Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tomaz, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:945366

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Tomaz

OPTIMIRANJE PRIPRAVE UZORAKA ZA ANALIZU POLIFENOLNIH SPOJEVA U KOŽICI GROŽĐA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Tomaz

OPTIMIZATION OF THE SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSIS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN THE GRAPE SKINS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Tomaz

OPTIMIRANJE PRIPRAVE UZORAKA ZA ANALIZU POLIFENOLNIH SPOJEVA U KOŽICI GROŽĐA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

DOKTORSKI RAD

Mentorice:
izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić

Zagreb, 2016

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Tomaz

OPTIMIZATION OF THE SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSIS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN THE GRAPE SKINS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Dr. Danijela Ašperger, Associate Professor
Dr. Jasminka Karoglan Kontić, Professor

Zagreb, 2016

Posebno se zahvaljujem mentoricama izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger i prof. dr. sc. Jasminki Karoglan Kontić za pružanje neprocjenjive podrške, ohrabrenja i davanja smjernica tijekom izrade ovoga rada. Tijekom suradnje s mentoricama postala sam samostalna u radu, stekla nova znanja i iskustva na kojima ću im uvijek biti zahvalna.

Veliko hvala i mojim studentima Marini, Petri, Ivi, Matiji, Barbari i Mariji za pomoć prilikom provedbe eksperimentalnog dijela ovog istraživanja.

Zahvaljujem i dr. sc. Luni Maslov na pomoći i podršci tijekom godina, a osobito za poticaj tijekom poslijediplomskog studija.

Hvala dr. sc. Domagoju Stupiću na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka grožđa iz vinograda.

Također zahvaljujem članovima Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta koji su pridonijeli izradi ovog rada.

Hvala Davoru na beskrajnom strpljenju i ljubavi.

SADRŽAJ

SAŽETAK ..... **xi**

ABSTRACT ..... **xiii**

1. UVOD **1**

1.1. Svrha rada **4**

2. LITERATURNI PREGLED **7**

2.1. Vinova loza **9**

2.1.1. Anatomska građa bobice grožđa **11**

2.1.1.1. Perikarp *15*

2.1.1.2. Sjemenka *16*

2.1.2. Faze rasta i razvoja bobice **16**

2.2. Fenoli u grožđu **17**

2.2.1. Fenolne kiseline **18**

2.2.2. Stilbeni **20**

2.2.3. Flavonoidi **22**

2.2.3.1. Flavonoli *22*

2.2.3.2. Flavan-3-oli *23*

2.2.3.3. Antocijanini *26*

2.3. Biološka aktivnost i primjena fenola **28**

2.3.1. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u farmaceutskoj industriji **30**

2.3.2. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji **34**

2.3.3. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u kozmetičkoj industriji **36**

2.4. Kemijska analiza fenola grožđa **37**

2.4.1. Uzorkovanje **38**

2.4.2. Priprava uzoraka **38**

2.4.2.1. Pohrana uzoraka *38*

2.4.2.2. Odmrzavanje *39*

2.4.2.3. Sušenje *36*

2.4.3. Ekstrakcijske tehnike 40

2.4.3.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće 42

2.4.4.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija 44

2.4.3.3. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija 45

2.4.3.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija 46

2.4.3.5. Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu 48

2.4.3.6. Ostale ekstrakcijske tehnike 49

2.4.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenola 50

2.4.4.1. Spektroskopske metode 51

2.4.4.2. Elektroanalitičke metode 53

2.4.4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 53

2.5. Primjena multivarijantnih statističkih tehnika u optimiranju ekstrakcije fenola 56

3. MATERIJALI I METODE 59

3.1. Kemikalije, instrumenti i pribor 61

3.2. Uzorci grožđa 62

3.3. Optimiranje postupka priprave uzoraka 65

3.3.1. Optimiranje metode za sušenje uzoraka 65

3.3.2. Optimiranje metode za pohranjivanje uzoraka 66

3.3.3. Metoda ekstrakcije 66

3.4. Optimiranje ekstrakcijskih tehnika 67

3.4.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće 67

3.4.1.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije 67

3.4.1.2. Određivanje broja ekstrakcijskih koraka 67

3.4.1.3. Određivanje omjera faza 68

3.4.1.4. Optimiranje postupka ekstrakcije čvrsto-tekuće primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna 68

3.4.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija 70

3.4.2.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije 70

3.4.2.2. Određivanje broja ekstrakcijskih koraka 70

3.4.2.3. Određivanje omjera faza 71

3.4.2.4. Optimiranje postupka ultrazvukom potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna 71

3.4.3. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija 73

3.4.3.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije 73

3.4.3.2. Određivanje omjera faza 73

3.4.2.3. Optimiranje postupka mikrovalovima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna 74

3.4.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija 75

3.4.4.1. Priprava otopina univerzalnog pufera 76

3.4.4.2. Priprava otopina enzimskih pripravaka 76

3.4.4.3. Određivanje utjecaja kalcijevih iona 76

3.4.4.4. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije 77

3.4.4.1. Određivanje raspona masenih udjela enzimskih pripravaka 77

3.4.2.4. Optimiranje postupka enzimima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna 77

3.4.5. Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu 79

3.4.6. Usporedba različitih optimiranih metoda ekstrakcije 81

3.5. Određivanje termičke stabilnosti ekstrakata 82

3.5.1. Postupak ekstrakcije 82

3.5.2. Određivanje termičke stabilnosti u vodenoj kupelji 82

3.5.3. Određivanje stabilnosti ekstrakata uz primjenu termosoniciranja 82

3.6. Tekućinsko kromatografska analiza fenolnih spojeva u ekstraktima kožica bobica grožđa 82

3.7. Statistička obrada podataka 85

4. REZULTATI I RASPRAVA 87

4.1. Optimiranje postupka priprave uzoraka 89

4.1.1. Postupak optimiranja sušenja uzoraka 89

4.1.1.1. Utjecaj metode sušenja na prinos sušenja i zaostalu vlagu 89

4.1.1.2. Utjecaj metode sušenja na masene udjele fenolnih spojeva 90

4.1.1.3. Stabilnost suhih kožica 94

4.1.2. Postupak optimiranja pohranjivanja uzoraka 97

4.1.2.1. Usporedba različitih načina pohrane uzoraka 103

4.2. Optimiranje ekstrakcijskih tehnika 105

4.2.1. Odabir organske faze..... 105

4.2.2. Optimiranje ekstrakcije čvrsto-tekuće 106

4.2.2.1. Određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije 106

4.2.2.2. Utjecaj broja ekstrakcijskih koraka 107

4.2.2.3. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala 108

4.2.2.4. Optimiranje postupka SLE primjenom BBD 109

4.2.3. Optimiranje ekstrakcije potpomognute ultrazvukom..... 115

4.2.3.1. Odabir raspona temperatura ekstrakcija 115

4.2.3.2. Odabir raspona trajanja ekstrakcije 116

4.2.3.3. Utjecaj broja ekstrakcijskih koraka 116

4.2.3.4. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala 117

4.2.3.5. Optimiranje metode UAE primjenom BBD 118

4.2.4. Optimiranje mikrovalovima potpomognute ekstrakcije 122

4.2.4.1. Odabir raspona vremena ekstrakcije 123

4.2.4.2. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala 123

4.2.4.3. Optimiranje metode MAE primjenom BBD 124

4.2.5. Optimiranje enzimima potpomognute ekstrakcije 129

4.2.5.1. Utjecaj dodatka kalcijevih iona na enzimsku aktivnost 129

4.2.5.2. Određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije 130

4.2.5.3. Određivanje optimalnog raspona masenih udjela enzima 131

4.2.5.4. Optimiranje metode EAE primjenom BBD 132

4.2.6. Optimiranje metode raspršenjem matrice uzorka kroz čvrstu fazu 144

4.2.6.1. Odabir čvrste faze 144

4.2.6.2. Optimiranje metode MSPD primjenom BBD 144

4.2.7. Usporedba optimiranih metoda ekstrakcije 153

4.3. Stabilnost ekstrakata fenola kožica bobica grožđa 159

4.3.1. Određivanje termičke stabilnosti fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa 160

4.3.1.1. Flavonoidi 164

4.3.1.2. Ostale skupine spojeva 170

4.3.2. Utjecaj termosoniciranja na stabilnost fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa 175

4.3.2.1. Flavonoidi 179

4.3.2.2. Ostale skupine spojeva 185

4.3.3. Utjecaj primjene ultrazvuka na termičku stabilnost fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa 191

5. ZAKLJUČCI 193

6. LITERATURNA VRELA 199

7. DODACI xv

8. ŽIVOTOPIS xxv

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

OPTIMIRANJE PRIPRAVE UZORAKA ZA ANALIZU POLIFENOLNIH SPOJEVA U KOŽICI GROŽĐA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Ivana Tomaz
Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25,
Zagreb

Cilj ovoga rada bio je optimirati uvjete priprave uzoraka kao i metode za ekstrakciju polifenola kožica grožđa. Ispitan je utjecaj različitog načina sušenja kožica bobica grožđa, sušenje u pećnici, na zraku pri sobnoj temperaturi te liofilizacija, na maseni udio pojedinih fenola te je utvrđeno da je liofilizacija najučinkovitija metoda. Optimiran je postupak zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka bobica grožđa pri čemu su zamrzavane bobice sa i bez jastučića. Kožica je odvojena od ostatka bobice sa još zamrznutih bobica te nakon odmrzavanja u mikrovalnoj pećnici, hladnjaku i na sobnoj temperaturi. Najveći maseni udjeli pojedinih fenola očuvani su kod uzoraka zamrznutih sa jastučićem, a sa kojih je kožica odvojena s još zamrznutih bobica. Provedeno je optimiranje pet metoda (ekstrakcija čvrsto-tekuće, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija, enzimima potpomognuta ekstrakcija te raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu) za ekstrakciju flavonoida iz kožica bobica grožđa te je usporedbom masenih udjela flavonoida u ekstraktima dobivenim tim metodama utvrđeno da je ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija najučinkovitija metoda.

(xxx+212 stranica, 58 slika, 65 tablica, 222 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: fenoli/ kožica bobice grožđa/ odmrzavanje uzoraka/optimiranje metode ekstrakcije/ sušenje/ termička stabilnost fenola

Mentorice: izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić, Agronomski fakultet

Rad prihvaćen: 2. studenog 2016.

Ocjenitelji:
1. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič, PMF
2. prof. dr. sc. Predrag Novak, PMF
3. doc. dr. sc. Darko Preiner, Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF THE SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSIS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN THE GRAPE SKINS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ivana Tomaz
Faculty of Agriculture, Svetošimunska cesta 25, Zagreb

The aim of the present study was the optimization of the sample preparations of grape skins and the extraction methods for polyphenols, as well. The investigation was done into the effect of the different drying methods of grape skins (oven drying, room temperature drying and freeze-drying) on the content of phenolic compounds. The most effective drying method was found to be freeze-drying. The process of freezing and thawing grape samples was undertaken. The grape berry samples were frozen with and without a receptacle. The skin of the frozen berries was separated from the rest of the berries after thawing in a microwave oven, a refrigerator and on room temperature. The largest content of individual phenols was preserved in samples frozen with a receptacle, where the skin was separated from the still frozen berries. The optimization was done for the five methods (solid-liquid extraction, ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, enzyme assisted extraction and matrix solid phase dispersion) of flavonoid extraction from the grape berry skins. The comparison of flavonoid content in the extracts obtained by the five methods showed that the ultrasound assisted extraction was the most effective method.

(xxx+212 pages, 58 figures, 65 tables, 222 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: drying/ grape berries skins/ phenolics/ optimization of extraction method/thawing/ thermal stability of phenolics/

Supervisors: Dr. Danijela Ašperger, Associate Professor, Faculty of Chemical Engineering and Technology
Dr. Jasminka Karoglan Kontić, Professor, Faculty of Agriculture

Thesis accepted: 2.11.2016.
Reviewers:
1. Dr. Ines Primožič, Assoc. Prof., PMF
2. Dr. Predrag Novak, Prof., PMF
3. Dr. Darko Preienr, Asst. Prof., Faculty of Agriculture

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najznačajnijih poljoprivrednih kultura na svijetu koja se uzgaja na približno 7,5 milijuna ha.[1] Plod vinove loze, grožđe, najvećim se dijelom prerađuje u vino, premda se značajan udio konzumira u svježem stanju, suši za dobivanje grožđica, prerađuje u bezalkoholne sokove te destilira u jaka alkoholna pića. Bobica grožđa obiluje brojnim skupinama spojeva od kojih je potrebno istaknuti šećere, organske kiseline, minerale, hlapljive aromatske spojeve, aminokiseline i fenole (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, stilbene te flavonoide kao što su antocijanini, flavonoli i flavan-3-oli). Polifenoli se definiraju kao tvari koje posjeduju više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina, dok fenoli podrazumijevaju sve spojeve koji sadrže aromatski prsten bez obzira na njihov broj s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina. Takva definicija nije prikladna kada se govori o biljnim fenolima jer bi ona uključila i estron te neke karotenoide koji su prema svom podrijetlu terpeni. Općenito, biljni fenoli i polifenoli odnose se na prirodne sekundarne metabolite koji potječu iz šikimat/fenilpropanskog puta i/ili poliketid-acetat/malonatnog puta, a pri čemu nastaju monomerni ili polimerni oblici, kako je i kemijski definirano, a uključeni su u vrlo veliki broj fizioloških procesa u biljkama.[2] Prema ovoj definiciji stilbeni i flavonoidi su polifenoli dok se fenolne kiseline ne ubrajaju u polifenole pa će se stoga u daljnjem tekstu kada je potrebno uzeti u obzir fenolne kiseline, stilbene te flavonoide koristiti izraz fenoli ili fenolni spojevi. Tijekom vinifikacije dolazi do ekstrakcije fenola iz različitih dijelova grozda u mošt (sok) i ne dolazi do njihove značajne izmjene tijekom alkoholne fermentacije. U vinu oni imaju važnu ulogu u senzornim svojstvima jer utječu na gorčinu, boju i okus vina, a posebno su značajni u proizvodnji crnih vina. Fenolni se sastav grožđa pojedine sorte *V. vinifera*, ali i drugih vrsta iz roda *Vitis* može koristiti u kemotaksonomijske svrhe tj. za provjeru autentičnosti grožđa. Tako se npr. prisutnost antocijanidin-3,5-*O*-diglukozida koristi za potvrdu da se ne radi o grožđu tj. vinu od sorata *V. vinifera*.[3,4] S obzirom na velik značaj fenolnog sastava grožđa za kvalitetu vina, i s obzirom na činjenicu da fenolni sastav može značajno varirati kod iste sorte, postoje brojna istraživanja kojima se nastoji definirati ovisnost fenolnog sastava o različitim okolišnim uvjetima, tehnologijama uzgoja, kao i postojanje unutar sortne varijabilnosti. Određene fenolne spojeve karakteriziraju brojne biološke aktivnosti, odnosno imaju antioksidacijska, antikancerogena, protuupalna, antimikrobna i kardioprotektivna svojstva pa se smatraju vrlo korisnim za ljudsko zdravlje. Zbog navedenih svojstava vrlo se često dodaju u prehrambene i kozmetičke proizvode. Pojedine sorte vinove loze sadrže izrazito velike sadržaje pojedinih fenola pa potencijalno mogu biti dobra sirovina za ekstrakciju fenola u komercijalne svrhe. U ovu skupinu sorata mogu se ubrojiti i neke sorte nastale međuvrsnim križanjima vinove loze s

drugim vrstama roda *Vitis,* a posebice sorta 'Regent' koja uz antocijanidin-3-*O*-monoglukozide sadrži i antocijanidin-3,5-*O*-diglukozide pa je stoga prikladna i za izučavanje fizikalno-kemijskih razlika između navedenih oblika antocijanina. Ove sorte imaju otpornost prema gljivičnim bolestima pa se u njihovom uzgoju koristi znatno manje sredstava za zaštitu bilja, što njihovo grožđe čini vrlo vrijednom sirovinom za proizvodnju farmaceutskih i drugih pripravaka, a i njihov uzgoj je ekonomski isplativiji.[5]

Postupak analize fenola iz različitih biljnih matrica pa tako i iz kožica grožđa vrlo je složen, a sastoji se od brojnih koraka kao što su uzorkovanje, priprava uzoraka, ekstrakcija te kvantitativna analiza. Svaki od ovih koraka značajno utječe na konačni rezultat te ih je stoga potrebno optimirati radi dobivanja što točnijeg i preciznijeg krajnjeg rezultata. Tijekom postupka optimiranja ovih koraka neophodno je dobro poznavanje anatomije bobica grožđa, položaja fenola unutar pojedinih tkiva kožice, ali i unutar samih stanica određenog tkiva kao i kemijskog sastava staničnih stijenki. U različitim se istraživanjima vezanim uz fenolni sastav grožđa primjenjuju različite ekstrakcijske tehnike u kojima se koriste različite vrste otapala, različito trajanje postupka ekstrakcije i drugo, pa se stoga s kvantitativne točke gledišta dobiveni rezultati ne mogu međusobno uspoređivati. Bez obzira što postoji veliki broj objavljenih radova koji se odnose na određivanje sastava i sadržaja fenola u kožicama bobica grožđa, danas ne postoji standardna ekstrakcijska metoda.[6]

1.1. Svrha rada

Na utvrđeni sadržaj fenolnih spojeva grožđa značajno utječu postupci priprave uzorka kao i metoda ekstrakcije, pa je stoga nužno njihovo optimiranje radi točnosti i usporedivosti rezultata znanstvenih istraživanja te za bolju iskoristivost grožđa kao sirovine za njihovo dobivanje u komercijalne svrhe.

Cilj istraživanja bio je:

1. Odrediti optimalne uvjete pohranjivanja, odmrzavanja i sušenja uzoraka grožđa pri kojima je očuvan najveći maseni udio 29 fenola (Tablica 1.1).

2. Razviti optimalne metode za ekstrakciju flavonoida iz kožice crnog grožđa pri čemu su korištene slijedeće ekstrakcijske tehnike: ekstrakcija čvrsto-tekuće, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija, raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu uz primjenu različitih komercijalno dostupnih čvrstih faza te enzimima potpomognuta ekstrakcija uz primjenu različitih komercijalno dostupnih

enoloških enzimskih pripravaka, a koje se mogu primijeniti u istraživačke i komercijalne svrhe.

3. Odrediti stabilnosti dobivenih ekstrakata u uvjetima povišene temperature zagrijavanjem u vodenoj kupelji te nakon primjene termosoniciranja.

Tablica 1.1. Spojevi analizirani u ovom radu

SPOJ	IUPAC nomenklatura
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3,5-il]-bis-*β*-D-glukopiranozid
Cijanidin-3-*O*-glukozid	[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	[2-(3,4,5-trihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3,5-il]-bis-*β*-D-glukopiranozid
Delfinidin-3-*O*-glukozid	[2-(3,4,5-trihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Epigalokatehin	(2*R*,3*R*)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)kroman
Epikatehin	(2*R*,3*R*)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman
Fertarinska kiselina	(2*R*,3*R*)-2-[(*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifeni)propenoiloksi)]-3-hidroksibutan-dikiselina
Galna kiselina	3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina
Galokatehin	(2*R*,3*S*)-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-3,5,7-kromantriol
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	[3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Kafeinska kiselina	(*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)propen-kiselina
Kaftarinska kiselina	(2*R*,3*R*)-2-[(*E*)-3-(3,4-dihidroksifenilpropenoiloksi)]-3-hidroksibutan-dikiselina
Katehin	(2*R*,3*S*)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman
Kemferol-3-*O*-glukuronid	[3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Kutarinska kiselina	(2*R*,3*R*)-2-[(*E*)-3-(4-hidroksifenilpropenoiloksi)]-3-hidroksibutan-dikiselina
Kvercetin-3-*O*-glukozid	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-D-glukopiranozid

Tablica 1.1. Spojevi analizirani u ovom radu [Nastavak]

Kvercetin-3-*O*-glukuronid	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-D-glukuropiranozid
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	[2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3,5-il]-bis-*β*-D-glukopiranozid
Malvidin-3-*O*-glukozid	[2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Miricetin-3-*O*-glukozid	[3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3,5-il]-bis-*β*-D-glukopiranozid
Peonidin-3-*O*-glukozid	[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-*β*-D-glukopiranozid
p-Kumarinska kiselina	(*E*)-3-(4-hidroksifenil)propen-kiselina
Procijanidin B1	*cis*,*trans*″-4,8″-bi-(3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman)
Procijanidin B2	*cis*,*cis*″-4,8″-bi(3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman)
Prokatehinska kiselina	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina
Rutin	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4*H*-kromen-4-on-3-il]-*β*-rutinopiranozid
Sinapinska kiselina	(2*E*)-3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)propen-kiselina
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	[5-[(*E*)-2-(4-hidroksifenil)etenil]rezorcin-3-il]-*β*-D-glukopiranozid

2. LITERATURNI PREGLED

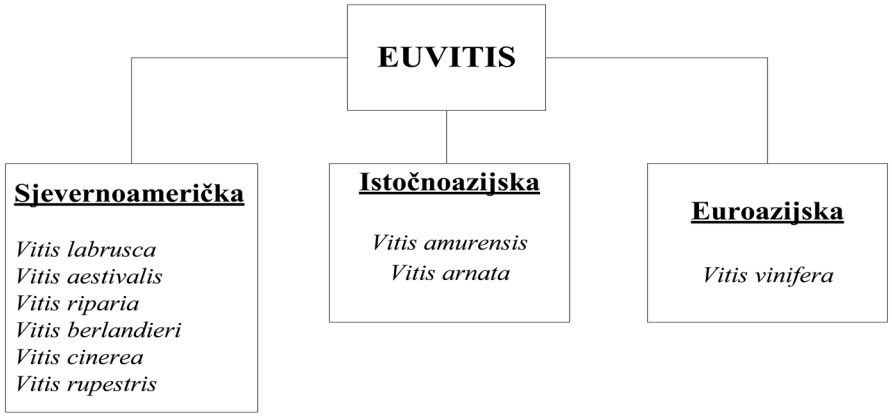
2.1. Vinova loza

Vinova loza jedna je od najstarijih poljoprivrednih kultura i jedna od prvih domesticiranih voćnih vrsta. Divlji predak vinove loze, *Vitis sylvestris* ili šumska loza bio je rasprostranjen u vrijeme pliocena na području Europe, od Atlantskog oceana do Crnog mora, kao dio vegetacije mediteranskih šuma. Brojni fosilni ostaci (Gruzija, Turska, zapadna Europa) upućuju na to da su u vrijeme neolitika ljudi u svojoj prehrani koristili grožđe. Kada je i gdje po prvi puta čovjek počeo uzgajati vinovu lozu i od nje proizvoditi vino, ne može se sa sigurnošću tvrditi, no najstariji danas poznati dokazi upućuju na područje Transkavkazije (uz istočne obale Crnog mora) i datiraju oko 5400 g. pr. n. e. Vrlo je vjerojatno da je loza domesticirana neovisno na više različitih mjesta, no najčešće prihvaćena hipoteza govori da se kultura uzgoja vinove loze širila od istoka prema zapadu, najprije na područje Mezopotamije, Sirije i Egipta (5500. g. pr. n. e. do 5000. g. pr. n. e.) te potom dalje po Mediteranu u glavne civilizacije toga vremena (Feniciju, Grčku, Rimsko Carstvo, Etruriju, Kartagu) i njihove kolonije. U Kini uzgoj grožđa započinje u 2. st. pr. n. e., a u Japanu 3200. g. pr. n. e. Pod utjecajem Rimljana vinova se loza širi u različite dijelove Europe pa i sjeverno sve do Njemačke. Do kraja Rimskog Carstva, uzgoj ove biljne vrste uobičajen je u većini Europe gdje se ona i danas uzgaja. U srednjem vijeku, Katolička Crkva zamjenjuje Rimljane u širenju uzgoja loze u nova područja. Širenje islama na sjevernu Afriku te Španjolsku ima važnu ulogu u rasprostranjivanju uzgoja stolnog grožđa. U razdoblju renesanse (16. st.) dolazi do širenja vinove loze u novo kolonizirana područja (zemlje Novog svijeta) gdje ona nije bila autohtona vrsta.[7]

Danas se vinova loza uzgaja gotovo na svim kontinentima. Svjetska proizvodnja grožđa u 2012. g. iznosila je nešto više od 70 milijuna tona. Približno 58 % proizvedenog grožđa prerađuje se u vino, 31 % konzumira u svježem stanju, dok se 11 % koristi za proizvodnju grožđica, sokova, džemova i dr. Uporaba grožđa uvelike ovisi o prirodnim i političko-religijskim osobitostima regije. U Europi i SAD-u većina se grožđa prerađuje u vino dok na uporabu grožđa u svježem obliku otpada svega 12 %. U islamskim zemljama većina se grožđa konzumira u svježem stanju ili prerađuje u grožđice. Primarna područja uzgoja smještena su između 30 °N i 50 °N te između 30 °S i 50 °S. Proizvodnju grožđa moguće je proširiti i u hladnija, toplija te vlažnija područja pri čemu je potrebno primijeniti određene agrotehničke mjere koje nadoknađuju optimalne uvjete uzgoja.[1]

Vinova se loza ubraja u porodicu lozica (*Vitacea*). Rod loza (*Vitis*) sastoji se od 70 vrsta, a može se podijeliti u dva podroda *Muscadinia* i *Euvitis* koji se razlikuju po

morfološkim i anatomskim karakteristikama te po broju kromosoma (*Muscadinia* 2*n*=40, *Euvitis* 2*n*=38). Vrste podroda *Euvitis* najznačajnije su za vinogradarstvo (Slika 2.1). Vrsta *V. vinifera* sadrži 5000 do 10 000 sorata od kojih se svega oko 2000 koristi u komercijalnom uzgoju.[8]



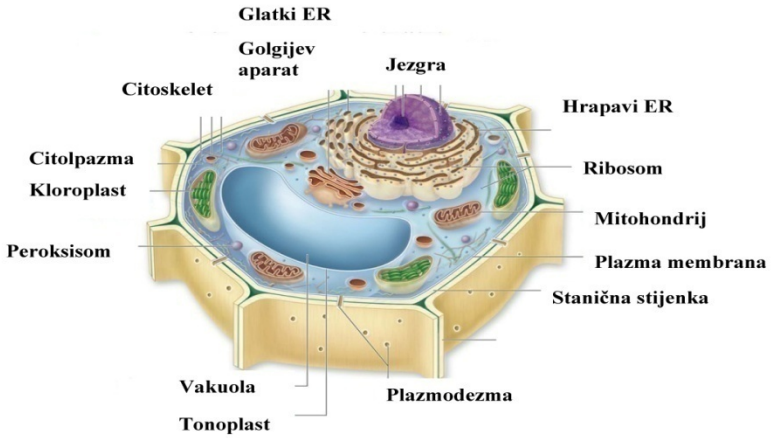
Slika 2.1. Podjela vrsta podroda *Euvitis* prema zemljopisnoj pripadnosti

Većina sorata vinove loze koje se danas uzgajaju nastale su spontanim križanjem, no ima i onih koje su stvorene utjecajem čovjeka, odnosno odgovarajućim oplemenjivačkim postupcima. Kod stvaranja novih sorata postavljaju se različiti oplemenjivački ciljevi (rodnost, kakvoća grožđa, dob dozrijevanja i dr.), a u novije vrijeme veliki se trud ulaže u stvaranje sorata tolerantnih na bolesti (plamenjača, pepelnica) i štetnike (filoksera). Naime, sredinom 19. st. Dolazi do širenja trsnog ušenca-filoksere (*Daktulospheria vitifoliae* Fitch) i bolesti kao što su plamenjača (*Plasompara viticola* Berl.) te pepelnica (*Uncinula necator* Burr), koje su posljedica uvoza sadnog materijala iz Sjeverne Amerike u Europu. Vinova loza nije u tijeku evolucije bila u kontaktu s ovim patogenima te je na njih bila potpuno neotporna. Zbog toga dolazi do uništavanja brojnih europskih vinograda, a ti se događaji smatraju početkom modernog oplemenjivanja vinove loze. Brojne vrste roda *Vitis* posjeduju otpornost prema pepelinici (*V. riparia, V. aestivalis, V. cinerea, M. rotundofolia*), plamenjači (*V. riparia, V. rupestris, V. aestivalis, V. labrusca, V. amurensis, M. rotundofolia*), crnoj plijesni i filokseri (*V. riparia, M. rotundofolia, V. cinerea, V. rupestris*) te se stoga koriste prilikom križanja sa sortama *V. vinifera* da bi nastali međuvrsni križanci s određenim stupnjem otpornosti prema navedenim bolestima. Danas su u Europi aktivni brojni programi oplemenjivanja, a jedan od njih je i onaj u Njemačkoj u sklopu kojega su nastale brojne kvalitetne sorte grožđa koje se koriste u komercijalnom uzgoju. Od tih sorata svakako je potrebno istaknuti 'Regent' i 'Sirius'.[9,10]

2.1.1. Anatomska građa bobice grožđa

Biljna stanica sadrži brojne organele: jezgru, endoplazmatski retikul (ER), mitohondrij, plastide, ribosome, Golgijev kompleks i stanične vakuole, a obavijena je plazma membranom koju okružuje stanična stijenka (Slika 2.2). Organele dijele stanicu na različite odjeljke, a svaki odjeljak ima posebnu funkciju u metabolizmu.

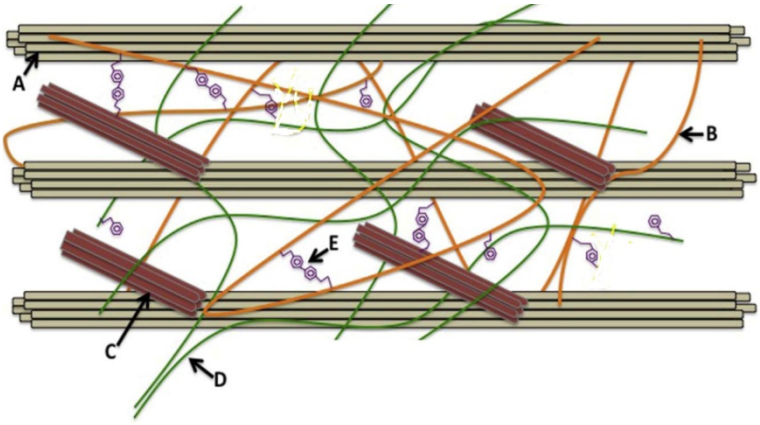
Najveća je organela vakuola koja zauzima približno 80 % ukupnog volumena stanice. Vakuole su obavijene tonoplastom, biološkom membranom, koja odvaja lumen vakuole od citosola. Ove organele glavni su spremnik u stanicama bobica grožđa za šećere, organske kiseline, aromatske spojeve, fenole, ione i vodu. U stanicama različitih tkiva bobice grožđa postoji više vrsta vakuola, litičke vakuole, vakuole za pohranu proteina, taninske, lipidne te fenolne vakuole. Fenolne su vakuole specijalizirane organele, a karakterizira ih velika količina fenola i neobično kiselo okruženje te velika viskoznost staničnog soka. Većina fenola nakuplja se u glikoziliranim oblicima što povećava njihovu topljivost, olakšava prijenos te povećava sposobnost pohranjivanja. U vakuolama su sadržane sferne pigmentirane inkluzije, antocijaninske vakuolarne inkluzije (engl. *Anthocyanic Vacuolar Inclusion*, AVI) koje se ponekad nazivaju i antocijanoplasti, a povezane su s tonoplastima te su glavno mjesto za pohranu antocijanina u stanicama bobica grožđa.[11,12]



Slika 2.2. Građa biljne stanice

Stanična stijenka neživa je složena makromolekularna struktura koja štiti živi dio stanice (protoplast) te biljnoj stanici daje čvrstoću i oblik, a s kemijskog gledišta definira se kao netopljiva tvar koja preostaje nakon lize biljnog tkiva ili stanica, a koje je potom izloženo djelovanju različitih pufera, organskih otapala ili enzima. S obzirom na stupanj histološke diferencijacije stanica, razlikuju se središnja lamela, primarna te sekundarna stanična stijenka.

Stanice kožice grožđa sadrže samo središnju lamelu i primarnu staničnu stijenku „tip I“. Središnja lamela međusobno povezuje susjedne stanice, a građena je od pektina i malih proteina. Primarna je stanična stijenka deblja od središnje lamele, a građena je od polisaharida (do 90 %), strukturnih proteina (2 % do 10 %), fenola (do 2 %), minerala i enzima (1 % do 5 %) (Slika 2.3). Celuloza, hemiceluloze i pektini glavni su polisaharidi stanične stijenke.



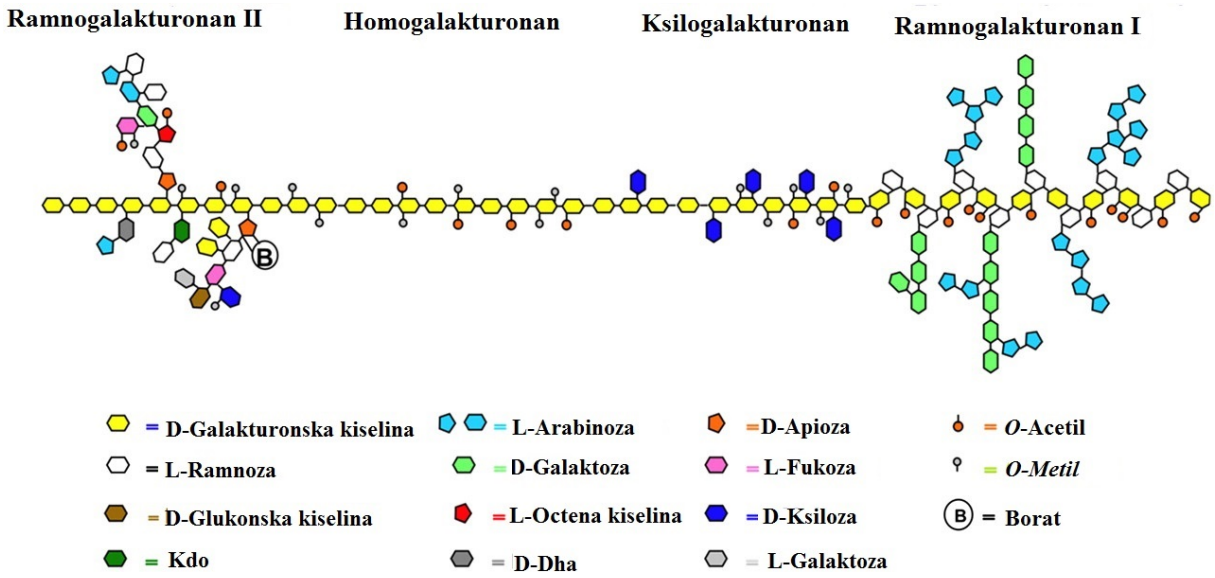
Slika 2.3. Shematski prikaz građe primarne stanične stijenke. A-celuloza, B-hemiceluloza, C-proteini, D-pektin, E-fenoli

Općenito se primarna stijenka sastoji od tri neovisne domene koje međudjeluju: okosnice celuloza-ksiloglukan, pektinskog matriksa te strukturnih proteina. Celuloza je linearni polimer sačinjen od jedinica D-glukoze međusobno povezanih β-1-4-glikozidnim vezama. Lanac celuloze može sadržavati 2000 do 25 000 jedinica D-glukoze. Približno 36 lanaca celuloze međusobno je povezano vodikovim vezama te čini kristalnu strukturu, nepropusnu za vodu, koja se naziva mikrofibril. Umrežavanje mikrofibrila celuloze odvija se posredstvom hemiceluloza preko međumolekulskih vodikovih veza, a pri čemu nastaje okosnica celuloza-ksiloglukan koja je uronjena u pektinski matriks. Hemiceluloze su polisaharidi staničnih stijenki koji su strukturni homolozi celuloze s okosnicom izgrađenom od β-1,4-vezanih jedinica D-piranoza kao što su D-glukoza, D-manoza i D-ksiloza, a u kojima se atom O-4 nalazi u ekvatorijalnom položaju. Najzastupljeniji polimeri ove skupine su ksiloglukani, dok su u manjem obimu zastupljeni i ksilani te manani. Okosnicu ksiloglukana čine jedinice D-glukoze međusobno povezane β-1-4-glikozidnim vezama. Na približno 75 % jedinica okosnice vezane su jedinice D-ksiloze koje izgrađuju bočne lance. Ove jedinice podliježu daljnjem grananju dodatkom D-galaktoze, L-arabinoze te L-fukoze. Manani sadrže glavni lanac izgrađen od β-1,4-vezanih jedinica D-manoze na koje može biti vezana D-galaktoza. Glavni je lanac ksilana izgrađen od vezanih jedinica D-ksiloze na koje mogu biti

vezani ostaci 4-*O*-metilglukuronske kiseline. Većina hidroksilnih skupina D-ksiloza supstituirana je acetilnim skupinama. Pektini su polisaharidi koji sadrže D-galakturonsku kiselinu. Pektinski polisaharidi sadrže slijedeće strukturne skupine: homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan I (RG-I), ramnogalakturonan II (RG-II), ksilogalakturonan (XGA), arabinogalaktan I (AG-I) te arabinogalaktan II (AG-II) (Slika 2.4). Homogalakturonan je polimer α-1,4-vezanih jedinica D-galakturonske kiseline, a na njega otpada više od 60 % ukupne mase pektina primarne stanične stijenke. Vrlo često dolazi do esterifikacije karboksilnih skupina D-galakturonske kiseline metilnom skupinom. Stupanj esterifikacije HG ima veliki utjecaj na njegovu sposobnost tvorbe gela koji kontrolira poroznost stanične stijenke te ujedno doprinosi njezinoj čvrstoći i međustaničnoj adheziji. Nemetilirane karboksilne skupine jedinica D-galakturonske kiseline negativno su nabijene te se mogu vezati s kalcijevim ionima što dovodi do umrežavanja i nastajanja gela. Molekule RG-II produžeci su glavnog lanca HG dužine 7 do 9 jedinica. Struktura RG-II vrlo je složena te sadrži 12 različitih vrsta glikozilnih jedinica među kojima su i vrlo neobični šećeri kao što su 2-keto-2-deoksi-D-liksoheptulozarinska kiselina (D-Dha) i 2-keto-2-deoksi-D-manooktalurozinska kiselina (D-Kdo). Međusobnim povezivanjem dviju molekula RG-II preko boratne diesterske veze nastaju dimeri ramnogalakturonana II. Glavni lanac molekule RG-I izgrađen je od ponavljajućih α-1,4-vezanih jedinica D-galakturonske kiseline i α-1,2-vezanih jedinica L-ramnozilgalakturonske kiseline. Na 20 % do 80 % jedinica L-ramnozilgalakturonske kiseline vezani su bočni lanci koji sadrže jedinice L-arabinoze i D-galaktoze koje također mogu tvoriti bočne lance s drugim šećernim jedinicama. Arabinogalaktan I izgrađen je od okosnice koju sačinjavaju jedinice D-galaktoze povezane β-1-4-glikozidnim vezama na čijem atomu O-3 mogu biti vezane jedinice L-arabinoze. Okosnicu AG-II čine jedinice D-galaktoze povezane β-1-4-glikozidnim vezama. Na okosnicu vrlo su često vezani bočni lanci izgrađeni od L-arabinoze i D-galaktoze.[13-15]

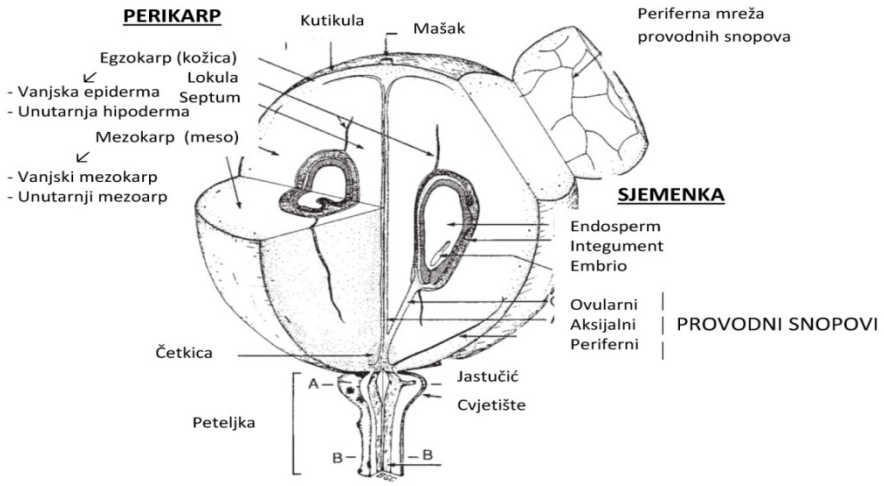
Stanična stijenka u kožicama bobica grožđa čini približno 15 % ukupne mase suhe kožice. Polisaharidi najzastupljenije su sastavnice stanične stijenke kožice s udjelom od približno 50 %. Neutralni polisaharidi (celuloza, ksiloglukani, galaktani, manani i ksilani) čine približno 30 % dok kiseli pektini čine 20 % ukupne mase stanične stijenke. Preostali dio stijenke izgrađuju netopljivi procijanidini (15 %), strukturni proteini (5 %) te enzimi i ostali fenoli. Celuloza je najzastupljeniji polisaharid stanične stijenke kožice bobice grožđa i čini 50 % mase ukupnih polisaharida. U nešto manjem udjelu zastupljeni su ksiloglukani (7 % do

9 %), manani (5 % do 6 %) te arabinogalaktani (4 % do 6 %). Pektinski je matriks izgrađen od do 80 % HG, 15 % RG-I, 5 % RG-II te AG-II.[16-20]



Slika 2.4. Shematski prikaz pektina primarne stanične stijenke

Nakon oplodnje iz plodnice razvija se bobica, plod vinove loze, koja je smještena na proširenju peteljčice koje se naziva jastučić. Provodni snopovi u bobicu ulaze iz peteljčice, a funkcija im je ishrana bobice. Četkica je dio peteljčice na kojemu ostaju prekinuti provodni snopovi nakon otkidanja bobice. Bobicu grožđa čine sjemenka i perikarp (Slika 2.5). Odnos pojedinih sastavnica bobice u ukupnoj masi ovisi o brojnim faktorima i njihovim složenim međudjelovanjima, a od kojih su najvažniji genotip, okolišni uvjeti te način uzgoja.[21]



Slika 2.5. Glavne sastavnice bobice grožđa

2.1.1.1. Perikarp

Perikarp (usplođe) sačinjavaju tri anatomski različita tkiva egzokarp (kožica), mezokarp i endokarp. Egzokarp se sastoji od vanjske epiderme prekrivene kutikulom i voskom te vanjske hipoderme. Kožica grožđa čini 5 % do 18 % svježe mase bobice grožđa. S dozrijevanjem bobice, kožica se lakše odvaja od parenhima jer stanične stijenke vanjskog mezokarpa, smještenog ispod hipoderme podliježu procesu djelomične razgradnje. Stanice epiderme zrele bobice grožđa promjera su od 6,5 μm do 10 μm, a sadrže leukoplaste, ER, Golgijev aparat, mitohondrije te sferosome bogate lipidima. Vanjska se hipoderma nalazi ispod vanjske epiderme, a sastoji se od nekoliko slojeva stanica. Ove su stanice kolenhimske, više-manje izdužene u smjeru osi bobice te imaju debele primarne stanične stijenke. Broj slojeva stanica ovoga tkiva ovisi o samoj sorti te ih može biti do 17. Debljina je ovoga sloja u rasponu od 107 μm do 246 μm. Stanice vanjske hipoderme sadrže plastide (amiloplaste, kloroplaste i leukoplaste). Vakuole određenih stanica ovog tkiva sadrže snopiće kristaličnih rafida izgrađenih od kalcijevog tartarata. Smatra se da kutikula nastaje izlučivanjem monomernih lipida kroz stanične stijenke vanjske epiderme, a na površini dolazi do njihove oksidacije i enzimskih reakcija. Kutikula se izgrađuje srastanjem iznutra, a sačinjena je od vanjskog sloja, kutikularne lamele (obično ne sadrži celulozu, a sastoji se od odvojenih lamela kutina i voska), unutarnjeg sloja, pektinske lamele te središnjeg sloja, mrežastog područja izgrađenog od kutina i voska odvojenih vlaknima celuloze. Kutin, strukturna sastavnica kutikule, lipidni je poliester, obično ne topljiv u vodi, elastičan i otporan na termičku razgradnju. Kutikula sprječava curenje topljivih sastavnica iz stanica smještenih ispod njezine površine. Osim kutina, kutikule mogu sadržavati i vosak izgrađen uglavnom od triterpena i oleinske kiseline te malu količinu spojeva koji sadrže dušik i fosfor.[22,23]

Mezokarp se još naziva i mesnati dio bobice, a dijeli se na pulpu (mekana čvrsta sastavnica) i sok (tekuća sastavnica). Ovo tkivo izgrađuje približno 25 do 30 slojeva parenhimskih stanica bogatih vakuolama. Stanice ovoga tkiva smještene su između slojeva vanjske hipoderme i slojeva endokarpa. Tkivo koje se nalazi izvan perifernih provodnih snopova perikarpa naziva se vanjski mezokarp, dok se tkivo smješteno unutar ovih snopova naziva unutarnji mezokarp. U zreloj bobici grožđa mezokarp zauzima približno 64 % ukupnog volumena bobice.[23]

Endokarp je najdublji sloj perikarpa, a okružuje lokule te se ponekad smatra i dijelom mezokarpa. Sadrži dva različita sloja stanica, unutarnje stanice epiderme te unutarnje stanice hipoderme.[23]

2.1.1.2. Sjemenka

Iz oplođenih jajnih stanica razvijaju se sjemenke. Bobica grožđa može imati do četiri sjemenke, ali najčešće sadrži manje. Zrela je sjemenka kruškolikog oblika, a u vanjskog građi razlikuju se tijelo i kljun. Tijelo je tamnije obojeno od kljuna jer je prekriveno mekom masom debljom u odnosu na onu koja prekriva kljun. Sjemenka bobice grožđa izgrađena je od tri osnovna tkiva: sjemene ljuske (teste), endosperma i embrija. Sjemena je ljuska izgrađena od vanjskog i unutarnjeg integumentra te od nekoliko različitih slojeva stanica koje mogu sadržavati inkluzije kao što su kamenčice (sklereide) i kristale npr. kalcijevog oksalata.[24]

2.2.2. Faze rasta i razvoja bobice grožđa

Rast bobice ima oblik dvostruke sigmoidne krivulje s dva perioda brzog rasta i razvoja (faza I i faza III) koji su odvojeni periodom usporenog rasta (faza II ili lag faza). Tijekom faze I oplođene jajne stanice podliježu nizu mitotičkih dioba i širenju stanica čime nastaje perikarpa bobice grožđa. Dioba stanica prestaje 3 tjedna nakon oplodnje. Tijekom ove faze dolazi i do širenja integumenta, jezgre, endosperma i embrija sjemenki. Ovaj period traje 40 do 60 dana, a tijekom kojeg dolazi do povećanja mase bobice za 250 %. Stanice se epiderme, hipoderme i mezokarpa povećaju za 15 %, 33 % odnosno 159 %. Stanice se mezokarpa šire u tangencijalnom i radijalnom smjeru dok se stanice hipoderme i epiderme šire isključivo u tangencijalnom smjeru. Tijekom ove faze dolazi do zadebljanja i produžavanja stanične stijenke što je praćeno i povećanjem sinteze nekih pektina kao što su galaktan i arabinogalaktani.[23,25-27]

Fazu II koja traje 7 do 40 dana karakteriziraju usporen rast perikarpa i dozrijevanje sjemenki. U ovoj fazi dolazi do značajnog nakupljanja organskih kiselina te one dosežu svoje maksimalne koncentracije.[26]

U vrijeme šare, koja se javlja početkom faze III, dolazi do brojnih značajnih promjena u metabolizmu, a koje uključuju nakupljanje šećera, mekšanje bobica, sintezu antocijanina, metabolizam organskih kiselina te nakupljanje aromatskih spojeva. Te su promjene usklađene unutar svake pojedine bobice, pa stoga pojedine bobice čak i one na istom grozdu ne dozrijevaju sinkronizirano što dovodi do značajnih razlika između bobica u trenutku berbe. U ovom periodu dolazi do povećanja mase bobice za 40 %. Stanice mezokarpa povećaju se u tangencijalnom i radijalnom smjeru za približno 30 %, dok im se površina poveća za 63 %. Stanice hipoderme i epiderme slijede sličan obrazac povećanja te dobivaju ili gube na veličini obrnuto u usporedbi s onima mezokarpa. U ovoj fazi dolazi i do značajnih promjena u sastavu staničnih stijenki. Mekšanje bobica grožđa povezano je sa smanjenjem sadržaja D-galaktoze,

a što za posljedicu ima smanjenje količine galaktana i arabinogalaktana I u staničnim stijenkama. Isto tako u ovom periodu dolazi do značajnog smanjenja metilacije D-galakturonske kiseline. Ova faza traje 35 do 55 dana.[26-28]

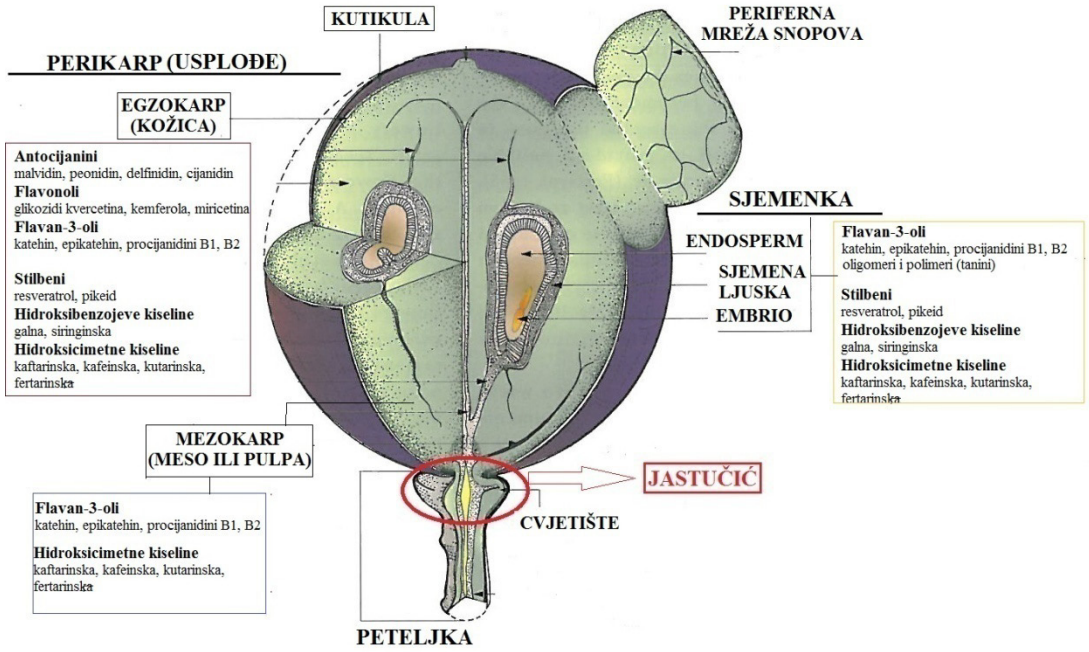
2.2. Fenoli u grožđu

Za razliku od osnovnog (primarnog) metabolizma koji se odnosi na anaboličke i kataboličke procese potrebne za život stanice i proliferaciju, sekundarni metabolizam uključuje spojeve sadržane u posebnim stanicama koji nisu izravno uključeni u fotosintezu ili disanje, ali su neophodni da bi biljka preživjela u svojoj okolini. Biljke sintetiziraju veliki broj sekundarnih metabolita, koji se s obzirom na biosintetičke putove i strukturne osobitosti mogu podijeliti u nekoliko skupina. Fenolni su spojevi najraširenij sekundarni metaboliti u biljnom carstvu, a procjenjuje se da približno 2 % ugljika asimiliranog tijekom fotosinteze biljka prevodi u fenolne spojeve. Do danas, identificirano je više od 8000 različitih biljnih fenolnih spojeva. U biljkama oni imaju ulogu u rastu, oplodnji i razmnožavanju te sudjeluju u različitim obrambenim reakcijama da bi istu zaštitili od abiotičkog stresa kao što je UV zračenje, nedostatak vode itd. ili biotičkog stresa kao što su napadi patogena ili predatora. Da bi ostvarili svoju funkciju, ovi se spojevi nakupljaju u posebnim tkivima ili vrstama stanica. Sekundarni metaboliti se obično prenose iz stanica u kojima su sintetizirani u susjedne stanice ili u druga tkiva ili organe. Oni se obično nalaze u vakuolama stanica epiderme. Zbog svoje izrazito složene građe, fenoli su podijeljeni u brojne skupine i podskupine, a podjela se temelji na broju sadržanih fenolnih prstenova te na temelju strukturnih elemenata koji međusobno povezuju te prstenove (Tablica 2.1).[29]

Tablica 2.1. Podjela fenola na skupine i podskupine

OSNOVNA STRUKTURA	SKUPINA
C_6	Jednostavni fenoli, benzokinoni
$C_6–C_1$	Hidroksibenzojeve kiseline
$C_6–C_2$	Feniloctene kiseline
$C_6–C_3$	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropeni, kumarini, kromeni
$C_6–C_4$	Naftokinoni
$C_6–C_1–C_6$	Ksantoni
$C_6–C_2–C_6$	Stilbeni, antrakinoni
$C_6–C_3–C_6$	FLAVONOIDI: flavoni, flavonoli, flavanonoli, flavanoni, antocijanini, flavanoli (flavan-3-oli), čalkoni
$(C_6–C_3)_n$	Lignini
$(C_6–C_3–C_6)_n$	Kondenzirani tanini

Bobice grožđa sadrže veliki broj različitih sekundarnih metabolita, a među najzastupljenijima su fenolni spojevi. Sastav i sadržaj ovih spojeva bobice grožđa uvelike ovisi o genotipu vinove loze, okolišnim uvjetima te uvjetima samog uzgoja. U bobici grožđa sintetiziraju se fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline), stilbeni te flavonoidi (antocijanini, flavonoli i flavan-3-oli). Ovi su spojevi sadržani kako u sjemenkama tako i u perikarpu bobice, ali se njihova razdioba u pojedinim tkivima značajno razlikuje (Slika 2.6). Većina fenola kožice grožđa sadržana je u stanicama hipoderme i epiderme, a njihov položaj u ovim tkivima ovisi o njihovoj strukturi, pa tako mogu biti vezani na staničnu stijenku (fenolne kiseline i flavan-3-oli), nalaziti se u vakuolama i citoplazmi (fenolne kiseline, antocijanini, flavonoli te monomeri i dimeri flavan-3-ola) kao i biti udruženi s jezgrom.[30,31]

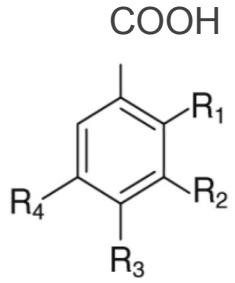


Slika 2.6. Razdioba fenola u različitim tkivima bobice grožđa

2.2.1. Fenolne kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline su C_6–C_1 aromatske karboksilne kiseline koje su preteče brojnih drugih spojeva važnih za rast i razvoj biljaka. U grožđu je sadržano nekoliko hidroksibenzojevih kiselina: galna, gentizinska, prokatehinska, salicilna, siringinska, *p*-hidroksibenzojeva te vanilinska kiselina, a čije se strukture razlikuje s obzirom na broj i položaj hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskom prstenu (Slika 2.7). Ove su kiseline

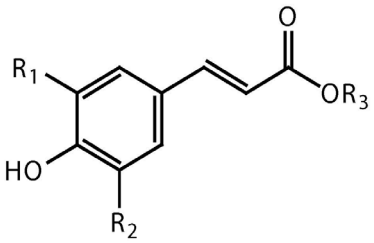
obično zastupljene u konjugiranim oblicima kao esteri ili glikozidi premda se mogu nalaziti i u slobodnom obliku. Vanilinska, siringinska, prokatehinska te *p*-hidroksibenzojeva kiselina sastavnice su lignina. U najvećim količinama sadržane su u sjemenkama bobica grožđa, ali se u slobodnim oblicima mogu naći i u kožicama. Od navedenih kiselina, galna je kiselina najzastupljenija s masenim udjelom u rasponu od 2 mg kg^{-1} svježih bobica pa sve do 13 mg kg^{-1} svježih bobica. Ona vrlo često tvori estere s flavan-3-olima.[32]



Galna kiselina $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = OH$
Gentizinska kiselina $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$; $R_4 = OH$
p-Hidroksibenzojeva kiselina $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OH$; $R_4 = H$
Prokatehinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = R_4 = OCH_3$
Salicilna kiselina $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$
Siringinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$; $R_4 = OCH_3$
Vanilinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$; $R_4 = H$

Slika 2.7. Strukturne formule hidroksibenzojevih kiselina

Hidroksicimetne kiseline imaju osnovnu strukturu s jedinicom $C_6–C_3$ koja sadrži dvostruku vezu na bočnom lancu, a koja može biti u *trans* i *cis* konfiguraciji. U grožđu su zastupljeniji *trans*-izomeri. Ove se kiseline međusobno razlikuju po broju i vrsti supstituenata vezanih na benzenski prsten. Najzastupljenije su kiseline *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska te sinapinska kiselina, a one mogu biti sadržane kao slobodne karboksilne kiseline ili kao esteri nastali povezivanjem s vinskom kiselinom, flavonoidima ili ugljikohidratima. Esteri kafeinske, *p*-kumarinske te ferulinske kiseline s vinskom kiselinom nazivaju se kaftarinska, *p*-kutarinska odnosno fertarinska kiselina (Slika 2.8).



Kafeinska kiselina $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$
Kaftarinska kiselina $R_1 = OH$; $R_2 = H$; $R_3 = C_4H_5O_6$ (tartarat)
p-Kumarinska kiselina $R_1 = R_2 = R_3 = H$
p-Kutarinska kiselina $R_1 = OH = R_2 = H$; $R_3 = C_4H_5O_6$
Ferulinska kiselina $R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_3 = H$
Fertarinska kiselina $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = C_4H_5O_6$
Sinapinska kiselina $R_1 = R_2 = OCH_3$; $R_3 = H$

Slika 2.8. Strukturne formule hidroksicimetnih kiselina

Hidroksicimetne kiseline nalaze se u svim tkivima bobice grožđa, a posebice u vakuolama stanica perikarpa. Kaftarinska je kiselina najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u grožđu, a slijede ju *p*-kutarinska, kafeinska te *p*-kumarinska kiselina. Njihov ukupni maseni udio

uvelike ovise o sorti grožđa te uvjetima uzgoja vinove loze, a prosječna mu je vrijednost 150 mg kg^{-1} svježih bobica. Ova skupina spojeva ulazi u strukturu staničnih stijenki povezivanjem s polisaharidima, najčešće pektinima. Oksidacijskim povezivanjem hidroksicimetnih kiselina nastaju dimeri koji dovode do umrežavanja polisaharida stanične stijenke, a što za posljedicu ima povećavanje čvrstoće stijenke i ograničavanje njezine biorazgradnje djelovanjem mikroorganizama.[32]

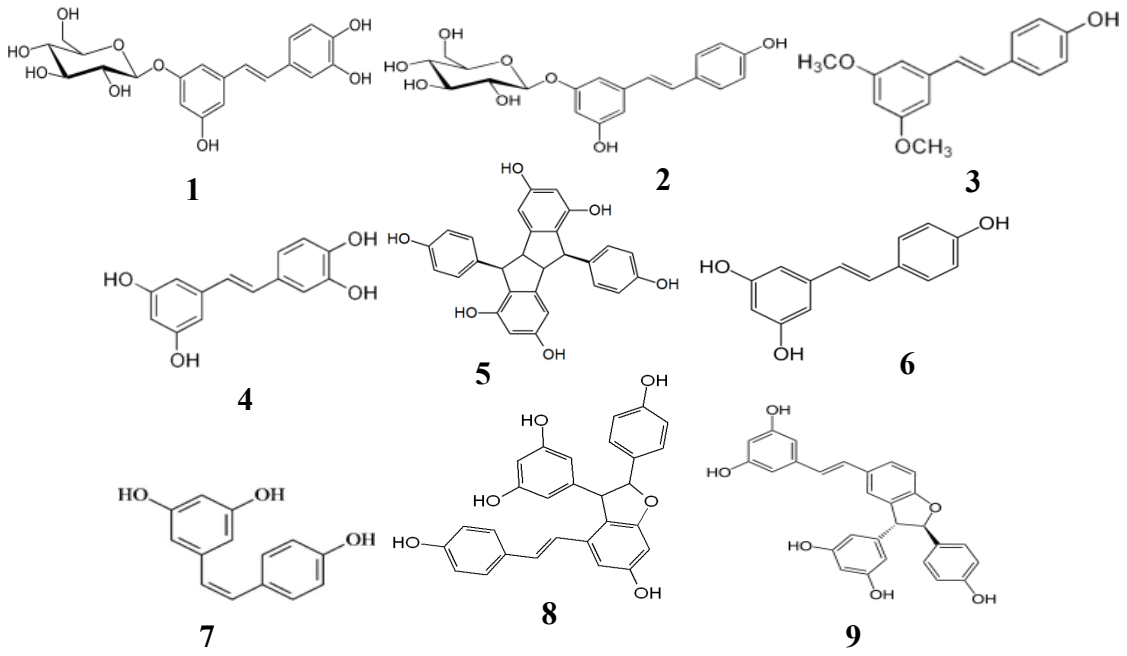
Tijekom rasta i razvoja bobice grožđa, od oplodnje pa do pune zrelosti, dolazi do promjene u masenom udjelu hidroksicimetnih kiselina. Tijekom faza I i II pa sve do šare, maseni se udio ovih spojeva povećava, a tijekom šare doseže maksimalnu vrijednost. Tijekom faze III, od šare pa do pune zrelosti, maseni udio im se značajno smanjuje.[33]

2.2.2. Stilbeni

Stilbeni su vrlo značajna skupina polifenolnih spojeva za rast i razvoj bobice jer ju štite od različitih biotičkih i abiotičkih utjecaja. U svojoj osnovnoj strukturi sadrže 1,2-difeniletilen ($C_6–C_2–C_6$). Najjednostavniji stilben je *trans*-resveratrol, koji posjeduje antimikrobnu aktivnost te je ishodni stilben koji se različitim modifikacijama prevodi u druge spojeve. Manje stabilni izomer *trans*-resveratrola je *cis*-resveratrol, a manja je stabilnost posljedica steričkih smetnji između aromatskih prstenova. Jedna od mogućih modifikacija je i glikozilacija koja je pogodno sredstvo za pohranu, prijenos, promjene antimikotičke aktivnosti kao i za zaštitu od oksidacijske razgradnje. Glikozilirani derivati resveratrola su *trans*- i *cis*-resveratrol-3-*O*-β-D-glukopiranozidi te astringin, 3'-hidroksilirani derivat *trans*-resveratrol-3-*O*-β-D-glukopiranozida. Osim glikozilacije, vrlo često dolazi i do metilacije. Pterostilben (3,5-dimetoksi-4'-hidroksistilben) dimetilirani je derivat *trans*-resveratrola s pojačanom antimikotičkom aktivnošću u odnosu na *trans*-resveratrol. Oligomerizacijom stilbenske se jedinice prevode u složenije spojeve. Oksidacijskim povezivanjem *trans*-resveratrola i njegovih derivata nastaju brojni dimeri, trimeri i tetrameri, a najznačajnija skupina ovakvih oligomera sadržana u grožđu su viniferini koji nastaju oksidacijom osnovne jedinice stilbena djelovanjem enzima 4-hidroksistilben peroksidaze. U grožđu, najzastupljeniji su α-viniferin (ciklički dehidrotrimer resveratrola), β-viniferin (ciklički dehidrotetramer resveratrola), γ-viniferin (oligomer resveratrola većeg stupnja polimerizacije), δ-viniferin (izomer dehidrodimera resveratrola) te ε-viniferin (ciklički dehidrodimer resveratrola). Do sinteze ε-viniferin dolazi u bobicama grožđa zaraženim sivom plijesni, a njegovu sintezu može potaknuti i zaraza plamenjačom te izloženost UV zračenju. Uz već navedene stilbene, u

grožđu identificirani su i astringinin (*trans*-3,3',4,5'-tetrahidrostilben) i njegov glukozid astrigin te palidol (*trans*-resveratrol dimer).[34] Na slici 2.9 prikazane su strukturne formule najzastupljenijih stilbena u kožicama bobice grožđa.

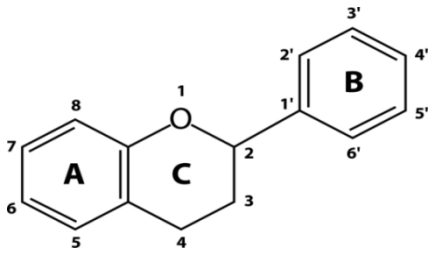
Premda je opće prihvaćeno da je sinteza stilbena u kožici bobice grožđa najčešće potaknuta biotičkim i abiotičkim stresom, postoje dokazi da do sinteze ovih spojeva dolazi i u zdravom grožđu. S obzirom na ukupni maseni udio stilbena, sorte se vinove loze mogu podijelite u dvije skupine. Prvu skupinu čine sorte koje sadrže velike masene udjele stilbena (1,2 mg kg^{-1} svježih bobica do 22,5 mg kg^{-1} svježih bobica), dok drugu skupinu čine one koje sadrže značajno manje masene udjele (0,03 mg kg^{-1} svježih bobica do 1,7 mg kg^{-1} svježih bobica). Promjene masenih udjela stilbena tijekom rasta i razvoja uvelike ovise o samoj sorti te okolišnim uvjetima kao i o uvjetima uzgoja, tako se maseni udio može smanjivati u čitavom periodu rasta i razvoja, od faze zelene bobice pa do pune zrelosti, te u trenutku zrelosti doseći vrijednost blizu nule. Isto tako prema nekim istraživanjima maseni udio stilbena može se povećavati od šare do pune zrelosti kada doseže maksimalnu vrijednost. Zdrave bobice grožđa sadrže značajno veće masene udjele glikoziliranih oblika resveratrola u odnosu na slobodni oblik, što ide u prilog tezi da je glikozilarni oblik resveratrola njegov skladišni oblik te da se on prevodi u slobodni oblik kad dolazi do zaraze patogenima.[35]



Slika 2.9. Strukturne formule nekih stilbena: (1) *Z* i *E*-astringin, (2) *Z* i *E*-resveratrol-3-*O*-β-D-glukopiranozid, (3) pterostilben, (4) astringinin, (5) palidol, (6) *trans*-resveratrol, (7) *cis*-resveratrol, (8) *Z* i *E*-ε-viniferin, (9) *Z* i *E*-δ-viniferin

2.2.3. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi čiju osnovnu strukturu čini difenilpropanska jedinica (C_6–C_3–C_6) u kojoj su dva hidroksilirana benzenska prstena, A i B, međusobno povezana lancem izgrađenim od tri atoma ugljika, a koji je dio heterocikličkog prstena C (Slika 2.10).

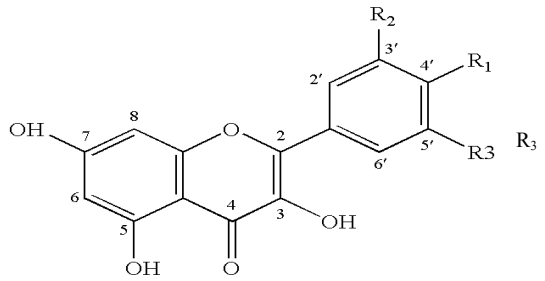


Slika 2.10. Osnovna struktura flavonoida

S obzirom na oksidacijsko stanje prstena C, flavonoidi grožđa mogu se podijeliti u tri skupine: flavonole, flavan-3-ole te antocijanine. Broj strukturno različitih spojeva unutar svake od navedenih skupina povećava se s promjenom stereokemije, stupnja polimerizacije te položaja i vrste supstituenata kao što su hidroksilne, metilne, galoilne i glikozilne skupine te alifatske i aromatske kiseline. Ukupan sastav i sadržaj flavonoida ovisi o genotipu te se do određenog stupnja može promijeniti uslijed djelovanja nekih biotičkih i abiotičkih čimbenika.

2.2.3.1. Flavonoli

Flavonole karakterizira prisutnost karbonilne (keto) skupine na položaju 4 i dvostruka veza između položaja 2 i 3 prstena C, a u grožđu su zastupljeni isključivo u obliku 3-*O*-glikozida. U bobici grožđa sintetiziraju se glikozidi slijedećih aglikona: kemferola, kvercetina, miricetina, izoramnetina, laricitrina te siringentina, a oni se međusobno razlikuju prema broju i vrsti supstituenata vezanih na prstenu B (Slika 2.11.). S obzirom na broj supstituenata na prstenu B mogu se podijeliti na monosupstituirane (kemferol), disupstituirane (kvercetin i izoramnetin) te na trisupstituirane (miricetin, laricitrin te siringetin). Kao šećerne jedinice najčešće su vezane glukoza, galaktoza te glukuronska kiselina dok je ramnoza vezana isključivo na kvercetin. Kombinacijom navedenih aglikona i šećera, u grožđu može biti sadržano najviše 19 flavonol-3-*O*-glikozida koji su najvećim dijelom smješteni u vakuolama stanica vanjske epiderme gdje imaju ulogu zaštite bobice od UV zračenja.[34]



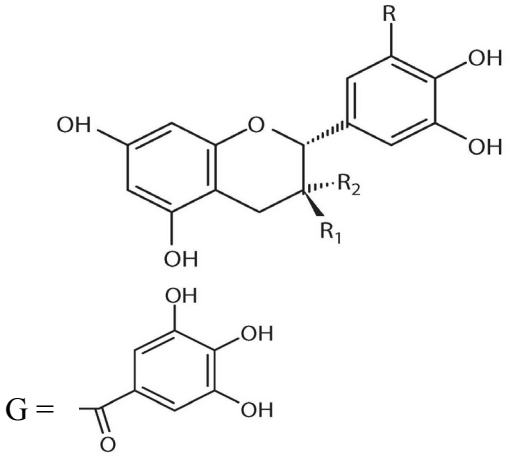
Kemferol $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$
Kvercetin $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$
Miricetin $R_1 = R_2 = R_3 = OH$
Izoramnetin $R_1 = OH; R_2 = OCH_3; R_3 = H$
Laricitrin $R_1 = OH; R_2 = OCH_3; R_3 = OH$
Siringetin $R_1 = OH; R_2 = R_3 = OCH_3$

Slika 2.11. Strukturne formule aglikona flavonola

Sastav flavonola ovisi o genotipu, dok na njihov sadržaj utječu genotip, ali i okolišni čimbenici. S obzirom da je sastav flavonola sortno specifičan može se koristiti u kemotaksonomijske svrhe. Od okolišnih čimbenika najznačajnija je izloženost sunčevoj svjetlosti. Grožđe više izloženo sunčevoj svjetlosti sadrži značajno veće masene udjele ovih spojeva u odnosu na grožđe zasjenjeno tijekom rasta i razvoja bobica. Biosinteza flavonola započinje već tijekom cvatnje. Tijekom rane faze razvoja bobica njihov se sadržaj smanjuje, a potom se počinje povećavati sve do pune zrelosti. Flavonol-3-*O*-glukozidi najzastupljeniji su flavonoli i čine približno 76 % ukupnog sadržaja svih flavonola, dok su flavonol-3-*O*-galaktozidi i flavonol-3-*O*-glukuronidi zastupljeni u značajno manjim udjelima (svaki čini 12 % ukupnog sadržaja flavonoida). Isto tako udjeli različitih aglikona razlikuju se unutar pojedine skupine flavonol-3-*O*-glikozida. Kvercetin i miricetin prevladavaju unutar flavonol-3-*O*-glukozida i flavonol-3-*O*-galaktozida. Monosupstituirani flavonoli najmanje su zastupljeni te čine svega 1,4 % do 8 % ukupnog sadržaja flavonola. Unutar skupine flavonol-3-*O*-galaktozida, disupstituirani aglikoni čine 48 %, dok trisupstituirani aglikoni čine 44 % ukupnog sadržaja flavonola. Trisupstituirani aglikoni prevladavaju u odnosu na disupstituirane kada je šećer glukoza (57 % u odnosu na 35 %), dok su disupstituirani najzastupljeniji aglikoni vezani na glukuronsku kiselinu i čine približno 90 % ukupnog sadržaja flavonol-3-*O*-glukuronida. Ukupan maseni udio flavonol-3-*O*-glikozida može biti u rasponu od 1 mg kg^{-1} svježih bobica pa do 124 mg kg^{-1} svježih bobica.[36-40]

2.2.3.2. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli sadrže hidroksilnu skupinu na položaju 3 prstena C. Ova skupina spojeva u grožđu zastupljena je u obliku monomera, oligomera te polimera. Monomeri sadržani u grožđu su: (+)-katehin, (−)-epikatehin, (+)-galokatehin, (−)-epigalokatehin te njihovi esteri s galnom kiselinom kao što su (−)-epikatehin-3-*O*-galat, (−)-epigalokatehin-3-*O*-galat te (+)-galokatehin-3-*O*-galat (Slika 2.12).

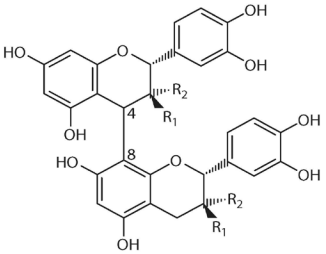


(+)-Katehin R = H; R_1 = OH; R_2 = H
(−)-Epikatehin R = H; R_1 = H; R_2 = OH
(+)-Galokatehin R = OH; R_1 = OH; R_2 =H
(−)-Epigalokatehin R = OH; R_1 = H; R_2 =OH
(−)-Epikatehin-3-*O*-galat R = H; R_1 = H; R_2 = O-G
(+)-Galokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G
(−)-Epigalokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G

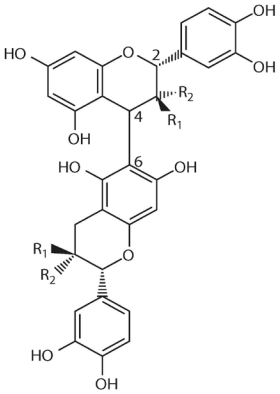
Slika 2.12. Strukturne formule monomera flavan-3-ola

Oligomeri i polimeri flavan-3-ola nazivaju se i proantocijanidini i kondenzirani tanini. Njihova struktura ovisi o prirodi (stereokemiji i načinu hidroksilacije) terminalnih i građevnih jedinica monomera, položaju i stereokemiji veze s ″donjom″ jedinicom, stupnju polimerizacije, prisutnošću ili odsutnošću modifikacija kao što je esterifikacija 3-hidroksilne skupine galnom kiselinom. S obzirom na vrstu veza koje nastaju između pojedinih podjedinica, proantocijanidini se dijele na tip A proantocijanidine i tip B proantocijanidine (Slika 2.13). Kod tipa B proantocijanidina, interflavanska veza između uzastopnih monomernih jedinica nastaje povezivanjem ugljikovog atoma na položaju 4 ″gornje″ jedinice i ugljikovog atoma na položaju 8 ″donje″ jedinice (C_4–C_8 veza) ili rjeđe između ugljikovog atoma na položaju 4 ″gornje″ jedinice i ugljikovog atoma na položaju 6 ″donje″ jedinice (C_4–C_6 veza). Tip A proantocijanidini, osim uobičajene interflavanske veze C_4–C_8 ili C_4–C_6 sadrže etersku vezu između ugljika na položaju 2 ″gornje″ jedinice i kisika na položaju 7 ″donje″ jedinice (C_2–O–C_7 veza). Stereokemija veze na položaju C_4 ″gornje″ jedinice može biti α ili β. Homooligomerni proantocijanidini koji imaju 4'5'-dihidroksilirani prsten B nazivaju se procijanidini jer njihovom kiselom hidrolizom nastaje antocijanidin cijanidin. Miješani oligomeri s 3'4'5'-trihidroksiliranim prstenom B, koji kiselom hidrolizom daju antocijanidin delfinidin, nazivaju se prodelfinidini. Procijanidini B1, B2, B3 i B4 najzastupljeniji su dimeri koji se međusobno razlikuju po uređenju (+)-katehina i (−)-epikatehina kao terminalnih jedinica (Slika 2.14).[41]

Tip B proantocijanidina

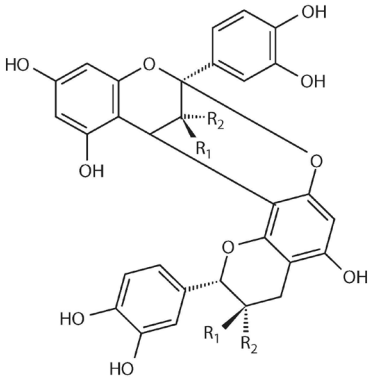


$C_4–C_8$ veza



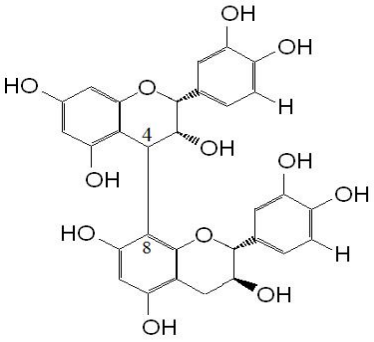
$C_4–C_6$ veza

Tip A proantocijanidina

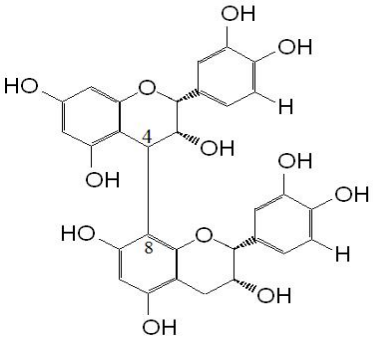


$C_4–C_8$ veza
i
$C_2–O–C_7$ veza

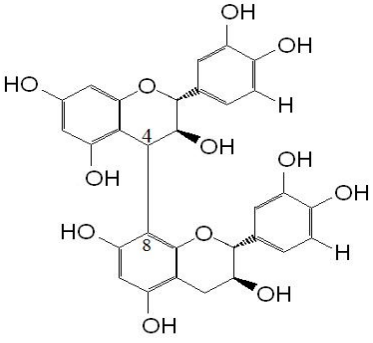
Slika 2.13. Općenite strukture proantocijanidina tip A i tip B



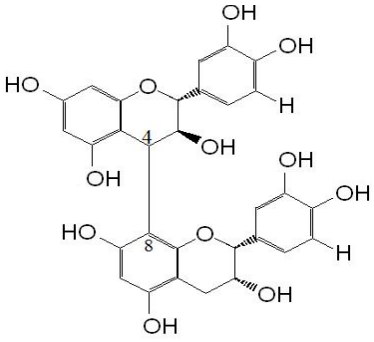
Procijanidin B1:
Epikatehin-(4β→8)-katehin



Procijanidin B2:
Epikatehin-(4β→8)-epikatehin



Procijanidin B3:
Katehin-(4α→8)-katehin



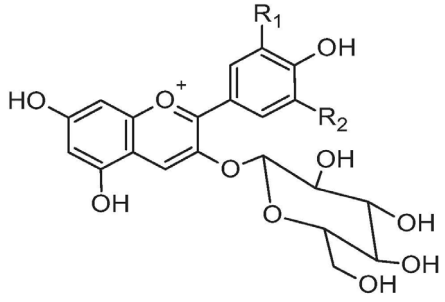
Procijanidin B4:
Katehin-(4α→8)-epikatehin

Slika 2.13. Strukturne formule procijanidina B1, B2, B3 i B4

Flavan-3-oli su sadržani u svim tkivima bobice grožđa, a najveći maseni udio određen im je u stanicama mekog parenhima sjemene ljuske. U kožici bobice grožđa flavan-3-oli mogu biti pohranjeni u vakuolama stanica hipoderme kao i biti vezani na polisaharide stanične stijenke. Sinteza ove skupine spojeva počinje tijekom cvatnje te se nastavlja tijekom ranih faza rasta i razvoja bobica. U kožicama sinteza završava tijekom šare, dok se u sjemenkama nastavlja još nekoliko tjedana nakon šare. Prosječna veličina proantocijanidina naziva se srednji stupanj polimerizacije (engl. *Mean Degree of Polymerization*, mDP), a on se mijenja tijekom čitavog perioda rasta i razvoja bobice. U kožicama bobica dolazi do povećanja mDP u razdoblju od šare pa do pune zrelosti, a što se očituje smanjenjem masenog udjela monomernih oblika flavan-3-ola. Sastav i sadržaj ovih spojeva u tkivima bobice značajno se razlikuje. U sjemenkama je srednji stupanj polimerizacije 4, a kao njihove građevne jedinice zastupljeni su isključivo procijanidini katehin, epikatehin te epikatehin-3-*O*-galat. Od monomernih flavan-3-ola najzastupljeniji su katehin i epikatehin. Maseni udio monomernih oblika u sjemenkama može biti od 60 mg kg^{-1} svježih bobica pa do 500 mg kg^{-1} svježih bobica, dok je maseni udio dimernih oblika u rasponu od 180 mg kg^{-1} svježih bobica pa do 350 mg kg^{-1} svježih bobica. Kožice grožđa uz procijanidine sadrže i prodelfinidine što znači da kao građevne jedinice uz katehin, epikatehin i epikatehin-3-*O*-galat mogu sadržavati i galokatehin te epigalokatehin. Stupanj polimerizacije proantocijanidina kožice grožđa značajno je veći od onog sjemenki te iznosi približno 40. Ukupan maseni udio monomernih oblika u kožicama grožđa može biti od 3,8 mg kg^{-1} svježih bobica do 38 mg kg^{-1} svježih bobica, a najzastupljeniji monomeri su katehin, epikatehin, galokatehin te epigalokatehin. U usporedbi sa sjemenkom, kožica bobice grožđa sadrži značajno manje masene udjele procijanidina B1, B2, B3 i B4 (15 mg kg^{-1} svježih bobica do 38 mg kg^{-1} svježih bobica).[42-46]

2.2.3.3. Antocijanini

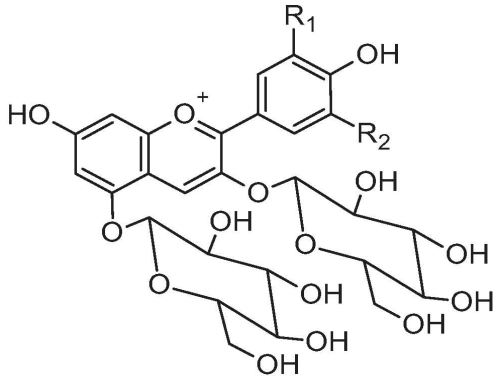
Antocijanini su glikozidi i acilglikozidi antocijanidina (2-fenilbenzopirilija) koji se međusobno razlikuju s obzirom na broj hidroksilnih i metoksilnih skupina vezanih na osnovnu $C_6–C_3–C_6$ strukturu. Općenito, u prirodi postoji 17 različitih antocijanidina, dok ih je u grožđu sadržano samo šest: pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin te malvidin. Stabilnost antocijanidina povećava se *O*-glikozilacijom. Kod grožđa šećerna jedinica je molekula glukoze. Sorte vrste *V. vinifera* sadrže isključivo antocijanine u kojima je glukoza vezana na položaj 3 prstena C, a koji se nazivaju antocijanidin-3-*O*-monoglukozidi (Slika 2.14).[39]



Pelargonidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = H$
Cijanidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OH$; $R_2 = H$
Delfinidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = OH$
Petunidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$
Peonidin-3-*O*-glukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$
Malvidin-3-*O*-glukozid $R_1 = R_2 = OCH_3$

Slika 2.14. Strukturne formule antocijanidin-3-*O*-monoglukozida

Druge vrste roda *Vitis* kao i njihovi međuvrsni križanci sadrže uz antocijanidin-3-*O*-monoglukozidi i antocijanine u kojima su prisutne dvije molekule glukoze od kojih je jedna vezana na položaj 3, a druga na položaj 5 prstena C, a koji se nazivaju antocijanidin-3,5-*O*-diglukozidi (Slika 2.15). Nemogućnost sorata *V. vinifera* da sintetiziraju antocijanidin-3,5-*O*-diglukozide posljedica je dvostruke mutacije na genu koji kodira sintezu enzima UDP-glukoza: antocijanin-5-*O*-glukoziltransferaza odgovornog za uvođenje glukoze na položaj 5 antocijanidin-3-*O*-monoglukozida.[34,47]



Pelargonidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = H$
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OH$; $R_2 = H$
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = OH$
Petunidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid $R_1 = R_2 = OCH_3$

Slika 2.15. Strukturne formule antocijanidin-3,5-*O*-diglukozida

Hidroksilacija i metilacija prstena B utječu na nijansu i stabilnost boje koja može biti u rasponu od crvene pa do plave. Derivati delfinidina plave su boje, a što je izravno povezano s brojem slobodnih hidroksilnih skupina. Derivati cijanidina su crvene boje. Povećanjem broja metoksilnih skupina boja postaje tamnije crvene pa je tako malvidin s dvije metoksilne skupine najtamnije crven. Povećani broj vezanih molekula glukoze na antocijanidin povećava stabilnost i topljivost nastalog antocijanina. Brojni antocijanini grožđa imaju acilirane šećere. Kao izvor acilnih skupina mogu biti aromatske kiseline kao što su *p*-kumarinska, kafeinska i

ferulinska kiselina te alifatske kiseline kao što su vinska i octena kiselina. Do acilacije dolazi na položaju C_6" glukoze, a acilacija šećera povećava kemijsku stabilnosti pripadnog antocijanina.

Na sastav antocijanina utječe genotip, pa se on vrlo često koristi u kemotaksonomijske svrhe. Sadržaj je antocijanina pod utjecajem okolišnih uvjeta. U većini crnih sorata prevladavaju trihidroksilirani antocijanini, od kojih je najčešće najzastupljeniji malvidin-3-*O*-glukozid. Sve crne sorte nemaju mogućnost sinteze aciliranih oblika antocijanina, a svakako najznačajniji primjer je 'Pinot crni'. Antocijanini su sadržani u kožici bobice grožđa, a posebice u stanicama vanjske hipoderme i epiderme. Njihova se sinteza odvija u citosolu stanica te se potom prenose u vakuole gdje se pohranjuju u posebnim odjeljcima, antocijaninskim vakuolarnim inkluzijama. Neke sorte, poznate kao bojadiseri, sadrže značajne količine antocijanina i u stanicama mezokarpa.[48,49]

Biosinteza antocijanina započinje u šari te se nastavlja sve do pune zrelosti. Prema nekim istraživanjima sadržaj antocijanina doseže maksimalnu vrijednost 10 do 20 dana prije tehnološke zrelosti, dok se prema drugima maksimalan sadržaj poklapa s maksimalnim sadržajem šećera tj. tehnološkom zrelošću. U prvim tjednima nakon šare sadržaj derivata cijanidina, delfinidina, petunidina i peonidina značajno se povećava, a maksimalnu vrijednost doseže 27 dana nakon šare tj. 20 dana prije tehnološke zrelosti da bi se potom neprestano smanjivao. Derivati malvidina slijede sličan obrazac promjene sadržaja s tim da maksimalne vrijednosti dosežu 41 dan nakon šare (10 dana prije tehnološke zrelosti) nakon čega im se sadržaj značajno smanjuje. Općenito sadržaj antocijanina u grožđu može biti u rasponu od 26 mg kg^{-1} svježih bobica pa do 6300 mg kg^{-1} svježih bobica.[32,34,50]

2.3. Biološka aktivnost i primjena fenola

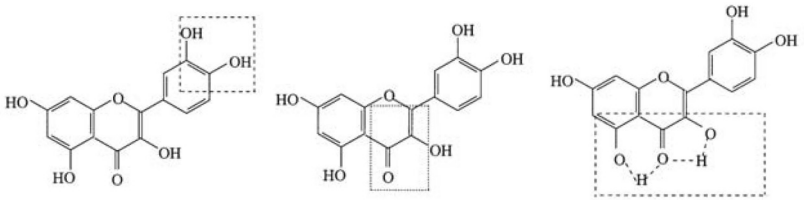
Biološka aktivnost flavonoida, fenolnih kiselina te stilbena temelji se na njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti te na sposobnosti da međudjeluju s određenim spojevima, proteinima i enzimima. Kao antioksidansi mogu djelovati putem nekoliko mehanizama, od kojih je najznačajniji onaj u kojem djeluju kao ″hvatači″ radikala pri čemu terminiraju lančane reakcije radikala. Radikali se mogu definirati kao atomi ili molekule koje imaju nespareni elektron, a što ih čini izrazito reaktivnima. Najčešće prisutni radikali su reaktivni spojevi kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) te reaktivni spojevi dušika (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) od koji je potrebno spomenuti superoksidni anion, hidroksilni i

peroksilni radikal, vodikov peroksid, peroksinitril te dušikov (II) oksid. Općenito, da bi neki spoj bio antioksidans, mora zadovoljiti dva osnovna kriterija: 1) kada je sadržan u koncentraciji puno nižoj od one supstrata podložnog oksidaciji, on može značajno odgoditi ili inhibirati oksidaciju supstrata te 2) nastali fenolni (fenoksilni) radikal mora biti stabilan da bi se spriječilo da djeluje u vidu radikala koji nastavlja, a ne terminira, lančanu reakciju. Stabilizacija nastalog fenoksilnog radikala postiže se delokalizacijom elektrona, nastankom intramolekulskih vodikovih veza ili dodatnom oksidacijom u reakciji s drugim radikalom. Da bi neki flavonoid bio dobar antioksidans mora posjedovati određene strukturne osobitosti:

1) da bi došlo do delokalizacije elektrona prsten B mora imati *ortho*-dihidroksilnu (kateholnu) strukturu (Slika 2.16 a);

2) delokalizaciju elektrona na prstenu B omogućava 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom (Slika 2.16 b);

3) hidroksilne skupine na položajima 3 i 5 moraju biti slobodne da bi se omogućilo nastajanje vodikove veze s 4-keto-skupinom (Slika 2.16 c).



a b c

Slika 2.16. Strukturne osobitosti flavonoida koji djeluju kao antioksidansi

Važnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti imaju položaj, struktura i broj vezanih šećera. Aglikoni, u usporedbi s pripadnim glikoziliranim oblicima značajno su učinkovitiji hvatači radikala. Općenito, *O*-metilacija hidroksilnih skupina smanjuje sposobnost hvatanja radikala. U slučaju flavan-3-ola povećanje stupnja polimerizacije povećava antioksidacijsku aktivnost pa su dimerni i trimerni oblici značajno učinkovitiji hvatači radikala u usporedbi s monomerima. Također, fenolne kiseline mogu biti dobri antioksidansi, a posebice one koje imaju kateholnu strukturu kao što je kafeinska kiselina.[51]

Drugi mogući mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola i fenolnih kiselina je putem međudjelovanja s drugim antioksidansima kao što su vitamini C i E. U ovim reakcijama fenoli pospješuju obnavljanje navedenih antioksidansa.

Važno svojstvo fenolnih spojeva mogućnost je tvorbe kelata s ionima prijelaznih metala kao što su bakar (I) i željezo (II). Keliranjem ovih iona sprječava se njihovo sudjelovanje u Fentonovim reakcijama kojima nastaju vrlo reaktivni hidroksilni radikali.[52]

Velike količine radikala nastaju kao neizbježni sporedni produkti u brojnim biokemijskim procesima, a posebice u onima u kojima se kao supstrat koristi molekularni kisik. S obzirom da organizam brojnim mehanizmima ima sposobnost uklanjanja ROS i RNS, ti sporedni produkti metabolizma kisika u normalnim fiziološkim uvjetima ne predstavljaju prijetnju. Ako radikali nastaju u izrazito velikim količinama te na mjestima gdje to nije uobičajeno, ravnoteža između njihovog nastajanja i uklanjanja se gubi, što dovodi do oksidacijskog stresa koji je uzročnik peroksidacije lipida te oksidacije DNA i proteina, a što u konačnici može dovesti do oštećenja tkiva. Ovu neravnotežu mogu uzrokovati ishemija, upalni procesi, radioaktivno zračenje, UV zračenje, citostatici, teški metali te citokini. Oksidacijski stres ima važnu ulogu u nastajanju neurodegenerativnih, kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, fibroze, hemolize kao i u samom procesu starenja.[53]

Fenolni spojevi posjeduju sposobnost izravnog vezanja na određene proteine ili peptide. Takav način djelovanja potiče inhibiciju ključnih enzima, promjenu staničnih receptora ili transkripcijskih faktora, promjene u prijenosu staničnih signala kao i promjene u nakupinama proteina koji mogu regulirati stanične funkcije povezane s rastom, proliferacijom, upalnim procesima, apoptozom, angiogenezom te odzivima imunološkog sustava.[2]

S obzirom na brojne pozitivne učinke i moguće mehanizme djelovanja, fenoli imaju sve izraženiju primjenu u različitim granama industrije kao što su farmaceutska, kozmetička te prehrambena industrija.

2.3.1. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u farmaceutskoj industriji

Od davnina je poznato da neke biljke posjeduju ljekovita svojstva te su učinkovito sredstvo za liječenje brojnih bolesti. Ljekovita svojstva nekih biljaka pripisuju se fenolima. Ekstrakt ginka (*Ginko biloba*) bogat je flavonoidima te se u vidu biljnog lijeka koristi za poboljšanje cirkulacije kao i za poboljšanje stanja bolesnika s oštećenim kognitivnim funkcijama, dok se ekstrakt ploda sikavice (*Silybum marianum*) koji sadrži veliku količinu polifenola silimarina primjenjuje za liječenje i poboljšanje funkcije jetara. Fenoli posjeduju protuupalna, antimikrobna i antitumorska svojstva te mogu djelovati u sprječavanju nastanka kardiovaskularnih bolesti što ih čini potencijalnim aktivnim tvarima za proizvodnju lijekova.

Upala se može definirati kao složena biološka reakcija tkiva na različite štetne podražaje poput patogena, oštećene stanice ili iritanse. Ona je obrambeni mehanizam organizma kojim se uklanjaju štetni podražaji te u slučaju ozlijede započne proces zacjeljivanja tkiva. Normalna je upala obično kratkotrajna. U slučaju kad upala prelazi u kronični stadij ona postaje dijelom patogeneze brojnih bolesti i poremećaja kao što su različite kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, astma, različiti karcinomi i dr. U razvoj upalnog procesa uključene su brojne sastavnice među kojima su posrednici upale: dušikov (II) oksid (NO), eikozanoidi (prostaglandini, tromboksani, prostaciklini i leukotrieni), molekule za adheziju stanica, citokini (interleukini, interferoni, kemokini itd.), a koji reguliraju promjene u tkivima te potiču lučenje upalnih stanica. Osim posrednika upale, u upalni proces uključeni su i brojni transkripcijski faktori NF-κB, aktivator proteina-1 (AP-1) te prijenosnici signala i aktivatori transkripcije (STAT), a koji su odgovorni za ekspresiju odgovarajućih upalnih gena. Sposobnost vezanja ovih transkripcijskih faktora na određeni slijed DNA mijenja se pomoću različitih protein kinaza (mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK), protein kinaza C (PKC), tirozin kinaza) uključenih u kaskadu prijenosa signala. Fenoli putem brojnih mehanizama djeluju protuupalno. Oni mogu inhibirati enzime odgovorne za sintezu eikozanoida iz arhaidonske kiseline kao što su fosfolipaza A_2, ciklooksigenaza-1 (COX-1), ciklooksigenaza-2 (COX-2) te lipooksigenaza (LOX) bilo da se izravno vežu na enzime i djeluju kao inhibitori bilo da utječu na ekspresiju gena odgovornih za sintezu ovih enzima. Fenolni spojevi također mogu inhibirati sintezu ostalih posrednika upalnog procesa citokina, kemokina, adhezijskih molekula, NO, tako što utječu na putove prijenosa signala koji su uključeni u njihovu sintezu. Promijene kaskada molekulskih događanja dovode do prevelike ekspresije navedenih posrednika pa inhibicija aktivacije transkripcijskih faktora NF-κB, AP-1, STAT dovodi do smanjenja njihove količine, a time i do ublažavanja upale. Fenoli mijenjaju kapacitet vezanja transkripcijskih faktora na DNA inhibicijom određenih protein kinaza uključenih u aktivaciju navedenih transkripcijskih faktora. Sam mehanizam djelovanja pojedinih fenolnih spojeva uvelike ovisi o njihovoj strukturi, a smatra se da najčešće djeluju višestrukim mehanizmima te istovremeno djeluju na više mjesta upalne kaskade.[54-56]

Prvi korak u procesu nastanka karcinoma inicijacija je tumora koja započinje oštećenjem DNA u jednoj ili više stanica uslijed izlaganja kancerogenima. Ako ne dođe do popravka oštećene DNA, dolazi do mutacija na genima što u konačnici dovodi do klonskog povećanja broja stanica s oštećenom DNA. U ovim stanicama dolazi do promjena u putovima prijenosa signala koji reguliraju proliferaciju i diferencijaciju stanica. Sastavnice ovih putova

uključuju nekoliko kinaza kao što su MAPK i PKC. Abnormalna aktivacija ili utišavanje ovih kinaza ili transkripcijskih faktora (NF-κB i AP-1) s kojima su povezane, uzrokuje nekontrolirani rast stanica, a koji dovodi do malignih promjena. Fenoli imaju antikancerogeni učinak koji postižu brojnim mehanizmima na staničnoj razini. Oni mogu inhibirati djelovanje navedenih kinaza kao i regulirati putove prijenosa signala inhibicijom određenih transkripcijskih faktora ili enzima odgovornih za njihovu aktivaciju. Promjenom određenih putova prijenosa signala fenoli mogu aktivirati signale za apoptozu tumorskih stanica, a što u konačnici dovodi do inhibicije karcinogeneze. Angiogeneza je proces koji se odvija posredstvom promjena u proliferaciji i ekspresiji gena stanica endotela. Inhibicijom angiogeneze fenoli kontroliraju rast, progresiju te metastaziranje tumora.[56,57]

Fenoli posjeduju višestruko neuroprotektivno djelovanje koje uključuje zaštitu neurona od oštećenja izazvanih neurotoksinima, posjeduju sposobnost sprječavanja upale neurona te imaju sposobnost poboljšanja pamćenja, učenja i kognitivnih funkcija. Navedeni se učinci mogu postići putem dvaju mehanizama. Fenoli međudjeluju s važnim putovima prijenosa signala u mozgu izazivajući inhibiciju apoptoze uzrokovane neurotoksinima te potpomaganje preživljavanja i diferencijacije neurona. Ova skupina spojeva selektivno djeluje na brojne protein kinaze i način prijenosa signala koji reguliraju određene transkripcijske faktore odgovorne za ekspresiju određenih gena. Polifenoli imaju pozitivan učinak na vaskularni sustav te na taj način utječe i na celebrovaskularnu cirkulaciju što u konačnici rezultira angiogenezom, neurogenezom te promjenama u morfologiji neurona, a čime se poboljšava sposobnost pamćenja i učenja. Nastajanje nakupina amiloidnih fibrila zajedničko je obilježje brojnih neuroloških bolesti Alzheimerove, Parkinsonove, Huntigtonove i prionske bolesti. Nastanak amiloidnih fibrila posljedica je agregacije i taloženja pogrešno strukturiranih proteina koji je posljedica pogreški u prijenosu signala aksonima, inhibicije proteosomske aktivnosti, pogreški u transkripciji DNA te povećanja razine oksidacijskog stresa, a što u konačnici rezultira disfunkcijom neurona. Fenoli inhibiraju nastanak amiloidnih fibrila preko posebnih aromatskih interakcija čime se onemogućava nastanak strukturiranih fibrila s citotoksičnim učinkom.[58,59]

Podloga razvoja različitih kardiovaskularnih bolesti je ateroskleroza koja započinje poremećajem funkcije endotela. Oštećenje funkcije endotela posljedica je viška angiotenzina II i kolesterola bogatog lipoproteinima niske gustoće (LDL) čijom oksidacijom započinje oštećenje endotela. Ekspresija adhezijskih molekula privlači monocite koji prodiru u stijenku, prelaze u makrofage koji fagocitiraju oksidirani LDL, da bi na posljetku nastale pjenaste stanice i aterosklerotski plak. Fenoli mogu smanjiti adsorpciju kolesterola i time smanjiti

njegov unos u jetra u obliku hilomikrona. Smanjenje količine kolesterola u jetrima povećava sintezu LDL-receptora koji kompenziraju manju dostupnost supstrata pa na taj način smanjuju njegovu količinu u plazmi. Fenoli značajno utječu i na brzinu izlučivanja apolipoproteina B kao i na aktivnost mikrosomskog proteina prenosioca (MTP) i enzima acil-CoA kolesterol aciltransferazu 2 što dovodi do promjena u sastavu čestica lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL). Smanjena količina triglicerida u plazmi posljedica je smanjene aktivnosti MTP i povećane aktivnosti lipoprotein lipaze. Sadržaj triglicerida u plazmi može se dodatno smanjiti promjenom kaskade delipidacije čime se značajno smanjuje količina LDL u krvotoku. Isto tako, fenoli inhibiraju sintezu citokina povezanih s adhezijskim molekulama. Fenolni spojevi inhibiraju peroksidaciju lipida te na taj način utječu na nastanak pjenastih stanica. Tromboza ima važnu ulogu u razvoju i napredovanju ateroskleroze. Ciklooksigenaza je enzim koji katalizira sintezu tromboksana A_2 (TXA_2), a koji ima veliku ulogu u agregaciji trombocita i nastanku trombova. Flavonoidi mogu inhibirati sintezu navedenog tromboksana u trombocitima kao i leukotriena u neutrofilima. Također, oni su i antagonisti receptora za TXA_2, reguliraju ekspresiju i aktivnost adhezijskih molekula, potiču sintezu NO (važnog vazodilatatora), što u konačnici dovodi do sprječavanja nastanka trombova.[56,60,61]

Jedno od farmakološki važnih svojstava polifenola i fenolnih kiselina njihova je antimikrobna aktivnost tj. antibakterijska, antimikotička te antiviralna aktivnost. Najviše je istraženo njihovo antibakterijsko djelovanje. Oni mogu djelovati putem nekoliko mehanizama na brojne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Mehanizmi antibakterijskog djelovanja fenola uključuju inhibiciju unutarstaničnih enzima, uklanjanje supstrata za rast bakterija, izravno djelovanje na metabolitičke putove kao što su oksidacijska fosforilacija ili prijenos elektrona te sprječavanje sinteze metaloproteina putem kompleksacije iona metala. Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina kod određenih bakterija temelji se na inhibiciji enzima kao što su DNA giraze te DNA topoizomeraze. Zbog svoje strukture, fenoli mogu međudjelovati s proteinima, lipidima i određenim enzimima staničnih membrana bakterija te na taj način uzrokovati promjene u funkcionalnosti membrana u vidu promjena njihove fluidnosti i propusnosti čime omogućavaju gubitak protona, iona i makromolekula, ali i ulazak drugih molekula u stanicu npr. antibiotika. Oksidacijska fosforilacija važan je metabolički proces za dobivanje energije u obliku molekula ATP-a. Inhibicijom samo jednog od enzima ovog procesa kao što je npr. NADH-citokrom c reduktaza dolazi do inhibicije čitavog procesa čime se inhibira rast bakterije. Neki fenoli mogu inhibirati virus humane imunodeficijencije (HIV), a posebno pandemijski soj HIV-1 sprječavajući ulazak virusa u stanicu domaćina ili onemogućavajući njegovu replikaciju inhibicijom ključnih enzima kao što su HIV-1 reverzna

transkriptaza i druge DNA polimeraze. Brojni fenolni spojevi mogu inhibirati i aktivnost drugih virusa: herpes simpleks virusa, respiratornog sincicijskog virusa, polio virusa, virusa bjesnoće, rotavirusa te Sindbis virusa. U slučaju navedenih virusa polifenoli inhibiraju različite DNA ili RNA polimeraze.[62,63]

2.3.2. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji

Veliki problem prehrambene industrije kvarenje je hrane koje može uzrokovati kombinacija različitih faktora kao što su svjetlost, prisutnost kisika, toplina, vlaga te različite vrste mikroorganizama. Mikrobiološko kvarenje uzrokuju različite vrste bakterija: *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurinum* te različite bakterije iz rodova *Pseudomonas, Streptococcus, Lactobacillus* te *Bacillus*. U svrhu produžetka trajanja mesa i mesnih prerađevina vrlo se često dodaju različiti nitrati i nitriti koji su izrazito štetni za ljudsko zdravlje.[64]

Oksidacija lipida važan je faktor koji utječe na kvalitetu pojedinih namirnica, a posebice mesa i mesnih prerađevina, riba i morskih plodova te masti i ulja. Glavni uzročnici oksidacije lipida prisutnost su kisika i nezasićenih masnih kiselina. Peroksidacija lipida započinje reakcijom ROS s nezasićenim masnim kiselinama pri čemu nastaju lipidni (peroksil) radikali koji nastavljaju reagirati i tvoriti različite sekundarne oksidacijske produkte. Čitav proces oksidacije lipida dovodi do užeglosti hrane. U svrhu sprječavanje oksidacije lipida, u namirnice se dodaju različiti konzervansi kao što su sintetički antioksidansi (butil-anisol, butil-hidroksitoluen te *tert*-butil-hidroksikinon) koji imaju negativan učinak na ljudsko zdravlje jer mogu potaknuti nastanak karcinoma.[65]

Enzimsko posmeđivanje jedna je od najznačajnijih reakcija promjene boje koja utječe na kvalitetu morskih plodova. Ove promjene boje, posljedica su djelovanje endogenog enzima polifenoloksidaze (PPO). U prisutnosti kisika ovaj enzim prevodi bezbojne monofenole u difenole koji se potom prevode u obojene kinone. Nastali kinoni reagiraju s aminokiselinama i tvore smeđe polimere, melanine, pa se ponekad ova vrsta enzimske reakcije naziva melanoza. Prisutnost nastalih melanina nije štetna za potrošača, ali ona značajno umanjuje tržišnu vrijednost morskih plodova. Za sprječavanje ili usporavanje nastanka melanoze koriste se različiti pripravci na bazi sulfita, a za koje je dokazano da oboljeli od astme mogu dobiti napadaj takozvane sulfitne astme, a mogu uzrokovati i povišenje tlaka, emfizem, crvenilo i konjunktivitis.[66]

Boja određenih proizvoda čini ih vizualno primamljivijima i interesantnijima, a što može potaknuti apetit kod potrošača. Općenito, umjetne se boje smatraju aditivima za

poboljšanje senzornih svojstava namirnica. Uvelike se dodaju u različite konditorske proizvode, sladolede, pudinge i bezalkoholna pića. Brojne umjetne boje mogu izazvati alergijske reakcije, ekceme, glavobolje i drugo.[67]

U posljednjem je desetljeću porasla svijest o zdravoj prehrani i konzumaciji proizvoda bez dodanih štetnih prehrambenih aditiva u obliku konzervansa, bojila ili antioksidansa. Ovakav svjetski trend potaknuo je provedbu istraživanja prirodnih spojeva kao potencijalnih zamjena za one sintetičke. U žarištu tih istraživanja su fenoli, prirodni tokokromanoli i dr. Danas, na razini Europske unije dozvoljena je uporaba tokokromanola dobivenih iz različitih biljnih vrsta, ekstrakata ružmarina bogatih fenolima te ekstrakata origana i melise koji sadrže različite polifenole kao prirodnih prehrambenih aditiva. Za očekivati je da se na listu dozvoljenih prehrambenih aditiva uvrste i ekstrakti fenola dobiveni iz drugih biljnih vrsta pa tako i oni dobiveni iz grožđa.[65]

S obzirom da brojni fenoli posjeduju antioksidacijska te antimikrobna svojstva mogu biti dobra zamjena za sintetičke antioksidanse odnosno za nitrite i nitrate. Dodatak ekstrakata fenola grožđa u različite namirnice životinjskog podrijetla ribu, piletinu, puretinu, govedinu te njihove prerađevine, značajno umanjuje oksidaciju lipida i time produžava rok trajanja namirnice. U nekim slučajevima ekstrakti grožđa mogu biti učinkovitiji antioksidansi od onih sintetičkih.[68-70]

Brojni su fenoli dobri inhibitori rasta raznih bakterija pa tako i onih koje uzrokuju mikrobiološko kvarenje hrane. Dodatak ekstrakta fenola grožđa u kuhanu govedinu značajno smanjuje broj bakterija kao što su *E. coli* i *S. typhimurium*. Fenolni spojevi inhibiraju rast i razvoj mezofilnih i psihrofilnih bakterija u škampima pohranjenim na ledu.[71,72]

Fenolni spojevi mogu spriječiti nastanak melanoze kod morskih plodova. Oni izravno inhibiraju enzim PPO, mogu hvatati kisik odnosno reducirati nastale kinone u difenole. Polifenoli imaju sposobnost keliranja bakra koji se nalazi u aktivnom mjestu enzima PPO, ali isto tako mogu djelovati i kao kompeticijski inhibitori ovog enzima zbog velike strukturne sličnosti sa supstratima.[66]

Antocijanini biljni su pigmenti čija boja ovisi o strukturi, ali i pH-vrijednosti medija u kojemu se nalaze. Antocijanini dobiveni iz kožice grožđa crvene su boje pa se uvelike dodaju u različita bezalkoholna pića i konditorske proizvode gdje imaju ulogu bojila. Primjena ove skupine spojeva ograničena je na proizvode niske pH-vrijednosti. Kada je pH-vrijednost proizvoda viša, tada se u svrhu stabilizacije boje zajedno s antocijaninima dodaju betacijani i betaini.[73]

2.3.3. Primjena fenola iz biljnih ekstrakata u kozmetičkoj industriji

Koža štiti unutarnje organe od opasnih učinaka okolišnih i ksenobiotičkih čimbenika pa je stoga očuvanje njezine vitalnosti i funkcije od velikog značaja za cjelokupno zdravlje organizma. Izlaganje sunčevom UV zračenju ključan je faktor za začetak nekolicine kožnih poremećaja: nastanka bora i raka, perutanja i suhoće kože te poremećaja u pigmentaciji.[74]

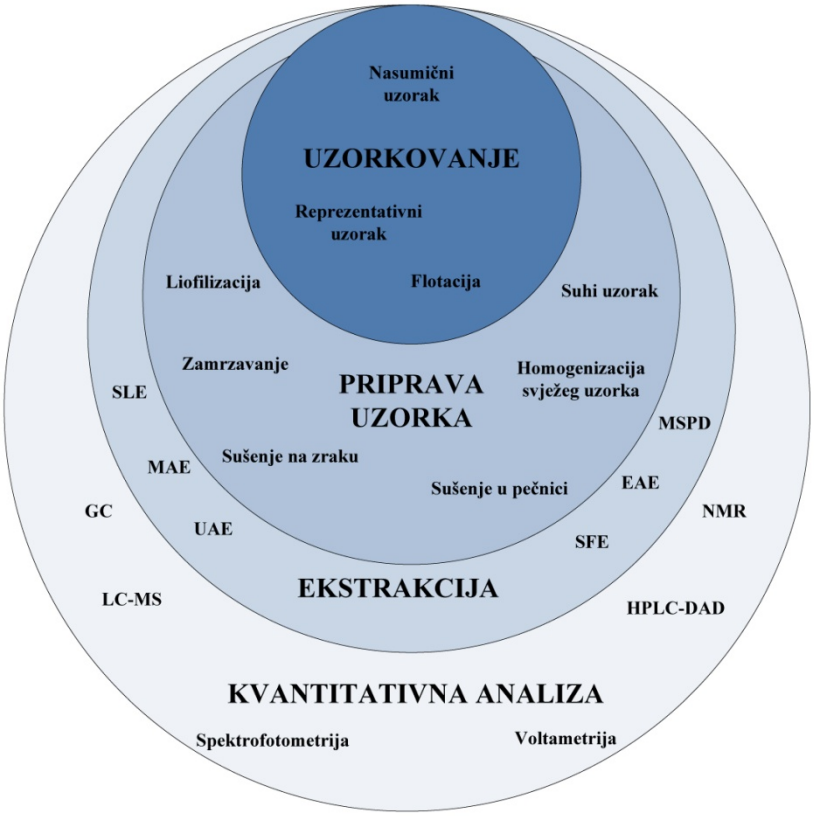
Većina fenola ima sposobnost apsorpcije UV zračenja pa kada se primjenjuju lokalno mogu spriječiti prodiranje UV zračenja kroz kožu. Njihov zaštitni faktor u rasponu je od 7 do 29, pa dodatkom u kreme za sunčanje mogu smanjiti upalu, oksidacijski stres te oštećenja DNA do kojih može doći djelovanjem UV zračenja.[75]

Upalni procesi u koži mogu nastati djelovanjem UV zračenja jer ono potiče ekspresiju enzima COX-2 kao i sintezu prostaglandina te proupalnih citokina. S obzirom da različiti fenoli imaju sposobnost inhibicije samog enzima COX-2 kao i njegove ekspresije te mogu inhibirati sintezu proupalnih citokina tako što djeluju na ključne sastavnice putova prijenosa signala koji su odgovorni za sintezu ovih citokina pa na taj način mogu umanjiti štetno djelovanje sunčevog UV zračenja. Izlaganje kože UV zračenju može uzrokovati povećanu sintezu ROS u koži odnosno pojavu oksidacijskog stresa koji može dovesti do preuranjenog starenja kože i oštećenja DNA. Fenoli mogu smanjiti sadržaj nastalih ROS bilo antioksidacijskim djelovanjem bilo da inhibiraju djelovanje ili ekspresiju enzima ključnih za nastanak reaktivnih spojeva kisika. Oksidacija nekih aminokiselina u proteinima, a do koje dolazi uslijed djelovanja UV zračenja, uzrokuje nastanak karboniliranih proteina čija je funkcija različita od one nativnih oblika. Inhibicija ovakve vrste oksidacije proteina fenolima može dovesti do smanjenja oštećenja kože te do sprječavanja preranog starenja iste. Oštećenja DNA u obliku ciklobutan-pirimidinskih dimera nastaju uslijed djelovanja UV zračenja na kožu. Ova se oštećenja smatraju glavnim uzročnicima karcinoma kože. Nastala oštećenja aktiviraju mehanizam za popravak DNA, a koji se odvijaju brže u prisutnosti fenola.[76]

Starenje kože povezano je sa smanjenjem količine kolagena, elastina te hijaluronske kiseline, a do kojeg dolazi djelovanjem enzima kolagenaze, elastaze odnosno hijaluronaze. Fenoli mogu inhibirati navedene enzime te time umanjiti razgradnju navedenih proteina i hijaluronske kiseline što za posljedicu ima sprječavanje starenja kože.[77]

2.4. Kemijska analiza fenola grožđa

Polifenoli i fenolne kiseline imaju važnu ulogu u određivanju organoleptičkih svojstava vina pa se njihov sastav i sadržaj često koristi za određivanje kvalitete neke sorte. Analiza ovih spojeva u grožđu provodi se u svrhu određivanja fenolne zrelosti koja se obično ne poklapa s onom tehnološkom, prilikom evaluacije sorata i/ili klonskih kandidata pojedine sorte kao i nakon primjene određenih ampelotehničkih mjera u vinogradu. Sam proces analize izrazito je složen te se sastoji o brojnih koraka: uzorkovanja, pohranjivanja uzoraka, priprave uzoraka, ekstrakcije te kvalitativne i kvantitativne analize (Slika 2.17). Svaki od navedenih koraka potrebno je optimirati da bi se dobio što točniji i precizniji krajnji rezultat analize. Premda je do danas objavljeno više od stotinu različitih radova povezanih s analizom fenola još uvijek ne postoji standardni postupak za pripravu uzoraka, ekstrakciju te njihovu kvantitativnu analizu.



Slika 2.17. Shematski prikaz analize fenola u grožđu

2.4.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je prvi korak u analizi fenola grožđa. Budući da nepravilno uzorkovanje ima za posljedicu pogrešku u čitavom analitičkom procesu ovaj je korak potrebno optimirati pritom uzimajući u obzir cilj analize. Način uzorkovanja grožđa ovisi o konačnom cilju analize, a može se provesti na nekoliko načina. Najčešće se uzima reprezentativni uzorak koji je po svom sastavu izrazito heterogen jer u vinogradu postoji velika varijabilnost u kemijskom sastavu grožđa uslijed ne sinkroniziranog rasta i razvoja pojedinih bobica. Varijabilnost je prisutna između bobica s različitih grozdova na istom trsu, ali i između bobica s istog grozda. Prvi korak u sakupljanju reprezentativnog uzorka izrada je plana uzorkovanja, a koji osigurava uzimanje plodova iz svih dijelova vinograda. Odabir trsova s kojih se uzimaju plodovi može biti slučajan ili sustavan kada se koriste koordinatne mreže (npr. plodovi se uzimaju sa svakog desetog trsa u svakom petom redu). Sama veličina prikupljenog uzorka ovisi o stupnju varijabilnosti u vinogradu. Kada je stupanj varijabilnosti velik tada se uzimaju uzorci s većeg broja trsova. Obično se uzima 200 do 400 bobica s 20 do 40 grozdova i to na način da se po 2 do 4 bobice uzimaju s vrha i dna te s prednje i stražnje strane grozda. Bobice se uzimaju s grozdova s obiju strana reda. Ovakav način uzorkovanja primjenjuje se kod određivanja zrelosti ili prilikom određivanja učinka primijenjenih ampelotehničkih zahvata u vinogradu.[78] Kada je cilj analize evaluacija klonskih kandidata ili optimiranje ekstrakcijskog postupka potrebno je imati što homogeniji uzorak bobica grožđa. Jedan od načina dobivanja homogenog uzorka primjena je postupka flotacije. Ovim se postupkom bobice razdvajaju na temelju razlika u gustoći, a koja je povezana sa sadržajem šećera u bobici. Smatra se da bobice slične gustoće imaju i vrlo ujednačen sadržaj fenola.[79,80]

2.4.2. Priprava uzoraka

Priprava uzorka obuhvaća sve one radnje koje je potrebno provesti na uzorku prije postupka same ekstrakcije. Kada se radi o analizi grožđa, to su najčešće pohranjivanje uzoraka, ako nije moguće provesti analizu neposredno nakon berbe, homogenizacija u slučaju svježeg uzorka, odmrzavanje u slučaju zamrznutog uzorka, sušenje te usitnjavanje.

2.4.2.1. Pohrana uzoraka

Period dostupnosti uzoraka grožđa izrazito je kratak, pa je najčešće uzorke prije analize potrebno prikladno pohraniti. Fenolni su spojevi izrazito podložni razgradnji u slučaju neprikladnih uvjeta pohranjivanja kao što su neprikladna temperatura, izloženost svjetlu, kisiku itd., a što za posljedicu ima smanjenje njihovog sadržaja.[81] Uzorci grožđa se vrlo rijetko analiziraju neposredno nakon berbe.[82] Puno se češće prije postupka analize pohranjuju

na određeni vremenski period. Jedan od načina pohrane je čuvanje suhih uzoraka kožica bobica[83,84] međutim uobičajenije je zamrzavanje bobica ili čitavih grozdova pri temperaturama od −18 °C do −30 °C.[85-92] Premda je zamrzavanje vrlo učinkovita metoda pohranjivanja uzoraka, ono dovodi do ireverzibilnih promjena u staničnim stijenkama, središnjoj lameli te u protoplastima što za posljedicu ima promjene u sadržaju i sastavu sastavnica stanica.[93] Neselektivno cijepanje staničnih stijenki može dovesti do razgradnje spojeva koji su na nju vezani. Dekompartmentilizacija stanice može omogućiti reakcije između endogenog enzima PPO i njegovih supstrata koji su inače u cjelovitoj stanici sadržani u različitim staničnim odjeljcima. Općenito, smatra se da brzim načinom zamrzavanja u tekućem dušiku dolazi do boljeg očuvanja cjelovitosti stanica jer je manje izraženo nastajanje kristala leda koji su odgovorni za cijepanje stanične stijenke i ostalih staničnih sastavnica. Ovakav je način zamrzavanja vrlo skup pa se u praksi najčešće koristi zamrzavanje u običnim zamrzivačima.[94,95] Kada se uzorci čuvaju u osušenom obliku potrebno je paziti da ne budu izloženi svjetlu, visokim temperaturama, vlazi i kisiku jer navedeni faktori mogu značajno umanjiti sadržaj pojedinih fenola.

2.4.2.2. Odmrzavanje

U slučaju zamrznutih uzoraka, prije sušenja, usitnjavanja i ekstrakcije, uzorke je potrebno odmrznuti na prikladan način. Već tijekom samog zamrzavanja dolazi do narušavanja strukture biljne matrice, a do dodatnih promjena dolazi i tijekom procesa odmrzavanja. Postoji nekoliko načina odmrzavanja uzoraka grožđa kao što su skidanje kožice sa još zamrznute bobice, odmrzavanje u mikrovalnoj pećnici, u hladnjaku te pri sobnoj temperaturi. Trajanje samog postupka odmrzavanja ovisi o temperaturi pri kojoj se ono provodi te je najkraće u slučaju mikrovalnog odmrzavanja, dok je najduže u hladnjaku. Provedena su brojna istraživanja o utjecaju zamrzavanja i odmrzavanja na sastav i sadržaj fenola u različitim biljnim vrstama kao što su jagode, maline, borovnice, trešnje te višnje, dok do danas nije provedeno istraživanje na grožđu. Općenito, smatra se da brze metode odmrzavanja održavaju veću cjelovitost staničnih struktura tkiva te time pridonosi očuvanju sadržaja fenola.[96-100]

2.4.2.3. Sušenje

Kožice bobica grožđa sadrže masene udjele vode u rasponu od 75 % do 80 %. Takav medij pogoduje rastu i razvoju brojnih mikroorganizama kao i razgradnji određenih kemijskih spojeva, a posebice fenola, stoga je potrebno naći metodu za očuvanje maksimalnog sadržaja ovih spojeva. Jedna od mogućih metoda je i sušenje, a koje ima dugu povijest uporabe za dobivanje prilično stabilnih produkata različitih biljnih vrsta koji se potom mogu pohraniti u

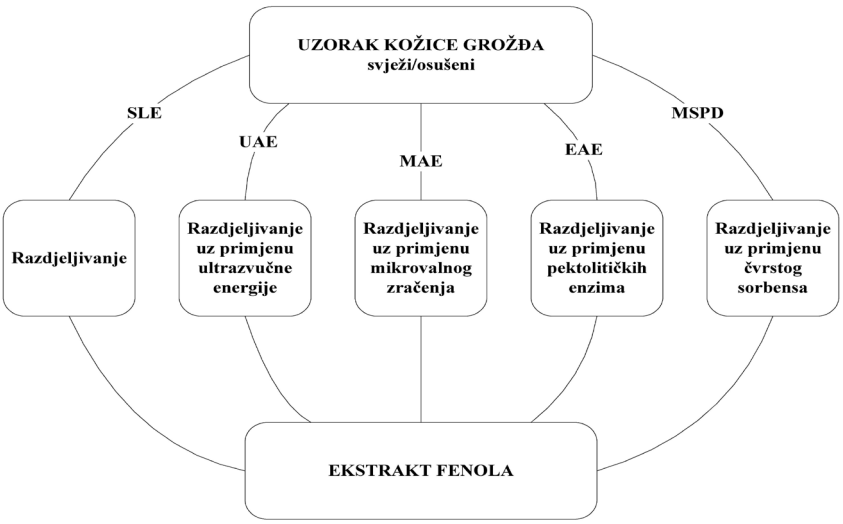
određenom vremenskom periodu. Sušenjem se uklanja voda iz biljne matrice čime se sprječava rast mikroorganizama te razgradnja određenih skupina spojeva.[101] Ponekad postupak ekstrakcije zahtjeva uporabu osušenog uzorka. Postupak sušenja može utjecati na sastav i sadržaj fenola kao i na kinetiku i učinkovitost ekstrakcije. Usitnjavanjem suhog uzorka dobivaju se vrlo male čestice čime se povećava dodirna površina između čvrstog uzorka i ekstrakcijskog otapala, a što u konačnici povećava učinkovitost same ekstrakcije. Sušenje uzrokuje promjene u strukturi same biljne matrice jer može uzrokovati promjene njezine poroznosti.[102] Za sušenje kožica bobica grožđa koriste se brojne tehnike kao što su liofilizacija, sušenje na zraku te sušenje u pećnici s cirkulirajućim vrućim zrakom. Različite metode sušenja mogu imati različit učinak na sastav i sadržaj pojedinačnih fenola u kožici grožđa.

Liofilizacija je postupak u kojem se voda u uzorku prvo zamrzava, a potom uklanja sublimacijom (primarno sušenje) te naposljetku desorpcijom (sekundarno sušenje). Sublimacija leda odvija se u uvjetima sniženog tlaka i temperature (tlak i temperatura moraju biti niži od onih u trojnoj točki vode). Nakon sublimacije u uzorku preostaje 7 % do 8 % vezane vode koju je moguće ukloniti desorpcijom. Ovaj se postupak provodi pri temperaturama višim od sobne temperature te uz sniženi tlak (maksimalni mogući vakuum sustava). Trajanje postupaka sušenja liofilizacijom ovisi o udjelu vode u uzorku, a u slučaju kožica grožđa on traje 2 do 3 dana.[101,103] Sušenje u pećnicama s vrućim cirkulirajućim zrakom provodi se pri različitim temperaturama (od 40 °C do 100 °C), a trajanje samog postupka ovisi o odabranoj temperaturi te je u rasponu od nekoliko sati pa do 2 dana.[104,105] U posljednje vrijeme sve se više primjenjuje sušenje na zraku pri sobnoj temperaturi čije vrijeme trajanja ovisi o udjelu vode u uzorku, a u rasponu je od 2 pa do 7 dana.[106] Bez obzira na činjenicu da način sušenja značajno utječe na konačan sastav i sadržaj fenola do danas je proveden vrlo mali broj istraživanja tijekom kojih je ispitan učinak različitih metoda sušenja na sastav i sadržaj fenola. U većini tih istraživanja praćen je utjecaj određene metode sušenja na ukupan sadržaj fenola kao i na antioksidacijsku aktivnost. Uzimajući u obzir činjenicu da je navedenim metodama određen oksidacijsko-redukcijski status uzoraka, dobiveni rezultati ne moraju nužno odražavati stvarno stanje u sastavu i sadržaju pojedinačnih fenola u analiziranim uzorcima.[101,104-107]

2.4.3. Ekstrakcijske tehnike

Ekstrakcija se može definirati kao selektivno odjeljivanje jednog ili više analita između dviju faza koje se međusobno ne miješaju te je vrlo važan korak u analizi fenolnih spojeva. Proces

ekstrakcije sastoji se od niza koraka. U prvom se koraku putem difuzije uzorak dovodi u neposredni kontakt s ekstrakcijskim otapalom. U drugom koraku dolazi do razdjeljivanja i/ili otapanja analita u ekstrakcijskom otapalu. Kad je potrebno izdvojiti analit iz čvrstog uzorka, neophodno je prevladati energiju međudjelovanja između njega i matrice. Afinitet analita prema ekstrakcijskom otapalu mora biti veći od njegovog afiniteta prema matrici uzorka. Naposljetku, ekstrakcijska faza (koja sadrži analit) mora difundirati kroz uzorak te se odijeliti u zasebnu fazu koja se potom uklanja od netopljive matrice čvrstog uzorka centrifugiranjem ili filtriranjem. Ekstrakcijske se tehnike mogu podijeliti s obzirom na fizikalni proces do kojeg dolazi tijekom razdvajanja analita od matrice uzorka (Slika 2.18).[108] Za ekstrakciju fenola iz kožica bobica grožđa koriste se brojne ekstrakcijske tehnike kao što su ekstrakcija čvrsto-tekuće (engl. *Solid-Liquid Extraction*, SLE),[92,109-115] ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction,* UAE),[116-118] mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE)[118,119], enzimima potpomognuta ekstrakcija (engl. *Enzyme-Assisted Extraction*, EAE),[120-124] tlačna ekstrakcija tekućinom (engl. *Pressurized Liquid Extraction,* PLE) koja se naziva još i ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE)[86,125], ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE)[126] te raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu (engl. *Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD)[127]. Bez obzira na odabir ekstrakcijske tehnike, prilikom njezine primjene potrebno je podesiti brojne čimbenike: vrstu ekstrakcijskog otapala, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, veličinu čestica te omjer faza koji se definira kao omjer mase čvrstog uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala.



Slika 2.18. Shematski prikaz različitih ekstrakcijskih tehnika

2.4.3.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće

Ekstrakcija čvrsto-tekuće najčešće je primjenjivanja tehnika za ekstrakciju fenola iz kožica bobica grožđa. Tehnika SLE može se definirati kao fenomen prijenosa mase u kojemu analiti sadržani u čvrstoj matrici difundiraju u ekstrakcijsko otapalo koje je s njom u kontaktu. Ova se ekstrakcijska tehnika može provesti primjenom različitih postupaka: maceracijom, miješanjem ili protresanjem (mućkanjem). Prijenos mase, a time i učinkovitost ekstrakcije, mogu se povećati promjenom gradijenta koncentracije, difuzijskih koeficijenata i/ili graničnih slojeva, a na koje utječu vrsta otapala, veličina čestica, temperatura i trajanje ekstrakcije te prisutnost interferirajućih spojeva u matrici. Vrsta otapala glavni je faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije. Topljivost fenolnih spojeva ovisi o njihovoj prirodi i polarnosti. Oni mogu tvoriti komplekse s drugim biljnim sastavnicama kao što su ugljikohidrati i proteini, a takva međudjelovanja mogu utjecati na topljivost fenola u ekstrakcijskim otapalima, što u konačnici utječe na učinkovitost ekstrakcije.[128,129] Vrlo često tijekom ekstrakcije fenola dolazi i do ekstrakcije drugih spojeva poput klorofila, karotenoida, masti, terpena, voskova itd., a koji mogu uzrokovati smetnje tijekom kvalitativne i kvantitativne analize. Do koekstrakcije ovih spojeva obično dolazi kada se koriste ekstrakcijska otapala s udjelom organske faze većim od 70 %, pa je u tom slučaju potrebno provesti naknadni postupak pročišćavanja dobivenog ekstrakta. U tu svrhu učestalo se primjenjuju dvije tehnike, ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*) te ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*), čime se produžuje i poskupljuje postupak ekstrakcije. Smatra se da primjenom ekstrakcijskog otapala s udjelom organske faze manjim od 70 % nije potrebno provoditi naknadno pročišćavanje uzorkaj jer tada ne dolazi do značajne koekstrakcije.[130] Za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa najčešće se koriste metanol (MeOH),[92,110] etanol (EtOH),[109] aceton (ACE),[110] etil-acetat (EtAc),[111] te njihove vodene otopine koje sadrže volumne udjele vode u rasponu od 0 % do 50 %.[112-115] Na učinkovitost ekstrakcije utječe pH-vrijednost ekstrakcijskog otapala te je ona značajno veća u kiselim uvjetima. U ekstrakcijska otapala dodaju se različite kiseline, mravlja (FA), octena (AcH) te klorovodična kiselina, u udjelima od 0,1 % do 1 %.[92,109,110,112,115] Temperatura i vrijeme ekstrakcije faktori su koje je potrebno optimirati da bi se minimizirao utrošak energije uz postizanje maksimalne učinkovitosti ekstrakcije. Povišenjem temperature ekstrakcije povećava se učinkovitost ekstrakcije uslijed povećanja topljivosti analita i difuzijskog koeficijenta uz istovremeno smanjenje viskoznosti otapala. Fenoli imaju ograničenu termičku stabilnost pa stoga nije moguće beskonačno povišenje temperature. Smatra se da temperatura ekstrakcije fenolnih spojeva ne smije biti viša od 60 °C. Povišenjem temperature ekstrakcije dolazi do značajnog skraćivanja trajanja

ekstrakcijskog postupka. Povećanje omjera faza ima pozitivan učinak na učinkovitost ekstrakcije. Pokretačka sila tijekom procesa prijenosa mase unutar čvrstog uzorka gradijent je koncentracije, a koji je veći kada je omjer mase čvrstog uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala veći jer se time povećava i brzina difuzije. Veličina čestica ima značajan učinak na učinkovitost ekstrakcije. Manje čestice dovode do smanjenja difuzijske udaljenosti soluta unutar čvrstine te povećavaju gradijent koncentracije, čime se povećava brzina ekstrakcije. S obzirom da dolazi do skraćivanja puta koji analiti moraju prevaliti da dođu do površine pa time dolazi i do skraćivanja trajanja postupka ekstrakcije. Najčešće se koristi uzorak s rasponom veličine čestica od 125 μm do 250 μm.[131,132] Bez obzira što su poznati svi faktori koji utječu na učinkovitost ekstrakcije još uvijek ne postoji standardna metoda za kvantitativnu ekstrakciju fenola iz kožica grožđa. Danas se koriste brojne metode SLE od kojih su neke navedene u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Prikaz nekih često korištenih uvjeta SLE za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa

Ekstrakcijsko otapalo	**Način ekstrakcije**	***t***	**ϑ / °C**	**Omjer faza / g mL^{-1}**	**Broj koraka**	**Lit.**
EtOH:H_2O:HCl = 70:29:1	maceracija	24 h	25	1:1,5	1	109
1) MeOH = 100 2) MeOH:H_2O = 80:20 3) MeOH:H_2O = 50:20 4) H_2O = 100 5) ACE:H_2O = 75:25	1) maceracija 2) miješanje 3) miješanje 4) maceracija 5) miješanje	1) 24 h 2) 4 h 3) 4 h 4) 24 h 5) 1 h	1) –20 2) 25 3) 25 4) –20 5) 25	1:125	5	110
MeOH:HCl = 99:1	maceracija	9 × 1 h	25	n.n.*	9	92
Etil-acetat	maceracija	30 min	25	1:10	1	111
MeOH:H_2O:FA = 50:48,5:1,5	homogenizator	8 min	4	n.n.	1	112
MeOH:H_2O = 70:30	mućkanje	30 min	25	1:10	1	113
EtOH:H_2O = 50:50	miješanje	2 min	25	1:100	5	114
EtOH:H_2O:HCl = 70:29:1	maceracija	2 × 4 h	25	n.n.	2	115
MeOH:FA = 99,9:0,1	mućkanje	48 h	25	1:25	1	110

* - nije navedeno u literaturnom vrelu

2.4.4.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija tehnika je ekstrakcije koja se temelji na razdiobi uz primjenu ultrazvuka visokog intenziteta raspona frekvencija od 20 kHz do 100 kHz. Za pretvorbu električne u energiju zvuka koriste se piezoelektrični sustavi. Zvučni se valovi šire kroz medij (tekućinu) te pri tome uzrokuju cikluse ekspanzije i kompresije. Kada je intenzitet ultrazvuka dovoljno velik, ekspanzijski ciklus dovodi do nastanka kavitacija ili malih mjehurića u tekućini. Kad su nastali, mjehurići apsorbiraju energiju zvučnih valova te se u ciklusu ekspanzije povećavaju, a u ciklus kompresije smanjuju. Tijekom jednog ciklusa ekspanzije i ekspresije, rast mjehurića je veći od njegovog smanjenja što u konačnici uzrokuje njegovo urušavanje tj. imploziju kavitacija uz nastanak udarnih valova. Udarni valovi lokalno uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa). Kada oni udare u površinu čvrstog uzorka dovode do značajnih fizikalno-kemijskih promjena uzorka. Pojava kavitacija ovisi o intenzitetu i frekvenciji ultrazvuka te o viskoznosti, površinskoj napetosti i gustoći tekućine. Visoke temperature tekućine imaju negativan učinak na intenzitet kavitacija. Svaka tekućina pri određenoj temperaturi ima najveću aktivnost kavitacija, a taj je raspon temperatura vrlo uzak.[133,134] Jedna od promjena do koje dolazi uslijed djelovanja udarnih valova razaranje je strukture stanične stijenke biljne stanice čime se uvelike olakšava izlučivanje željenih analita u ekstrakcijsko otapalo. Tijekom procesa ekstrakcije iz suhog uzorka, uzorak je potrebno hidrirati. Primjenom ultrazvuka uvelike se olakšava hidracija pa time i bubrenje, a što za posljedicu ima povećanje pora stanične stijenke i olakšavanje difuzije analita iz unutrašnjosti stanica u okolno ekstrakcijsko otapalo.[135] Kao i u slučaju tehnike SLE, na učinkovitost UAE utječu brojni faktori kao što su omjer faza, veličina čestica uzorka, vrsta ekstrakcijskog otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije. Tehnika UAE može se provesti primjenom ultrazvučnih kupelji ili ultrazvučnih sondi.[134] Bez obzira na svoje prednosti i široku primjenu u ekstrakciji fenola iz različitih biljnih matrica ova se tehnika rijetko primjenjuje u ekstrakciji fenola iz kožica grožđa bilo kao jedina tehnika bilo kao dodatna tehnika koja se primjenjuje zajedno sa tehnikom SLE (Tablica 2.3).

Tablica 2.3. Prikaz uvjeta UAE za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa

Ekstrakcijsko otapalo	Način ekstrakcije	*t*	ϑ / °C	Omjer faza / g mL^{-1}	Lit.
EtOH:H_2O = 50:50	UAE	6 min	10	1:10	116
EtOH:H_2O = 52:48	UAE	24,5 min	45	1:50	117
EtOH:HCl = 99,9:0,1	UAE	3 h	25	1:25	118
MeOH:HCl = 99:1	1) UAE 2) SLE-miješanje	1) 15 min 2) 1 h	25	n.n.*	136
MeOH:FA = 95:3	1) SLE-maceracija 2)UAE	1) 3 dana 2) 5 min	25	n.n.	137
ACE:H_2O:HCl = 80:19,9:0,1	1) UAE 2) SLE-miješanje	1) 15 min 2) 30 min	25	1:20	87

* - nije navedeno u literaturnom vrelu

2.4.3.3. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija temelji se na primjeni mikrovalne energije. Mikrovalovi (MV) dio su spektra elektromagnetskog zračenja (EMZ) s rasponom frekvencija od 0,3 GHz do 300 GHz. U komercijalnim mikrovalnim sustavima najviše se koriste frekvencije mikrovalova 2,45 GHz. Prolaskom mikrovalova kroz medij, dolazi do apsorpcije njihove energije koja se potom prevodi u termičku energiju, a što je temelj tehnike MAE. Tijekom provedbe tehnike MAE dolazi do zagrijavanja tekućine unutar stanica čvrstog uzorka, a koja zatim isprava i uzrokuje povišenje tlaka koje djeluje na staničnu stijenku. Porast tlaka unutar stanica uzrokuje razaranje staničnih stijenki i organela što za posljedicu ima porast poroznosti uzorka, a čime se omogućava bolje prodiranje ekstrakcijskog otapala u matricu i povećanje učinkovitosti ekstrakcije. Na učinkovitost tehnike MAE utječu brojni faktori: snaga zračenja MV, trajanje postupka, sadržaj vlage i veličina čestica uzorka, vrsta otapala, omjer faza, temperatura i tlak ekstrakcije te broj ekstrakcijskih koraka. Od navedenih faktora najznačajniji je vrsta ekstrakcijskog otapala. Prilikom odabira ekstrakcijskog otapala potrebno je podrobno razmotriti tri fizikalna parametra, topljivost analita, dielektričnu konstantu te faktor rasipanja (engl. *Dissipation Factor,* tan δ) koji je mjera učinkovitosti kojom se određeno otapalo zagrijava djelovanjem MV. Otapala s velikom dielektričnom konstantom, voda i druga polarna otapala, mogu apsorbirati više mikrovalne energije od nepolarnih te su stoga bolja otapala za MAE. Karakteristika dobrog otapala za ekstrakciju fenola primjenom MAE, velika je vrijednost dielektrične konstante i faktora rasipanja, a te

uvjete zadovoljavaju metanol i etanol te njihove vodene otopine. Postupak MAE obično se provodi u zatvorenim ekstrakcijskim posudama načinjenim od politetrafluoretilena (PTFE) u uvjetima kontroliranog tlaka i temperature. Postupak ekstrakcije započinje unošenjem uzorka i određenog volumena otapala u ekstrakcijsku posudu koja se potom zatvara. Uzorci se stavljaju na okretnicu u pećnici sustava za ekstrakciju te se primjenjuje MV zračenje određene snage čime započinje tzv. „predekstrakcijski korak" tijekom kojega se zagrijava otapalo na određenu temperaturu. Vrijeme potrebno za postizanje željene temperature ovisi o broju i vrsti uzoraka te može biti do 15 minuta. Nakon što se postigla željena temperatura ekstrakcijske smjese, primjenom MV ona se zagrijava određeni vremenski period, a najčešće od 10 min do 30 min. Taj se korak često naziva i statičkom ekstrakcijom. Po završetku statičke ekstrakcije, uzorci se hlade u pećnici na sobnu temperaturu što može potrajati i do 20 minuta.[138,139] Ova se ekstrakcijska tehnika vrlo rijetko primjenjuje za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa (Tablica 2.4).

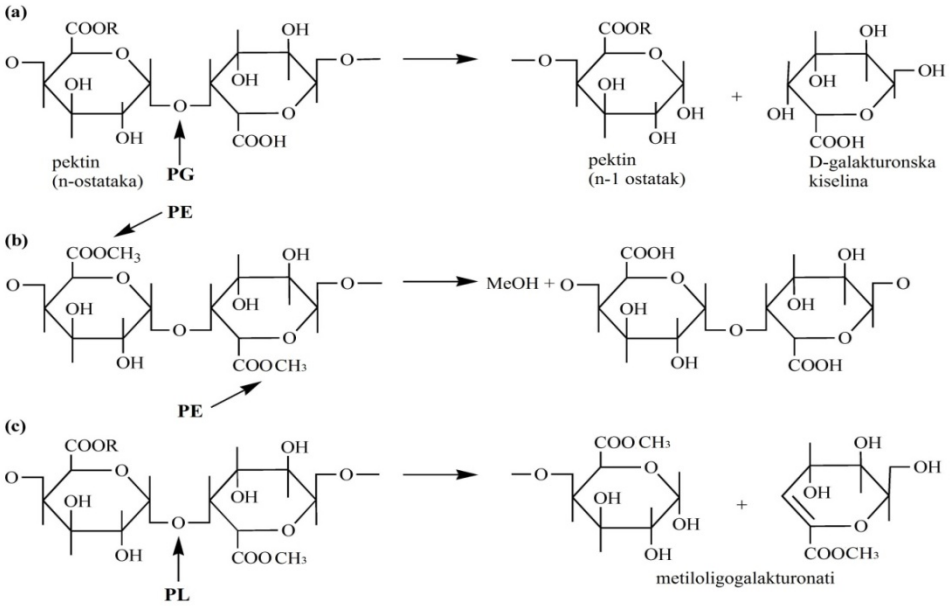
Tablica 2.4. Prikaz uvjeta MAE za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa

Ekstrakcijsko otapalo	***P* / W**	***t* /min**	**ϑ / °C**	**Omjer faza / g mL^{-1}**	**Lit.**
MeOH:H_2O = 40:60	500	5	100	1:12,5	119
EtOH:HCl = 99,9:0,1	1200	6	50	1:17	118

2.4.3.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija

Pri provedbi ekstrakcije u slučaju biljnih matrica, pa tako i kožica bobica grožđa, potrebno je razoriti staničnu stijenku da bi se unutarstanični sadržaj mogao izlučiti u ekstrakcijsko otapalo. Jedan od načina razaranja staničnih stijenki primjena je enzima koji cijepaju njezine sastavnice, a što je osnova ekstrakcijske tehnike koja se naziva enzimima potpomognuta ekstrakcija. Za cijepanje staničnih stijenki primjenjuju se brojni enzimi kao što su celulaze, hemicelulaze, tanaze, pektinaze i drugi. Pektinaze su skupina enzima koji kataliziraju razgradnju pektina putem reakcija depolimerizacije (hidrolaze i liaze) i reakcija deesterifikacije (esteraze). Danas, na tržištu postoje brojni komercijalni enzimski pripravci koji sadrže različite pektinaze, poligalakturonazu (PG), pektinliazu (PL) te pektinmetilesterazu (PE), u različitim udjelima. U navedenim pripravcima osim pektinaza vrlo se često dodaju celulaze i hemicelulaze. Ovi enzimi mogu se izolirati iz različitih

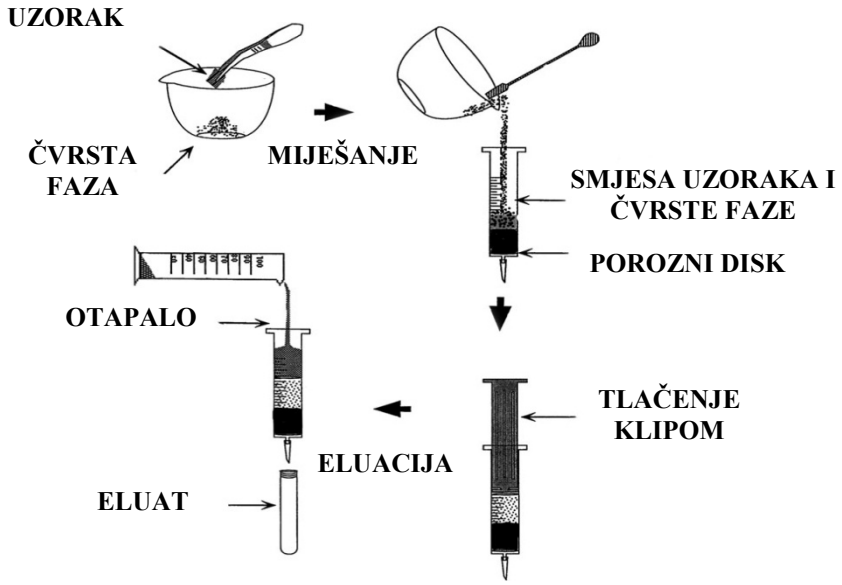
mikroorganizama bakterija, gljivica i kvasca. Gljivice vrste *Aspergillus* najčešći su izvor za dobivanje različitih pektinaza. Enzim PG ubraja se u skupinu glikozil-hidrolaza, a katalizira hidrolizu α-1,4-glikozidnih veza lanca poligalakturonske kiseline do koje može doći na nasumičnim mjestima unutar lanca, ali i na nereducirajućem kraju, a pri čemu se oslobađa D-galakturonska kiselina (Slika 2.19 a). Enzim PE katalizira deesterifikaciju metoksilne skupine pektina uz nastajanje pektinske kiseline i metanola. Ovaj enzim djeluje na metilnu skupinu galakturonske jedinice pektina koja je smještena neposredno do neesterificirane galakturonske jedinice (Slika 2.19 b). Djelovanje ovog enzima može se pospješiti dodatkom kalcijevih iona. Pektinliaze kataliziraju nasumično cijepanje pektina, a posebice onog koji sadrži veliki udio esterificiranih karboksilnih skupina. Ovom reakcijom, koja se ubraja u reakcije *trans*-eliminacije glikozidnih veza, nastaju nezasićeni metil-oligogalakturonati (Slika 2.19 c). Aktivnost ovog enzima može povećati prisutnost kalcijevih iona. Na učinkovitost tehnike EAE utječu brojni faktori kao što su pH-vrijednost medija, vrsta enzima, temperatura, trajanje inkubacije te omjer masa enzima i supstrata.[140,141] Pektinaze su enzimi koji imaju najveću učinkovitost u kiselom mediju u rasponu pH-vrijednosti od 2 do 5. Provedeno je nekoliko istraživanja učinkovitosti ove ekstrakcijske tehnike uz kožicu bobice grožđa kao uzorak. U ovim istraživanjima korišteni su različiti uvjeti pa je inkubacija najčešće provođena pri temperaturama od 40 °C do 50 °C u trajanju od 2 h pa sve do 12 h. Omjer mase enzima i mase supstrata ovisi o uporabljenom pripravku te je u rasponu od 4,5 mg g^{-1} pa do 10 mg g^{-1}.[120-124]



Slika 2.19. Način djelovanja pojedinih pektinaza: a) poligalakturonaze (PG), b) pektin metilesteraze (PE) te c) pektinliaze (PL)

2.4.3.5. Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu

Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu novi je postupak za razaranje i ekstrakciju koji se primjenjuje na čvrstim uzorcima. U ovom postupku koristi se nekoliko tehnika za razaranje uzorka, a pri čemu se dobiva materijal s jedinstvenim kromatografskim karakterom za ekstrakciju spojeva iz određene matrice. Postupak ekstrakcije sastoji se od nekoliko koraka (Slika 2.20). Uzorak i čvrsta faza stavljaju se u stakleni ili ahatni tarionik te se potom miješaju pomoću tučka načinjenog od istog materijala. Nakon što su uzorak i čvrsta faza dobro promiješani i usitnjeni prenose se u kolonicu u koju je prethodno stavljen porozni disk. Nastala jedinstvena faza, lagano se komprimira klipom, te se potom provodi eluacija s odgovarajućim otapalom.[142]



Slika 2.20. Shematski prikaz postupka MSPD

Na učinkovitost postupka MSPD utječu brojni faktori: prosječna veličina čestica čvrste faze, vrsta uporabljene čvrste faze, omjer mase uzorka i mase čvrste faze, vrsta i volumen eluacijskog otapala te kemijski sastav same matrice. Materijali s veličinom čestica raspona od 40 μm do 100 μm najčešće se primjenjuju u postupku MSPD. Uporaba čvrste faze vrlo malih čestica (3 μm do 10 μm) dovodi do produžetka trajanja eluacije jer značajno smanjuje protok eluacijskog otapala. Kao čvrsta faza najčešće se koriste materijali koji sadrže silicijev dioksid kao čvrsti nosač na koji je vezana neka hidrofobna faza kao npr. oktadecil. Ovakva vrsta čvrstih faza još se naziva i sorbens. Kada se uzorak miješa sa sorbensom, on se prvo ponaša kao abraziv, uzrokujući sile smicanja, a što dovodi do usitnjavanja i razaranja strukture uzorka. Vezana faza sorbensa ima i ulogu „vezanog“ otapala koje pomaže u postizanju

potpunog razaranja i raspršivanju uzorka. Uzorak se raspršuje na čitavoj površini vezane faze sorbensa tvoreći jedinstveni miješani karakter faze putem hidrofilnih i hidrofobnih interakcija s različitim sastavnicama uzorka. U postupku MSPD mogu se primijeniti i čvrstine kao što su nederivatizirani silikati (silicijev dioksid, pijesak itd.) te različite druge anorganske čvrstine (Floresil, aluminijev oksid itd.), čiji se mehanizam djelovanja razlikuje od mehanizma djelovanja čvrstih faza s vezanom fazom. Tijekom miješanja, čvrsta faza ima ulogu abraziva koji usitnjava i razara strukturu uzorka. Dodatno razaranje i raspršivanje sastavnica odvija se do stupnja kojim sastavnice međudjeluju s kemijskim skupinama čvrste površine, ali i međusobno. Prilikom provedbe ove ekstrakcijske tehnike dolazi do brojnih međudjelovanja: međudjelovanja sastavnica uzorka odnosno analita sa čvrstom fazom; međudjelovanja uzorka odnosno analita sa vezanom fazom (ako se koristi takva vrsta čvrste faze); međudjelovanja analita sa raspršenim sastavnicama uzorka dok analiti, sastavnice uzorka i čvrsti nosač međudjeluju s eluacijskim otapalom. Sva navedena dinamička međudjelovanja odvijaju se istovremeno.[143] Omjer mase uzorka i mase čvrste faze može biti u rasponu od 1:1 pa do 1:10, a najčešće se koristi omjer od 1:5 (500 mg uzorka i 2 g čvrste faze). Ovaj omjer uvelike ovisi o prirodi samog uzorka i cilju analize, pa ga je potrebno optimirati tijekom razvoja metode.[144] Do danas nije provedeno optimiranje metode MSPD za ekstrakciju fenola iz kožice bobica crnih sorata grožđa.

2.4.3.6. Ostale ekstrakcijske tehnike

Ekstrakcija superkritičnim fluidom temelji se na uporabi superkritičnog fluida kao ekstrakcijskog otapala. Superkritični fluidi imaju jedinstvena svojstva kao što su dobra svojstva otapala (kao tekućine), velika difuzivnost, mala viskoznost te zanemariva površinska napetost (kao plinovi). Navedena svojstva omogućavaju brzi prijenos mase i povećanu sposobnost prodiranja u pore matrice uzorka, a što za posljedicu ima brzu i učinkovitu ekstrakciju. U postupku SFE uzorak se stavlja u posudu ekstraktora te se podvrgava djelovanju superkritičnog fluida pri povišenom tlaku. Kao fluidi mogu se koristiti različiti plinovi amonijak, dušik, metan, ksenon, ugljikov (IV) oksid i drugi. Od navedenih plinova, najviše se primjenjuje CO_2 zbog niske kritične temperature (31,1 °C), niske cijene, kemijske stabilnosti, nezapaljivosti i neotrovnosti. S obzirom da je nepolaran, za ekstrakciju polarnih spojeva potrebno je dodati modifikator, čime se mijenja polarnost ekstrakcijskog otapala uz povišenje kritične temperature. Kao modifikatori za ekstrakciju fenola koriste se etanol, metanol, aceton, acetonitril itd. u rasponu volumnih udjela od 5 % do 50 %.[130] Za ekstrakciju fenola iz kožica grožđa korišten je superkritični CO_2 uz etanol kao modifikator u volumnom udjelu od 20 %. Postupak ekstrakcije proveden je pri 60 °C i tlaku od 250 bara u trajanju od

3 min (statički period) i 15 min (dinamički period) uz protok ekstrakcijskog otapala od 2 mL min^{-1}.[126]

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu, koja se naziva i ubrzana ekstrakcija otapalom, kombinira povišene temperature (100 °C do 200 °C) i visoke tlakove (100 bar do 140 bar) kako bi postigla brzu, učinkovitu i automatiziranu ekstrakciju analita iz čvrste matrice uzorka. Kao ekstrakcijska otapala koriste se uobičajena organska otapala ili njihove vodene otopine. Uzorak (često pomiješan sa sredstvom za sušenje) smješten je u ekstrakcijskoj ćeliji od nehrđajućeg čelika koja se pod tlakom, zagrijava i puni ekstrakcijskim otapalom. Velika učinkovitost ekstrakcije postiže se uporabom organskog otapala u tekućoj fazi na temperaturama iznad temperature vrelišta otapala. Povišena temperatura povećava brzinu difuzije, topljivost analita i time ubrzava ekstrakciju. Visoki tlak može olakšati ekstrakciju spojeva koji se nalaze u porama matrice. Komercijalno dostupni PLE-sustavi lako se mogu automatizirati i paralelno analizirati do 24 uzorka.[130] Za ekstrakciju i pročišćavanje fenola iz kožica grožđa Ju i Howard primijenili su PLE-tehniku. U slučaju ekstrakcije fenola iz kožica grožđa kao sredstvo za sušenje najčešće se koristi morski pijesak. Kao ekstrakcijska otapala mogu se primijeniti metanol, voda ili vodena otopina natrijevog bisulfida masene koncentracije 1,4 g L^{-1}, dok je temperatura ekstrakcije obično 100 °C. Broj provedenih statičkih ekstrakcijskih ciklusa ovisi o uporabljenom otapalu te je on u rasponu od jednog, kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi voda ili vodena otopina natrijevog bisulfida, do tri, kad se kao otapalo primjeni metanol.[86,125]

2.4.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenola

Bez obzira što postoji vrlo veliki broj istraživanja, određivanje sastava i sadržaja različitih fenola i dalje je veliki izazov. Ovisno o cilju istraživanja, za analizu fenola primjenjuju se različite instrumentalne tehnike. Kada je potrebno procijeniti ukupan sadržaj fenola (engl. *Total Phenolic Content*, TPC), antocijanina, flavan-3-ola ili flavonoida koriste se različite spektrofotometrijske metode. Za određivanje točnog sastava i sadržaja fenola u ekstraktima kožica grožđa primjenjuju se različite kromatografske tehnike, a ponajviše tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) dok se za određivanje struktura pojedinih fenola primjenjuju nuklearna magnetska rezonancija (NMR) te spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS).[6]

2.4.4.1. Spektroskopske metode

Spektroskopija UV-VIS

Za određivanje sadržaja fenolnih spojeva u različitim biljnim matricama razvijene su brojne spektrofotometrijske metode koje se temelje na različitim principima, a koriste se za određivanje različitih funkcionalnih skupina prisutnih u molekulama fenola. Najjednostavnija metoda za brzu procjenu TPC u ekstraktima kožica grožđa mjerenje je apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm (uz prethodno razrjeđenje uzorka). Ova se metoda temelji na karakterističnoj apsorpciji benzenskih prstenova fenola pri 280 nm. Prednost ove metode su brzina analize i dobra obnovljivost. Neki spojevi kao što su hidroksicimetne kiseline nemaju apsorpcijske maksimume pri navedenoj valnoj duljini. Ekstrakti kožica grožđa uz fenole mogu sadržavati i druge spojeve koji sadrže benzenski prsten, a što može dovesti do interferencija tijekom analize. Za procjenu ukupnog sadržaja hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijanina mogu se primijeniti metode koja se temelje na određivanju apsorbancija pri valnim duljinama od 320 nm, 360 nm odnosno 520 nm.[90]

Najčešće primjenjivana metoda za procjenu TPC Folin-Ciocalteu-ova (FC) je metoda koja se temelji na redukcijskim svojstvima fenola. Tijekom postupka analize dolazi do redukcije fosfomolibidata u prisutnosti fenola u lužnatim uvjetima u plavo obojeni kompleks koji ima karakteristični apsorpcijski maksimum u području valnih duljina od 725 nm do 765 nm. Ova metoda nije specifična jer reagens FC tvori komplekse i s drugim spojevima kao što su proteini i drugi reducensi (npr. askorbinska kiselina), a koji mogu biti sadržani u ekstraktima kožica bobica grožđa.[6]

Ukupan sadržaj flavonoida može se odrediti metodom koja se temelji na reakcijama kompleksacije flavonoida s aluminijevim ionima pri čemu u prisutnosti natrijevog nitrita i natrijevog hidroksida nastaju kompleksi s apsorpcijskim maksimumom pri λ=510 nm.[145]

Sadržaj ukupnih flavan-3-ola može se odrediti spektrofotometrijskom metodom uz vanilin kao reagens. Reakcija između flavan-3-ola i vanilina odvija se u kiselim uvjetima pri čemu nastaju adukti s apsorpcijskim maksimumom pri λ=500 nm. Druga metoda za određivanje sadržaja flavan-3-ola temelji se na njihovoj reakciji s 4-(dimetilamino)-cinamaldehidom uz nastajanje adukata s apsorpcijskim maksimumom pri valnoj duljini od 640 nm.[6,145]

Postoji nekoliko spektrofotometrijskih metoda za procjenu ukupnog sadržaja antocijanina. Jedna od metoda, temelji se na uporabi različitih pH-vrijednosti pri čemu se koristi svojstvo antocijanina da im se valne duljine apsorpcijskih maksimuma mijenjaju u ovisnosti o pH. Smanjenjem pH-vrijednosti ekstrakta na vrijednosti između 0,5 i 0,8

antocijanini prelaze u crveno obojene flavilijeve oblike. Drugi način za određivanje ukupnog sadržaja antocijanina, primjena je metode izbjeljivanjem natrijevim bisulfidom. Dodatak ovog reagensa u uzorak ekstrakta koji sadrži antocijanine dovodi do nastanka bezbojnog adukta antocijanin-sulfonska kiselina.[6,112,115]

Bliska infracrvena spektroskopija

Bliska infracrvena (engl. *Near Infrared*, NIR) spektroskopija snažna je, brza i nedestruktivna analitička tehnika koja se može koristiti u analizi fenola. Područje NIR elektromagnetskog zračenja nalazi se u području valnih duljina od 750 nm do 2500 nm. U ovom području EMZ mogu se dobiti informacije o relativnim udjelima C–H, N–H i O–H veza u pojedinim molekulama. Kvantitativna primjena spektroskopije NIR temelji se na korelaciji između sastava uzorka i apsorpcije zračenja pri različitim valnim duljinama u području NIR, a koje se određuje refleksijskom ili transmisijskom spektroskopijom. Glavna prednost ove tehnike mogućnost je bilježenja odziva kemijskih veza u određenim sastavnicama u području NIR te mogućnost dobivanja karakterističnog spektra koji se može ponašati kao otisak prsta danog uzorka. Primjena multivarijantnih tehnika kao što je metoda najmanjih kvadrata (engl. *Principle Least Squares*, PLS) ili diskriminantne analize omogućava stvaranje modela za procjenu svojstava određenih analita. Glavni je nedostatak ove tehnike kalibracija i cijena instrumenta.[6]

Tijekom perioda dozrijevanja snimljeni su NIR spektri cijelih kožica i bobica grožđa. Za dobivanje kvantitativnog modela za određivanje masenih udjela flavan-3-ola, flavonola, fenolnih kiselina i antocijanina kao i za TPC korištena je metoda PLS. Dobiveni modeli primjenom tehnike NIRS i kemometrike omogućavaju određivanje TPC kao i sadržaja pojedinih skupina fenola u kožicama bobica grožđa tijekom perioda dozrijevanja.[146]

Nuklearna magnetska rezonancija

Tehnika NMR, danas je nezaobilazan alat u identifikaciji i strukturnoj karakterizaciji fenolnih spojeva iz različitih biljnih matrica pa tako i iz kožica bobica grožđa. S obzirom da je nedestruktivna metoda velike osjetljivosti vrlo se često primjenjuje u analizama u kojima je potrebno sačuvati analit. Dobivanje kristala pojedinih fenola prikladnih za difrakcijsku analizu X-zrakama vrlo je teško, pa se stoga koriste tehnike NMR u čvrstom stanju za određivanje geometrije molekula fenola. Bez obzira što su razvijene brojne dvodimenzionalne tehnike NMR, za određivanje struktura pojedinih fenola u ekstraktima kožica grožđa često se primjenjuju i jednodimenzionalne ^{1}H i ^{13}C NMR tehnike.[147-149]

2.4.4.2. Elektroanalitičke metode

Elektroanalitičke su tehnike skupina analitičkih tehnika koje se temelje na mjerenju otpora, struje i potencijala, a svima je zajedničko da se odvijaju u elektrokemijskom članku koji je sačinjen najčešće od dviju elektroda uronjenih u odgovarajući elektrolit. Ove se tehnike mogu podijeliti na voltametrijske, potenciometrijske, konduktometrijske, kulorimetrijske itd. Za analizu fenola najčešće se primjenjuju različite voltametrijske metode. Zajedničko obilježje svih voltametrijskih tehnika je da uključuju primjenu potencijala na elektrodu te praćenje nastale struje koja teče kroz elektrokemijsku ćeliju, pa se stoga sve voltametrijske tehnike mogu opisati kao funkcije potencijala, struje i vremena. Ove se tehnike smatraju aktivnim jer primijenjeni potencijal uzrokuje oksidaciju ili redukciju elektroaktivnih vrsta na površini elektrode, a što dovodi do promjene u njihovoj koncentraciji. Voltametrijske su tehnike pouzdan alat za brzo i jeftino određivanje fenolnih spojeva u različitim matricama. Razvijene su metode precizne i dovoljno osjetljive da se mogu primijeniti i na uzorke koji sadrže vrlo niske koncentracije analita. U posljednje vrijeme, ove tehnike polako zamjenjuju spektrofotometrijske metode za određivanje TPC. Velika prednost voltametrijskih tehnika krije se u činjenici da nije potrebno posebno obraditi uzorak prije samog mjerenja čime se smanjuje trajanje analize, ali i izbjegavaju pogreške povezane s velikim brojem koraka tijekom priprave uzoraka. Danas se u praksi najčešće primjenjuju tehnike linearne, cikličke te diferencijalne impulsne voltametrije. Kao radne elektrode koriste se staklena ili grafitna elektroda dok se kao referentna elektroda koristi srebrna elektroda.[150]

2.4.4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Za određivanje preciznog sastava i sadržaja fenola u ekstraktima kožica grožđa najčešće se primjenjuje tehnika HPLC.[87,92,109-115,118,136,138,151] Na učinkovitost metode HPLC utječu slijedeći faktori: sastav nepokretne i pokretne faze, uvjeti eluacije te način detekcije analita. Za određivanje pojedinih fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa primjenjuju se sustavi obrnutih faza uz oktadecilsilicijev dioksid (C_{18}) kao najčešće korištenu nepokretnu fazu.[87,92,109-111,113-115,118,119,136,137] Osim ove nepokretne faze mogu se koristiti i monolitne kolone koje su načinjene od poroznog materijala u jednom komadu. Primjena ovakvih kolona omogućava brži protok pokretne faze koji može biti i do 5 mL min^{-1} čime se skraćuje vrijeme analize i uravnoteživanje kromatografskog sustava.[151] Danas na tržištu postoje specijalne kolone s nepokretnom fazom načinjenom od nanočestica sačinjenih od čvrste jezgre silikagela koja je obložena poroznim slojem polimera (engl. *Core Shell)*. Primjenom takvih kolona može se poboljšati selektivnost i razlučivanje uz istovremeno postizanje vrlo niskih granica detekcije i velike ponovljivosti.[88] Za razdvajanje fenola mogu se koristiti i kolone s

mješovitom nepokretnom fazom koja posjeduje ionsko-izmjenjivačka i hidrofobna svojstva. Ovakva nepokretna faza sadrži osnovne pozitivno nabijene skupine koje su ugrađene u hidrofobni lanac, a čijom se uporabom mogu dobro razdvojiti antocijanini.[152]

Gradijentno eluiranje uz uporabu dvaju sustava otapala najčešće je primijenjeni način eluiranja pri analizi fenola. Jedno od otapala je polarno koje se sastoji od vodene otopine octene, fosforne ili mravlje kiseline, dok drugo otapalo čine zakiseljeni metanol ili acetonitril. Protok je pokretne faze u rasponu od 0,2 mL min^{-1} do 2,5 mL min^{-1}, a volumen injektiranog uzorka od 2 μL do 20 μL.[87,92,109-115,118,119,136,137]

Fenolni su spojevi dobri kromofori te ovisno o skupini kojoj pripadaju imaju apsorpcijske maksimume u širokom rasponu valnih duljina od 280 nm do 530 nm (Tablica 2.5) pa se za njihovu detekciju najčešće koristi detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector,* DAD).[87,92,109,110,112-115,118,119,137] Flavan-3-oli, stilbeni te neke hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline su i fluorofori koji posjeduju karakteristične pobudne i emisijske spektre (Tablica 2.5) pa se mogu odrediti primjenom fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FLD) čime se postiže vrlo selektivan način analize. Kao detektor može se koristiti i elektrokemijski detektor (engl. *Electrochemical Detector,* ED) uz radnu elektrodu načinjenu od staklastog ugljika i srebrnu elektrodu kao referentnu elektrodu.[89,136]

Vezani sustav HPLC-MS primjenjuje se za identifikaciju pojedinih sastavnica u ekstraktima kožica bobica grožđa, a pri čemu se koriste blage ionizacijske tehnike kao što su ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization,* ESI) te kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Za detekciju antocijanina primjenjuje se pozitivna ESI, dok se za detekciju ostalih skupina fenola koristi negativan način ionizacije. Svaki pojedinačni fenol ima karakteristične molekulske ione kao i fragmente na temelju kojih je moguće odrediti njegovu strukturu (Tablica 2.5).[82,153-156]

Tablica 2.5. Spektralne karakteristike pojedinih fenola

Spoj	$[M\text{-H}]^-$ (Fragment MS^2 *m/z*)	$[M\text{-H}]^+$ (Fragment MS^2 *m/z*)	DAD λ/nm	FLD λ_{ex} / nm λ_{em}/ nm	λ_{max} / nm
Delfinidin-3-*O*-glukozid		465 (303)	518		277, 342, 525
Cijanidin-3-*O*-glukozid		449 (287)	518		279, 516
Petunidin-3-*O*-glukozid		479 (317)	518		277, 347, 525
Peonidin-3-*O*-glukozid		463 (301)	518		280, 516
Malvidin-3-*O*-glukozid		493 (331)	518		277, 348, 528
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid		625 (301)	518		280, 516
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid		655 (331)	518		275, 524
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid		611 (449)	518		279, 516
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid		627 (303)	518		277, 525
Miricetin-3-O-glukozid	479 (317)		360		261,300(s),349
Rutin	609 (301, 179, 151)		360		256, 264 (s), 300 (s), 353
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	463 (301)		360		256, 300(s), 354
Kvercetin-3-*O*-glukozid	463 (301)		360		256, 265 (s), 295(s), 353
Kemferol- 3-*O*-glukozid	447 (285)		360		265,300(s),346
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	477(315)		360		255, 265(s), 297(s), 354
Kvercetin	301 (151,179)		360	264; 320	254, 369
Kemferol	285 (257, 151, 169)		360	268; 322	265, 364
Miricetin	317 (151, 179)		360	268; 370	266, 304, 375
Procijanidin B1	577 (407, 425, 451,429)		280	225; 320	265
Epigalokatehin	305 (125, 179)		280	225; 320	278
Katehin	289 (245, 205, 179)		280	225; 320	277
Procijanidin B2	577 (407, 425, 451,429)		280	225; 320	265
Epikatehin	289 (245, 205, 179)		280	225; 320	277
Epikatehingalat	441 (289, 169)		280		278
Galna kiselina	169 (125)		280	278; 366	272
Siringinska kiselina	197 (182, 153)		280	225; 365	272
Kaftarinska kiselina	312 (149)		320		298, 328
Kafeinska kiselina	179 (135)		320	262; 426	298, 327
p-Kumarinska	163 (119)		320	260; 422	298, 310
Ferulinska kiselina	193 (134, 149, 179)		320	260; 422	297, 313
trans-Resveratrol	227 (185, 159)		308	225; 392	306 - 316
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	389 (227)		308	225; 392	306 -316

2.5. Primjena multivarijantnih statističkih tehnika u optimiranju ekstrakcije fenola

Optimiranje u analitičkoj kemiji može se definirati kao određivanje uvjeta nekog postupka pri čemu se dobivaju najbolji mogući rezultati (odzivi). Tradicionalno, optimiranje se provodi određivanjem utjecaja jednog po jednog faktora na konačni rezultat (engl. *One-Variable-at-a-Time,* OVAT), a što znači da se vrijednosti pojedinog ispitivanog faktora mijenjaju dok se vrijednosti ostalih faktora održavaju stalnima. Ovakav način optimiranja iziskuje provođenje velikog broja pokusa nN^k gdje je n broj uključenih ponavljanja, N broj razina pojedinog faktora, a k broj faktora. Tako npr. za pokus u kojem se ispituje utjecaj triju faktora na tri razine uz dva ponavljanja potrebno je provesti 54 pokusa. Drugi nedostatak ovakvog načina optimiranja je da on ne uključuje interakcijske učinke ispitanih faktora na rezultat. Ovi problemi tijekom optimiranja postupka ekstrakcije mogu se prevladati primjenom multivarijantnih statističkih tehnika odnosno eksperimentalnog dizajna (engl. *Design of Experiment*, DoE), a pri čemu se najčešće koristi metodologija površina odziva (engl. *Response Surface Methodology,* RSM). Metodologija RSM skup je matematičkih i statističkih tehnika koje se temelje na pristajanju polinomne jednadžbe eksperimentalnim podacima, a koja mora opisati ponašanje skupa podataka pomoću statističkog predviđanja. Postoje brojni dizajni za kvadratne površine odziva kao što su središtem osmišljen dizajn (engl. *Central Composite Design*), potpuni faktorijski dizajn (engl. *Full Factorial Design*), djelomični faktorijski dizajn, zvjezdasti dizajn (engl. *Star Design)*, Doehlertov dizajn, Box-Behnkenov dizajn (BBD) itd. Od navedenih dizajna za optimiranje postupka ekstrakcije najčešće se primjenjuje BBD. Cilj primjene RSM istovremeno je optimiranje razina nekolicine faktora uz postizanje najbolje učinkovitosti sustava uz provođenje malog broja eksperimenata, a pri čemu se uzimaju u obzir i interakcijski učinci pojedinih faktora. Optimiranje putem RSM sastoji se od slijedećih koraka[157]:

1) odabira neovisnih faktora, a koji mogu biti numerički (poprimaju kontinuirane vrijednosti) i/ili kategorički (poprimaju diskretne vrijednosti);

2) odabira eksperimentalnog dizajna i provođenja pokusa u skladu s odabranom eksperimentalnom matricom. Prilikom primjene BBD faktori se podešavaju na tri razine tako da su razmaci između tih razina jednaki, a potrebno je provesti $2k(k-1)+c_p$ pokusa, gdje je k broj faktora, a c_p broj središnjih točaka. Ponavljanja se provode samo za središnje točke, a njihov je broj obično tri, pa je za pokus u kojem se ispituje utjecaj triju faktora na tri razine s tri ponavljanja u središnjoj točki potrebno provesti svega 15 eksperimenata;

3) matematičko-statističke obrade eksperimentalno dobivenih podataka pomoću polinomne funkcije (1) za odziv Y

$$Y = \beta_0 + \Sigma\beta_i x_i + \Sigma\beta_{ij} x_i x_j + \Sigma\beta_{ii} x_i^2 \qquad (i=1, 2\ldots k) \qquad (2.1)$$

β_0, β_i, β_{ii} i β_{ij} su odsječak te koeficijenti za linearne, kvadratne odnosno interakcijske učinke, x_i i x_j su razine faktora;

4) evaluacije prikladnosti dobivenog modela, a pri čemu se uzimaju u obzir p-vrijednost modela koja mora biti manja od 0,05; p-vrijednost nedostatka prikladnosti (engl. *Lack of Fit*) koja mora biti veća od 0,05, koeficijent determinaciji R^2, prilagođeni R^2 i predviđeni R^2 čije vrijednosti moraju biti što bliže 1;

5) dobivanja optimalnih vrijednosti za svaki ispitani faktor. Kada je potrebno istovremeno uzeti u obzir više dobivenih odziva te kada je neophodno naći odgovarajući kompromis između svih odziva primjenjuje se Derringerova funkcija ili funkcija poželjnosti (engl. *Desirability Function*). Kada se dobivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije temelji na dobivanju maksimalnih odziva Y, pojedinačne poželjnosti (d) za maksimalnu vrijednost (T) mogu se opisati jednadžbom (2):

$$d = \begin{cases} 0 \text{ ako je } Y < 1 \\ \left(\frac{Y-L}{T-L}\right)^s \text{ ako je } L \leq Y \leq T \\ 1 \text{ ako je } Y > T \end{cases} \qquad (2.2)$$

gdje je L najmanja prihvatljiva vrijednost odziva, a s njegova srednja vrijednost. Kada su određene pojedinačne funkcije poželjnosti one se kombiniraju primjenom jednadžbe za dobivanje geometrijske srednje vrijednosti (3), a pri čemu se dobiva ukupna poželjnost (D):

$$D = (d_1 d_2 \ldots d_m)^{1/m} \qquad (2.3)$$

6) potvrde modela uz provođenje pokusa s dobivenim optimalnim vrijednostima za svaki pojedini faktor. Usporedbom eksperimentalno dobivenih vrijednosti odziva za dane uvjete s onima predviđenim dizajnom dobiva se uvid u točnost i preciznost dobivenog modela.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije, instrumenti i pribor

Kemikalije

- Kemikalije stupnja čistoće *pro analysis*: borna kiselina, kalcijev klorid heksahidrat, volumetrijska otopina natrijevog hidroksida 1 M, aceton i etanol proizvodi su Kemike, Zagreb, Hrvatska.
- Kemikalije stupnja čistoće *puriss*.: 85%-tna *ortho*-fosforna kiselina i mravlja kiselina nabavljene su od tvrtke Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka.
- Otapala HPLC čistoće: acetonitril i metanol pribavljeni su od tvrtke J. T. Baker, Deventer, Nizozemska.
- Enzimski pripravci: Endozym Rouge i Endozym Contact Pelliculire nabavljeni su od tvrtke AEB Group, Brescia, Italija.
- Enzimski pripravci: Lallzyme EX-V i Lallzyme HC proizvodi su tvrtke Lallemand Inc., Montreal, Kanada.
- Morski pijesak čistoće *pro analysis* nabavljen je od tvrtke Merck, Darmstadt, Njemačka
- SepraPhenyl proizvod je tvrtke Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Amberlite XAD-2, pribavljen je od tvrtke Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD

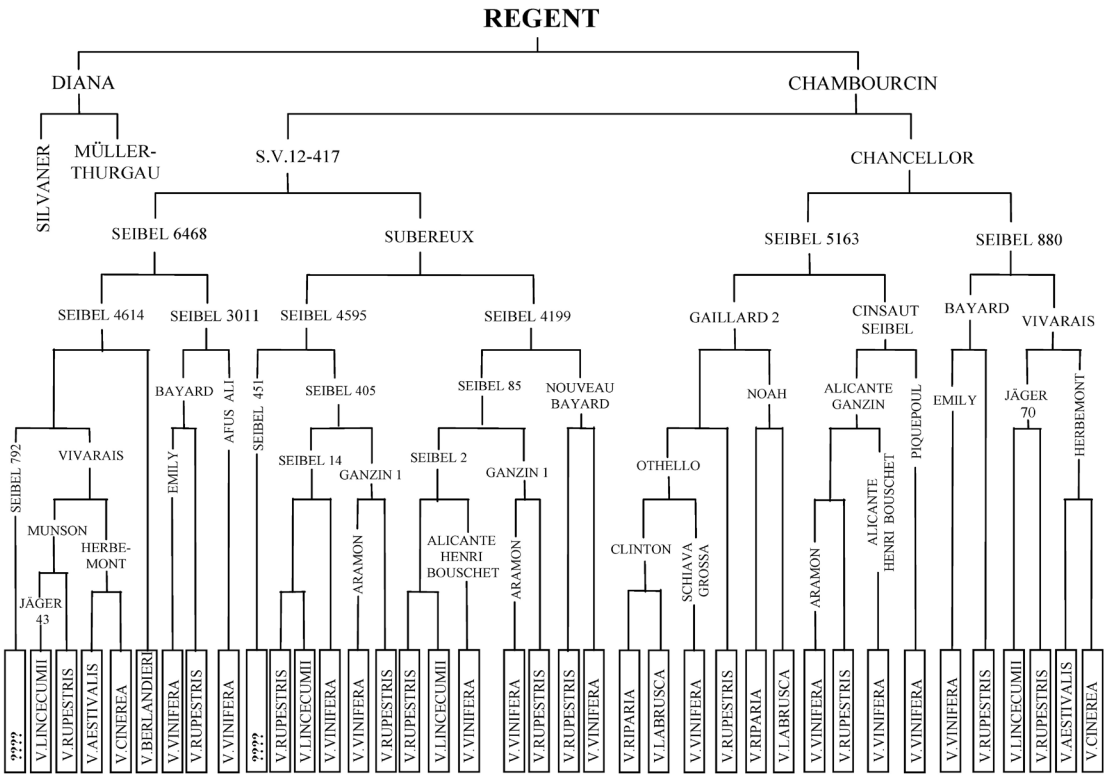
Instrumenti i pribor

- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s automatskim uzorkivačem „Agilent 1100" opremljen grijačem kolone, detektorom s nizom dioda i fluorescencijskim detektorom serije Agilent 1200, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD
- Analitička vaga „Sartorius CP225D", Sartorius, Goettingen, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj „Sonorex RK 100H", Bandelin, Berlin, Njemačka
- Rotacijski uparivač „HEI-VAP Advantage", Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka
- Magnetna miješalica „RCT basic", IKA, Staufen, Njemačka
- Membranski filtri od PTFE veličine pora 0,22 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Vodena kupelj „WBU 45", Memmert, Schwabach, Njemačka
- Sustav za filtriranje pokretne faze, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Membranski filtri, celulozni, za filtriranje pokretne faze, veličine pora 0,45 μm, Advantec, Japan
- pH-metar „Lab 850", Schott Instruments, Mainz, Njemačka

- Centrifuga „Centric 322A“, Tehtnica, Železnik, Slovenija
- Uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju, „MarsX“, CEM, Matthews, NC, SAD
- Aluminijsko postolje za posudice za ekstrakciju, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Vakumska stanica za ekstrakciju na čvrstoj fazi za dvanaest uzoraka, Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Liofilizator, Martin Christ Gefriertrocknungaslangen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka
- Dehidrator za sušenje hrane „FDK24DW“, Gorenje, Gornje Velenje, Slovenija
- Mlinac za kavu „SMK150“, Gornje Velenje, Slovenija
- Mikrovalna pećnica „MO20MW“, Gornje Velenje, Slovenija

3.2. Uzorci grožđa

Sorta 'Regent' međuvrsni je križanac sa složenim pedigreom (Slika 3.1) nastala 1967. g. u Julius Kűhn Institute pod vodstvom profesora Gerhardta Alleweldta. Roditelji ove sorte su 'Diana' i 'Chambourcin'. Nakon provedenih brojnih istraživanja 1994. g. priznata je kao nova sorta te mijenja ime iz sjemenjak Gf. 67-198-3 u 'Regent'. S obzirom da sadrži dio genetskog materijala američkih vrsta loze, posjeduje određenu otpornost prema gljivičnim bolestima kao što su plamenjača, pepelinica i siva plijesan pa je pogodna za ekološki uzgoj. Ova sorta dobro podnosi niske temperature tako da se može uzgajati u Njemačkoj, Švedskoj, Belgiji, Švicarskoj, Velikoj Britaniji, Kanadi te hladnijim predjelima SAD-a.[158] Sukladno „Pravilniku o nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze“ iz 2014. g. 'Regent' postaje preporučena sorta za proizvodnju vina i drugih proizvoda od grožđa za podregije Pleševica, Pokuplje, Zagorje-Međimurje, Moslavina te Prigorje-Bilogora. Grozd je vrlo malen, srednje zbijen i stožastog oblika (Slika 3.2). Ova sorta osim što sadrži vrlo velike masene udjele pojedinih fenolnih spojeva uz antocijanidin-3-*O*-monoglukozide sadrži i antocijanidin-3,5-*O*-diglukozide pa je stoga prikladna i za izučavanje fizikalno-kemijskih razlika između navedenih oblika antocijanina.



Slika 3.1. Shematski prikaz rodoslovlja 'Regenta'

Slika 3.2. Grozd sorte 'Regent'

Uzorci grožđa sorte 'Regent' 2012., 2013. i 2014. g. uzeti su u fazi pune zrelosti iz pokusnog nasada međuvrsnih križanaca na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta u Zagrebu, koje je smješteno na južnim obroncima Medvednice, a ubraja se u Zagrebačko vinogorje, podregiju Prigorje-Bilogora regije Zapadna kontinentalna Hrvatska. Razmak sadnje unutar reda iznosi 0,8 m, a između redova 2,0 m, a što odgovara

sklopu od 6250 trsova po hektaru. Sorta je cijepljena na podlogu SO4 (*V. berlandieri* × *V. riparia*) te je formiran uzgojni oblik jednokraki ili jednostruki Gyot.

U svrhu dobivanja što homogenijeg uzorka bobica grožđa proveden je postupak flotacije. Bobice su škaricama odvojene od grozdova na približno 1 mm od cvjetišta pri čemu su zadržani mali dio peteljčice, jastučić te četkica. Postupak flotacije proveden je uzastopnim uranjanjem bobica u vodene otopine saharoze masenih koncentracija 235 g L^{-1}, 250 g L^{-1}, 265 g L^{-1} te 280 g L^{-1} počevši od otopine najniže masene koncentracije. Navedene masene koncentracije vodenih otopina saharoze odgovaraju gustoćama od 1,088 g mL^{-1}, 1,094 g mL^{-1}, 1,099 g mL^{-1} odnosno 1,104 g mL^{-1}. Uranjanjem bobica grožđa u vodenu otopinu saharoze gustoće 1,088 g mL^{-1} bobice se razdvajaju u skladu sa svojom gustoćom. Bobice iste gustoće kao i otopina otplutaju na površinu otopine, a one veće gustoće potonu na dno (Slika 3.3).

Slika 3.3. Postupak flotacije bobica grožđa

Potonule bobice potom se uranjaju u otopinu veće gustoće (1,094 g mL^{-1}) pri čemu dolazi do ponovnog razdvajanja s obzirom na njihovu gustoću. Postupak je proveden i za preostale dvije otopine saharoze.

Za potrebe provedbe optimiranja postupka sušenja, pohranjivanja, ekstrakcijskih tehnika te određivanja stabilnosti ekstrakata korištena je najzastupljenija frakcija tj. frakcija s rasponom gustoća od 1,094 g mL^{-1} do 1,099 g mL^{-1} što odgovara sadržaju šećera od 80 °Oe. Za potrebe optimiranja postupka sušenja uzeto je 450 g homogenih bobica koje su potom podijeljene u 15 poduzoraka mase 30 g. Ukupna masa od 720 g homogenih bobica razdijeljena je u 24 poduzorka mase 30 g, a korištena je za potrebe optimiranja metode za

odmrzavanje uzoraka bobica grožđa. Za optimiranje pojedinih ekstrakcijskih tehnika te za određivanje stabilnosti ekstrakata uporabljena je masa od 2 kg homogenih bobica grožđa.

3.3. Optimiranje postupka priprave uzoraka

3.3.1. Optimiranje metode za sušenje uzoraka

Kožice bobica svih 15 poduzoraka odvojene su od ostatka bobice te su izvagane u svrhu određivanja mase svježih kožica. Po 3 poduzorka potom su podvrgnuta različitim načinima sušenja (Tablica 3.1), dok je jedna skupina od 3 poduzorka homogenizirana i ekstrahirana u svježem obliku. Nakon provedenog postupka sušenja, kožice bobica grožđa ponovno su izvagane (masa suhih kožica). Kožice su potom usitnjene pri čemu je dobiven prah veličine čestica u rasponu od 125 μm do 250 μm.

Tablica 3.1. Primijenjene tehnike sušenja kožica bobica grožđa

Metoda	ϑ / °C	t	Broj poduzoraka
Liofilizacija	–30	72 h	3
Sušenje na zraku	+25	7 dana	3
Sušenje u dehidratoru	+60	18 h	3

Prinos sušenja (engl. *Drying Yield*, DY) za svaku pojedinu metodu sušenja izračunat je prema jednadžbi 3.1:

$$DY = \frac{m\ (suhih\ kožica)}{m\ (svježih\ kožica)} \times 100 \qquad (3.1.)$$

Ukupna suha tvar (engl. *Total Dry Matter*, TDM) te vlažnost preostala nakon sušenja (engl. *Residual Moisture*, RM) određeni su iz preostala 3 poduzorka, sušenjem svježih kožica u sušioniku pri 135 °C u trajanju od 2 h. Vrijednosti *TDM* i *RM* izračunate su prema jednadžbi 3.2 odnosno 3.3:

$$TDM = \frac{m\ (suhih\ kožica)}{m\ (svježih\ kožica)} \times 100 \qquad (3.2)$$

$$RM = TDM - m\ (\text{suhih kožica}) \qquad (3.3)$$

Za potrebe ekstrakcije svakog poduzorka, uzeto je 500 mg suhog praha kožica, dok je preostali dio pohranjen pri sobnoj temperaturi na mračnom mjestu u bočicama za uzorke

opremljenim s teflonskim čepovima u periodu od 6 mjeseci, nakon čega su uzorci ekstrahirani i analizirani. Pohranjeni ostatak korišten je za određivanje stabilnosti suhih uzoraka dobivenih različitim metodama sušenja.

3.3.2. Optimiranje metode za pohranjivanje uzoraka

Poduzorci (24) pohranjeni su u zamrzivaču na −20 °C u trajanju od šest mjeseci. Korištena su dva načina zamrzavanja uzorka bobica grožđa. Zamrznute su bobice sa jastučićem kao i one bez njega. Za oba načina zamrzavanja provedena su četiri načina odmrzavanja (Tablica 3.2). Nakon provedenog odmrzavanja određenom metodom, kožice su odvojene od ostatka bobice grožđa te su potom sušene na zraku pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana. Suhe kožice su usitnjene i dobiven je prah veličine čestica u rasponu od 125 μm do 250 μm koji je potom ekstrahiran.

Tablica 3.2. Postupci odmrzavanja uzoraka

Način odmrzavanja	Broj poduzoraka	Kratak opis tretmana
Zamrznuto skidanje	3	Skidanje kožice sa zamrznutih bobica bez jastučića
Sobna temperatura	3	Odmrzavanje bobica bez jastučića na zraku pri sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 1,5 h
Mikrovalna	3	Odmrzavanje bobica bez jastučića u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min
Hladnjak	3	Odmrzavanje bobica bez jastučića u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h
Zamrznuto skidanje jastučić	3	Skidanje kožice sa zamrznutih bobica s jastučićem
Sobna temperatura jastučić	3	Odmrzavanje bobica s jastučićem na zraku pri sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 1,5 h
Mikrovalna jastučić	3	Odmrzavanje bobica s jastučićem u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min
Hladnjak jastučić	3	Odmrzavanje bobica s jastučićem u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h

3.3.3. Metoda ekstrakcije

Na uzorak mase 500 mg dodano je 10 mL ekstrakcijskog otapala (EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v*). Ekstrakcijska smjesa ostavljena je na maceraciji 24 sata te je potom centrifugirana pri 3600 okretaja u minuti u trajanju od 15 minuta. Dobiveni supernatant odvojen je od taloga, a na preostali talog ponovno je dodano 10 mL ekstrakcijskog otapala. Dobivena ekstrakcijska

smjesa podvrgnuta je UAE u trajanju od 15 minuta. Smjesa je potom ponovno centrifugirana, a dobiveni je supernatant odvojen i spojen s prvim. Dobiveni ekstrakt uparen je primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C. Ostatak preostao nakon otparavanja etanola kvantitativano je prebačen u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjen do oznake 0,5 %-tnom vodenom otopinom fosforne kiseline. Ekstrakti su filtrirani pomoću membranskih filtara i analizirani primjenom metode HPLC.

3.4. Optimiranje ekstrakcijskih tehnika

Kožice su odvojene od ostatka bobice te su potom sušene na zraku pri sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana. Suhe su kožice potom usitnjene, a za potrebe optimiranja pojedinih ekstrakcijskih tehnika korišten je suhi prah s veličinom čestica u rasponu od 125 μm do 250 μm.

3.4.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće

Svi pokusi su provedeni na magnetskoj miješalici pri 400 okretaja u minuti. Po završetku ekstrakcije smjesa je centrifugirana pri 3600 okretaja u minuti u trajanju od 15 min, a dobivenim supernatantima uklonjeno je organsko otapalo primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C. Ekstrakti su potom kvantitativno prebačeni u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je zatim do oznake dodana 0,5 %-tna vodena otopina fosforne kiseline.

3.4.1.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije

Za potrebe određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v*. Omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala (omjer faza) bio je 1:40 g mL^{-1} odnosno masa uzorka bila je 250 mg uz volumen otapala od 10 mL, a svi su pokusi provedeni pri 30 °C u jednom ekstrakcijskom koraku. Vrijeme trajanja ekstrakcije bilo je 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h, 20 h te 24 h.

3.4.1.2. Određivanje broja ekstrakcijskih koraka

Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v*, uz omjer faza od 1:40 g mL^{-1}, pri temperaturi od 30 °C i ukupnom trajanju od 2 h, dok se broj ekstrakcijskih koraka mijenjao te je bio jedan, dva odnosno tri. Uvjeti ekstrakcije prikazani su u tablici 3.3. Po završetku ekstrakcije supernatanti su spojeni.

Tablica 3.3. Uvjeti ekstrakcije

Broj ekstrakcijskih koraka	Volumen otapala dodan po koraku / mL	Trajanje ekstrakcije po koraku / min
1	10	120
2	1. korak 5 2. korak 5	1. korak 60 2. korak 60
3	1. korak 4 2. korak 3 3. korak 3	1. korak 40 2. korak 40 3. korak 40

3.4.1.3. Određivanje omjera faza

Sve su ekstrakcije provedene u jednom ekstrakcijskom koraku uz smjesu EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v* kao ekstrakcijsko otapalo pri temperaturi od 30 °C u trajanju od 2 h, dok su se omjeri faza mijenjali (Tablica 3.4).

Tablica 3.4. Korišteni omjeri faza, volumeni ekstrakcijskog otapala i mase uzorka

Omjer faza / g mL^{-1}	***V*** **(Ekstrakcijsko otapalo) / mL**	***m*** **(Uzorak) / mg**
1:40	10	250
1:60	10	165
1:80	10	125

3.4.1.4. Optimiranje postupka ekstrakcije čvrsto-tekuće primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna

Za potrebe optimiranja metode SLE korišteni su slijedeći uvjeti ekstrakcije koji su u svim provedenim pokusima bili stalni: masa uzorka od 125 mg, volumen ekstrakcijskog otapala od 10 mL te jedan ekstrakcijski korak. Osim vode i određenog organskog otapala u danim volumnim udjelima, ekstrakcijska su otapala sadržavala i 1 % mravlje kiseline. Primjenom BBD ispitan je učinak triju numeričkih faktora (udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu, temperatura ekstrakcije te vrijeme ekstrakcije) te jednog kategoričkog faktora (vrsta organskog otapala) na maseni udio antocijanina, flavonola te flavan-3-ola. Navedena četiri neovisna faktora ispitana su na tri razine (Tablica 3.5), a pri čemu je provedeno 45 pokusa sa različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 3.6).

Tablica 3.5. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode SLE

Faktori	Razine faktora		
Kodirane razine	–1	0	1
A: Udio organskog otapala (%)	20	50	80
*B:*Temperatura ekstrakcije (°C)	30	45	60
C: Vrijeme ekstrakcije (h)	1	2	3
D: Vrsta organskog otapala	ACN	EtOH	ACE

Tablica 3.6. Uvjeti za provedbu SLE pokusa primjenom BBD

Broj	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Vrsta organskog otapala
1	50	60	1	EtOH
2	80	60	2	ACE
3	50	60	1	ACN
4	80	45	3	EtOH
5	50	30	1	EtOH
6	50	30	1	ACN
7	80	30	2	ACE
8	20	30	2	ACN
9	80	45	1	ACE
10	80	45	3	ACN
11	50	30	3	ACE
12	50	45	2	EtOH
13	50	45	2	EtOH
14	20	45	1	ACE
15	80	30	2	ACN
16	50	60	3	ACN
17	80	60	2	EtOH
18	50	60	3	ACE
19	50	45	2	ACN
20	80	45	1	ACN
21	50	30	3	ACN
22	50	45	2	ACN
23	20	60	2	ACE
24	20	60	2	ACN
25	50	30	1	ACE
26	20	45	3	ACE
27	50	30	3	EtOH
28	80	45	3	ACE
29	80	60	2	ACN
30	20	45	3	EtOH
31	80	45	1	EtOH

Tablica 3.6. Uvjeti za provedbu SLE pokusa primjenom BBD [Nastavak]

Broj	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Vrsta organskog otapala
32	50	45	2	EtOH
33	50	45	2	ACE
34	50	45	2	ACN
35	50	60	1	ACE
36	20	30	2	ACE
37	20	45	1	ACN
38	20	60	2	EtOH
39	20	45	3	ACN
40	20	30	2	EtOH
41	50	45	2	ACE
42	50	45	2	ACE
43	80	30	2	EtOH
44	20	45	1	EtOH
45	50	60	3	EtOH

3.4.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Svi su pokusi provedeni u ultrazvučnoj kupelji volumena 2 L (unutarnjih dimenzija 24 cm × 14 cm × 10 cm) uz stalnu ultrazvučnu snagu i frekvenciju od 320 W odnosno 35 kHz. Po završetku ekstrakcije smjesa je centrifugirana pri 3600 okretaja u minuti u trajanju od 15 min, a dobivenim supernatantima uklonjeno je organsko otapalo primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C. Ekstrakti su potom kvantitativno prebačeni u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je zatim do oznake dodana 0,5 %-tna vodena otopina fosforne kiseline.

3.4.2.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije

Za potrebe određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije, kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v*. Omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala (omjer faza) bio je 1:40 g mL^{-1} odnosno masa je uzorka bila 250 mg uz volumen otapala od 10 mL, a svi pokusi provedeni su pri 50 °C u jednom ekstrakcijskom koraku. Vrijeme trajanja ekstrakcije bilo je 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min te 90 min.

3.4.2.2. Određivanje broja ekstrakcijskih koraka

Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v*, uz omjer faza od 1:40 g mL^{-1}, pri temperaturi od 50 °C i ukupnom trajanju od 15 min, dok se broj ekstrakcijskih koraka mijenjao te je bio jedan, dva odnosno tri. Uvjeti ekstrakcije prikazani su

u tablici 3.7. Po završetku ekstrakcije supernatanti dobiveni primjenom dva odnosno tri koraka su spojeni.

Tablica 3.7. Uvjeti ekstrakcije

Broj ekstrakcijskih koraka	Volumen otapala dodan po koraku / mL	Trajanje ekstrakcije po koraku / min
1	10	15
2	1. korak 5 2. korak 5	1. korak 7,5 2. korak 7,5
3	1. korak 4 2. korak 3 3. korak 3	1. korak 5 2. korak 5 3. korak 5

3.4.2.3. Određivanje omjera faza

Sve su ekstrakcije provedene u jednom koraku uz smjesu EtOH:H_2O:FA=70:29:1, *v:v:v* kao ekstrakcijsko otapalo pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 15 min, dok su se omjeri faza mijenjali (Tablica 3.8).

Tablica 3.8. Korišteni omjeri faza, volumeni ekstrakcijskog otapala i mase uzorka

Omjer faza / g mL^{-1}	***V*** **(Ekstrakcijsko otapalo) / mL**	***m*** **(Uzorak) / mg**
1:40	10	250
1:60	10	165
1:80	10	125

3.4.2.4. Optimiranje postupka ultrazvukom potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna

Za potrebe optimiranja metode UAE korišteni su uvjeti ekstrakcije koji su u svim provedenim pokusima bili stalni: masa uzorka od 125 mg, volumen ekstrakcijskog otapala od 10 mL te jedan ekstrakcijski korak. Osim vode i određenog organskog otapala u danim udjelima, ekstrakcijska otapala sadržavala su i 1 % mravlje kiseline. Primjenom BBD ispitan je učinak triju numeričkih faktora (udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu, temperatura ekstrakcije te vrijeme ekstrakcije) te jednog kategoričkog faktora (vrsta organskog otapala) na maseni udio antocijanina, flavonola te flavan-3-ola. Navedena četiri neovisna faktora ispitana su na

tri razine (Tablica 3.9), a pri čemu je provedeno 45 pokusa sa različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 3.10).

Tablica 3.9. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode UAE

Faktori	Razine faktora		
Kodirane razine	–1	0	1
A: Udio organskog otapala (%)	20	50	80
*B:*Temperatura ekstrakcije (°C)	50	60	70
C: Vrijeme ekstrakcije (min)	5	10	15
D: Vrsta organskog otapala	ACN	EtOH	ACE

Tablica 3.10. Uvjeti za provedbu UAE pokusa primjenom BBD

Broj	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Vrsta organskog otapala
1	50	70	15	EtOH
2	20	60	15	ACE
3	80	70	10	ACN
4	50	60	10	EtOH
5	20	60	15	EtOH
6	50	70	15	ACE
7	80	60	15	EtOH
8	50	60	10	ACN
9	80	60	5	ACN
10	20	70	10	EtOH
11	80	60	5	EtOH
12	80	70	10	ACE
13	50	50	5	EtOH
14	20	60	5	ACN
15	20	50	10	EtOH
16	50	60	10	ACE
17	50	50	15	ACE
18	50	60	10	EtOH
19	20	60	15	ACN
20	50	50	5	ACN
21	20	70	10	ACE
22	50	60	10	ACN
23	20	50	10	ACN
24	50	50	5	ACE
25	50	70	5	ACN
26	80	60	15	ACE
27	50	70	15	ACN
28	50	60	10	EtOH
29	80	60	5	ACE

Tablica 3.10. Uvjeti za provedbu UAE pokusa primjenom BBD [Nastavak]

Broj	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Vrsta organskog otapala
30	50	60	10	ACE
31	20	60	5	ACE
32	50	60	10	ACN
33	80	60	15	ACN
34	50	50	15	EtOH
35	80	50	10	EtOH
36	50	60	10	ACE
37	20	50	10	ACE
38	80	50	10	ACN
39	80	50	10	ACE
40	50	70	5	ACE
41	80	70	10	EtOH
42	20	70	10	ACN
43	50	70	5	EtOH
44	20	60	5	EtOH
45	50	50	15	ACN

3.4.3. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija

Svi pokusi provedeni su u mikrovalnoj pećnici uz snagu mikrovalova od 600 W. Po završetku ekstrakcije smjesa je centrifugirana pri 3600 okretaja u minuti u trajanju od 15 min, a dobivenim supernatantima primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C otpareno je organsko otapalo. Ekstrakti su potom kvantitativno prebačeni u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je potom do oznake dodana 0,5 %-tna vodena otopina fosforne kiseline.

3.4.3.1. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije

Za potrebe određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa ACN:H_2O:FA=20:79:1, *v:v:v*. Omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala (omjer faza) bio je 1:80 g mL^{-1} odnosno masa je uzorka bila 125 mg uz volumen otapala od 10 mL, a svi pokusi provedeni su pri 50 °C u jednom ekstrakcijskom koraku. Vrijeme trajanja ekstrakcije bilo je 5 min, 10 min, 30 min, 45 min te 60 min.

3.4.3.2. Određivanje omjera faza

Sve su ekstrakcije provedene u jednom ekstrakcijskom koraku uz smjesu ACN:H_2O:FA=20:79:1, *v:v:v* kao ekstrakcijsko otapalo pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 15 min, dok su se omjeri faza mijenjali (Tablica 3.11).

Tablica 3.11. Korišteni omjeri faza, volumeni ekstrakcijskog otapala i mase uzorka

Omjer faza / g mL^{-1}	*V* (Ekstrakcijsko otapalo) / mL	*m* (Uzorak) / mg
1:40	10	250
1:60	10	165
1:80	10	125

3.4.3.3. Optimiranje postupka mikrovalovima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna

Za potrebe optimiranja metode MAE korišteni su slijedeći uvjeti ekstrakcije koji su u svim provedenim pokusima bili stalni: masa uzorka od 125 mg, volumen ekstrakcijskog otapala od 10 mL te jedan ekstrakcijski korak. Osim vode i određenog organskog otapala u danim udjelima, ekstrakcijska otapala sadržavala su i 1 % mravlje kiseline. Primjenom BBD ispitan je učinak triju numeričkih faktora (udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu, temperatura ekstrakcije te vrijeme ekstrakcije) te jednog kategoričkog faktora (vrsta organskog otapala) na maseni udio antocijanina, flavonola te flavan-3-ola. Navedena tri neovisna numerička faktora ispitana su na tri razine, dok je kategorički faktor ispitan na dvije razine (Tablica 3.12), a pri čemu je provedeno 30 pokusa sa različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 3.13).

Tablica 3.12. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode MAE

Faktori	Razine faktora		
Kodirane razine	–1	0	1
A: Udio organskog otapala (%)	20	50	80
*B:*Temperatura ekstrakcije (°C)	40	50	60
C: Vrijeme ekstrakcije (min)	5	10	15
D: Vrsta organskog otapala	ACN		EtOH

Tablica 3.13. Uvjeti za provedbu MAE pokusa primjenom BBD

Broj	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Vrsta organskog otapala
1	50	40	5	ACN
2	20	50	5	ACN
3	80	50	15	ACN
4	20	60	10	ACN
5	20	40	10	ACN
6	20	40	10	EtOH
7	80	50	15	EtOH
8	80	50	5	ACN
9	80	50	5	EtOH
10	50	40	15	ACN
11	50	40	15	EtOH
12	50	50	10	EtOH
13	20	50	15	EtOH
14	20	50	5	EtOH
15	50	60	15	EtOH
16	50	50	10	ACN
17	50	60	5	EtOH
18	80	40	10	EtOH
19	50	60	15	ACN
20	80	60	10	ACN
21	20	50	15	ACN
22	50	50	10	EtOH
23	80	60	10	EtOH
24	50	60	5	ACN
25	20	60	10	EtOH
26	50	50	10	ACN
27	50	40	5	EtOH
28	50	50	10	EtOH
29	80	40	10	ACN
30	50	50	10	ACN

3.4.4. Enzimima potpomognuta ekstrakcija

U svim provedenim pokusima masa praha kožica grožđa bila je 125 mg dok je volumen ekstrakcijskog otapala bio 10 mL. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je otopina određene pH-vrijednosti u koju je dodan određeni maseni udio jednog od enzimskih pripravaka. Ekstrakcije su provedene na magnetskoj miješalici pri 400 okretaja u minuti. Po završetku ekstrakcije enzimi su deaktivirani uranjanjem bočice s ekstraktom u vodenu kupelj pri temperaturi od 90 °C u trajanju od 1 min. Nakon deaktivacije ekstrakti su ohlađeni u ledenoj

kupelji te centrifugirani pri 3600 okretaja u minuti. Supernatant kvantitativno je prebačen u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je potom do oznake dodana 0,5 %-tna vodena otopina fosforne kiseline.

3.4.4.1. Priprava otopina univerzalnog pufera

Za potrebe optimiranja metode EAE korišteni su univerzalni puferi pH-vrijednosti 2,0; 3,5 te 5,0 priređeni miješanjem 1 L otopine borne, fosforne i octene kiseline množinskih koncentracija 0,04 mol L^{-1} te otopine natrijevog hidroksida množinske koncentracije 0,2 mol L^{-1} volumena 51 mL, 210 mL odnosno 350 mL. U pojedinim puferskim otopinama pH-vrijednost određena je pomoću pH-metra. Za potrebe provedbe pokusa u kojima je bila nužna prisutnost kalcijevih iona množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1} u 1 L pufera određene pH-vrijednosti dodano je 3,29 g kalcijevog klorida heksahidrata.

3.4.4.2. Priprava otopina enzimskih pripravaka

U istraživanju korištena su četiri enzimska pripravka Lallzyme EV-X, Lallzyme HC, Endozym Rouge te Endozym Contact Pelliculaire koji sadrže različite enzime s različitim aktivnostima (Tablica 3.14), a koji su izolirani iz vrste *Aspergillus niger*. Radne otopine enzimskih pripravaka priređivane su svaki dan otapanjem 50 mg pojedinog enzimskog pripravka u 100 mL otopina pufera određene pH-vrijednosti koje su sadržavale 0,015 mol L^{-1} kalcijevih iona. Maseni udjeli enzimskih pripravaka izraženi su kao mg pripravka po g uzorka.

Tablica 3.14. Karakteristike uporabljenih enzimskih pripravaka: poligalakturonaza (PG), pektin metilesteraza (PE) te pektinliaza (PL)

Naziv enzimskog pripravka	**Glavna enzimska aktivnost**			
	PG / U g^{-1}	**PL / U g^{-1}**	**PE / U g^{-1}**	**Celulaza i hemicelulaza**
Lallzyme EV-X	4000	120	1000	+++
Lallzyme HC	3500	100	800	---
Endozym Rouge	3200	7100	700	+++
Endozym Contact Pelliculaire	600	300	250	+++

3.4.4.3. Određivanje utjecaja kalcijevih iona

U pokusima su korištene otopine pufera pH-vrijednosti 3,5 sa i bez dodatka kalcijevih iona množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1}, uz temperaturu i vrijeme inkubacije od 40 °C odnosno 2 h i maseni udio pripravka Lallzyme EX-V od 15 mg g^{-1}.

3.4.4.4. Određivanje raspona trajanja ekstrakcije

U ovom nizu pokusa korišten je pripravak Lallzyme EX-V masenog udjela 15 mg g^{-1} priređen u otopini pufera pH-vrijednosti 3,5 koja je sadržavala kalcijeve ione. Temperatura inkubacije bila je 40 °C, a njezino trajanje 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 7 h, 17 h, 20 h te 24 h.

3.4.4.5. Određivanje raspona masenih udjela enzimskog pripravka

Pri provođenju ovog niza pokusa temperatura i vrijeme inkubacije bili su 40 °C odnosno 2 h. Radna otopina enzimskog pripravka Lallzyme EX-V priređivala se otapanjem 50 mg pojedinog pripravka u 100 mL otopine pufera pH-vrijednosti 3,5 koja je sadržavala 0,015 mol L^{-1} kalcijevih iona. Maseni udjeli pripravka od 0 mg g^{-1}, 5 mg g^{-1}, 10 mg g^{-1}, 15 mg g^{-1}, 20 mg g^{-1}, 30 mg g^{-1}, 40 mg g^{-1} te 45 mg g^{-1} dobiveni su tako da su u posudicu s uzorkom pipetirani određeni volumeni radne otopine enzimskog pripravka i pufera pH-vrijednosti 3,5 koja je sadržavala kalcijeve ione (Tablica 3.15).

Tablica 3.15. Priprava otopina enzimskog pripravka Lallzyme EX-V različitih masenih udjela

***w* (Lallzyme EX-V) / mg g^{-1}**	***V* (Radne otopine) / mL**	***V* (Pufera) / mL**
0	0,00	10,00
5	1,25	8,75
10	2,50	7,50
15	3,75	6,25
20	5,00	5,00
30	7,50	2,50
40	8,75	1,25
45	10,00	0,00

3.4.4.6. Optimiranje postupka enzimima potpomognute ekstrakcije primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna

Za potrebe optimiranja metode EAE korišteni su slijedeći uvjeti ekstrakcije koji su u svim provedenim pokusima bili stalni: masa uzorka od 125 mg, volumen ekstrakcijskog otapala od 10 mL te jedan ekstrakcijski korak. Primjenom BBD ispitan je učinak četiriju numeričkih faktora (maseni udio enzima, pH, temperatura te vrijeme inkubacije) za svaki pojedini enzimski pripravak, Lallzyme EV-X, Lallzyme HC, Endozym Rouge te Endozym Contact Pelliculaire, na maseni udio antocijanina, flavonola te flavan-3-ola. Navedena četiri numerička neovisna faktora ispitana su na tri razine (Tablica 3.16), a pri čemu je ukupno

provedeno 108 pokusa tj. 27 pokusa za svaki enzimski pripravak sa različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 3.17).

Tablica 3.16. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode EAE

Faktori	Razine faktora		
Kodirane razine	–1	0	1
A: Maseni udio enzima (mg g^{-1})	10	15	20
B: pH	2,0	3,5	5,0
C: Temperatura (°C)	30	40	50
D: Vrijeme (h)	1	2	3

Tablica 3.17. Uvjeti za provedbu EAE pokusa primjenom BBD

Broj	*w* (Enzima) / mg g^{-1}	pH	ϑ / °C	*t* / h
1	15	3,5	40	2
2	20	3,5	40	3
3	15	2,0	40	1
4	20	3,5	30	2
5	10	2,0	40	2
6	10	5,0	40	2
7	15	5,0	30	2
8	10	3,5	40	3
9	10	3,5	50	2
10	10	3,5	40	1
11	15	5,0	40	1
12	10	3,5	30	2
13	15	3,5	30	3
14	15	3,5	50	3
15	15	5,0	50	2
16	20	3,5	50	2
17	15	2,0	30	2
18	15	5,0	40	3
19	15	3,5	40	2
20	15	2,0	40	3
21	20	3,5	40	1
22	15	3,5	50	1
23	20	2,0	40	2
24	15	2,0	50	2
25	15	3,5	30	1
26	15	3,5	40	2
27	20	5,0	40	2

3.4.5. Raspršenje matrice uzorka kroz čvrstu fazu

Kao čvrste faze korišteni su morski pijesak, Amberlite XAD-2 te SepraPhenyl materijali s različitim svojstvima (Tablica 3.18).

Tablica 3.18. Svojstva korištenih čvrstih faza

Čvrsta faza	Sastav	Veličina čestica / μm	Veličina pora / Å
Morski pijesak	Silicijev dioksid	100 do 315	-
Amberlite XAD-2	Stiren-divinilbenzen	250 do 841	90
SepraPhenyl	Fenilsilicijev dioksid	50	65

U svim provedenim pokusima masa uzorka praha kožica bobica grožđa bila je 125 mg, a koja je u ahatnom tarioniku pomiješana s određenom masom određene čvrste faze. Nakon provedene homogenizacije, smjesa je kvantitativno prenesena u kolonicu na čije je dno prethodno stavljen polietilenski porozni disk. Po završetku punjenja kolonice, isti porozni disk stavljen je i na vrh te je potom lagano tlačen plastičnim klipom štrcaljke. Tako pripravljene kolonice stavljene su na vakumsku stanicu za ekstrakciju na čvrstoj fazi te je protok eluacijskog otapala podešen na 1 mL min^{-1}. Bez obzira na ukupan volumen eluacijskog otapala, eluacija je prvo provedena s 2 mL otapala te je sustav ostavljen 5 min u svrhu natapanja sloja. Nakon toga, eluacija je provedena s preostalim volumenom otapala. Nakon provedenog postupka MSPD ekstrakti su upareni primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C, a ostatak preostao nakon otparavanja organskog otapala prenesen je u tikvicu od 10 mL i nadopunjen do oznake s 0,5 %-tnom fosfornom kiselinom.

Za potrebe optimiranja metode MSPD eluacijska otapala osim vode i određenog organskog otapala u danim udjelima, sadržavala su i 1 % mravlje kiseline. Primjenom BBD ispitan je učinak triju numeričkih faktora (udio organske faze u eluacijskom otapalu, volumen eluacijskog otapala te omjer mase čvrste faze i mase uzorka) te jednog kategoričkog faktora (vrsta organskog otapala) za sve tri korištene čvrste faze na maseni udio antocijanina, flavonola te flavan-3-ola. Navedena tri neovisna numerička faktora ispitana su na tri razine, dok je kategorički faktor ispitan na dvije razine (Tablica 3.19), a pri čemu je ukupno provedeno 90 pokusa tj. 30 pokusa za svaku pojedinu čvrstu fazu sa različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 3.20).

Tablica 3.19. Korišteni neovisni faktori i njihove razine u BBD za optimiranje metode MSPD

Faktori	Razine faktora		
Kodirane razine	–1	0	1
A: Udio organskog otapala (%)	20	50	80
*B:*Volumen eluacijskog otapala (mL)	4	7	10
C: Omjer masa sorbensa i uzorka	3	4	5
D: Vrsta organskog otapala	ACN		EtOH

Tablica 3.20. Uvjeti za provedbu MSPD pokusa primjenom BBD

Broj	φ (Organska faza) / %	V / mL	Omjer masa sorbensa i uzorka	Vrsta organskog otapala
1	50	4	3	EtOH
2	50	4	3	ACN
3	80	7	5	ACN
4	80	10	4	ACN
5	80	10	4	EtOH
6	80	7	3	ACN
7	20	7	5	ACN
8	50	7	4	EtOH
9	50	7	4	ACN
10	80	4	4	EtOH
11	80	7	3	EtOH
12	20	10	4	ACN
13	20	7	3	ACN
14	50	10	5	EtOH
15	20	4	4	EtOH
16	50	7	4	EtOH
17	50	7	4	ACN
18	20	7	5	EtOH
19	50	4	5	ACN
20	80	7	5	EtOH
21	50	7	4	ACN
22	50	10	5	ACN
23	20	4	4	ACN
24	20	7	3	EtOH
25	80	4	4	ACN
26	50	4	5	EtOH
27	50	7	4	EtOH
28	50	10	3	ACN
29	20	10	4	EtOH
30	50	10	3	EtOH

3.4.6. Usporedba različitih optimiranih metoda ekstrakcije

Prilikom provedbe usporedbe optimiranih metoda ekstrakcije korišteni su optimalni uvjeti ekstrakcije dobiveni primjenom BBD za pojedinu metodu (Tablice 3.21 do 3.23). U svim pokusima masa uzorka bila je 125 mg te je korišten jedan ekstrakcijski korak. Ekstrakcijska otapala primijenjena u metodama SLE, UAE, MAE te MSPD osim vode i određenog organskog otapala u danim udjelima, sadržavala su i 1 % mravlje kiseline, dok je u slučaju metode EAE pufer sadržavao kalcijeve ione množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1}, a njihov je volumen bio 10 mL. Po završetku ekstrakcije, ekstrakcijska je smjesa centrifugirana, a supernatanti u slučaju metoda SLE, UAE i EAE kvantitativno su preneseni u odmjerne tikvice od 10 mL koje su do oznake nadopunjene 0,5 %-tnom otopinom fosforne kiseline. Ekstrakti dobiveni primjenom metoda MAE i MSPD upareni su primjenom rotacijskog uparivača pri 35 °C, a ostatci preostali nakon uklanjanja organskih otapala kvantitativno prebačeni u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopunjeni do oznake s 0,5 %-tnom otopinom fosforne kiseline.

Tablica 3.21. Optimalni uvjeti ekstrakcije za metodu MSPD

Organska faza	φ (Organska faza) / %	Omjer masa čvrste faze i uzorka	Čvrsta faza
ACN	50	3:1	Fenilsilicijev dioksid
EtOH	60	5:1	Morski pijesak

Tablica 3.22. Optimalni uvjeti ekstrakcije za metode SLE, UAE i MAE

Metoda	Organska faza	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / min
SLE	ACN	20	50	60
	EtOH	20	55	60
UAE	ACN	25	50	15
	EtOH	20	70	15
MAE	EtOH	60	40	5

Tablica 3.23. Optimalni uvjeti ekstrakcije za metodu EAE za enzimski pripravak Lallzyme EV-X

w (Enzima) / mg g^{-1}	pH	ϑ / °C	t / h
10,00	2,0	45	3

3.5. Određivanje termičke stabilnosti ekstrakata

3.5.1. Postupak ekstrakcije

Masa od 12,50 g praha kožica grožđa ekstrahirana je s 1 L ekstrakcijskog otapala koje je sadržavalo smjesu EtOH:H_2O:AcH=20:79:1, *v:v:v*. Ekstrakcijska je smjesa stavljena na magnetsku miješalicu (400 okretaja u minuti) te je ostavljena 1 h pri temperaturi od 50 °C. Nakon završene ekstrakcije, smjesa je centrifugirana na 3600 okretaja u minuti, a dobiveni supernatant kvantitativno je prebačen u odmjernu tikvicu od 1 L koja je potom nadopunjena do oznake 0,5 %-tnom vodenom otopinom fosforne kiseline.

3.5.2. Određivanje termičke stabilnosti u vodenoj kupelji

U bočice za uzorke dodano je 5 mL ekstrakta. Bočice su uronjene u vodenu kupelj temperature 40 °C, 60 °C i 80 °C i ostavljene na inkubaciju u trajanju od 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h i 4 h. Po završetku inkubacije ekstrakti su ohlađeni u ledenoj kupelji i analizirani primjenom metode HPLC.

3.5.3. Određivanje stabilnosti ekstrakata uz primjenu termosoniciranja

Alikovoti ekstrakta od 5 mL stavljeni su u bočice za uzorke te su podvrgnuti zagrijavanju u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturama od 50 °C, 60 °C i 70 °C u trajanju od 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min te 90 min. Nakon provedenog termosoniciranja, ekstrakti su ohlađeni u ledenoj kupelji i analizirani metodom HPLC.

3.6. Tekućinsko kromatografska analiza fenolnih spojeva u ekstraktima kožica bobica grožđa

Razdvajanje, identifikacija i kvantitativna analiza fenola u ekstraktima kožica grožđa provedena je primjenom metode HPLC uz detektore DAD i FLD i slijedeće radne uvjete:

- pokretna faza A: fosforna kiselina:voda=0,5:99,5, *v:v*
- pokretna faza B: fosforna kiselina:voda:ACN=0,5:49,5:50,0, *v:v:v*
- protok pokretne faze: 0,9 mL min^{-1}
- temperatura kolone: 50 °C
- gradijentno je eluiranje provedeno prema programu navedenom u tablici 3.23
- volumen injektiranog uzorka: 20 µL

- ❖ detekcija pojedinih skupina spojeva provedena je pri valnim duljinama navedenim u tablici 3.24
- ❖ kolona Luna Phenyl-Hexyl
  - nepokretna faza: fenilne skupine vezane preko heksilnih lanaca na silikagel
  - duljina kolone: 250 mm
  - promjer kolone: 4,6 mm
  - veličina čestica: 5 μm

Tablica 3.23. Uvjeti gradijentnog eluiranja za razdvajanje fenolnih spojeva u ekstraktima kožica grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

***t* / min**	**Pokretna faza A** ***φ* / %**	**Pokretna faza B** ***φ* / %**
0	100	0
2	100	0
7	80	20
35	60	40
40	60	40
45	20	80
50	0	100
52	0	100
60	100	0
64	100	0

Tablica 3.24. Valne duljine i vremena zadržavanja pojedinih analiziranih fenola

Broj	t_R / min	Spoj	λ / nm
1	8,200	Galna kiselina	280
2	11,770	Prokatehinska kiselina	280
3	12,100	Galokatehin	225/320
4	12,300	Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	518
5	13,300	Procijanidin B1	225/320
6	13,400	Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	518
7	13,800	Delfinidin-3-*O*-glukozid	518
7	14,100	Kaftarinska kiselina	320
9	14,700	Epigalokatehin	225/320
10	15,300	Katehin	225/320
11	15,900	Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	518
12	16,400	Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	518
13	16,900	Cijanidin-3-*O*-glukozid	518
14	17,200	Kafeinska kiselina	320
15	18,100	Kutarinska kiselina	320
16	18,400	Procijanidin B2	225/320
17	19,600	Epikatehin	225/320
18	19,900	Peonidin-3-*O*-glukozid	518
19	20,500	Kumarinska kiselina	320
20	21,100	Malvidin-3-*O*-glukozid	518
21	23,900	Miricetin-3-*O*-glukozid	360
22	25,400	Fertarinska kiselina	320
23	28,100	Rutin	360
24	28,400	*trans*-Resveratrol-3-*O*-glukozid	308
25	29,300	Kvercetin-3-*O*-glukuronid	360
26	29,900	Kvercetin-3-*O*-glukozid	360
27	34,700	Kemferol-3-*O*-glukuronid	360
28	36,400	Sinapinska kiselina	320
29	37,400	Izoramnetin-3-*O*-glukozid	360

Identifikacija kromatografskih krivulja temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja sastavnica iz uzorka s vremenima zadržavanja kao i usporedbom s UV spektrima standarada, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda. Rezultati su izraženi u mg kg^{-1} suhe mase kožica grožđa. Maseni udio određene skupine flavonoida, koji su korišteni kao odzivi (*Y*, ovisne varijable) izraženi su kao zbroj masenih udjela pojedinačnih spojeva te skupine određenih opisanom metodom.

3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati utjecaja različitih načina sušenja; različitih načina odmrzavanja kao i rezultati utjecaja termičke obrade sa i bez primjene ultrazvuka na sastav i masene udjele fenolnih spojeva u ekstraktima kožica grožđa određeni su primjenom analize varijance (ANOVA) i *„post-hoc*“ Tukey-evog testa na razini pouzdanosti od 95 % (p<0,05). Za potrebe statističke obrade podataka korišten je računalni program Origin Pro8 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD).

Tijekom optimiranja ekstrakcijskih metoda SLE, UAE, MAE, EAE i MSPD kao odzivi (*Y*, ovisne varijable) korišteni su maseni udjeli: delfinidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3,5-*O*-diglukozida, peonidin-3,5-*O*-diglukozida, malvidin-3,5-*O*-diglukozida, delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida te malvidin-3-*O*-glukozida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio antocijanina); miricetin-3-*O*-glukozida, rutina, kvercetin-3-*O*-glukunorida, kvercetin-3-*O*-glukozida te kemferol-3-*O*-glukunorida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavonola) te galokatehina, epigalokatehina, katehina, epikatehina, procijanidina B1 i B2 izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavan-3-ola). Rezultati BBD-eksperimenata analizirani su nelinearnom višestrukom regresijom s povratnom eliminacijom da bi pristajali jednadžbi 2.1. Pri optimiranju ekstrakcije korištena je metodologija koja uzima u obzir više kriterija (Derringerova funkcija). Analiza rezultata dobivenih eksperimentalnim dizajnom te izračun predviđenih vrijednosti provedeni su primjenom specijaliziranog računalnog programa DesignExpert (Trial Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Koeficijenti su tumačeni pomoću *F*-testa. Da bi se odredili optimalni uvjeti za dobivanje maksimalnog masenog udjela flavonoida u kožici grožđa korištene su analiza varijance (ANOVA), regresijska analiza kao i izrada grafičkog prikaza površina odziva.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimiranje postupka priprave uzoraka

4.1.1. Postupak optimiranja sušenja uzoraka

4.1.1.1.Utjecaj metode sušenja na prinos sušenja i zaostalu vlagu

Dobra metoda sušenja uzoraka kožica grožđa mora zadovoljiti nekoliko važnih kriterija kao što su zadržavanje što većeg sadržaja fenola, jednostavnost i isplativost uporabe te mali utrošak energije. Suha tvar kožica grožđa izračunata je pomoću jednadžbe 3.2 te ona iznosi 22,80 g suhog uzorka na 100 g svježeg uzorka. Važan faktor koji utječe na učinkovitost metode prinos je sušenje, a koji je izračunat primjenom jednadžbe 3.1. Manja vrijednost ovog faktora ukazuje na veću učinkovitost primijenjene metode sušenja. Najmanja vrijednost prinosa sušenja određena je u liofiliziranim uzorcima, dok je najveća određena kod uzoraka sušenih pri sobnoj temperaturi (Tablica 4.1). Ovakav rezultat ukazuje da je liofilizacija najučinkovitija metoda sušenja uzoraka kožica bobica grožđa.

Tablica 4.1. Ovisnost prinosa sušenja i preostale vlage o primijenjenoj metodi sušenja

Način sušenja	Prinos sušenja (g suhog uzorka po 100 g svježeg uzorka)	Preostala vlaga (%)
Liofilizacija	28,14[a]	5,34
Sušenje na zraku	29,06[b]	6,26
Sušenje u dehidratoru	28,90[b]	6,10

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Na prinos sušenja značajno utječu temperatura sušenja te relativna vlažnost zraka. Razlike u dobivenim prinosima sušenja za primijenjene različite metode mogu se objasniti navedenim faktorima. Tijekom postupka liofilizacije sušenje se odvija u vakuumu pri niskim temperaturama uz izrazito nisku relativnu vlažnost, dok je prilikom sušenja pri sobnoj temperaturi uzorak bio izložen relativno visokoj vlažnosti zraka (većoj od 50 %). Prema jednadžbi 3.3 izračunat je udio preostale vlage u uzorku, a koji je mjera učinkovitosti metode sušenja. Kao i u slučaju prinosa sušenja, manja vrijednost ovog faktora ukazuje na veću učinkovitost metode. Dobivene su vrijednosti u rasponu od 5,34 % do 6,26 % te su u skladu s vrijednostima dobivenim u ranijim istraživanjima.[101,106] Tseng i sur.[106] dobili su najniže vrijednosti za liofilizirane uzorke kožica sorte 'Pinot crni' (5,60 %), nešto više za uzorke sušene u pećnici pri 40 °C (5,92 %), a najviše za uzorke sušene na zraku (6,95 %).

4.1.1.2. Utjecaj metode sušenja na masene udjele fenolnih spojeva

U tablici 4.2. prikazani su maseni udjeli pojedinih polifenolnih spojeva u ekstraktima kožica dobiveni primjenom različitih načina sušenja uzoraka, a koji jasno ukazuju da primijenjena metoda sušenja značajno utječe na maseni udio pojedinih polifenola. Najveći sadržaj antocijanina zadržan je u uzorcima sušenim primjenom liofilizacije. Najmanji maseni udjeli ove skupine spojeva dobiveni su u uzorcima sušenim u dehidratoru. Poznato je da su antocijanini izrazito termički nestabilni. Prilikom njihovog zagrijavanja pri temperaturama višim od 50 °C dolazi do njihove razgradnje.[159] Usporedbom masenih udjela pojedinih monoglukozida u odnosu na odgovarajuće diglukozide, u ovom je istraživanju pokazano da su diglukozidi termički značajno stabilniji u odnosu na odgovarajuće monoglukozide, što je u skladu i s brojnim drugim istraživanjima.[160,161] Na primjeru malvidin-3-*O*-glukozida, sušenjem u dehidratoru u odnosu na liofilizaciju, ustanovljeno je smanjenje sadržaja za 40 %, dok je gubitak malvidin-3,5-*O*-diglukozida iznosio svega 15 %. Više vrijednosti masenih udjela antocijanina dobivenih u ekstraktima kožica sušenih na zraku ili liofilizacijom u odnosu na ekstrakte svježih kožica, mogu biti posljedica promjena u strukturi staničnih stijenki i membrana do kojih dolazi tijekom sušenja. Prilikom liofilizacije nastaju kristalići leda u biljnom tkivu koji mogu uzrokovati probijanje staničnih struktura i staničnih stijenki čime se značajno olakšava otpuštanje spojeva iz unutrašnjosti stanice u ekstrakcijsko otapalo.[107] Općenito, tijekom sušenja dolazi do gubitka selektivne propusnosti i denaturacije membrana te do povećanja poroznosti biljnog tkiva čime se također uvelike olakšava ekstrakcija spojeva sadržanih u unutrašnjosti stanica.[102,162]

Tablica 4.2. Utjecaj načina sušenja uzoraka na masene udjele pojedinih flavonoida

Spoj	w / mg kg^{-1} suhih kožica			
	Svježi	**Liofilizacija**	**Sušenje na zraku**	**Sušenje u dehidratoru**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	1440,15^{b}±29,20	1537,79^{a}±27,23	1560,97^{a}±36,39	1516,59^{a,b}±79,75
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	1061,13^{a}±10,52	1032,65^{b}±6,97	1026,35^{b,c}±3,47	1015,54^{c}±8,77
Delfinidin-3-*O*-glukozid	9751,65^{b}±121,40	10976,59^{a}±50,87	10981,34^{a}±51,59	7082,74c±162,78
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1284,36^{b}±6,25	1337,09^{a}±36,91	1283,19^{c}±14,92	953,56^{c}±36,18
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10039,09^{c}±15,27	11799,73^{a}±60,12	11295,17^{b}±24,48	10024,87^{c}±22,23
Cijanidin-3-*O*-glukozid	2198,79^{b}±16,19	2376,41^{a}±21,07	2356,17^{a}±12,08	1332,65^{a}±51,36
Peonidin-3-*O*-glukozid	548,62^{b}±0,57	601,73^{a}±9,08	590,76^{a}±5,27	287,11^{c}±7,62
Malvidin-3-*O*-glukozid	7053,46^{b}±36,44	7783,57^{a}±173,24	7749,41^{a}±126,26	4652,20^{c}±3,22
Ukupni antocijanini	**33377,20^{c}±139,18**	**37445,60^{a}±210,72**	**36843,30^{b}±113,53**	**26865,30^{d}±242,62**
Miricetin-3-*O*-glukozid	667,22^{b}±30,07	625,60^{c}±8,46	624,16^{c}±2,52	741,55^{a}±10,58
Rutin	150,34^{a}±2,52	145,14^{a}±2,01	143,33^{a}±6,26	175,08^{a}±35,14
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	118,68^{a}±1,08	80,97^{d}±0,64	87,51^{c}±0,96	114,43^{b}±0,88
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1353,12^{a}±38,35	1225,31^{b}±25,68	1218,99^{b}±9,45	1340,80^{a}±18,03
Kemferol- 3-*O*-glukuronid	44,63^{b}±3,37	35,12^{c}±2,42	31,59^{c}±0,85	54,80^{a}±1,13
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	70,43^{d}±2,52	102,13^{c}±4,11	109,88^{b}±1,21	156,38^{a}±3,95
Ukupni flavonoli	**2404,43^{b}±59,11**	**2214,27^{c}±36,34**	**2215,46^{c}±11,95**	**2583,04^{a}±57,32**
Galokatehin	55,85^{c}±4,11	70,38^{a,b}±0,12	66,30^{a,b}±3,69	70,94^{a}±1,66
Procijanidin B1	70,61^{b}±1,22	83,72^{a}±1,75	57,82^{c}±2,97	18,73^{d}±1,18
Epigalokatehin	34,03^{a}±3,17	36,51^{a}±1,96	37,38^{a}±1,50	35,90^{a}±0,14
Katehin	52,50^{a}±2,24	51,98^{a}±1,38	38,43^{c}±1,69	38,65^{c}±1,80
Procijanidin B2	11,58^{b}±20,06	54,45^{a}±3,20	30,57^{a,b}±2,96	31,30^{a,b}±1,84
Epikatehin	35,83^{a}±1,77	32,05^{a}±2,42	21,58^{b}±2,61	19,84^{b}±1,08
Ukupni flavan-3-oli	**269,92^{b}±25,22**	**329,09^{a}±7,70**	**252,07^{b}±9,19**	**215,37^{c}±3,30**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Flavonoli su druga najzastupljenija skupina fenola sadržana u kožicama grožđa. Određeni su maseni udjeli pojedinačnih flavonol-3-*O*-glikozida u uzorcima kožica grožđa podvrgnutih različitim načinima sušenja (Tablica 4.2). Najbolji način sušenja uzoraka kožice grožđa s obzirom na masene udjele većine pojedinačnih flavonola sušenje je u dehidratoru, dok su oni u liofiliziranim uzorcima i uzorcima sušenim na zraku nešto manji. Pretpostavlja se da takav rezultat može biti posljedica relativno kratkog perioda sušenja pri višoj temperaturi (60 °C), čime je značajno umanjena mogućnost oksidacije, a time i razgradnje flavonola. Grožđe sadrži enzime koji se ubrajaju u veliku skupinu β-glikozidaza. Ti enzimi mogu biti sadržani kao dio genoma samog grožđa ili mogu potjecati od divljih kvasaca prisutnih na bobicama grožđa, a oni cijepaju β-glikozidne veze pa tako mogu cijepati i šećerne jedinice vezane na aglikone flavonola. Do denaturacije i potpune inaktivacije većine enzima dolazi pri temperaturama višim od 50 °C.[163,164] Promatrajući masene udjele pojedinačnih i ukupnih flavonola nakon sušenja na zraku i liofilizacije, nije ustanovljena statistički značajna razlika između ta dva načina sušenja. Od pojedinačnih spojeva, primijenjeni način sušenja jedino nema statistički značajnog učinka na rutin.

Maseni udjeli svih pojedinačnih flavan-3-ola najveći su u liofiliziranim uzorcima kožica grožđa, dok su najmanji u uzorcima sušenim u pećnici (Tablica 4.2). Posebno niske vrijednosti dobivene su za procijanidin B1 koji je vrlo nestabilan spoj. Kad se usporede svježi uzorci i oni sušeni na zraku nije opažena statistički značajna razlika u ukupnom masenom udjelu flavan-3-ola. Maseni udio katehina u uzorcima kožica sušenim na zraku manji je za približno 26 % u usporedbi s njegovim masenim udjelom u svježim odnosno liofiliziranim uzorcima. Takvo se opažanje može pripisati djelovanju enzima polifenoloksidaze. Navedeni enzim ima sposobnost oksidacije mono- i difenola, pa time i katehina.[165-167]

U tablici 4.3 prikazani su maseni udjeli pojedinačnih hidroksicimetnih kiselina nakon podvrgavanja uzoraka kožice grožđa različitim metodama sušenja. Istraživanje je pokazalo da je najbolji način sušenja uzoraka kožice grožđa sušenje u dehidratoru, a slijedi ga liofilizacija, dok najmanje masene udjele imaju uzorci sušeni na zraku. Enzim PPO prirodno je sadržan u kožici grožđa. Navedeni enzim uzrokuje enzimsku oksidaciju brojnih fenolnih spojeva, a smatra se da najveći afinitet ima prema hidroksicimetnim kiselinama. Kao i u slučaju većine drugih enzima, njegova optimalna aktivnost je pri temperaturama do 40 °C, dok pri višim temperatura dolazi do njegove denaturacije i potpune inaktivacije. Stoga, dobiveni se rezultati mogu objasniti djelovanjem navedenog enzima. Naime, sušenje u dehidratoru provodi se pri temperaturi od 60 °C u trajanju 18 sati, što dovodi do denaturacije, a time i do ireverzibilne

deaktivacije navedenog enzima. U slučaju sušenja na zraku pri sobnoj temperaturi u periodu od sedam dana, navedeni enzim ima optimalne uvjete za djelovanje pa su stoga i dobiveni najmanji maseni udjeli ovih kiselina u ekstraktima kožica grožđa sušenim na zraku. Prilikom postupka liofilizacije primjenom niskih temperatura dolazi do privremene deaktivacije navedenog enzima. Kasnijim povišenjem temperature tijekom ovog postupka dolazi do njegove ponovne aktivacije te je on u mogućnosti oksidirati ispitivane spojeve.[167,168]

Tablica 4.3. Utjecaj metode sušenja uzoraka na masene udjele pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena

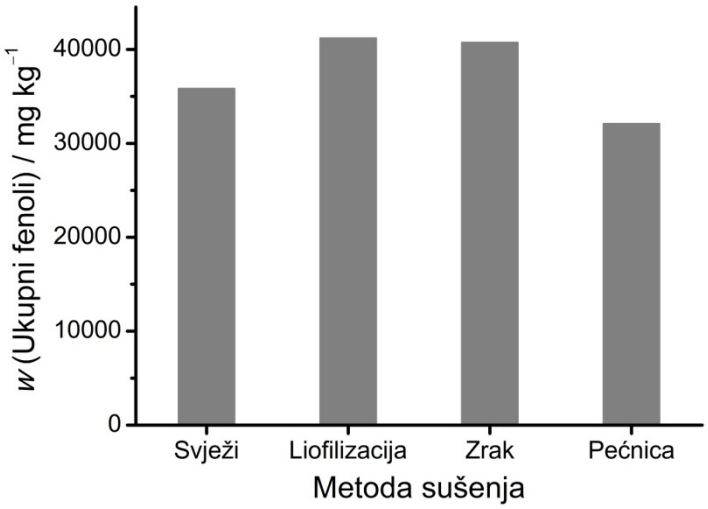
Spoj	w / mg kg^{-1} suhih kožica			
	Svježi	Liofilizacija	Sušenje na zraku	Sušenje u dehidratoru
Kaftarinska kiselina	255,61^{d}±8,13	417,35^{b}±1,58	389,90^{c}±2,31	595,22^{a}±5,25
Kafeinska kiselina	54,46^{a}±2,90	42,55^{c}±2,24	43,64^{c}±1,24	48,28^{b}±1,52
p-Kutarinska kiselina	204,85^{d}±4,08	382,32^{b}±3,02	375,48^{c}±2,02	591,89^{a}±0,63
p-Kumarinska kiselina	23,92^{a}±3,23	24,89^{a}±2,49	23,49^{a}±1,97	17,70^{b}±0,89
Ferulinska kiselina	31,58^{b,c}±1,53	38,38^{a}±2,79	34,03^{b}±1,59	29,09^{c}±2,38
Sinapinska kiselina	24,65^{a}±1,61	20,00^{b}±1,80	17,27^{c}±0,85	21,14^{b}±1,05
Ukupne hidroksicimetne kiseline	**595,07^{d}±13,90**	**925,48^{b}±3,71**	**883,81^{c}±1,61**	**1303,31^{a}±6,28**
Galna kiselina	0	11,91^{b}±2,40	12,92^{b}±3,05	58,06^{a}±0,88
Prokatehinska kiselina	40,81^{c}±0,70	78,50^{b}±1,55	25,96^{c}±2,36	851,57^{a}±16,93
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	**40,81^{c}±0,70**	**90,42^{b}±3,13**	**38,88^{c}**±3,98	**909,63^{a}±17,72**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	168,92^{c}±2,77	219,91^{b}±7,74	221,64^{a,b}±5,92	231,52^{a}±4,47
Ukupni fenoli	**35856^{c}±8,13**	**41224^{a}±1,58**	**40755^{b}±2,31**	**32107^{d}±5,25**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Najveći maseni udio galne i prokatehinske kiseline određen je u uzorcima sušenim u dehidratoru, ali te vrijednosti je potrebno razmotriti s velikim oprezom. Izrazito visoke vrijednosti masenog udjela prokatehinske kiseline mogu biti posljedica termičke razgradnje cijanidin-3-*O*-glukozida. Neka su istraživanja pokazala da je jedan od razgradnih produkata cijanidin-3-*O*-glukozida prokatehinska kiselina.[169,170] Uzimajući u obzir gore navedeno objašnjenje, najbolji način sušenja kožica grožđa uz maksimalno zadržavanje hidroksibenzojevih kiselina je liofilizacija.

Od stilbena, kožice grožđa sadrže *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozid. Sušenjem na zraku i u dehidratoru zadržava se najveća količina ovog spoja. Nešto manji maseni udio opažen je u liofiliziranim uzorcima.

Maseni udio ukupnih fenola dobiven je zbrajanjem masenih udjela svih pojedinačnih spojeva. Uzimajući u obzir sve analizirane spojeve i zanemarujući učinak metode sušenja na pojedinačne spojeve, najbolja metoda sušenja je liofilizacija (Slika 4.1). Razlike u masenim udjelima liofiliziranih i uzoraka sušenih na zraku nisu velike (manje od 2 %), stoga takav način sušenja može biti dobra zamjena za skupi postupak liofiliziranja.



Slika 4.1. Utjecaj metode sušenja uzoraka na maseni udio ukupnih fenola

4.1.1.3. Stabilnost suhih kožica

Nakon što su uzorci osušeni i usitnjeni, pohranjeni su u smeđe staklene posudice za uzorke opremljene teflonskim čepovima te su ostavljeni na mračnom mjestu pri temperaturi od 25 °C u periodu od 6 mjeseci. U tablicama 4.4 i 4.5 prikazani su maseni udjeli pojedinačnih fenolnih

spojeva određeni nakon 6 mjeseci stajanja. Postotak preostao nakon stajanja određen je dijeljenjem masenog udjela dobivenog nakon 6 mjeseci pohrane s onim određenim neposredno nakon sušenja. Pohranjivanje značajno utječe na sadržaj pojedinih fenola u kožicama sušenim na različite načine. Od ispitanih metoda sušenja, u uzorcima sušenim u dehidratoru opažena je najmanja promjena u masenim udjelima analiziranih spojeva. U navedenim uzorcima maseni udio pojedinih antocijanina ostao je gotovo ne promijenjen. Najveće smanjenje masenog udjela opaženo je kod peonidin-3-*O*-glukozida i ono je bilo manje od 3 %. Maseni udio ukupnih flavonola, hidroksibenzojeveih i hidroksicimetnih kiselina, flavan-3-ola te stilbena u kožicama sušenim u dehidratoru ostao je gotovo nepromijenjen. Najveće smanjenje masenog udjela pojedinačnih fenola opaženo je u uzorcima sušenim na zraku, i to u slučaju antocijanina. Kada se usporedi smanjenje masenog udjela odgovarajućeg diglukozida s odgovarajućim monoglukozidom ono je u prvom slučaju značajno manje što potvrđuje da su diglukozidi stabilniji od monoglukozida. Tijekom sušenja na zraku nije došlo do denaturacije enzima PPO te je on u mogućnosti nastaviti oksidaciju odgovarajućih fenola. Poznato je da navedeni enzim izravno ne djeluje na glikozilirane oblike fenola, ali on može posredno oksidirati antocijanine preko vezanih reakcija oksidacije, a koje su posebno izražene u slučaju monoglukozida jer ne postoje steričke smetnje u vidu vezane glukoze na položaju *O*-5 što je slučaj kod diglukoziliranih oblika.[171,172] Isto tako enzim *β*-glikozidaza može dovesti do cijepanja glikozidne veze i nastanka antocijanidina koji su značajno nestabilniji u odnosu na antocijanine. Od analiziranih antocijanina, u uzorcima sušenim na zraku najnestabilniji je peonidin-3-*O*-glukozid. Preostali maseni udio ovog antocijanina iznosi 44,85 %. Od analiziranih spojeva najveću stabilnost u uzorcima sušenim na zraku imaju flavonoli. Opaženo značajno smanjenje masenog udjela hidroksicimetnih kiselina može se pripisati djelovanju enzima PPO. Ovisno o sorti iz koje je izoliran, navedeni enzim ima najveću aktivnost pri temperaturama od približno 15 °C, ali on zadržava veliki dio svoje aktivnosti i pri temperaturi od 25 °C. Značajno povećanje masenog udjela prokatehinske kiseline može se pripisati razgradnji cijanidin-3-*O*-glukozida. Smanjenje masenog udjela *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida može biti posljedica djelovanja enzima *β*-glikozidaze, a u prilog tomu ide opaženo povećanje sadržaja *trans*-resveratrola.

Tablica 4.4. Maseni udjeli flavonoida u kožicama grožđa sušenim različitim načinima nakon šest mjeseci pohrane

Spoj	Sušenje u dehidratoru		Sušenje na zraku		Liofilizacija	
	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	1475,04±36,36	97,26	1036,81±53,83	66,42	1390,93±29,91	90,45
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	1003,56±6,23	98,82	760,84±9,38	74,13	920,19±18,10	89,11
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7008,37±104,22	98,95	7070,93±225,49	64,39	9240,09±76,03	84,18
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	942,59±20,40	98,85	660,76±32,63	51,49	1232,03±36,80	92,14
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10000,81±73,75	99,76	7748,00±382,14	68,60	10240,53±118,09	86,79
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1309,99±67,56	98,30	1399,55±28,83	59,40	1892,00±7,37	80,30
Peonidin-3-*O*-glukozid	278,64±1,18	97,05	251,50±17,93	44,85	483,71±24,19	80,39
Malvidin-3-*O*-glukozid	4641,97±58,93	99,78	3985,71±40,15	51,43	6272,43±308,95	80,59
Ukupni antocijanini	**26660,97±142,02**	**99,24**	**22914,10±369,52**	**62,24**	**31671,81±468,37**	**92,84**
Miricetin-3-*O*-glukozid	736,38±18,87	99,30	623,89±19,22	99,96	619,42±8,94	99,01
Rutin	174,73±1,92	99,80	129,89±2,94	90,62	144,37±3,80	99,47
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	113,87±2,52	99,51	86,65±2,95	99,02	80,50±1,87	99,41
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1331,81±7,85	99,33	1165,91±25,90	95,65	1160,47±9,98	94,71
Kemferol- 3-*O*-glukuronid	54,37±0,62	99,22	31,15±3,57	98,62	29,31±1,15	83,45
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	156,14±3,76	99,85	104,57±3,34	95,17	93,39±3,08	91,45
Ukupni flavonoli	**2571,31±14,05**	**99,55**	**2142,06±36,52**	**96,69**	**2133,46±5,55**	**96,35**
Galokatehin	70,46±1,46	99,32	59,34±2,38	89,51	69,92±3,15	99,35
Procijanidin B1	18,16±2,29	96,94	45,75±2,45	79,13	57,25±3,34	68,38
Epigalokatehin	35,37±2,42	98,52	35,02±3,86	93,70	36,12±1,56	98,92
Katehin	38,48±1,81	99,57	23,81±2,21	61,96	41,25±2,32	79,99
Procijanidin B2	29,72±1,17	94,94	27,06±2,44	88,52	28,21±1,33	51,81
Epikatehin	17,95±1,10	90,44	9,36±1,48	43,36	25,18±3,94	78,57
Ukupni flavan-3-oli	**215,14±9,09**	**99,89**	**200,35±12,18**	**79,48**	**257,94**±11,49	**78,46**

Liofilizirani uzorci kožica grožđa umjereno su stabilnost. Maseni udio antocijanina preostao nakon 6 mjeseci pohrane bio je u rasponu od 92,84 % do 86,90 %. Smanjenje masenog udjela diglukozida manje je od onog odgovarajućih monoglukozida. Opažena je najmanja promjena u masenim udjelima flavonola. U usporedbi s uzorcima sušenim na zraku, maseni udio hidroksicimetnih kiselina u liofiliziranim uzorcima smanjio se u značajno većem obimu. Opaženo je povećanje masenog udjela prokatehinske kiseline koje je u korelaciji sa smanjenjem masenog udjela cijanidin-3-*O*-glukozida. Općenito, u slučaju liofiliziranih uzoraka zadržan je najveći maseni udio ukupnih fenola.

Tablica 4.5. Maseni udjeli fenolnih kiselina i stilbena u kožicama grožđa sušenim različitim načinima nakon šest mjeseci pohrane

Spoj	Sušenje u dehidratoru		Sušenje na zraku		Liofilizacija	
	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**Preostalo / %**
Kaftarinska kiselina	595,21±5,12	100,00	311,02±2,55	79,77	286,83±6,06	68,73
Kafeinska kiselina	47,50±2,76	98,38	29,90±2,90	68,53	24,55±1,75	57,67
p-Kutarinska kiselina	591,82±4,89	99,99	244,19±2,28	59,66	228,83±2,91	59,85
p-Kumarinska kiselina	17,45±1,50	98,59	15,63±1,67	66,53	14,18±3,52	57,15
Ferulinska kiselina	28,77±2,46	98,92	18,93±1,52	55,60	16,61±2,40	43,27
Sinapinska kiselina	20,38±1,52	96,39	9,42±1,45	54,54	11,24±2,12	56,22
Ukupne hidroksicimetne kiseline	**1301,13±6,23**	**99,83**	**629,10±4,76**	**71,18**	**582,25±12,48**	**62,91**
Galna kiselina	40,19±3,94	69,22	14,54±0,31	112,51	17,75±2,50	148,99
Prokatehinska kiselina	863,91±12,08	101,45	29,28±0,96	112,80	106,83±1,28	136,07
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	**904,09±15,33**	**99,39**	**43,82±1,15**	**112,71**	**124,58**±3,47	**137,77**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	231,23±4,88	99,88	125,06±7,22	55,52	165,83±5,88	74,82
Ukupni fenoli	**31884±5,12**	**99,31**	**26052±2,55**	**63,97**	**35899±6,06**	**87,08**

4.2.2. Postupak optimiranja pohranjivanja uzoraka

Zamrzavanje kao i metoda odmrzavanja, značajno utječu na maseni udio antocijanina (Tablica 4.6). U zamrznutim uzorcima (sa i bez jastučića), a koji su odmrznuti skidanjem kožica sa bobica u zamrznutom stanju maseni udjeli antocijanina značajno su veći u odnosu na one u nezamrznutim uzorcima (svježi uzorci). Antocijanini su sadržani u staničnim vakuolama kao i u antocijaninskim vakuolarnim inkluzijama, a koje se mogu nalaziti unutar staničnih vakuola te na citosolnoj strani tonoplasta.[12] Tijekom zamrzavanja dolazi do formiranja kristalića leda što može dovesti do razgradnje membrana pri čemu membrana gubi sposobnost djelovanja kao polupropusne ili difuzijske barijere.[173] Ovakve promjene na membranama mogu povećati ekstraktibilnost antocijanina i drugih spojeva sadržanih u stanicama. U usporedbi sa svježim uzorcima, manji maseni udjeli antocijanina određeni su u zamrznutim uzorcima bez jastučića koji su odmrznuti pri sobnoj temperaturi i u hladnjaku. Jastučić može pomoći u očuvanju integriteta bobice grožđa tijekom procesa zamrzavanja i odmrzavanja, a što može objasniti dobivene značajno veće masene udjele antocijanina u uzorcima zamrznutim s jastučićem koji su odmrzavani pri sobnoj temperaturi i u hladnjaku. Stanična dekompartmentilizacija, do koje dolazi uslijed zamrzavanja i odmrzavanja, može omogućiti oksidacijsku razgradnju antocijanina putem vezanih reakcija oksidacije. Enzim PPO može ubrzati razgradnju antocijanina u prisutnosti hidroksicimetnih kiselina, a posebice

kaftarinske kiseline, koja je najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u kožicama bobica grožđa. Enzim PPO iz grožđa olakšava oksidaciju kaftarinske kiseline u kinon, a koji kasnije može reagirati s antocijaninima.[172] Obim razgradnje antocijanina uvelike ovisi o njihovoj strukturi. Prema dobivenim rezultatima, uzimajući u obzir monoglukozide, obim razgradnje smanjuje se slijedećim redoslijedom: delfinidin>cijanidin>peonidin>malvidin, a što je u skladu s ranije provedenim istraživanjem.[171] Od ispitanih antocijanina najstabilniji su malvidin-3,5-*O*-diglukozid i peonidin-3,5-*O*-diglukozid. Aktivnost polifenoloksidaze ovisi o temperaturi i vremenu inkubacije. Optimalna temperatura za većinu PPO iz grožđa je na približno 15°C[168], dok je pri 4 °C aktivnost PPO na približno 60 % maksimalne aktivnosti.[167] Dobiveni izrazito mali maseni udjeli antocijanina u uzorcima odmrzavanim u hladnjaku vjerojatno su posljedica produženog odmrzavanje pri 4 °C zajedno sa očuvanom aktivnošću PPO.

Flavonoli su sadržani u staničnim vakuolama.[174] Najveći maseni udjeli ove skupine spojeva nađeni su u uzorcima zamrznutim s jastučićem, a čija je kožica odvojena sa još zamrznutih bobica (Tablica 4.6). U svim zamrznutim uzorcima maseni udjeli ove skupine spojeva bili su veći od onih određenih u svježim uzorcima. U usporedbi s antocijaninima, ova je skupina spojeva manje podložna oksidacijskoj razgradnji djelovanjem PPO. Prisutnost β-glikozidaza prirodno sadržanih u grožđu može utjecati na masene udjele flavonol-glikozida. Ovi enzimi mogu cijepati β-glikozidnu vezu u molekulama flavonol-3-*O*-glikozida, a pri čemu dolazi do otpuštanja odgovarajućeg flavonol aglikona i šećera.[175] U uzorcima zamrznutim sa i bez jastučića, a koji su odmrzavani pri sobnoj temperaturi, u hladnjaku i u mikrovalnoj opažena je prisutnost odgovarajućih aglikona.

Tablica 4.6. Utjecaj različitih načina zamrzavanja i odmrzavanja na masene udjele flavonoida

Spoj	*w* / mg kg^{-1} suhe kožice								
	SV[1]	**ZS[2]**	**ST[3]**	**MP[4]**	**HL[5]**	**ZSJ[6]**	**STJ[7]**	**MPJ[8]**	**HLJ[9]**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	1560,97^{a}	1513,00^{a}	557,28^{b}	875,02^{c}	364,07^{d}	2149,02^{e}	1054,74^{f}	1131,78^{f}	716,06^{g}
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	1026,35^{h}	1332,23^{a}	745,79^{b}	881,66^{c}	288,39^{d}	1701,47^{e}	911,68^{c}	1167,09^{f}	514,78^{g}
Delfinidin-3-*O*-glukozid	10981,34^{a}	11246,03^{a}	6059,34^{b}	8263,83^{c}	4492,25^{d}	13663,03^{e}	8730,25^{cf}	9023,91^{f}	7671,56^{g}
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1283,19^{c}	1626,28^{a}	1431,69^{be}	1456,44^{b}	1242,04^{c}	1888,02^{d}	1396,54^{e}	1743,12^{f}	1425,7^{be}
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	11295,17^{f}	17040,77^{ad}	15624,17^{be}	15800,77^{be}	14434,8^{c}	17807,87^{a}	16398,67^{bd}	17487,4^{a}	15022^{ce}
Cijanidin-3-*O*-glukozid	2356,17^{c}	2828,14^{a}	1720,61^{b}	2358,83^{c}	1546,91^{d}	3222,16^{e}	2272,04^{f}	2453,17^{g}	2400,3^{eg}
Peonidin-3-*O*-glukozid	560,76^{ef}	696,93^{a}	503,28^{b}	495,27^{b}	437,56^{c}	711,11^{a}	537,98$^{b\,e}$	597,59^{df}	622,3^{d}
Malvidin-3-*O*-glukozid	7749,41^{g}	9630,81^{a}	6839,38^{b}	8423,81^{c}	6832,25^{b}	11043,76^{d}	7254,24^{e}	9221,21^{f}	9077,8^{f}
Ukupni antocijanini	**36813,35^{g}**	**45914,19^{a}**	**33481,53^{b}**	**38555,63^{c}**	**29638,3^{d}**	**52186,43^{e}**	**38556,14^{c}**	**42825,2^{f}**	**37450^{cg}**
Miricetin-3-*O*-glukozid	624,16^{g}	726,78^{a}	379,80^{b}	454,00^{c}	446,73^{c}	968,18^{e}	256,94^{d}	507,47^{f}	370,01^{b}
Rutin	143,33^{f}	285,62^{a}	261,19^{ad}	221,02$^{b\,e}$	212,54^{be}	246,19^{de}	204,16^{b}	267,3^{ad}	236,57^{bd}
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	87,51^{f}	183,7^{ad}	256,48^{b}	177,49^{a}	145,09^{c}	181,21^{ad}	179,87^{a}	194,79^{d}	162,88^{e}
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1308,99^{e}	1935,37^{a}	1861,73^{b}	2059,33^{d}	1845,07^{b}	2139,63^{c}	2163,33^{c}	2158,14^{c}	2037,78^{d}
Kemferol- 3-*O*-glukuronid	31,59^{f}	72,55^{ae}	82,67^{b}	64,58^{ce}	62,13^{c}	74,00^{a}	50,98^{d}	84,19^{b}	64,54^{ce}
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	19,88^{b}	32,59^{a}	0	0	0	29,93^{a}	0	0	0
Ukupni flavonoli	**2215,46^{f}**	**3236,6^{a}**	**2841,87^{b}**	**2976,42^{e}**	**2711,56^{c}**	**3639,14^{d}**	**2855,29^{b}**	**3211,90^{a}**	**2871,78^{b}**
Galokatehin	66,30^{ae}	68,13^{a}	45,19^{b}	54,04^{c}	16,07^{d}	82,94^{e}	41,70^{b}	64,62^{ae}	15,17^{d}
Procijanidin B1	57,82^{ad}	64,23^{a}	32,11^{c}	57,44^{ad}	38,36^{bc}	58,49^{ad}	44,39^{b}	44,06^{b}	52,84^{de}
Epigalokatehin	37,38^{a}	34,48^{ac}	17,43^{d}	39,25^{a}	37,38^{a}	29,04^{bc}	25,43^{b}	30,18^{bc}	32,27^{ab}
Katehin	38,43^{d}	27,32^{ac}	11,76^{b}	25,35^{ac}	15,19^{be}	31,70^{ad}	13,15^{b}	19,57^{bc}	14,20^{b}
Procijanidin B2	30,57^{a}	31,99^{a}	18,21^{bc}	22,33^{bd}	13,96^{c}	28,07^{ad}	16,97^{bc}	21,31^{bde}	14,58^{ce}
Epikatehin	21,58^{d}	18,82^{ad}	5,35^{ce}	10,69^{b}	4,78^{ce}	16,09^{a}	6,16^{bc}	8,05^{bc}	3,98^{c}
Ukupni flavan-3-oli	**252,07^{a}**	**244,98^{a}**	**130,06^{d}**	**209,10^{c}**	**125,74^{d}**	**246,33^{a}**	**147,82^{b}**	**187,79^{e}**	**133,00^{d}**

[1] Uzorci analizirani neposredno nakon berbe; [2]Skidanje kožice sa zamrznutih bobica bez jastučića; [3] Odmrzavanje bobica bez jastučića na zraku pri sobnoj temperature (25 °C) u trajanju od 1,5 h; [4]Odmrzavanje bobica bez jastučića u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min; [5]Odmrzavanje bobica bez jastučića u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h; ; [6]Skidanje kožice sa zamrznutih bobica s jastučićem; [7]Odmrzavanje bobica s jastučićem na zraku pri sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 1,5 h; [8]Odmrzavanje bobica s jastučićem u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min; [9]Odmrzavanje bobica s jastučićem u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

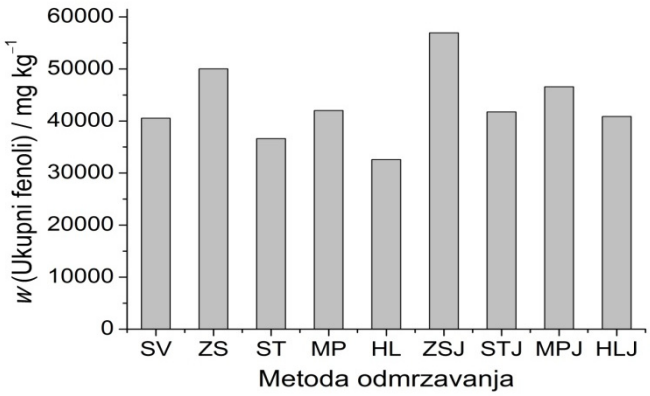
U kožicama bobica grožđa, stanična stijenka tvori barijeru koja onemogućava difuziju sastavnica stanica, uključujući i fenole, te u isto vrijeme štiti stanicu od vanjskih utjecaja. Stanična stijenka kožica grožđa izgrađena je od polisaharida (celuloze, hemiceluloze, pektina), strukturnih proteina te fenola od kojih su najzastupljeniji flavan-3-oli i fenolne kiseline. Flavan-3-oli mogu biti sadržani i u slobodnom stanju u staničnim vakuolama. Maseni udjeli flavan-3-ola u svježim uzorcima veći su od onih u zamrznutim uzorcima bez obzira na način zamrzavanja i primijenjenu metodu odmrzavanja, a ta razlika ovisi o samom spoju, ali i o načinu zamrzavanja i odmrzavanja (Tablica 4.6). Najmanji maseni udjeli ovih spojeva opaženi su u uzorcima zamrznutim bez jastučića, a koji su odmrznuti na sobnoj temperaturi i u hladnjaku. Nastanak kristalića leda do kojeg dolazi prilikom zamrzavanja uzrokuje ireverzibilnu strukturnu razgradnju stanične stijenke. Cijepanje struktura stanične stijenke nije specifično pa ono dovodi do strukturnih promjena njezinih sastavnica pa tako i flavan-3-ola. Isto tako flavan-3-oli, a posebice katehin, su *o*-difenoli, a koji su primarni supstrati enzima PPO.[166] Ireverzibilna strukturna razgradnja staničnih stijenki zajedno s djelovanjem PPO može biti razlog opaženim manjim masenim udjelima flavan-3-ola u zamrznutim uzorcima u odnosu na one u svježima.

Hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline mogu biti sadržane u slobodnom obliku u citoplazmi ili biti vezane na strukture stanične stijenke. Ove kiseline mogu tvoriti eterske veze s ligninom preko svojih hidroksilnih skupina aromatskih prstenova kao i esterske veze sa strukturnim ugljikohidratima i proteinima preko karboksilnih skupina.[31,174] S obzirom na svoju kemijsku strukturu, ove se kiseline smatraju *o*-difenolima pa su stoga i izvrsni supstrati za PPO.[166] Navedene osobitosti hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina mogu biti razlogom za opažene manje masene udjele ovih kiselina u zamrznutim uzorcima u odnosu na svježe (Tablica 4.7). Uzimajući u obzir samo zamrznute uzorke, najveći maseni udjeli dobiveni su u uzorcima zamrznutim s jastučićem s čijih je bobica još u zamrznutom stanju odvojena kožica, a u kojima je očuvano približno 61 % masenog udjela hidroksicimetnih i 90 % masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina u odnosu na svježe uzorke. U uzorcima zamrznutim bez jastučića i odmrznutim u hladnjaku očuvano je svega 6 % masenog udjela hidroksicimetnih kiselina u odnosu na svježe uzorke.

Stilben *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozid sadržan je u staničnim vakuolama i AVI.[12] Opaženo je da svježi uzorci sadrže značajno veće masene udjele ovog spoja u odnosu na masene udjele u zamrznutim uzorcima bez obzira na način zamrzavanja i metode odmrzavanja (Tablica 4.7). Zamrzavanje uzoraka bez jastučića uz odmrzavanje u hladnjaku

dovodi do potpunog gubitka *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida. S obzirom da u navedenom spoju između resveratrola i glukoze postoji β-glikozidna veza on je potencijalni supstrat enzima β-glikozidaze, a što može objasniti dobivene rezultate.

Ukupan maseni udio fenola izražen je kao zbroj pojedinačnih spojeva (Tablica 4.7). Postupak zamrzavanja te metoda odmrzavanja značajno utječu na maseni udio ukupnih fenola (Slika 4.2). Najveći maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorcima zamrznutim s jastučićem, a s čijih je bobica još u zamrznutom stanju odvojena kožica, a što je posljedica pozitivnog učinka ovakvog načina zamrzavanja i odmrzavanja na masene udjele antocijanina i flavonola, a koji čine više od 95 % ukupnog sadržaja fenola u kožicama bobica grožđa. Skidanje kožica sa još zamrznutih bobica vrlo je složen postupak posebno kada je u vrlo kratkom vremenskom periodu potrebno obraditi veliki broj uzoraka. Jedan od mogućih načina za prevladavanje tog problema je odmrzavanje uzoraka u mikrovalnoj pećnici. Ovaj način odmrzavanja ima neke prednosti u odnosu na ostale metode odmrzavanja (hladnjak i sobna temperatura) od kojih je potrebno naglasiti kratko vrijeme odmrzavanja, koje je najčešće kraće od dvije minute. Ovim načinom odmrzavanja očuvano je 82 % masenog udjela antocijanina, 88 % flavonola, 74 % flavan-3-ola, 27 % hidroksicimetnih kiselina, 66 % hidroksibenzojevih kiselina, 21 % stilbena te 82 % ukupnih fenola u odnosu na maksimalni određeni maseni udio, a što ukazuje na to da ova metoda odmrzavanja može biti dobra metoda odmrzavanja kada je potrebno provesti pripravu velikog broja uzoraka kožica bobica grožđa u kratkom vremenu.



SV-Uzorci analizirani neposredno nakon berbe; ZS-Skidanje kožice sa zamrznutih bobica bez jastučića; ST-Odmrzavanje bobica bez jastučića na zraku pri sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 1,5 h; MP-Odmrzavanje bobica bez jastučića u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min; HL-Odmrzavanje bobica bez jastučića u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h; ZSJ-Skidanje kožice sa zamrznutih bobica s jastučićem; STJ-Odmrzavanje bobica s jastučićem na zraku pri sobnoj temperature (25 °C) u trajanju od 1,5 h; MPJ-Odmrzavanje bobica s jastučićem u mikrovalnoj pećnici; HLJ-Odmrzavanje bobica s jastučićem u hladnjaku

Slika 4.2. Ovisnost masenog udjela ukupnih fenola o primijenjenoj metodi zamrzavanja i odmrzavanja

Tablica 4.7. Utjecaj različitih načina zamrzavanja i odmrzavanja na masene udjele hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena

Spoj	*w* / mg kg^{-1} suhe kožice								
	SV[1]	**ZS[2]**	**ST[3]**	**MP[4]**	**HL[5]**	**ZSJ[6]**	**STJ[7]**	**MPJ[8]**	**HLJ[9]**
Kaftarinska kiselina	389,90^{h}	175,58^{a}	19,86^{b}	47,48^{g}	9,57^{d}	275,61^{e}	31,38^{f}	104,92^{c}	7,46^{d}
Kafeinska kiselina	43,64^{f}	8,16^{ad}	0,00	4,88^{de}	0,00	15,78^{c}	2,01^{be}	8,79^{a}	0,00
p-Kutarinska kiselina	375,48^{f}	156,78^{a}	19,70^{b}	33,22^{e}	17,50^{b}	205,17^{d}	25,66^{be}	81,23^{c}	21,52^{b}
p-Kumarinskakiselina	23,49^{a}	23,97^{a}	9,76^{b}	9,99^{bc}	8,54^{b}	8,76^{b}	9,86^{bc}	12,45^{bc}	9,28^{b}
Ferulinska kiselina	34,03^{e}	15,41^{ac}	9,72^{bd}	10,28^{cd}	8,27^{d}	11,46^{cd}	8,12^{d}	12,75^{cd}	10,20^{cd}
Sinapinska kiselina	17,27^{cd}	15,45^{a}	11,35^{bd}	9,37^{b}	11,87^{bd}	18,97^{c}	15,38^{bc}	15,35^{bc}	11,05^{bd}
Ukupne hidroksicimetne kiseline	**883,81^{g}**	**395,35^{a}**	**70,39^{b}**	**115,22^{f}**	**55,75^{b}**	**535,75^{d}**	**92,41^{e}**	**235,49^{c}**	**59,51^{b}**
Galna kiselina	12,92^{c}	2,96^{ab}	0,00	1,91^{a}	0,00	9,69^{bc}	2,25^{a}	0,00	0,00
Prokatehinska kiselina	95,96^{e}	70,88^{a}	53,31^{b}	72,99^{a}	50,73^{b}	87,84^{c}	61,44^{d}	71,37^{a}	53,48^{b}
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	**108,88^{c}**	**97,27^{a}**	**53,31^{b}**	**74,90^{ab}**	**50,73^{b}**	**97,53^{a}**	**63,69^{ab}**	**71,37^{ab}**	**53,48^{b}**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	256,41^{e}	142,96^{a}	30,80^{b}	65,98^{c}	0,00	221,64^{f}	23,73^{b}	53,41^{c}	1,64^{d}
Ukupni fenoli	**40539^{g}**	**50031^{a}**	**36608^{b}**	**41997^{c}**	**32586^{d}**	**56927^{e}**	**41739^{c}**	**46595^{f}**	**40866^{6}**

[1] Uzorci analizirani neposredno nakon berbe; [2]Skidanje kožice sa zamrznutih bobica bez jastučića; [3] Odmrzavanje bobica bez jastučića na zraku pri sobnoj temperature (25 °C) u trajanju od 1,5 h; [4]Odmrzavanje bobica bez jastučića u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min; [5]Odmrzavanje bobica bez jastučića u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h; [6]Skidanje kožice sa zamrznutih bobica s jastučićem; [7]Odmrzavanje bobica s jastučićem na zraku pri sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 1,5 h; [8]Odmrzavanje bobica s jastučićem u mikrovalnoj pećnici (100 W) u trajanju od 1 min; [9]Odmrzavanje bobica s jastučićem u hladnjaku (4 °C) u trajanju od 15 h

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

4.2.2.1. Usporedba različitih načina pohrane uzoraka

Uspoređena su četiri različita načina priprave uzoraka kožica bobica grožđa, obrada tek ubranog uzorka uz sušenje liofilizacijom, pohrana suhog liofiliziranog uzorka te pohranjivanje uzoraka s jastučićem zamrzavanjem i kasnije skidanje kožica s još zamrznutih bobica, na masene udjele pojedinih fenola te na masene udjele ukupnih fenola koji su izraženi kao zbroj pojedinačnih vrijednosti (Tablica 4.8). Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da pohranjivanje uzoraka zamrzavanjem ima pozitivan učinak na ekstraktibilnost antocijanina i flavonola. Kada je potrebno odrediti točan maseni udio pojedinih hidroksicimetnih kiselina, analizu je potrebno provesti neposredno nakon berbe jer su gubici do kojih dolazi tijekom postupka pohranjivanja bilo zamrzavanjem bilo pohranjivanjem suhoga liofiliziranog praha izrazito veliki (veći od 40 %), a što u konačnici može dati pogrešnu sliku o njihovom stvarnom masenom udjelu. U slučaju ostalih skupina spojeva razlike između masenih udjela u uzorcima podvrgnutim različitim načinima priprave su statistički značajne, ali su manje od 25 %.

Tablica 4.8. Utjecaj različitih načina priprave uzoraka na masene udjele fenola

Spoj	***w* / mg kg^{-1} suhih kožica**		
	Liofilizacija	**Liofilizacija 6 mjeseci**	**Zamrznuto skidanje s jastučićem**
Kaftarinska kiselina	417,35^{a}±1,58	286,83^{b}±6,06	275,61^{b}±2,48
Kafeinska kiselina	42,55^{a}±2,24	24,55^{b}±1,75	15,78^{c}±0,84
p-Kutarinska kiselina	382,32^{a}±3,02	228,83^{b}±2,91	205,17^{c}±3,14
p-Kumarinska kiselina	24,89^{a}±2,49	14,18^{b}±3,52	8,76^{c}±0,85
Ferulinska kiselina	38,38^{a}±2,79	16,61^{b}±2,40	11,46^{c}±1,52
Sinapinska kiselina	20,00^{a}±1,80	11,24^{b}±2,12	18,97^{a}±1,74
Ukupne hidroksicimetne kiseline	**925,48^{a}±3,71**	**582,25^{b}±12,48**	**535,75^{c}±5,19**
Galna kiselina	11,91^{a}±2,40	17,75^{b}±2,50	9,69^{c}±1,27
Prokatehinska kiselina	78,50^{a}±1,55	106,83^{b}±1,28	87,84^{c}±2,83
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	**90,42^{a}±3,13**	**124,58^{b}±3,47**	**97,53^{c}**±3,28
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	219,91^{a}±7,74	165,83^{b}±5,88	221,64^{a}±6,21
Ukupni fenoli	**41224^{a}±2**	**35899^{b}±6**	**56927^{c}±5**

Tablica 4.8. Utjecaj različitih načina priprave uzoraka na masene udjele fenola [Nastavak]

Spoj	w / mg kg^{-1} suhih kožica		
	Liofilizacija	**Liofilizacija 6 mjeseci**	**Zamrznuto skidanje s jastučićem**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	1537,79^{a}±27,23	1390,93^{b}±29,91	2149,02^{c}±30,72
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	1032,65^{a}±6,97	920,19^{b}±18,10	1701,47^{c}±11,63
Delfinidin-3-*O*-glukozid	10976,59^{a}±50,87	9240,09^{b}±76,03	13663,03^{c}±83,55
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1337,09^{a}±36,91	1232,03^{b}±36,80	1888,02^{c}±12,11
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	11799,73^{a}±60,12	10240,53^{b}±118,09	17807,87^{c}±97,13
Cijanidin-3-*O*-glukozid	2376,41^{a}±21,07	1892,00^{b}±7,37	3222,16^{c}±9,45
Peonidin-3-*O*-glukozid	601,73^{a}±9,08	483,71^{b}±24,19	711,11^{c}±2,32
Malvidin-3-*O*-glukozid	7783,57^{a}±173,24	6272,43^{b}±308,95	11043,76^{c}±7,23
Ukupni antocijanini	**37445,60^{a}±210,72**	**31671,81^{b}±468,37**	**52186,43^{c}±180,49**
Miricetin-3-*O*-glukozid	625,60^{a}±8,46	619,42^{a}±8,94	968,18^{b}±5,10
Rutin	145,14^{a}±2,01	144,37^{a}±3,80	246,19^{b}±3,09
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	80,97^{a}±0,64	80,50^{a}±1,87	181,21^{b}±0,94
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1225,31^{a}±25,68	1160,47^{b}±9,98	2139,63^{c}±25,53
Kemferol-3-*O*-glukuronid	35,12^{a}±2,42	29,31^{a}±1,15	74,00^{b}±4,34
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	102,13^{a}±4,11	93,39^{a}±3,08	29,93^{b}±3,91
Ukupni flavonoli	**2214,27^{a}±36,34**	**2133,46^{b}±5,55**	**3639,14^{c}±28,96**
Galokatehin	70,38^{a}±0,12	69,92^{a}±3,15	82,94^{b}±0,31
Procijanidin B1	83,72^{a}±1,75	57,25^{b}±3,34	58,49^{b}±1,68
Epigalokatehin	36,51^{a}±1,96	36,12^{a}±1,56	29,04^{b}±1,27
Katehin	51,98^{a}±1,38	41,25^{b}±2,32	31,70^{c}±2,00
Procijanidin B2	54,45^{a}±3,20	28,21^{b}±1,33	28,07^{b}±1,63
Epikatehin	32,05^{a}±2,42	25,18^{b}±3,94	16,09^{c}±0,69
Ukupni flavan-3-oli	**329,09^{a}±7,70**	**257,94^{b}**±11,49	**246,33^{c}±5,78**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

4.2. Optimiranje ekstrakcijskih metoda

Za potrebe optimiranja pojedinih ekstrakcijskih tehnika primijenjen je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn. Nakon provedenih pokusa dobiveni odzivi (maseni udjeli antocijanina, flavonola i flavan-3-ola) statistički su obrađeni pomoću polinomne jednadžbe (jednadžba 2.1) pri čemu su dobivene vrijednosti pojedinih koeficijenata određenih članova jednadžbe. Signifikantnost modela kao i regresijski koeficijenti određeni su analizom varijance. Primjenom povratne eliminacije (engl. *Backward Elimination*) uklonjeni su statistički beznačajni članovi modela. Koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni R^2, *p*-vrijednosti modela i neprikladnosti modela kao i preciznost parametri su koji opisuju prikladnost i točnost modela. Da bi model bio značajan, *p*-vrijednost modela mora biti manja od 0,05 dok *p*-vrijednost neprikladnosti modela mora biti veća od 0,05. Razlike između koeficijenta determinacije i prilagođenog koeficijenta determinacije moraju biti što manje. Preciznost je mjera omjera signala i šuma, a ta vrijednost mora biti veća od 4 da bi model bio prikladan. Međudjelovanje pojedinih ekstrakcijskih faktora određeno je iz grafova kontura (engl. *Contour Plot*). Općenito, eliptični oblik kontura ukazuje na vrlo značajno međudjelovanje između odgovarajućih faktora, dok kružni oblik kontura ukazuje na zanemarivo međudjelovanje između istih.[176] Dobivanje optimalnih vrijednosti za pojedine skupine spojeva kao i za sve njih zajedno provedeno je primjenom Derringerove funkcije (jednadžbe 2.2 i 2.3).

4.2.1. Odabir organske faze

Vrsta ekstrakcijskog otapala ima značajan učinak na učinkovitost postupka ekstrakcije. Na topljivost flavonoida značajno utječe polarnost uporabljenog otapala. Ovisno o primijenjenom ekstrakcijskom otapalu u ekstraktu mogu biti sadržani flavonoidi, ali i druge skupine spojeva šećeri, organske kiseline i masti, a koji su topljivi u pripadnom ekstrakcijskom otapalu. Da bi se postigle izvrsna učinkovitost i dobra selektivnost neophodno je primijeniti prikladno ekstrakcijsko otapalo. Metanol i etanol imaju vrlo slična fizikalno-kemijska svojstva. Lapornik i sur.[177] pokazali su da je etanol bolja organska faza od metanola u ekstrakcijskom otapalu za ekstrakciju fenola. Primjena ultrazvuka visokih frekvencija može povećati nastanak hidroksilnih radikala. Nastanak ovih radikala može se spriječiti dodatkom malih količina etanola. Etanol može smanjiti temperaturu unutar kavitacijskog mjehurića te time utjecati na kemijske promjene.[178,179] Isto tako vrijednosti faktora rasipanja (tan δ) u slučaju istih molarnih udjela etanola i metanola u vodenim otopinama veće su u otopinama koje sadrže etanol. Veće

vrijednosti ovog faktora omogućavaju veću provodnost mikrovalova kroz medij, a čime se povećava učinkovitost mikrovalovima potpomognute ekstrakcije.[180] Temeljem navedenog kao i činjenice da je etanol ekološki prihvatljivo otapalo te nema negativnih učinaka na ljudsko zdravlje, odabran je kao jedna od tri organske faze u ekstrakcijskim otapalima. Prema nekim provedenim istraživanjima aceton je izvrsno organsko otapalo za ekstrakciju flavan-3-ola.[87] Kao treća organska faza odabran je acetonitril temeljem rezultata istraživanja provedenih tijekom razvoja i optimiranja metode HPLC za analizu fenola.[181] Flavonoidi, a posebice antocijanini najstabilniji su pri niskim pH-vrijednostima kad se nalaze u obliku flavilijevog kationa pa je stoga ekstrakciju potrebno provoditi u kiselim uvjetima. Acilirani antocijanini kao i flavonol-3-*O*-glikozidi nestabilni su u otopinama koje sadrže jake anorganske kiseline pa je stoga nužno koristiti slabe organske kiseline kao što je mravlja kiselina. Dodatkom mravlje kiseline u ekstrakcijsko otapalo dolazi do značajnog povećanja sadržaja pojedinih flavonoida (Dodatak Tablica 7.1). Istraživanje koje su proveli Bakker i Timberlake[182] ukazuje na mogućnost nastanka formiliranih derivata antocijanina u ekstrakcijskim sustavima koji sadrže 2 % mravlje kiseline. Podrobnim pregledom kromatograma snimljenih pri 518 nm nakon injektiranja ekstrakta dobivenih primjenom ekstrakcijskog otapala koje je sadržavalo 1 % mravlje kiseline, nisu opaženi formilirani derivati antocijanina. Temeljem navedenih opažanja u daljnjim pokusima korištena su ekstrakcijska otapala koja su kao organsku fazu sadržavala različite volumne udjele acetonitrila, acetona ili etanola te 1 % mravlje kiseline.

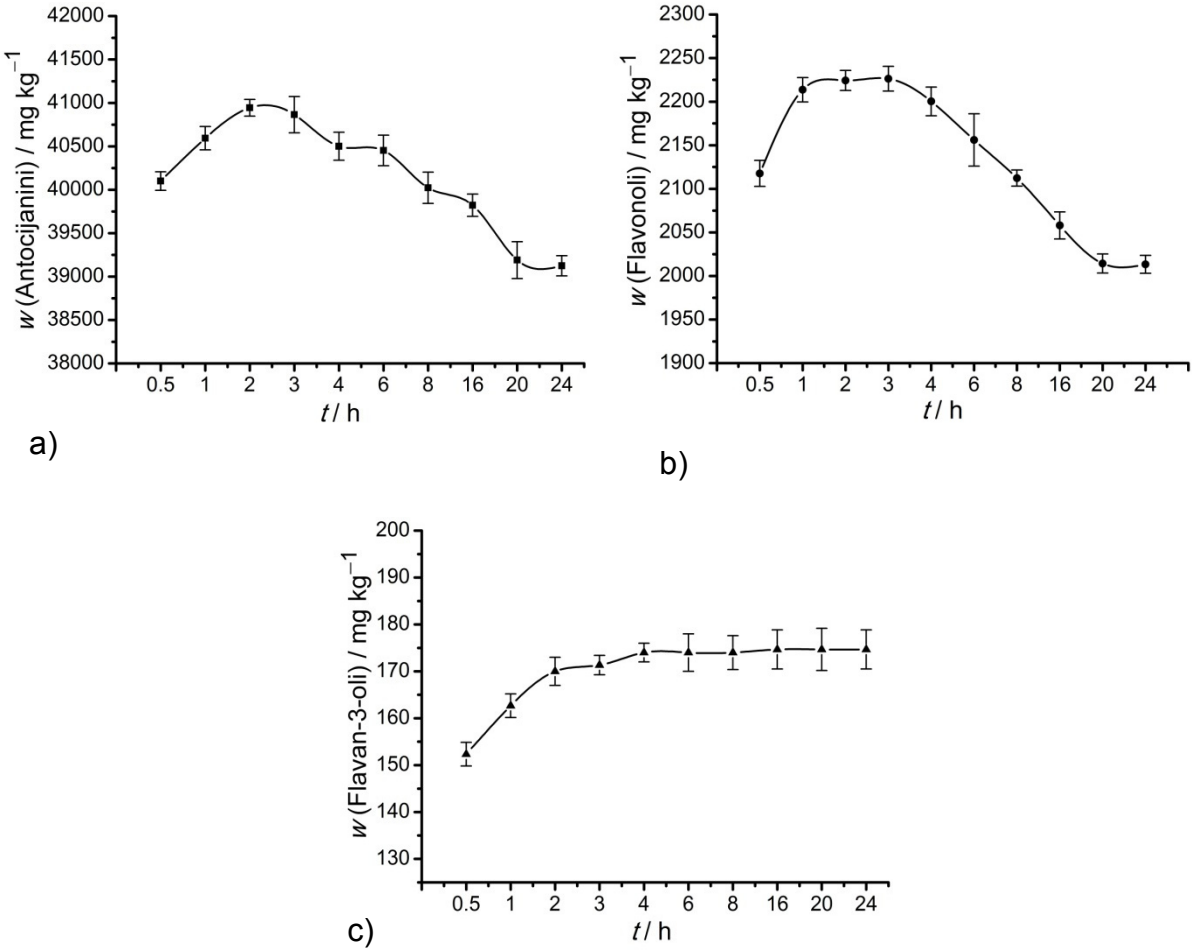
4.2.2. Optimiranje ekstrakcije čvrsto-tekuće

Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn najučinkovitiji je kada se primjenjuje na relativno uskom rasponu vrijednosti pojedinih eksperimentalnih faktora pa je ponekad potrebno provesti određivanje tih raspona primjenom metode koja uključuje izučavanje učinka jednog faktora na konačni rezultat dok su ostali faktori stalni. Ovakav je pristup korišten za određivanje optimalnog raspona vremena ekstrakcije te za određivanje optimalnog broja ekstrakcijskih koraka i omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala.

4.2.2.1. Određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije

Utjecaj vremena ekstrakcije na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola prikazani su na slici 4.3. Značajno povećanje masenog udjela antocijanina opaženo je između 1 h i 3 h. Sličan trend slijede flavonoli te flavan-3-oli. Duže trajanje ekstrakcije dovodi do značajnog smanjenja masenih udjela antocijanina i flavonola, dok je maseni udio flavan-3-ola ostao gotovo nepromijenjen. Ovakvo opažanje može biti posljedica hidrolize antocijanina i flavonol-3-*O*-glikozida pri čemu nastaju antocijanidini i aglikoni flavonola jer se ekstrakcija

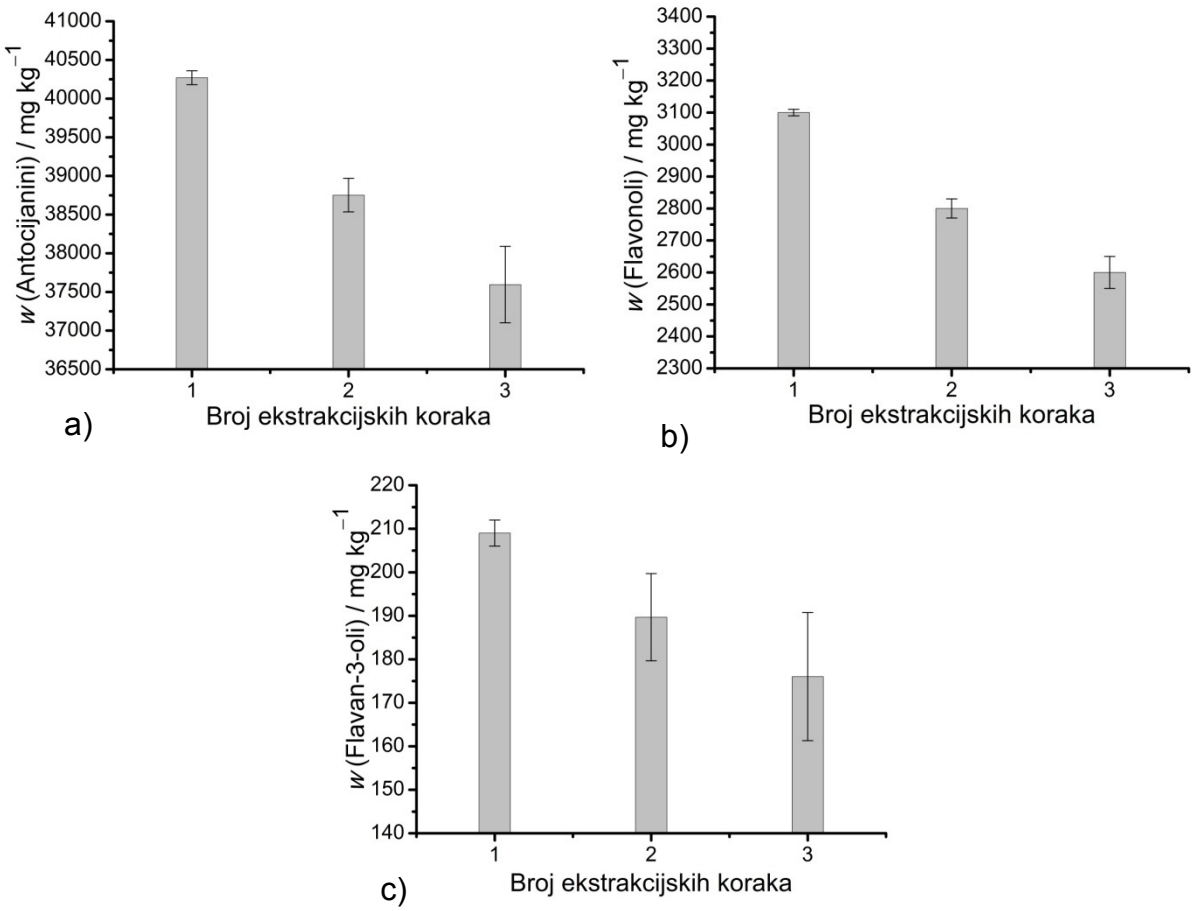
odvija u kiselom mediju. Temeljem dobivenih rezultata u daljnjim pokusima (primjena eksperimentalnog dizajna) korišten je raspon vremena ekstrakcije od 1 h do 3 h.



Slika 4.3. Utjecaj trajanja ekstrakcije na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola

4.2.2.2. Utjecaj broja ekstrakcijskih koraka

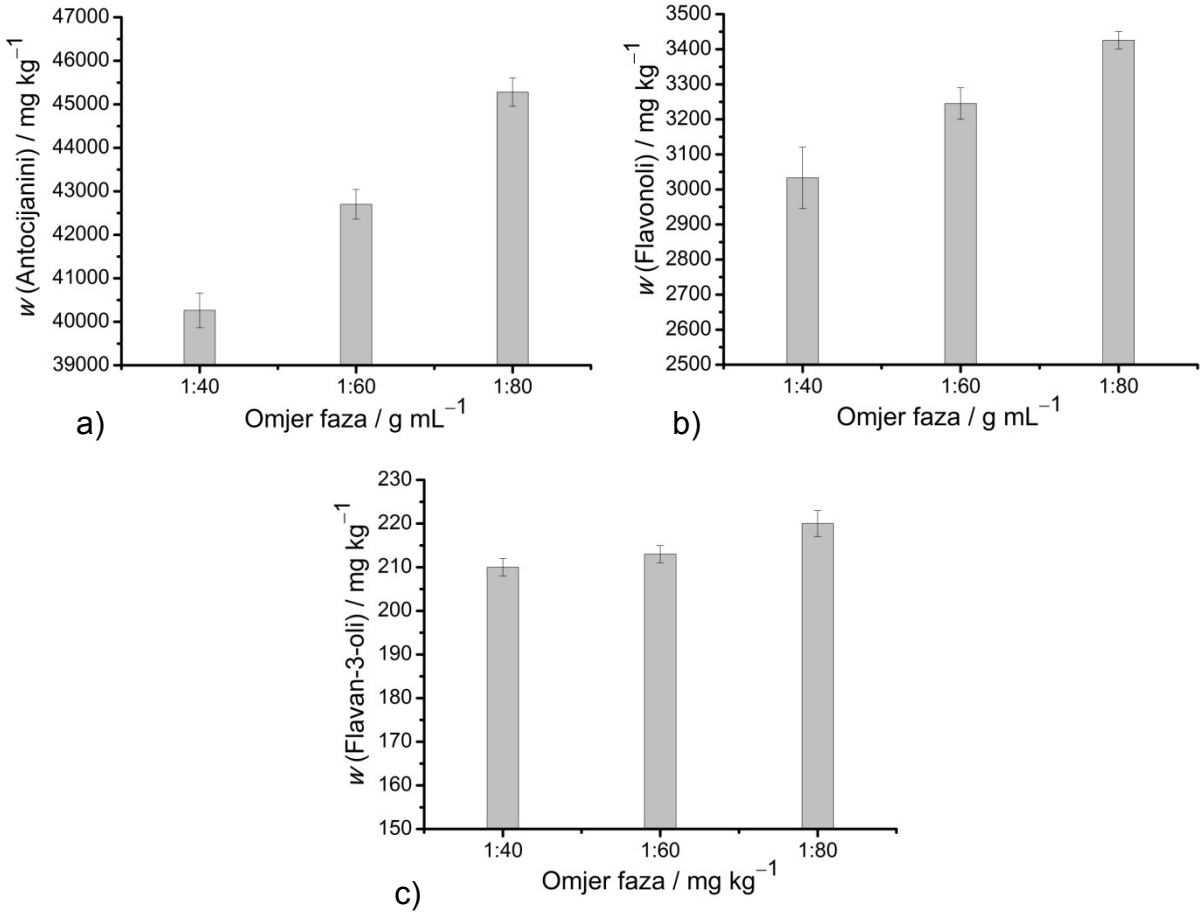
Broj ekstrakcijskih koraka značajno utječe na masene udjele antocijanina, flavonola te flavan-3-ola (Slika 4.4). Najveći maseni udjeli svih triju skupina spojeva određeni su u ekstraktima dobivenim jednim ekstrakcijskim korakom. Povećanje broja ekstrakcijskih koraka dovodi do gotovo linearnog smanjena masenih udjela ispitanih flavonoida, a što je u skladu s opažanjem Manea i sur.[183] Izračunata relativna standardna odstupanja (RSD) najveća su u slučaju ekstrakcije koja se provodi u tri koraka, a što se može objasniti učestalim prijenosom uzorka iz jedne posude u drugu.



Slika 4.4. Ovisnost masenog udjela a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola o broju ekstrakcijskih koraka

4.2.2.3. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala

Na slici 4.5 prikazan je utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala tj. omjera faza na masene udjele flavonoida. Povećanjem omjera faza dolazi gotovo do linearnog povećanja masenih udjela antocijanina, flavonola odnosno flavan-3-ola. Najveći maseni udjeli za sve ispitane skupine flavonoida određeni su u ekstraktima s omjerom mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala od 1:80 g mL^{-1}, a što je u dobrom slaganju s istraživanjem koje su proveli Cacace i Mazza.[131] Povećanje masenih udjela flavonoida s povećanjem omjera faza u skladu je s principom prijenosa mase. Pokretačka sila tijekom prijenosa mase unutar čvrstine je koncentracijski gradijent koji se povećava s povećanjem omjera faza, što u konačnici dovodi do povećanja brzine difuzije.



Slika 4.5. Utjecaj omjera faza na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola te c) flavan-3-ola

4.2.2.4. Optimiranje postupka SLE primjenom BBD

Temeljem rezultata dobivenih u prethodnim pokusima odabrane su razine ekstrakcijskih faktora. Kao ekstrakcijski faktori korišteni su vrsta organskog otapala, njegov udio u ekstrakcijskom otapalu te vrijeme i temperatura ekstrakcije (Tablica 3.5). Prilagođavanjem podataka različitim modelima pokazalo je da se maseni udjeli antocijanina, flavonola te flavan-3-ola najbolje mogu prikazati kvadratnom polinomnom jednadžbom. Parametri provedene ANOVA zajedno s dobivenim koeficijentima za pojedine članove kvadratne jednadžbe prikazani su u tablici 4.7. Određene *p*-vrijednosti modela manje su od 0,0001, dok su one neprikladnosti modela značajno veće od 0,05 što ukazuje na veliki značaj dobivenih modela.

Najznačajniji ekstrakcijski faktor je vrsta organskog otapala, a najprikladnije organsko otapalo za sve tri skupine flavonoida je acetonitril. Premda se smatra da je aceton dobro organsko otapalo za ekstrakciju flavan-3-ola, on je izrazito nepogodno otapalo za antocijanine bez obzira u kojem je volumnom udjelu sadržan u ekstrakcijskom otapalu. Lu i sur.[184] istražili su neobične reakcije antocijanina s acetonom te su opazili nastanak piranoantocijanidina

nakon trodnevne reakcije pri 40 °C. Ovi spojevi imaju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama od približno 480 nm. Podrobnim pregledom nekih kromatografskih pikova na kromatogramima dobivenim injektiranjem acetonskih ekstrakata opažene su neuobičajene koeluacije i novi pikovi pri valnoj duljini od 360 nm. Novi pikovi imaju apsorpcijske maksimume pri λ=480 nm te stoga mogu biti piranoantocijanidini nastali reakcijama između acetona i antocijanin-3-*O*-glukozida (Dodatak Slika 7.1). Ovi su spojevi detektirani u svim ekstraktima dobivenim s vodenim otopinama acetona bez obzira na njegov volumni udio, vrijeme i temperaturu ekstrakcije, a najzastupljeniji su u ekstraktima dobivenim kada je udio acetona bio 50 %, temperatura 60 °C, a vrijeme ekstrakcije 3 h.

Udio organskog otapala ima značajan utjecaj na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Za sve ispitane skupine flavonoida dovoljan je volumni udio acetonitrila od 20 %. Takvo opažanje je u skladu i s kromatografskim uvjetima za njihovu analizu jer većina ispitanih spojeva eluira u razdoblju od 40 min kada volumni udio acetonitrila u kromatografskom sustavu ne prelazi 20 %.

Tablica 4.9. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele

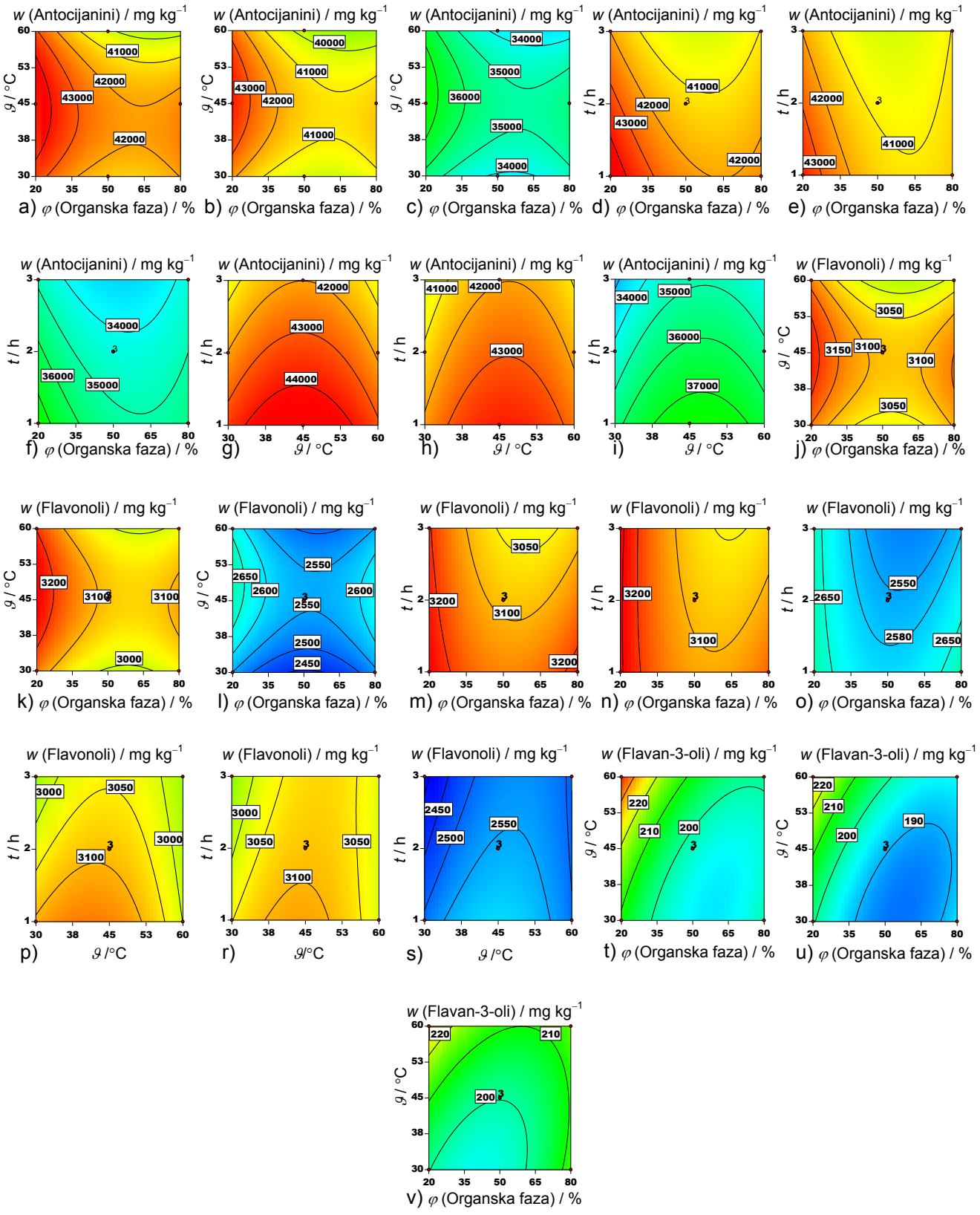
Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,1798		0,7409		0,2851
Odsječak	38804,40		2910,67		196,19	
A:Udio organske faze	–753,86	0,0044	–43,72	0,0266	–7,08	<0,0001
B:Temperatura	–237,32	0,3369	1,91	0,9191	7,38	<0,0001
C:Vrijeme	–862,56	0,0014	–35,68	0,0663		
D[1]:Otapalo	2465,15	< 0,0001	177,05	< 0,0001	1,54	<0,0001
D[2]:Otapalo	2019,53	< 0,0001	177,12	< 0,0001	–5,56	<0,0001
AB	–483,26	0,1706	–17,97	0,5014	–6,39	0,0005
AC	363,63	0,2989	–26,11	0,3308		
AD[1]	–83,05	0,9079	6,00	0,5868	–4,04	0,0012
AD[2]	–67,91	0,8334	–26,24	0,3068	–3,04	0,0017
BC	72,93	0,5917	27,46	0,5191		
BD[1]	–335,64	0,7256	–28,75	0,8556		
BD[2]	67,28	0,0013	5,40	0,0012		
CD[1]	–146,91	0,0004	–13,21	0,0036		
CD[2]	276,43	0,9525	12,32	0,8772		
A^2	1277,93	0,0044	99,26	0,0266	10,41	<0,0001
B^2	–1436,61	0,3369	–87,60	0,9191	3,42	0,0765
C^2	–21,48	0,0014	4,28	0,0663		
R^2	0,9339		0,9333		0,8044	
Prilagođeni *R^2*	0,8921		0,8914		0,7541	
Preciznost	17,24		15,21		16,88	

Temperatura ekstrakcije važan je faktor. Povišenje temperature do 50 °C ima pozitivan učinak na povećanje masenih udjela antocijanina i flavonola. Pri višim temperaturama povećava se topljivost fenolnih spojeva sadržanih u kožicama grožđa dok se u isto vrijeme smanjuje viskoznost ekstrakcijske smjese, a što dovodi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije. Povišenje temperature na vrijednosti više od 50 °C uzrokuje značajno smanjenje masenih udjela antocijanina i flavonola. Takvo opažanje može biti posljedica termičke nestabilnosti ovih skupina spojeva kao i njihove oksidacije. Pri temperaturama višim od 50 °C može doći do hidrolize šećernih skupina antocijanina i flavonol-3-*O*-glikozida. Temperature više od 50 °C imaju pozitivan učinak na masene udjele flavan-3-ola. Neka istraživanja ukazuju na to da je ova skupina spojeva vrlo stabilna pri višim temperaturama. Zhu i sur.[185]

pokazali su da zagrijavanjem ekstrakata zelenog čaja pri temperaturi od 100 °C u trajanju od 7 h dolazi do smanjenja masenih udjela flavan-3-ola od svega 15 %.

Trajanje ekstrakcije od 1 h dovoljno je za vrlo učinkovitu ekstrakciju antocijanina i flavonola. Duže trajanje ekstrakcije ima pozitivan učinak na masene udjela flavan-3-ola. Tijekom ekstrakcije u kiselom mediju može doći do hidrolize tanina. Tanini kožica bobica grožđa izgrađeni su od monomernih oblika flavan-3-ola međusobno povezanih interflavanskim vezama, a epikatehin i katehin najzastupljenije su terminalne jedinice tanina. Tijekom hidrolize prvo dolazi do cijepanja terminalnih jedinica tanina, a što se može objasniti nepostojanjem steričkih smetnji. Pri produženoj ekstrakciji pri višim temperaturama dolazi do značajne hidrolize tanina pa time i do povećanja masenog udjela flavan-3-ola u dobivenim ekstraktima.

Međudjelovanje ekstrakcijskih faktora određeno je iz grafova kontura (Slika 4.6). U slučaju antocijanina i flavonola najznačajnije međudjelovanje, bez obzira na vrstu organskog otapala, opaženo je između volumnog udjela organske faze i temperature ekstrakcije, volumnog udjela organske faze i vremena ekstrakcije te temperature i vremena ekstrakcije. Obje skupine spojeva u svim slučajevima slijede isti trend. Temperatura i volumni udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu imaju značajan učinak na viskoznost ekstrakcijskog otapala. Smanjenje viskoznosti olakšava difuziju analita iz čvrstog uzorka u okolno ekstrakcijsko otapalo pa time povećava učinak ekstrakcije. Povišenjem temperature smanjuje se viskoznost otapala pa je potreban i manji udio organske faze. U slučaju antocijanina i flavonola povišenje temperature dovodi do smanjenja volumnog udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu (Slika 4.6 a, b, c, j, k, l). Pri temperaturi od 45 °C smanjenje volumnog udjela organske faze i skraćivanje vremena ekstrakcije dovode do povećanja masenih udjela antocijanina i flavonola u ekstraktima (Slika 4.6 d, e, f, m, n, o).



Slika 4.6. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola uz acetonitril kao organsku fazu: a), d), g), j), m), p), t); uz etanol kao organsku fazu: b), e), h), k), n), r), u); te aceton kao organsku fazu: c), f), i), l), o), s), v)

Međudjelovanje između temperature i vremena ekstrakcije također je važan ekstrakcijski faktor. Povišenje temperature dovodi do skraćivanja vremena ekstrakcije (Slika 4.6 g, h, i, p, r, s). Ovakav rezultat može se objasniti smanjenom viskoznošću ekstrakcijskog otapala i većom brzinom difuzije, a što u konačnici za posljedicu ima da je potrebno kraće vrijeme da analiti iz unutrašnjosti čvrstog uzorka dođu na površinu te se otope u ekstrakcijskom otapalu. U slučaju flavan-3-ola jedino značajno međudjelovanje je između volumnog udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu i temperature ekstrakcije bez obzira na vrstu dodanog organskog otapala (Slika 4.6 t, u, v). Povišenje temperature i smanjenje volumnog udjela organske faze dovode do povećanja masenog udjela flavan-3-ola u dobivenim ekstraktima.

Primjenom Derringerove funkcije određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije za pojedine skupine flavonoida kao i za njih zajedno (Tablica 4.10). Optimalni uvjeti za ekstrakciju antocijanina i flavonola su jednaki dok se oni za flavan-3-ole razlikuju. Takvo opažanje može biti posljedica položaja navedenih skupina spojeva u stanicama kožica bobica grožđa. Antocijanini i flavonoli nalaze se u staničnim vakuolama te je za njihovu ekstrakciju potrebno primijeniti blaže uvjete ekstrakcije. Flavan-3-oli mogu biti i dio staničnih stijenki pa su stoga za njihovo izlučivanje potrebni drugačiji uvjeti, viša temperatura i veći volumni udio organske faze jer je potrebno u potpunosti razoriti strukturu stanične stijenke. Kada je dobiveni ekstrakt potrebno uporabiti u prehrambenoj, kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji kao organsku fazu u ekstrakcijskom otapalu potrebno je koristiti etanol pa je stoga optimirana i metoda u slučaju primjene etanola.

Prikladnost dobivenih jednadžbi modela za optimalne vrijednosti odziva određena je provođenjem eksperimenata pri dobivenim optimalnim uvjetima te uspoređivanjem vrijednosti predviđenim modelom s onima eksperimentalno dobivenima. Dobivene vrijednosti su vrlo slične vrijednostima predviđenim modelom. Njihove razlike ne prelaze 1,50 %, što ukazuje da su dobiveni modeli pouzdani i precizni (Tablica 4.10).

Tablica 4.10. Optimalni uvjeti ekstrakcije SLE, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

Skupina	Organska faza	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / h	Predviđena vrijednost / mg kg^{-1}	Dobivena vrijednost (n=3) / mg kg^{-1}
Antocijanini	ACN	20	45	1	44524,03	44498,32±59,32
Flavonoli	ACN	20	45	1	3249,22	3265,32±15,38
Flavan-3-oli	ACN	20	60	2	229,58	226,34±8,25
Konačni uvjeti	**ACN**	**20**	**50**	**1**		
Antocijanini					44522,20	44406,82±110,34
Flavonoli					3229,92	3301,85±20,67
Flavan-3-oli					225,13	223,64±5,43
Konačni uvjeti	**EtOH**	**20**	**55**	**1**		
Antocijanini					43373,60	43419,64±121,87
Flavonoli					3218,14	3274,28±23,74
Flavan-3-oli					221,86	217,33±4,35

4.2.3.Optimiranje ultrazvukom potpomognute ekstrakcije

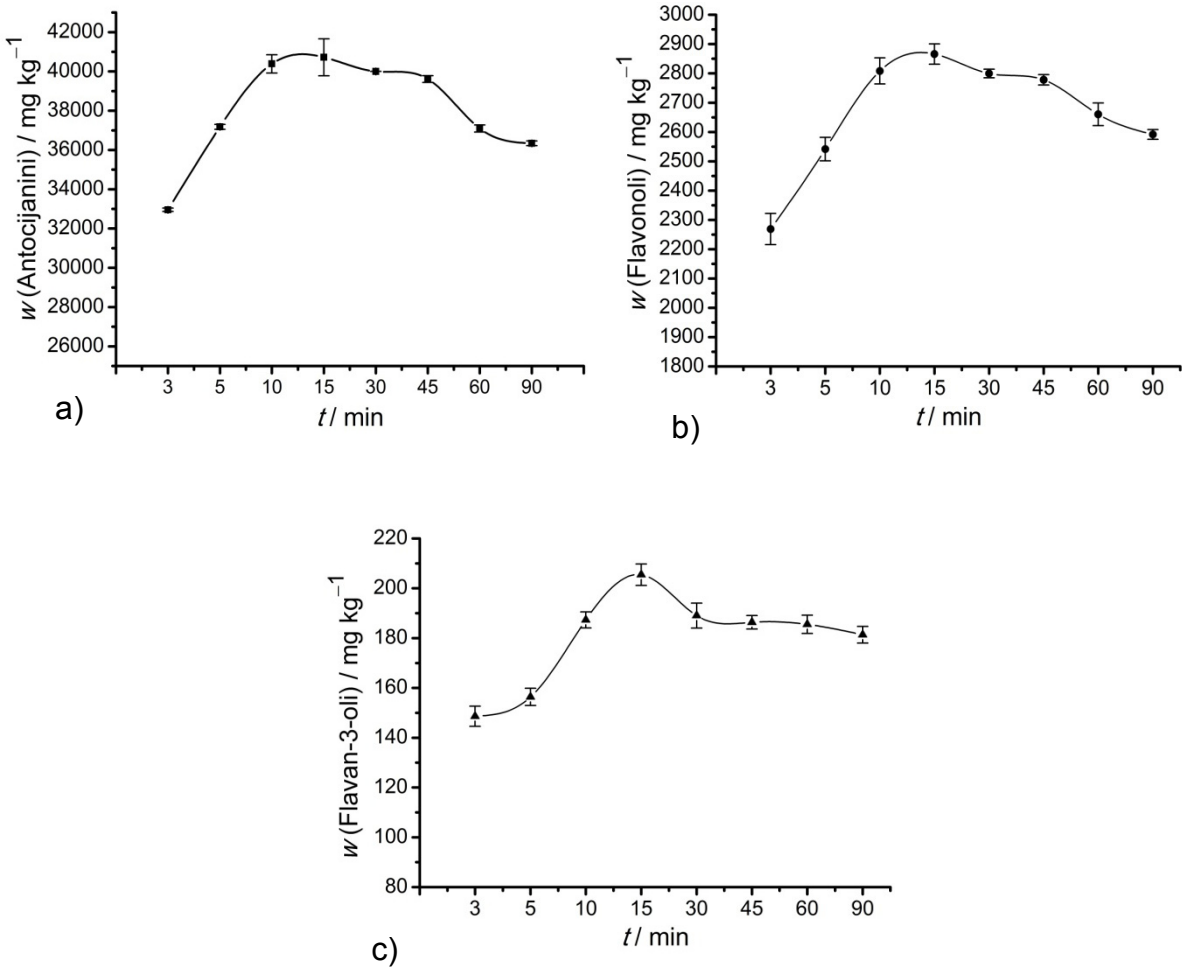
Kao i u slučaju optimiranja metode SLE za određivanje optimalnog raspona trajanja ekstrakcije, optimalnog broja ekstrakcijskih koraka i omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala primijenjen je pristup izučavanje učinka jednog faktora na konačni rezultat dok su ostali faktori bili stalni.

4.2.3.1. Odabir raspona temperatura ekstrakcija

Temperatura ekstrakcije važan je faktor koji može utjecati na viskoznost ekstrakcijskog otapala. Pri višim temperaturama viskoznost se smanjuje pa se time povećava brzina difuzije i povećava učinkovitost postupka ekstrakcije. Više temperature također pospješuju razaranje snažnih međudjelovanja između soluta i matrice. Tijekom implozije, unutar kavitacijskih mjehurića razvijaju se vrlo visoke temperature. Prilikom uporabe netermostatiranih ultrazvučnih kupelji tijekom kontinuirane primjene ultrazvuka dolazi do povišenja temperature vode u ultrazvučnoj kupelji. Taj poraste temperature odvija se sve dok se ne postigne ravnotežna temperatura. Da bi se ekstrakcija provela pri točno određenoj temperaturi neophodno je odrediti ravnotežnu temperaturu.[134] U slučaju uporabe ultrazvučne kupelji „Sonorex RK 100H“, ta je temperatura postignuta nakon 90 min primjene ultrazvuka te je iznosila 50 °C bez obzira na početnu temperaturu vode (Dodatak Slika 7.2). Temeljem dobivenih rezultata u daljnjim pokusima korišten je raspon temperatura od 50 °C do 70 °C.

4.2.3.2. Odabir raspona vremena ekstrakcija

Ovisnost masenih udjela antocijanina, flavonola i flavan-3-ola o vremenu ekstrakcije prikazana je na slici 4.7.

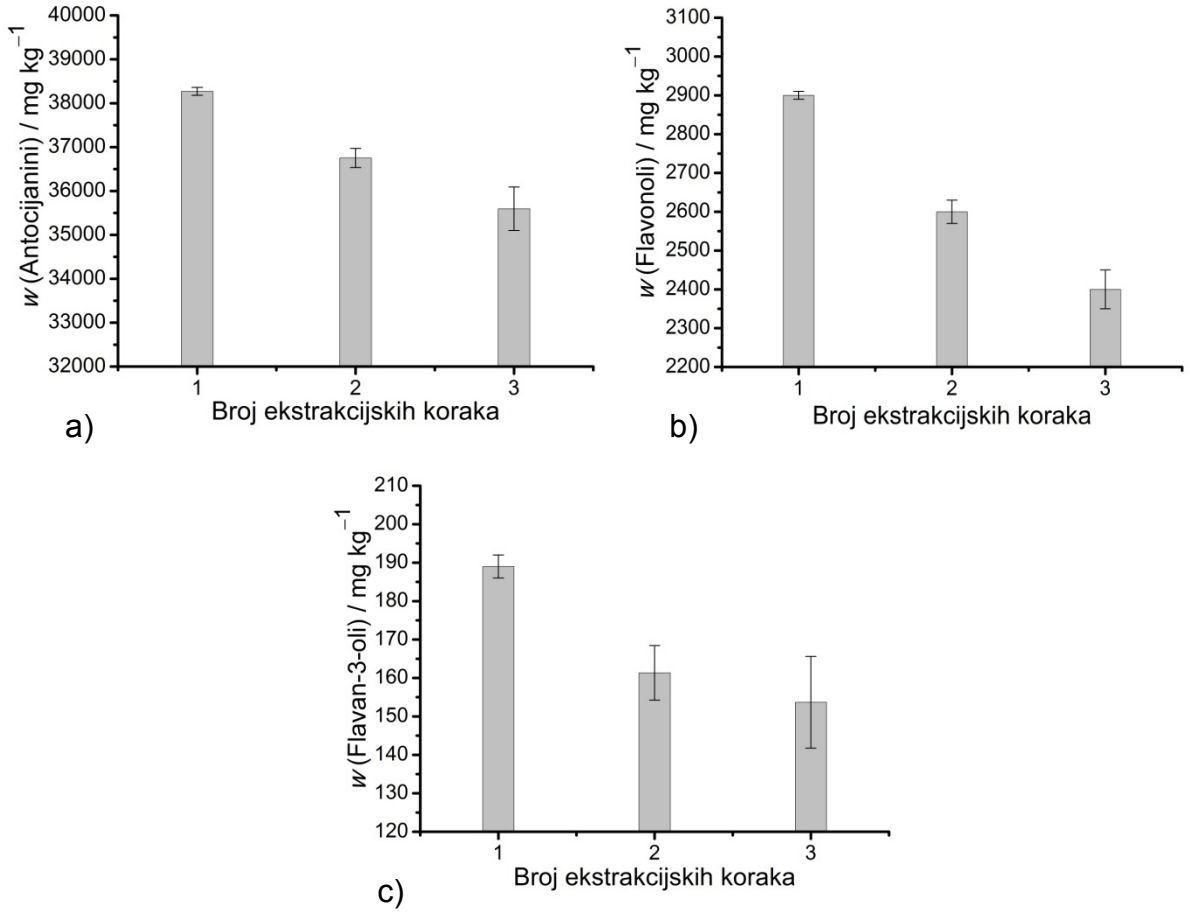


Slika 4.7. Utjecaj vremena ekstrakcije na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola

Značajno povećanje masenog udjela antocijanina opaženo je između 5 min i 15 min, nakon čega se on značajno smanjuje. Isti trend slijede i ostale dvije skupine flavonoida. Smanjenje masenog udjela flavan-3-ola nakon 15 min značajno je manje u odnosu na flavonole i antocijanine. Stoga je u eksperimentalnom dizajnu korišten vremenski period od 5 min do 15 min.

4.2.3.3. Utjecaj broja ekstrakcijskih koraka

Slika 4.8 prikazuje utjecaj broja ekstrakcijskih koraka na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola.

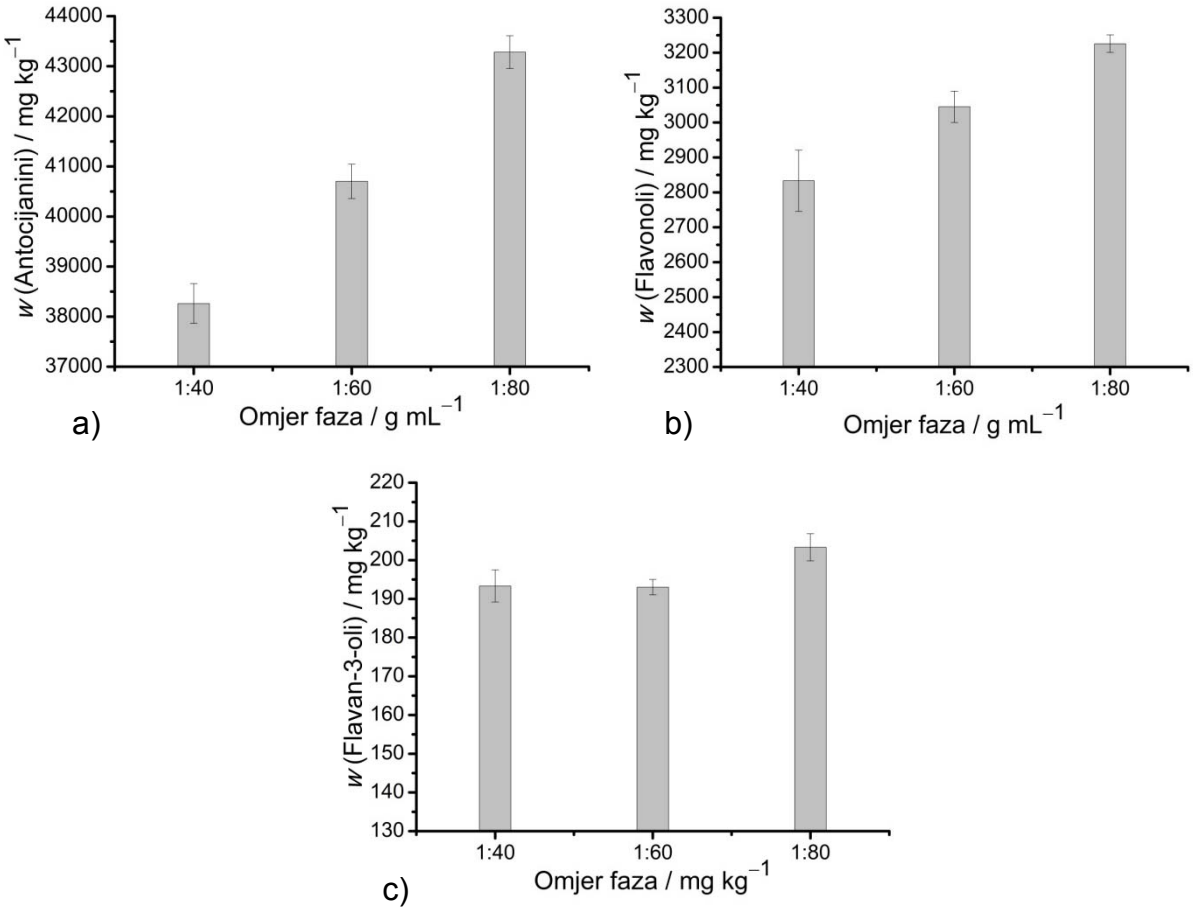


Slika 4.8. Ovisnost masenih udjela a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola o broju ekstrakcijskih koraka

Maseni udjeli svih ispitanih skupina spojeva značajno su manji u ekstraktima dobivenim uz primjenu većeg broja ekstrakcijskih koraka. Povećanje broja ekstrakcijskih koraka dovodi do gotovo linearnog smanjenja masenih udjela pojedinih skupina flavonoida, ali i do gotovo linearnog povećanja RSD.

4.2.3.4. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala

Ispitan je utjecaj omjera faza na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola (Slika 4.9).



Slika 4.9. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola

Kao i u slučaju metode SLE, povećanje volumena ekstrakcijskog otapala uz održavanje stalne mase uzorka dovodi do značajnog povećanja masenih udjela pojedinih skupina flavonoida. Ovakvo opažanje je u skladu s principom prijenosa mase jer povećanjem omjera faza dolazi do povećanja koncentracijskog gradijenta koji u konačnici dovodi do veće brzine difuzije analita iz čvrstog uzorka u okolno ekstrakcijsko otapalo.

4.2.3.5. Optimiranje metode UAE primjenom BBD

Pri optimiranju metode UAE kao ekstrakcijski faktori korišteni su vrsta organskog otapala i njegov volumni udio u ekstrakcijskom otapalu te vrijeme i temperatura ekstrakcije s razinama navedenim u tablici 3.9. Tijekom provedbe postupka optimiranja provedeno je 45 pokusa (Tablica 3.10). Analizom dobivenih rezultata određeno je da se maseni udjeli antocijanina, flavonola i flavan-3-ola najbolje mogu opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom. Parametri provedene ANOVA te dobiveni koeficijenti za pojedine članove kvadratne jednadžbe prikazani su u tablici 4.11. Određene *p*-vrijednosti modela manje su od 0,0001, dok

su one neprikladnosti modela značajno veće od 0,05 što ukazuje na veliki značaj dobivenih modela.

Vrsta organskog otapala dodanog u ekstrakcijsko otapalo najznačajniji je ekstrakcijski faktor koji utječe na dobivene masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. U slučaju antocijanina i flavonola najbolje organsko otapalo je acetonitril dok je za ekstrakciju flavan-3-ola to etanol. Ovakvo opažanje može biti povezano i s potrebnom višom temperaturom ekstrakcije za dobivanje maksimalnih udjela flavan-3-ola. Više temperature zajedno s primjenom ultrazvučnim valovima mogu pogodovati nastanku hidroksilnih radikala, a koji potom mogu reagirati s analitima. Za razliku od acetonitrila, etanol je učinkovitiji u sprječavanju nastanka tih radikala. Kao i u slučaju metode SLE, u acetonskim ekstraktima opažena je prisutnost pikova s apsorpcijskim maksimumima pri valnoj duljini od približno 480 nm, a koji se mogu pripisati produktima reakcije između antocijanina i acetona. Novonastali spojevi najobilniji su u ekstraktima dobivenim pri temperaturi od 50 °C i trajanju od 10 min s ekstrakcijskim otapalom koje je sadržavalo 80 % acetona.

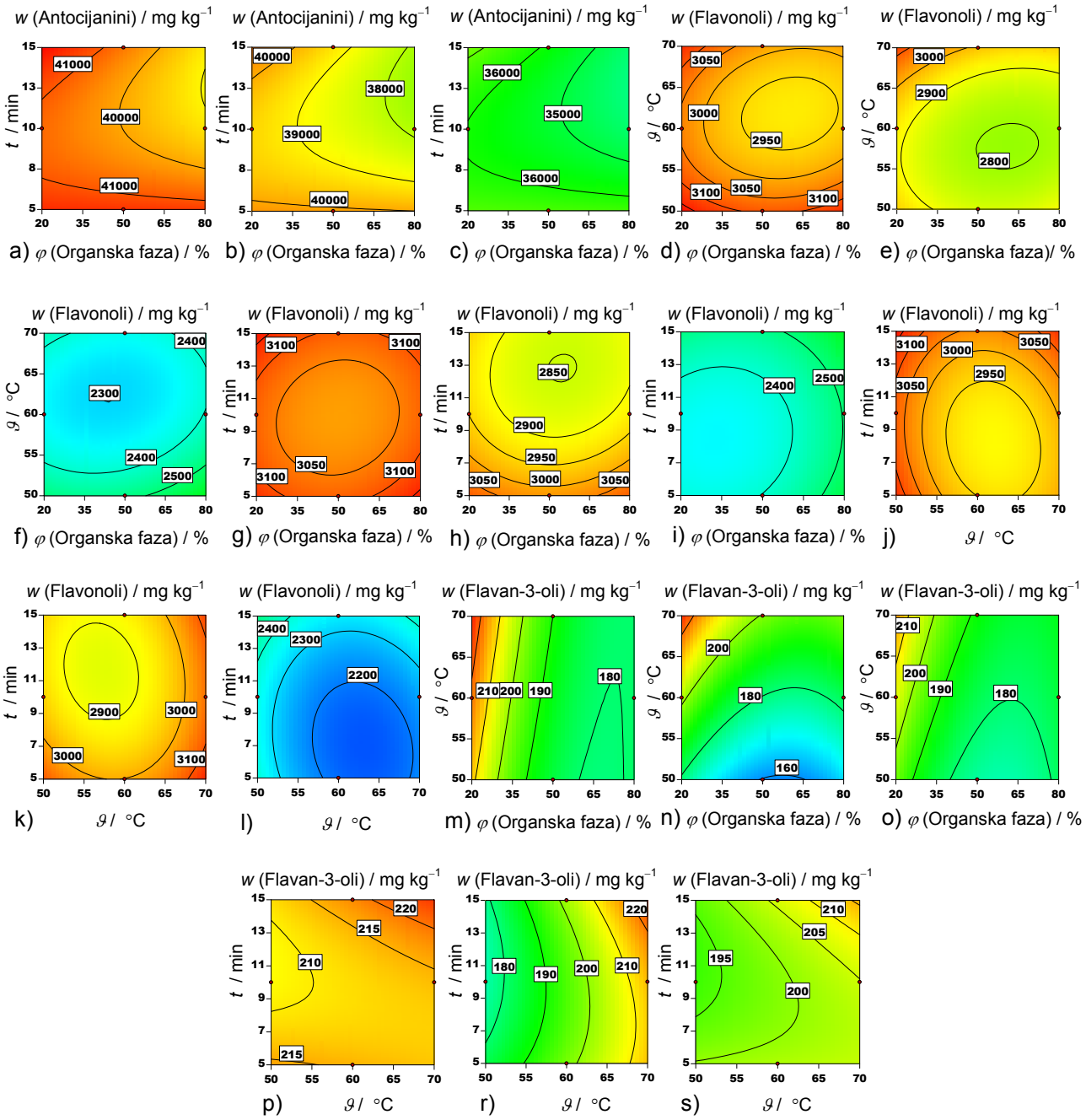
Udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu ima značajan učinak na masene udjele pojedinih skupina flavonoida. Za postizanje maksimalnih vrijednosti masenih udjela antocijanina, flavonola te flavan-3-ola dovoljan je volumni udio organske faze od 20 %.

Najveći maseni udjeli antocijanina i flavonola dobiveni su pri temperaturi od 50 °C. Temperature više od 50 °C imaju pozitivan učinak na maseni udio flavan-3-ola, te su im najveći maseni udjeli opaženi pri temperaturi od 70 °C. Navedene razlike u optimalnim temperaturama ekstrakcije za pojedine skupine flavonoida mogu biti posljedica njihovog različitog položaja u stanicama kožica grožđa. Optimalno vrijeme ekstrakcije za sve tri skupine flavonoida je 15 min.

Interakcijski učinci između pojedinih ekstrakcijskih faktora određeni su iz grafova kontura (Slika 4.10). U slučaju antocijanina međudjelovanje između volumnog udjela organske faze i trajanja ekstrakcije jedini je značajan interakcijski faktor (Slika 4.10 a, b, c). Međudjelovanja između volumnog udjela organske faze i vremena odnosno temperature te vremena i temperature značajno utječu na masene udjele flavonola (Slika 4.10 c-l). Na masene udjele flavan-3-ola utječu međudjelovanja između volumnog udjela organske faze i temperature te temperature i vremena (Slika 4.10 m-s). Povišenje temperature uz istovremeno povećanje vremena ekstrakcije dovode do značajnog povećanja masenog udjela flavan-3-ola bez obzira na uporabljeno organsko otapalo.

Tablica 4.11. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,4930		0,6904		0,4084
Odsječak	34595,51		2596,16		175,79	
A:Udio organske faze	–776,55	0,0301	–5,29	0,7967	–13,12	<0,0001
B:Temperatura	–917,59	0,0114	–35,84	0,0894	5,73	0,0205
C:Vrijeme	–400,03	0,2517	14,76	0,04744	2,00	0,4003
D[1]:Otapalo	1607,48	< 0,0001	236,16	< 0,0001	3,84	0,2419
D[2]:Otapalo	1481,81	< 0,0001	190,96	< 0,0001	–3,35	0,2419
AB			–25,24	0,3879	–3,51	0,2990
AC	–667,85	0,1776	–14,95	0,6074		
AD[1]			–19,40	0,2100	–45,7	0,2400
AD[2]			–32,38	0,2100	3,45	0,2400
BC			26,89	0,3581	4,06	0,2309
BD[1]	–438,88		–26,32	0,0616	–6,62	0,0157
BD[2]	767,46		70,79	0,0616	10,09	0,0157
CD[1]			16,74	0,0643		
CD[2]			–68,09	0,0643		
A^2			65,09	0,0386	12,81	0,0008
B^2	2430,13	< 0,0001	119,38	0,0005		
C^2	1059,55	0,0428	73,15	0,0214	5,14	0,1459
R^2	0,9008		0,9445		0,7970	
Prilagođeni *R^2*	0,8953		0,9096		0,7699	
Preciznost	12,91		14,64		9,15	



Slika 4.10. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka na masene udjele a) antocijanina uz ACN kao organsku fazu, b) antocijanina uz EtOH kao organsku fazu, c) antocijanina uz ACE kao organsku fazu pri 50 °C; d) flavonola uz ACN kao organsku fazu, e) flavonola uz EtOH kao organsku fazu, f) flavonola uz ACE kao organsku fazu uz vrijeme ekstrakcije od 15 min; g) flavonola uz ACN kao organsku fazu, h) flavonola uz EtOH kao organsku fazu, i) flavonola uz ACE kao organsku fazu pri 50 °C, j) flavonola uz ACN kao organsku fazu, k) flavonola uz EtOH kao organsku fazu, l) flavonola uz ACE kao organsku fazu u udjelu od 20 %; m) flavan-3-ola uz ACN kao organsku fazu, n) flavan-3-ola uz EtOH kao organsku fazu, o) flavan-3-ola uz ACE kao organsku fazu uz vrijeme ekstrakcije od 15 min; p) flavan-3-ola uz ACN kao organsku fazu, r) flavan-3-ola uz EtOH kao organsku fazu, s) flavan-3-ola uz ACE kao organsku fazu u udjelu od 20 %

U tablici 4.12 prikazani su optimalni uvjeti ekstrakcije dobiveni primjenom Derringerove funkcije. Dobiveni optimalni uvjeti za ekstrakciju antocijanina i flavonola jednaki su dok se oni za flavan-3-ole razlikuju. Provedeno je i optimiranje metode uz primjenu etanola kao ekstrakcijskog otapala jer je on dozvoljeno organsko otapalo za primjenu u kozmetičkoj, prehrambenoj te farmaceutskoj industriji.

Provođenjem eksperimenata pri dobivenim optimalnim uvjetima te uspoređivanjem vrijednosti predviđenim modelom s onima eksperimentalno dobivenima, određena je prikladnost dobivenih jednadžbi za pojedine modele. Eksperimentalno dobivene vrijednosti i vrijednosti predviđene modelom međusobno se razlikuju za manje od 1,50 % čime je potvrđeno da su dobiveni modeli pouzdani i precizni.

Tablica 4.10. Optimalni uvjeti ekstrakcije UAE, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

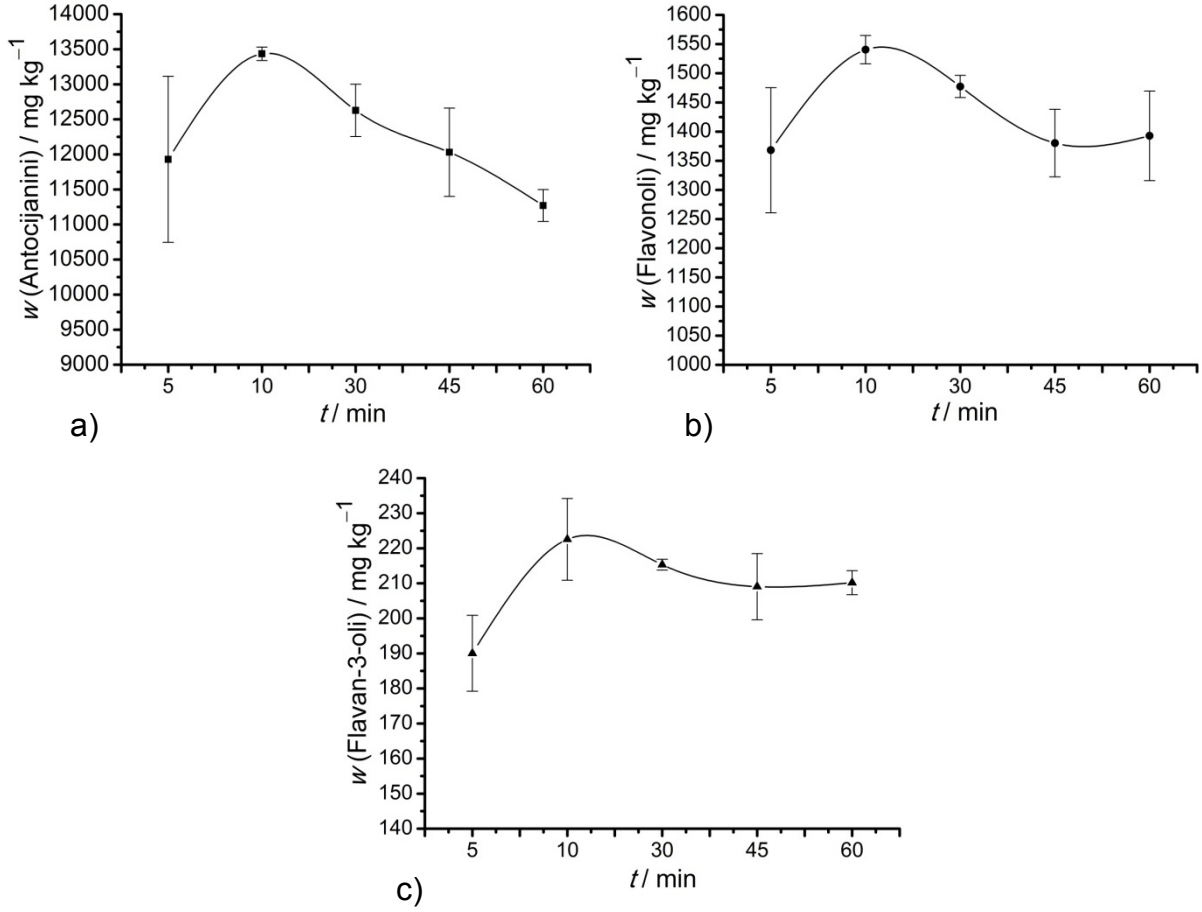
Skupina	**Organska faza**	**φ (Organska faza) / %**	**ϑ / °C**	***t* / min**	**Predviđena vrijednost / mg kg^{-1}**	**Dobivena vrijednost (*n*=3) / mg kg^{-1}**
Antocijanini	ACN	20	50	15	42098,35	41972,02±35,21
Flavonoli	ACN	20	50	15	3171,10	3205,29±11,18
Flavan-3-oli	EtOH	20	70	15	225,45	221,47±9,39
Konačni uvjeti	**ACN**	**20**	**50**	**15**		
Antocijanini					42098,35	42412,35±98,72
Flavonoli					3171,10	3209,04±23,21
Flavan-3-oli					211,72	213,28±3,88
Konačni uvjeti	**EtOH**	**20**	**70**	**15**		
Antocijanini					40461,20	40409,62±102,36
Flavonoli					3131,12	3176,23±25,18
Flavan-3-oli					225,45	230,7±2,05

4.2.4. Optimiranje mikrovalovima potpomognute ekstrakcije

S obzirom na vrlo malu učinkovitost ekstrakcijskih metoda SLE i UAE primjenom acetona kao organske faze te nastanka novih spojeva, u ovom nizu pokusa kao organske faze u ekstrakcijskom otapalu korišteni su samo etanol i acetonitril. Optimalan raspon trajanja ekstrakcije kao i omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala određeni su metodom izučavanja učinka jednog faktora na konačni rezultat dok su ostali faktori stalni.

4.2.4.1. Odabir raspona vremena ekstrakcija

Trajanje postupka ekstrakcije važan je faktor koji značajno utječe na masene udjele flavonoida (Slika 4.11).

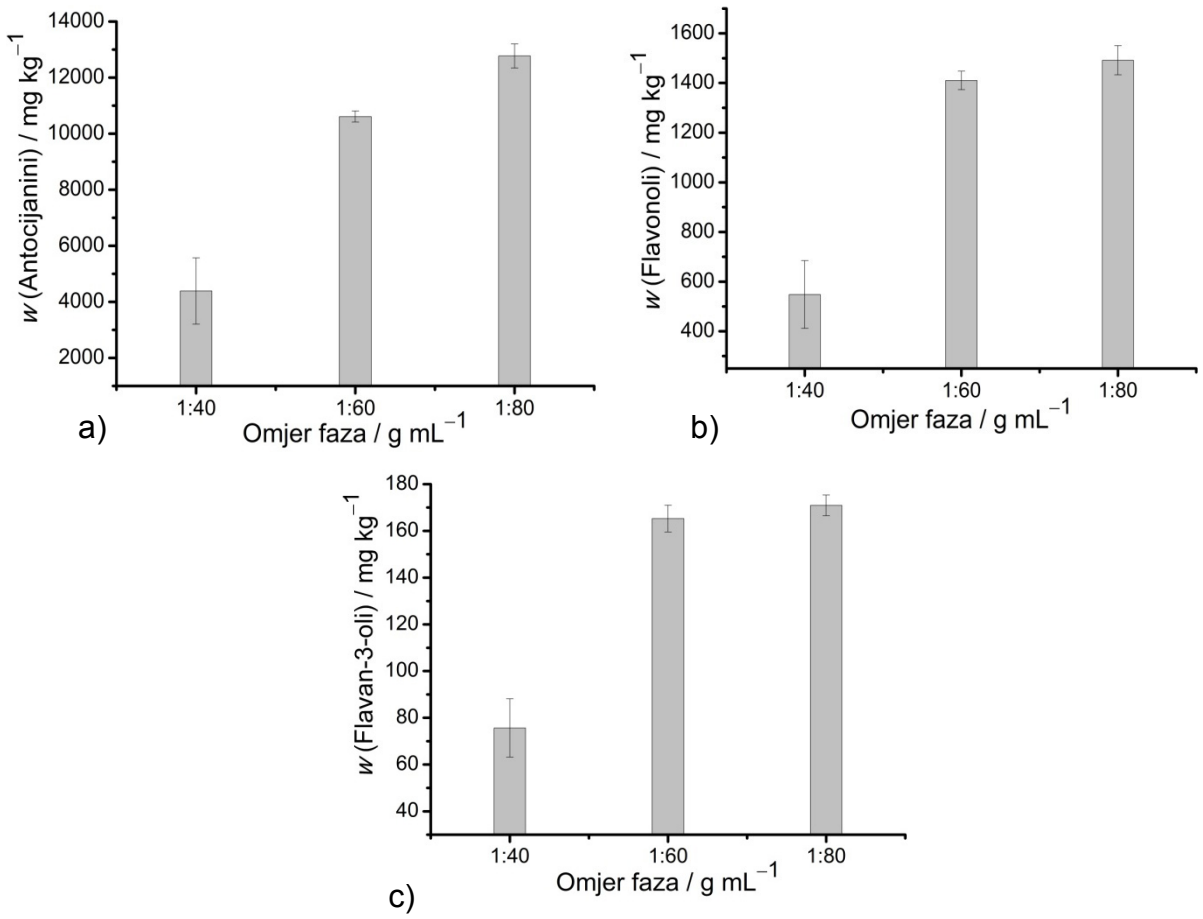


Slika 4.11. Utjecaj vremena ekstrakcije na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola

U periodu između 5 min i 10 min opaženo je značajno povećanje masenih udjela svih ispitanih skupina flavonoida. U vremenskom periodu između 10 min i 60 min smanjenje masenih udjela flavonola i flavan-3-ola je malo, dok je smanjenje masenog udjela antocijanina izrazito veliko posebice nakon 30 min, a što se može pripisati njihovoj termičkoj nestabilnosti. Za potrebe provedbe optimiranja metode eksperimentalnim dizajnom korišten je vremenski raspon od 5 min do 15 min.

4.2.4.2. Utjecaj omjera mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala

Na slici 4.12 prikazana je ovisnost masenih udjela antocijanina, flavonola i flavan-3-ola o omjeru faza.



Slika 4.12. Ovisnost masenog udjela a) antocijanina, b) flavonola i 3) flavan-3-ola o omjeru mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala

Kao i u slučaju metoda SLE i UAE povećanje omjera faza dovodi do značajnog povećanja masenih udjela ispitanih flavonoida te su oni najveći u ekstraktima dobivenim u uvjetima kada je omjer faza bio 1:80 g mL^{-1}.

4.2.4.3. Optimiranje metode MAE primjenom BBD

Kao ekstrakcijski faktori korišteni su vrsta organske faze i njezin volumni udio u ekstrakcijskom otapalu, vrijeme te temperatura ekstrakcije (Tablica 3.12). U sklopu postupka optimiranja primjenom BBD provedeno je 30 pokusa (Tablica 3.13) čiji su rezultati obrađeni, a pri čemu je utvrđeno da se dobiveni maseni udjeli antocijanina, flavonola i flavan-3-ola najbolje mogu opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom. U tablici 4.13 prikazani su dobiveni koeficijenti za pojedine članove kvadratne jednadžbe zajedno s parametrima provedene analize varijance.

Za razliku od prethodne dvije metode, SLE i UAE, vrsta organske faze u ekstrakcijskom otapalu statistički je značajan faktor samo u slučaju flavan-3-ola. Udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu faktor je koji značajno utječe na masene udjele

antocijanina i flavonola dok mu je učinak na maseni udio flavan-3-ola zanemariv. Najbolja organska faza za ekstrakciju antocijanina i flavan-3-ola je etanol, dok su najveći maseni udjeli flavonola opaženi u ekstraktima dobivenim s acetonitrilom kao organskom fazom. Ovakav rezultat može biti posljedica različitih dielektričnih svojstava vodenih otopina etanola i acetonitrila te različitog položaja ispitanih skupina flavonoida unutar samih stanica kožica bobica grožđa. Antocijanini za razliku od flavonola osim u vakuolama mogu biti sadržani i u antocijaninskim inkluzijskim vakuolama smještenim u staničnim vakuolama pa je za njihovo izlučivanje iz stanice potrebno razgraditi dvije lipidne membrane kao i staničnu stijenku. Flavan-3-oli mogu biti sastavni dio staničnih stijenki pa je prilikom njihove ekstrakcije potrebno u potpunosti razoriti strukturu stanične stijenke. Učinkovitost određenog otapala tijekom provedbe MAE određena je njegovim faktorom rasipanja (tan δ). Veća vrijednost ovog faktora ukazuje na bolju sposobnost prevođenja mikrovalne energije u toplinu. Općenito, etanol i njegove vodene otopine imaju značajno veće vrijednosti faktora rasipanja u odnosu na acetonitril i njegove vodene otopine pa stoga i učinkovitije prevodi mikrovalnu energiju u toplinu.[180,186] Lokalno povišenje temperature pozitivno utječe na denaturaciju i razgradnju staničnih membrana kao i staničnih stijenki što u konačnici može dovesti do olakšanja ekstrakcije antocijanina i flavan-3-ola primjenom vodenih otopina etanola.

Temperatura ekstrakcije ima značajan učinak na učinkovitost ekstrakcije svih ispitanih skupina flavonoida. Najveći maseni udjeli antocijanina i flavonola određeni su u ekstraktima dobivenim pri nižim temperaturama. Ovakvo opažanje može biti posljedica njihove termičke nestabilnosti pri temperaturama višim od 50 °C, ali i činjenice da prilikom primjene mikrovalnog zračenja unutar pora čvrstog uzorka koje su natopljene ekstrakcijskim otapalom lokalno mogu biti i značajno više temperature od onih u okolnom otapalu. Povišenje temperature dovodi do povećanja masenog udjela flavan-3-ola.

Tablica 4.13. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele

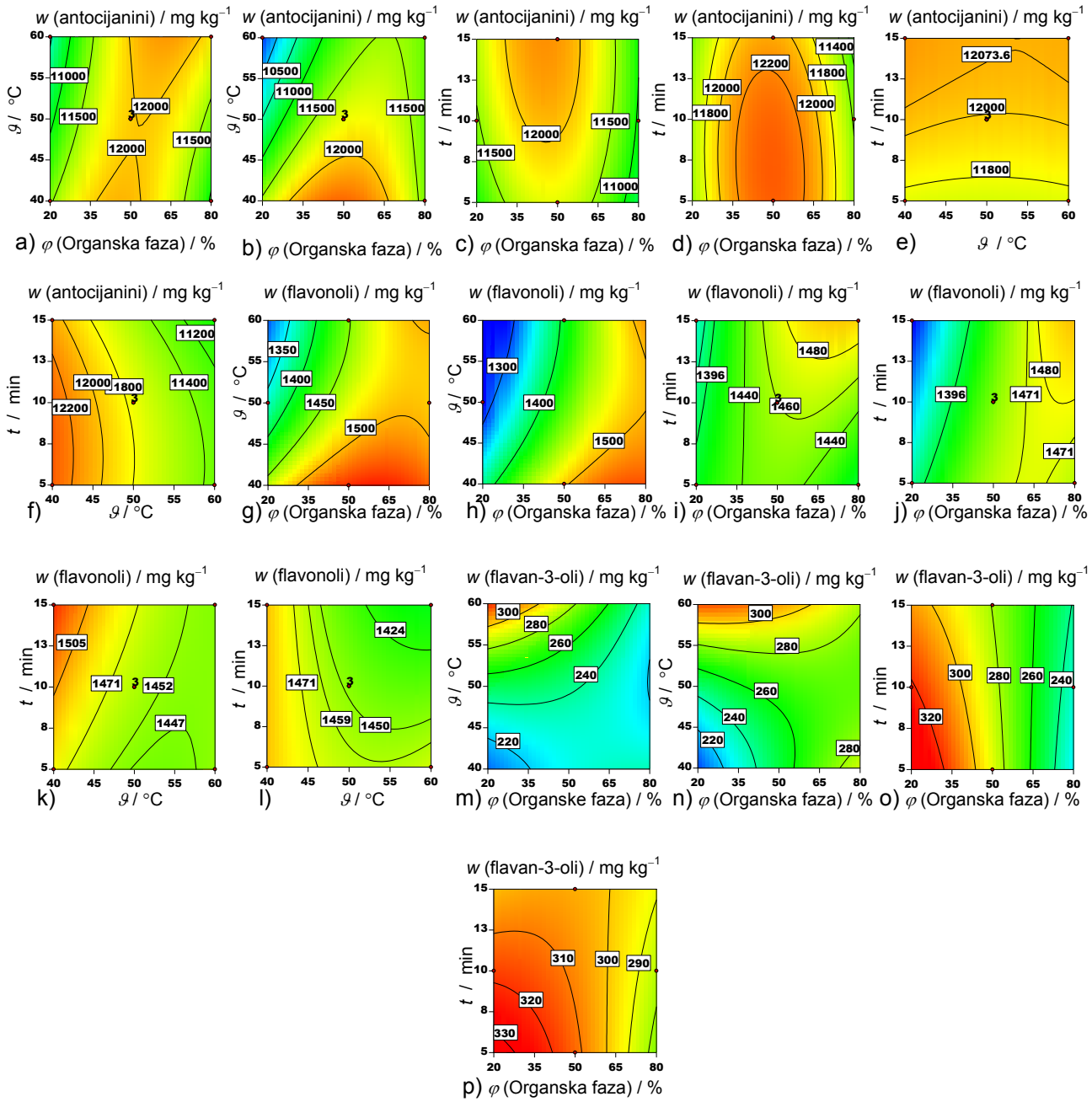
Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		0,0002		0,0004
Neprikladnost modela		0,2654		0,8269		0,6455
Odsječak	11872,21		1453,65		254,40	
A:Udio organske faze	–310,37	0,0105	53,07	0,0018	–1,13	0,8530
B:Temperatura	–263,62	0,0169	–29,11	0,0433	27,87	0,0001
C:Vrijeme	25,70	0,7954	–0,97	0,9431	–4,46	0,4416
D:Otapalo	–115,29	0,1238	–6,02	0,5432	12,03	0,0093
AB	486,32	0,0049	36,31	0,0838	–30,01	0,0022
AC	–59,36	0,6898	34,80	0,0997	12,10	0,1677
AD	75,96	0,4822	23,15	0,1218	14,04	0,0313
BC	–15,07	0,9086	–15,29	0,4023		
BD	–438,88	0,0233				
CD	–167,94	0,1062	–14,33	0,2989		
A^2	–843,68	<0,0001	–44,45	0,0353	–7,52	0,3736
B^2	41,63	0,7768	19,18	0,3457	13,68	0,1208
C^2	–101,92	0,4909				
R^2	0,8626		0,8272		0,7642	
Prilagođeni *R^2*	0,8351		0,8097		0,7462	
Preciznost	10,73		7,89		9,01	

Grafovi kontura za najznačajnije interakcijske učinke pojedinih ekstrakcijskih faktora prikazani su na slici 4.13. Povećanjem volumnog udjela organske faze do 50 %, bez obzira da li je to acetonitril ili etanol, uz istovremeno sniženje temperature dolazi do značajnog povećanja masenog udjela antocijanina (Slika 4.13 a, b). Sličan trend slijede i flavonoli, ali je za postizanje većih masenih udjela potrebno povećati volumni udio organske faze do 65 % (Slika 4.13 g, h). Sniženje volumnog udjela organske faze uz istovremeno povišenje temperature ima pozitivan učinak na učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola (Slika 4.13 m, n). Međudjelovanje između volumnog udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu i vremena ekstrakcije ima značajan učinak na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Povećanje volumnog udjela do 50 % i 65 % uz istovremeni produžetak trajanja ekstrakcije uzrokuje povećanje masenog udjela antocijanina odnosno flavonola (Slika 4.13 c, d, i, j). Maseni udio flavan-3-ola povećava se sa smanjivanjem volumnog udjela organske faze i skraćivanjem vremena ekstrakcije (Slika 4.13 o, p). Za postizanje većih masenih udjela antocijanina i flavonola ekstrakciju je potrebno provoditi pri niskim temperaturama (40 °C) u

trajanju od 10 min odnosno 15 min (Slika 4.13 e, f, k, l). Ovakvo opažanje može se objasniti termičkom nestabilnošću ovih flavonoida. Bez obzira na pozitivan učinak povišene temperature na viskoznost otapala i povećanje brzine difuzije, visoke temperature tijekom primjene mikrovalne energije imaju izrazito negativan učinak na masene udjele antocijanina i flavonola, a što može biti posljedica lokalnog povišenja temperature.

Dobiveni optimalni uvjeti ekstrakcije primjenom Derringerove funkcije prikazani su u tablici 4.14. Za pojedine skupine flavonoida optimalni uvjeti ekstrakcije značajno se razlikuju. Prilikom optimiranja metode za sve tri skupine flavonoida potrebno je provesti značajne kompromise pa je stoga i za očekivati da su maseni udjeli pojedinih flavonoida u slučaju primjene konačnih uvjeta značajno manji nego u slučaju primjene optimalnih uvjeta dobivenih za pojedinačne slučajeve.

Usporedbom modelima predviđenih vrijednosti s onima eksperimentalno dobivenim potvrđena je točnost i prikladnost dobivenih modela.



Slika 4.13. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka na masene udjele a) antocijanina uz ACN kao organsku fazu, b) antocijanina uz EtOH kao organsku fazu, uz vrijeme ekstrakcije od 10 min; c) antocijanina uz ACN kao organsku fazu, d) antocijanina uz EtOH kao organsku fazu pri 50 °C; e) antocijanina uz ACN kao organsku fazu, f) antocijanina uz EtOH kao organsku fazu u udjelu od 50 %; g) flavonola uz ACN kao organsku fazu, h) flavonola uz EtOH kao organsku fazu uz vrijeme trajanja ekstrakcije od 15 min; i) flavonola uz ACN kao organsku fazu, j) flavonola uz EtOH kao organsku fazu pri 50 °C; k) flavonola uz ACN kao organsku fazu, l) flavonola uz EtOH kao organsku fazu u udjelu od 50 %; m) flavan-3-ola uz ACN kao organsku fazu, n) flavan-3-ola uz EtOH kao organsku fazu uz vrijeme ekstrakcije od 10 min; o) flavan-3-ola uz ACN kao organsku fazu, p) flavan-3-ola uz EtOH kao organsku fazu pri 60 °C

Tablica 4.14. Optimalni uvjeti ekstrakcije MAE, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

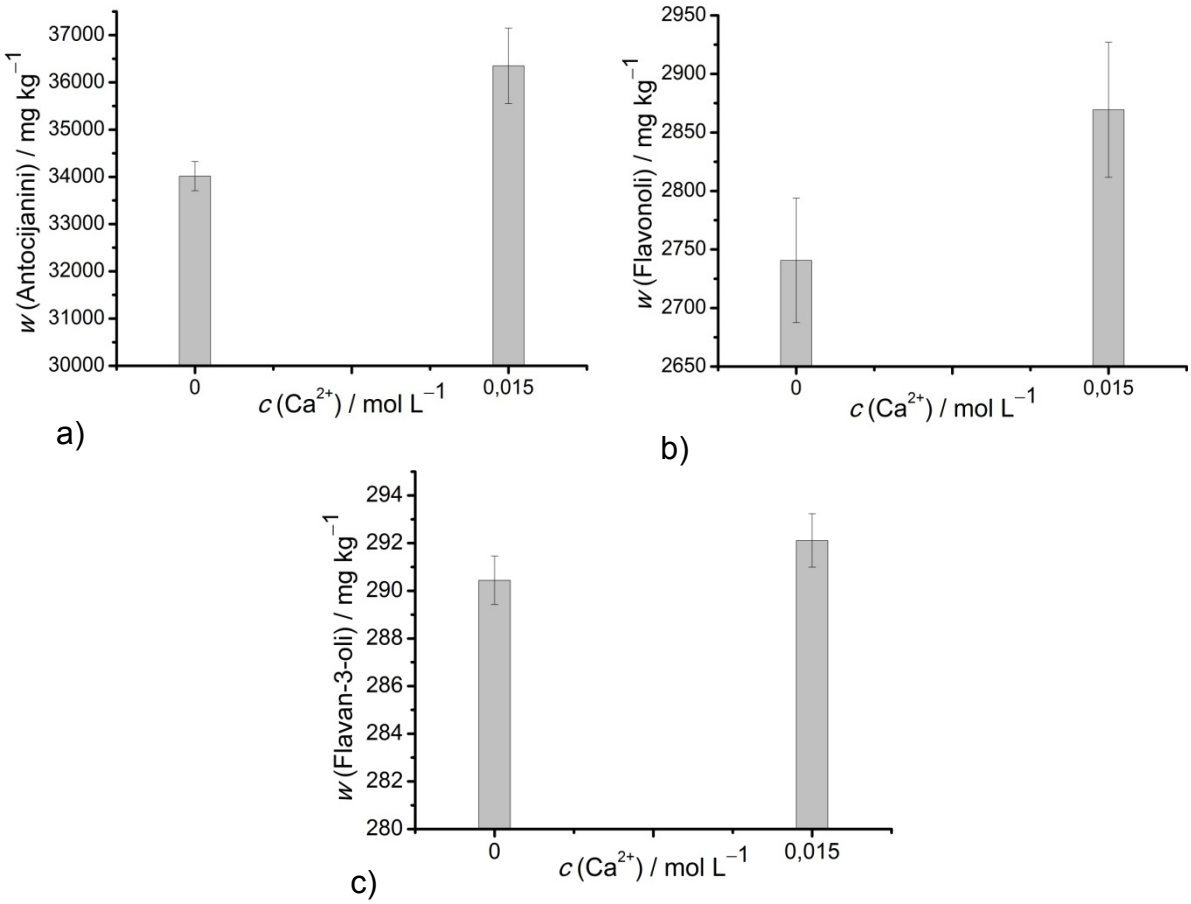
Skupina	Organska faza	φ (Organska faza) / %	ϑ / °C	t / min	Predviđena vrijednost / mg kg^{-1}	Dobivena vrijednost (n=3) / mg kg^{-1}
Antocijanini	EtOH	50	40	7	12349,40	12331,64±21,14
Flavonoli	ACN	60	40	15	1564,15	1557,32±19,29
Flavan-3-oli	EtOH	20	60	5	333,09	228,20±8,66
Konačni uvjeti	**EtOH**	**60**	**40**	**5**		
Antocijanini					12228,08	12545,19±162,51
Flavonoli					1514,27	1514,06±20,70
Flavan-3-oli					270,26	266,83±24,47

4.2.5. Optimiranje enzimima potpomognute ekstrakcije

Prije primjene BBD za optimiranje postupka EAE određen je utjecaj dodatka kalcijevih iona na enzimsku aktivnost, te su određeni optimalni rasponi trajanja inkubacije i masenih udjela enzima pomoću metode izučavanja učinka jednog faktora na konačni rezultat dok su ostali faktori stalni.

4.2.5.1. Utjecaj dodatka kalcijevih iona na enzimsku aktivnost

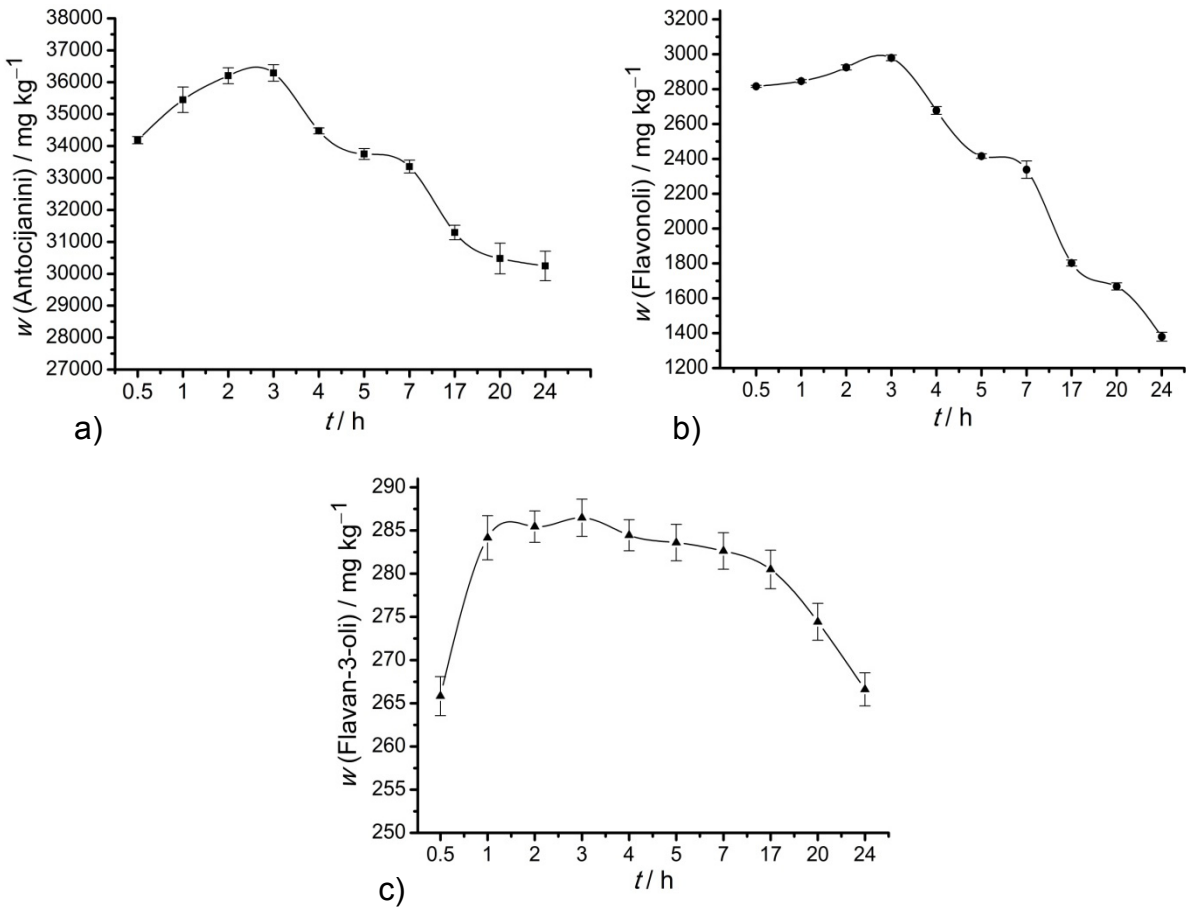
Nari i sur.[187] u svom istraživanju utvrdili su da dodatak kalcijevih iona množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1} značajno povećava aktivnost pektin metilesteraze, važnog enzima uključenog u razgradnju pektina staničnih stijenki. Na slici 4.14 prikazan je utjecaj dodatka kalcijevih iona na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Dodatak ovih iona otopini enzima značajno povećava masene udjele ispitanih skupina flavonoida, a posebice antocijanina i flavonola. U svim daljnjim pokusima korištene su otopine enzima koje su sadržavale i kalcijeve ione množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1}.



Slika 4.14. Utjecaj dodatka kalcijevih iona u otopinu enzima na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola, c) flavan-3-ola

4.2.5.2. Određivanje optimalnog raspona trajanja inkubacije

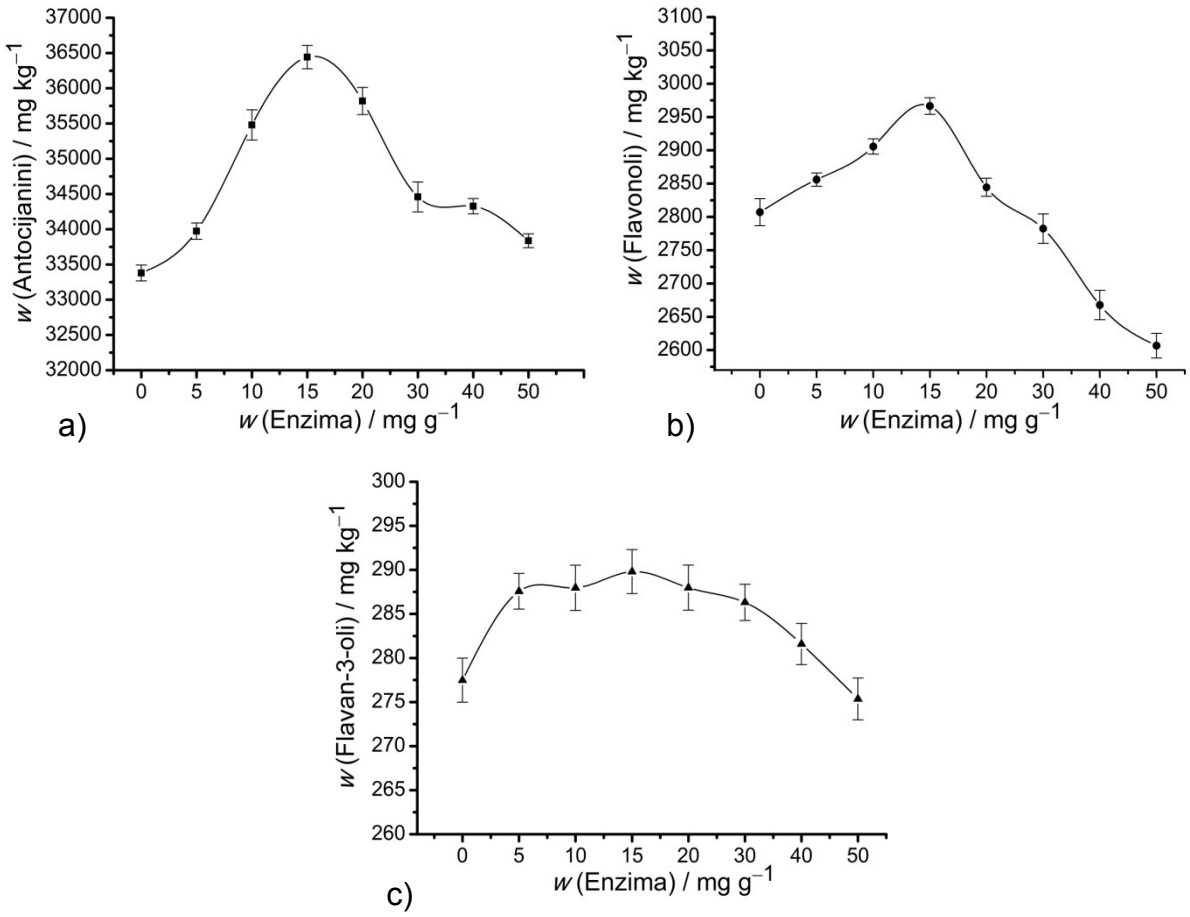
Ovisnost masenih udjela antocijanina, flavonola i flavan-3-ola o vremenu inkubacije prikazana je na slici 4.15. Značajno povećanje masenog udjela antocijanina opaženo je tijekom perioda inkubacije između 1 h i 3 h. Sličan trend slijede flavonoli i flavan-3-oli. Prolongirana inkubacija dovodi do značajnog smanjenja masenih udjela antocijanina i flavonola dok maseni udio flavan-3-ola tijekom čitavog perioda ostaje gotovo stalan do 17 h inkubacije, a nakon čega se značajno smanjuje. Ovakvo opažanje može biti povezano s nekim enzimskim aktivnostima, a posebice aktivnosti glikozidaza enzimskog pripravka Lallzyme EX-V, a koje nisu navedene u specifikaciji proizvođača. Ovi enzimi mogu dovesti do cijepanja glikozidnih veza u molekulama antocijanina i flavonol-3-*O*-glikozida, a pri čemu nastaju antocijanidini odnosno aglikoni flavonola. U slučaju produžene inkubacije, duže od 7 h, opažen je porast masenih udjela aglikona flavonola, a posebice kvercetina. Temeljem dobivenih podataka u eksperimentalnom dizajnu korišten je vremenski period inkubacije između 1 h i 3 h.



Slika 4.15. Ovisnost masenog udjela a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola o vremenu inkubacije

4.2.5.3. Određivanje optimalnog raspona masenih udjela enzima

Poznato je da velika količina fenola može inhibirati aktivnost pektinaza. Sorta 'Regent' sadrži izrazito velike masene udjele antocijanina i flavonola pa je stoga neophodno odrediti optimalan raspon masenih udjela enzima. Utjecaj različitih masenih udjela enzima na masene udjele flavonoida prikazan je na slici 4.16. Dodatak male količine enzimskog pripravka dovodi do značajnog povećanja masenih udjela svih ispitanih skupina flavonoida. Maksimalni maseni udio antocijanina dobiven je primjenom masenog udjela pripravka u rasponu od 10 mg g^{-1} do 20 mg g^{-1}. Sličan je trend opažen i u slučaju flavonola, dok maseni udio enzimskog pripravka ima manje izraženi učinak na učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola.



Slika 4.16. Utjecaj masenog udjela enzimskog pripravka na masene udjele a) antocijanina, b) flavonola i c) flavan-3-ola

4.2.5.4. Optimiranje metode EAE primjenom BBD

Temeljem rezultata provedenih u prethodnim pokusima i poznatih svojstava pektinaza izoliranih iz *A. niger*, odabrane su razine slijedećih eksperimentalnih faktora: masenog udjela enzimskog pripravka, pH-vrijednosti te vremena i temperature inkubacije (Tablica 3.16). Tijekom postupka optimiranja provedeno je 27 pokusa za svaki enzimski pripravak, Lallzyme EX-V, Lallzyme HC, Endozym Rouge te Endozym Contact Pelliculaire (Tablica 3.17). Nakon provedenih pokusa dobivene vrijednosti masenih udjela statistički su obrađene te je utvrđeno da se one za sve skupine flavonoida kao i za sve korištene enzimske pripravke najbolje mogu opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom. Vrijednosti za pojedine koeficijente polinomne jednadžbe drugog reda i regresijske koeficijente odziva te parametre ANOVA za dobivene modele za pripravke Lallzyme EX-V, Lallzyme HC, Endozym Contact Pelliculaire i Endozym Rouge prikazani su u tablicama 4.15 do 4.18. Za sve ispitane slučajeve

p-vrijednosti modela manje su od 0,0001, dok su *p*-vrijednosti neprikladnosti modela veće od 0,2300 što ukazuje da su modeli izrazito statistički značajni. Bez obzira na uporabljeni pripravak i skupinu flavonoida, najznačajniji eksperimentalni faktor je pH-vrijednost. Najveći maseni udjeli pojedinih skupina flavonoida dobiveni su pri niskim pH-vrijednostima. Ovakvo opažanje može se objasniti većom stabilnošću flavonoida kao i većom aktivnošću pektinaza pri nižim pH-vrijednostima.[140,141] Temperatura inkubacije važan je faktor, a čiji utjecaj prvenstveno ovisi o primijenjenom enzimskom pripravku, ali i o prirodi analita. Povišenje temperature u slučaju uporabe pripravaka Lallzyme EX-V i Endozym Rouge dovodi do značajnog povećanja masenih udjela antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Najveći maseni udjeli svih ispitanih skupina flavonoida uz primjenu Endozym Contact Pelliculaire dobiveni su pri nižim temperaturama. Ovakvo opažanje može biti posljedica različitih karakteristika pojedinih pektinaza sadržanih u određenom enzimskom pripravku.

Opaženo je da povećanje masenog udjela pojedinog enzimskog pripravka ne dovodi do skraćivanja vremena inkubacije, a što se može objasniti ovisnošću brzine enzimske reakcije o količini supstrata.

Vrijeme inkubacije važan je faktor koji značajno utječe na masene udjele antocijanina, flavonola te flavan-3-ola bez obzira na primijenjeni enzimski pripravak. Vrijeme inkubacije potrebno za dobivanje maksimalnih masenih udjela analita uvelike ovisi o enzimskom pripravku, ali i o samom analitu.

Tablica 4.15. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Lallzyme EX-V

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,7781		0,6034		0,7148
Odsječak	35310,86		3228,00		298,95	
A:Maseni udio enzima	73,97	0,7327	–51,18	0,0359	–1,64	0,2038
B:pH	–2522,82	<0,0001	–289,69	< 0,0001	–8,58	<0,0001
C:Temperatura	1008,92	0,0008	51,51	0,0454	1,77	0,1963
D:Vrijeme	–78,06	0,7685	–47,79	0,0868	1,69	0,2557
AB	568,65	0,1453			5,34	0,0832
AC					–3,98	0,3447
AD			–43,25	0,2743	2,07	0,0012
BC	–245,83	0,5148	–29,86	0,4448		
BD	–605,08	0,3755	–152,67	0,0518		
CD	469,15	0,3348				
A^2			–78,70	0,0430	6,29	0,0052
B^2	2797,05	<0,0001	143,92	0,0029	7,14	0,0026
C^2	–852,51	0,0206	–190,05	0,0001	7,38	0,0021
D^2	–311,03	0,4617	–5,83	0,2393	9,03	0,0005
R^2	0,9535		0,9513		0,9032	
Prilagođeni *R^2*	0,9141		0,9100		0,8865	
Preciznost	16,78		15,30		11,49	

Tablica 4.16. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Lallzyme HC

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,5146		0,4197		0,7440
Odsječak	33096,05		2737,67		317,00	
A:Maseni udio enzima	71,83	0,6582	–43,25	0,0250	–0,50	0,6786
B:pH	–2743,75	<0,0001	–206,08	< 0,0001	–8,71	<0,0001
C:Temperatura	–660,19	0,0026	–60,54	0,0072	2,02	0,1442
D:Vrijeme	–576,06	0,0064	–105,29	<0,0001	–0,14	0,9194
AB	-372,50	0,1984	–47,75	0,1319		
AC	270,75	0,3426	–216,00	0,0028		
AD	381,75	0,1882				
BC						
BD						
CD	–1965,91	0,0026			–8,17	0,0284
A^2			–30,08	0,2881	–3,80	0,0560
B^2	2800,91	<0,0001	264,67	<0,0001	3,59	0,0699
C^2	1462,87	0,0002	65,04	0,0549		
D^2	951,49	0,0053	85,29	0,0158		
R^2	0,9758		0,9625		0,8202	
Prilagođeni *R^2*	0,9553		0,9357		0,7461	
Preciznost	22,20		22,55		10,56	

Tablica 4.17. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Endozym Contact Pelliculaire

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,2894		0,3256		0,5817
Odsječak	33369,86		2816,87		311,13	
A:Maseni udio enzima	–9,42	0,9607	–1,04	0,9339	1,01	0,0853
B:pH	–2989,38	<0,0001	–177,25	< 0,0001	–5,48	<0,0001
C:Temperatura	801,07	0,0030	85,48	<0,0001	2,17	0,0070
D:Vrijeme	–328,83	0,0872	–9,17	0,4283	1,35	0,0179
AB	–403,00	0,2121			–0,83	0,3381
AC			59,86	0,0293	0,94	0,4009
AD	283,50	0,3721			1,31	0,1469
BC	5374,88	<0,0001	332,25	<0,0001	18,14	<0,0001
BD					0,73	0,3997
CD	448,75	0,1679	32,75	0,1154	2,15	0,0266
A^2	286,63	0,2975	36,07	0,0507	–2,76	0,0033
B^2	2324,27	<0,0001	259,96	<0,0001	2,25	0,0132
C^2					–3,17	0,0036
D^2	636,01	0,0366	66,62	0,0022		
R^2	0,9647		0,9743		0,9667	
Prilagođeni *R^2*	0,9324		0,9546		0,9235	
Preciznost	16,70		21,83		19,97	

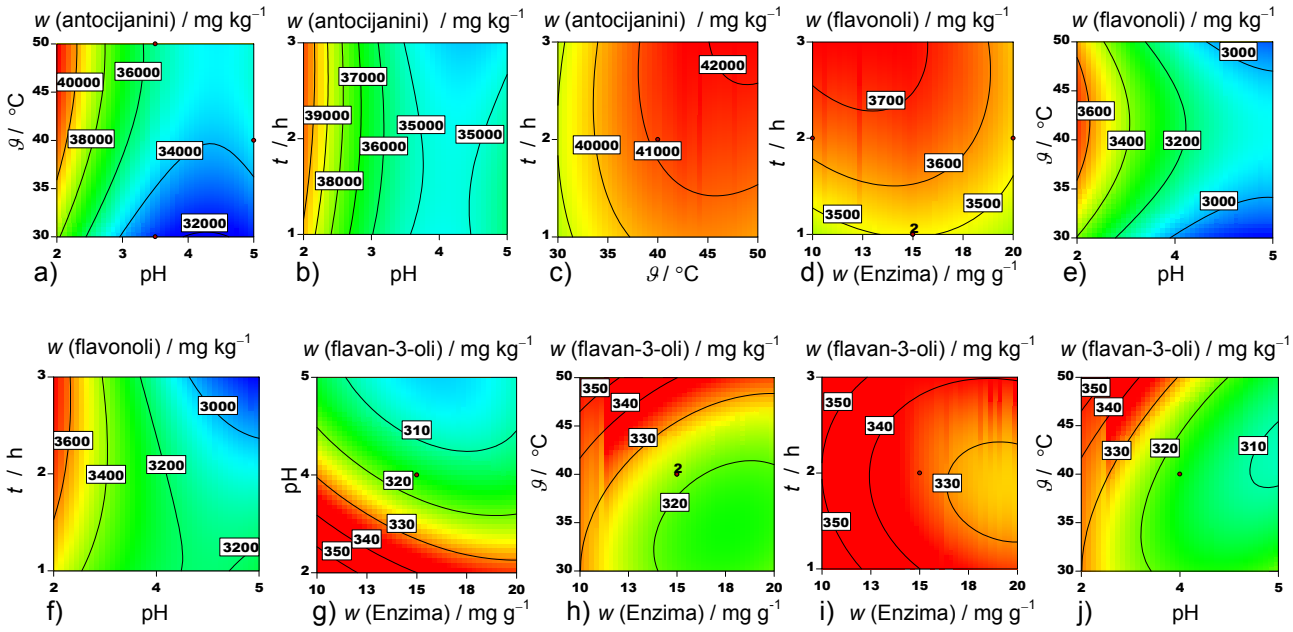
Tablica 4.18. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele za enzimski pripravak Endozym Rouge

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,6500		0,4956		0,2387
Odsječak	34272,01		2920,67		307,15	
A:Maseni udio enzima	151,89	0,4461	–35,39	0,0274	–1,34	0,0245
B:pH	–2865,11	<0,0001	–190,23	< 0,0001	–5,88	<0,0001
C:Temperatura	530,61	0,0167	45,89	0,0067	3,66	<0,0001
D:Vrijeme	–525,44	0,0153	–65,40	0,0005	–4,38	<0,0001
AB			–16,75	0,4838	–0,66	0,4395
AC	427,42	0,2855			–2,29	0,0479
AD	471,50	0,1490	18,75	0,4342	1,09	0,2165
BC	–278,00	0,3822			0,86	0,3228
BD						
CD	–312,25	0,3083	–44,50	0,0777	–4,52	0,0002
A^2	–272,99	0,2975	–19,52	0,3671	–2,41	0,0047
B^2	2646,01	<0,0001	220,25	<0,0001	4,17	0,0001
C^2			–46,77	0,0433		
D^2	940,76	0,0041	34,25	0,1251	4,38	<0,0001
R^2	0,9615		0,9622		0,9663	
Prilagođeni *R^2*	0,9290		0,9303		0,9326	
Preciznost	17,37		17,31		19,91	

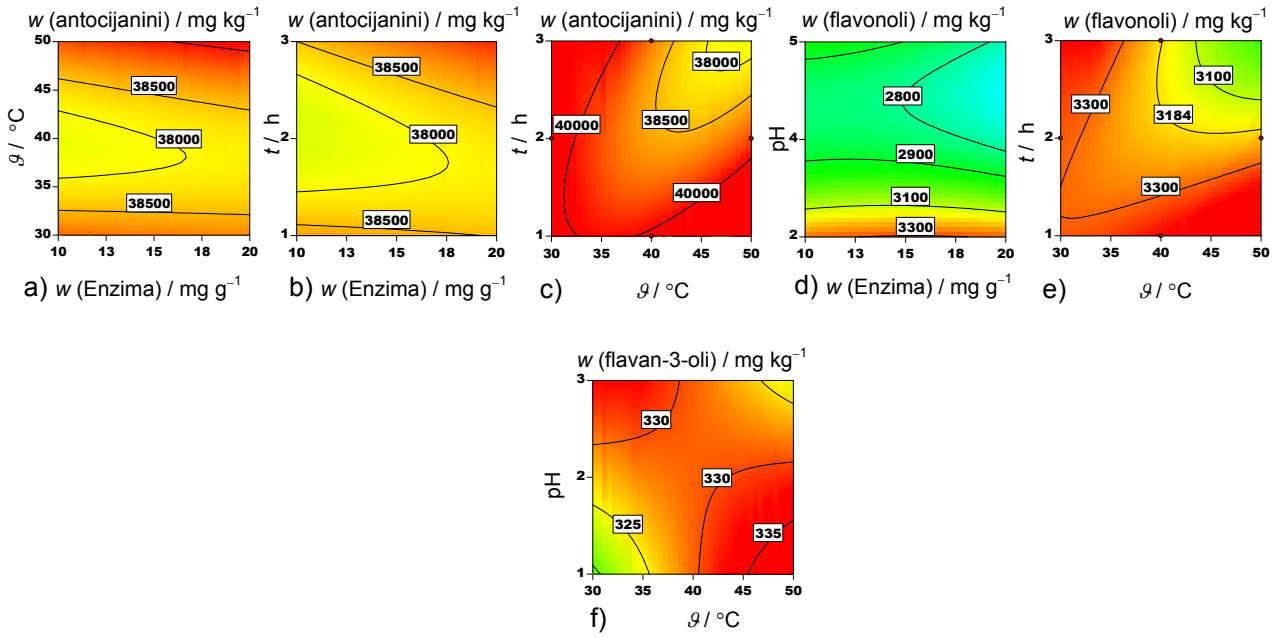
Pomoću grafova kontura određeni su najznačajniji interakcijski učinci pojedinih eksperimentalnih faktora za pojedine enzimske pripravke.

U slučaju uporabe pripravka EX-V maseni udio antocijanina funkcija je pH i temperature inkubacije, pH i vremena inkubacije te vremena i temperature inkubacije. Pri visokim temperaturama i niskim pH-vrijednostima postiže se najveća učinkovitost ekstrakcije antocijanina. Sniženje pH-vrijednosti uz istovremeni produžetak inkubacije dovode do značajnog povećanja masenog udjela ove skupine spojeva. Najveći maseni udjeli antocijanina određeni su u uvjetima produžene inkubacije pri visokoj temperaturi (Slika 4.17 a, b, c). Na učinkovitost ekstrakcije flavonola utječe interakcija između masenog udjela pripravka i vremena inkubacije, temperature inkubacije i masenog udjela pripravka te vremena inkubacije i pH-vrijednosti. Duže vrijeme inkubacije i manji maseni udio pripravka pozitivno utječu na učinkovitost ekstrakcije flavonola. Sniženjem pH-vrijednosti i povišenjem temperature odnosno povećanjem vremena inkubacije dolazi do značajnog porasta masenog udjela ove skupine spojeva (Slika 4.17 d, e, f). Pri niskim pH-vrijednostima i malim masenim udjelima pripravka opažena je najveća učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola. Povišenje temperature uz istovremeno smanjenje pH-vrijednosti dovodi do značajnog porasta masenog udjela flavan-3-ola (Slika 4.17 g, h, i).

Na maseni udio antocijanina prilikom primjene pripravka Lallzyme HC utječu međudjelovanja između pojedinih ekstrakcijskih faktora kao što su oni između masenog udjela pripravka i temperature inkubacije, masenog udjela pripravka i vremena inkubacije te vremena i temperature inkubacije (Slika 4.18 a, b, c). Povišenjem temperature inkubacije uz istovremeno skraćivanje vremena dolazi do značajnog porasta masenog udjela ove skupine flavonoida. Maseni udio flavonola funkcija je međudjelovanja između masenog udjela pripravka i pH-vrijednosti te između vremena i temperature inkubacije (Slika 4.18 d, e). Kao i u slučaju kod antocijanina, pri nižim temperaturama inkubacije potrebno je duže vrijeme da se postignu maksimalne vrijednosti masenog udjela ove skupine spojeva. Interakcija između pH-vrijednosti i vremena inkubacije značajno utječe na učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola. Pri niskim pH-vrijednostima i visokim temperaturama opaženi su najveći maseni udjeli ove skupine spojeva (Slika 4.18 f).



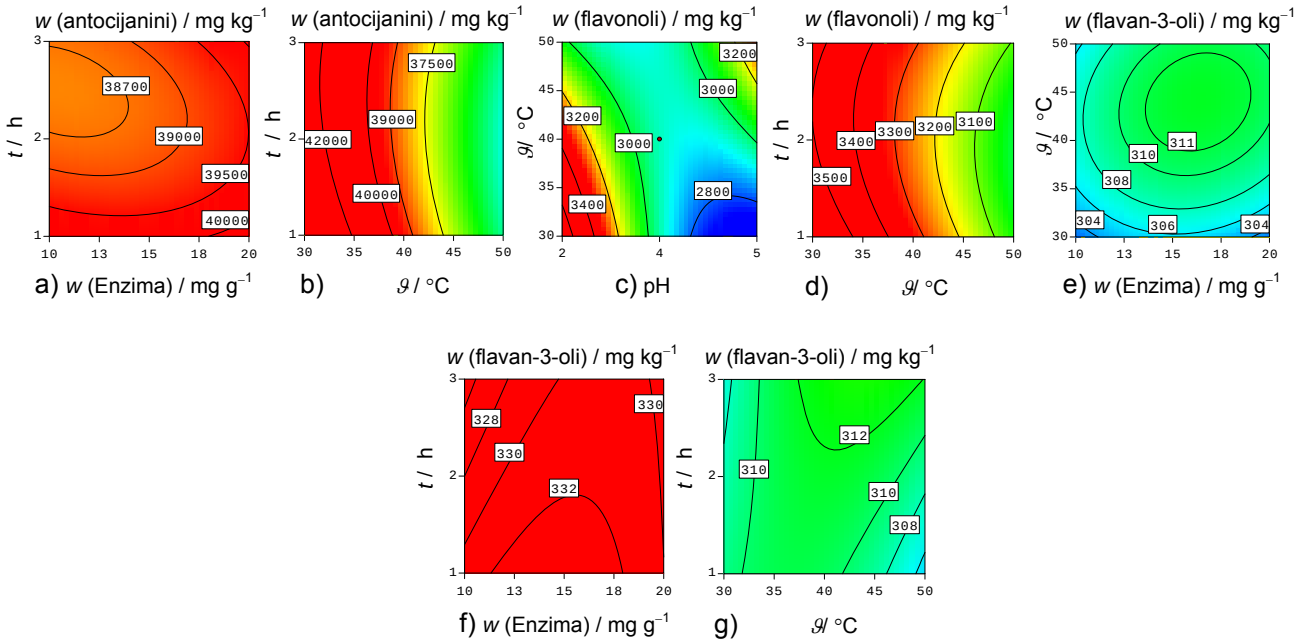
Slika 4.17. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka za pripravak Lallzyme EX-V na masene udjele a) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i vrijeme inkubacije od 3 h, b) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri 40 °C, c) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri pH 2, d) flavonola pri pH 2 i 40 °C, e) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i vrijeme inkubacije od 2 h, f) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri 40 °C, g) flavan-3-ola pri 50 °C i vremenu inkubacije od 1 h, h) flavan-3-ola pri pH 2 i vremenu inkubacije od 1 h, i) flavan-3-ola pri pH 2 i 50 °C, j) flavan-3-ola uz maseni udio enzima od 10 mg g^{-1} i vrijeme inkubacije od 1 h



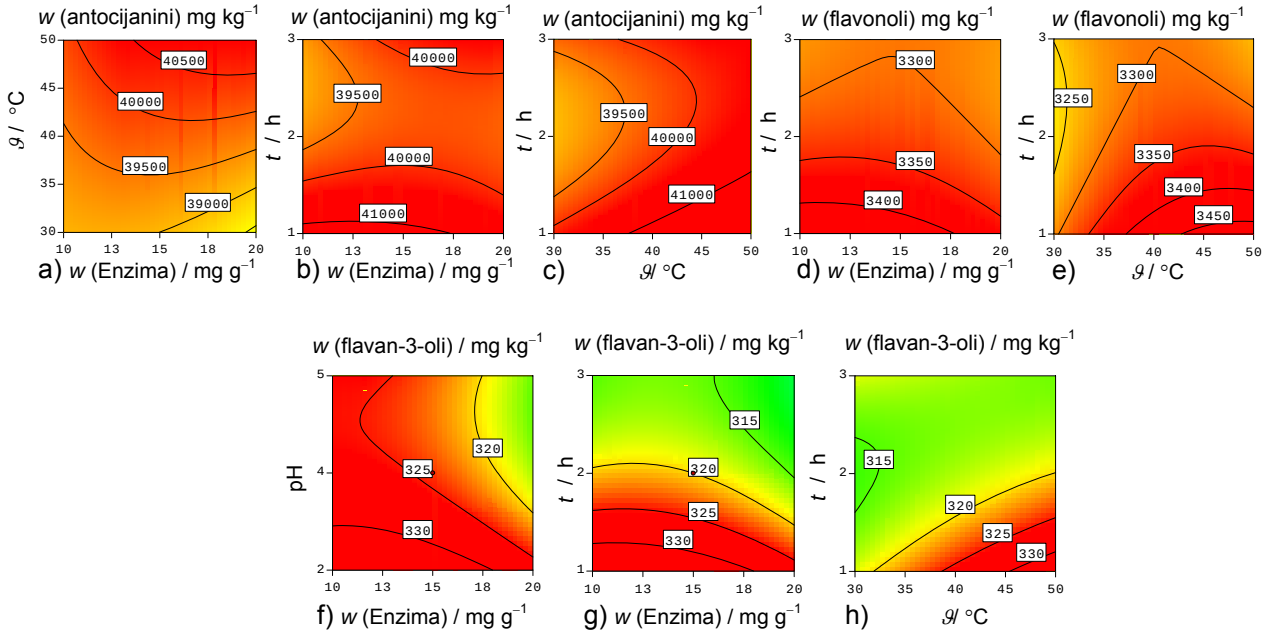
Slika 4.18. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka za pripravak Lallzyme HC na masene udjele a) antocijanina pri pH 2 i vremenu inkubacije od 3 h, b) antocijanina pri pH 2 i 35 °C, c) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri pH 2, d) flavonola pri 40 °C i vremenu inkubacije od 1 h, e) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i pH 2, f) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i vrijeme inkubacije od 1 h

Slika 4.19 prikazuje grafove kontura u slučaju primjene enzimskog pripravka Endozym Contact Pelliculaire. Na maseni udio antocijanina utječe interakcija između vremena inkubacije i masenog udjela pripravka te ona između vremena i temperature inkubacije (Slika 4.19 a, b). Maseni je udio flavonola funkcija međudjelovanja između ekstrakcijskih faktora kao što su temperatura inkubacije i pH-vrijednost te temperatura i vrijeme inkubacije. Pri nižim temperaturama i niskoj pH-vrijednosti učinkovitost ekstrakcije flavonola je maksimalna. Najveći maseni udjeli ove skupine flavonoida opaženi su pri niskim temperaturama i kraćim vremenima inkubacije (Slika 4.19 c, d). Međudjelovanje između masenog udjela enzimskog pripravka i temperature inkubacije, vremena inkubacije i masenog udjela pripravka te vremena i temperature inkubacije utječu na maseni udio flavan-3-ola (Slika 4.19 e, f, g). Povećanjem masenog udjela do 15 mg g^{-1} i vremena inkubacije dovodi do značajnog povećanja masenog udjela flavan-3-ola.

Na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola prilikom primjene enzimskog pripravka Endozym Rouge utječu različita međudjelovanja pojedinih eksperimentalnih faktora. Povišenje temperature uz istovremeno povećanje masenog udjela pripravka odnosno skraćenje vremena inkubacije dovodi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije antocijanina. Pri dužem vremenu inkubacije i manjem masenom udjelu enzimskog pripravka opaženo je povećanje masenog udjela ove skupine flavonoida (Slika 4.20 a, b, c). Kraće vrijeme inkubacije i manji maseni udio pripravka odnosno viša temperatura inkubacije imaju pozitivan učinak na učinkovitost ekstrakcije flavonola (Slika 4.20 d, e). Maseni je udio flavan-3-ola funkcija međudjelovanja između masenog udjela enzimskog pripravka i pH-vrijednosti odnosno vremena inkubacije te temperature i vremena inkubacije. Manji maseni udio pripravka pri niskom pH odnosno kraćem vremenu inkubacije pozitivno utječe na učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola. Pozitivan učinak na ekstrakciju ove skupine spojeva ima i povišenje temperature inkubacije uz istovremeno skraćivanje njezinog trajanja (Slika 4.20 f, g, h).



Slika 4.19. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka za pripravak Endozym Contact Pelliculaire na masene udjele a) antocijanina pri pH 2 i 40 °C, b) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri pH 2, c) flavonola uz maseni udio enzima od 10 mg g^{-1} i vrijeme inkubacije od 1 h, d) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i pH 2, e) flavan-3-ola pri pH 3,5 i vremenu inkubacije od 2 h, f) flavan-3-ola pri pH 2 i 30 °C, g) flavan-3-ola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i pH 3,5



Slika 4.20. Konturni prikazi najznačajnijih interakcijskih učinaka za pripravak Endozym Rouge na masene udjele a) antocijanina pri pH 2 i vremenu inkubacije od 2 h, b) antocijanina pri pH 2 i 40 °C, c) antocijanina uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri pH 2, d) flavonola pri pH 2 i 40 °C, e) flavonola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} i pH 2, f) flavan-3-ola pri 30 °C i vremenu inkubacije od 1 h, g) flavan-3-ola pri pH 2 i 50 °C, h) flavan-3-ola uz maseni udio enzima od 15 mg g^{-1} pri pH 2

Optimalni uvjeti ekstrakcije za pojedine skupine flavonoida za svaki pojedini enzimski pripravak prikazani su u tablici 4.19. Dobiveni optimalni uvjeti razlikuju se kako za pojedine enzimske pripravke tako i za pojedine skupine flavonoida, ali svima je zajedničko da je potrebno ekstrakciju provoditi pri niskim pH-vrijednostima. Razlike u dobivenim optimalnim vrijednostima za pojedinu skupinu flavonoida ekstrahiranu različitim enzimskim pripravcima posljedica su različitog sadržaja pojedinih enzima kao što su poligalakturonaza, pektin liaza te pektin metilesteraza u pojedinom enzimskom pripravku, ali i moguće prisutnosti drugih enzimskih aktivnosti koje nisu navedene u specifikacijama proizvođača za pripadni pripravak. Najveći maseni udjeli antocijanina, flavonola i flavan-3-ola dobiveni su primjenom pripravka Lallzyme EX-V. Bez obzira što pripravak Lallzyme HC ne sadrži celulaze i hemicelulaze on je učinkovitiji za ekstrakciju flavonoida iz kožica bobica grožđa od pripravaka koji sadrže te aktivnosti (Endozym Rouge i Endozym Contact Pelliculaire). Temeljem dobivenih rezultata kao i sadržaja pojedinih enzima u pojedinom pripravku, može se zaključiti da je za ekstrakciju flavonoida najvažnija aktivnost različitih pektinaza, a posebice one poligalakturonaze i pektin metilesteraze koje su u najvećim udjelima zastupljene u pripravku Lallzyme EX-V, dok pripravak Lallzyme HC sadrži nešto manje količine ovih enzima (Tablica 3.14).

Prikladnost dobivenih jednadžbi modela za optimalne vrijednosti odziva određena je provođenjem eksperimenata pri dobivenim optimalnim uvjetima te uspoređivanjem vrijednosti predviđenim modelom s onima eksperimentalno dobivenima. Dobivene su vrijednosti vrlo slične vrijednostima predviđenim modelom što ukazuje da su dobiveni modeli pouzdani i precizni.

Tablica 4.19. Optimalni uvjeti ekstrakcije EAE, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

Skupina	*w* (Enzima) / mg g^{-1}	pH	ϑ / °C	*t*/ h:min	Predviđena vrijednost / mg kg^{-1}	Dobivena vrijednost (*n*=3) / mg kg^{-1}
			EX-V			
Antocijanini	10,30	2,00	46	2:30	41966,08	41907,41±45,13
Flavonoli	12,00	2,00	43	2:45	3736,42	3811,98±21,03
Flavan-3-oli	12,00	2,00	49	1:15	347,45	341,30±9,65
Konačni uvjeti	**10,50**	**2,00**	**45**	**3:00**		
Antocijanini					41905,32	41753,21±76,22
Flavonoli					3726,47	3718,34±5,88
Flavan-3-oli					344,21	346±2,83
			HC			
Antocijanini	20,00	2,00	30	1:00	41224,10	41072,84±83,47
Flavonoli	12,00	2,00	45	1:00	3517,60	3498,47±38,14
Flavan-3-oli	15:00	2,20	50	3:00	335,28	329,35±4,71
Konačni uvjeti	11,20	2,00	31	2:45		
Antocijanini					41325,07	40949,21±19,82
Flavonoli					3395,74	3392,21±14,08
Flavan-3-oli					340,20	336,27±1,054
			Contact Pelliculaire			
Antocijanini	10,00	2,40	30	1:30	40642,60	40598,36±75,89
Flavonoli	12,00	2,00	33	2:10	3464,41	3482,39±19,32
Flavan-3-oli	16,00	2,10	33	2:30	326,82	330,71±5,86
Konačni uvjeti	11,50	2,10	36	2:10		
Antocijanini					39691,58	39518,32±179,32
Flavonoli					3339,79	3332,25±4,76
Flavan-3-oli					320,08	319,58±3,68
			Rouge			
Antocijanini	15,00	2,00	48	2:00	40425,83	40237,38±198,47
Flavonoli	18,00	2,00	42	1:15	3444,32	3452,92±15,78
Flavan-3-oli	14,00	2,00	45	1:00	329,08	320,46±6,36
Konačni uvjeti	14,00	2,00	39	1:25		
Antocijanini					40362,35	39886,25±174,87
Flavonoli					3381,52	3377,41±4,85
Flavan-3-oli					320,63	319,09±3,29

4.2.6. Optimiranje metode raspršenjem matrice uzorka kroz čvrstu fazu

4.2.6.1. Odabir čvrste faze

Kao čvrste faze najčešće se primjenjuju one koje kao nosač sadrže silicijev dioksid na koji su vezane različite skupine kao što su oktilna, oktadecilna te fenilna skupina. U posljednje vrijeme sve je veći broj istraživanja koja ukazuju na veliku učinkovitost primjene faza sačinjenih od fenilsilicijevog dioksida u razdvajanju različitih skupina fenola. Razdvajanje analita koji posjeduju aromatske prstenove s fenilnim skupinama čvrste faze temelji se na tvorbi π-π interakcija i disperzivnih hidrofobnih sila, pa su stoga takve faze učinkovitiji materijali za odvajanje fenolnih spojeva od uobičajenih faza koje se primjenjuju u sustavu obrnutih faza kao što su oktadecilsilicijev dioksid ili oktasilicijev dioksid.[188,189] Osim navedenih materijala za razdvajanje fenola vrlo se često koriste i različiti polimerni materijali sačinjeni od polistiren-divinilbenzena. U takvu skupinu ubrajaju se i različite Amberlite XAD smole. Prema uredbi Europske komisije, uporaba ovih čvrstih faza dozvoljena je u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.[190-192] Veliki nedostatak čvrstih faza s vezanim fazama te onih polimernih njihova je velika cijena. Morski pijesak vrlo je jeftin materijal koji ima široku primjenu u razaranju biljnih uzoraka. Premda se smatra da on nema ulogu otapala analita tijekom postupka miješanja, zbog svoje građe u vidu vrlo oštrih rubova i grube površine omogućava smicanje tijekom mehaničkog miješanja uzoraka i čvrste faze što ga čini vrlo učinkoviti sredstvom za razaranje stanica čvrstih uzoraka. Neka su istraživanja pokazala da je morski pijesak učinkovitija čvrsta faza za ekstrakciju fenola u usporedbi s različitim C_{18} materijalima.[193-195] Temeljem navedenih spoznaja pri optimiranju postupka MSPD kao čvrste faze korišteni su Sepra Phenyl, Amberlite XAD-2 te morski pijesak.

4.2.6.2. Optimiranje metode MSPD primjenom BBD

Prilikom postupka optimiranja metode MSPD kao ekstrakcijski faktori korišteni su vrsta čvrste faze, vrsta i volumni udio organske faze u eluacijskom otapalu, volumen eluacijskog otapala te omjer masa sorbensa i uzorka s razinama navedenim u tablici 3.19, a pri čemu je provedeno ukupno 90 pokusa. Statističkom obradom dobivenih masenih udjela antocijanina, flavonola i flavan-3-ola utvrđeno je da se oni najbolje mogu opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom, a čiji su koeficijenti zajedno s drugim parametrima određenim analizom varijance prikazani u tablici 4.20.

Tablica 4.20. Koeficijenti polinomne jednadžbe drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri ANOVA za dobivene modele

Član	Antocijanini		Flavonoli		Flavan-3-oli	
	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost	Koeficijent	*p*-vrijednost
Model		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Neprikladnost modela		0,5051		0,3275		0,3090
Odsječak	9187,87		1368,69		128,41	
A:Udio organske faze	214,58	0,1513	38,50	0,0320	–1,31	0,4109
B:Volumen	549,74	0,0005	109,51	< 0,0001	4,96	0,0019
C:Omjer	–685,93	<0,0001	–27,46	0,1171	–3,79	0,0207
D:Otapalo	381,67	0,0007	4,60	0,6613	3,95	0,0009
E[1]:Čvrsta faza	2237,67	< 0,0001	130,11	< 0,0001	25,43	< 0,0001
E[2]:Čvrsta faza	–4666,75	< 0,0001	–239,25	< 0,0001	–49,38	< 0,0001
AB						
AC	411,02	0,0534				
AD[1]	775,52	< 0,0001	96,58	< 0,0001	2,15	0,1809
AE[1]	70,09	0,0013	–5,32	< 0,0001	–0,47	0,0023
AE[2]	–727,73	0,0013	–102,39	< 0,0001	–6,82	0,0023
BC						
BD[1]					–1,93	0,2354
BE[1]	125,23	0,2595	–45,65	0,0280	–5,28	< 0,0001
BE[2]	–346,10		67,00	0,0280	10,65	< 0,0001
CD[1]			–13,21			
CE[1]	613,00	< 0,0001	37,01	0,0252	5,92	0,0093
CE[2]	–1333,85	< 0,0001	–69,66	0,0252	–6,36	0,0093
DE[1]	–482,74	< 0,0001	–11,68	< 0,0001	–2,20	< 0,0001
DE[2]	913,01	< 0,0001	92,42	< 0,0001	8,87	< 0,0001
A^2	–1210,99	< 0,0001	–199,48	< 0,0001	–10,92	<0,0001
B^2	–361,33	0,1036			–4,44	0,0621
C^2	280,14	0,2052				
R^2	0,9425		0,9392		0,9368	
Prilagođeni *R^2*	0,9266		0,9035		0,9205	
Preciznost	27,44		21,60		26,09	

Najznačajniji ekstrakcijski faktor koji utječe na masene udjele svih ispitanih skupina spojeva vrsta je primijenjene čvrste faze. Najučinkovitija čvrsta faza je fenilsilicijev dioksid koja tijekom primjene u postupku MSPD ima dvojaku ulogu. On služi kao abraziv za razaranje strukture staničnih stijenki kožica bobica grožđa, ali ima i ulogu svojevrsnog otapala za flavonoide. Vezana faza fenil i flavonoidi posjeduju aromatske prstenove u svojim

strukturama te osim uobičajenih hidrofobnih interakcija mogu tvoriti i snažne π-π interakcije, a što u konačnici ima za posljedicu veliku učinkovitost tijekom primjene postupka MSPD. Maseni udjeli antocijanina, flavonola te flavan-3-ola dobiveni primjenom morskog pijeska kao čvrste faze nešto su manji u usporedbi s onima dobivenima primjenom fenilsilicijevog dioksida. S obzirom na svoju strukturu pijesak je vrlo učinkovit u razaranju struktura staničnih stijenki kožica grožđa. Sveobuhvatno razaranje staničnih stijenki za posljedicu ima olakšanje pristupa eluacijskog otapala sastavnicama stanica pa time i povećanje ekstrakcije. Dobiveni maseni udjeli pojedinih skupina flavonoida primjenom XAD-2 kao čvrste faze značajno su manji u usporedbi s onima dobivenim primjenom fenilsilicijevog dioksida i pijeska. Najveće razlike opažene su u slučaju antocijanina dok su najmanje opažene u masenim udjelima flavonola. Takav rezultat je u skladu s ranije provedenim istraživanjima u kojima je utvrđeno da ovakva vrsta čvrste faze ima najveći afinitet prema flavonolima te izrazito mali afinitet prema antocijaninima, dok je afinitet prema flavan-3-olima umjeren.[196,197]

Odabir eluacijskog otapala ima važnu ulogu tijekom postupka MSPD jer on tijekom postupka MSPD ima ulogu uobičajene pokretne faze u kromatografskom sustavu, ali ima i ulogu otapala željenih analita. Vrsta organske faze sadržane u eluacijskom otapalu važan je ekstrakcijski faktor koji značajno utječe na masene udjele pojedinih skupina flavonoida. Antocijanini su najzastupljenija skupina flavonoida u kožicama bobica grožđa te je za njihovu najučinkovitiju ekstrakciju primjenom MSPD potrebno koristiti etanol. Smatra se da metanol za razliku od acetonitrila pojačava π-π interakcije između antocijanina i fenil vezane faze, a što za posljedicu ima njihovo bolje razdvajanje. S obzirom da etanol i metanol imaju vrlo slična fizikalno-kemijska svojstva navedeno svojstvo metanola vjerojatno se može primijeniti i na etanol.[198] Za postizanje maksimalnih masenih udjela flavonola i flavan-3-ola potrebno je primijeniti eluacijsko otapalo koje sadrži acetonitril.

Volumen je eluacijskog otapala važan faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Volumen eluacijskog otapala ovisi o masi uporabljenog sorbensa te o masenom udjelu analita. Primjenom većih volumena eluacijskog otapala osigurava se potpuna eluacija željenih analita.

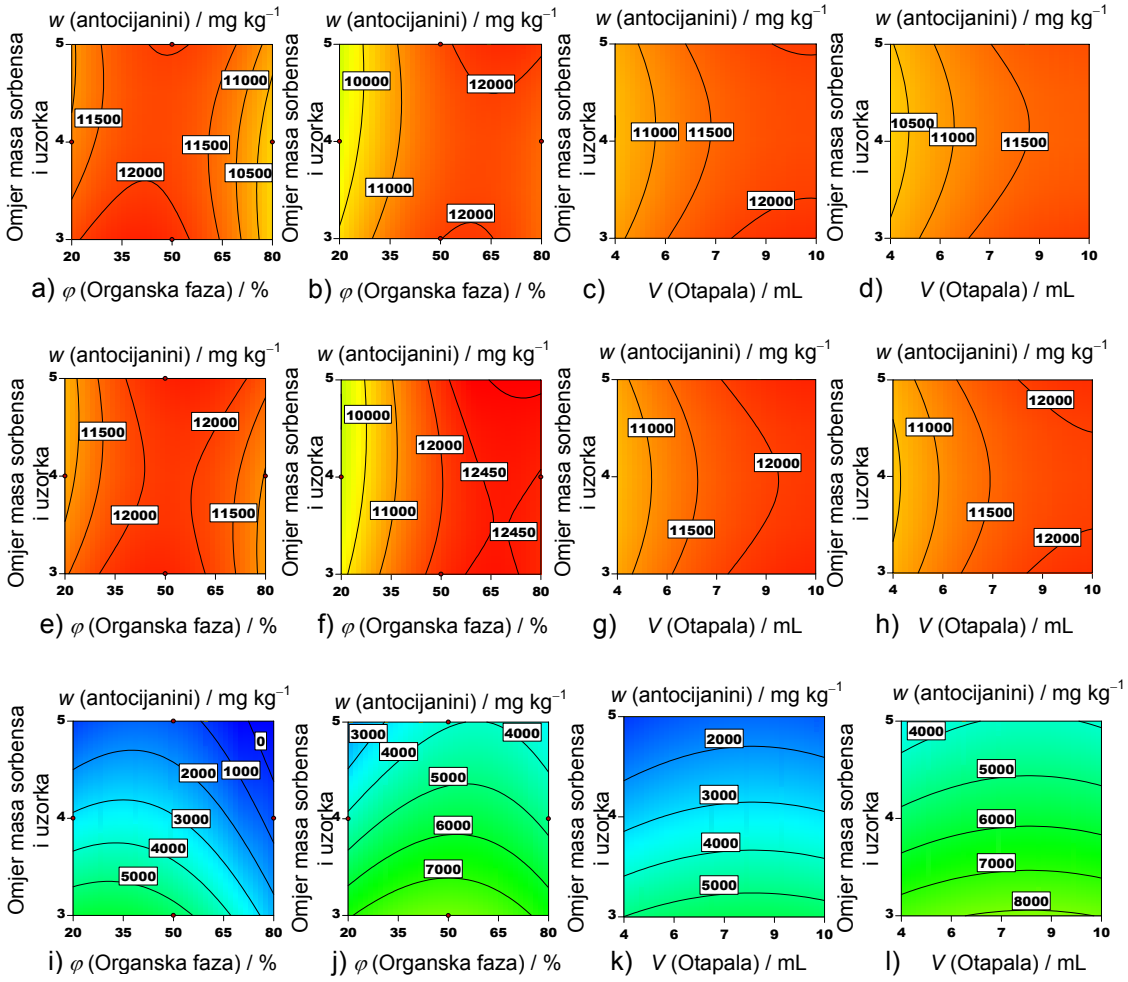
Maseni udjeli antocijanina i flavan-3-ola funkcija su omjera masa čvrste faze i uzorka. Povećanjem ovog omjera dolazi do značajnog povećanja masenog udjela antocijanina, dok smanjenje omjera masa čvrste faze i uzorka ima pozitivan učinak na ekstrakciju flavan-3-ola. Ovakvo opažanje može biti posljedica masenih udjela navedenih skupina spojeva. Antocijanini su zastupljeni u značajno većim masenim udjelima pa je za njihovo otapanje u

vezanoj fazi potrebna njezina veća masa jer primjenom manjih masa dolazi do prezasićenja te ona nema sposobnost dodatnog otapanja ovih analita. Flavan-3-oli su sadržani u znatno manjem obimu pa primjena većih masa čvrste faze može imati negativan učinak na njihovu ekstrakciju jer može doći do njihovog razvlačenja na čvrstoj fazi, a time i do gubitka u konačnom ekstraktu.

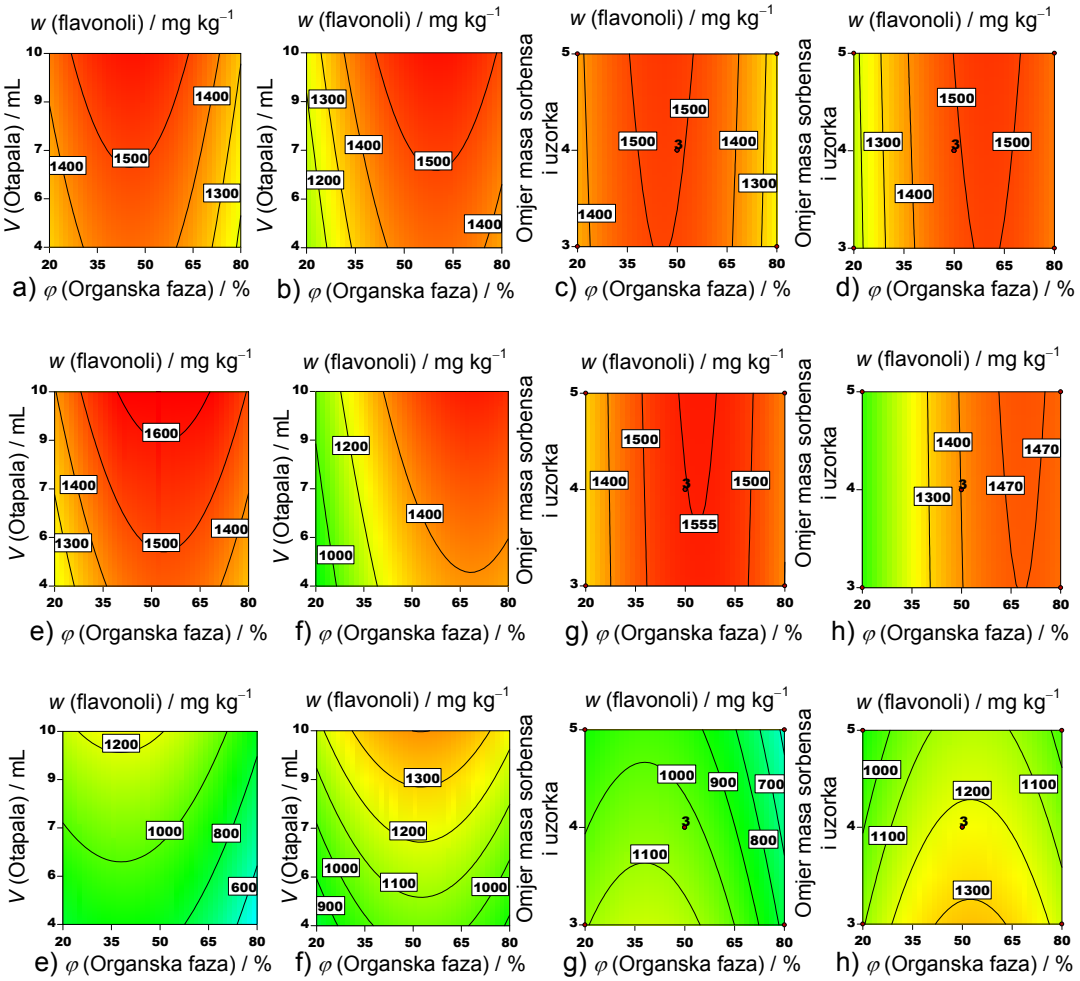
Učinak interakcija između pojedinih ekstrakcijskih faktora na masene udjele antocijanina, flavonola i flavan-3-ola određen je iz grafova kontura (Slike 4.21 do 4.23).

Maseni udio antocijanina bez obzira na primijenjenu čvrstu fazu i eluacijsko otapalo funkcija je međudjelovanja između omjera masa čvrste faze i uzorka te udjela organske faze odnosno volumena eluacijskog otapala. Povećanjem udjela organske faze uz primjenu manjih omjera masa čvrste faze i uzorka dolazi do značajnog povećanja masenog udjela ove skupine spojeva. Najveći maseni udjeli antocijanina opaženi su u ekstraktima dobivenim primjenom malog omjera masa i velikog eluacijskog volumena. Eluacijsko otapalo ima ulogu otapala koje se natječe s vezanom fazom za analite pa stoga veći volumen otapala nadoknađuje malu masu vezane faze (Slika 4.21).

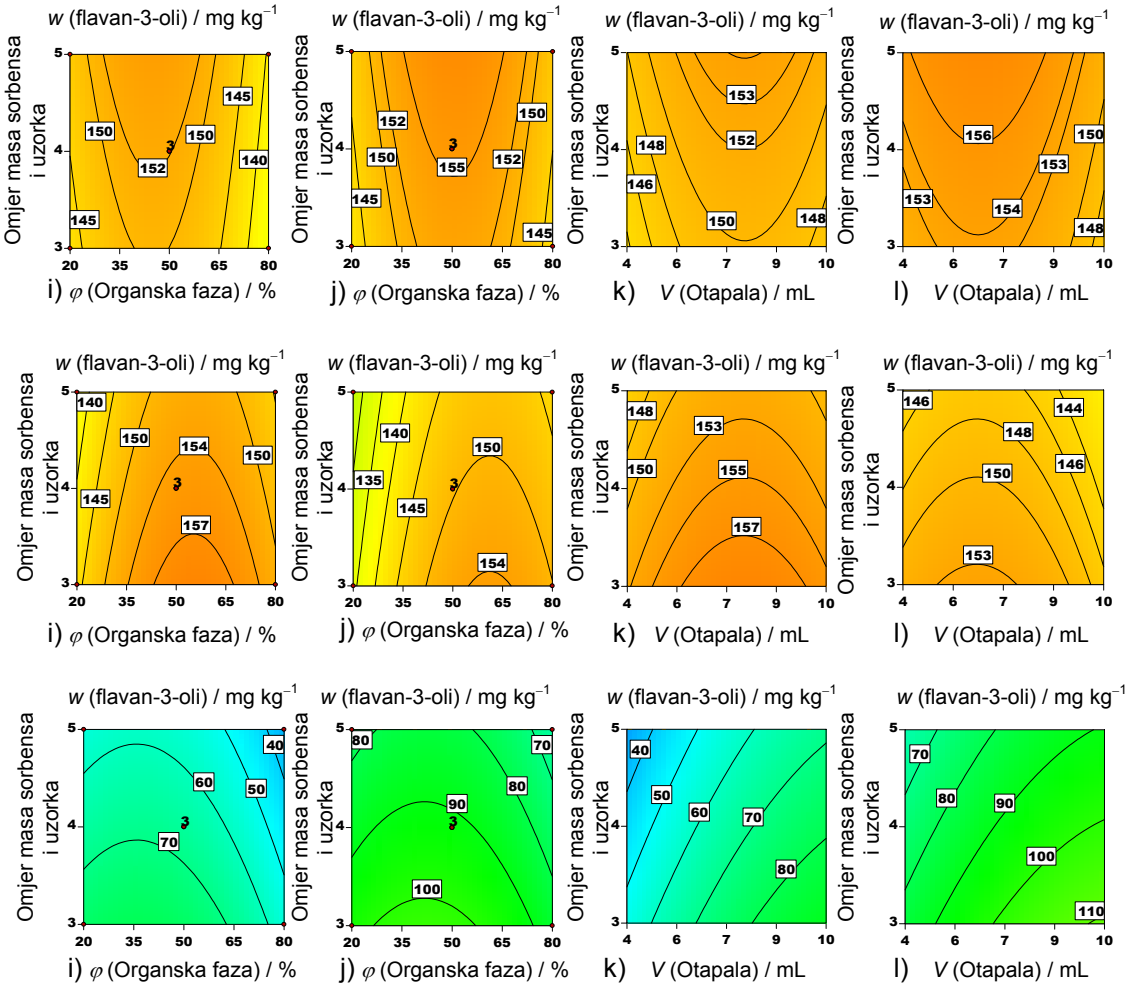
Na masene udjele flavonola bez obzira na uporabljeno eluacijsko otapalo i vrstu čvrste faze utječu međudjelovanja između udjela organske faze u eluacijskom otapalu i omjera masa čvrste faze i uzorka odnosno volumena. Udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu ovisi o vrsti organskog otapala, a za postizanje što veće učinkovitosti ekstrakcije ove skupine spojeva potrebno je da eluacijsko otapalo sadrži približno 50 % acetonitrila odnosno 65 % etanola. Primijenjeni volumen otapala značajno ne ovisi o primijenjenoj čvrstoj fazi, a njegovim povećanjem dolazi i do povećanja masenog udjela flavonola (Slika 4.22).



Slika 4.21. Konturni prikaz najznačajnijih interakcijskih učinaka između pojedinih ekstrakcijski faktora na maseni udio antocijanina prilikom primjene a) morskog pijeska i acetonitrila, b) morskog pijeska i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 10 mL; c) morskog pijeska i acetonitrila, d) morskog pijeska i etanola uz volumen udio organske faze u eluacijskom otapalu od 50 %; e) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, f) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 10 mL; g) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, h) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz volumen udio organske faze u eluacijskom otapalu od 50 %; i) XAD-2 i acetonitrila, j) XAD-2 i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 10 mL; k) XAD-2 i acetonitrila, l) XAD-2 i etanola uz volumen udio organske faze u eluacijskom otapalu od 50 %



Slika 4.22. Konturni prikaz najznačajnijih interakcijskih učinaka između pojedinih ekstrakcijski faktora na maseni udio flavonola prilikom primjene a) morskog pijeska i acetonitrila, b) morskog pijeska i etanola uz omjer masa čvrste faze i uzorka od 4:1; c) morskog pijeska i acetonitrila, d) morskog pijeska i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL; e) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, f) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz omjer masa čvrste faze i uzorka od 4:1; g) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, h) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL; i) XAD-2 i acetonitrila, j) XAD-2 i etanola uz omjer masa čvrste faze i uzorka od 4:1; k) XAD-2 i acetonitrila, l) XAD-2 i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL



Slika 4.23. Konturni prikaz najznačajnijih interakcijskih učinaka između pojedinih ekstrakcijski faktora na maseni udio flavan-3-ola prilikom primjene a) morskog pijeska i acetonitrila, b) morskog pijeska i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL; c) morskog pijeska i acetonitrila, d) morskog pijeska i etanola uz volumen udio organske faze u eluacijskom otapalu od 50 %; e) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, f) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL; g) fenilsilicijevog dioksida i acetonitrila, h) fenilsilicijevog dioksida i etanola uz volumen udio organske faze eluacijskom otapalu od 50 %; i) XAD-2 i acetonitrila, j) XAD-2 i etanola uz volumen eluacijskog otapala od 7 mL; k) XAD-2 i acetonitrila, l) XAD-2 i etanola uz volumen udio organske faze u eluacijskom otapalu od 50 %

Kao i u slučaju antocijanina, maseni udio flavan-3-ola ovisi o međudjelovanju između omjera masa čvrste faze i uzorka te volumena eluacijskog otapala odnosno njegovog masenog udjela. Udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu kao i njegov volumen ovise o primijenjenom organskom otapalu (Slika 4.23).

Optimiranje postupka MSPD provedeno je primjenom Derringerove funkcije. Dobiveni optimalni uvjeti za ekstrakciju pojedinih flavonoida navedeni su u tablici 4.21. Obzirom da je uporaba morskog pijeska kao čvrste faze i etanola kao organskog otapala dozvoljena u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, određeni su i optimalni uvjeti u slučaju uporabe ovih ekstrakcijskih faktora.

Provođenjem eksperimenata pri dobivenim optimalnim uvjetima te uspoređivanjem vrijednosti predviđenim modelom s onima eksperimentalno dobivenima, određena je prikladnost dobivenih jednadžbi za pojedine modele. Razlike između eksperimentalno dobivenih vrijednosti i vrijednosti predviđenih modelom vrlo su male pa je time potvrđeno da su dobiveni modeli pouzdani i precizni.

Tablica 4.21. Optimalni uvjeti postupka MSPD, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti za pojedine skupine flavonoida

Skupina	Čvrsta faza	Organska faza	φ (Organska faza) / %	V (Eluacijsko otapalo) / mL	Omjer masa čvrste faze i uzorka	Predviđena vrijednost / mg kg^{-1}	Dobivena vrijednost (n=3) / mg kg^{-1}
Antocijanini	Fenilsilicijev dioksid	EtOH	80	9	5:1	13098,32	13093,54±93,84
Flavonoli	Fenilsilicijev dioksid	ACN	50	10	5:1	1632,24	1643,38±1,42
Flavan-3-oli	Fenilsilicijev dioksid	ACN	50	7	3:1	159,03	151,45±2,65
Konačni uvjeti	**Fenilsilicijev dioksid**	**ACN**	**50**	**10**	**3:1**		
Antocijanini						12296,37	12870,70±15,70
Flavonoli						1615,81	1571,31±6,07
Flavan-3-oli						157,54	160,33±9,54
Konačni uvjeti	**Pijesak**	**EtOH**	**60**	**10**	**5:1**		
Antocijanini						12201,20	12175,03±19,97
Flavonoli						1586,29	1591,87±9,12
Flavan-3-oli						149,94	150,96±7,30

4.2.6. Usporedba optimiranih ekstrakcijskih metoda

Primjenom Box-Behnkenovog eksperimentalnog dizajna provedeno je optimiranje pojedinih ekstrakcijskih tehnika, SLE, UAE, MAE, EAE te MSPD. Optimirane metode ovisno o uporabljenom ekstrakcijskom otapalu mogu se podijeliti na metode s isključivom primjenom u analitičko-istraživačke svrhe te one koje mogu imati primjenu u komercijalne svrhe tj. za dobivanje ekstrakata fenola koji se mogu koristiti u različitim granama industrije kao što su prehrambena, farmaceutska i kozmetička industrija, ali i za znanstveno-istraživačke potrebe. U slučaju tehnika MAE i EAE ekstrakcijski uvjeti za primjenu u analitičko-istraživačke i komercijalne svrhe jednaki su. Ekstrakcijska otapala u slučaju analitičke primjene SLE i UAE sadrže acetonitril čija uporaba u navedenim granama industrije nije dozvoljena pa stoga ekstrakcijska otapala za tu svrhu sadrže etanol. Primjena različitih organskih faza u ekstracijskom otapalu rezultira višim temperaturama ekstrakcije u slučaju uporabe etanola. Morski pijesak i etanol su tvari koje se mogu koristiti u prehrambenoj i drugim industrijama pa je metoda MSPD za tu svrhu optimirana primjenom navedenih tvari. U optimiranoj metodi MSPD za analitičku primjenu koriste se acetonitril te fenilsilicijev dioksid.

U tablici 4.22 navedeni su maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva određeni optimiranim metodama s primjenom u analitičko-istraživačke svrhe uz optimalne uvjete ekstrakcije (Tablice 3.21 do 3.23). Da bi se odredila preciznost i pouzdanost pojedine metode ekstrakcije izračunata su relativna standardna odstupanja. Najveći maseni udjeli za gotovo sve ispitane spojeve dobiveni su primjenom metode UAE. Nešto manji maseni udjeli određeni su u ekstraktima MSPD i SLE, dok su najniži maseni udjeli dobiveni primjenom MAE. Sve novo optimirane metode imaju vrlo niske vrijednosti RSD što ih čini izrazito preciznima i pouzdanima. Nešto veće vrijednosti RSD u slučaju metode UAE u odnosu na metode SLE i MSPD mogu biti posljedica nejednolikog intenziteta i snage ultrazvučnih valova u kupelji. Poznato je da intenzitet ultrazvučnih valova ovisi o udaljenosti od izvora. Prilikom primjene metoda SLE i UAE zbog malog volumnog udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu, iz dobivenih ekstrakata nije potrebno prije analize na HPLC-u ukloniti organsku fazu čime se smanjuje broj koraka i učestalo prenošenje uzorka iz jedne posude u drugu tijekom postupka ekstrakcije što u konačnici dovodi do manjeg gubitka analita. Metoda UAE ima neke prednosti kao što su kratko vrijeme i niska cijena ekstrakcije te mogućnost provedbe više ekstrakcija odjednom. Metoda MSPD primjenom fenilsilicijevog dioksida omogućava dobivanje vrlo čistog ekstrakta bez spojeva koji mogu raditi smetnje tijekom kvantitativne i kvalitativne analize. Nedostatak ove metode relativno je visoka cijena čvrste faze.

Tablica 4.22. Ovisnost masenog udjela pojedinih fenolnih spojeva o primijenjenoj optimiranoj metodi ekstrakcije za analitičko-istraživačke potrebe

SPOJ	SLE		UAE		MAE		EAE		MSPD	
	w / mg kg^{-1}	RSD / %	*w* / mg kg^{-1}	RSD / %	*w* / mg kg^{-1}	RSD / %	*w* / mg kg^{-1}	RSD / %	*w* / mg kg^{-1}	RSD / %
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	712,44^{b,c}±5,93	0,83	761,04^{a}±8,33	1,09	535,33^{d}±8,86	1,66	700,20^{c}±5,89	0,84	721,20^{b}±7,23	1,00
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	913,86^{b}±3,16	0,35	950,71^{a}±9,71	1,02	789,31^{d}±18,54	2,35	832,05^{c}±9,77	1,17	895,08^{b}±5,43	0,61
Delfinidin-3-*O*-glukozid	13507,63^{b}±40,90	0,30	14107,46^{a}±189,62	1,34	11802,31^{d}±184,76	1,57	12993,14^{c}±26,23	0,20	13614,95^{b}±46,02	0,34
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1694,07^{a}±2,94	0,17	1723,40^{a}±28,14	1,63	1523,07^{c}±18,32	1,20	1629,48^{b}±6,33	0,39	1720,49^{a}±14,56	0,85
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10552,76^{b}±71,56	0,68	10892,78^{a}±141,96	1,30	9497,73^{c}±177,23	1,87	10273,09^{b}±64,39	0,63	10893,75^{a}±43,43	0,40
Cijanidin-3-*O*-glukozid	3961,58^{b}±23,29	0,59	4092,63^{a}±54,98	1,34	3468,45^{d}±53,31	1,54	3772,81^{c}±4,90	0,13	3923,95^{b}±25,16	0,64
Peonidin-3-*O*-glukozid	1187,47^{b}±2,24	0,19	1227,36^{a}±26,88	2,19	1059,70^{d}±11,53	1,09	1137,53^{c}±7,25	0,64	1188,12^{b}±3,07	0,26
Malvidin -3-*O*-glukozid	17686,45^{b}±136,63	0,77	18207,42^{a}±246,29	1,35	15672,28^{d}±199,73	1,27	16923,87^{c}±40,49	0,24	17865,97^{a,b}±112,29	0,63
UKUPNI ANTOCIJANI	**50216,25^{b}±260,64**	**0,52**	**51962,80^{a}±675,58**	**1,30**	**44348,17^{d}±607,33**	**1,37**	**48262,18^{c}±131,22**	**0,27**	**50823,52^{a,b}±153,88**	**0,30**
Miricetin-3-*O*-glukozid	552,76^{a}±6,07	1,10	544,99^{a,b}±9,78	1,79	479,08^{c}±9,15	1,91	529,52^{b}±10,76	2,03	564,99^{a}±3,13	0,55
Rutin	243,86^{b}±3,53	1,45	247,30^{a,b}±1,68	0,68	224,88^{d}±5,15	2,29	237,53^{c}±1,88	0,79	256,18^{a}±3,80	1,48
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	248,65^{b}±0,07	0,03	255,62^{a}±2,95	1,15	227,39^{c}±3,01	1,32	221,54^{d}±2,21	1,00	250,97^{a,b}±3,08	1,23
Kvercetin-3-*O*-glukozid	2735,63^{b}±9,71	0,35	2816,63^{a}±43,60	1,55	2482,47^{c}±22,59	0,91	2450,18^{c}±11,00	0,45	2739,21^{b}±18,15	0,66
Kemferol-3-*O*-glukuronid	58,69^{b,c}±0,99	1,68	60,76^{a,b}±0,90	1,49	54,55^{d}±0,83	1,53	57,78^{c}±1,36	2,35	59,39^{b}±0,91	1,54
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	40,85^{c}±0,73	1,79	50,62^{b}±1,57	3,10	65,47^{a}±0,56	0,85	27,72^{e}±0,87	3,14	35,43^{d}±0,62	1,74
UKUPNI FLAVONOLI	**3880,45^{b}±9,89**	**0,25**	**3975,93^{a}±53,24**	**1,34**	**3533,84^{c}±35,28**	**1,00**	**3524,27^{c}±23,81**	**0,68**	**3906,17^{a,b}±21,80**	**0,56**
Galokatehin	151,31^{b}±0,50	0,33	152,23^{a,b}±2,51	1,65	138,49^{d}±1,79	1,29	145,87^{c}±1,71	1,17	156,47^{a}±0,83	0,53
Procijanidin B1	36,57^{a}±1,04	2,85	38,76^{a}±0,75	1,93	31,51^{b}±0,88	2,79	32,89^{b}±0,50	1,53	37,98^{a}±0,84	2,19
Epigalokatehin	53,09^{b}±0,16	0,30	41,96^{c}±1,14	2,72	52,49^{b}±0,90	1,72	42,67^{c}±0,36	0,84	62,70^{a}±0,41	0,65
Katehin	73,59^{c}±0,52	0,71	80,50^{b}±3,10	3,85	86,44^{a}±1,70	1,97	57,60^{e}±1,16	2,01	66,26^{d}±0,98	1,47
Procijanidin B2	82,13^{b}±0,59	0,72	90,34^{a}±0,21	0,23	80,44^{b}±2,30	2,86	79,37^{b,c}±1,51	1,90	76,58^{c}±0,24	0,31
Epikatehin	36,40^{b,c}±0,31	0,85	43,02^{a}±1,56	3,62	34,66^{c}±1,15	3,31	36,55^{b,c}±0,70	1,91	37,85^{b}±0,76	2,00

SLE: ekstrakcije čvrsto-tekuće; UAE: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; MAE: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; EAE: ekstrakcija potpomognuta enzimima; MSPD: rasršenje matrice uzorka čvrstom fazom

Tablica 4.22. Ovisnost masenog udjela pojedinih fenolnih spojeva o primijenjenoj optimiranoj metodi ekstrakcije za analitičko-istraživačke potrebe

[Nastavak]

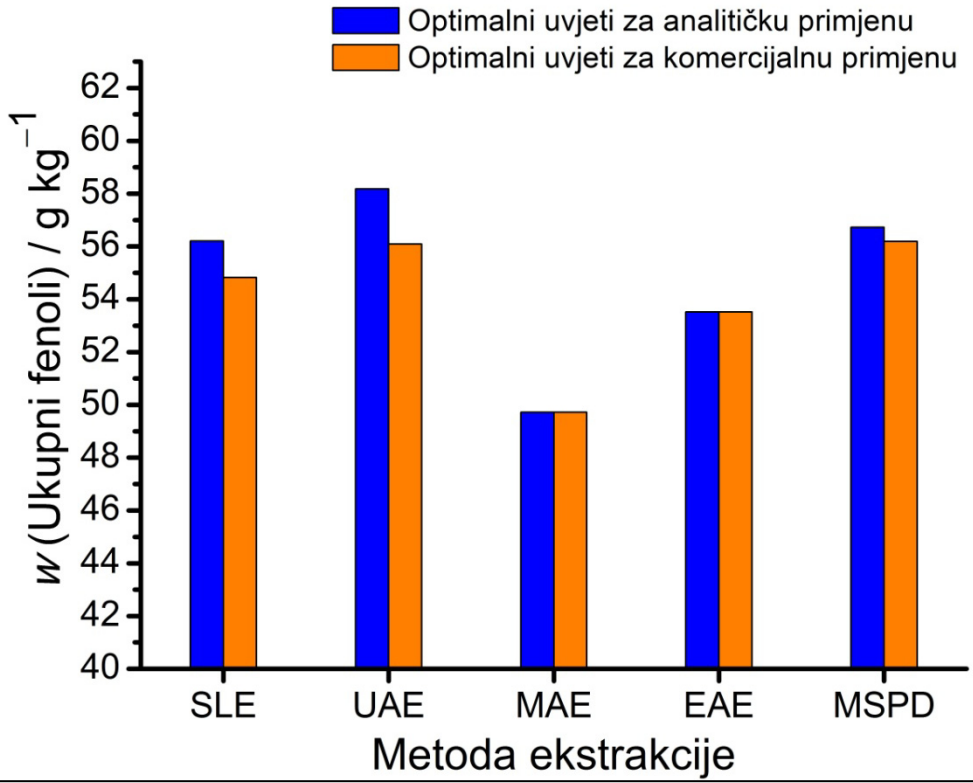
SPOJ	SLE		UAE		MAE		EAE		MSPD	
	***w* / mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w* / mg kg^{-1}**	**RSD / %**
Kaftarinska kiselina	502,12^{b}±3,67	0,73	545,72^{a}±1,48	0,27	452,24^{c}±11,12	2,46	502,89^{b}±6,54	1,30	514,49^{b}±5,63	1,09
Kafeinska kiselina	49,92^{b}±0,94	1,89	57,08^{a}±0,77	1,36	39,91^{c}±0,48	1,19	31,81^{d}±0,73	2,29	31,45^{d}±0,40	1,27
p-Kutarinska kiselina	522,72^{b}±2,51	0,48	561,46^{a}±6,13	1,09	401,91^{e}±8,86	2,20	457,32^{b}±0,80	0,18	497,15±4,02	0,81
p-Kumarinska kiselina	34,10^{a}±0,08	0,24	33,39^{a,b}±0,13	0,39	32,82^{b}±0,73	2,24	27,59^{d}±0,18	0,66	33,12^{a,b}±0,66	2,01
Fertarinska kiselina	86,19^{b}±1,07	1,24	87,42^{b}±0,81	0,92	97,34^{a}±0,74	0,76	40,86^{d}±0,90	2,19	46,40^{c}±0,42	0,90
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	**1195,05^{b}±5,28**	**0,44**	**1285,07^{a}±5,86**	**0,46**	**1024,21^{e}±20,58**	**2,01**	**1060,47^{d}±5,89**	**0,56**	**1122,61^{c}±9,91**	**0,88**
Prokatehinska kiselina	67,62^{b}±1,51	2,24	61,54^{c}±1,16	1,88	39,69^{d}±0,86	2,17	65,11^{b}±0,60	0,93	74,93^{a}±1,29	1,72
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	411,11^{b}±1,44	0,35	441,19^{a}±3,62	0,82	352,89^{c}±5,10	1,45	314,66^{d}±1,82	0,58	357,58^{c}±1,20	0,34

SLE: ekstrakcije čvrsto-tekuće; UAE: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; MAE: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; EAE: ekstrakcija potpomognuta enzimima; MSPD: rasršenje matrice uzorka čvrstom fazom

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Maseni udio pojedinih fenola značajno ovisi o uporabljenoj metodi ekstrakcije s primjenom u komercijalne svrhe (Tablica 4.23). Dobiveni maseni udjeli primjenom ovih optimiranih metoda nešto su manji od onih dobivenih metodama za analitičke potrebe. Najveći maseni udjeli antocijanina dobiveni su primjenom metode MSPD, dok su najveći maseni udjeli flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih kiselina te stilbena dobiveni primjenom metode UAE. Primjenom ove metode maseni udjeli antocijanina u dobivenim ekstraktima nešto su manji nego u ekstraktima dobivenim metodom MSPD, ali te razlike nisu statistički značajne. Kao i u slučaju metoda s analitičkom primjenom, dobivene vrijednosti RSD su male što ukazuje na to da su novo optimirane metode vrlo precizne i pouzdane. Tijekom postupka optimiranja ekstrakcijskih metoda s primjenom u komercijalne svrhe korišten je omjer faza 1:80 g mL^{-1} tj. 125 mg uzorka i 10 mL ekstrakcijskog otapala. Prilikom uporabe tih metoda u industrijskim sustavima potrebno je povćati masu uzorka uz istovremeno povećanje volumena ekstrakcijskog otapala npr. 500 g uzorka i 40 L organskog otapala.

Na slici 4.24 prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola za sve optimirane metode.



SLE: ekstrakcije čvrsto-tekuće; UAE: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; MAE: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; EAE: ekstrakcija potpomognuta enzimima; MSPD: rasršenje matrice uzorka čvrstom fazom

Slika 4.24. Ovisnost masenog udjela ukupnih fenola o primijenjenoj metodi ekstrakcije

Tablica 4.23. Ovisnost masenog udjela pojedinih fenolnih spojeva o primijenjenoj optimiranoj metodi ekstrakcije za komercijalne potrebe

SPOJ	SLE		UAE		MAE		EAE		MSPD	
	w / mg kg^{-1}	RSD / %	w / mg kg^{-1}	RSD / %	w / mg kg^{-1}	RSD / %	w / mg kg^{-1}	RSD / %	w / mg kg^{-1}	RSD / %
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	693,56^{c}±5,77	0,81	731,43^{a}±8,01	1,05	535,33^{d}±8,86	1,66	700,20^{c}±5,89	0,84	715,65^{b}±7,17	0,99
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	889,64^{b}±3,08	0,34	913,73^{a}±9,34	0,98	789,31^{d}±18,54	2,35	832,05^{c}±9,77	1,17	888,18^{b}±5,39	0,60
Delfinidin-3-*O*-glukozid	13149,68^{b}±39,81	0,29	13558,86^{a}±182,24	1,29	11802,31^{d}±184,76	1,57	12993,14^{c}±26,23	0,20	13510,12^{a}±45,66	0,34
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1649,18^{b,c}±2,87	0,17	1656,36^{b}±27,04	1,57	1523,07^{c}±18,32	1,20	1629,48^{b}±6,33	0,39	1707,24^{a}±14,45	0,84
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10273,12^{b}±69,67	0,66	10469,05^{b}±136,44	1,25	9497,73^{c}±177,23	1,87	10273,09^{b}±64,39	0,63	10809,87^{a}±43,10	0,40
Cijanidin-3-*O*-glukozid	3856,60^{b}±22,76	0,57	3933,43^{a}±52,84	1,29	3468,45^{d}±53,31	1,54	3772,81^{c}±4,90	0,13	3893,74^{a}±24,97	0,64
Peonidin-3-*O*-glukozid	1156,00^{a,b}±2,18	0,18	1179,62^{a}±25,83	2,10	1059,70^{c}±11,53	1,09	1137,53^{b}±7,25	0,64	1178,98^{a}±3,05	0,26
Malvidin -3-*O*-glukozid	17217,76^{b}±133,01	0,75	17499,15^{a,b}±236,71	1,30	15672,28^{c}±199,73	1,27	16923,87^{b}±40,49	0,24	17728,40^{a}±111,43	0,62
UKUPNI ANTOCIJANI	**48885,52^{b}±253,73**	**0,51**	**49941,45^{a,b}±649,30**	**1,25**	**44348,17^{c}±607,33**	**1,37**	**48262,18^{b}±131,22**	**0,27**	**50432,17^{a}±152,69**	**0,30**
Miricetin-3-*O*-glukozid	550,77^{a}±6,05	1,09	538,12^{b}±9,66	1,77	479,08^{c}±9,15	1,91	529,52^{b}±10,76	2,03	554,65^{a}±3,07	0,54
Rutin	242,98^{a,b}±3,51	1,44	244,19^{a,b}±1,67	0,67	224,88^{c}±5,15	2,29	237,53^{b}±1,88	0,79	251,49^{a}±3,73	1,45
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	247,75^{a}±0,07	0,03	252,40^{a}±2,91	1,14	227,39^{b}±3,01	1,32	221,54^{b}±2,21	1,00	246,38^{a}±3,02	1,20
Kvercetin-3-*O*-glukozid	2725,79^{a,b}±9,67	0,35	2781,14^{a}±43,05	1,53	2482,47^{c}±22,59	0,91	2450,18^{c}±11,00	0,45	2689,08±17,82	0,65
Kemferol-3-*O*-glukuronid	58,48^{b}±0,98	1,68	60,00^{a}±0,89	1,47	54,55^{d}±0,83	1,53	57,78^{c}±1,36	2,35	58,30^{b}±0,90	1,51
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	40,70^{v}±0,73	1,79	49,98^{b}±1,55	3,06	65,47^{a}±0,56	0,85	27,72^{e}±0,87	3,14	34,78^{b}±0,61	1,71
UKUPNI FLAVONOLI	**3866,48^{b}±9,85**	**0,25**	**3925,83^{a}±52,57**	**1,32**	**3533,84^{c}±35,28**	**1,00**	**3524,27^{c}±23,81**	**0,68**	**3834,69^{d}±21,41**	**0,55**
Galokatehin	149,11^{b}±0,50	0,33	161,50^{a}±2,66	1,75	138,49^{e}±1,79	1,29	145,87^{d}±1,71	1,17	148,92^{c}±0,79	0,50
Procijanidin B1	36,04^{b}±1,03	2,81	41,12^{a}±0,79	2,05	31,51^{c}±0,88	2,79	32,89^{c}±0,50	1,53	36,15±^{b}0,74	2,08
Epigalokatehin	52,32^{b}±0,16	0,30	44,52^{c}±1,21	2,89	52,49^{b}±0,90	1,72	42,67^{c}±0,36	0,84	59,68^{a}±0,39	0,62
Katehin	72,52^{b}±0,51	0,70	85,40^{a}±3,29	4,09	86,44^{a}±1,70	1,97	57,60^{e}±1,16	2,01	63,07^{c}±0,93	1,40
Procijanidin B2	80,94^{b}±0,58	0,71	95,84^{a}±0,22	0,25	80,44^{b}±2,30	2,86	79,37^{b}±1,51	1,90	72,89^{c}±0,22	0,29
Epikatehin	35,87^{b,c}±0,30	0,84	45,64^{a}±1,65	3,84	34,66^{c}±1,15	3,31	36,55^{b,c}±0,70	1,91	36,02^{b}±0,72	1,90
UKUPNI FLAVANOLI	**426,81^{b}±0,43**	**0,10**	**474,02^{a}±1,31**	**0,29**	**424,03^{b}±4,87**	**1,15**	**394,96^{d}±3,13**	**0,79**	**416,74^{c}±0,55**	**0,13**

SLE: ekstrakcije čvrsto-tekuće; UAE: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; MAE: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; EAE: ekstrakcija potpomognuta enzimima; MSPD: rasršenje matrice uzorka čvrstom fazom

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.23. Ovisnost masenog udjela pojedinih fenolnih spojeva o primijenjenoj optimiranoj metodi ekstrakcije za komercijalne potrebe [Nastavak]

SPOJ	SLE		UAE		MAE		EAE		MSPD	
	w **/ mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w*** **/ mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w*** **/ mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w*** **/ mg kg^{-1}**	**RSD / %**	***w*** **/ mg kg^{-1}**	**RSD / %**
Kaftarinska kiselina	491,82^{b}±3,59	0,72	531,64^{a}±1,44	0,26	452,24^{c}±11,12	2,46	502,89^{b}±6,54	1,30	497,36^{b}±5,44	1,09
Kafeinska kiselina	48,90^{b}±0,93	1,85	55,61^{a}±0,75	1,32	39,91^{c}±0,48	1,19	31,81^{d}±0,73	2,29	30,40^{d}±0,39	1,27
p-Kutarinska kiselina	512,00^{b}±2,45	0,47	546,98^{a}±5,98	1,06	401,91^{c}±8,86	2,20	457,32^{b}±0,80	0,18	480,59^{c}±3,89	0,81
p-Kumarinska kiselina	33,40^{a}±0,08	0,23	32,53^{a}±0,13	0,38	32,82^{a}±0,73	2,24	27,59^{b}±0,18	0,66	32,02^{a}±0,64	2,01
Fertarinska kiselina	84,43^{b}±1,05	1,22	85,16^{b}±0,79	0,90	97,34^{a}±0,74	0,76	40,86^{d}±0,90	2,19	44,86^{c}±0,40	0,90
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	**1170,55^{b}±5,17**	**0,43**	**1251,91^{a}±5,70**	**0,44**	**1024,21^{c}±20,58**	**2,01**	**1060,47^{d}±5,89**	**0,56**	**1085,23^{c}±9,58**	**0,88**
Prokatehinska kiselina	67,45^{b}±1,51	2,23	59,29^{c}±1,11	1,81	39,69±0,86	2,17	65,11^{b}±0,60	0,93	73,96^{a}±1,27	1,70
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	404,94^{b}±1,42	0,34	436,38^{a}±3,66	0,83	352,89^{c}±5,10	1,45	314,66^{d}±1,82	0,58	349,32^{c}±1,17	0,33

SLE: ekstrakcije čvrsto-tekuće; UAE: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; MAE: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; EAE: ekstrakcija potpomognuta enzimima; MSPD: rasršenje matrice uzorka čvrstom fazom

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

4.3. Stabilnost ekstrakata fenola kožica bobica grožđa

Porastom svijesti potrošača o zdravoj prehrani te brojnih istraživanja koja su potvrdila pozitivan učinak fenola na ljudsko zdravlje sve se više ovi prirodni bioaktivni spojevi koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. S obzirom da ekstrakti kožica bobica grožđa obiluju pojedinim fenolnim spojevima imaju veliki potencijal primjene u komercijalne svrhe. Dobiveni se ekstrakti najčešće dodaju u ishodnu smjesu za dobivanje nekoga pripravka ili proizvoda, a koja se potom prije stavljanja na tržište obrađuje na određeni način. Tijekom postupka proizvodnje hrane i različitih farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka koriste se različite termičke i druge metode kao što je primjena ultrazvuka visokih frekvencija. Termička obrada jedna je od najčešće korištenih tehnika u prehrambenoj industriji koja osigurava mikrobiološku sigurnost proizvoda. Tijekom termičke obrade dolazi do inaktivacije mikroorganizama kao i enzima koji imaju negativan učinak na sam proizvod. U ovu skupinu enzima ubrajaju se polifenoloksidaze, pektin metilesteraze, lipaze, proteaze, peroksidaze itd. Blanširanje, termička pasterizacija, kuhanje, pečenje i sterilizacija termičke su tehnike za obradu prehrambenih proizvoda s najvećom primjenom. Ove se tehnike provode pri temperaturama od 40 °C pa do 95 °C, a sam postupak obično traje od 1 min pa do 6 h.[199-201] Veliki broj kozmetičkih pripravaka sadrži emulzije sačinjene od vode i ulja. Ovakve se emulzije obično priređuju miješanjem vodene i uljne faze pri visokim temperaturama (50 °C do 85 °C) uz miješanje u prisutnosti emulgatora. Sam postupak traje sve dok se uljne kapi u potpunosti ne rasprše unutar vodene faze i ne nastane jednolika homogena masa. Novije metode priprave vodeno-uljnih emulzija uključuju raspršenje vode i oleosoma uz neprestano miješanje pri temperaturama koje ne prelaze 40 °C.[202,203]

Razvoj novih tehnologija na znanstvenoj razini uvelike prate i pojedine grane industrije pa tako ultrazvuk visokih frekvencija ima sve veću primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Termosoniciranje jedna je od ultrazvučnih tehnika koja se uvelike koristi tijekom postupka konzerviranja hrane. U ovoj tehnici primjenjuju se ultrazvučni valovi uz istovremeno zagrijavanje medija na temperature od približno 60 °C. Primjenom ove tehnike dolazi do učinkovite inaktivacije brojnih mikroorganizama kao što su bakterije i kvasci, ali i do inaktivacije pojedinih enzima.[204,205] Tal-Fifiel[206] je 2007. g. razvio jedinstvenu metodu za dobivanje stabilnih vodeno-uljni kozmetičkih emulzija primjenom ultrazvuka. U proizvodnji tableta najčešće su se primjenjivale različite mehaničke metode. Novija su istraživanja pokazala da se vrlo učinkovito komprimiranje praha kao sastavnice tableta može postići primjenom ultrazvuka.[207] Prilikom priprave određene aktivne supstanice

primjenjuje se postupak sonokristalizacije koji je vrlo učinkovit način za dobivanje određenih farmaceutskih pripravaka.[208]

Navedeni postupci priprave pojedinih proizvoda i pripravaka mogu utjecati na sastav i sadržaj fenolnih spojeva pa je stoga nužno poznavati njihova fizikalno-kemijska svojstva od kojih su najvažniji termička i ultrazvučna stabilnost.

Do danas, provedeno je svega nekoliko istraživanja čiji je cilj bio određivanje termičke stabilnosti fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim iz različitih biljaka. Termička stabilnost fenola uvelike ovisi o samom spoju, pH-vrijednosti otopine itd. Najveća stabilnost fenolnih spojeva opažena je u kiselim uvjetima. Su i sur.[209] odredili su da se sadržaj flavan-3-ola iz zelenog čaja tijekom zagrijavanja pri 100 °C u periodu od 1 h smanji za svega 20 % do 25 %, dok se u istom vremenskom periodu pri 95 °C sadržaj antocijanina smanji za približno 50 %.[210]

U literaturi postoji vrlo malo podataka o utjecaju ultrazvuka na sastav i sadržaj fenola. Većina ovih istraživanja provedena je na otopinama standarada flavonoida i fenolnih kiselina.[211,212] Poznato je da matrica značajno utječe na stabilnost fenola u određenim uvjetima pa je stoga potrebno provesti određivanje stabilnosti tijekom termosoniciranja u stvarnim matricama.[213]

4.3.1. Određivanje termičke stabilnosti fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa

Ekstrakti kožica bobica grožđa zagrijavani su pri temperaturama od 40 °C, 60 °C i 80 °C u vremenskom periodu od 15 min do 4 h. Po završetku zagrijavanja ekstrakti su analizirani primjenom metode HPLC, a pri čemu su određeni maseni udjeli pojedinih antocijanina, flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena (Tablice 4.24 do 4.29).

Tablica 4.24. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 40 °C

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**15min**	**30 min**	**1h**	**2h**	**3h**	**4h**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	924,64^{a} ± 0,78	924,29^{a} ± 0,79	924,54^{a} ± 1,04	924,44^{a} ± 0,78	924,72^{a} ± 1,09	924,84^{a} ± 1,03	924,10^{a} ± 1,02
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	825,76^{a} ± 0,83	825,37^{a} ± 1,34	825,60^{a} ± 1,03	825,27^{a} ± 1,03	825,62^{a} ± 1,17	825,43^{a} ± 1,03	825,54^{a} ± 0,71
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7163,47^{a} ± 0,69	7163,34^{a} ± 1,20	7163,55^{a} ± 1,06	7163,49^{a} ± 1,16	7163,62^{a} ± 1,08	7163,59^{a} ± 1,38	7163,72^{a} ± 1,00
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1036,61^{a} ± 1,04	1036,42^{a} ± 1,01	1036,27^{a} ± 1,04	1036,14^{a} ± 0,95	1036,11^{a} ± 0,99	1036,29^{a} ± 0,99	1036,59^{a} ± 0,97
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10387,53^{a} ± 0,67	10387,34^{a} ± 1,41	10386,68^{a} ± 0,51	10387,78^{a} ± 1,00	10383,95^{b} ± 0,50	10381,81^{b} ± 0,83	10377,43^{c} ± 0,50
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1827,49^{a} ± 1,89	1825,59^{a} ± 1,89	1822,80^{a} ± 1,88	1822,42^{a} ± 1,88	1825,24^{a} ± 1,88	1823,87^{a} ± 1,87	1823,67^{a} ± 1,87
Peonidin-3-*O*-glukozid	383,09^{a} ± 0,51	383,28^{a} ± 0,13	383,49^{a} ± 0,52	382,94^{a} ± 0,52	382,97^{a} ± 0,66	382,70^{a} ± 0,51	382,68^{a} ± 0,65
Malvidin -3-*O*-glukozid	5913,16^{a} ± 0,91	5913,38^{a} ± 1,43	5913,83^{a} ± 1,01	5914,69^{a} ± 0,92	5889,66^{b} ± 0,89	5885,68^{c} ± 0,89	5879,69^{d} ± 0,89
UKUPNI ANTOCIJANINI	**28461,75^{a} ± 6,61**	**28459,03^{a} ± 6,68**	**28456,75^{a} ± 1,80**	**28457,16^{a} ± 4,05**	**28431,88^{b} ± 4,40**	**28424,21^{b} ± 4,06**	**28413,42^{c} ± 2,42**
Miricetin-3-*O*-glukozid	581,50 ± 0,62	580,88 ± 0,62	581,94 ± 0,10	581,34 ± 0,62	582,08 ± 0,48	581,69 ± 0,54	581,71 ± 0,52
Rutin	165,83^{a} ± 0,50	165,89^{a} ± 0,70	165,91^{a} ± 0,50	165,00^{a} ± 0,38	165,93^{a} ± 0,50	165,31^{a} ± 0,38	165,25^{a} ± 0,39
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	117,88^{a} ± 0,51	118,17^{a} ± 0,51	118,29^{a} ± 0,51	117,57^{a} ± 0,51	117,84^{a} ± 0,14	117,47^{a} ± 0,43	117,44^{a} ± 0,53
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1767,72^{a} ± 0,31	1767,86^{a} ± 0,31	1767,81^{a} ± 0,31	1767,83^{a} ± 0,51	1767,80^{a} ± 0,74	1768,01^{a} ± 0,33	1768,32^{a} ± 0,49
Kemferol-3-*O*-glukuronid	36,15^{a} ± 0,53	36,30^{a} ± 0,55	36,09^{a} ± 0,05	35,64^{a} ± 0,05	36,34^{a} ± 0,05	35,87^{a} ± 0,56	35,89^{a} ± 0,62
UKUPNI FLAVONOLI	**2669,08^{a} ± 1,45**	**2669,12^{a} ± 1,64**	**2670,06^{a} ± 0,49**	**2668,38^{a} ± 0,90**	**2669,99^{a} ± 0,57**	**2669,02^{a} ± 0,63**	**2669,28^{a} ± 0,50**
Galokatehin	52,50^{a} ± 0,54	53,06^{a} ± 0,64	52,66^{a} ± 0,54	53,26^{a} ± 0,62	52,93^{a} ± 0,62	53,50^{a} ± 0,54	52,87^{a} ± 0,54
Procijanidin B1	34,07^{a} ± 0,55	33,83^{a} ± 0,54	34,10^{a} ± 0,05	34,06^{a} ± 0,55	34,01^{a} ± 0,62	33,38^{a} ± 0,54	33,72^{a} ± 0,55
Epigalokatehin	22,83^{a} ± 0,55	22,73^{a} ± 0,55	23,08^{a} ± 0,55	22,94^{a} ± 0,60	22,87^{a} ± 0,60	22,79^{a} ± 0,60	23,00^{a} ± 0,60
Katehin	14,84^{a} ± 0,56	15,23^{a} ± 0,55	14,62^{a} ± 0,56	14,76^{a} ± 0,55	14,98^{a} ± 0,56	15,10^{a} ± 0,03	15,19^{a} ± 0,03
Procijanidin B2	12,97^{a} ± 0,56	12,81^{a} ± 0,58	12,75^{a} ± 0,02	12,63^{a} ± 0,60	12,53^{a} ± 0,56	12,47^{a} ± 0,55	12,26^{a} ± 0,56
Epikatehin	24,80^{a} ± 0,55	24,64^{a} ± 0,54	24,75^{a} ± 0,55	24,95^{a} ± 0,60	25,15^{a} ± 0,55	25,21^{a} ± 0,60	25,02^{a} ± 0,57
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	**162,01^{a} ± 3,31**	**162,64^{a} ± 1,33**	**162,24^{a} ± 2,15**	**163,00^{a} ± 1,33**	**162,67^{a} ± 0,67**	**161,89^{a} ± 0,45**	**162,56^{a} ± 0,78**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.25. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 60 °C

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**15min**	**30 min**	**1h**	**2h**	**3h**	**4h**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	924,64^{a} ± 0,78	836,68^{b} ± 3,27	814,54^{c} ± 6,29	777,52^{d} ± 5,55	765,24^{d} ± 5,30	739,82^{e} ± 4,80	652,31^{f} ± 3,05
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	825,76^{a} ± 0,83	756,55^{b} ± 0,77	735,78^{c} ± 0,75	722,94^{d} ± 0,74	687,40^{e} ± 0,69	679,73^{f} ± 0,70	627,43^{g} ± 0,66
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7163,47^{a} ± 0,69	6452,76^{b} ± 1,48	6396,52^{c} ± 1,42	6256,76^{d} ± 1,27	6113,38^{e} ± 1,11	5444,71^{f} ± 0,54	4975,02^{g} ± 0,58
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1036,61^{a} ± 1,04	965,77^{b} ± 0,96	950,36^{c} ± 0,95	940,72^{d} ± 0,94	926,54^{e} ± 0,93	896,10^{f} ± 0,90	822,63^{g} ± 0,83
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10387,53^{a} ± 0,67	9801,88^{b} ± 0,71	9452,77^{c} ± 1,04	9416,31^{d} ± 1,07	9366,68^{e} ± 1,13	9049,85^{f} ± 1,46	8459,90^{g} ± 2,12
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1827,49^{a} ± 1,89	1772,16^{b} ± 1,83	1696,28^{c} ± 1,74	1679,39^{d} ± 1,73	1613,46^{e} ± 1,65	1384,15^{f} ± 1,40	1279,75^{g} ± 1,29
Peonidin-3-*O*-glukozid	383,09^{a} ± 0,51	352,15^{b} ± 0,51	347,83^{c} ± 0,50	340,67^{d} ± 0,50	337,26^{e} ± 0,50	311,17^{f} ± 0,50	293,90^{g} ± 0,49
Malvidin -3-*O*-glukozid	5913,16^{a} ± 0,91	5316,78^{b} ± 0,50	5309,37^{c} ± 0,50	5237,75^{d} ± 0,49	5239,70^{e} ± 0,49	4779,55^{f} ± 0,73	4544,06^{g} ± 0,95
UKUPNI ANTOCIJANINI	**28461,75^{a} ± 6,61**	**26254,73^{b} ± 5,26**	**25703,44^{c} ± 9,11**	**25372,07^{d} ± 8,15**	**25049,67^{e} ± 7,57**	**23285,09^{f} ± 5,21**	**21655,01^{g} ± 2,63**
Miricetin-3-*O*-glukozid	581,50 ± 0,62	551,03^{b} ± 0,57	550,94^{b} ± 0,57	550,23^{b,c} ± 0,57	549,93^{c,d} ± 0,57	549,21^{d} ± 0,56	546,40^{e} ± 0,56
Rutin	165,83^{a} ± 0,50	159,69^{b} ± 0,50	158,14^{b} ± 0,68	157,48^{b} ± 0,50	157,44^{b} ± 0,69	156,93^{b} ± 0,50	154,14^{c} ± 0,50
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	117,88^{a} ± 0,51	99,10^{b} ± 0,52	96,89^{c} ± 0,52	95,59^{c,d} ± 0,52	94,89^{d} ± 0,52	94,52^{d} ± 0,52	92,72^{e} ± 0,52
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1767,72^{a} ± 0,31	1670,96^{b} ± 1,72	1644,29^{c} ± 1,69	1639,10^{d} ± 1,68	1602,07^{e} ± 1,64	1580,27^{f} ± 1,64	1560,64^{g} ± 1,59
Kemferol-3-*O*-glukuronid	36,15^{a} ± 0,53	34,40^{b} ± 0,55	34,22^{b} ± 0,62	34,02^{b} ± 0,55	33,96^{b} ± 0,55	33,47^{b} ± 0,55	30,70^{c} ± 0,55
UKUPNI FLAVONOLI	**2669,08^{a} ± 1,45**	**2513,98^{b} ± 3,20**	**2485,48^{c} ± 3,63**	**2477,66^{d} ± 3,18**	**2439,30^{d} ± 4,90**	**2414,41^{e} ± 3,15**	**2384,60^{f} ± 3,13**
Galokatehin	52,50^{a} ± 0,54	49,25^{b} ± 0,54	49,16^{b} ± 0,54	48,42^{b,c} ± 0,54	47,49^{c} ± 0,54	47,38^{c} ± 0,54	47,11^{c} ± 0,54
Procijanidin B1	34,07^{a} ± 0,55	29,90^{b} ± 1,04	30,61^{b} ± 1,20	30,95^{b} ± 0,97	31,08^{b} ± 0,61	31,28^{b} ± 0,61	32,83^{b} ± 0,53
Epigalokatehin	22,83^{a} ± 0,55	22,73^{a} ± 0,55	22,42^{a} ± 0,55	22,46^{a} ± 1,18	22,40^{a} ± 1,18	22,41^{a} ± 1,18	21,08^{a} ± 0,55
Katehin	14,84^{a} ± 0,56	17,00^{b} ± 0,56	17,86^{b,c} ± 0,58	19,04^{c} ± 0,60	20,83^{d} ± 0,55	23,02^{e} ± 0,55	24,76^{f} ± 0,61
Procijanidin B2	12,97^{a} ± 0,56	12,48^{b} ± 0,56	12,24^{b,c} ± 0,56	11,89^{c} ± 0,56	11,74^{a} ± 0,56	11,56^{a} ± 0,56	11,19^{a} ± 0,56
Epikatehin	24,80^{a} ± 0,55	25,51^{b} ± 0,55	25,61^{b} ± 0,55	25,73^{b} ± 0,55	26,87^{c} ± 0,55	27,64^{d} ± 0,55	29,20^{e} ± 0,59
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	**162,01^{a} ± 3,31**	**161,93^{a} ± 3,31**	**162,90^{a} ± 3,09**	**162,39^{a} ± 2,15**	**163,11^{a} ± 2,15**	**165,86^{a} ± 2,15**	**167,27^{a} ± 2,44**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

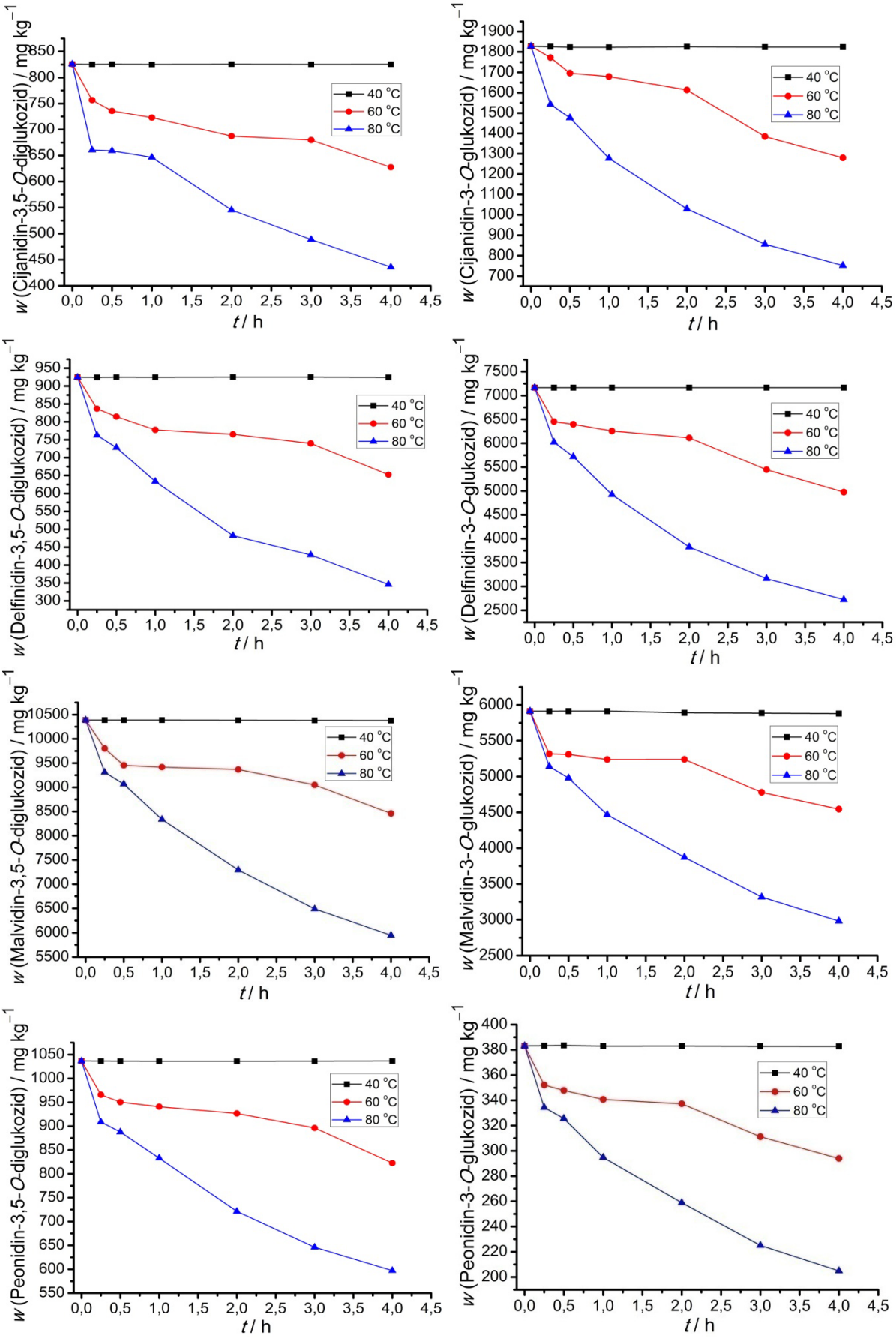
Tablica 4.26. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 80 °C

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**15min**	**30 min**	**1h**	**2h**	**3h**	**4h**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	924,64^{a} ± 0,78	762,74^{b} ± 5,25	728,22^{c} ± 4,56	633,20^{d} ± 2,66	482,10^{e} ± 0,36	428,31^{f} ± 1,43	345,83^{g} ± 3,08
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	825,76^{a} ± 0,83	660,42^{b} ± 0,69	659,05^{b} ± 0,68	646,53^{c} ± 0,70	545,33^{d} ± 0,60	488,88^{e} ± 0,56	435,96^{f} ± 0,54
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7163,47^{a} ± 0,69	6022,80^{b} ± 1,02	5718,50^{c} ± 0,73	4922,71^{d} ± 0,62	3825,77^{e} ± 1,71	3164,60^{f} ± 1,17	2723,96^{g} ± 1,78
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1036,61^{a} ± 1,04	908,76^{b} ± 0,91	887,77^{c} ± 0,89	832,82^{d} ± 0,84	721,35^{e} ± 0,74	646,20^{f} ± 0,67	597,17^{g} ± 0,64
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10387,53^{a} ± 0,67	9310,87^{b} ± 1,18	9065,76^{c} ± 1,45	8336,04^{d} ± 2,26	7292,45^{e} ± 0,80	6489,53^{f} ± 0,99	5948,29^{g} ± 0,95
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1827,49^{a} ± 1,89	1543,56^{b} ± 2,18	1498,90^{c} ± 38,21	1277,46^{d} ± 0,79	1028,81^{e} ± 1,03	856,15^{f} ± 0,86	751,69^{g} ± 0,76
Peonidin-3-*O*-glukozid	383,09^{a} ± 0,51	334,35^{b} ± 0,50	325,57^{c} ± 0,50	294,79^{d} ± 0,49	258,89^{e} ± 0,49	225,12^{f} ± 0,49	204,96^{g} ± 0,49
Malvidin -3-*O*-glukozid	5913,16^{a} ± 0,91	5140,75^{b} ± 0,50	4978,47^{c} ± 0,58	4466,56^{d} ± 1,02	3871,89^{e} ± 0,87	3316,72^{f} ± 1,88	2980,80^{g} ± 2,06
UKUPNI ANTOCIJANINI	**28461,75^{a} ± 6,61**	**24684,06^{b} ± 7,14**	**23839,53^{c} ± 5,68**	**21410,12^{d} ± 2,20**	**18026,59^{e} ± 3,81**	**15615,50^{f} ± 5,70**	**13988,67^{g} ± 5,81**
Miricetin-3-*O*-glukozid	581,50 ± 0,62	497,11^{b} ± 0,57	494,12^{c} ± 0,57	483,51^{d} ± 0,70	470,08^{e} ± 0,55	460,28^{f} ± 0,55	454,10^{g} ± 0,55
Rutin	165,83^{a} ± 0,50	150,43^{b} ± 0,50	149,48^{b,c} ± 0,50	148,49^{c,d} ± 0,50	147,36^{d} ± 0,50	141,33^{e} ± 0,50	129,89^{f} ± 0,51
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	117,88^{a} ± 0,51	85,78^{b} ± 0,52	81,48^{c} ± 0,53	80,97^{c} ± 0,53	80,36^{c} ± 0,53	76,82^{d} ± 0,53	71,86^{e} ± 0,53
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1767,72^{a} ± 0,31	1577,55^{b} ± 1,61	1567,59^{c} ± 1,60	1564,09^{c} ± 1,60	1552,50^{d} ± 1,59	1474,56^{e} ± 1,50	1457,11^{f} ± 1,48
Kemferol-3-*O*-glukuronid	36,15^{a} ± 0,53	32,56^{b} ± 0,55	31,40^{b,c} ± 0,55	30,94^{c} ± 0,55	29,82^{c} ± 0,55	27,07^{d} ± 0,55	25,10^{e} ± 0,55
UKUPNI FLAVONOLI	**2669,08^{a} ± 1,45**	**2343,43^{b} ± 3,15**	**2324,04^{c} ± 3,14**	**2402,75^{d} ± 3,14**	**2281,12^{e} ± 3,11**	**2180,07^{f} ± 3,07**	**2138,07^{g} ± 3,06**
Galokatehin	52,50^{a} ± 0,54	48,30^{b} ± 0,54	48,34^{b} ± 0,54	48,42^{b} ± 0,54	48,71^{b} ± 0,54	49,08^{b} ± 0,54	48,62^{b} ± 0,64
Procijanidin B1	34,07^{a} ± 0,55	30,90^{b} ± 1,15	27,45^{c} ± 1,19	24,67^{d} ± 0,91	19,72^{e} ± 0,75	16,51^{f} ± 0,53	14,73^{g} ± 0,46
Epigalokatehin	22,83^{a} ± 0,55	21,58^{a} ± 0,55	22,02^{a} ± 0,61	21,73^{a} ± 0,61	17,52^{b} ± 0,56	15,04^{c} ± 0,02	15,05^{c} ± 0,56
Katehin	14,84^{a} ± 0,56	16,86^{b} ± 0,56	20,27^{c} ± 0,55	24,95^{d} ± 0,55	31,11^{e} ± 0,55	32,78^{f} ± 0,55	34,75^{g} ± 0,55
Procijanidin B2	12,97^{a} ± 0,56	12,48^{b} ± 0,56	12,28^{b} ± 0,56	11,82^{b} ± 0,56	11,41^{b} ± 0,56	11,17^{b} ± 0,56	11,02^{b} ± 0,56
Epikatehin	24,80^{a} ± 0,55	19,07^{b} ± 0,56	20,25^{b,c} ± 0,55	21,74^{c} ± 0,55	24,07^{a} ± 0,55	30,10^{d} ± 0,55	35,46^{e} ± 0,55
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	**162,01^{a} ± 3,31**	**151,84^{b} ± 3,31**	**153,51^{b} ± 2,53**	**156,43^{a} ± 2,53**	**155,83^{a} ± 3,31**	**158,38^{a} ± 3,31**	**162,52^{a} ± 2,52**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

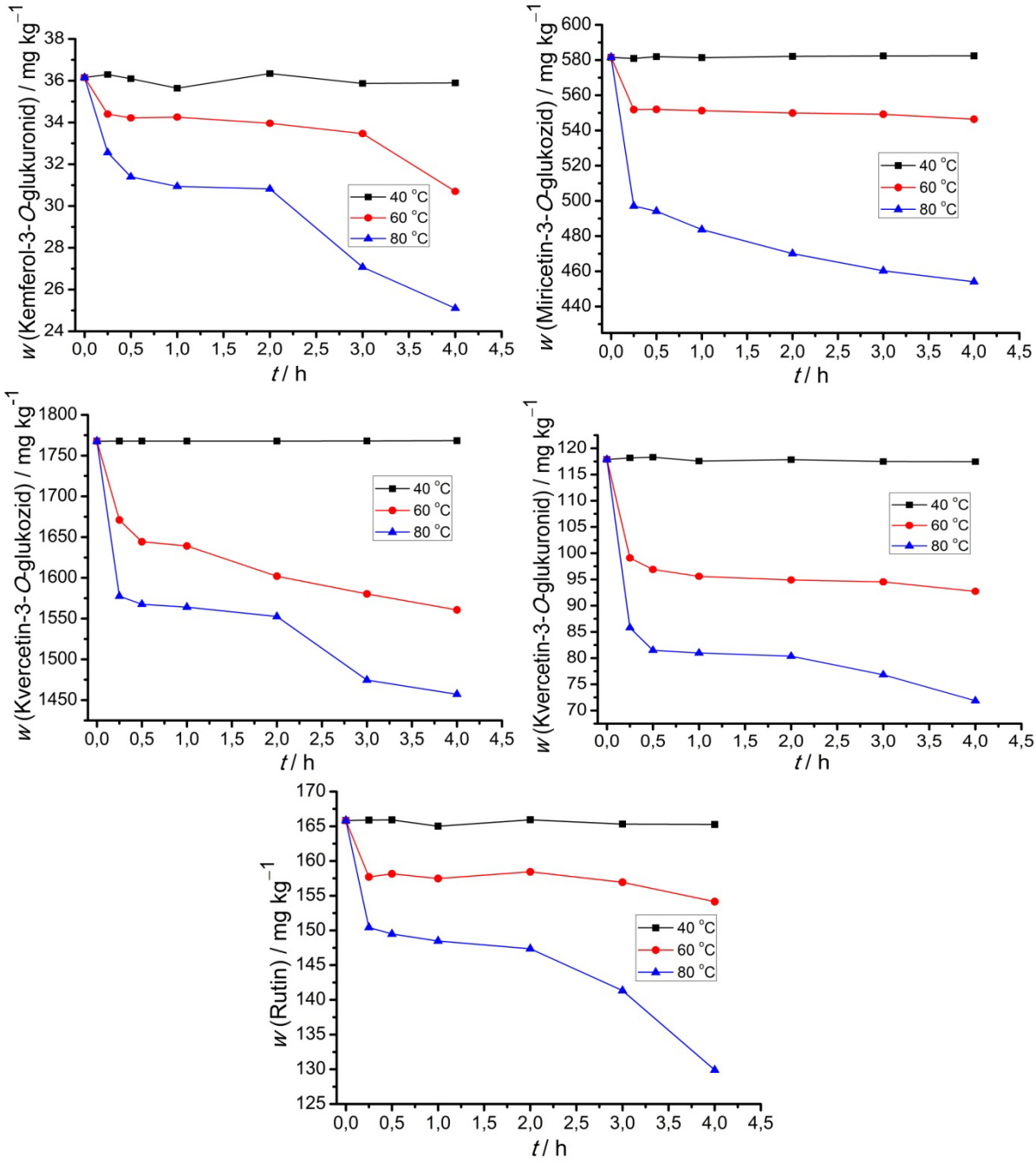
4.3.1.1. Flavonoidi

Zagrijavanje ekstrakta pri 40 °C u periodu od 4 h nema značajan utjecaj na maseni udio antocijanina jer je po završetku inkubacije preostalo više od 99 % početnog masenog udjela (Tablica 4.24). Nakon 15 min zagrijavanja pri 60 °C preostalo je 99,49 %, 91,62 %, 90,08 %, 93,17 % 94,36 %, 96,97 %, 91,92 % i 89,91 % početnog masenog udjela delfinidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3,5-*O*-diglukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3,5-*O*-diglukozida, malvidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida odnosno malvidin-3-*O*-glukozida. Dodatno zagrijavanje u periodu do 1 h nije dovelo do značajnog smanjenja antocijanina (Slika 4.25). Zagrijavanje u periodu od 4 h uzrokuje smanjenja masenog udjela delfinidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3,5-*O*-diglukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3,5-*O*-diglukozida, malvidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-glukozida na 70,55 %, 75,98 %, 69,45 %, 79,36 %, 81,44 %, 70,03 %, 76,72 % odnosno 76,85 % početnog masenog udjela (Tablica 4.25). Tijekom zagrijavanja pri 80 °C opaženo je značajno veće smanjenje masenog udjela svih ispitanih antocijanina (Slika 4.25). Nakon zagrijavanja u trajanju od 4 h smanjenje masenog udjela antocijanina u odnosu na početni maseni udio bio je u rasponu od 42,39 % do 61,97 % za peonidin-3,5-*O*-diglukozid odnosno delfinidin-3-*O*-glukozid (Tablica 4.26). Stupanj razgradnje antocijanina uvelike ovisi o primijenjenoj temperaturi, vremenu zagrijavanja, ali i o samoj strukturi pojedinog antocijanina. U usporedbi s odgovarajućim 3-*O*-glukozidima, 3,5-*O*-diglukozidi značajno su stabilniji. U nizu ispitanih antocijanina stupanj razgradnje povećava se slijedećim redoslijedom: peonidin<malvidin<cijanidin<delfinidin za 3-*O*-glukozidima kao i za 3,5-*O*-diglukozidi. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na aromatskom prstenu imaju važnu ulogu u termičkoj stabilnosti odgovarajućeg antocijanina. Dobiveni rezultati u potpunosti su u skladu s ranijim provedenima istraživanjima.[214,215] Općenito, tijekom zagrijavanja antocijanina prvo dolazi do otvaranja prstena C uz nastajanje čalkon-glukozida, a nakon čega slijedi reakcija deglikozilacije pri čemu nastaje čalkon. Dodatnim cijepanjem prstena B čalkona nastaju odgovarajuće hidroksibenzojeve kiseline. Tako je npr. krajnji produkt termičke razgradnje cijanidin-3-*O*-glukozida prokatehinska kiselina, a delfinidin-3-*O*-glukozida galna kiselina.



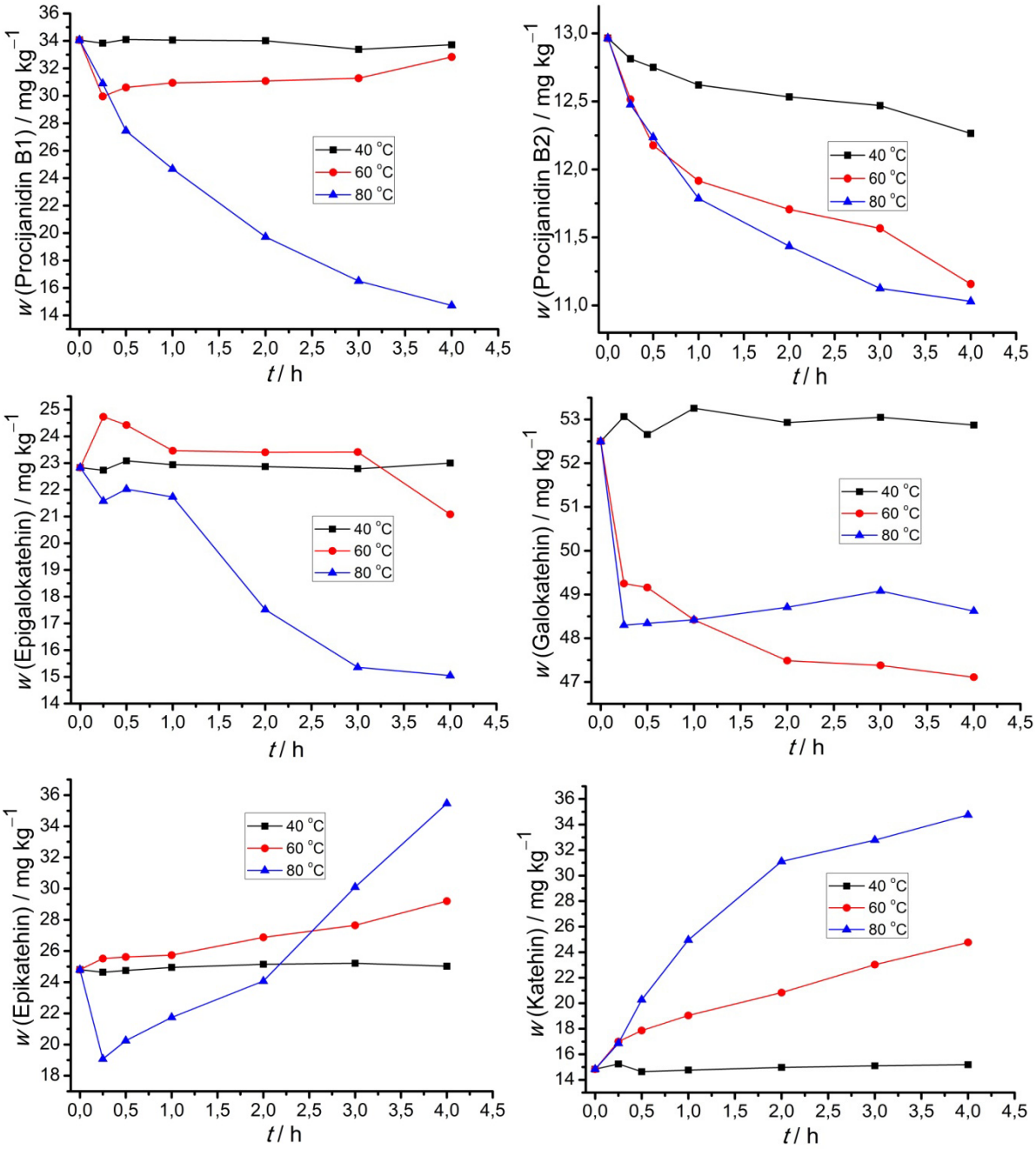
Slika 4.25. Ovisnost masenog udjela antocijanina o vremenu i temperaturi inkubacije

Na slici 4.26 prikazana je ovisnost masenog udjela pojedinih flavonola o vremenu i temperaturi inkubacije. Kao i u slučaju antocijanina, nakon zagrijavanja u periodu od 4 h pri temperaturi od 40 °C nije opaženo statistički značajno smanjenje masenog udjela ovih spojeva. Povišenjem temperature na 60 °C dolazi do značajnog smanjenja masenih udjela flavonola, a stupanj razgradnje ovisi o kemijskoj strukturi pripadnog spoja kao i o vremenu inkubacije. Nakon 15 min zagrijavanja pri 60 °C održano je 91 % masenog udjela pojedinih flavonola u odnosu na početne vrijednosti, dok se nakon 4 h zagrijavanja maseni udio miricetin-3-*O*-glukozida, rutina, kvercetin-3-*O*-glukuronida, kvercetin-3-*O*-glukozida i kemferol-3-*O*-glukuronida smanjio na 93,96 %, 92,95 %, 78,66 %, 88,29 % odnosno 84,91 % početnog masenog udjela (Tablica 4.25). Najveće smanjenje masenog udjela flavonola opaženo je u ekstraktima zagrijavanim pri 80 °C. U slučaju gotovo svih flavonola najizraženije smanjenje masenog udjela opaženo je nakon 15 min inkubacije, uz iznimku kemferol-3-*O*-glukuronida kod kojeg je najizraženije smanjenje masenog udjela opaženo nakon 2 h (Slika 4.26). Nakon 4 h inkubacije smanjenje masenog udjela flavonola u odnosu na početni maseni udio bio je u rasponu od 39,04 % do 17,57 % za kvercetin-3-*O*-glukuronid odnosno kvercetin-3-*O*-glukozid (Tablica 4.26). Pri niskim pH-vrijednostima u uvjetima povišene temperature dolazi do deglikozilacije flavonol-3-*O*-glikozida, a pri čemu nastaju odgovarajući aglikon i šećer. Nakon provedene inkubacije ekstrakata pri 60 °C i 80 °C u dobivenim kromatogramima opažena je prisutnost aglikona, a čiji se maseni udio povećavao s povišenjem temperature i trajanjem zagrijavanja. Opaženo je gotovo linearno povećanje masenog udjela odgovarajućeg aglikona sa smanjenjem masenog udjela pripadnog flavonol-3-*O*-glikozida. Ovoj tezi u prilog ide opažanje da su korelacije između masenih udjela odgovarajućih flavonol-3-*O*-glikozida i nastalih aglikona određene u rasponu od –0,9418 do –0,9863 za par kemferol-3-*O*-glukuronid/kemferol odnosno kvercetin-3-*O*-glikozide/kvercetin (Dodatak Slika 7.3).



Slika 4.26. Ovisnost masenog udjela flavonola o vremenu i temperaturi inkubacije

Temperatura i vrijeme zagrijavanja uvelike utječu na stabilnost flavan-3-ola (Slika 4.27). Najveća stabilnost ove skupine spojeva opažena je tijekom zagrijavanja ekstrakata pri 40 °C. U tim uzorcima nije opaženo smanjenje masenog udjela pojedinih flavan-3-ola (Tablica 4.24). Temeljem rezultata dobivenih u ekstraktima zagrijavanim pri višim temperaturama (60 °C i 80 °C), flavan-3-oli se mogu podijeliti u dvije skupine. U prvu skupinu su uključeni oni spojevi čiji se maseni udio tijekom zagrijavanja smanjuje, dok su u drugu uključeni oni čiji se maseni udio povećava. Galokatehin te procijanidini B1 i B2 pripadaju prvoj skupini, dok katehin i epikatehin pripadaju drugoj. Maseni udio epigalokatehina tijekom zagrijavanja pri 60 °C u periodu od 15 min povećava se na 107,69 % početnog masenog udjela, da bi se potom daljnjim zagrijavanjem polako smanjivao i nakon 4 h dosegao 92,33 % početnog masenog udjela. Tijekom inkubacije pri 80 °C u čitavom vremenskom periodu opaženo je smanjivanje masenog udjela ovoga spoja. Nakon 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h i 4 h maseni udio epigalokatehina smanjio se na 94,52 %, 96,45 %, 95,18 %, 76,73 %, 67,26 % odnosno 65,90 % početnog masenog udjela (Tablica 4.26). Smanjenje masenog udjela galokatehina i procijanidina B1 izraženije je pri 80 °C, a nakon 4 h zagrijavanja dolazi do smanjenja masenog udjela ovih spojeva na 92,61 % odnosno 65,90 % početnog masenog udjela. Galokatehin i epigalokatehin dva su epimera iste molekulske formule. Poznato je su epi-strukture u odnosu na neepi-strukture značajno stabilnije te da pri višim temperaturama dolazi do epimerizacije epi-strukture u neepi-strukturu[216,217] čime se može objasniti značajno manje smanjenje masenog udjela galokatehina (7,39 %) u odnosu na epigalokatehin (34,10 %). Nakon zagrijavanja u trajanju od 15 min pri 60 °C i 80 °C opaženo je značajno povećanje masenog udjela katehina i epikatehina. Dodatno zagrijavanje dovodi do još značajnijeg porasta masenog udjela ovih spojeva, pri obje temperature. Nakon 4 h zagrijavanja katehin doseže 140,08 % i 157,30 % početnog masenog udjela pri 60 °C odnosno 80 °C. Povećanje masenog udjela epikatehina pri istim temperaturama u istom vremenskom periodu nešto je manje (115,05 % pri 60 °C i 130,05 % pri 80 °C). Povećanje masenih udjela katehina i epikatehina može biti posljedica hidrolize terminalnih jedinica tanina sadržanih u ekstraktima kožica bobica grožđa kao i razgradnje procijanidina B1 i B2. Tanini kožica grožđa izgrađeni su od monomernih oblika flavan-3-ola međusobno povezanih intraflavanskim vezama. Epikatehin i katehin najčešće su terminalne jedinice tanina kožica bobica grožđa.[44] S obzirom da ne postoje steričke smetnje, tijekom hidrolize tanina prvo dolazi do cijepanja terminalnih jedinica, a tijekom duljeg zagrijavanja pri višim temperaturama dolazi do obilnijeg cijepanja tanina i otpuštanja terminalnih jedinica.



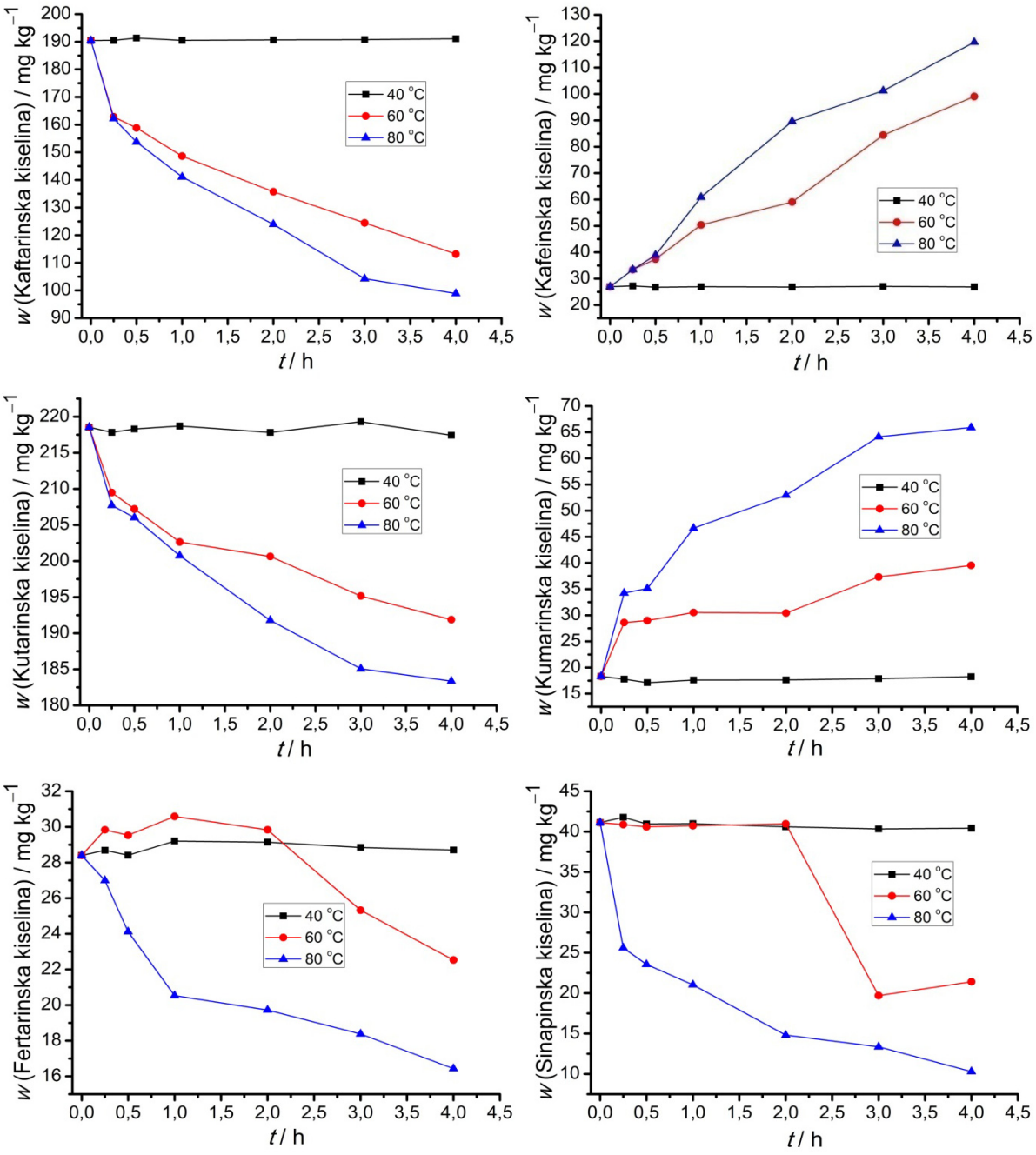
Slika 4.27. Ovisnost masenog udjela flavan-3-ola o vremenu i temperaturi inkubacije

4.3.1.2. Ostale skupine spojeva

Ovisnosti masenih udjela pojedinih hidroksicimetnih kiselina o temperaturi i vremenu inkubacije prikazane su na slici 4.28. Statistički značajne promjene u masenim udjelima prilikom zagrijavanja ekstrakata pri 40 °C nisu opažene (Tablica 4.27). Kaftarinska kiselina je tartaratni ester kafeinske kiseline, dok je kutarinska kiselina tartaratni ester kumarinske kiseline. Pri temperaturama zagrijavanja od 60 °C i 80 °C dolazi do značajnog smanjenja masenih udjela kaftarinske i kutarinske kiseline, ali i do povećanja masenih udjela kafeinske i kumarinske kiseline, a što je značajnije izraženo pri 80 °C. Dobiveni se rezultati mogu objasniti hidrolizom odgovarajućih estera. Koeficijenti korelacije određeni pri 60 °C i 80 °C za par kaftarinska/kafeinska kiselina iznose –0,9863 odnosno –0,9934, a za par kutarinska/kumarinska kiselina –0,9753 odnosno –0,9862, a što ide u prilog tezi da dolazi do hidrolize kaftarinske i kutarinske kiseline uz nastajanje kafeinske odnosno kumarinske kiseline i tartaratnog aniona. Nakon 4 h zagrijavanja pri 60 °C maseni udio fertarinske i sinapinske kiseline smanjio se na 79,34 % odnosno 52,06 % početnog masenog udjela (Tablica 4.28). Smanjenje masenih udjela ovih kiselina značajnije je pri 80 °C. Nakon 4 h inkubacije preostaje 57,88 % i 25,05 % početnog masenog udjela fertarinske i sinapinske kiseline (Tablica 4.29).

Prilikom zagrijavanja ekstrakata kožica bobica grožđa pri temperaturama od 60 °C i 80 °C dolazi do značajnog povećanja masenih udjela galne i prokatehinske kiseline (Slika 4.29). Veliko povećanje masenog udjela prokatehinske kiseline posljedica je termičke razgradnje cijanidin-3-*O*-glukozida. U prilog ovoj tezi idu veliki koeficijenti korelacije određeni pri obje temperature s vrijednostima od –0,9889 odnosno –0,9967 (Dodatak Slika 7.4). Povećanje masenog udjela galne kiseline može biti posljedica hidrolize galotanina i galoiliranih oblika flavan-3-ola, ali i termičke razgradnje delfinidin-3-*O*-glukozida.

Stilben, *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozid ima vrlo veliku termičku stabilnost (Slika 4.29). Pri temperaturi od 40 °C tijekom čitavog perioda zagrijavanja nije opažena statistički značajna promjena masenog udjela ovoga spoja. U ekstraktima zagrijavanim pri 60 °C i 80 °C u trajanju od 4 h preostalo je 94,68 % odnosno 91,38 % početnog masenog udjela ovog stilbena.



Slika 4.28. Ovisnost masenog udjela hidroksicimetnih kiselina o vremenu i temperaturi inkubacije

Tablica 4.27. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 40 °C

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	15min	30 min	1h	2h	3h	4h
Kaftarinska kiselina	190,43^{a} ± 0,70	190,49^{a} ± 1,18	191,33^{a} ± 0,50	190,50^{a} ± 0,70	190,65^{a} ± 0,49	190,76^{a} ± 0,49	191,09^{a} ± 0,49
Kafeinska kiselina	26,94^{a} ± 0,60	27,24^{a} ± 0,59	26,76^{a} ± 0,55	26,94^{a} ± 0,55	26,84^{a} ± 0,55	27,04^{a} ± 0,61	26,87^{a} ± 0,60
p-Kutarinska kiselina	218,55^{a} ± 0,49	217,84^{a} ± 0,49	218,29^{a} ± 0,49	218,71^{a} ± 0,49	217,82^{a} ± 0,49	218,30^{a} ± 0,90	217,42^{a} ± 0,49
p-Kumarinska kiselina	18,33^{a} ± 0,56	17,79^{a} ± 0,56	17,11^{a} ± 0,03	17,61^{a} ± 0,55	17,63^{a} ± 0,56	17,88^{a} ± 0,55	18,25^{a} ± 0,56
Fertarinska kiselina	28,40^{a} ± 0,55	28,68^{a} ± 0,62	28,41^{a} ± 0,57	29,21^{a} ± 0,55	29,14^{a} ± 0,62	28,85^{a} ± 0,56	28,70^{a} ± 0,56
Sinapinska kiselina	41,46^{a} ± 0,59	41,79^{a} ± 0,54	40,96^{a} ± 1,04	41,33^{a} ± 0,99	40,60^{a} ± 1,05	40,33^{a} ± 1,04	40,43^{a} ± 1,04
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	**523,78^{a} ± 1,70**	**523,82^{a} ± 2,86**	**522,87^{a} ± 1,08**	**523,96^{a} ± 1,94**	**522,67^{a} ± 1,72**	**524,15^{a} ± 1,14**	**522,76^{a} ± 1,13**
Galna kiselina	39,73^{a} ± 0,54	39,77^{a} ± 0,54	40,32^{a} ± 0,54	41,16^{a} ± 0,61	40,84^{a} ± 0,62	41,01^{a} ± 0,95	41,20^{a} ± 0,56
Prokatehinska kiselina	143,09^{a} ± 0,50	142,56^{a} ± 0,50	142,77^{a} ± 0,50	143,21^{a} ± 0,69	142,52^{a} ± 1,00	142,63^{a} ± 0,50	142,85^{a} ± 0,85
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	**182,82^{a} ± 1,04**	**182,33^{a} ± 1,04**	**183,09^{a} ± 1,04**	**184,37^{a} ± 1,30**	**183,35^{a} ± 0,70**	**183,65^{a} ± 1,35**	**184,39^{a} ± 0,36**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	144,28^{a} ± 0,50	143,65^{a} ± 0,50	143,65^{a} ± 0,50	143,61^{a} ± 0,50	143,79^{a} ± 0,50	144,14^{a} ± 0,69	144,44^{a} ± 0,50

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.28. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 60 °C

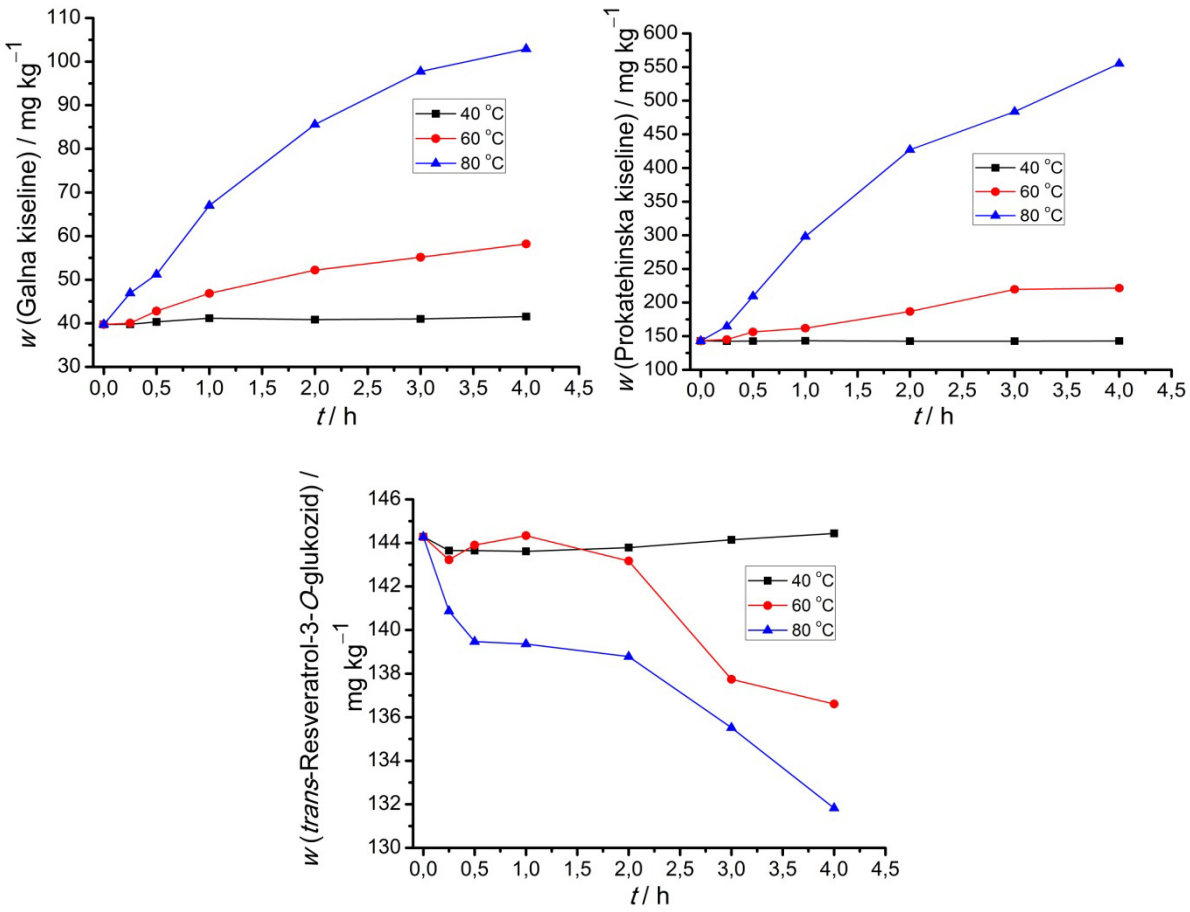
Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	15min	30 min	1h	2h	3h	4h
Kaftarinska kiselina	190,43^{a} ± 0,70	162,84^{b} ± 0,50	158,82^{c} ± 0,50	148,62^{d} ± 0,50	135,73^{e} ± 0,50	124,64^{f} ± 0,48	113,19^{g} ± 0,50
Kafeinska kiselina	26,94^{a} ± 0,60	33,42b ± 0,55	37,41^{c} ± 0,55	50,36^{d} ± 0,55	59,06^{e} ± 0,54	84,39^{f} ± 0,54	99,05^{g} ± 0,54
p-Kutarinska kiselina	218,55^{a} ± 0,49	209,23^{b} ± 0,30	208,30^{c} ± 1,50	202,64^{d} ± 0,49	200,64^{e} ± 0,34	195,16^{f} ± 0,49	191,87^{g} ± 0,49
p-Kumarinska kiselina	18,33^{a} ± 0,56	28,60^{b} ± 0,56	29,00^{b,c} ± 0,56	30,53^{c} ± 0,55	30,42^{c} ± 0,55	37,31^{d} ± 0,55	39,53^{e} ± 0,55
Fertarinska kiselina	28,40^{a} ± 0,55	29,84^{a} ± 0,55	29,53^{a} ± 0,55	29,59^{a} ± 0,55	29,84^{a} ± 0,55	25,32^{b} ± 0,55	22,53^{c} ± 0,55
Sinapinska kiselina	41,46^{a} ± 0,59	40,87^{a} ± 1,04	40,60^{a} ± 1,03	40,73^{a} ± 0,55	40,96^{a} ± 0,99	19,70^{b} ± 0,55	20,41^{b} ± 0,55
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	**523,78^{a} ± 1,70**	**504,09^{b} ± 1,37**	**504,70^{b,c} ± 2,22**	**503,47^{b,c} ± 3,16**	**496,64^{c} ± 3,16**	**486,31^{d} ± 3,16**	**487,58^{d} ± 3,16**
Galna kiselina	39,73^{a} ± 0,54	40,03^{a} ± 0,54	42,80^{b} ± 0,54	46,87^{c} ± 0,54	52,19^{d} ± 0,54	55,13^{e} ± 0,54	58,20^{f} ± 0,54
Prokatehinska kiselina	143,09^{a} ± 0,50	145,05^{b} ± 0,17	156,36^{c} ± 0,50	161,92^{d} ± 0,50	186,80^{e} ± 0,49	219,50^{f} ± 0,49	221,39^{g} ± 0,49
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	**182,82^{a} ± 1,04**	**185,08^{a} ± 0,49**	**199,17^{b} ± 1,04**	**209,19^{c} ± 1,09**	**238,99^{d} ± 1,02**	**274,64^{e} ± 1,01**	**279,59^{f} ± 1,01**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	144,28^{a} ± 0,50	143,22^{a} ± 0,50	143,90^{a} ± 1,00	144,33^{a} ± 0,50	143,17^{a} ± 0,50	137,74^{b} ± 0,51	136,61^{b} ± 0,51

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.29. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 80 °C

Spoj	*w* / mg kg^{-1}						
	0 min	**15min**	**30 min**	**1h**	**2h**	**3h**	**4h**
Kaftarinska kiselina	$190,43^{a} \pm 0,70$	$162,24^{b} \pm 0,50$	$153,75^{c} \pm 0,50$	$141,08^{d} \pm 0,50$	$123,97^{e} \pm 0,51$	$104,26^{f} \pm 0,52$	$98,89^{g} \pm 0,52$
Kafeinska kiselina	$26,94^{a} \pm 0,60$	$33,42^{b} \pm 0,55$	$38,92^{c} \pm 0,54$	$60,88^{d} \pm 0,53$	$89,62^{e} \pm 0,52$	$101,18^{f} \pm 0,52$	$119,61^{g} \pm 0,51$
p-Kutarinska kiselina	$218,55^{a} \pm 0,49$	$207,72^{b} \pm 0,49$	$206,02^{c} \pm 0,49$	$200,74^{d} \pm 0,49$	$191,79^{e} \pm 0,49$	$185,07^{f} \pm 0,49$	$183,36^{g} \pm 0,50$
p-Kumarinska kiselina	$18,33^{a} \pm 0,56$	$34,27^{b} \pm 0,56$	$35,11^{b} \pm 0,56$	$46,64^{c} \pm 0,55$	$52,96^{d} \pm 0,55$	$64,12^{e} \pm 0,54$	$65,89^{f} \pm 0,54$
Fertarinska kiselina	$28,40^{a} \pm 0,55$	$26,99^{a} \pm 0,55$	$24,11^{b} \pm 0,55$	$20,53^{c} \pm 0,55$	$19,72^{c,d} \pm 0,55$	$18,38^{d} \pm 0,56$	$16,44^{e} \pm 0,56$
Sinapinska kiselina	$41,46^{a} \pm 0,59$	$25,62^{b} \pm 0,55$	$23,57^{c} \pm 0,55$	$21,04^{d} \pm 0,55$	$14,81^{e} \pm 0,56$	$13,37^{e} \pm 0,56$	$10,30^{f} \pm 0,56$
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$\mathbf{523,78^{a} \pm 1,70}$	$\mathbf{490,27^{b} \pm 3,16}$	$\mathbf{481,49^{c} \pm 3,16}$	$\mathbf{490,91^{b} \pm 3,16}$	$\mathbf{492,86^{b} \pm 3,16}$	$\mathbf{486,37^{b,c} \pm 3,16}$	$\mathbf{494,48^{d} \pm 3,16}$
Galna kiselina	$39,73^{a} \pm 0,54$	$46,94^{b} \pm 0,54$	$51,22^{c} \pm 0,54$	$67,00^{d} \pm 0,53$	$85,58^{e} \pm 0,52$	$97,73^{f} \pm 0,52$	$102,92^{g} \pm 0,52$
Prokatehinska kiselina	$143,09^{a} \pm 0,50$	$164,62^{b} \pm 0,50$	$209,29^{c} \pm 0,49$	$298,20^{d} \pm 0,49$	$427,09^{e} \pm 0,53$	$483,68^{f} \pm 0,56$	$555,14^{g} \pm 0,61$
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	$\mathbf{182,82^{a} \pm 1,04}$	$\mathbf{211,55^{b} \pm 1,03}$	$\mathbf{260,51^{c} \pm 1,02}$	$\mathbf{365,20^{d} \pm 0,99}$	$\mathbf{512,67^{e} \pm 0,98}$	$\mathbf{581,41^{f} \pm 0,99}$	$\mathbf{658,05^{g}}$ **1,00**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	$144,28^{a} \pm 0,50$	$140,87^{b} \pm 0,50$	$139,47^{b,c} \pm 0,51$	$139,36^{c} \pm 0,51$	$138,78^{c} \pm 0,51$	$135,52^{d} \pm 0,51$	$131,82^{e} \pm 0,51$

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)



Slika 4.29. Ovisnost masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina i stilbena o vremenu i temperaturi inkubacije

4.3.2. Utjecaj termosoniciranja na stabilnost fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa

Ekstrakti kožica bobica grožđa zagrijavani su pri temperaturama od 50 °C, 60 °C i 70 °C uz primjenu ultrazvuka frekvencije 35 kHz u vremenskom periodu od 5 min do 90 min. Maseni udjeli pojedinih antocijanina, flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena određeni su po završetku zagrijavanja primjenom metode HPLC i prikazani su u tablicama 4.30 do 4.35.

Tablica 4.30. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 50 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	5min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	931,37^{a} ± 0,79	931,35^{a,b} ± 1,16	912,58^{b} ± 1,06	899,51^{c} ± 1,12	894,64^{d} ± 1,11	884,88^{e} ± 1,09	850,88^{f} ± 1,03
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	824,60^{a} ± 0,71	824,41^{a} ± 1,05	818,66^{b} ± 0,58	812,12^{c} ± 0,93	806,36^{d} ± 1,47	776,57^{e} ± 0,90	748,20^{f} ± 0,85
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7213,56^{a} ± 1,22	7213,22^{a} ± 0,97	7213,06^{a} ± 1,04	7172,23^{b} ± 0,75	7129,37^{c} ± 0,70	7007,56^{d} ± 1,42	6783,35^{e} ± 1,30
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1040,61^{a} ± 1,29	1040,44^{a} ± 0,62	1039,67^{a} ± 0,91	1036,55^{b} ± 1,31	1028,35^{c} ± 1,35	1019,62^{d} ± 0,88	995,46^{e} ± 0,65
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10456,47^{a} ± 1,45	10456,08^{a} ± 1,42	10403,32^{b} ± 3,34	10401,89^{b} ± 2,36	10292,16^{c} ± 3,16	10210,74^{d} ± 3,25	9980,86^{e} ± 2,97
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1829,89^{a} ± 2,06	1829,49^{a} ± 2,15	1823,47^{a,b} ± 2,28	1820,03^{b} ± 1,42	1819,51^{b} ± 3,32	1790,65^{c} ± 3,26	1733,69^{d} ± 3,16
Peonidin-3-*O*-glukozid	384,16^{a} ± 1,64	384,23^{a} ± 1,26	384,37^{a} ± 1,30	384,00^{a} ± 1,57	383,41^{a} ± 0,70	379,25^{b} ± 0,69	368,37^{c} ± 0,67
Malvidin -3-*O*-glukozid	5944,25^{a} ± 2,56	5942,97^{a,b} ± 2,90	5937,99^{b} ± 1,44	5927,42^{c} ± 1,19	5906,57^{d} ± 1,82	5833,28^{e} ± 1,21	5657,65^{f} ± 1,01
UKUPNI ANTOCIJANINI	**28624,92^{a} ± 8,05**	**28622,19^{a} ± 2,99**	**28533,12^{b} ± 5,38**	**28453,76^{c} ± 3,75**	**28260,36^{d} ± 7,38**	**27902,53^{e} ± 3,68**	**27118,45^{f} ± 9,31**
Miricetin-3-*O*-glukozid	581,81^{a} ± 1,51	581,40^{a} ± 0,83	578,26^{b} ± 1,05	578,31^{b} ± 1,05	575,69^{b,c} ± 1,05	575,10^{c} ± 0,84	570,73^{d} ± 1,04
Rutin	171,00^{a} ± 0,68	170,54^{a} ± 0,31	170,80^{a} ± 0,39	171,09^{a} ± 0,39	170,64^{a} ± 0,39	170,87^{a} ± 0,39	170,20^{a} ± 0,31
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	117,67^{a} ± 0,22	117,20^{a} ± 1,86	113,37^{b} ± 0,21	113,70^{b} ± 0,21	112,89^{b} ± 0,21	112,50^{b} ± 0,21	112,63^{b} ± 0,21
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1765,68^{a} ± 1,20	1765,47^{a} ± 1,10	1764,26^{a} ± 0,70	1759,97^{b} ± 0,76	1759,83^{b} ± 0,76	1759,96^{b} ± 0,67	1760,09^{b} ± 0,67
Kemferol-3-*O*-glukuronid	35,86^{a} ± 0,41	35,46^{a} ± 0,06	35,93^{a} ± 0,07	36,10^{a} ± 0,53	35,54^{a} ± 0,53	35,69^{a} ± 0,57	35,71^{a} ± 0,57
UKUPNI FLAVONOLI	**2672,02^{a} ± 3,60**	**2671,07^{a} ± 2,16**	**2662,63^{b} ± 2,36**	**2659,17^{b,c} ± 1,80**	**2654,59^{c} ± 1,79**	**2654,12^{c} ± 1,49**	**2649,37^{d} ± 2,37**
Galokatehin	53,75^{a} ± 0,52	53,69^{a} ± 0,10	53,58^{a} ± 0,49	53,05^{a} ± 0,57	52,79^{a} ± 0,50	53,08^{a} ± 0,50	52,86^{a} ± 0,67
Procijanidin B1	33,77^{a} ± 0,24	34,12^{a} ± 0,53	33,93^{a} ± 0,06	34,14^{a} ± 0,53	33,95^{a} ± 0,53	33,55^{a} ± 0,64	33,77^{a} ± 0,53
Epigalokatehin	22,81^{a} ± 0,28	22,57^{a} ± 0,04	22,83^{a} ± 0,04	22,77^{a} ± 0,63	23,13^{a} ± 0,59	23,08^{a} ± 0,57	22,77^{a} ± 0,62
Katehin	14,87^{a} ± 0,33	14,52^{a} ± 0,03	16,92^{b} ± 0,03	17,87^{c} ± 0,03	27,32^{d} ± 0,03	28,05^{e} ± 0,03	29,62^{f} ± 0,04
Procijanidin B2	12,47^{a} ± 0,15	12,95^{a} ± 0,02	13,22^{b} ± 0,02	13,64^{b} ± 0,02	15,86^{c} ± 0,03	16,54^{d} ± 0,03	17,42^{e} ± 0,03
Epikatehin	24,45^{a} ± 0,23	24,52^{a} ± 0,54	24,37^{a} ± 0,54	24,48^{a} ± 0,57	25,44^{a,b} ± 0,05	26,34^{b} ± 0,05	27,74^{c} ± 0,05
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	**162,12^{a} ± 0,18**	**162,04^{a} ± 0,94**	**164,85^{a} ± 0,71**	**165,96^{b} ± 1,32**	**178,49^{c} ± 1,37**	**180,63^{c} ± 0,36**	**184,18^{d} ± 0,93**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.31. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**5min**	**15 min**	**30 min**	**45 min**	**60 min**	**90 min**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	$931{,}37^{a} \pm 0{,}79$	$792{,}63^{b} \pm 1{,}44$	$782{,}74^{c} \pm 1{,}43$	$767{,}50^{d} \pm 1{,}40$	$756{,}32^{e} \pm 1{,}38$	$684{,}15^{f} \pm 1{,}25$	$676{,}76^{g} \pm 1{,}23$
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	$824{,}60^{a} \pm 0{,}71$	$613{,}58^{b} \pm 1{,}12$	$612{,}25^{b} \pm 1{,}12$	$608{,}78^{c} \pm 1{,}11$	$598{,}57^{d} \pm 1{,}09$	$578{,}31^{e} \pm 1{,}05$	$569{,}00^{f} \pm 1{,}04$
Delfinidin-3-*O*-glukozid	$7213{,}56^{a} \pm 1{,}22$	$6332{,}11^{b} \pm 2{,}30$	$6273{,}31^{b} \pm 2{,}22$	$5911{,}10^{c} \pm 57{,}90$	$5819{,}37^{d} \pm 1{,}74$	$5772{,}96^{d} \pm 1{,}71$	$5219{,}84^{e} \pm 1{,}00$
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	$1040{,}61^{a} \pm 1{,}29$	$950{,}38^{b} \pm 1{,}73$	$943{,}12^{c} \pm 1{,}72$	$903{,}85^{d} \pm 1{,}65$	$901{,}12^{d} \pm 1{,}64$	$889{,}93^{e} \pm 1{,}62$	$840{,}82^{f} \pm 1{,}53$
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	$10456{,}47^{a} \pm 1{,}45$	$9817{,}34^{b} \pm 2{,}67$	$9736{,}02^{c} \pm 2{,}53$	$9417{,}93^{d} \pm 56{,}41$	$9287{,}70^{e} \pm 1{,}73$	$9250{,}01^{e} \pm 1{,}66$	$8688{,}31^{f} \pm 0{,}74$
Cijanidin-3-*O*-glukozid	$1829{,}89^{a} \pm 2{,}06$	$1612{,}52^{b} \pm 1{,}91$	$1598{,}61^{c} \pm 1{,}88$	$1484{,}04^{d} \pm 1{,}68$	$1464{,}53^{e} \pm 0{,}97$	$1454{,}37^{f} \pm 1{,}63$	$1342{,}69^{g} \pm 1{,}92$
Peonidin-3-*O*-glukozid	$384{,}16^{a} \pm 1{,}64$	$351{,}15^{b} \pm 0{,}64$	$346{,}35^{c} \pm 0{,}63$	$326{,}83^{d} \pm 0{,}60$	$320{,}32^{e} \pm 0{,}58$	$312{,}41^{f} \pm 0{,}59$	$301{,}69^{g} \pm 0{,}55$
Malvidin -3-*O*-glukozid	$5944{,}25^{a} \pm 2{,}56$	$5464{,}19^{b} \pm 1{,}59$	$5373{,}00^{c} \pm 1{,}59$	$5063{,}48^{d} \pm 3{,}29$	$5026{,}38^{e} \pm 3{,}27$	$4998{,}53^{f} \pm 1{,}50$	$4646{,}13^{g} \pm 2{,}12$
UKUPNI ANTOCIJANINI	$\mathbf{28624{,}92^{a} \pm 8{,}05}$	$\mathbf{25933{,}90^{b} \pm 11{,}41}$	$\mathbf{25665{,}40^{c} \pm 10{,}93}$	$\mathbf{24416{,}84^{d} \pm 62{,}60}$	$\mathbf{24174{,}30^{e} \pm 9{,}12}$	$\mathbf{23940{,}67^{f} \pm 9{,}81}$	$\mathbf{22285{,}24^{g} \pm 4{,}72}$
Miricetin-3-*O*-glukozid	$581{,}81^{a} \pm 1{,}51$	$487{,}93^{b} \pm 0{,}89$	$487{,}70^{b} \pm 0{,}75$	$479{,}77^{c} \pm 0{,}87$	$478{,}84^{c} \pm 0{,}87$	$477{,}46^{c} \pm 0{,}46$	$466{,}84^{d} \pm 0{,}85$
Rutin	$171{,}00^{a} \pm 0{,}68$	$162{,}39^{b} \pm 0{,}35$	$152{,}47^{c} \pm 0{,}41$	$142{,}63^{d} \pm 0{,}26$	$140{,}32^{e} \pm 0{,}26$	$135{,}81^{f} \pm 0{,}25$	$130{,}99^{g} \pm 0{,}24$
Kvercetin-3-*O*-glukuronid	$117{,}67^{a} \pm 0{,}22$	$84{,}23^{b} \pm 0{,}15$	$81{,}36^{c} \pm 0{,}15$	$81{,}09^{c} \pm 0{,}15$	$80{,}85^{c} \pm 0{,}70$	$80{,}82^{c} \pm 0{,}70$	$77{,}69^{c} \pm 0{,}14$
Kvercetin-3-*O*-glukozid	$1765{,}68^{a} \pm 1{,}20$	$1544{,}90^{b} \pm 2{,}82$	$1545{,}19^{b} \pm 2{,}40$	$1534{,}96^{c} \pm 2{,}80$	$1527{,}43^{d} \pm 2{,}78$	$1523{,}43^{d,e} \pm 2{,}78$	$1516{,}90^{e} \pm 2{,}76$
Kemferol-3-*O*-glukuronid	$35{,}86^{a} \pm 0{,}41$	$32{,}20^{b} \pm 0{,}06$	$31{,}33^{c} \pm 0{,}06$	$30{,}61^{d} \pm 0{,}06$	$30{,}11^{d} \pm 0{,}05$	$30{,}41^{d} \pm 0{,}06$	$30{,}25^{d} \pm 0{,}06$
UKUPNI FLAVONOLI	$\mathbf{2672{,}02^{a} \pm 3{,}60}$	$\mathbf{2291{,}66^{b} \pm 3{,}88}$	$\mathbf{2288{,}05^{b} \pm 2{,}42}$	$\mathbf{2269{,}06^{c} \pm 3{,}30}$	$\mathbf{2259{,}88^{d} \pm 4{,}33}$	$\mathbf{2248{,}27^{d} \pm 3{,}23}$	$\mathbf{2222{,}66^{e} \pm 4{,}23}$
Galokatehin	$53{,}75^{a} \pm 0{,}52$	$48{,}23^{b} \pm 0{,}09$	$48{,}55^{b} \pm 0{,}09$	$48{,}23^{b} \pm 0{,}09$	$48{,}52^{b} \pm 0{,}09$	$48{,}79^{b} \pm 0{,}09$	$47{,}24^{c} \pm 0{,}09$
Procijanidin B1	$33{,}77^{a} \pm 0{,}24$	$30{,}09^{b} \pm 0{,}05$	$29{,}65^{c} \pm 0{,}05$	$29{,}05^{d} \pm 0{,}05$	$28{,}39^{e} \pm 0{,}05$	$27{,}52^{f} \pm 0{,}05$	$25{,}72^{g} \pm 0{,}05$
Epigalokatehin	$22{,}81^{a} \pm 0{,}28$	$22{,}24^{b} \pm 0{,}04$	$21{,}26^{c} \pm 0{,}04$	$20{,}14^{d} \pm 0{,}04$	$19{,}80^{e} \pm 0{,}04$	$18{,}95^{f} \pm 0{,}03$	$18{,}17^{g} \pm 0{,}03$
Katehin	$14{,}87^{a} \pm 0{,}33$	$14{,}16^{b} \pm 0{,}03$	$17{,}28^{c} \pm 0{,}03$	$18{,}55^{d} \pm 0{,}03$	$27{,}73^{e} \pm 0{,}03$	$28{,}51^{f} \pm 0{,}03$	$28{,}54^{f} \pm 0{,}03$
Procijanidin B2	$12{,}47^{a} \pm 0{,}15$	$12{,}64^{a} \pm 0{,}02$	$14{,}43^{b} \pm 0{,}02$	$15{,}41^{c} \pm 0{,}02$	$16{,}85^{d} \pm 0{,}02$	$17{,}59^{e} \pm 0{,}02$	$18{,}36^{f} \pm 0{,}02$
Epikatehin	$24{,}45^{a} \pm 0{,}23$	$24{,}04^{a} \pm 0{,}04$	$24{,}91^{b} \pm 0{,}05$	$25{,}59^{c} \pm 0{,}05$	$26{,}32^{d} \pm 0{,}05$	$26{,}72^{e} \pm 0{,}05$	$27{,}06^{f} \pm 0{,}05$
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	$\mathbf{162{,}12^{a} \pm 0{,}18}$	$\mathbf{151{,}93^{b} \pm 0{,}28}$	$\mathbf{156{,}08^{c} \pm 0{,}28}$	$\mathbf{156{,}96^{c} \pm 0{,}28}$	$\mathbf{167{,}60^{d} \pm 0{,}28}$	$\mathbf{168{,}08^{d} \pm 0{,}28}$	$\mathbf{165{,}08^{a} \pm 0{,}28}$

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

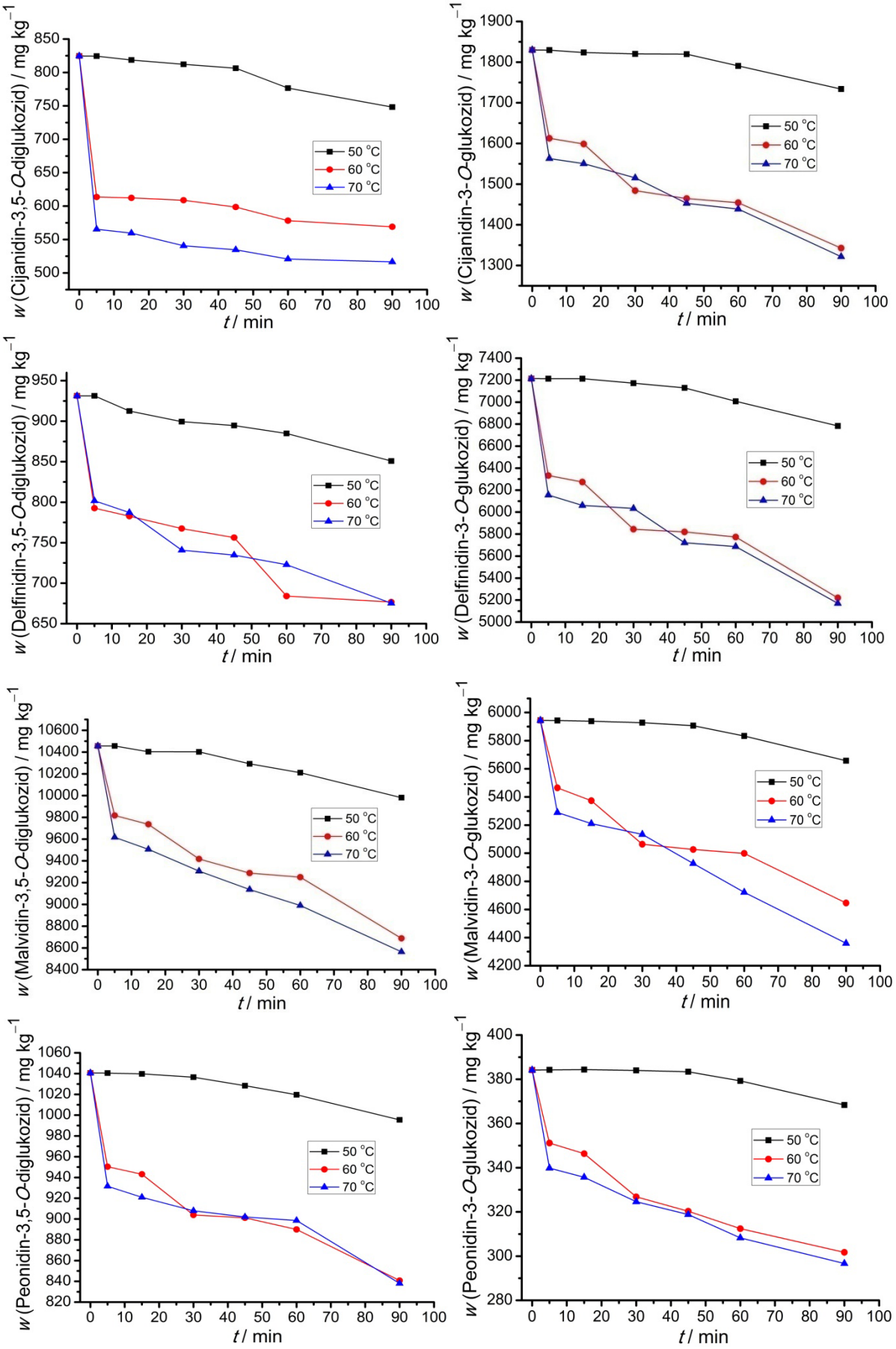
Tablica 4.32. Ovisnost masenog udjela pojedinih flavonoida o vremenu inkubacije određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	5min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	931,37^{a} ± 0,79	790,47^{b} ± 0,08	777,25^{b} ± 1,43	740,83^{c} ± 0,41	734,77^{c} ± 1,34	662,84^{d} ± 1,32	648,63^{d} ± 24,25
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	824,60^{a} ± 0,71	565,39^{b} ± 1,03	559,63^{c} ± 1,02	540,63^{d} ± 0,51	534,74^{e} ± 0,97	520,77^{f} ± 0,95	516,63^{g} ± 0,94
Delfinidin-3-*O*-glukozid	7213,56^{a} ± 1,22	6155,38^{b} ± 2,08	6060,42^{c} ± 1,06	5834,34^{d} ± 1,04	5721,07^{e} ± 2,25	5686,91^{f} ± 1,66	5169,70^{g} ± 1,65
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	1040,61^{a} ± 1,29	931,64^{b} ± 1,70	920,91^{c} ± 1,16	901,29^{d} ± 7,34	883,99^{e} ± 0,62	868,29^{f} ± 1,12	828,08^{g} ± 1,53
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	10456,47^{a} ± 1,45	9616,89^{b} ± 1,27	9506,69^{c} ± 2,12	9305,94^{d} ± 1,78	9136,76^{e} ± 1,47	8990,49^{f} ± 1,22	8564,30^{g} ± 0,59
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1829,89^{a} ± 2,06	1562,89^{b} ± 2,85	1550,31^{b} ± 1,36	1488,68^{c} ± 25,74	1452,79^{d} ± 2,65	1438,76^{d} ± 1,60	1321,75^{e} ± 1,39
Peonidin-3-*O*-glukozid	384,16^{a} ± 1,64	339,80^{b} ± 0,62	335,67^{b} ± 0,61	314,61^{c} ± 0,61	308,80^{d} ± 0,58	303,25^{d} ± 4,86	296,69^{e} ± 0,54
Malvidin -3-*O*-glukozid	5944,25^{a} ± 2,56	5289,18^{b} ± 1,60	5210,55^{c} ± 1,40	5003,45^{d} ± 1,65	4926,52^{e} ± 1,89	4721,96^{f} ± 2,03	4359,79^{g} ± 3,28
UKUPNI ANTOCIJANINI	**28624,92^{a} ± 8,05**	**25262,99^{b} ± 9,64**	**24931,42^{c} ± 7,88**	**24501,77^{d} ± 8,72**	**23727,45^{e} ± 11,32**	**23288,61^{f} ± 6,75**	**21742,24^{g} ± 8,14**
Miricetin-3-*O*-glukozid	581,81^{a} ± 1,51	483,45^{b} ± 0,88	481,25^{b} ± 0,88	475,82^{c} ± 0,87	472,24^{d} ± 0,86	470,13^{d} ± 0,86	460,09^{e} ± 0,84
Rutin	171,00^{a} ± 0,68	157,54^{b} ± 0,25	145,54^{c} ± 0,25	134,52^{d} ± 2,09	130,40^{e} ± 0,24	127,35^{f} ± 0,23	117,47^{g} ± 0,21
Kvercetin-3-*O*-glukuronidi	117,67^{a} ± 0,22	79,19^{b} ± 0,14	78,46^{c} ± 0,14	77,11^{d} ± 0,14	76,84^{d,e} ± 0,14	76,44^{e} ± 0,14	71,84^{f} ± 0,13
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1765,68^{a} ± 1,20	1543,68^{b} ± 2,81	1542,95^{b} ± 1,30	1531,55^{c} ± 2,79	1521,44^{d} ± 2,77	1514,19^{e} ± 2,76	1506,43^{f} ± 2,75
Kemferol-3-*O*-glukuronidi	35,86^{a} ± 0,41	31,13^{b} ± 0,06	30,58^{b} ± 0,06	29,19^{c} ± 0,06	29,48^{c} ± 0,06	29,20^{c} ± 0,05	28,21^{d} ± 0,05
UKUPNI FLAVONOLI	**2672,02^{a} ± 3,60**	**2277,99^{b} ± 4,38**	**2271,78^{b} ± 1,67**	**2249,52^{c} ± 4,31**	**2233,39^{d} ± 4,28**	**2217,30^{e} ± 4,24**	**2184,05^{f} ± 4,15**
Galokatehin	53,75^{a} ± 0,52	47,45^{b} ± 0,09	47,14^{b} ± 0,09	47,27^{b} ± 0,51	47,27^{b} ± 0,50	46,12^{c} ± 0,09	46,18^{c} ± 0,08
Procijanidin B1	33,77^{a} ± 0,24	29,94^{b} ± 0,05	29,45^{b} ± 0,05	28,79^{b,c} ± 0,05	27,13^{c,d} ± 0,05	26,18^{d,e} ± 0,05	25,15^{e} ± 1,78
Epigalokatehin	22,81^{a} ± 0,28	21,23^{b} ± 0,04	20,81^{c} ± 0,04	19,29^{d} ± 0,04	18,83^{e} ± 0,04	17,63^{f} ± 0,04	16,17^{g} ± 0,03
Katehin	14,87^{a} ± 0,33	15,31^{a,b} ± 0,56	16,00^{a,b} ± 0,03	16,53^{b} ± 1,18	30,95^{c} ± 0,06	32,17^{c} ± 0,06	34,00^{d} ± 0,06
Procijanidin B2	12,47^{a} ± 0,15	13,94^{b} ± 0,03	15,86^{c} ± 0,03	16,59^{d} ± 0,02	17,20^{e} ± 0,02	18,90^{f} ± 0,02	19,03^{g} ± 0,02
Epikatehin	24,45^{a} ± 0,23	24,55^{a} ± 0,04	24,90^{b} ± 0,05	25,84^{c} ± 0,05	26,57^{d} ± 0,05	29,57^{e} ± 0,05	32,68^{f} ± 0,06
UKUPNI FLAVAN-3-OLI	**162,12^{a} ± 0,18**	**152,42^{b} ± 0,27**	**154,15^{c} ± 0,28**	**154,30^{c} ± 0,90**	**168,28^{d} ± 0,28**	**170,56^{d,e} ± 0,28**	**172,17^{e} ± 0,28**

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

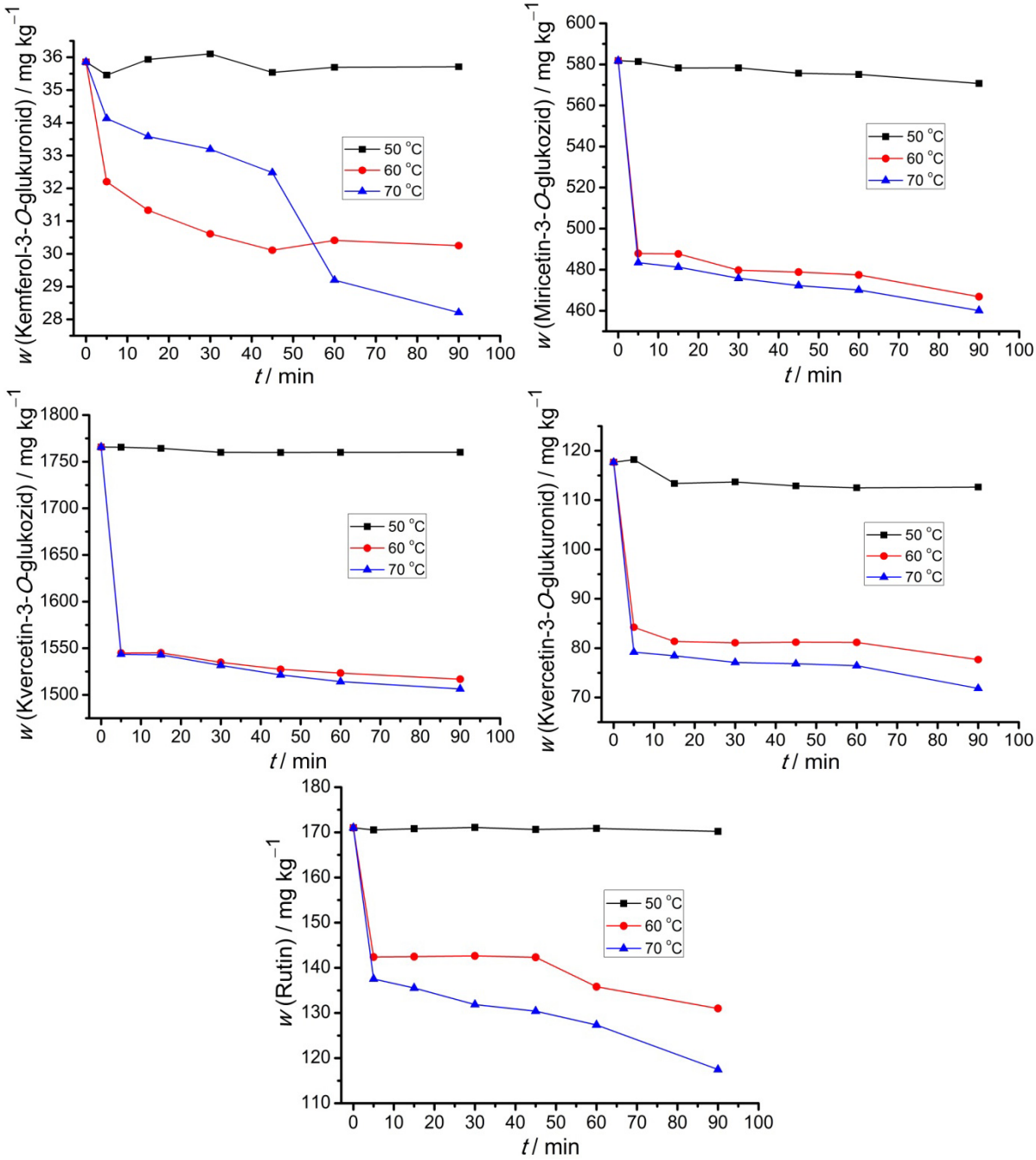
4.3.2.1. Flavonoidi

Vrijeme i temperatura inkubacije imaju značajan učinak na masene udjele svih ispitanih antocijanina (Slika 4.30). U prvih 15 min inkubacije pri 50 °C smanjenje masenih udjela antocijanina je najmanje te je ono u rasponu od 0 % pa do 2,02 % za peonidin-3-*O*-glukozid odnosno delfinidin-3,5-*O*-diglukozid. Dodatnim termosoniciranjem dolazi do daljnjeg smanjenja masenih udjela ovih spojeva da bi nakon 90 min maseni udio delfinidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3,5-*O*-diglukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3,5-*O*-diglukozida, malvidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-glukozida dosegao 91,36 %, 90,70 %, 94,04 %, 95,66 %, 95,45 %, 94,74 %, 95,89 % odnosno 95,18 % početnog masenog udjela (Tablica 4.30). Zagrijavanje pri temperaturi od 60 °C uz primjenu ultrazvuka dovodi do značajnog smanjenja masenog udjela ove skupine spojeva. Do najizraženijeg smanjenja masenog udjela svih ispitanih antocijanina dolazi u prvih 5 min inkubacije te ono iznosi 15,96 %, 25,75 %, 13,03 %, 9,37 %, 6,89 %, 12,64 %, 9,84 % te 9,61 % u slučaju delfinidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3,5-*O*-diglukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3,5-*O*-diglukozida, malvidin-3,5-*O*-diglukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida odnosno malvidin-3-*O*-glukozida. Dodatno termosoniciranje uzrokuje daljnju razgradnju antocijanina (Tablica 4.31). Povišenjem temperature s 60 °C na 70 °C dolazi do nešto veće razgradnje antocijanina, ali opaženo povećanje razgradnje nije toliko izraženo kao u slučaju povišenja temperature s 50 °C na 60 °C (Slika 4.30). Razgradnja antocijanina do koje dolazi djelovanjem ultrazvuka posljedica je ekstremnih fizikalnih uvjeta prisutnih unutar kavitacijskih mjehurića tijekom njihove implozije. Razgradnja antocijanina može biti posljedica sonolize vode jer kavitacije potiču nastanak hidroksilnih radikala. Nastanak ovih radikala smanjuje se s povišenjem temperature te je on značajno veće pri temperaturi od 60 °C nego je to slučaj pri temperaturi od 70 °C, što ukazuje da s povišenjem temperature dolazi do smanjenja broja implozija kavitacijskih mjehurića uslijed ublažavajućeg učinka para unutar mjehurića. Povećanje tlaka para unutar mjehurića uzrokuje smanjenje intenziteta kavitacija pa je time i djelovanje ultrazvuka pri višim temperaturama manje izraženo. Hidroksilni radikali i/ili vodikov peroksid mogu biti uključeni u razgradnju antocijanina tako što potiču otvaranje prstenova i nastanak čalkona. Daljnji tijek ovih reakcija istovjetan je onome do kojeg dolazi pri povišenim temperaturama, ali bez primjene ultrazvuka.[178,218]



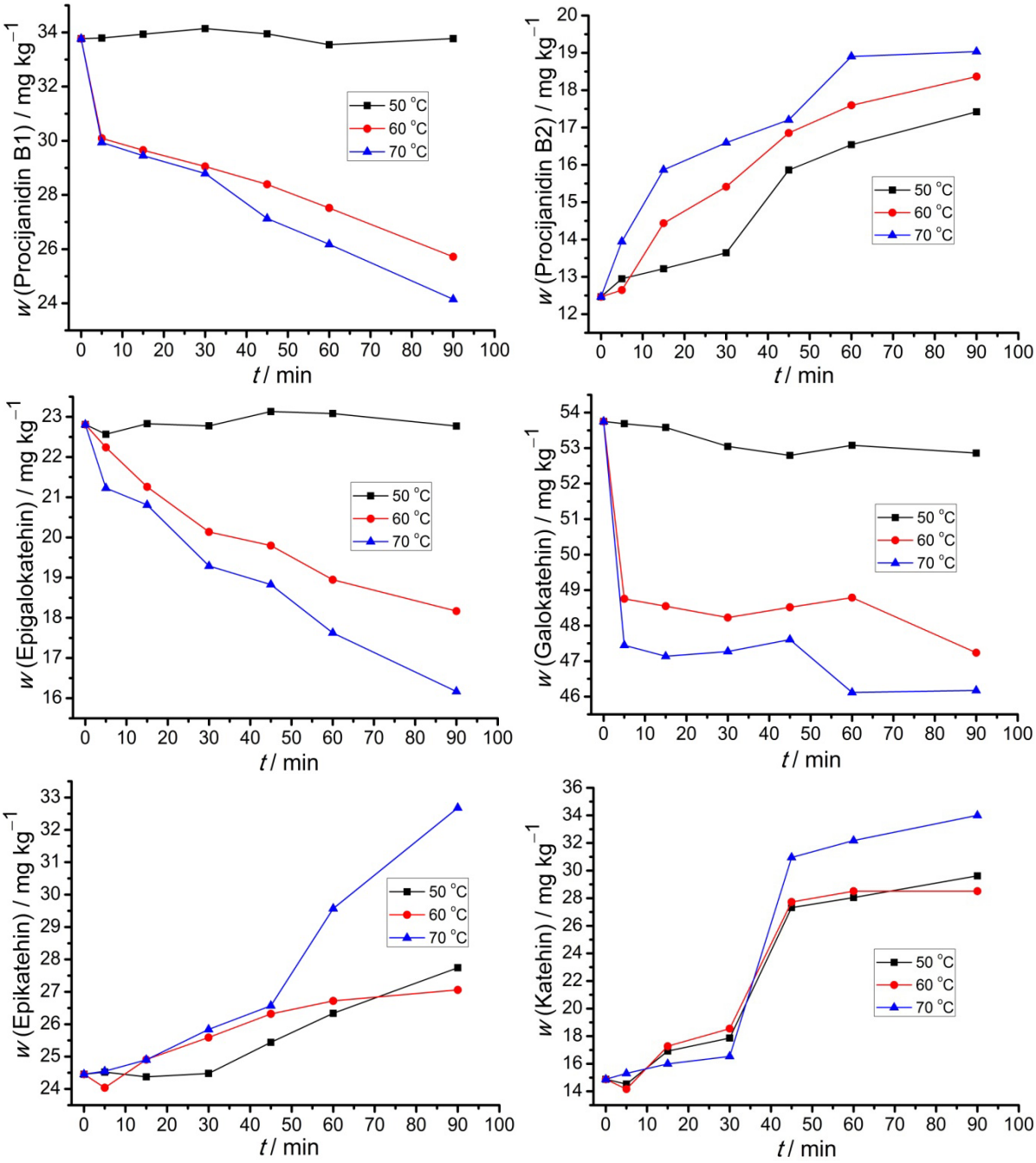
Slika 4.30. Ovisnost masenog udjela antocijanina o vremenu i temperaturi inkubacije uz primjenu ultrazvuka

U prvih 15 min inkubacije pri 50 °C uz primjenu ultrazvuka nije opaženo statistički značajno smanjenje masenog udjela kod gotovo svih ispitanih flavonola (Tablica 4.30). Nakon 90 min inkubacije u slučaju svih ispitanih spojeva preostalo je više od 95 % njihovog početnog masenog udjela. Tijekom zagrijavanja pri 60 °C uz primijenjen ultrazvuk nakon prvih 5 min inkubacije opaženo je značajno smanjenje masenih udjela miricetin-3-*O*-glukozida, rutina, kvercetin-3-*O*-glukuronida, kvercetin-3-*O*-glukozida i kemferol-3-*O*-glukuronida (Slika 4.31). Daljnjom inkubacijom dolazi do daljnjeg postupnog smanjenja masenog udjela da bi nakon 90 min dosegao 80,24 %, 76,60 %, 66,02 %, 85,91 % te 84,96 % početnog masenog udjela za miricetin-3-*O*-glukozid, rutin, kvercetin-3-*O*-glukuronid, kvercetin-3-*O*-glukozid odnosno kemferol-3-*O*-glukuronid (Tablica 4.31). Kao i u slučaju antocijanina, povišenje temperature s 60 °C na 70 °C ne dovodi do toliko velikog smanjenja masenih udjela ove skupine spojeva kao što je to slučaj prilikom povišenja temperature s 50 °C na 60 °C. Opažena je statistički značajna negativna korelacija između smanjenja masenih udjela odgovarajućih flavonol-3-*O*-glikozida i povećanja masenih udjela pripadnih aglikona (Dodatak Slika 7.5), pa se može zaključiti da tijekom termosoniciranja u kiselim uvjetima dolazi do razgradnje flavonol-3-*O*-glikozida na odgovarajući aglikon i šećer. Određeni koeficijenti korelacije za pojedine parove veći su pri temperaturi od 70 °C u odnosu na one određene pri 60 °C. Produkti sonolize vode, hidroksilni radikali i vodikov peroksid mogu dovesti do oksidacije aglikona flavonola.[219,220] Nastanak ovih radikala značajno je veći pri temperaturi od 60 °C u usporedbi s onime pri 70 °C, a što može objasniti dobivene razlike u koeficijentima korelacije pri danim temperaturama.



Slika 4.31. Ovisnost masenog udjela flavonola o vremenu i temperaturi inkubacije uz primjenu ultrazvuka

Tijekom čitavog perioda inkubacije pri 50 °C ne dolazi do statistički značajne promjene u masenim udjelima galokatehina, epigalokatehina te procijanidina B1. U prvih 5 min inkubacije maseni udjeli katehina, epikatehina i procijanidina B2 stalni su, dok daljnjom inkubacijom dolazi do značajnog porast masenih udjela ovih spojeva, a da bi nakon 90 min inkubacije on iznosio 199,19 %, 139,70 % odnosno 113,46 % početnog masenog udjela (Tablica 4.30). Pri višim temperaturama inkubacije dolazi do značajnog smanjenja masenih udjela galokatehina, epigalokatehina te procijanidina B1 te do značajnog povećanja masenih udjela katehina, epikatehina i procijanidina B2 (Slika 4.32). Povećanje masenog udjela procijanidina B2, katehina i epikatehina posebno je izraženo pri 70 °C. Tijekom termosoniciranja u kiselim uvjetima dolazi do hidrolize tanina kožica bobica grožđa pa time i do povećanja masenog udjela pojedinih monomernih sastavnica tanina. Povećanje masenog udjela katehina značajno je veće od onoga epikatehina. Takvo opažanje može biti posljedica veće zastupljenosti katehina kao terminalne jedinice tanina, ali i reakcije epimerizacije pri čemu dolazi do prevođenja epikatehina u katehin. Najmanje povećanje masenih udjela katehina i epikatehina opaženo je pri 60 °C. Pri ovoj temperaturi vrlo je izražena sonoliza voda, a produkti ove reakcije mogu reagirati s katehinom i epikatehinom, pri čemu mogu nastati različiti dimeri.[221,222] Smanjenje masenih udjela galokatehina i epigalokatehina ovisi o temperaturi i vremenu zagrijavanje, a ono je najveće pri temperaturi od 70 °C nakon 90 min inkubacije (Tablica 4.32). Pri navedenoj temperaturi i vremenskom periodu preostalo je 85,91 % galokatehina i 70,88 % epigalokatehina. Manje smanjenje masenog udjela galokatehina u odnosu na njegov epi-oblik posljedica je značajno veće stabilnosti neepi-oblika te procesa epimerizacije epigalokatehina u galokatehin do koje dolazi pri višim temperaturama.



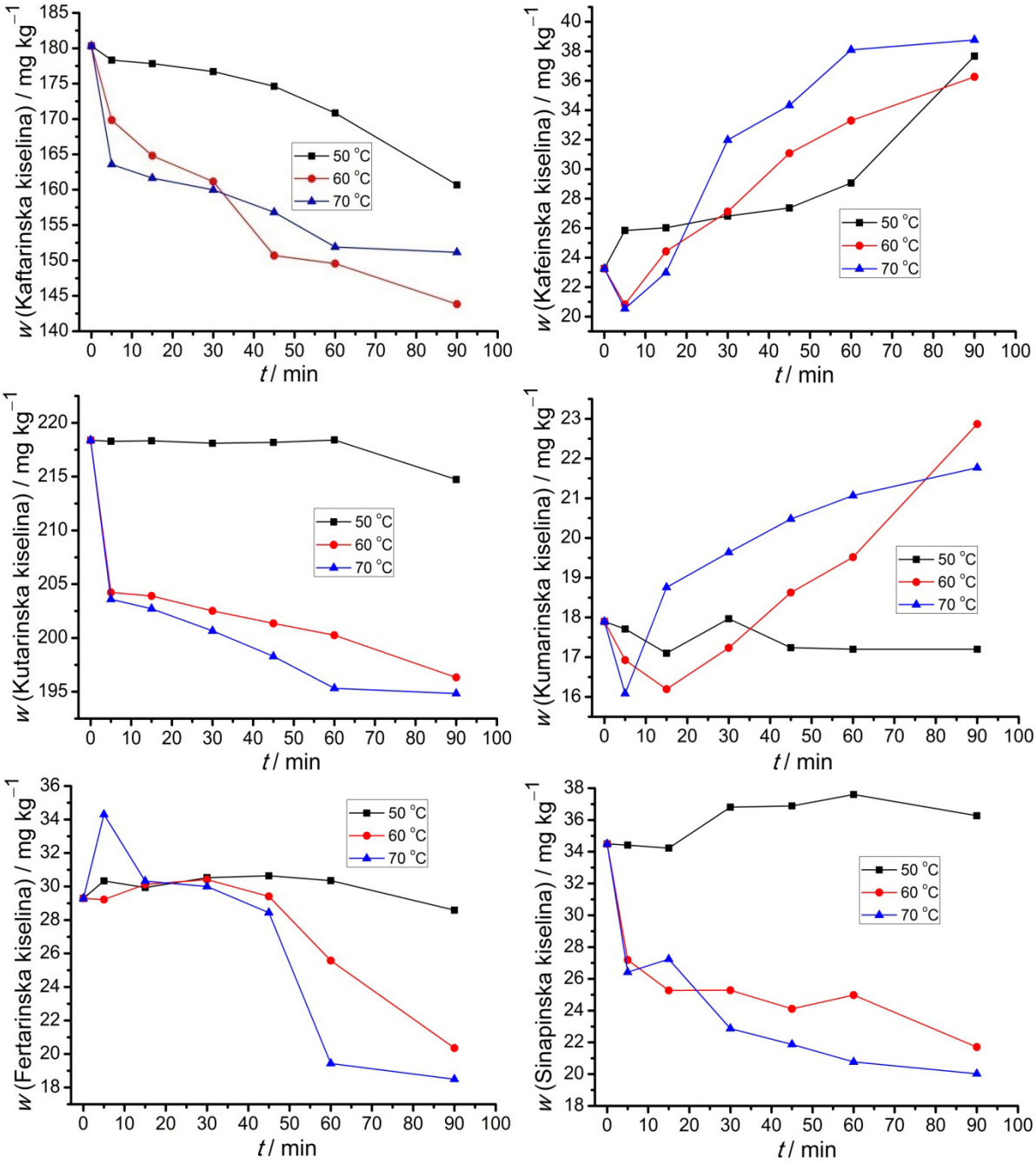
Slika 4.32. Ovisnost masenog udjela flavan-3-ola o vremenu i temperaturi inkubacije uz primjenu ultrazvuka

4.3.2.2. Ostale skupine spojeva

Ovisnost masenih udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida prikazani su u tablicama 4.33 do 4.36.

Zagrijavanjem ekstrakata kožica bobica grožđa pri 50 °C uz istovremenu primjenu ultrazvuka dolazi do značajnih promjene u masenim udjelima pojedinih hidroksicimetnih kiselina (Tablica 4.33). Do najznačajnijih promjena dolazi u slučaju kaftarinske, kutarinske i sinapinske kiseline čiji se maseni udjeli smanjuju te u slučaju kafeinske i kumarinske kiseline čije se maseni udjeli povećavaju. Povišenjem temperature s 50 °C na 60 °C opažene su izrazito velike promjene u masenim udjelima pojedinih ispitanih kiselina iz ove skupine. Dodatnim povišenjem temperature na 70 °C dolazi do dodatnih promjena u masenim udjelima, a koje nisu toliko izražene kao prethodne (Slika 4.33). Kao i u slučaju zagrijavanja bez primjene ultrazvuka, postoji povezanost između smanjenja masenih udjela kaftarinske kiseline i povećanja masenih udjela kafeinske kiseline te između smanjenja masenih udjela kutarinske kiseline i povećanja masenih udjela kumarinske kiseline. Koeficijenti korelacije određeni pri 60 °C i 70 °C za par kaftarinska/kafeinska kiselina su –0,9910 odnosno –0,9620 dok su za par kutarinska/kumarinska kiselina –0,9882 odnosno –0,9780 što ukazuje da je povećanje masenog udjela kafeinske i kumarinske kiseline posljedica hidrolize njihovih tartaratnih estera tj. kaftarinske odnosno kutarinske kiseline (Dodatak Slika 7.6). Smanjenje masenih udjela fertarinske i sinapinske kiseline najveće je u slučaju inkubacije provedene pri 70 °C u trajanju od 90 min. Po završetku inkubacije u navedenim uvjetima preostalo je 61,07 % i 58,06 % početnog masenog udjela fertarinske odnosno sinapinske kiseline (Tablica 4.35).

Povećanje masenih udjela galne i prokatehinske kiseline opaženo je pri sve tri temperature inkubacije (Slika 4.34). Opaženo povećanje masenih udjela najveće je pri temperaturi od 70 °C. Povećanje masenog udjela galne kiseline vjerojatno je posljedica hidrolize galioiliranih oblika flavan-3-ola i galotanina do koje dolazi u kiselom mediju, ali i razgradnje delfinidin-3-*O*-glukozida. Konačni produkt razgradnje cijanidin-3-*O*-glukozida je prokatehinska kiselina, što objašnjava opaženo povećanje njezinog masenog udjela tijekom inkubacije. Navedenoj tezi u prilog idu i određeni koeficijenti korelacije pri 60 °C i 70 °C, a koji iznose –0,9820 odnosno –0,9835 (Dodatak Slika 7.6).



Slika 4.33. Ovisnost masenog udjela hidroksicimetnih kiselina o vremenu i temperaturi inkubacije uz primjenu ultrazvuka

Tablica 4.33. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 50 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	5min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Kaftarinska kiselina	180,32^{a} ± 0,72	178,33^{a,b} ± 1,29	177,83^{b} ± 0,83	176,71^{b,c} ± 0,62	174,62^{c} ± 0,92	170,84^{d} ± 0,33	160,69^{e} ± 0,38
Kafeinska kiselina	23,26^{a} ± 1,00	25,84^{b} ± 0,05	26,03^{b} ± 0,05	26,81^{b,c} ± 0,05	27,37^{c} ± 0,05	29,06^{d} ± 0,05	37,67^{e} ± 0,07
p-Kutarinska kiselina	218,39^{a} ± 0,27	218,28^{a} ± 0,25	218,33^{a} ± 0,40	218,10^{a} ± 0,40	218,18^{a} ± 0,40	218,41^{a} ± 0,40	214,73^{b} ± 0,39
p-Kumarinska kiselina	17,90^{a} ± 0,11	17,71^{b} ± 0,03	17,10^{c} ± 0,03	17,97^{a} ± 0,03	17,24^{c} ± 0,03	17,19^{c} ± 0,03	17,20^{c} ± 0,03
Fertarinska kiselina	30,29^{a} ± 0,23	30,34^{a} ± 0,06	29,94^{a} ± 0,05	30,53^{a} ± 0,06	30,64^{a} ± 0,52	30,35^{a} ± 0,06	28,59^{b} ± 0,09
Sinapinska kiselina	34,50^{a} ± 0,63	34,42^{a} ± 0,06	34,23^{a} ± 0,06	33,81^{a} ± 0,07	33,22^{a,b} ± 0,57	32,27^{b} ± 0,63	30,54^{c} ± 0,64
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	**504,64^{a} ± 2,45**	**504,92^{a} ± 1,42**	**503,45^{a} ± 0,83**	**503,93^{a} ± 1,01**	**501,26^{a,b} ± 0,59**	**498,13^{b} ± 1,43**	**489,46^{c} ± 0,50**
Galna kiselina	40,50^{a} ± 0,11	40,39^{a} ± 0,07	40,69^{a} ± 0,07	40,72^{a} ± 0,07	41,98^{b} ± 0,08	43,33^{c} ± 0,08	46,41^{d} ± 0,08
Prokatehinska kiselina	144,33^{a} ± 1,65	143,66^{a} ± 0,26	149,14^{b} ± 0,27	153,48^{c} ± 0,28	155,45^{d} ± 0,28	156,45^{d} ± 0,28	159,83^{e} ± 0,29
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	**184,83^{a} ± 1,76**	**184,05^{a} ± 0,34**	**189,83^{b} ± 0,35**	**194,19^{c} ± 0,35**	**196,59^{d} ± 0,36**	**198,78^{e} ± 0,36**	**206,24^{f} ± 0,38**
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	143,41^{a} ± 0,79	143,08^{a} ± 0,26	143,24^{a} ± 0,41	143,11^{a} ± 0,91	142,76^{a} ± 0,96	142,75^{a} ± 0,74	142,54^{a} ± 0,26

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.34. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**5min**	**15 min**	**30 min**	**45 min**	**60 min**	**90 min**
Kaftarinska kiselina	$180{,}32^{a} \pm 0{,}72$	$169{,}84^{b} \pm 0{,}31$	$164{,}80^{c} \pm 0{,}30$	$161{,}14^{d} \pm 0{,}29$	$150{,}69^{e} \pm 0{,}29$	$149{,}56^{f} \pm 0{,}29$	$143{,}84^{g} \pm 0{,}26$
Kafeinska kiselina	$23{,}26^{a} \pm 1{,}00$	$29{,}83^{b} \pm 0{,}04$	$34{,}42^{c} \pm 0{,}04$	$37{,}12^{d} \pm 0{,}05$	$41{,}08^{e} \pm 0{,}06$	$43{,}29^{f} \pm 0{,}06$	$46{,}26^{g} \pm 0{,}07$
p-Kutarinska kiselina	$218{,}39^{a} \pm 0{,}27$	$205{,}23^{b} \pm 0{,}64$	$203{,}91^{b,c} \pm 0{,}89$	$202{,}51^{c,d} \pm 0{,}26$	$201{,}35^{d,e} \pm 0{,}37$	$200{,}26^{e} \pm 0{,}36$	$196{,}33^{f} \pm 0{,}36$
p-Kumarinska kiselina	$17{,}90^{a} \pm 0{,}11$	$17{,}56^{a} \pm 0{,}66$	$17{,}20^{a} \pm 0{,}03$	$18{,}24^{a} \pm 0{,}03$	$19{,}63^{b} \pm 0{,}03$	$20{,}52^{c} \pm 0{,}04$	$22{,}87^{d} \pm 0{,}04$
Fertarinska kiselina	$30{,}29^{a} \pm 0{,}23$	$30{,}22^{a} \pm 0{,}05$	$30{,}12^{a} \pm 0{,}05$	$30{,}41^{a} \pm 0{,}06$	$29{,}41^{b} \pm 0{,}05$	$25{,}58^{c} \pm 0{,}05$	$20{,}36^{d} \pm 0{,}04$
Sinapinska kiselina	$34{,}50^{a} \pm 0{,}63$	$27{,}19^{b} \pm 0{,}05$	$25{,}27^{c} \pm 0{,}05$	$25{,}28^{c} \pm 0{,}05$	$24{,}11^{d} \pm 0{,}04$	$24{,}64^{d} \pm 0{,}54$	$21{,}71^{e} \pm 0{,}04$
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$\mathbf{504{,}64^{a} \pm 2{,}45}$	$\mathbf{480{,}23^{b} \pm 0{,}21}$	$\mathbf{475{,}71^{c} \pm 0{,}73}$	$\mathbf{474{,}70^{c} \pm 0{,}37}$	$\mathbf{466{,}27^{d} \pm 0{,}86}$	$\mathbf{463{,}85^{d} \pm 0{,}37}$	$\mathbf{451{,}36^{e} \pm 0{,}80}$
Galna kiselina	$40{,}50^{a} \pm 0{,}11$	$40{,}68^{a} \pm 0{,}51$	$41{,}37^{b} \pm 0{,}08$	$42{,}15^{c} \pm 0{,}08$	$46{,}37^{d} \pm 0{,}08$	$47{,}11^{e} \pm 0{,}09$	$51{,}60^{f} \pm 0{,}09$
Prokatehinska kiselina	$144{,}33^{a} \pm 1{,}65$	$144{,}45^{a} \pm 0{,}25$	$145{,}42^{a} \pm 0{,}27$	$162{,}32^{b} \pm 0{,}30$	$173{,}76^{c} \pm 0{,}32$	$180{,}09^{d} \pm 0{,}46$	$198{,}12^{e} \pm 0{,}36$
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	$\mathbf{184{,}83^{a} \pm 1{,}76}$	$\mathbf{185{,}13^{a} \pm 0{,}30}$	$\mathbf{186{,}79^{a} \pm 0{,}34}$	$\mathbf{204{,}48^{b} \pm 0{,}37}$	$\mathbf{220{,}12^{c} \pm 0{,}40}$	$\mathbf{227{,}17^{e} \pm 0{,}41}$	$\mathbf{249{,}71^{e} \pm 0{,}46}$
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	$\mathbf{143{,}41^{a} \pm 0{,}79}$	$\mathbf{133{,}65^{b} \pm 0{,}37}$	$\mathbf{133{,}58^{b} \pm 0{,}36}$	$\mathbf{133{,}59^{b} \pm 0{,}36}$	$\mathbf{133{,}64^{b} \pm 0{,}24}$	$\mathbf{133{,}73^{b} \pm 0{,}24}$	$\mathbf{132{,}19^{c} \pm 0{,}24}$

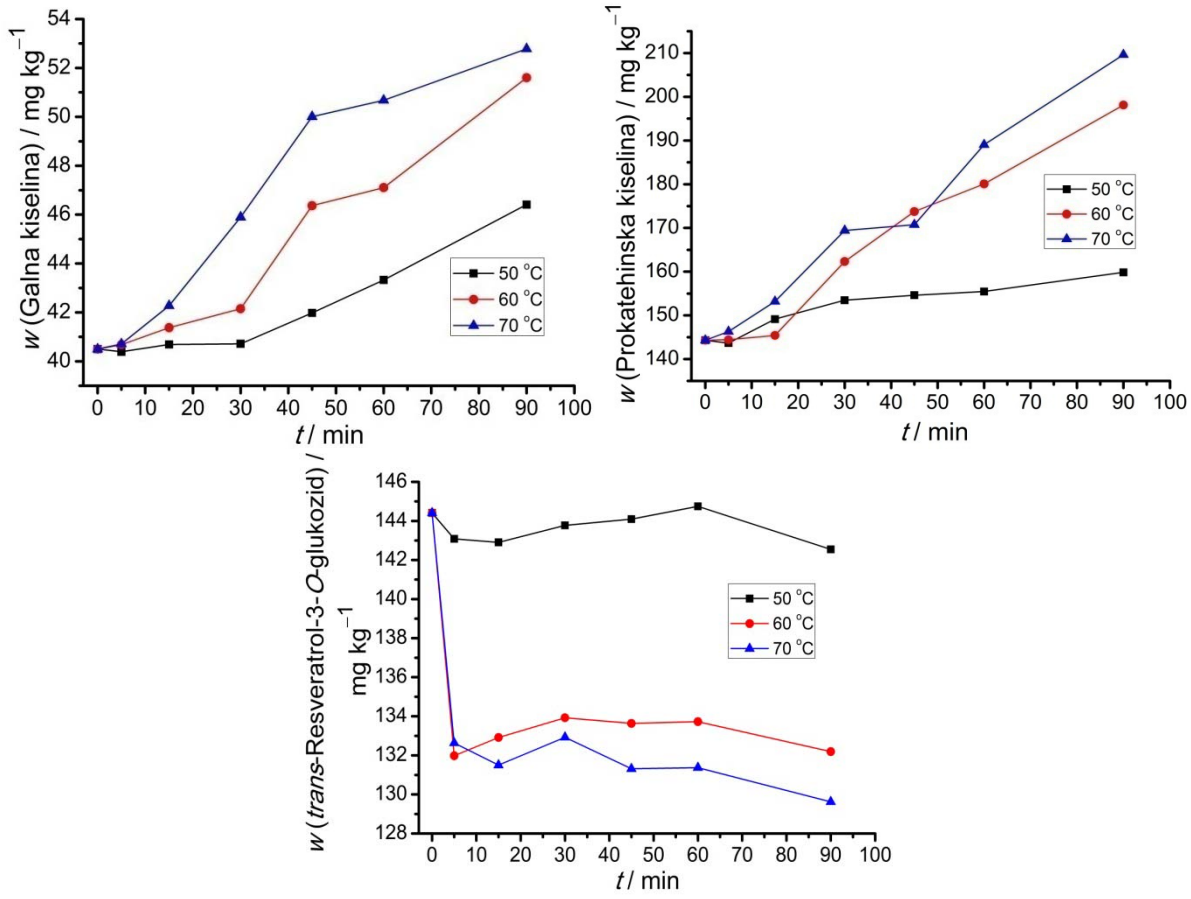
Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

Tablica 4.35. Ovisnost masenog udjela pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena o vremenu inkubacije određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka

Spoj	w / mg kg^{-1}						
	0 min	**5min**	**15 min**	**30 min**	**45 min**	**60 min**	**90 min**
Kaftarinska kiselina	$180,32^{a} \pm 0,72$	$163,58^{b} \pm 0,30$	$161,65^{b,c} \pm 0,29$	$159,98^{b,c} \pm 0,29$	$150,49^{c,d} \pm 0,33$	$141,90^{d} \pm 0,28$	$131,16^{e} \pm 0,28$
Kafeinska kiselina	$23,26^{a} \pm 1,00$	$34,54^{b} \pm 0,04$	$37,65^{c} \pm 0,54$	$41,98^{d} \pm 0,06$	$44,33^{e} \pm 0,06$	$48,09^{f} \pm 0,07$	$58,76^{g} \pm 0,07$
p-Kutarinska kiselina	$218,39^{a} \pm 0,27$	$203,60^{b} \pm 0,37$	$202,72^{c} \pm 0,37$	$200,66^{d} \pm 0,37$	$198,29^{e} \pm 0,36$	$195,32^{f} \pm 0,36$	$194,83^{f} \pm 0,36$
p-Kumarinska kiselina	$17,90^{a} \pm 0,11$	$18,09^{a} \pm 0,03$	$18,76^{b} \pm 0,03$	$19,64^{c} \pm 0,04$	$20,48^{d} \pm 0,04$	$22,73^{e} \pm 0,58$	$23,77^{f} \pm 0,04$
Fertarinska kiselina	$30,29^{a} \pm 0,23$	$31,63^{a} \pm 2,37$	$30,32^{a} \pm 0,06$	$30,00^{a} \pm 0,05$	$28,44^{a} \pm 0,05$	$19,44^{b} \pm 0,04$	$18,50^{b} \pm 0,03$
Sinapinska kiselina	$34,50^{a} \pm 0,63$	$26,42^{b} \pm 0,05$	$24,24^{c} \pm 0,05$	$22,87^{d} \pm 0,04$	$21,88^{e} \pm 0,04$	$20,77^{f} \pm 0,04$	$20,03^{g} \pm 0,04$
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	$\mathbf{504,64^{a} \pm 2,45}$	$\mathbf{476,52^{b} \pm 0,85}$	$\mathbf{475,34^{b} \pm 0,37}$	$\mathbf{475,12^{b} \pm 0,85}$	$\mathbf{463,90^{c} \pm 0,36}$	$\mathbf{447,58^{d} \pm 0,81}$	$\mathbf{447,05^{d} \pm 0,81}$
Galna kiselina	$40,50^{a} \pm 0,11$	$40,71^{a} \pm 1,10$	$42,27^{b} \pm 0,08$	$45,90^{c} \pm 0,08$	$50,01^{d} \pm 0,09$	$50,68^{d} \pm 0,09$	$52,78^{e} \pm 0,10$
Prokatehinska kiselina	$144,33^{a} \pm 1,65$	$146,32^{b} \pm 0,26$	$153,19^{c} \pm 0,28$	$169,41^{d} \pm 0,31$	$180,76^{e} \pm 0,31$	$189,04^{f} \pm 0,34$	$209,60^{g} \pm 0,35$
UKUPNE HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	$\mathbf{184,83^{a} \pm 1,76}$	$\mathbf{187,03^{a} \pm 0,92}$	$\mathbf{195,47^{b} \pm 0,36}$	$\mathbf{215,30^{c} \pm 0,39}$	$\mathbf{220,76^{d} \pm 0,40}$	$\mathbf{239,72^{e} \pm 0,44}$	$\mathbf{262,38^{f} \pm 0,44}$
trans-Resveratrol-3-*O*-glukozid	$\mathbf{143,41^{a} \pm 0,79}$	$\mathbf{132,63^{b} \pm 0,24}$	$\mathbf{131,50^{c} \pm 0,24}$	$\mathbf{131,59^{c} \pm 0,36}$	$\mathbf{131,31^{c} \pm 0,24}$	$\mathbf{131,37^{c} \pm 0,24}$	$\mathbf{129,62^{d} \pm 0,24}$

Srednje vrijednosti označene različitim slovima u redu, ukazuju na statistički značajnu razliku u skladu s Tukey-evim testom (p<0,05)

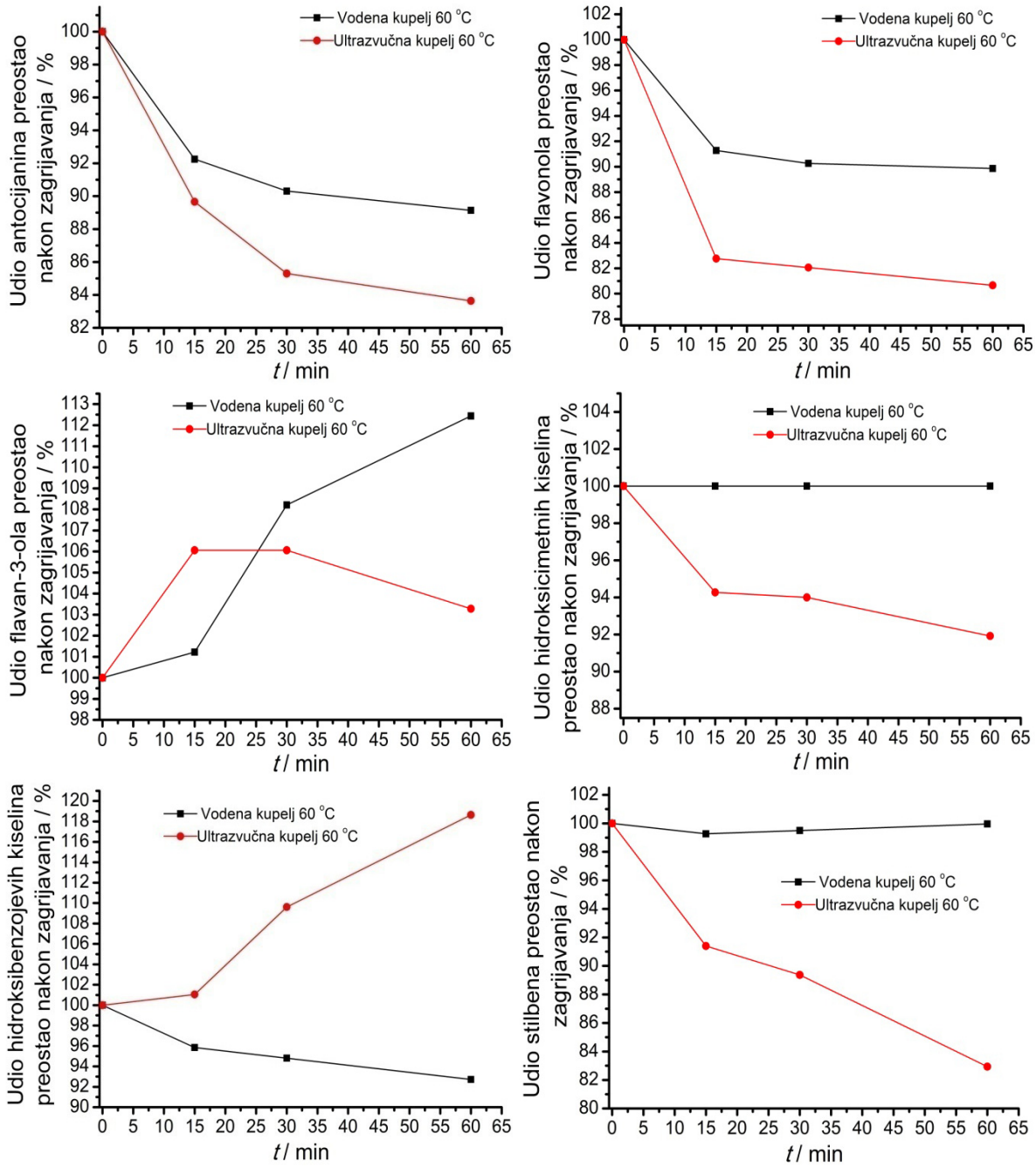
Ovisnost masenog udjela *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida o temperaturi i vremenu inkubacije prikazana je na slici 4.34. Tijekom inkubacije pri 50 °C ne dolazi do statistički značajnih promjena masenog udjela ovoga spoja. Pri temperaturi od 60 °C tijekom prvih 5 min dolazi do naglog smanjenja masenog udjela *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida od 6,80 %. Daljnjim zagrijavanjem pri ovoj temperaturi ne dolazi do značajnih promjena u masenom udjelu ovoga stilbena. Smanjenje masenog udjela *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida najveće je pri temperaturi od 70 °C nakon inkubacije od 90 min, kada preostane 90,38 % njegovog početnog masenog udjela (Tablica 4.35).



Slika 4.34. Ovisnost masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina i stilbena o vremenu i temperaturi inkubacije uz primjenu ultrazvuka

4.3.3. Utjecaj primjene ultrazvuka na termičku stabilnost fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa

Prilikom primjene ultrazvuka implozijom kavitacijskih mjehurića nastaju ekstremni fizikalni uvjeti u vidu visokih tlakova i temperatura, a što dovodi do pojave nekolicine sonokemijskih reakcija koje se mogu odvijati istovremeno ili zasebno od kojih je u vodenom mediju najznačajnija sonoliza vode. Tijekom ove reakcije nastaju hidroksilni radikali i superoksidni anioni koji mogu sudjelovati u različitim reakcijama oksidacije fenolnih spojeva. Usporedbom promjena masenih udjela ukupnih antocijanina, flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbena u ekstraktima podvrgnutim zagrijavanju pri 60 °C bez primjene ultrazvuka s onima u ekstraktima zagrijavanim pri istoj temperaturi i istom vremenskom periodu uz primjenu ultrazvuka može se odrediti utjecaj ultrazvučnih valova frekvencije 35 kHz na stabilnost fenola. Primjena ultrazvuka ima negativan učinak na stabilnost gotovo svih ispitanih spojeva. Veće povećanje masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina opaženo je u slučaju primjene ultrazvuka u odnosu na ono u uzorcima koji su zagrijavani bez njegove primjene, a što je povezano s manjom stabilnošću cijanidin-3-*O*-glukozida i delfinidin-3-*O*-glukozida te većom učinkovitošću hidrolize galotanina i galolilranih flavan-3-ola uz djelovanje ultrazvuka (Slika 4.35).


Udio antocijanina preostao nakon zagrijavanja / %
<flavonola>Udio flavonola preostao nakon zagrijavanja / %</flavonola>
<flavan>Udio flavan-3-ola preostao nakon zagrijavanja / %</flavan>
<hidroksicimetnih>Udio hidroksicimetnih kiselina preostao nakon zagrijavanja / %</hidroksicimetnih>
<hidroksibenzojevih>Udio hidroksibenzojevih kiselina preostao nakon zagrijavanja / %</hidroksibenzojevih>
<stilbena>Udio stilbena preostao nakon zagrijavanja / %</stilbena>
<vodena>Vodena kupelj 60 °C</vodena>
<ultrazvucna>Ultrazvučna kupelj 60 °C</ultrazvucna>
<t>t / min</t>

Slika 4.35. Utjecaj primjene ultrazvuka na termičku stabilnost fenola u ekstraktima kožica bobica grožđa

5. ZAKLJUČCI

U ovome radu proveden jer postupak optimiranja metode sušenje te pohrane uzoraka kožica grožđa. Isto tako provedeno je i optimiranje pet ekstrakcijskih metoda za dobivanje fenola iz kožica bobica grožđa. Pri provedbi istraživanja provedena je analiza više od 500 uzoraka i na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Primijenjena metoda sušenja uzoraka ima značajan utjecaj na masene udjele pojedinih ispitanih skupina fenola. Optimalna metoda sušenja velikim dijelom ovisi o prirodi samog analita. Primjenom liofilizacije očuvan je najveći maseni udio antocijanina i flavan-3-ola, dok je sušenjem u pećnici očuvan najveći maseni udio flavonola, hidroksicimetnih kiselina te stilbena. Uzimajući u obzir ukupni maseni udio svih analiziranih fenola, liofilizacija je metoda sušenja kojom je očuvan najveći njihov sadržaj. Razlike u masenim udjelima između liofiliziranih uzoraka i onih sušenih na zraku nisu velike (manje su od 2 %) pa stoga sušenje na zraku može biti dobra zamjena za skup postupak liofilizacije.
2. Različiti načini zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka značajno utječu na konačne masene udjele pojedinih fenolnih spojeva. Zamrzavanje uzoraka bobica grožđa s jastučićem uz skidanje kožice s još zamrznute bobice, kao načinom odmrzavanja, ima pozitivan učinak na masene udjele antocijanina i flavonola, dok nema utjecaja na one flavan-3-ola. Zamrzavanje uzoraka bez obzira da li oni sadrže jastučić ili ne te primijenjena metoda odmrzavanja uzrokuju značajno smanjenje masenog udjela hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te stilbene pa je stoga ako je cilj analize određivanje sadržaja ovih skupina spojeva uzorke potrebno analizirati neposredno nakon berbe.
3. Optimiranjem metode SLE primjenom BBD određeno je da je acetonitril najučinkovitija organska faza u ekstrakcijskom otapalu kada je sadržan u volumnom udjelu od 20 %. Za dobivanje najvećih masenih udjela flavonoida ekstrakciju je potrebno provesti u jednom koraku uz omjer mase uzorka i volumen ekstrakcijskog otapala od 1:80 g mL^{-1} pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 1 h. S obzirom da dobiveni ekstrakt sadrži acetonitril on se ne može koristiti u komercijalne svrhe pa je stoga optimiranje metode SLE provedeno uz etanol kao organsku fazu pri čemu su dobiveni slijedeći optimalni uvjeti: volumen organske faze u ekstrakcijskom otapalu od 20 %, temperatura ekstrakcije od 55 °C uz trajanje ekstrakcije od 1 h i omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala od 1:80 g mL^{-1}. I u ovom slučaju ekstrakcija je provedena u jednom koraku.

4. Box-Behnkenov dizajn korišten je za potrebe optimiranja metode UAE, a pri tome je utvrđeno da je ekstrakciju potrebno provesti u jednom koraku uz slijedeće optimalne uvjete: omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala od 1:80 g mL^{-1}, acetonitril kao organsku fazu u ekstrakcijskom otapalu u volumnom udjelu od 25 %, temperaturu ekstrakcije od 50 °C te trajanje ekstrakcije od 15 min. Pri optimiranju metode ekstrakcije s primjenom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji određeno je da su optimalan omjer faza i broj ekstrakcijskih koraka istovjetni kao i u prethodnoj metodi dok je kao organska faza u ekstrakcijskom otapalu korišten etanol u volumnom udjelu od 20 %. Optimalno vrijeme i temperatura ekstrakcije su 15 min odnosno 70 °C.
5. Za metodu MAE uporabom BBD određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije. Najveći maseni udjeli flavonoida dobiveni su primjenom etanola kao organske faze u ekstrakcijskom otapalu u volumnom udjelu od 60 %. Za postizanje najveće učinkovitosti, ekstrakciju je potrebno provesti u jednom koraku uz omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala od 1:80 g mL^{-1} u trajanju od 5 min pri 40 °C.
6. Određeni su optimalni uvjeti metode EAE. Najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta je primjenom enzimskog pripravka Lallzyme EX-V u masenom udjelu od 10,50 mg g^{-1}. Ekstrakciju je potrebno provesti u puferu pH-vrijednosti 2,00 koji sadrži kalcijeve ione množinske koncentracije 0,015 mol L^{-1} pri temperaturi od 45 °C u trajanju od 3 h.
7. Prilikom postupka optimiranja metode MSPD s primjenom u znanstveno-istraživačke svrhe utvrđeno je da je fenilsilicijev dioksid najučinkovitija čvrsta faza kada je omjer masa čvrste faze i uzorka 3:1, dok je kao ekstrakcijsko otapalo najučinkovitije ono koje sadrži volumni udio acetonitrila od 50 %. Za postizanje najvećih masenih udjela flavonoida u dobivenom ekstraktu, volumen eluacijskog otapala mora biti 10 mL. Primjenom BBD provedeno je optimiranje metode MSPD s mogućnošću primjene u komercijalne svrhe pri čemu su korišteni etanol kao organska faza u ekstrakcijskom otapalu i morski pijesak kao čvrsta faza. Utvrđeno je da je postupak potrebno provesti s 10 mL eluacijskog otapala koje sadrži volumni udio etanola od 60 %.
8. Usporedbom svih pet novo optimiranih metoda ekstrakcije utvrđeno je da je metoda UAE uz primjenu acetonitrila kao organske faze najučinkovitija. Opažene razlike između masenih udjela dobivenih primjenom metode UAE uz acetonitril kao organsku fazu i onih dobivenih uz etanol kao organsku fazu nisu velike, one iznose približno

3,5 % pa stoga metoda uz primjenu etanola može biti dobra alternativna ekološki prihvatljiva metoda za ekstrakciju fenola iz kožica bobica grožđa.

9. Stabilnost pojedinih fenolnih spojeva ovisi o temperaturi i vremenu inkubacije, ali i o samoj prirodi analita. Tijekom čitavog perioda inkubacije (4 h) pri 40 °C maseni je udio svih ispitanih spojeva ostao nepromijenjen. Prilikom inkubacije pri 60 °C u trajanju od 2 h preostalo je 89 % masenog udjela ukupnih antocijanina u odnosu na početnu vrijednost, dok je nakon 1 h inkubacije pri 80 °C preostalo 75,24 %. Stabilnost flavonola pri višim temperaturama značajno je veća od one antocijanina te je nakon 4 h zagrijavanja pri 60 °C i 80 °C preostalo 89 % odnosno 80 % masenog udjela ukupnih flavonola. Promjene u masenim udjelima flavan-3-ola, hidroksicimetnih kiselina te stilbena pri obje temperature inkubacije u trajanju od 4 h vrlo su male. Dobiveni se ekstrakti mogu koristiti u komercijalne svrhe kada je potrebno provesti termičku obradu pripravka, a njezino trajanje i temperatura pri kojoj se provodi ovise o tome koju je skupinu spojeva potrebno očuvati u velikom masenom udjelu.
10. Termosoniciranje uzrokuje značajne promjene u masenim udjelima fenolnih spojeva u ekstraktima kožica bobica grožđa. Prilikom termosoniciranja pri 50 °C u periodu od 90 min maseni udjeli svih ispitanih spojeva održani su na vrijednostima većim od 94 % početnih masenih udjela. Od ispitanih spojeva najnestabilniji su antocijanini, čiji se maseni udio nakon 90 min inkubacije pri 70 °C smanjio na 75 % početne vrijednosti. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da su fenolni spojevi sadržani u ekstraktima kožica dovoljno stabilni da se mogu rabiti prilikom proizvodnje pripravaka, a pri čemu se primjenjuje ultrazvuk visokih frekvencija.

6. LITERATURNA VRELA

1. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture 2012, http://oiv.int (pristupljeno 19. travanj, 2016).
2. S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysegu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50** (2011) 586-621.
3. K. Wenzel, H. H. Dittrich, M. Heimfarth, *Vitis* **26** (1987) 65-78.
4. F. Mattivi, R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini, R. Velasco, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 7692-7702.
5. J. Karoglan Kontić, I. Rendulić Jelušić, I. Tomaz, D. Preiner, Z. Marković, D. Stupić, Ž. Andabaka, E. Maletić, *Int. J. Food Prop.* **19** (2016) 1009-1024.
6. B. Lorrain, I. Ky, L. Pechamat, P. -L. Teissedre, *Molecules* **18** (2013) 1076-1100.
7. P. This, T. Lacombe, M. R. Thomas, *Trends Genet.* **22** (2006) 511-519.
8. E. Maletić, J. Karoglan Kontić, I. Pejić, *Vinova loza*, Školska knjiga, Zagreb, 2008.
9. C. L. Owens, u *Temprate Fruit Crop Breeding*, Springer Science+Buisness Media B.V., 2008.
10. B. I. Reisch, C. L. Owens, P. S. Cousins, u *Handbook of Plant Breeding: Fruit Breeding*, Springer, New York, 2012.
11. N. Fontes, H. Gerós, S. Delrot, *Am. J. Enol. Vitic.* **62** (2011) 270-278.
12. S. Conn, C. Franco, W. Zhang, *Planta* **231** (2010) 1343-1360.
13. M. A. O'Neill, W. S. York, u *The Plant Cell Wall, Annual Plant Reviews*, CRC Press, 2003.
14. K. H. Caffall, D. Mohnen, *Carbohyd. Res.* **344** (2009) 1879-1900.
15. N. C. Carpita, D. M. Gibeaut, *Plant J.* **3** (1993) 1-30.
16. R. L. Hanlin, M. Hrmova, J. F. Harbertson, M. O. Downey, *Austr. J. Grape Wine Res.* **16** (2010) 173-188.
17. A. Vicens, D. Fournand, P. Williams, L. Sidhoum, M. Moutounet, T. Doco, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 2955-2960.
18. M. Lecas, J. -M. Brillouet, *Phytochem.* **35** (1994) 1241-1243.
19. S. Vidal, P. Williams, M. A. O'Neill, P. Pellerin, *Carbohyd. Polym.* **45** (2001) 315-323.
20. T. Doco, P. Williams, M. Pauly, M. A. O'Neill, P. Pellerin, *Carbohyd. Polym.* **53** (2003) 253-261.
21. N. Mirošević, J. Karoglan Kontić, *Vinogradarstvo*, Globus, Zagreb, 2008.
22. J. A. Considine, R. B. Knox, *Protoplasma* **99** (1979) 347-365.

23. W. J. Hardie, T. P. O'Brien, V. G. Jaudzems, *Austr. J.Grape Wine Res.* **2** (2006) 97-142.
24. C. Pratt, *Am. J. Enol. Vitic.* **22** (1971) 92-109.
25. B. G. Coombe, M. G. McCarthy, *Austr. J. Grape Wine Res.* **6** (2000) 131-135.
26. S. P. Robinson, C. Davies, *Aust. J. Grape Wine Res.* **6** (2000) 175-188.
27. A. Ortega-Regules, J. M. Ros-Garcia, A. B. Bautista-Ortin, J. M. Lopez-Roca,E. Gomez-Plaza, *J. Sci. Food Agric.* **88** (2008) 420-428.
28. B. G. Coombe, *Am. J. Enol.Vitic.* **43** (1992) 101-110.
29. V. Lattanzio, P. A. Kroon, S. Quideau, D. Treutter, u *Recent Advances in Polyphenol Research*, Blackell Publishing Ltd., 2008.
30. M. Pinelo, A. Arnous, A. S. Meyer, *Trends Food Sci. Tech.* **17** (2006) 579-590.
31. B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutierrez-Uribe, S. O. Serna-Saldivar, *Food Chem.* **152** (2014) 46-55.
32. S. D. Castellarin, L. Bavaresco, L. Falginella, M. I. V. Z. Goncavles, G. Di Gaspero, u *The Biochemistry of the Grape Berry*, Bentham Science Publishers, 2012.
33. F. M. Romeyer, J. J. Macheix, J. P. Goiffon, C. C. Reminiac, J. C. Sapis, *J. Agric. Food Chem.* **31** (1983) 346-349.
34. R. Flamini, F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas, L. Bavaresco, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 19651-19669.
35. P. Gatto, U. Vrhovsek, J. Muth, C. Segala, C. Romualdi, P. Fontana, D. Pruefer, M. Stefanini, C. Moser, F. Mattivi, R. Velasco, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 11773-11785.
36. M. De Rosso, L. Tonidandel, R. Larcher, G. Nicolini, A. Dalla Vedova, F. De Marchi, M. Gardiman, M. Giust, R. Flamini, *Food Chem.* **163** (2014) 244-251.
37. M. Figueiredo-Gonzalez, E. Martinez-Carballo, B. Cancho-Grande, J. L. Santiago, M. C. Martinez, J. Simal-Gandara, *Food Chem.* **130** (2012) 9-19.
38. M. O. Downey, J. S. Harvey, S. P. Robinson, *Austr. J. Grape Wine Res.* **9** (2003) 110-121.
39. N. Castillo-Munoz, M. Fernandez-Gonzalez, S. Gomez-Alonso, E. Garcia-Romero, I. Hermosin-Gutierrez, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 7883-7891.
40. N. -N. Liang, F. He, H. -Q. Bi, C. -Q. Duan, M. J. Reeves, J. Wang, *Eur. Food Res. Technol.* **235** (2012) 1187-1197.
41. R. A. Dixon, D. -Y. Xie, S. B. Sharma, *New Phytol.* **165** (2005) 9-28.

42. J. -M. Souquet, V. Cheynier, F. Brossaud, M. Moutounet, *Phytochem.* **43** (1996) 509-512.
43. C. Prieur, J. Rigaud, V. Cheynier, M. Moutounet, *Phytochem.* **36** (1994) 781-784.
44. F. Mattivi, U. Vrhovsek, D. Masuero, D. Trainotti, *Austr. J. Grape Wine Res.* **15** (2009) 27-35.
45. R. R. Montealegre, R. R. Peces, J. L. C. Vozmediano, J. M. Gascuena, E. G. Romero, *J. Food Compos. Anal.* **19** (2006) 687-693.
46. M. O. Downey, J. S. Harvey, S. P. Robinson, *Austr. J. Grape Wine Res.* **9** (2003) 15-27.
47. L. Janvary, T. Hoffmann, J. Pfeiffer, L. Hausmann, R. Topfer, T. C. Fischer, W. Schwab, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 3512-3518.
48. A. Teixeira, J. Eiras-Dias, S. D. Castellarin, H. Geros, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 18711-18739.
49. F. He, J. -J. He, Q. -H. Pan, C. -Q. Duan, *Austr. J. Grape Wine Res.* **16** (2010) 464-468.
50. J. -M. Ryan, E. Revilla, *J. Agri. Food Chem.* **51** (2003) 3372-3378.
51. C. A. Rice Evans, N. J. Miller, *Biochem. Soc.* **24** (1996) 790-795.
52. K. D. Croft, *Ann. Ny. Acad. Sci.* **854** (1998) 435-442.
53. D. J. Betteridge, *Metabolism* **49** (2000) 3-8.
54. M. J. Tunon, M. V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, J. Gonzalez-Gallego, *Curr. Drug Metabol.* **10** (2009) 256-271.
55. H. P. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, *J. Pharmacol. Sci.* **96** (2004) 229-245.
56. E. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides, *Pharmacol. Rev.* **52** (2000) 673-751.
57. P. Fresco, F. Borges, C. Diniz, M. P. M. Marques, *Med. Res. Rev.* **26** (2006) 747-766.
58. D. Vauzour, K. Vafeiadou, A. Rodriguez-Mateos, C. Rendeiro, J. P. E. Spencer, *Genes. Nutr.* **3** (2008) 115-126.
59. Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **67** (2006) 27-37.
60. W. R. Leifert, M. Y. Abeywardena, *Nutr. Res.* **28** (2008) 729-737.
61. T. L. Zern, M. L. Fernandez, *J. Nutr.* **135** (2005) 2291-2294.
62. T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **26** (2005) 343-356.
63. M. Daglia, *Curr. Opin. Biotech.* **23** (2012) 174-181.
64. S. Rawat, *Asian J. Plant Sci. Res.* **5** (2015) 47-56.

65. D. P. Makris, D. Boskou, u *Plant as a Source of Natural Antioxidants*, CAB International, 2014.
66. S. Maqsood, S. Benjakul, F. Shahidi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53** (2013) 162-179.
67. M. F. Kobilewski, M. F. Jacobson, *Food Dyes A Rinbow of Risks*, Centre of Science in the Public Interest, 2010.
68. M. M. Selani, C. J. Contreras-Castillo, L. D. Shirahigue, C. R. Gallo, M. Plata-Oviedo, N. D. Montes-Villanueva, *Meat Sci.* **88** (2011) 397-403.
69. M. Pazos, M. J. Gonzalez, J. L. Gallardo, J. L. Torres, I. Medina, *Eur. Food Res. Technol.* **220** (2005) 514-519.
70. M. B. Mielnik, E. Olsen, G. Vogt, D. Adeline, G. Skrede, *Food Sci. Technol.* **39** (2006) 191-198.
71. M. J. R. Vaquero, P. A. A. Fernandez, M. C. M. de Nadra, A. M. S. de Saad, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 6048-6052.
72. J. Ahn, I. U. Grun, A. Mustapha, *Food Microbiol.* **24** (2007) 7-14.
73. R. L. Jackman, R. Y. Yada, M. A. Tung, R. A. Speers, *J. Food Biochem.* **11** (1987) 201-247.
74. O. V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, M. Kerscher, *Int. J. Cosmet. Sci.* **37** (2015) 455-464.
75. R. Stevanato, M. Bertelle, S. Fabris, *Regul. Toxicol. Pharm.* **69** (2014) 71-77.
76. J. A. Nichols, S. K. Katiyar, *Arch. Dermatol. Res.* **302** (2010) 71-83.
77. T. S. A. Thring, P. Hili, D. P. Naughton, *Bmc Complem. Altern. Med.* **9** (2009) 27.
78. B. Watson, u *Oregon Viticulture*, ur. E. W. Hellman, Oregon State University Press. Corvalis, Oregon, 2003.
79. L. Rolle, F. Torchio, G. Zeppa, V. Gerbi, *Am. J. Enol. Vitic.* **60** (2009) 93-97.
80. L. Rolle, F. Torchio, S. Giacosa, S. R. Segade, E. Cagnasso, V. Gerbi, *Am. J. Enol. Vitic.* **63** (2012) 195-204.
81. R. Amarowicz, R. Carle, G. Dongowski, A. Durazzo, R. Galensa, D. Kammerer, G. Maiani, M. K. Piskula, *Mol. Nutri. Food Res.* **53** (2009) S151-S183.
82. L. Hollecker, M. Pinna, G. Filippino, S. Scrugli, B. Pinna, F. Argiolas, M. Murru, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3402-3408.
83. Z. -M. Jin, J. -J. He, H. -Q. Bi, X. -Y. Cui, C. -Q. Duan, *Molecules* **14** (2009) 4922-4935.
84. C. -Y. Liu, L. -J. Wang, J.- F. Wang, B. -H. Wu, W. Liu, P. -G. Fan, Z. -C. Liang, S. -H. Li, *Food Chem.* **136** (2013) 643-649.

85. C. Ehrhardt, P. Arapitsas, M. Stefanini, G. Flick, F. Mattivi, *J. Mass Spectrom.* **49** (2014) 860-869.
86. R. F. Guerrero, A. Liazid, M. Palma, B. Puertas, R. Gonzalez-Barrio, A. Gil-Izquierdo, C. Garcia-Barroso, E. Cantos-Villar, *Food Chem.* **112** (2009) 949-955.
87. V. Ivanova, M. Stefova, B. Vojnoski, A. Dornyei, L. Mark, V. Dimovska, T. Stafilov, F. Kilar, *Food Res. Int.* **44** (2011) 2851-2860.
88. D. C. Manns, A. K. Mansfield, *J. Chromatogr. A* **1251** (2012) 111-121.
89. P. Koźmiński, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Lett.* **41** (2008) 662-674.
90. G. Mazza, L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, B. Ewert, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 4009-4017.
91. Y. Gao, G. A. Cahoon, *Am. J. Enol. Vitic.* **46** (1995) 339-345.
92. J. Cacho, P. Fernandez, V. Ferreira, J. E. Castells, *Am. J. Enol. Vitic.* **43** (1992) 244-248.
93. S. Van Buggenhout, D. N. Sila, T. Duvetter, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Comp. Rev. Food Sci. Technol.* **8** (2009) 105-117.
94. J. Oszmiański, A. Wojdyło, J. Kolniak, *Food Sci. Technol.* **42** (2009) 581-586.
95. M. Holzwarth, S. Korhummel, R. Carle, D. R. Kammerer, *Food Res. Int.* **48** (2012) 241-248.
96. S. H. Häkkinen, S. O. Kärenlampi, I. M. Heinonen, H. M. Mykkänen, A. R. Törrönen, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 2274-2279.
97. A. Chaovanalikit, R. E. Wrolstad, *J. Food Sci.* **69** (2004) FCT67-FCT72.
98. V. Lohachoompol, G. Srzednicki, J. Craske, *J. Biomed. Biotechnol.* **2004** (2004) 248-252.
99. B. de Ancos, E. Ibañez, G. Reglero, M. P. Pilar Cano, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 873-879.
100. E. M. González, B. de Ancos, M. P. Cano, *J. Sci.Food Agric.* **83** (2003) 722-726.
101. C. de Torres, M. C. Díaz-Maroto, I. Hermosín-Gutiérrez, M. S. Pérez-Coello, *Anal. Chim. Acta* **660** (2010) 177-182.
102. J. V. Garcia-Perez, M. A. García-Alvarado, J. A. Carcel, A. Mulet, *J. Food Engi.* **101** (2010) 49-58.
103. G. R. Nireesha, L. Divya, C. Sowmya, N. Venkateshan, M. Niranjan Babu, V. Lavakumar, *Int. J. Novel Trends Pharm. Sci.* **3** (2013) 87-98.
104. R. C. Khanal, L. R. Howard, R. L. Prior, *Food Res. Int.* **43** (2010) 1464-1469.

105. J. A. Larrauri, P. Rupérez, F. Saura-Calixto, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1390-1393.
106. A. Tseng, Y. Y. Zhao, *J. Food Sci.* **77** (2012) H192-H201.
107. T. Vashisth, R. K. Singh, R. B. Pegg, *Food Sci. Technol.* **44** (2011) 1649-1657.
108. D. E. Raynie, u *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, 2000.
109. D. Favretto, R. Flamini, *Am. J. Enol. Vitic.* **51** (2000) 55-64.
110. B. Sun, A. M. Ribes, M. C. Leandro, A. P. Belchior, M. I. Spranger, *Anal. Chim. Acta* **563** (2006) 382-390.
111. Z. -M. Jin, H. -Q. Bi, N. -N. Liang, C. -Q. Duan, *Anal. Lett.* **43** (2010) 776-785.
112. D. Rusjan, Z. Korosec-Koruza, *Acta Chim. Slov.* **54** (2007) 114-118.
113. Y. Yilmaz, R. T. Toledo, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 255-260.
114. N. Mateus, S. Marques, A. C. Goncalves, J. M. Machado, V. De Freitas, *Am. J. Enol. Vitic.* **52** (2001) 115-121.
115. P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi, L. Sebastiani, *J. Food Compos. Anal.* **21** (2008) 589-598.
116. C. Carrera, A. Ruiz-Rodriguez, M. Palma, C. G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* **732** (2012) 100-104.
117. K. Ghafoor, T. Hui, Y. H. Choi, *J. Food Biochem.* **35** (2011) 735-746.
118. A. Ghassempour, R. Heydari, Z. Talebpour, A. R. Fakhari, A. Rassouli, N. Davies, H. Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **31** (2008) 2686-2703.
119. A. Liazid, R. F. Guerrero, E. Cantos, M. Palma, C. G. Barroso, *Food Chem.* **124** (2011) 1238-1243.
120. D. Kammerer, A. Claus, A. Schieber, R. Carle, *J. Food Sci.* **70** (2005) C157-C163.
121. A. S. Meyer, S. M. Jepsen, N. S. Sorensen, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 2439-2446.
122. T. Maier, A. Goppert, D. R. Kammerer, A. Schieber, R. Carle, *Eur. Food Res. Technol.* **227** (2008) 267-275.
123. O. Mũnoz, M. Sepúlveda, M. Schwartz, *Food Chem.* **87** (2004) 487-490.
124. R. Gómez-García, G. C. G. Martínez-Ávila, C. N. Aguilar, *3 Biotech.* **2** (2012) 297-300.
125. Z. Y. Ju,L. R. Howard, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 5207-5213.
126. A. Chafer, M. C. Pascual-Marti, A. Salvador, A. Berna, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 2050-2056.

127. M. S. Dopico-García, P. Valentão, A. Jagodziñska, J. Klepczyñska, L. Guerra, P. B. Andrade, R. M. Seabra, *Talanta* **74** (2007) 20-31.
128. T. M. Takeuchi, C. G. Pereira, M. E. M. Braga, M. R. Maróstica Jr., P. F. Leal, M. A. A. Meireles, u *Extracting Bioactive Compounds from Food Products: Theory and Applications*, CRC Press, 2009.
129. J. M. Aguliera, u *Extraction Optimization in Food Engineering*, Marcel Decker, Inc., 2003.
130. C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, S. Godbout, J. R. Valéro, *Crit. Rev. Biotechnol.* **31** (2011) 227-249.
131. J. E. Cacace, G. Mazza, *J. Food Eng.* **59** (2003) 379-389.
132. M. Pinelo, J. Sineiro, M. J. Núñez, *J. Food Eng.* **77** (2006) 57-63.
133. K. S. Suslick, *Sci. Am.* **260** (1989) 80-86.
134. J. L. Capelo-Martínez, *Ultrasound in Chemistry: Analytical Application*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009.
135. M. Vinatoru, *Ultrason. Sonochem.* **8** (2001) 303-313.
136. I. Novak, P. Janeiro, M. Seruga, A. M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* **630** (2008) 107-115.
137. I. Revilla, S. Pérez-Magariño, M. L. González-SanJosé, S. Beltrán, *J. Chromatogr. A* **847** (1999) 83-90.
138. C. S. Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* **902** (2000) 227-250.
139. W. Routray, V. Orsat, *Food Bioprocess. Tech.* **5** (2012) 409-424.
140. D. Biscaro Pedrolli, A. Costa Monteiro, E. Gomes, E. Cano Carmona, *Open Biotechnol. J.* **3** (2009) 9-18.
141. R. S. Jayani, S. Saxena, R. Gupta, *Process Biochem.* **40** (2005) 2931-2944.
142. S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 115-127.
143. S. A. Barker, *J. Biochem. Bioph. Meth.* **70** (2007) 151-162.
144. A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganá, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2521-2532.
145. V. Ivanova, M. Stefova, F. Chinnici, *J. Serb. Chem. Soc.* **75** (2010) 45-59.
146. R. Ferrer-Gallego, J. M. Hernández-Hierro, J. C. Rivas-Gonzalo, M. T. Escribano-Bailón, *Anal. Chim. Acta* **732** (2012) 73-77.
147. J. A. Kennedy, Y. Hayasaka, S. Vidal, E. J. Waters, G. P. Jones, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 5348-5355.
148. Y. R. Lu, L. Y. Foo, *Food Chem.* **65** (1999) 1-8.

149. V. Cheynier, J. Rigaud, *Am. J. Enol. Vitic.* **37** (1986) 248-252.
150. M. J. Aguirre, Y. Y. Chen, M. Isaacs, B. Matsuhiro, L. Mendoza, S. Torres, *Food Chem.* **121** (2010) 44-48.
151. A. Liazid, G. F. Barbero, M. Palma, J. Brigui, C. G. Barroso, *Chromatographia* **72** (2010) 417-424.
152. J. L. McCallum, R. Yang, J. C. Young, J. N. Strommer, R. Tsao, *J. Chromatogr. A* **1148** (2007) 38-45.
153. O. Gürbüz, D. Göcmen, F. Dagdelen, M. Gürsoy, S. Aydin, I. Sahin, L. Büyükuysal, M. Usta, *Food Chem.* **100** (2007) 518-525.
154. M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J. P. Pérez, T. Borges, F. J. G. Montelongo, *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 249-257.
155. P. Mazzuca, P. Ferranti, G. Picariello, L. Chianese, F. Addeo, *J. Mass Spectrom.* **40** (2005) 83-90.
156. R. Flamini, *ISRN Spectroscopy* **2013** (2013) 1-45.
157. M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar,L. A. Escaleira, *Talanta* **76** (2008) 965-977.
158. R. T. Eibach, *Acta Hort.* **603** (2003) 687-691.
159. B. Cemeroglu, S. Velioglu, S. Isik, *J. Food Sci.* **59** (1994) 1216-1218.
160. N. Martí, A. Pérez-Vicente, C. García-Viguera, *J. Sci. Food Agric.* **82** (2002) 217-221.
161. C. Garcı́a-Viguera, P. Bridle, *Food Chem.* **64** (1999) 21-26.
162. J. Raynal, M. Moutounet, J. -M. Souquet, *J. Agric. Food Chem.* **37** (1989) 1046-1050.
163. A. Belancic, Z. Gunata, M. -J. Vallier, E. Agosin, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 1453-1459.
164. M. Ü. Ünal, V. A. Aksoy, A. A. Şener, *Eur. Food Res. Technol.* **238** (2014) 9-15.
165. S. Guyot, V. Cheynier, J. -M. Souquet, M. Moutounet, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 2458-2462.
166. C. Y. Lee, N. L. Smith, A. P. Pennesi, *J. Sci. Food Agric.* **34** (1983) 987-991.
167. G. Rapeanu, A. Van Loey, C. Smout, M. Hendrickx, *Food Chem.* **94** (2006) 253-261.
168. M. Ü. Ünal, A. Şener, *J. Agric. Food Chem.* **86** (2006) 2374-2379.
169. N. P. Seeram, L. D. Bourquin, M. G. Nair, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 4924-4929.
170. R. M. de Ferrars, C. Czank, Q. Zhang, N. P. Botting, P. A. Kroon, A. Cassidy, C. D. Kay, *Brit. J. Pharmacol.* **171** (2014) 3268–3282.
171. K. Yokotsuka, V. L. Singleton, *Am. J. Enol. Vitic.* **48** (1997) 13-25.

172. P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, M. Moutounet, *Phytochem.* **45** (1997) 1365-1369.
173. A. E. Delgado, A. C. Rubiolo, *Food Sci. Technol.* **38** (2005) 135-142.
174. G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, M. Tattini, *Plant Sci.* **196** (2012) 67-76.
175. A. Versari, S. Biesenbruch, D. Barbanti, P. J. Farnell, S. Galassi, *Food Res. Int.* **30** (1997) 811-817.
176. Y. Liu, S. L. Wei, M. C. Liao, *Ind. Crops Prod.* **49** (2013) 837-843.
177. B. Lapornik, M. Prosek, A. G. Wondra, *J. Food Eng.* **71** (2005) 214-222.
178. P. Riesz, D. Berdahl, C. L. Christman, *Environ. Health Perspect.* **64** (1985) 233-252.
179. K. Vilkhu, R. Mawson, L. Simons, D. Bates, *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* **9** (2008) 161-169.
180. A. Megriche, A. Belhadj, A. Mgaidi, *Medit. J. Chem.* **1** (2012) 200-209.
181. I. Tomaz, L. Maslov, *Food Anal. Method.* **9** (2016) 401-410.
182. J. Bakker, C. F. Timberlake, *J. Sci. Food Agric.* **36** (1985) 1315-1324.
183. C. Mané, J. M. Souquet, D. Ollé, C. Verriés, F. Véran, G. Mazerolles, V. Cheynier, H. Fulcrand, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 7224-7233.
184. Y. R. Lu, L. Y. Foo, *Tetrahedr. Lett.* **42** (2001) 1371-1373.
185. Q. Y. Zhu, A. Q. Zhang, D. Tsang, Y. Huang, Z. -Y. Chen, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 4624-4628.
186. A. P. Jogdand, P. L. Kadam, *IOSR J. App. Phy.* **6** (2014) 14-22.
187. J. Nari, G. Noat, J. Ricard, *Biochem. J.* **279** (1991) 343-350.
188. P. Janas, S. Bocian, P. Jandera, T. Kowalkowski, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* **1429** (2016) 198-206.
189. E. Kranjc, A. Albreht, I. Vovk, D. Makuc, J. Plavec, *J. Chromatogr. A* **1437** (2016) 95-106.
190. S. Cheng, H. Tang, H. Yan, *J. Appl. Polym. Sci.* **102** (2006) 4652-4658.
191. F. A. Tomás Barberán, M. A. Blázquez, C. Garcia-Viguera, F. Ferreres, F. Tomás-Lorente, *Phytochem. Anal.* **3** (1992) 178-181.
192. D. Kammerer, J. G. Kljusuric, R. Carle, A. Schieber, *Eur. Food Res. Technol.* **220** (2005) 431-437.
193. D. M. Teixeira, R. F. Patão, A. V. Coelho, C. T. da Costa, *J. Chromatogr. A* **1103** (2006) 22-28.
194. A. C. Manhita, D. M. Teixeira, C. T. da Costa, *J. Chromatogr. A* **1129** (2006) 14-20.
195. M. Lores, M. Iglesias Estévez, M. Álvarez Casas, M. Llompart, C. M. García Jares, *Rec. Rur.* **8** (2012) 39-47.

196. M. Scordino, A. Di Mauro, A. Passerini, E. Maccarone, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 1965-1972.
197. J. Bretag, D. R. Kammerer, U. Jensen, R. Carle, *Eur. Food Res. Technol.* **228** (2009) 985-999.
198. D. H. Marchand, K. Croes, J. W. Dolan, L. R. Snyder, R. A. Henry, K. M. R. Kallury, S. Waite, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* **1062** (2005) 65-78.
199. A. Rawson, A. Patras, B. K. Tiwari, F. Noci, T. Koutchma, N. Brunton, *Food Res. Int.* **44** (2011) 1875-1887.
200. A. Patras, N. P. Brunton, C. O'Donnell, B. K. Tiwari, *Trends Food Sci. Tech.* **21** (2010) 3-11.
201. I. Ioannou, I. Hafsa, S. Hamdi, C. Charbonnel, M. Ghoul, *J. Food Eng.* **111** (2012) 208-217.
202. T. Suzuki, *USA Pat.,* 4254104, 1981.
203. J. Guth, V. Lentner, *Google Pat*., WO2005097059 A1, 2005.
204. S. Şahin Ercan, C. Soysal, *Natural Sci.* **5** (2013) 5-13.
205. F. Chemat, Zill-e-Huma, M. K. Khan, *Ultrason. Sonochem.* **18** (2011) 813-835.
206. B. Tal-Figiel, *Chem. Eng. Res. Des.* **85** (2007) 730-734.
207. M. Levina, M. H. Rubinstein, A. R. Rajabi-Siahboomi, *Pharmaceut. Res.* **17** (2000) 257-265.
208. G. Ruecroft, D. Hipkiss, T. Ly, N. Maxted, P. W. Cains, *Org. Process Res. Dev.* **9** (2005) 923-932.
209. Y. L. Su, L. K. Leung, Y. Huang, Z. -Y. Chen, *Food Chem.* **83** (2003) 189-195.
210. J. P. Calvi, F. J. Francis, *J. Food Sci.* **43** (1978) 1448-1456.
211. L. P. Qiao, X. Q. Ye, Y. J. Sun, J. Q. Ying, Y. Shen, J. C. Chen, *Ultrason. Sonochem.* **20** (2013) 1017-1025.
212. L. Qiao, Y. Sun, R. Chen, Y. Fu, W. Zhang, *Plos One* **9** (2014).
213. M. Biesaga , K. Pyrzyńska, *Food Chem.* **136** (2013) 46-54.
214. G. Hrazdina, A. J. Borzell, W. B. Robinson, *Am. J. Enol. Vitic.* **21** (1970) 201-204.
215. L. Cabrita, T. Fossen, O. M. Andersen, *Food Chem.* **68** (2000) 101-107.
216. R. Wang, W. B. Zhou, R. -A. H. Wen, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 5924-5932.
217. N. Li, L. S. Taylor, M. G. Ferruzzi,L. J. Mauer, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 12531-12539.
218. T. J. Mason, J. P. Lorimer, *Applied Sonochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002.

219. L. V. Jorgensen, C. Cornett, U. Justesen, L. H. Skibsted, L. O. Dragsted, *Free Rad. Res.* **29** (1998) 339-350.

220. O. Dangles, G. Fargeix, C. Dufour, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* (1999) 1387-1395.

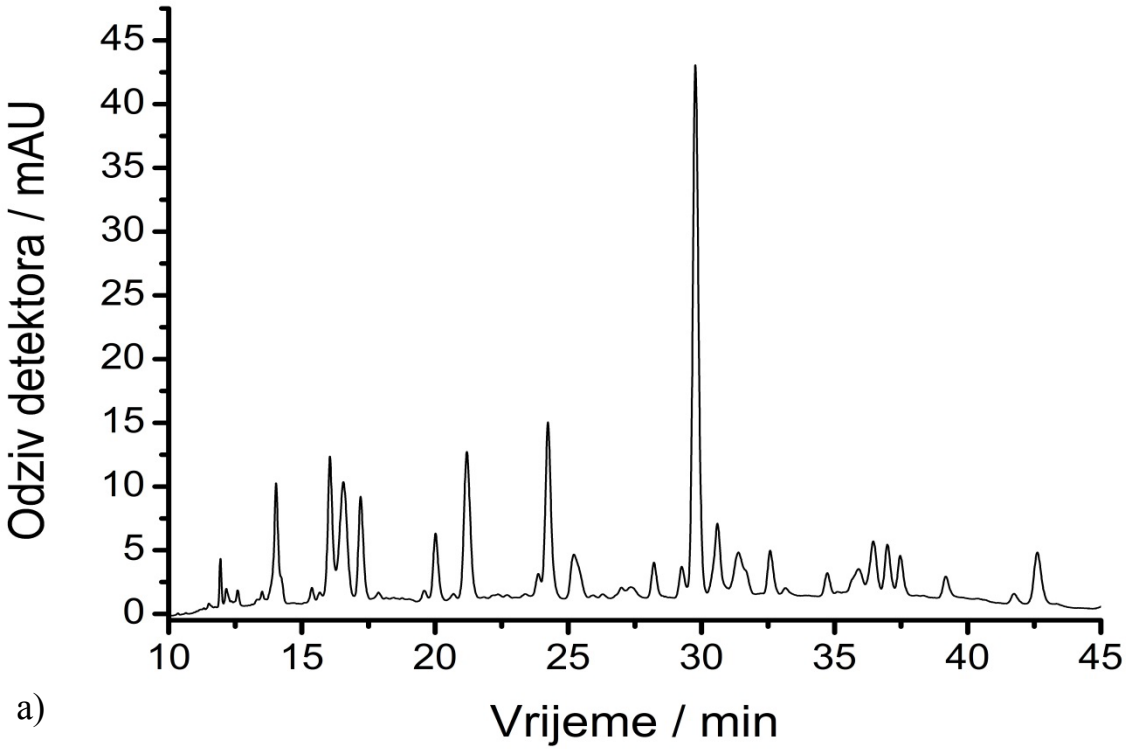
221. S. Valcic, J. A. Burr, B. N. Timmermann, D. C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.* **13** (2000) 801-810.

222. V. Roginsky, A. E. Alegria, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4529-4535.

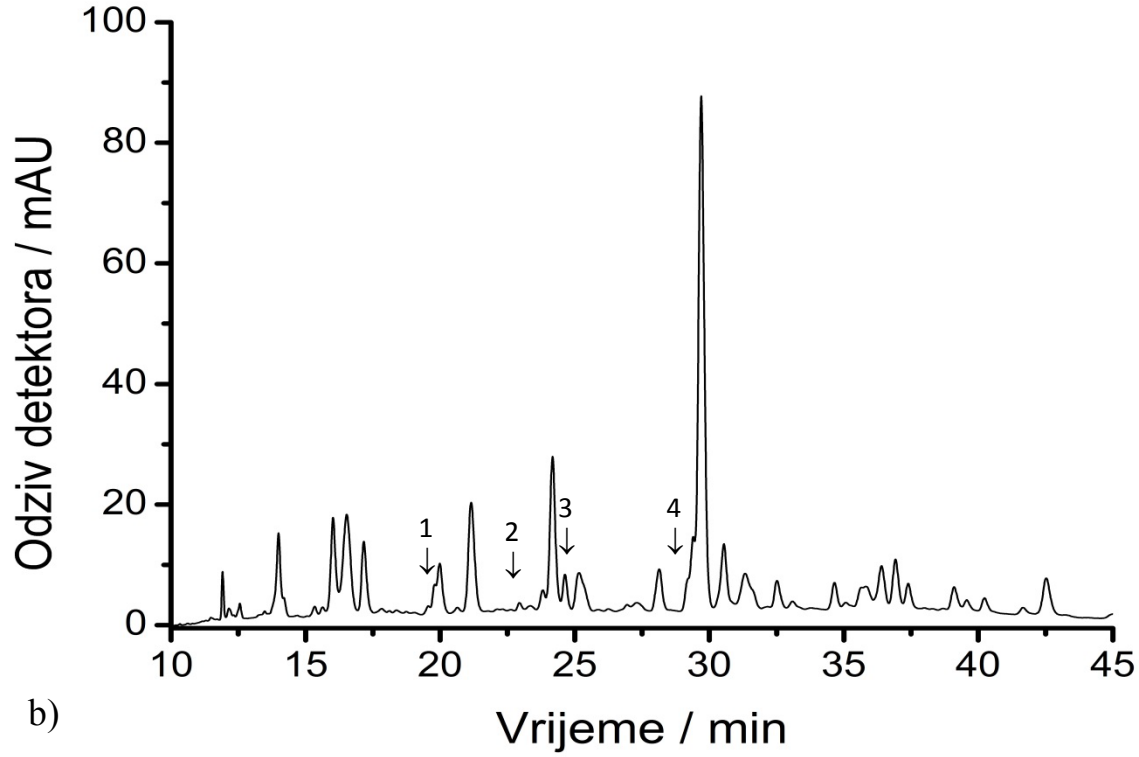
7. DODACI

Tablica 7.1. Utjecaj otapala na maseni udio pojedinih flavonoida

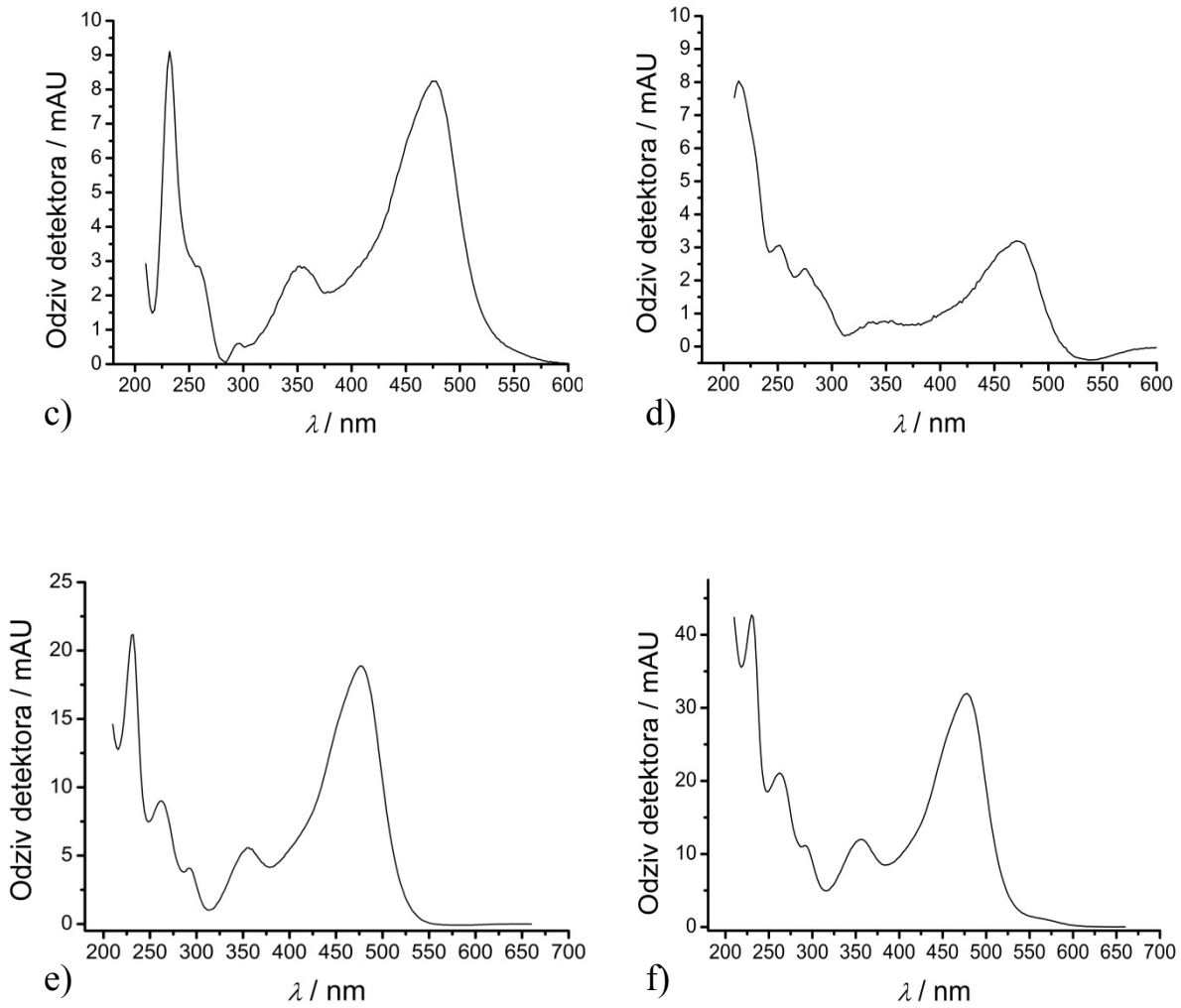
Spoj	w / mg kg^{-1}		
	MeOH	**EtOH**	**EtOH + 1 % FA**
Delfinidin-3,5-*O*-diglukozid	864,36±24,73[a]	1040,47±10,71[b]	1340,47±4,01[c]
Cijanidin-3,5-*O*-diglukozid	1122,89±29,73[a]	1171,23±7,46[a]	1347,41±7,50[b]
Delfinidin-3-*O*-glukozid	9284,13±71,73[a]	9006,86±73,90[b]	10960,35±61,00[c]
Peonidin-3,5-*O*-diglukozid	954,63±4,51[a]	940,65±5,27[a]	1127,25±14,01[b]
Malvidin-3,5-*O*-diglukozid	13630,26±30,00[a]	13909,08±44,76[b]	15766,92±57,85[c]
Cijanidin-3-*O*-glukozid	1796,35±12,91[a]	1716,18±13,86[b]	2053,23±10,01[c]
Peonidin-3-*O*-glukozid	485,82±7,51[a]	508,18±8,83[a]	590,17±11,00[b]
Malvidin-3-*O*-glukozid	6783,82±10,71[a]	6988,87±50,23[b]	7832,98±30,00 [c]
Ukupni antocijanini	**34922,26±105,34[a]**	**35281,52±100,76[a]**	**41018,78±110,32[b]**
Miricetin-3-*O*-glukozid	481,91±5,54[a]	528,04±7,00[b]	550,44±11,83[c]
Rutin	245,11±5,02[a]	250,71±4,27[a]	255,11±5,03[a]
Kvercetin-3-*O*-glukozid	1587,82±15,27[a]	1661,67±10,50[b]	1720,70±16,91[c]
Kemferol- 3-*O*-glukuronid	54,06±5,49[a]	69,61±9,51[b]	111,01±10,03[c]
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	92,57±2,44[a]	106,11±4,47[b]	110,14±2,02[b]
Ukupni flavonoli	**2462,47±9,37[a]**	**2616,14±10,32[b]**	**2747,40±18,82[c]**
Galokatehin	6,06±1,01[a]	7,27±1,94[a]	11,02±0,97[b]
Procijanidin B1	49,16±2,02[a]	53,18±3,04[a,b]	59,05±2,09[b]
Epigalokatehin	25,32±2,08[a]	24,04±3,12[a]	36,71±1,03[b]
Katehin	7,73±2,52[a]	14,25±3,03[b]	12,48±2,49[b]
Procijanidin B2	0,73±0,64[a]	0,66±0,57[a]	17,68±0,64[b]
Epikatehin	20,54±1,53[a]	20,77±3,68[a]	26,93±0,91[b]
Ukupni flavan-3-oli	**109,54±3,22[a]**	**120,17±5,65[b]**	**163,87±4,87[c]**


Odziv detektora / mAU
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
10
15
20
25
30
35
40
45
Vrijeme / min

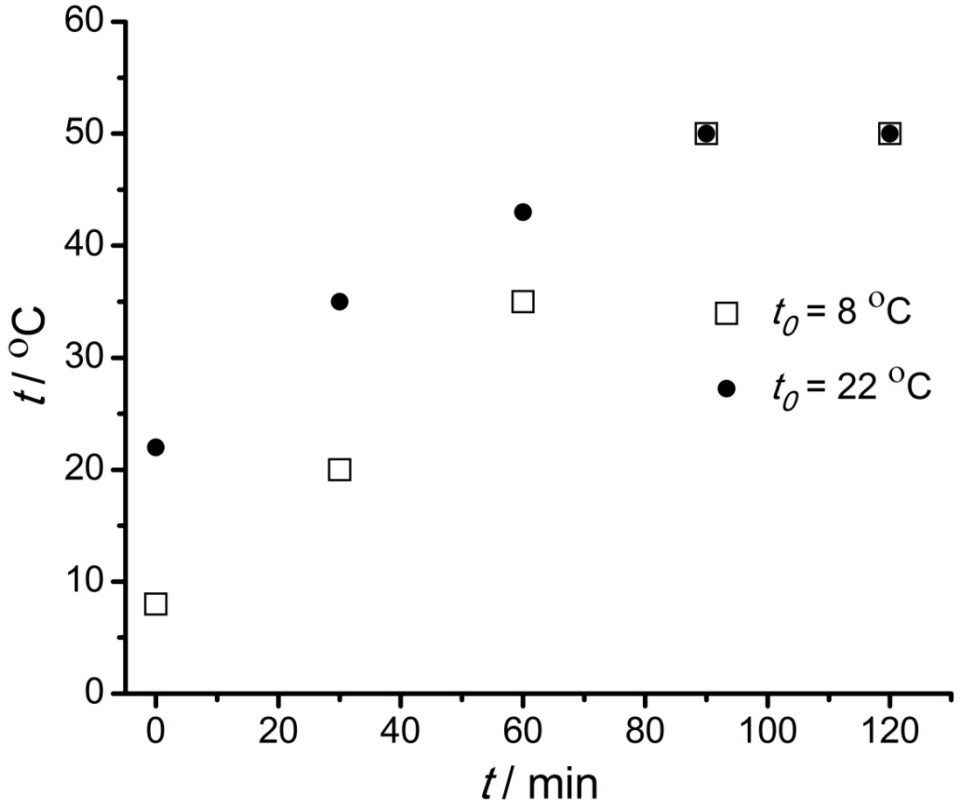
a)


Odziv detektora / mAU
0
20
40
60
80
100
1
2
3
4
10
15
20
25
30
35
40
45
Vrijeme / min

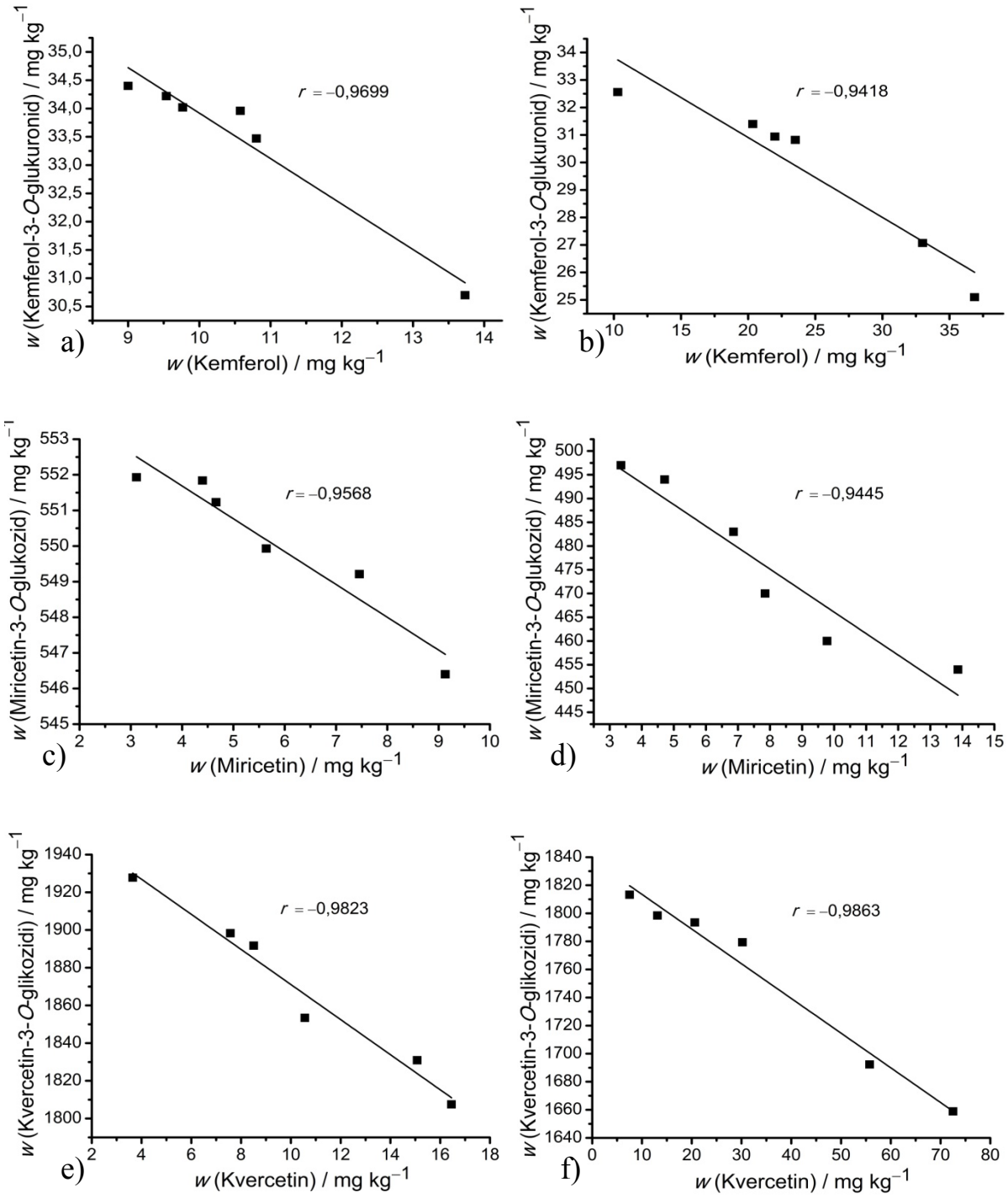
b)



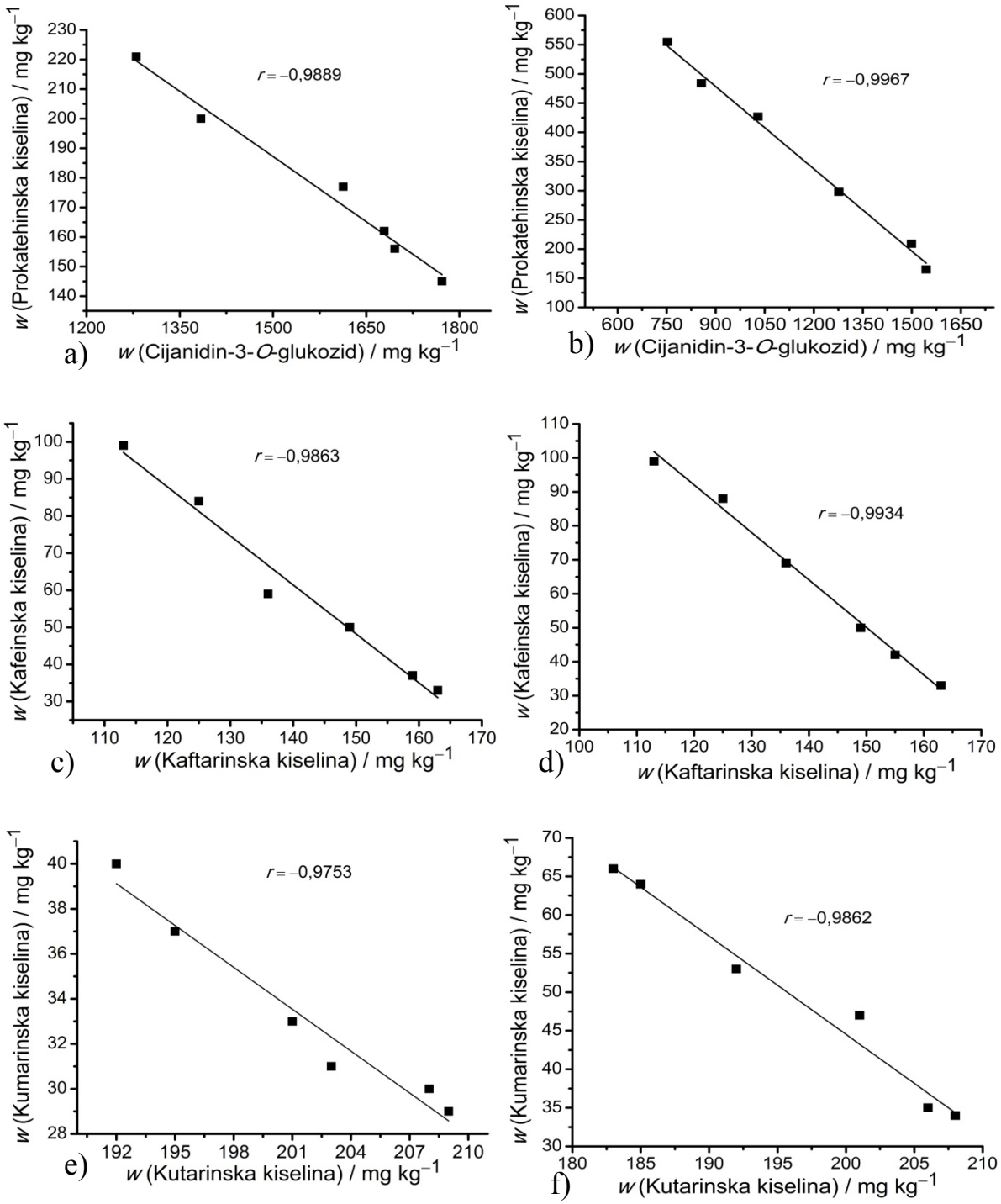
Slika 7.1. a) Kromatogram acetonitrilnog ekstrakta snimljen pri λ=360 nm, b) Kromatogram acetonskog ekstrakta snimljen pri λ=360 nm, c) UV-spektar pika 1 u kromatogramu acetonskog ekstrakta, d) UV-spektar pika 2 u kromatogramu acetonskog ekstrakta, e) UV-spektar pika 3 u kromatogramu acetonskog ekstrakta i f) UV-spektar pika 4 u kromatogramu acetonskog ekstrakta



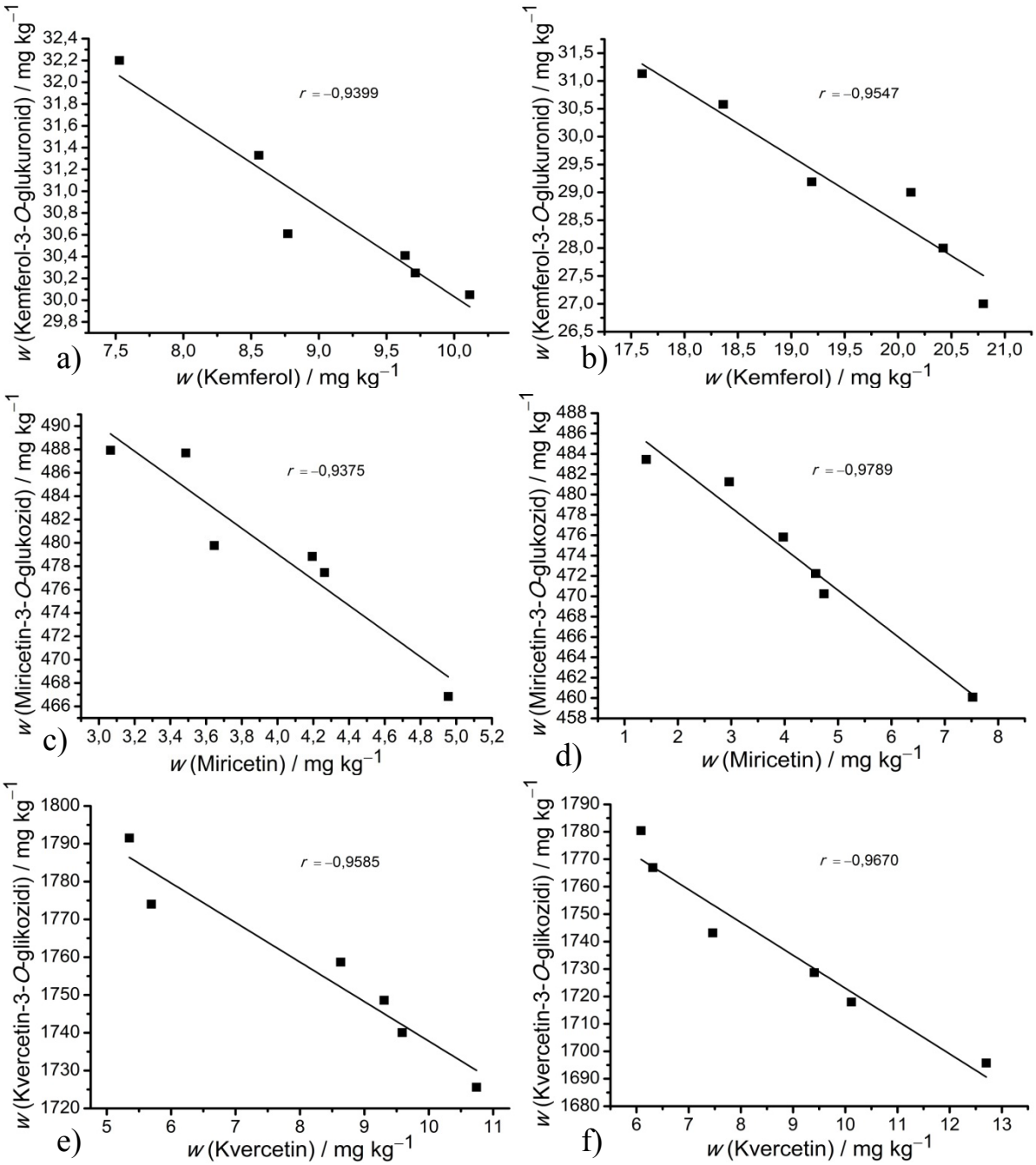
Slika 7.2. Određivanje ravnotežne temperature u ultrazvučnoj kupelji



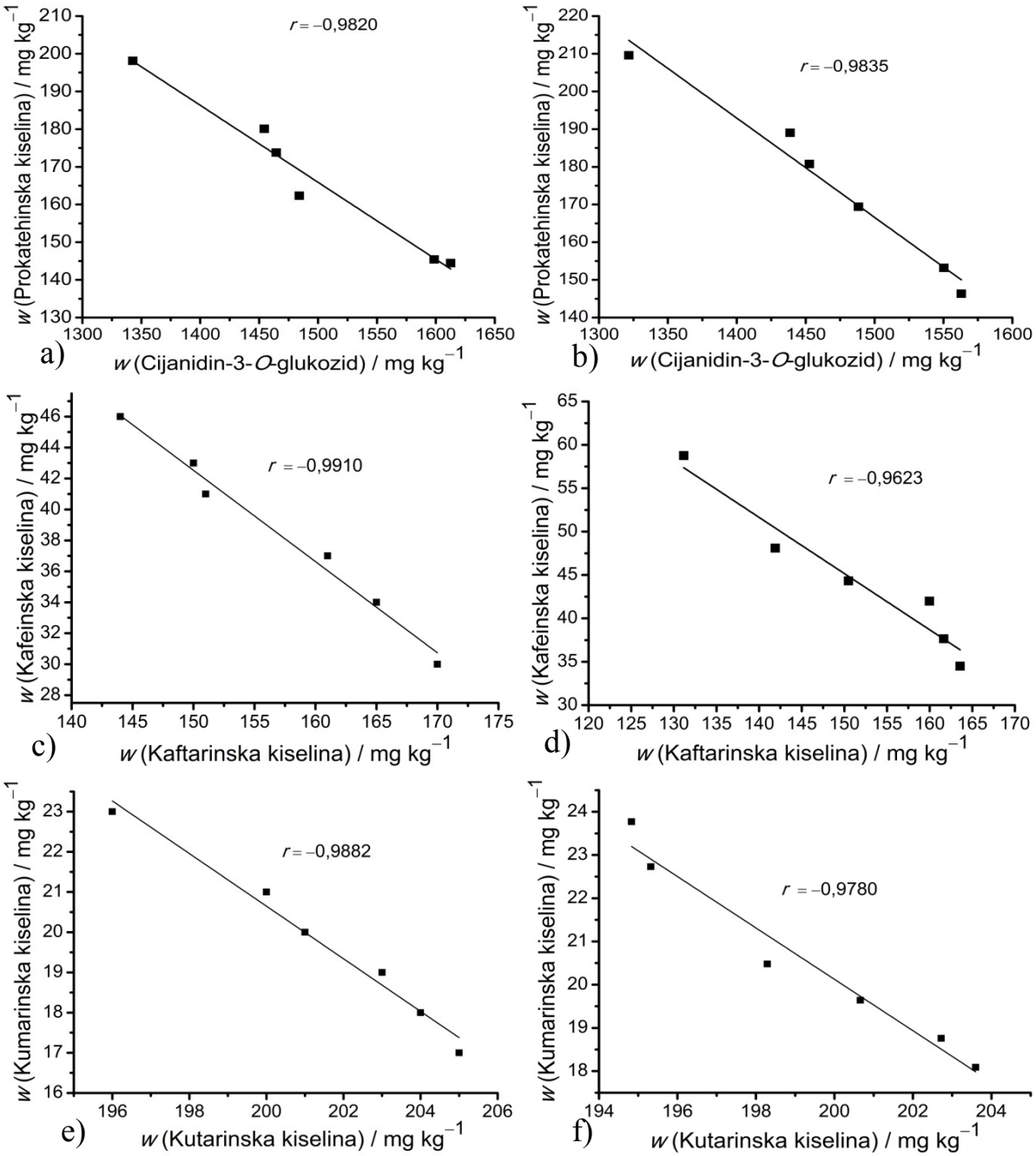
Slika 7.3. Linearna korelacija između masenih udjela a) kemferola i kemferol-3-*O*-glukuronida određena pri 60 °C, b) kemferola i kemferol-3-*O*-glukuronida određena pri 80 °C, c) miricetina i miricetin-3-*O*-glukuronida određena pri 60 °C, d) miricetina i miricetin-3-*O*-glukuronida određena pri 80 °C, e) kvercetina i ukupnih kvercetin-3-*O*-glikozida određena pri 60 °C te f) kvercetina i ukupnih kvercetin-3-*O*-glikozida određena pri 80 °C



Slika 7.4. Linearna korelacija između masenih udjela a) prokatehinske kiseline i cijanidin-3-*O*-glukozida određena pri 60 °C, b) prokatehinske kiseline i cijanidin-3-*O*-glukozida određena pri 80 °C, c) kafeinske i kaftarinske kiseline određena pri 60 °C, d) kafeinske i kaftarinske kiseline određena pri 80 °C, e) kumarinske i kutarinske kiseline određena pri 60 °C te f) kumarinske i kutarinske kiseline određena pri 80 °C



Slika 7.5. Linearna korelacija između masenih udjela a) kemferola i kemferol-3-*O*-glukuronida određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka, b) kemferola i kemferol-3-*O*-glukuronida određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka, c) miricetina i miricetin-3-*O*-glukuronida određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka, d) miricetina i miricetin-3-*O*-glukuronida određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka, e) kvercetina i ukupnih kvercetin-3-*O*-glikozida određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka te f) kvercetina i ukupnih kvercetin-3-*O*-glikozida određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka



Slika 7.6. Linearna korelacija između masenih udjela a) prokatehinske kiseline i cijanidin-3-*O*-glukozida određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka, b) prokatehinske kiseline i cijanidin-3-*O*-glukozida određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka, c) kafeinske i kaftarinske kiseline određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka, d) kafeinske i kaftarinske kiseline određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka, e) kumarinske i kutarinske kiseline određena pri 60 °C uz primjenu ultrazvuka te f) kumarinske i kutarinske kiseline određena pri 70 °C uz primjenu ultrazvuka

8. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS

Ivana Tomaz rođena je 12. studenog 1980. g. u Zagrebu. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje završava u Kutini. Po završetku srednje škole upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojemu 2010. g. stječe zvanje diplomiranog inženjera kemije. Od 2011. g. zaposlena je na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u zvanju stručnog suradnika u sustavu znanosti i visokog obrazovanja gdje se kontinuirano bavi istraživanjima sastava i sadržaja fenola i drugih skupina spojeva u grožđu kao i razvojem i implementacijom različitih kemijskih metoda i tehnika. Doktorski studije kemije na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2012. godine.

Koautorica je 9 znanstvenih radova koji su objavljeni u časopisima citiranim u bazi CC/SCI te 2 rada u ostalim časopisima. Sudjelovala je na 9 međunarodnih i nacionalnih skupova.

.

POPIS RADOVA

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima:

1. P. Štambuk, D. Tomašković, I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, J. Karoglan Kontić, Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics, *3 Biotech* **6** (2016) 224-235.

2. L. Maslov, I. Tomaz, M. Mihaljević Žulj, A. Jeromel, Aroma characterization of predicate wines from Croatia, *European Food Research and Technology* (2016) doi:10.1007/s00217-016-2741-x.

3. J. Karoglan Kontić, I. Rendulić Jelušić, I. Tomaz, D. Preiner, Z. Marković, D. Stupić, Ž. Andabaka, E. Maletić, Polyphenolic Composition of the Berry Skin of Six Fungus-Resistant Red Grapevine Varieties, *International Journal of Food Properties* **19** (2016) 1809-1824.

4. I. Tomaz, L. Maslov, Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Different Matrices using Phenyl- Hexyl Stationary Phase, *Food Analytical Methods* **19** (2016) 401-410.

5. I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, D. Periner, D. Ašperger, J. Karoglan Kontić, Recovery of Flavonoids from Grape Skins by Enzyme-Assisted Extraction, *Separation Science and Technology* **51** (2016) 255-268.

6. I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, D. Periner, D. Ašperger, J. Karoglan Kontić,Solid-liquid Extraction of Phenolics from Red Grape Skins, *Acta Chimica Slovenica* **63** (2016) 287-297.

7. I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, D. Periner, D. Ašperger, J. Karoglan Kontić, Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology, *Phytochemical A nalysis* **27** (2016) 13-22.

8. M. Mihaljević Žulj, L. Maslov, I. Tomaz, A. Jeromel, Determination of 2-aminoacetophenone in white wines using ultrasound assisted SPME coupled, *Journal of Analytical Chemistry* **70** (2015) 814-818.

9. M. Mihaljević Žulj, I. Tomaz, L. Maslov Bandić, I. Puhelek, A. M. Jagatić Korenika, A. Jeromel, Influence of Different Yeast Strains on Metabolism of Tryptophan and Indole-3-Acetic Acid During Fermentation, *South African Journal of Enology and Viticulture* **36** (2015) 44-49.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. M. Karoglan, M. Osrečak, I. Tomaz, J. Sladić, Utjecaj roka berbe na sadržaj polifenola i antocijana u grožđu crnih sorata vinove loze, *Journal of Central European Agriculture* **17** (2016) 874-883.

2. D. Preiner, J. Karoglan Kontic, E. Maletić, Z. Marković, I. Tomaz, Sadržaj polifenola u prošeku od hrvatskih autohtonih sorata vinove loze, *Glasnik zaštite bilja* **5** (2014) 75-80.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom:

1. Ž. Andabaka, D. Stupić, D. Preiner, Z. Marković, E. Maletić, J. Karoglan Kontić, I. Tomaz, Sadržaj antocijanina autohtonih dalmatinskih crnih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.), *Zbornik radova 51. hrvatski i 11. međunarodni simpozij agronoma* / Pospišil, Milan; Vnučec, Ivan (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 2015, 383-386.

2. A. Mucalo, G. Zdunić, I. Tomaz, L. Maslov, I. Budić-Leto, E. Maletić, Influence of harvest date on the primary metabolites of ″Plavac mali″ (*Vitis vinifera* L.) grapes, *Međunarodni znanstveno-stručni skup 15. Ružičkini dani "Danas znanost - sutra industrija": zbornik radova = International Scientific and Professional Conference 15th Ružička days "Today science - tomorrow industry": proceedings* / Šubarić, Drago ; Jukić, Ante (ur.). Osijek; Zagreb: Faculty of Food Technology; Croatian Society of Chemical Engineers, 2015, 297-305.

3. M. Mihaljević Žulj, I. Tomaz, L. Maslov Bandić, I. Puhelek, A. M. Jagatić Korenika, A. Jeromel, Efekt dodatka amonijevog sulfata na metabolizam triptofana tijekom alkoholne fermentacije, *49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture* 2014.

4. A. Tomić, M. Žulj Mihaljević, I. Tomaz, A. Jeromel, Utjecaj pektolitičkih enzima na polifenolni sastav kupinovog vina, *48. Hrvatski i 8. Međunarodni Simpozij Agronoma* Osijek, Hrvatska, 2013 855-859.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. L. Maslov, M. Mihaljević Žulj, I. Tomaz, A. Jeromel, Determination of 2-aminoacetophenone in Riesling wines by SPME-GC-MS, *Book of Abstracts*. Riva del Garda, 2014, 19.

2. L. Maslov, I. Tomaz, M. Medić-Šarić, Determination of polyphenols and indole-3-acetic acid in wines by HPLC-DAD-FLD, *Book of Abstracts* Poreč, 2013, 58.

3. M. Mihaljević Žulj, A. M. Jagatić Korenika, I. Puhelek, L. Maslov, I. Tomaz, A. Jeromel, Influence of different yeast strain on metabolism of tryptophan and indole-3-acetic acid as the precursors of „untypical aging off- flavour“ (UTA) in wine, *International Symposium for Agriculture and Food:Book of Abstracts*. Skoplje, 2012, 55.

4. I. Tomaz, L. Maslov, J. Karoglan Kontić, Determination of anthocyanins in hybrid wine by HPLC-DAD AND HPLC-MS, *Book of Abstracts* Zagreb, 2012, 43.

5. I. Tomaz, V. Vojković, I. Primožić. Fluorescence Quenching of Antropogenic Fulvic Acid by Iridium(IV), *Euroanalysis, Abstracts* Innsbruck 2009, 783.