

Određivanje stupnja polimerizacije proantocijanidina sjemenki grožđa floroglucinolom

Blašković, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:896021>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Jelena Blašković

**ODREĐIVANJE STUPNJA POLIMERIZACIJE PROANTOCIJANIDINA
SJEMENKI GROŽĐA FLOROGLUCINOLOM**

Završni rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Jelena Blašković

**ODREĐIVANJE STUPNJA POLIMERIZACIJE PROANTOCIJANIDINA
SJEMENKI GROŽĐA FLOROGLUCINOLOM**

Završni rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, 2022., pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Ljubenkova, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja Prvostupnik/prvostupnica Biologije i kemije.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

ODREĐIVANJE STUPNJA POLIMERIZACIJE PROANTOCIJANIDINA SJEMENKI GROŽĐA FLOROGLUCINOLOM

Jelena Blašković

Proantocijanidini iz sjemenki grožđa su polimerni fenolni spojevi koji imaju blagotvoran učinak na čovjekovo zdravlje. Najpoznatiji su po svom antioksidativnom svojstvu, a štite od bolesti tako što smanjuju količine slobodnih radikala u organizmu koji oštećuju stanice. Njihova svojstva su u mnogome određena su stupnjem polimerizacije odnosno brojem monomernih jedinica od kojih su sastavljeni. Ispitana je metoda određivanja stupnja polimerizacije proantocijanidina iz sjemenki grožđa floroglucinolom umjesto benzil merkaptana, koji je izrazito neugodnog mirisa i nezgodan za korištenje. Postupak s floroglucinolom ne zahtjeva rad u digestoru niti posebnu opremu. Uzorci su bile sjemenke autohtonih hrvatskih sorti grožđa Plavca malog, Crljenka i Babića. Uzorci su analizirani korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te je iz tih podatak izračunat stupanj polimerizacije proantocijanidina. Uzorci su analizirani korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

Ključne riječi: proantocijanidini, HPLC kromatografija, floroglucinol, stupanj polimerizacije

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: [22] stranica, [7] grafičkih prikaza, [5] tablica i [24] literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Ivica Ljubenkov, izvanredni profesor

Ocjenjivači: Izv.prof.dr.sc. Ivica Ljubenkov, izvanredni profesor

Izv.prof.dr.sc. Renata Odžak, izvanredni profesor

Izv.prof.dr.sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: [dan] [Rujan] [2022]

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Chemistry
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

B. Sc. Thesis/Diploma Thesis

DETERMINATION OF THE POLYMERIZATION DEGREE OF PROANTHOCYANIDINS FROM GRAPE SEEDS WITH PHLOROGLUCINOL

Jelena Blašković

Proanthocyanidins from grape seeds are polymeric phenolic compounds that have a beneficial effect on human health. They are best known for their antioxidant properties, protecting against disease by reducing the amount of free radicals in the body that damage cells. Their properties are largely determined by the degree of polymerization, that is, by the number of monomer units of which they are composed. The method for determination of the polymerisation degree of proanthocyanidins from grape seeds with phloroglucinol instead of benzyl mercaptan, which has an extremely unpleasant smell and is inconvenient to use, was examined. The procedure with phloroglucinol does not require a digester or special equipment. The samples were seeds of indigenous Croatian grape varieties Plavac mali, Crljenak and Babić. The samples were analyzed using high performance liquid chromatography and the degree of polymerization of proanthocyanidin was calculated from these data.

Keywords: proanthocyanidins, HPLC chromatography, phloroglucinol

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: [22] pages, [7] figures, [5] tables and [24] references, original in: Croatian

Mentor: Ivica Ljubenković, Ph.D. Associate Professor

Reviewers: Ivica Ljubenković, Ph.D. Associate Professor

Renata Odžak, Ph.D. Associate Professor

Stjepan Orhanović, Ph.D. Associate Professor

Thesis accepted: [September] [day] [2022]

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PROANTOCIJANIDINI.....	2
2. 1. Kemijska struktura, biosinteza i transport proantocijanidina.....	2
2. 2. Utjecaj proantocijanidina na zdravlje čovjeka.....	4
3. KROMATOGRAFIJA.....	6
3. 1. Uvod u tehniku kromatografije.....	6
4. HPLC KROMATOGRAFIJA.....	7
4. 1. Uvod u rad sa HPLC kromatografijom.....	7
4. 2. Dijelovi HPLC uređaja.....	7
5. EKSPERIMENTALNI RAD.....	8
5. 1. Cilj eksperimentalnog rada.....	8
5. 2. Priprema otopina.....	10
5. 3. Ekstrakcija proantocijanidina.....	11
5. 4. Postupak sa floroglucinolom.....	11
5. 5. Uređaj i uvjeti kromatografije.....	11
6. REZULTATI EKPERIMENTALNOG RADA I RASPRAVA.....	12
7. ZAKLJUČAK.....	19
8. LITERATURA.....	20

1. UVOD

Proantocijanidini su oligomerni i polimerni tanini, pripadaju velikoj skupini bio flavonoida. Svaka biljka izložena utjecaju okoliša razvija vlastiti obrambeni mehanizam kako bi se zaštitila. Primarna uloga proantocijanidina u biljnim stanicama je zaštita biljke od oštećenja. U stanicama biljaka koje su izložene stresu dolazi do povećane sinteze reaktivnih dušikovih i kisikovih spojeva koje mogu oštetiti strukturu i funkciju molekula važnih za metabolizam (proteina i lipida). Kako bi stanica neutralizirala povećanu sintezu ovih štetnih spojeva, aktiviraju se razni mehanizmi koji uključuju bio sintezu antioksidansa (askorbinska kiselina, flavonoli, glutationi, pigmenti itd). Biljna stanica, za razliku od životinjske, ima veću vakuolu u kojoj se nakupljaju navedeni antioksidansi, uključujući i proantocijanidine. Proantocijanidini se primarno nalaze u stanicama lista biljke, egzokarpu plodova i njihovim sjemenkama. Sve je više dokaza koji ukazuju na pozitivan učinak proantocijanidina na ljudski organizam. Štite organizam od bolesti zahvaljujući njihovim reducirajućim svojstvima, sposobnosti vezanja određenih proteina, pa čak imaju i važan utjecaj u promjeni genske ekspresije specifičnih gena koji su vezani za regulaciju proliferacije oštećenih i potencijalno kancerogenih stanica. Također, poznato je da smanjuju koncentraciju slobodnih radikala, zaustavljaju njihovo umnožavanje te vežu metale kako bi smanjili njihov razarujući učinak na organizam, pružajući čak i učinkovitiju zaštitu od oksidativnog stresa od vitamina C, E te β -karotena (Han et al. 2007). Poznata su i njihova protuupalna svojstva. Zbog njihovog pozitivnog učinka na čovjekovo zdravlje ispitali smo proantocijanidine sjemenki autohtonih hrvatskih sorti grožđa.

PROANTOCIJANIDINI

2. 1. Kemijska struktura, biosinteza i transport proantocijanidina

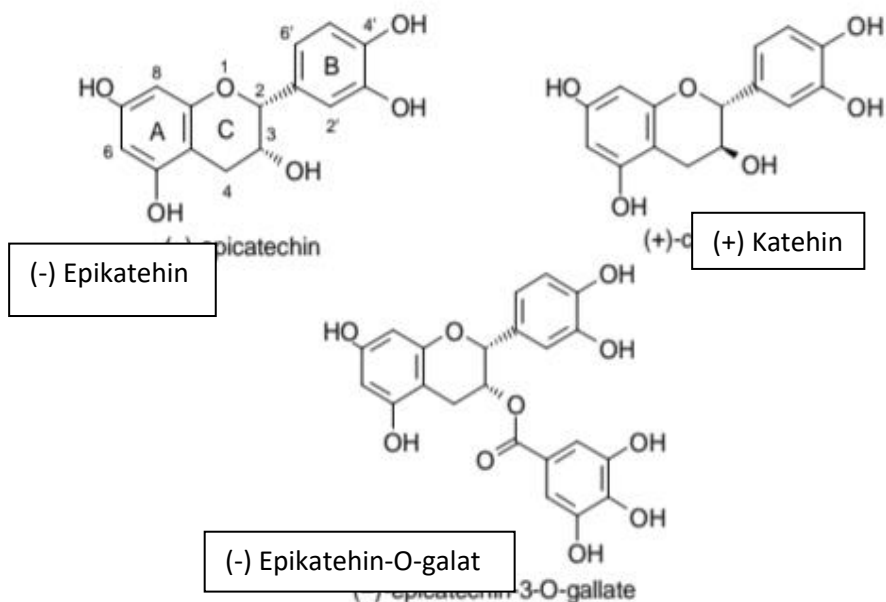
Proantocijanidini su oligomeri i polimeri nastali kondenzacijom flavan-3-ol podjedinica. Flavan-3-ol podjedinice u proantocijanidinima vina čine katehin, epikatehin i epikatehin-galat, (Slika 1). Oligomeri nastaju udruživanjem od 2 do 5 flavan-3-ol podjedinica, dok su polimeri mnogo veći te nastaju udruživanjem od 6 do 60 flavan-3-ol podjedinica. Od ostalih flavonoida razlikuju se po broju i položaju hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu. Još jedan važan faktor po kojem se razlikuju je stereokemija. S obzirom da su tri ugljikova atoma (C2, C3 i C4) u prstenu asimetrična, pokazuju različite apsolutne konfiguracije. Smatralo se da je na drugom ugljikovom atomu (C2) atomu moguća jedino R konfiguracija, međutim, iako je to njegova najčešća konfiguracija pronađena u prirodi, dokazano je da se pojavljuje i u S konfiguraciji. Kada se ugljikov atom C2 pojavljuje u R konfiguraciji, u nomenklaturi se njegovom nazivu se dodaje prefiks „-ent”. S obzirom da su proantocijanidini nastali polimerizacijom, važan nam je podatak o stupnju polimerizacije (DP, engl. *Degree of polymerisation*) koji nam daje informaciju o broju gradivnih jedinica proantocijanidina. Spojevi s niskim stupnjem polimerizacije su oligomeri, lako su topljivi, dok su polimeri spojevi s visokim DP te stvaraju čvrste filmove i nisu lako topljivi. Polimerizacija spomenutih podjedinica još nije potpuno razjašnjena, ne zna se da li je taj proces potpuno spontan ili uključuje određene enzime.

Proantocijanidini se akumuliraju u epidermalnim stanicama biljaka, a njihova količina se povećava tijekom zrenja plodova. Sastav flavan-3-ol monomera i terminalnih jedinica promjenjiv je tijekom zrenja plodova, dok sastav jedinica koje čine polimer (engl. *extension units*) ostaje isti (Kennedy i Jones, 2000). U nekim radovima je opisano kako visoka temperatura potiče degradaciju polimera proantocijanidina (Danışman et al., 2015). Kromatografske metode za analiziranje proantocijanidina dijele se na one koje analiziraju čitave spojeve te na one koje koriste hidrolizu kataliziranu kiselinom. Kada je spoj čitav, možemo dobiti informaciju o prosječnoj molekularnoj težini te koliko je zastupljen u masi uzorka. Analiza hidroliziranih proantocijanidina nam govori od koliko i od kojih se podjedinica polimer sastoji te možemo odrediti i njihov udio. Prilikom kiselinsko katalizirane hidrolize, proantocijanidini se depolimeriziraju i oslobađaju terminalne podjedinice kao flavan-3-ol monomere te podjedinice koje čine polimer (engl. *extension units*) u obliku elektrofilnih flavan-3-ol intermedijara koji reagiraju sa nukleofilom. Dva najčešće korištena nukleofila su floroglucinol i benzil merkaptan.

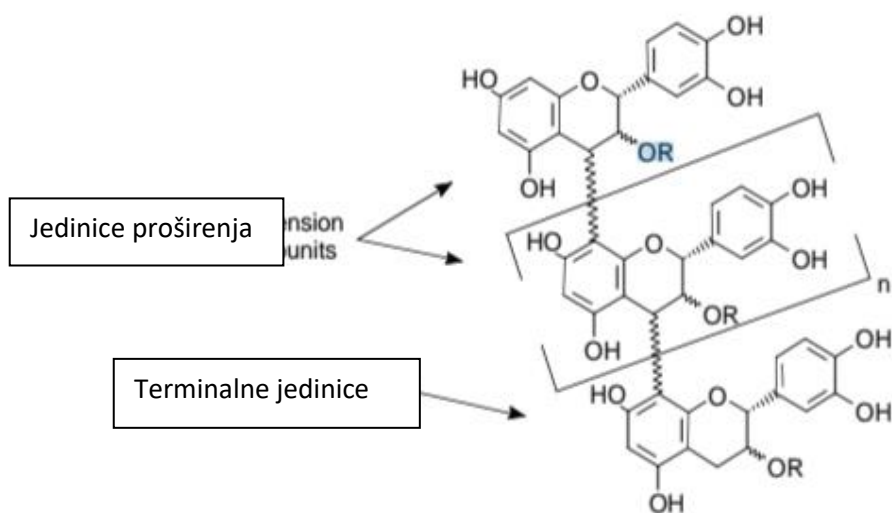
Kennedy et al.

Flavan-3-ol monomeri

Flavan-3-ol monomers



General procyanidin structure



Slika 1. Opća struktura proantocijanidina i flavan-3-ol monomera

Biosinteza flavan-3-ol podjedinica je zahtjevan proces koji se može odvijati u tri različita smjera te uključuje oko 20-ak različitih enzimski kataliziranih reakcija. Ti procesi se odvijaju na citosolnoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma biljnih stanica.

Pretpostavka je da dolazi do transporta flavan-3-ol podjedinica u vakuolu stanice gdje se odvija formiranje proantocijanidina. Točan mehanizam njihovog prijenosa nije utvrđen, ali postoji nekoliko hipoteza. Jedna od značajnih hipoteza pretpostavlja da dolazi do nastanka vezikula na hrapavom endoplazmatskom retikulumu koje prenose podjedinice do cis strane Golgijevog aparata, a njihov sadržaj oslobađa se u lumen samog aparata. Pretpostavlja se da se podjedinice prenose trans stranom Golgijevog aparata do vakuole. Ovaj proces, poznat pod nazivom „trans-Golgijeva mreža“ je tipičan kako za biljne, tako i za životinjske stanice, a služi za unutarstanični prijenos primarnih i sekundarnih metabolita. Druga hipoteza o transportu flavan-3-ol podjedinica uključuje glutation S-transferazu (GST) kao posrednika. GST su enzimi poznati po tome što se povezuju s detoksicirajućim i antioksidativnim svojstvima u biljaka i životinja.

2. 2. Utjecaj proantocijanidina na zdravlje čovjeka

Polifenoli su najpoznatiji biološki aktivni spojevi u grožđu s poznatim antioksidativnim djelovanjem. Grožđe je najbogatiji izvor polifenola u odnose na druge plodove voća, a čak 60-70% ih se nalazi u sjemenkama (Xia et al., 2010). Fenolni metaboliti utječu na smanjenje oksidativnog stresa u stanicama. Kada su stanice izložene oksidativnom stresu, podložnije su nizu degenerativnih promjena. Dolazi do niza patoloških promjena: neurodegenerativnih bolesti, dijabetes, tumori, kardiovaskularnih oboljenja.

- Oksidativni stres

Tretman antioksidansima je jedan od najboljih načina za borbu protiv oksidativnog stresa. Antioksidansi smanjuju utjecaj oksidativnog stresa na nekoliko načina. Jedan od mehanizama smanjenja oksidativnog stresa je stabilizacija slobodnih radikala doniranjem elektrona sa hidroksi skupine fenola. Dokazano je in vivo da konzumacija praha grožđa smanjuje oksidativni stres i njegov razarajući utjecaj na organizam (Choi et al., 2012).

- Protuupalno djelovanje

Pojava upalnih procesa u organizmu je način zaštite tkiva od ozljeda stanica, patogena te iritacije. Ako se upalni procesi nastave kroz neko vrijeme, može se razviti kronično upalno stanje, što je jedan od glavnih razloga razvoja kroničnih bolesti. Polifenoli iz grožđa dokazano smanjuju upalne procese tako što moduliraju put kojim nastaju upalni procesi. Proantocijanidini iz grožđa djeluju protuupalno tako što utječu na količinu slobodnih radikala te sprječavaju peroksidaciju lipida te inhibiraju citokinezu stanica koje sudjeluju u upalnom

procesu (Li et al., 2001). Proantocijanidini ekstrahirani iz grožđa utječu na imunološki sustav prilikom upale tako što potiče produkciju prostagladina E2 (Terra et al., 2007).

- Antibakterijsko djelovanje

Dokazano je da ekstrakt iz sjemenki grožđa pokazuje jako antibakterijsko djelovanje protiv Gram pozitivnih bakterija u odnosu na Gram negativne (Jayaprakasha et al., 2003). Ekstrakti iz soka i sjemenki grožđa dokazano inhibiraju rast bakterije *Listeria monocytogenes* (Rhodes et al., 2006). Najvažniji aktivni spojevi su katehin, epikatehin i epikatehin galat (Anastasiadi et al., 2009).

- Utjecaj na tkiva unutarnjih organa

Dokazan je i pozitivan utjecaj na smanjenje disfunkcije endotela krvnih žila, koja je direktno povezana sa razvojem ateroskleroze i hipertenzije, te smanjuje oksidaciju LDL-a. Konzumacija produkata grožđa ima i značajan pozitivan utjecaj na funkciju mozga i središnjeg živčanog sustava (Tsuda, 2012). Katehin i epikatehin imaju značajan utjecaj na razgradnju tvorbi koje se javljaju u mozgu prilikom Alzheimerove bolesti (Ksiezak-Reding et al., 2012). Antikancerogena svojstva objašnjena su mješavinom polifenolnih spojeva sa različitim biološkim aktivnostima (Zhou i Raffoul, 2010). Tretman kancerogenih stanica gušterače čovjeka s proantocijanidinima iz sjemenki grožđa značajno je smanjio njihovu vijabilnost te čak inducirao njihovu apoptozu (Prasad i Katiyar, 2013). Ovim činjenicama dokazano je da proantocijanidini iz sjemenki grožđa koje nisu iskoristive pri proizvodnji vina imaju značajan pozitivan utjecaj na čovjekovo zdravlje.

3. KROMATOGRAFIJA

3. 1. Uvod u tehniku kromatografije

Uzorak koji se analizira u laboratoriju većinom je smjesa nekoliko komponenti koje je potrebno razdvojiti raznim tehnikama kako bi izdvojili potrebnu komponentu kojoj slijedi daljnja analiza. Jedna od metoda razdvajanja smjesa je kromatografija. To je metoda kemijske analize koja služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka u složenim smjesama, a temelji se na različitoj brzini kretanja pojedine komponente u uzorku kroz kromatografski sustav. Kromatografiju je otkrio ruski znanstvenik M. S. Tsweet, a naziv „Chromatography“ se sastoji od dvije riječi: „Chroma“ što na grčkom znači boja te „Graphein“ što na grčkom znači zapisivati. Svim kromatografskim metodama zajedničko je postojanje dvije faze: mobilna(pokretna) i stacionarna(nepokretna) faza te pojave razdiobe analita između dvije faze. Brzina putovanja pojedinih komponenti ovisi o jačini vezivanja komponente za stacionarnu fazu. Što je jača interakcija između stacionarne faze i komponente, duže je vrijeme zadržavanja u kromatografskom sustavu. Eluent je mobilna faza a može biti tekućina ili plin, ovisno o prirodi komponenata koje želimo razdvojiti. Eluat je mobilna faza u kojoj su sadržani spojevi koji se ispiru s kromatografske kolone. Kromatogram je vizualni prikaz rezultata kromatografskog razdvajanja. Kromatograf je naziv za uređaj na kojem provodimo kromatografiju. Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme je vrijeme koje je prošlo od početka eluiranja do potpunog eluiranja pojedine komponente s kolone. Mrtvo vrijeme je vrijeme potrebno da mobilna faza prođe uređaj i kolonu te dođe do detektora bez zadržavanja u koloni. Korigirano retencijsko vrijeme je vrijeme koje je potrebno da uzorak prođe kroz kolonu.

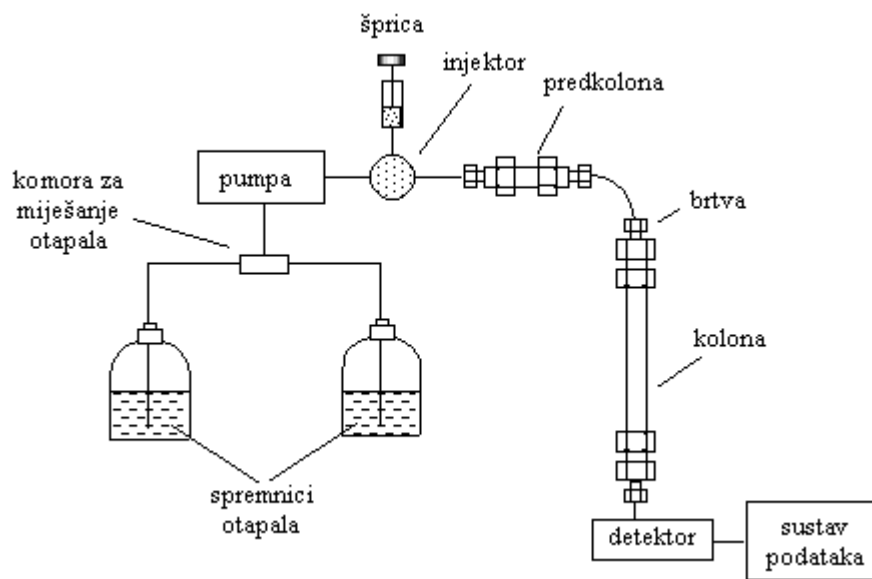
4. HPLC KROMATOGRAFIJA

4.1. Uvod u rad sa HPLC kromatografijom

HPLC ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*) je specifična vrsta kolonske kromatografije koja se koristi za razdvajanje, analizu i identifikaciju komponenti od interesa (analita). Postoje različite vrste HPLC kromatografije ovisno o polarnosti stacionarne faze. Kromatografija na normalnim fazama koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu, a koristi se kada je tvar koja se analizira polarna, te se adsorbira i zadržava na česticama stacionarne faze. Jačina adsorpcije je veća što je polarnost tvari veća, što izravno povećava vrijeme zadržavanja na koloni. Kromatografija na obrnutim fazama (engl. *Reversed phase*, RP) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu, a vrijeme zadržavanja je duže za manje polarne tvari. Vrijeme zadržavanja se povećava dodatkom polarnog otapala u mobilnu fazu, a smanjuje se dodatkom hidrofobnih otapala. RP-HPLC funkcionira na osnovu hidrofobnih interakcija nepolarne tvari i nepolarne stacionarne faze. Osim polarnosti mobilne faze i temperature na brzinu eluiranja utječe pH, čijim podešavanjem se utječe na polarnost analita.

4.2. Dijelovi HPLC uređaja

Osnovni dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (Slika 2). HPLC pomoću pumpe pokreće otapala (mobilnu fazu) kroz kromatografski sustav. Postoji više različitih vrsti pumpi, a zajedničko im je da svaka mora generirati veliki tlak kako bi otapalo moglo proći kroz kolonu punjenu sitnim česticama silika-gela. Injektor služi za ubrizgavanje uzorka u tok mobilne faze. Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće bez suspendiranih čestica. Ubrižgavanje se obavlja ručno ili pomoću auto-injektora. Sustav je dizajniran za ubrizgavanje 0,1 do 100 μL uzorka pod visokim tlakom. Kolona koja služi za razdvajanje uzoraka najčešće je metalna cijev, a njezino punjenje razlikuje se ovisno o vrsti kromatografije koju provodimo. Konačno, detektor je uređaj koji pretvara promjene neke mjerene vrijednosti (apsorpcija, fluorescencija, indeks prelamanja) mobilne faze u električni signal, povezan je s računalnim sustavom kojim se upravlja cijelim HPLC uređajem i koji prikazuje rezultate razdvajanja, na kromatogramu. Dva su tipa rada HPLC uređaja: Izokratno ili linearno-sastav eluenta je stalan tijekom cijele kromatografije i gradijentno-sastav eluenta se mijenja na programirani način.

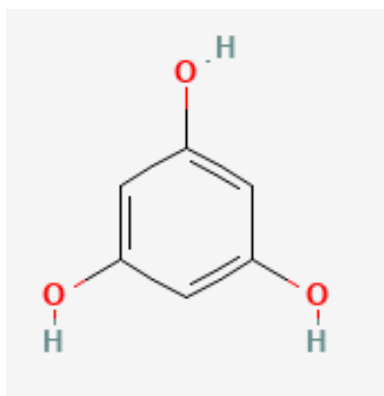


Slika 2. Prikaz dijelova HPLC uređaja

5. EKSPERIMENTALNI RAD

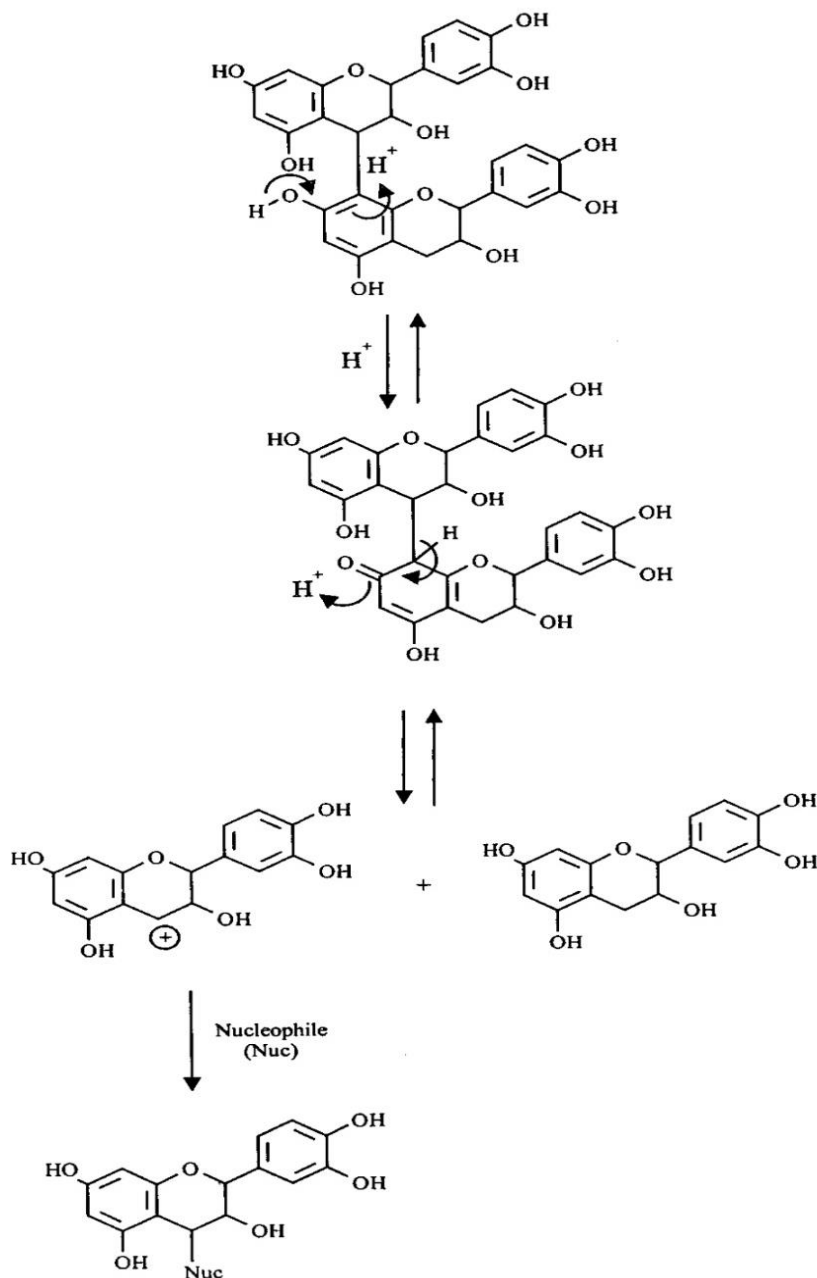
5.1. Cilj eksperimentalnog rada

Cilj ovog rada bilo je uvesti novu metodu za određivanje stupnja polimerizacije. Naime, metoda s benzil merkaptanom je problematična zbog njegovog neugodnog mirisa i otrovnosti. U ovom radu, koristili smo floroglucinol (Slika 3.) kao nukleofil za reakciju kiselo katalizirane hidrolize proantocijanidina, kako bi dobili podatak o broju podjedinica koji sadrži svaki polimer, (Slika 4). Floroglucinol (benzen-1, 3, 5-triol) je bijeli prah, a u prirodi se nalazi u smeđoj algi *Ecklonia cava* i u biljci *Alpinia blepharocalyx*. Floroglucinol kao nukleofil ima prednost jer nema neugodan miris i s time je lakši za korištenje, za razliku od benzil merkaptana.



Slika 3. Kemijska struktura floroglucinola

Uspješnost metode je određena njezinom reproducibilnošću i kvaliteti rezultata u odnosu na rezultate dobivene korištenjem benzil merkaptana. Također, tijekom nekoliko eksperimenata, pokazalo se da askorbinska kiselina pomaže povećati ponovljivost metode (Kennedy i Jones, 2001). Uzorci koje smo koristili u eksperimentalnom radu su sjemenke tri autohtone vrste grožđa sa različitih geografskih područja: Plavac-Komarna, Plavac-Pelješac, Babić-Šibenik i Crljenak-Kaštela.



Slika 4. Predloženi mehanizam za kiselo kataliziranu hidrolizu proantocijanidina.

5.2. Priprema otopina

Za postupak sa floroglucinolom smo pripremili sljedeće otopine:

- Otopina za ekstrakciju proantocijanidina: aceton:destilirana voda:octena kiselina (70:29,5:0,5;v/v/v)
- 0,1 g askorbinske kiseline te 0,5 g floroglucinola otopljeno je u 100 mL 0,1 M HCl u MeOH
- 0,04 M otopina NaAc za zaustavljanje reakcije

5.3. Ekstrakcija proantocijadinina

Od prethodno obrađenih sjemenki grožđa (odmašćene, osušene i usitnjene) odvagano je po 1,00 g uzorka u svaku epruvetu. Ukupno smo imali 4 uzorka u koje se dodaje po 5 mL otopine za ekstrakciju. Svaki uzorak smo vorteksirali po 2 minute te ostavili stajati 5 min kako bi se razdvojio talog sjemenki od supernatanta u kojem se nalaze i proantocijanidini. Supernatant je odekantiran u plastičnu špricu te je filtriran kroz syringe filter CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25, 0,45 μm . 100 μL uzorka smo prebacili u HPLC vial te razrijedili 10x s otopinom za ekstrakciju. Analizirali smo ih HPLC tehnikom kako bi odredili nevezani katehin, epikatehin i epikatehin galat. Njihove koncentracije su nam potrebne za izračun stupnja polimerizacije. Svaki uzorak je ekstrahiran 2 puta.

5.4. Postupak određivanja stupnja polimerizacije sa floroglucinolom

Ostatak ekstrakta prebačen je u Eppendorf plastične epruvete te su upareni na centrifugalnom uparivaču Jouan RC1022. Nakon uparavanja, na dnu je ostalo malo krutog uzorka. Epruvete smo vagali prije i nakon uparavanja kako bi dobili masu ekstrakta.

Tablica 1. Odvage krutih ostataka svih uzoraka

1	1-1	2	2-1	3	3-1	4	4-1
Crljenak-Kaštela	Crljenak-Kaštela	Babić-Šibenik	Babić-Šibenik	Plavac-Pelješac	Plavac-Pelješac	Plavac-Komarna	Plavac-Komarna
0,0224 g	0,0261 g	0,0199 g	0,0249 g	0,0171 g	0,0267 g	0,0184 g	0,0291 g

Kruti ostatak nakon uparavanja je otopljen u 1 mL metanola kako bi ga pripremili za postupak s floroglucinolom (derivatizacija). Pipetom je uzeto 200 μL ekstrakta te je dodano 1 mL otopine floroglucinola i askorbinske kiseline koji su otopljeni u 0,1 M HCl u metanolu. Tako pripremljeni ekstrakti su stavljeni u sušionik 25 min pri 50 °C. Reakcija se zaustavlja dodatkom 5 volumena otopine natrijeva acetata tj. 6 mL. Tako pripremljen uzorak je prebačen u bočice za HPLC te razdvojen po unaprijed unesenoj metodi.

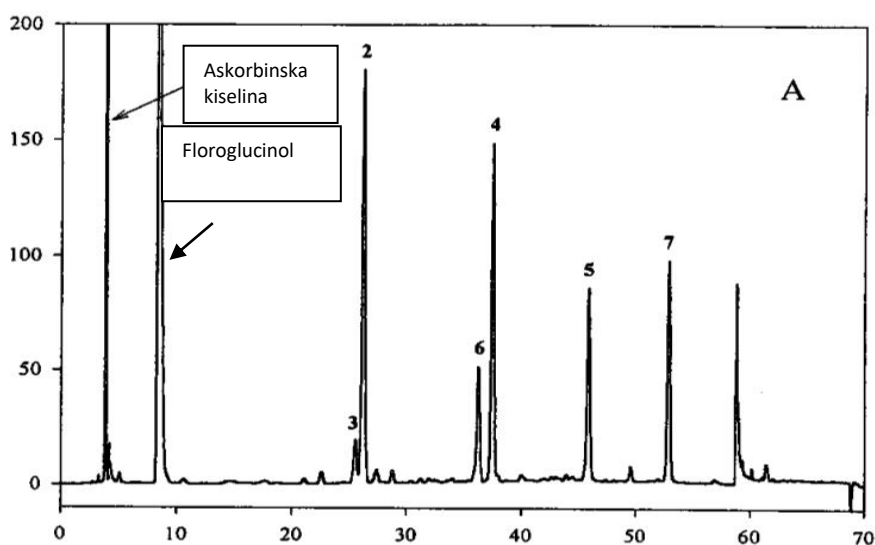
5.5. Uređaj i uvjeti kromatografije

Nederivatizirane uzorke koji su otopljeni u metanolu se razrijede kako bi dobili bolji signal te ih analizirali HPLC tehnikom kako bi utvrdili količinu nevezanog katehina, epikatehina i epigalokatehina slobodnog prije derivatizacije. Razdvajanje je provedeno na HPLC uređaju

PerkinElmer, Series 200. Koristili smo kolonu Restek Ultra Aqueous C18 (veličina čestica 5 μm , 250x4,6 mm). Prije samog nanošenja uzorka, potrebno je isprati kolonu sa otapalima koje ćemo koristiti za eluciju. Otopina A je voda s 0,25% HAc, a otopina B je acetonitril s 0,25% HAc. Temperatura je održavana pri 25 °C, protok je 1 mL/min a valna duljina detektora postavljena je na 280 nm. Trajanje svakog kromatografskog ciklusa je 65 min. Adukti floroglucinola analizirani su na istom uređaju i s istom kolonom kao i nederivatizirani uzorci. Uvjeti elucije su: protok mobilne faze 1,0 mL/min; 5% B 10 min, linearni gradijent od 20 do 40% B u 25 min. Valna duljina detektora postavljena je na 280 nm.

6. Rezultati eksperimentalnog rada i rasprava

Kromatografijom prije derivatizacije dobili smo podatak o slobodnoj količini katehina, epikatehina i epikatehin galata. Identificirali smo ih uspoređujući njihova retencijska vremena s retencijskim vremenima standarda. Nakon derivatizacije, kao produkte smo dobili slobodne terminalne jedinice (katehin, epikatehin i epikatehin galat) te njihove adukte s floroglucinolom iz polimernih proantocijanidina. Iste smo identificirali uspoređujući naše kromatograme s kromatogramima iz literature prikazani na slici 5, (Kennedy i Jones, 2001).



Slika 5. Kromatogram preuzet iz literature za identifikaciju spojeva nakon derivatizacije: 2) Epikatehin-floroglucinol, 3) Katehin floroglucinol, 4) Epikatehin-3-O-galat-floroglucinol 5) (+) Katehin, 6) (-) Epikatehin, 7) (-) Epikatehin-3-O-galat

Korištenjem računalnog programa smo odredili površine ispod krivulja integracijom (prije i nakon reakcije s floroglucionolom). U tablicama 3. i 4. nalaze se identificirane podjedinice prije i nakon derivatizacije poredane po rastućim retencijskim vremenima, kao i prethodno određene površine dobivene integracijom. Te smo površine koristili za račun stupnja polimerizacije. Za izračun stupnja polimerizacije potrebne su i molarne apsorbance koje su karakteristične za svaki spoj. Tablica istih je preuzeta iz rada Kennedy i Jones, 2001. Koncentracije su proporcionalne površini ispod svakog signala na kromatogramu.

Tablica 2. Molarne apsorbance za tražene proantocijanidine i njihove derivate

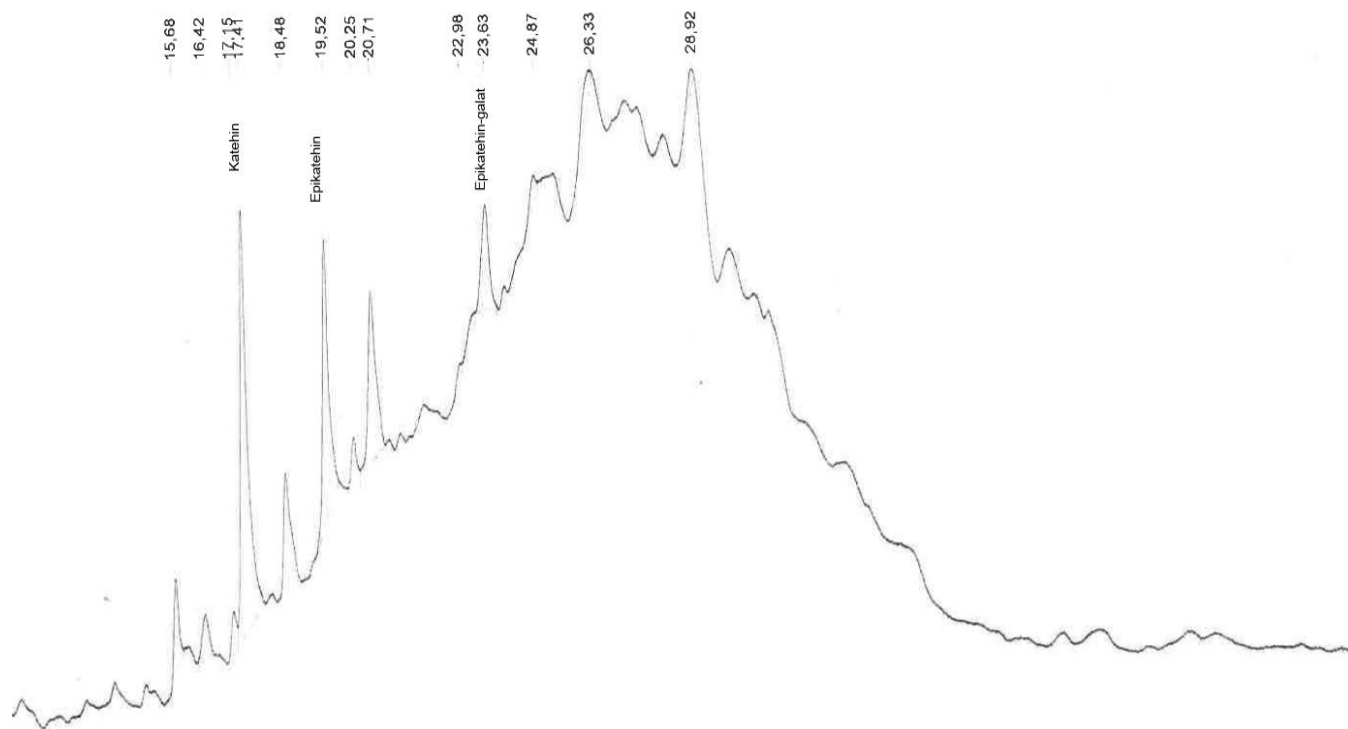
Naziv spoja	Molarna apsorbancija (ϵ 280)
Katehin	3988
Epikatehin	3988
Epikatehin galat	12611
Katehin-F	4218
Epikatehin-F	4218
Epikatehin-galat-F	14766

Tablica 3. Retencijska vremena i površina ispod krivulje za uzorak 1 prije derivatizacije

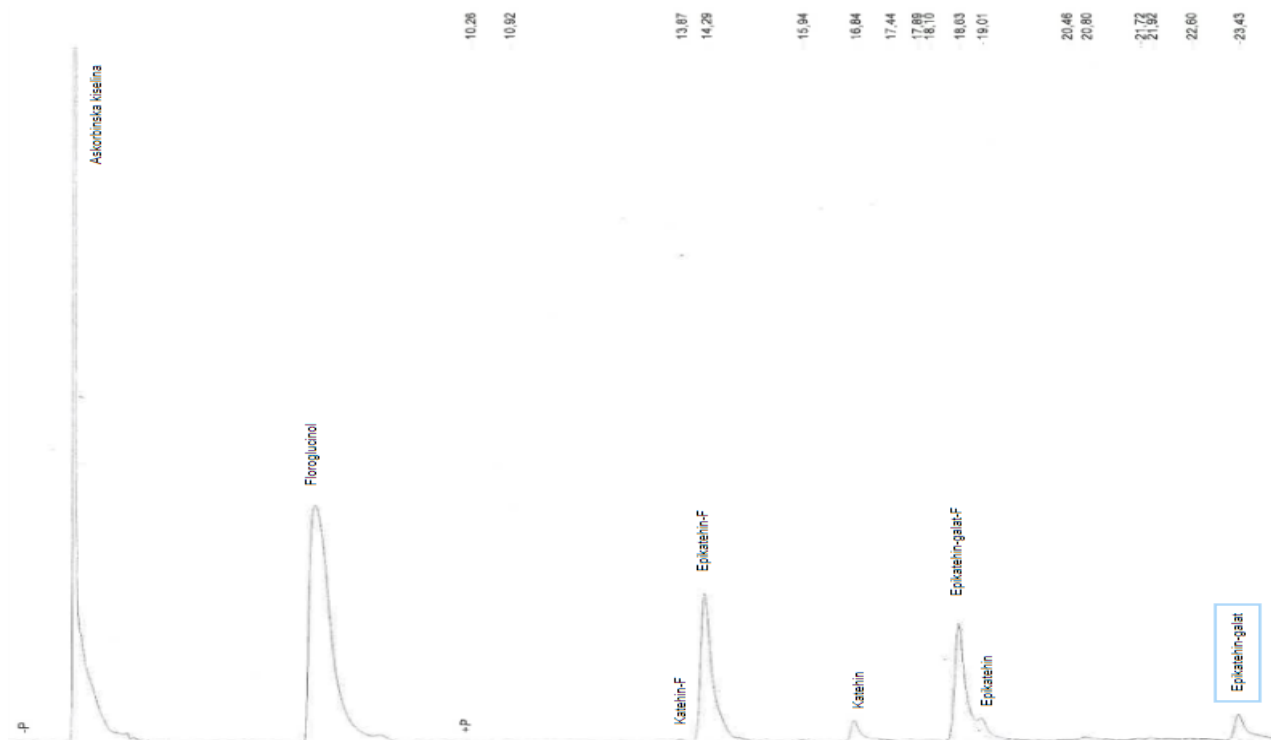
Spoj	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme	Površina ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Površina (%)
1	Katehin	17,150	4808,17	1,49
2	Epikatehin	19,520	39059,93	12,08
3	Epikatehin galat	23,628	17572,20	5,44

Tablica 4. Retencijska vremena i površina ispod krivulje nakon derivatizacije

Spoj	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme	Površina (uV*sec)	Površina (%)
1	Katehin-F	13,866	36196,45	0,77
2	Epikatehin-F	14,287	2064703,97	43,94
3	Katehin	16,841	194451,42	4,14
4	Epikatehin galat-F	18,625	1491401,98	31,74
5	Epikatehin	19,012	185281,85	3,94
6	Epikatehin galat	23,427	341431,02	7,27



Slika 6. Kromatogram prije derivatizacije s pripisanim signalima



Slika 7. Kromatogram nakon derivatizacije s pripisanim signalima

Stupanj polimerizacije, koji nam govori koliko je jedinica monomera u polimeru, računali smo prema formuli:

$$DP = \frac{\varepsilon(D) \cdot D + \varepsilon(E) \cdot E + \varepsilon(F) \cdot F + \varepsilon(a) \cdot a + \varepsilon(b) \cdot b + \varepsilon(c) \cdot c}{\varepsilon(a) \cdot a + \varepsilon(b) \cdot b + \varepsilon(c) \cdot c}$$

Gdje je:

DP- stupanj polimerizacije, engl. „*degree of polymerisation*“

a=A-A0-koeficijent tj. razlika površina signala katehina nakon i prije derivatizacije pomnožen s razrjeđenjem

b=B-B0- koeficijent tj. razlika površina signala epikatehina nakon i prije derivatizacije pomnožen s razrjeđenjem

c=C-C0- koeficijent tj. razlika površina signala epikatehin galata nakon i prije derivatizacije pomnožen s razrjeđenjem

D, E, F-oznake za površinu derivatiziranog katehina, epikateina i epikatehin galata pomnoženog s razrjeđenjem

Izračunali smo stupanj polimerizacije za svaki od uzoraka po navedenoj formuli. Računali smo stupanj polimerizacije tako što smo množili molarni apsorpcijski koeficijent svakog spoja s vrijednostima površine njegovog signala pomnožen sa razrjeđenjem. Rađena su paralelna injektiranja, pa smo tako imali po četiri rezultata za svaku sortu vinove loze. U tablici se nalaze stupnjevi polimerizacije za svaki uzorak, kao i njihov prosječni stupanj polimerizacije. Za uzorak Crljenak-Kaštela dobiven je najveća relativna standardna devijacija.

Tablica 5. Prikaz stupnjeva polimerizacije za svaki uzorak

Uzorak	DP1	DP2	DP'1	DP'2	Prosječni DP	RSD
Plavac-Komarna	6,69	7,17	6,70	7,19	6,94	3,1%
Plavac-Pelješac	5,46	4,83	5,59	5,85	5,43	6,17%
Crljenak-Kaštela	5,45	7,10	5,43	7,11	6,27	11,87%
Babić-Šibenik	5,63	4,84	5,63	4,84	5,23	6,7%

Naš prosječni DP je u rasponu od 5-7 što odgovara literaturnim podacima iz preglednog rada Monagas i suradnika, u kojem su navedeni stupnjevi polimerizacije proantocijanidina različitog voća određenih masenom spektrometrijom. U tom radu navedeni su podaci i za stupanj polimerizacije proantocijanidina iz sjemenki grožđa koji u širim granicama iznosi od 2 do 12. U užim granicama od 4 do 8 monomernih jedinica.

ZAKLJUČAK

Proantocijanidini su vrsta polifenolnih spojeva koji nastaju kondenzacijom flavan-3-ol podjedinica. Sjemenke grožđa bogate su proantocijanidinima i tijekom maceracije grožđa prelaze u vino te imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Flavan-3-ol monomerne jedinice u vinu su katehin, epikatehin i, epikatehin-galat. U ovom radu određen je stupanj polimerizacije proantocijanidina koji su razloženi na svoje podjedinice korištenjem floroglucinola umjesto benzil merkaptana koji je izrazito neugodnog mirisa i nezgodan za korištenje. Rezultati dobiveni analizom uzoraka korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC engl. *High performance liquid chromatography*) izračunat je stupanj polimerizacije. Analizirana su 4 uzorka sjemenki grožđa: Plavac-Komarna, Plavac-Pelješac, Babić-Šibenik i Crljenak-Kaštela. Stupanj polimerizacije dobiven ovim postupkom odgovara stupnju polimerizacije proantocijanidina vina iz literaturnih podataka.

LITERATURA

1. Anastasiadi M.; Chorianopoulos, N.G.; Nychas, G.-J.E.; Haroutounian, S.A. (2009). Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2), 457-463.
2. Choi, S.-K., Zhang, X.-H., Seo, J.-S. (2012). Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. *Nutrition research and practice*, 6 (1), 3–8.
3. Danişman G., E. Arslan, A.K. Toklucu. (2015). Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in grape juice during heating. *Czech J. Food Sci.*, 33, 103-108.
4. Han, X., Shen, T. i Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8, 950–988.
5. Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakariah, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 36 (2), 117-122.
6. Karonen, M., Leikas, A., Loponen, J., Sinkkonen, J., Ossipov, V. i Pihlaja, K. (2007). Reversed-phase HPLC-ESI/MS analysis of birch leaf proanthocyanidins after their acidic degradation in the presence of nucleophiles. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 18 (5), 378-386
7. Kennedy, J. A., Matthews, M.A. i Waterhouse, A.L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77-85
8. Kennedy, J.A. i Jones, G.P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (4), 1740-1746.
9. Ksiezak-Reding, H., Ho, L., Santa-Maria, I., Diaz-Ruiz, C., Wang, J., Pasinetti, G.M. (2012). Ultrastructural alterations of Alzheimer's disease paired helical filaments by grape seed-derived polyphenols. *Neurobiology of aging*, 33 (7), 1427-1439.
10. Lakshmi, B.V.S., Sudhakar, M., Aparna, M. (2013). Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35 (3), 361-368.
11. Li, W.G., Zhang, X.Y., Wu, Y.J., Tian, X. (2001). Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta pharmacologica Sinica*, 22 (12), 1117–1120.
12. Mannino, G., Chinigò, G., Serio, G., Genova, T., Gentile, C., Munaron, L. i Bertea, C. M. (2021). Proanthocyanidins and Where to Find Them: A Meta-Analytic Approach

- to Investigate Their Chemistry, Biosynthesis, Distribution, and Effect on Human Health. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10 (8), 1229.
13. Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15 (1), 27-35.
 14. Monagas, M., Quintanilla-López, J.E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Lebrón-Aguilar, R. (2010). MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51 (2), 358-372
 15. National Center for Biotechnology Information. (2022). PubChem Compound Summary for CID 359, Phloroglucinol. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phloroglucinol>. (Pristupljeno 15. 09. 2022.)
 16. Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, I.G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1), 41-46.
 17. Pérez-Díaz, R., Madrid-Espinoza, J., Salinas-Cornejo, J., González-Villanueva, E. i Ruiz-Lara, S. (2016). Differential Roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in Proanthocyanidin and Anthocyanin Transport in *Vitis vinifera*. *Frontiers in plant science*, 7, 1166.
 18. Prasad, R., Katiyar, S.K. (2013). Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF- κ B. *Cancer letters*, 334 (1), 118-126.
 19. Rhodes, P.L., Mitchell, J.W., Wilson, M.W., Melton, L.D. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International journal of food microbiology*, 107 (3), 281–286.
 20. Scola, G., Scheffel, T., Gambato, G., Freitas, S., Dani, C., Funchal, C., Gomez, R., Coitinho, A. and Salvador, M. (2013). Flavan-3-ol compounds prevent pentylenetetrazol-induced oxidative damage in rats without producing mutations and genotoxicity. *Neuroscience letters*, 534, 145-149.
 21. Terra X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J.-M., Arola, L., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J. (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by

- inhibiting NFκB signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (11), 4357-4365.
22. Tsuda T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular nutrition & food research*, 56 (1), 159–170.
23. Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11 (2), 622-646.
24. Zhou, K. Raffoul, J.J. (2012). Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of oncology*.