 in Applied Chemistry*, 11(6), 14898-14905. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1489814905>. Dostopano: december 2024.

²¹ Palwankar, S., Kale, P., Kadu, P. & Prabhavalkar, K. (2020). Assessment of antidiabetic activity of combination of *Murraya koenigii* leaves extract and *Vitis vinifera* seeds extract in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 1 9(1), 79-85. https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_50_19.

²² Barriga-Sánchez, M., Hiparraguirre, H. C. & Rosales-Hartshorn, M. (2022). Chemical composition and mineral content of Black Borgoña (*Vitis labrusca* L.) grapes, pomace and seeds, and effects of conventional and non-conventional extraction methods on their antioxidant properties. *Food Science and Technology1 (Brazil)*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.120021>. Dostopano: december 2024.

²³ Mollica, A., Scioli, G., Valle, A. Della, Cichelli, A., Novellino, E., Bauer, M., Kamysz W., Llorent-Martínez, F. J., Córdova, M. I. F. De, Castillo-López, R., Ak, G., Zeng in, G., Pieretti, S. & Stefanucci, A. (2021). Phenolic analysis and in vitro biological activity of red wine, pomace and grape seeds oil derived from *vitis vinifera* Cv. montepulciano d'abruzzo. *Antioxidants*, 10(11), 1-17. <https://doi.org/10.3390/antiox10111704>. Dostopano: december 2024.

²⁴ Sabra, A., Netticadan, T. & Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry: X*, 12, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>. Dostopano: december 2024.

²⁵ Kupe, M., Karatas, N., Unal, M. S., Ercisli, S., Baron, M. & Sochor, J. (2021). Nutraceutical and functional properties of peel, pulp, and seed extracts of six 'köhnü' grape clones. *Horticulturae*, 7(10), 1-15. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100346>.

²⁶ Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, 2015; 138-177.

²⁷ Pisoschi A M, Pop A: The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal Of Medicinal Chemistry* 2015; 97: 55-74.

²⁸ Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N: Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research* 2013; 7 (9):828-835.

²⁹ http://www.happi.com/issues/2013-12/view_features/the-role-of-antioxidants-in-dermatological-cosmetic-formulas, dostopano: december 2024.

³⁰ Članek: Antioxidants <https://nutritionsource.hsph.harvard.edu/antioxidants/>. Dostopano: december 2024.

- ³¹ Andrei A. Bunaciu, Andrei Florin Danet, Serban Fleschin & Hassan Y. Aboul-Enein (2015): *Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay*, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, DOI: 10.1080/10408347.2015.1101369.
- ³² Liu, R.H. *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action*. *J. Nutr.*, 2004, 134, 3479S–3485S.
- ³³ Harborne, J.B.; Williams, C.A. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* **2000**, 55, 481-504.
- ³⁴ Cheynier, V. *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 223S-229S.
- ³⁵ Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007) *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 950–988. doi:10.3390/i8090950
- ³⁶ Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. *Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health*. *J Nutr Biochem*. 2013 Aug;24(8):1415-22. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001. PMID: 23849454.
- ³⁷ Kim, K.-H.; Tsao, R.; Yang R.; Cui, S.W. *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions*. *Food Chem.* **2006**, 95, 466-473.
- ³⁸ Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747
- ³⁹ Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI (2003). *Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruptions of the bilayer structure*. *Free Radical Biology & Medicine* 34(1): 84-92.
- ⁴⁰ Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K (1999). *Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid*. *Free Radical Biology & Medicine* 27(11/12): 1313-1323.
- ⁴¹ Tourino S, Selga A, Jimenez A et al. (2005). *Procyanidin fractions from Pine (Pinus Pinaster) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells*. *J Agric Food Chem* 53: 4728-4735.
- ⁴² Prijatelj N (2005). *Farmakognozija. Kemijska struktura naravnih spojin: učbenik za 4. letnik programa farmaceutski tehnik – 1. izdaja*, DZS, Ljubljana:82 - 86
- ⁴³ Wang, H.; Murphy, P.A. *Isoflavone content in commercial soybean foods*. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1666-1673.
- ⁴⁴ Tsao, R.; Papadopoulos, Y.; Yang, R.; Young, J.C.; McRae, K. *Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages*. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 5797-5805.
- ⁴⁵ Tsao R. *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231. Epub 2010 Dec 10. PMID: 22254006; PMCID: PMC3257627.
- ⁴⁶ Zhao, F.; Watanabe, Y.; Nozawa, H.; Daikonya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S. *Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from Hops (Humulus lupulus)*. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 43-49.
- ⁴⁷ Tsao, R.; McCallum, J. *Chemistry of Flavonoids*. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*; de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., Eds.; Blackwell Publishing: Ames, IA, USA, 2009; Chapter 5, pp. 131-153.
- ⁴⁸ Grayer, R.J.; Veitch, N.C. *Flavanones and dihydroflavonols*. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 918-1002.

- ⁴⁹ Nurhan Unusan, *Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry*, *Journal of Functional Foods*, let. 67, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620300852>. Dostopano: december 2024.
- ⁵⁰ Nurhan Unusan, *Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry*, *Journal of Functional Foods*, let. 67, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620300852>. Dostopano: december 2024.
- ⁵¹ Anderson, O.M.; Jordheim, M. *The anthocyanins*. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 472-551.
- ⁵²Vir:<https://mcusercontent.com/79e0063bc8942c5a52cf2defc/images/2056f0c4-a0dd-4a7a-bddd-cb1e95b13f48.png>. Dostopano: december 2024.
- ⁵³ Davis, C.B.; Markey, C.E.; Busch, M.A.; Busch, K.W. *Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5925-5933.
- ⁵⁴Vir:<https://mcusercontent.com/79e0063bc8942c5a52cf2defc/images/2056f0c4-a0dd-4a7a-bddd-cb1e95b13f48.png>. Dostopano: december 2024.
- ⁵⁵ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2852857/>. Dostopano: december 2024.
- ⁵⁶ Vir: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2852857/table/t1-ijms-11-00622/>. Dostopano: december 2024.
- ⁵⁷ S. Sahoo, N. Kumar, C. Bhattacharya, S. S. Sagiri, K. Jain, K. Pal, S. S. Ray in B. Nayak. *Organogels: Properties and Applications in Drug Delivery. Designed Monomers and Polymers*. (2012). <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1163/138577211X555721>.
- ⁵⁸ Duden, *Leksikon Kemija*, Tržič: Učila International, 2008.
- ⁵⁹ Knez, Ž., Škerget, M. *Navodila za vaje iz termodifuzijske tehnike*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2000.
- ⁶⁰ *Stearinska kislina (Stearic Acid)*. *FuturaNatura*. (2023). <https://www.futunatura.si/stearinska-kislina>. Dostopano: december 2024.