

Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina

Lisica, Patricija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:783156>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Patricija Lisica

6867/PT

**UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA IZOLACIJU
FENOLNIH SPOJEVA IZ ORGANSKOG OTPADA U
PROIZVODNJI VINA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

Mentor: *prof.dr.sc. Verica Dragović- Uzelac*

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za sušenje i praćenje biološki aktivnih spojeva

UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA IZ ORGANSKOG OTPADA U PROIZVODNJI VINA

Patricija Lisica, 6867/ PT

Sažetak: Cilj ovog istraživanja je bio ispitati utjecaj otapala i vremena ekstrakcije na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost iz prethodno liofiliziranih te odmašćenih uzoraka sjemenki grožđa sorti Merlot, Teran te Cabernet Sauvignon. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji uz primjenu 50%-tne vodene otopine etanola i 50%-tne vodene otopine acetona na 30 °C pri vremenu od 15, 30 te 45 minuta. Ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline i flavonoli određivani su spektrofotometrijski, a pojedinačni fenolni spojevi određivani su HPLC metodom. Antioksidacijski kapacitet određivan je DPPH metodom. Veće koncentracije ukupnih fenolnih spojeva i najviši antioksidacijski kapacitet su određeni uz primjenu 50%-tne vodene otopine acetona uz trajanje ekstrakcije od 30 minuta za sorte grožđa Teran i Cabernet Sauvignon, odnosno 45 minuta za sortu grožđa Terran .

Ključne riječi: organski otpad od proizvodnje vina, sjemenke komine grožđa, fenolni spojevi, ekstrakcijski uvjeti, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 37 stranica, 5 slika, 8 tablica, 64 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr.sc. Verica Dragović- Uzelać*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Sandra Pedisić, dr.sc. Zoran Zorić, Zdenka Pelaić dipl.ing.*

Rad predan: srpanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Drying and Monitoring Biologically Active Compounds

EFFECT OF EXTRACTION CONDITIONS ON ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM ORGANIC WASTE IN WINE PRODUCTION

Patricija Lisica, 6867/ PT

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of solvents and extraction time on the content of polyphenols and antioxidant activity of previously lyophilized and defatted samples of grape seed, varieties Teran, Merlot and Cabernet Sauvignon. Extraction was performed in ultrasound bath by using two extraction solvents: 50 % (v/v) aqueous solution of ethanol (E) and acetone (A) through 15, 30 and 45 minutes at 30 °C. Total phenols, hydroxycinnamic acids and flavonols were determined spectrophotometrically and the individual phenolic compounds were determined by HPLC method. Antioxidant capacity was determined by DPPH method. Results indicated that more efficient solvent for polyphenol extraction and antioxidant capacity from defatted grape seeds was obtained with 50% acetone (v/v) for 30 minutes for grape varieties Teran and Cabernet Sauvignon, and 45 minutes for the grape variety Teran.

Keywords: organic waste from wine production, grape seed pomace, phenolic compounds, extraction conditions, antioxidant capacity

Thesis contains: 37 pages, 5 figures, 8 tables, 64 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Sandra Pedisić, PhD. Zoran Zorić, Zdenka Pelaić BSc*

Thesis delivered: July, 2016.

Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta "Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina". Projekt je sufinancirala Europska unija u okviru poziva RC.2.2.08 „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Regionalna konkurentnost 2007. - 2013.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Organski otpad iz proizvodnje vina	2
2.2. Fenolni spojevi komine grožđa	2
2.2.1. Flavonoidi	3
2.2.1.1. Flavan-3-oli	5
2.2.1.2. Flavonoli	6
2.2.2. Neflavonoidi	6
2.2.2.1. Fenolne kiseline	6
2.2.3. Stilbeni	7
2.2.4. Tanini	7
2.3. Ekstrakcija polifenola	8
2.3.1. Utjecaj otapala, vremena i temperature na proces ekstrakcije	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Uzorci sjemenki komine grožđa	11
3.2. Metode rada	11
3.2.1. Određivanje ukupne suhe tvari	11
3.2.2. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka odmašćenih sjemenki grožđa	12
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola	13
3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	15
3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju	17
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta dpph metodom	20
4. REZULTATI	22
5. RASPRAVA	27
5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju polifenola	27
5.2. Utjecaj vremena trajanja na ekstrakciju polifenola	28
5.3. Utjecaj otapala i vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet	29
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA	32

1. UVOD

Vinova loza kao jedna od najstarijih kultiviranih biljaka u svijetu, sa više od 60 milijuna tona godišnje proizvodnje grožđa, predstavlja jednu od najvažnijih voćarskih kultura. Grozd vinove loze sastoji se od peteljke i bobice (sjemenke, meso, pokožica) čiji postotni udio je karakterističan za svaku pojedinu sortu vinove loze, a ovisan je i o agro-klimatskim uvjetima koji utječu na prinos i kakvoću grožđa. Tijekom proizvodnje vina nastaje znatna količina komine (13-20%) koja se sastoji od vode (55-69%) te suhe tvari (peteljke, pokožice i sjemenke) i predstavlja organski otpad prehrambene industrije čije nepropisno odlaganje predstavlja velik rizik za okoliš. Razvoj postupaka i metoda izolacije bioaktivnih spojeva iz organskog otpada omogućilo je kvalitetno korištenje komine grožđa kao korisnog nusprodukta vinifikacije, a komina je posebno zanimljiva zbog kemijskog sastava u kojem dominiraju različiti biološki aktivni spojevi koji su važni za ljudsko zdravlje. Biološki aktivni spojevi iz sjemenki, pokožice, vinskog taloga i komine pripadaju skupini tzv. fenolnih spojeva kao što su flavonoidi, tanini, fenolne kiseline, stilbeni i kumarini, a njihova količina je uvjetovana sortimentom, agro-klimatskim uvjetima, svojstvima tla, postupcima proizvodnje vina, vremenu između nastajanja otpada i valorizacije, itd. (Teixeira i sur., 2014). U sjemenkama, čiji udio u suhoj tvari komine varira od 20 do 38% se nalazi oko 60% polifenola grožđa. Pri izolaciji fenolnih spojeva ekstrakciju je potrebno provesti pri optimalnim uvjetima zbog osjetljivosti biološki aktivnih spojeva na temperaturu, vrstu otapala te vrijeme ekstrakcije, a provodi se uz primjenu različitih tehnika, od klasične preko ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ultrazvukom, visokim hidrostatskim tlakom i sl. Dobiveni ekstrakti imaju potencijalnu primjenu u proizvodnji bio-proizvoda (funkcionalnog kruha, sladoleda i sl.), bio-goriva te se s njima povezuje niz zdravstvenih dobrobiti koje uključuju antioksidacijsko djelovanje, jačanje imunološkog sustava, prevenciju kardiovaskularnih bolesti i sl.

Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj otapala i vremena ekstrakcije na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost iz prethodno odmašćenih uzoraka sjemenki grožđa sorte Teran, Merlot te Cabernet Sauvignon.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Organski otpad iz proizvodnje vina

Grožđe je plod vinove loze (*Vitis vinifera* L.) te je jedna od najrasprostranjenijih voćarskih kultura u svijetu, a uzgoj i proizvodnja vinove loze usmjerena je na potrošnju grožđa u obliku svježeg stolnog voća (13%), voćnih sokova i groždica (7%), dok se više od 80% godišnjeg uroda grožđa koristi za proizvodnju vina (Iora, 2014). Procjenjuje se da je 2013. godine godišnja proizvodnja grožđa dosegla čak 77 milijuna tona. U Republici Hrvatskoj u posljednjih deset godina uzgoj grožđa se smanjio sa 353 000 na 181 000 tona (FAOSTAT, 2015). Prema podacima iz 2013. godine u RH se proizvelo 90 000 tona grožđa, odnosno 565 000 hL vina i 18 000 tona organskog otpada u obliku vinske komine.

Poseban interes pridaje se organskom otpadu u obliku vinske komine (sjemenu, stabljici, lišću, pokožici) koji predstavlja jeftin izvor polifenolnih spojeva i prirodnih antioksidansa pogodnih za korištenje u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Kemijski sastav komine ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, stanju biljke te klimatskim uvjetima. Također, značajne razlike u kemijskom sastavu prisutne su i ovisno o dijelu bobice grožđa, pa tako i između sjemenke i pokožice grožđa. Kominu grožđa također karakterizira veliki sadržaj fenolnih spojeva zbog loše ekstrakcije tokom proizvodnje vina (Arvanitoyannis i sur., 2006)

Sjeme grožđa čini 15% krutog otpada u industriji i sadrži otprilike 60-70% ukupnih ekstrahiranih fenolnih spojeva grožđa (Lugue-Rodriguez i sur., 2005; Nawaz i sur., 2006), a odličan su izvor monomernih fenolnih spojeva, kao što su katehin, epikatehin, epikatehin galat, dimerni, trimerni i tetramerni procijanidini, kao i visoko polimerizirani proantocijanidini (tanini) (Jayaprakasha et al., 2003; Shi i sur., 2003).

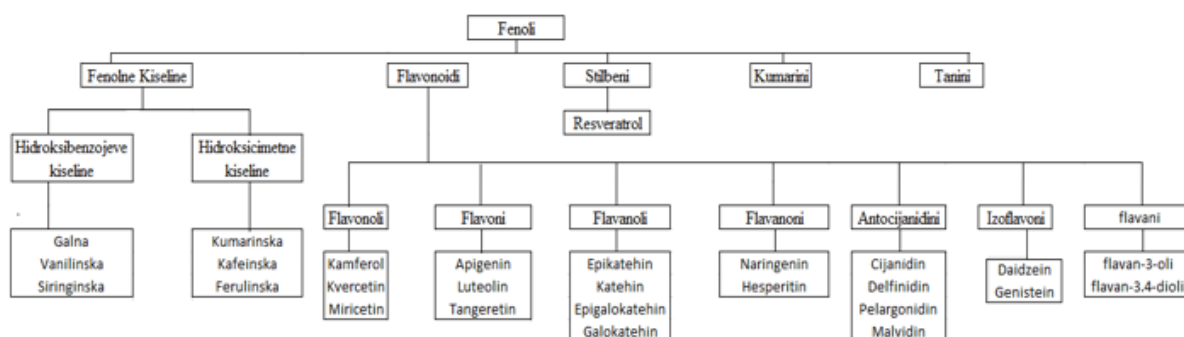
U posljednja dva desetljeća polifenolni spojevi su istraživani s različitih aspekata kao što su utjecaj na zdravlje, izolacija iz biljaka, određivanje polifenolnog profila u različitim sortama kao i njihovo antioksidativno djelovanje (Pinelo i sur., 2005.; Bucić Kojić i sur., 2007.). Do sada najčešće korištena metoda za izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada je konvencionalna ekstrakcija, no postoje i nove metode ekstrakcije koje uključuju visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, ionske tekućine, mikrovalove i drugo.

2.2. Fenolni spojevi komine grožđa

Komina grožđa je bogata bioaktivnim spojevima poput fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena, organskih kiselina i šećera. (Pinelo i sur., 2005; Lafka i sur. 2007). Najzastupljeniji

među njima su polifenoli koji se stvaraju tijekom rasta i razvoja bobice iz dva glavna biosintetska puta: ciklusa šikiminske kiseline te acetatnog puta. Glavne fenolne komponente komine su antocijani, flavonoli i njihovi glikozidi (kvercetin, kampferol, miricetin i rutin), katehini i epikatehin te njihovi esteri, oligomerni procijanidini, stilbeni (resveratrol) i fenolne kiseline (galna, elaginska, kafeinska, ferulinska i kumarinska kiselina te ester klorogenske kiseline) (Lafka i sur., 2007; Rajha i sur., 2014a).

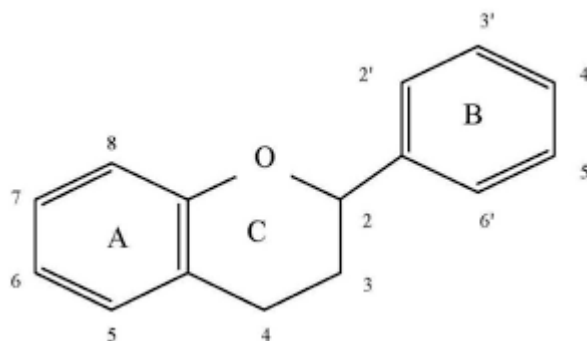
Osnovnu kemijsku strukturu fenolnih spojeva čine dva aromatska prstena povezanih pomoću 3 atoma ugljika, tvoreći tako treći prsten C, na koje može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, koje mogu biti metoksilirane i glikozidirane s monosaharidima, oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine, te imaju veliku sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004; Ignat i sur., 2011). Po broju hidroksilnih skupina se dijele na mono, di, tri i polifenole, odnosno prisutni su u rasponu od vrlo jednostavnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva. Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na flavonoide i neflavonoide. U skupinu neflavonoidnih spojeva ubrajamo fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), kumarine, tanine te stilbene. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine, izoflavone i flavane (Whale i sur., 2010).



Slika 1. Podjela fenolnih spojeva (Whale i sur., 2010)

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu fenola i do danas je identificirano više od 6400 flavonoida, što čini više od polovice ukupnih fenolnih spojeva (Harborne i sur.,1999). To su spojevi male molekulske mase, koji se sastoje od 15 atoma ugljika raspoređenih u obliku difenolpropanskog kostura (C6-C3-C6) (Balasundrum i sur.,2006.). Sastoje se od dva fenolna prstena (A i B) koji su povezani preko centralnog piranskog prstena C kao što je prikazano na slici (Jackson,2008.).



Slika 2. Kemijska struktura flavonoida (Jackson, 2008)

Flavonoidima je svojstveno da se u prirodi nalaze kao konjugirani spojevi u glikoziliranom ili esterificiranom obliku, pa je zanimljivo da je pronađeno više od osamdeset različitih šećera vezanih na flavonoide (Dillard i German, 2000). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren (Macheix i sur., 1990; Harborne, 1988.). Prema topljivosti se dijele na lipofilne i hidrofilne flavonoide (Harborne i Baxter, 1999.), a najčešće su prisutni u obliku O- i C-glikozida (Harborne, 1994.). Flavonoidi se ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena dijele u brojne podskupine (Harborne i Baxter, 1999):

- Flavonoli
- Flavoni
- Antocijanidini
- Izoflavoni
- Flavanoli
- Flavani
- Flavanoni
- Procijanidini
- Dihidrohalkoni

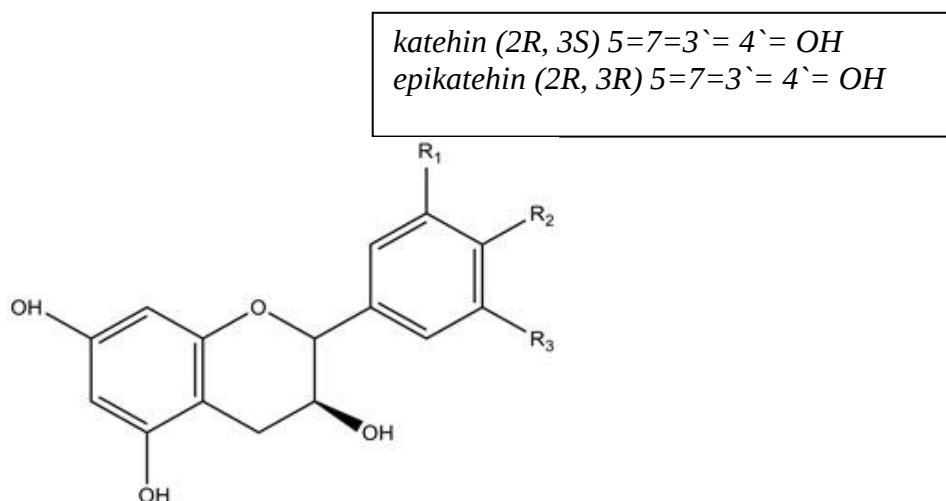
Najzastupljeniji flavonoidi u grožđu su: antocijani, flavan-3-oli, proantocijanidini, flavonoli i dihidroflavonoli. Nalaze se u sjemenkama, kožici i peteljkovini grožđa, a u soku ih ima vrlo malo.

U sjemenkama komine grožđa najzastupljeniji flavanodi su flavan-3-oli, i to katehini i epikatehini, odnosno njihovi derivati, te različite vrste procijanidina (Shalini Gaur Rudra i sur., 2015)

2.2.1.1. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su najraširenija skupina flavonoida, koji imaju zasićenu vezu između dva asimetrična ugljikova atoma (C2 i C3). Nosioci su svojstava gorčine vina, a ekstrahiraju se iz čvrstih dijelova grožđa tijekom maceracije. U prirodnim supstratima javljaju se kao aglikoni koji su najčešće polimeri, a koncentracija im varira s obzirom na sortu. Glavni spojevi ove skupine su: (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin. Katehin se u sjemenkama različitih sorti grožđa nalazi u udjelima od 24,12 do 117 mg/100 g s.tv., dok najviša zabilježena vrijednost za epikatehin iznosi 47,50 mg/100 g s.tv. (Rockenbach i sur.,2011; Ruberto i sur.,2007). Tijekom dozrijevanja vina kondenziraju se i talože. Polimerizacijom katehina nastaju procijanidini koji su nosioci gorčine i trpkocje u crnim vinima (Hornsey, 2007).

U grožđu i vinu su najznačajniji sljedeći flavan-3-oli: (+)-katehin, (-)- epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin, epikatehin-3-O-galat, katehin-galat i katehin-katehin-galat. Katehina sadrže najviše sjemenke, dok peteljkovina i kožica manje, a količina ovisi o maceraciji i pritiscima tijekom prešanja. Katehini i leukoantocijani su najviše zastupljena fenolna frakcija crvenih moštava. Katehini daju vinu okus i ne stvaraju glukozide, dok leukoantocijani daju vinu oporost i gorčinu i stvaraju glukozide. Oporost i gorčina su direktno povezani sa stupnjem polimerizacije monomera dajući smeđe dimere i polimere (sudjeluju u reakcijama enzimskog posmeđivanja, krajnji produkt je o-kinon i melanoidni spojevi koji mogu biti različitih nijansi smeđe boje).



Slika 3. Kemijska strukture najčešćih flavan-3-ola (Jackson, 2008)

2.2.1.2. Flavonoli

Flavonoli su spojevi koje karakterizira prisutnost dvostruke veze između C1 i C2 atoma ugljika te OH skupine na C3 atomu ugljika (Castillo-Muñoz i sur., 2007). U grožđu se javljaju kao glukozidi, u kojima šećernu komponentu najčešće predstavlja glukoza, ramnoza i glukuronska kiselina (Jeffey i sur., 2008). U pokožici grožđa najzastupljeni su: monoglukozid kempferol, mircetin i kvercetin te izoramnetin. Prema provedenom istraživanju Godevca i sur. (2010) u kojem su ispitivani ekstrakti sjemeni različitih sorti grožđa dokazana je prisutnost kamferol rutinozida, kvercetina ili njegovih glikozida (kvercetin-3-O-glukuronid, kvercetin-3-O glukozid, kvercetin-3-O ramnozik) u svim sortama. U manjem broju sorti pronađeni su još i dihidrokvercetin, njegov glukozid astilbin te izoramnetin-3-O-glukozid.

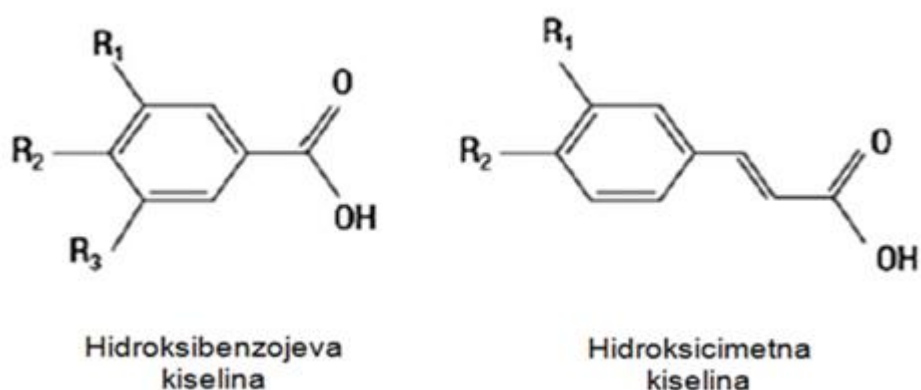
2.2.2. Neflavonoidi

Od neflavonoida, u grožđu su prisutne fenolne kiseline koje se dijele u dvije osnovne grupe, hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te stilbeni. Sastavni su dio lignina i tkiva biljaka, a dolaze vezani na antocijane i šećere. Samo su hidroksicimetne kiseline prisutne u većim količinama u grožđu dok hidroksibenzojevih kiselina i stilbena ima malo. U većim količinama se nalaze u pokožici bobice u količini od 0,1-30 mg L⁻¹. U vinu se nalaze slobodne ili u obliku estera, te pridonose aroma vina.

2.2.2.1. Fenolne kiseline

Hidroksicimetne kiseline imaju C3-C6 kostur. Treća su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u bobicama grožđa. U bijelom vinu doprinose posmeđivanju pri oksidaciji s nefenolskim spojevima (Teixeira, 2013. Adams, 2006., Kennedy, 2006.) Najviše ih ima u mesu i pokožici grožđa. Najzastupljenije su *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina primarno prisutne kao *trans* izomeri, a obično su esterificirane s vinskom kiselinom, dok su vrlo malo prisutne u slobodnom obliku.

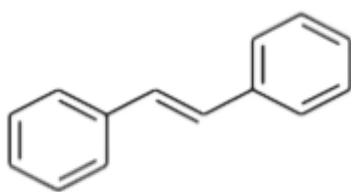
Hidroksibenzojeve kiseline imaju C1-C6 kostur u svojoj strukturi, a za razliku od hidroksicimetnih kiselina, ima ih vrlo malo u grožđu. Uobičajene su galna, gentizinska, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina uglavnom nađene u slobodnom obliku. U sjemenkama komine grožđa najzastupljenija je galna kiselina (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.)



Slika 4. Kemijska struktura fenolnih kiselina (Ignat i sur., 2011)

2.2.3. Stilbeni

Stilbeni imaju osnovnu molekulsku strukturu C6-C2-C6 (slika 5.), a dominantni spoj u grupi stilbena je resveratrol. U biljci je povećana sinteza u slučaju infekcije i visokoj izloženosti UV svjetlosti (Adams, 2006.). Iako prisutni u malim količinama, zaokupljaju interes mnogih znanstvenika zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka. Grožđe i vino su dva glavna izvora ovih spojeva (Kashif, 2010.) Najviše ih ima u pokožici, ali bitna količina se može naći i u peteljci. Resveratrol je glavni stilben grožđa, a postoji u dva izomerna oblika. *Trans*-resveratrol služi kao prekursor za oligo- i polimerne stilbene poput viniferina. (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.) Stilbeni su snažni antioksidansi i prema nekim istraživanjima pokazuju antikancerogeno djelovanje (Bertelli i sur., 1998).



Slika 5. Osnovna kemijska struktura stilbena

2.2.4. Tanini

Tanini su najraširenija grupa prirodnih složenih fenola, relativno velike molekulske mase. Ovisno o sorti u doba zrelosti najviše tanina sadrži vanjski omotač sjemenki. Mogu se podijeliti na hidrolizirane i kondenzirane tanine (Porter, 1989). Hidrolizirani tanini su esteri fenolnih kiselina i derivata fenolnih kiselina sa šećerima. Najčešći produkt hidrolize su galna

i elaginska kiselina. Nema ih u kožici, vrlo malo u soku, a najviše u vanjskom omotaču sjemenki. U vinu se nalaze kao katehinalati. Kondenzirani tanini su spojevi koji nastaju kondenzacijom i oksidativnom polimerizacijom katehina i leukoantocijana. Polimeri su smeđe obojeni i sudjeluju u astringenciji vina.

2.3. Ekstrakcija polifenola

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda koja omogućuje razdvajanje i koncentriranje tvari uz pomoć otapala, pri čemu dolazi do prijenosa jednog ili više spojeva iz analiziranog uzorka u tekuću fazu. Ona predstavlja fizikalni proces kod kojeg temeljem koncentracijskog gradijenta dolazi do difuzije spojeva iz biološkog materijala u otapalo (Lloyd i van Wyk, 2012).

Ekstrakcija polifenola se temelji na njihovoj različitoj topljivosti u otapalu kojim se provodi ekstrakcija. Izbor otapala je jedan od najvažnijih koraka u postupku ekstrakcije jer topljivost polifenolnih spojeva i njihova difuzija ovisi o kemijskoj strukturi koja može varirati od jednostavnih do vrlo polimeriziranih spojeva. Stoga je gotovo nemoguće razviti metodu za ekstrakciju koja je pogodna za sve biljne materijale (Robards, 2003; Naczk & Shahidi, 2004). Osim vrste otapala i fenolnih spojeva na ekstrakciju utječe i temperatura ekstrakcije, omjer kruto-tekuće, vrijeme ekstrakcije, vrijeme i uvjeti pohrane uzoraka, prisutnost ometajućih tvari, pH-vrijednost i dr. (Rostagno i Prado, 2013). Uzorci mogu biti u svježem, smrznutom ili suhom stanju, usitnjeni te homogenizirani, sa svrhom lakše i učinkovitije ekstrakcije. Najčešće korišten postupak izolacije fenolnih spojeva je ekstrakcija organskim otapalima. Prema literaturi najčešće korištena otapala s različitim efektima prilikom ekstrakcije fenola su metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat, dimetilformamid, njihove smjese te njihove smjese s vodom (Escribano-Bailon & Santos Buelga, 2003).

2.3.1. Utjecaj otapala, vremena i temperature na proces ekstrakcije

Na učinak ekstrakcije značajan utjecaj imaju otapalo, vrijeme trajanja ekstrakcije i temperatura pri kojoj se vrši ekstrakcija. Prilikom odabira adekvatnog otapala prednost se daje otapalima koja su selektivna za spojeve koje želimo ekstrahirati, nereaktivni sa drugim spojevima i potpuno hlapljivi, visokog ekstrakcijskog kapaciteta te niske cijene. Također je od osobite važnosti da otapalo bude neškodljivo za ljude i opremu, odnosno ekološki prihvatljivo. Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala su alkoholi (metanol, etanol i njihove vodene otopine), a zatim aceton i etil acetat. Za ekstrakciju fenolnih kiselina prisutnih u netopljivom obliku (vezane, esteri ili glikozidni kompleksi) osim primjene organskih otapala često se primjenjuje i kiselinska/ bazna

hidroliza. Dodatkom baze, kiseline ili oboje dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina (Rostagno i Prado, 2013).

Metanol, aceton i etil acetat imaju visoku učinkovitost prilikom ekstrakcije polifenola, međutim, njihova upotreba je ograničena zbog štetnosti za zdravlje i okoliš (Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003; Naczki i Shahidi, 2006.). Cheng i suradnici (2006) su dokazali da se prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva iz vinske komine, pokožice i sjemenki grožđa primjenom metanola kao otapala može ekstrahirati oko 20% više fenolnih spojeva nego etanolom, dok su Lapornik i suradnici (2005) dokazali da se primjenom alkoholnog otapala, iz ekstrakta dobivenog od komine grožđa, dobije 5, odnosno 7 puta više fenolnih spojeva kad se kao otapalo koristi etanol, odnosno metanol nego korištenjem vode kao otapala. Iz sjemenja komine grožđa bolji se prinosi fenolnih spojeva postižu uz primjenu acetonskih otopina (Weidner i sur., 2012; Kallithraka i sur., 1995). Polifenoli manje molekulske mase kao što su fenolne kiseline, antocijani i flavanol monomeri i oligomeri se bolje ekstrahiraju s metanolom, dok se flavonoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju u acetonu (McMurrough i sur., 1996; Guyot i sur., 1998). Kao ekološki najprihvatljivija otapala koriste se voda i vodene otopine etanola. Vodene otopine etanola su se iskazale učinkovitijima prilikom ekstrakcije od jednokomponentnog sustava otapala, posebice 50%-tna vodena otopina etanola (Bucić-Kojić i sur., 2009). Odnosno, hidroalkoholne otopine pružaju visok prinos ukupnih ekstrakata iako nisu visoko selektivne za određene grupe fenolnih spojeva (Karvela & Makris, 2009.) te prilikom ekstrakcije suhog biljnog materijala bolji učinak se postiže s većim udjelom vodene faze u organskoj fazi (Robards, 2003).

Na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala značajan utjecaj imaju temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. Povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije, jer dolazi do povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije (Spigno i De Faveri, 2007). U ekstraktu sjemenki grožđa povećala se koncentracija katehina i epikatehina povećanjem temperature ekstrakcije sa 50 °C na 70 °C (Varzakas i sur., 2005; Shi i sur., 2003). Međutim, fenolni spojevi su podložni hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60 °C (Spigno i De Faveri, 2007). Stoga, predugo vrijeme trajanja ekstrakcije i visoka temperatura pospješuju oksidaciju fenolnih spojeva što dovodi do smanjenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu. Istraživanje Lafke i suradnika (2007) pokazalo je da se ukupan sadržaj fenola pri temperaturi od 80 °C smanjuje za 10,3%, a pri 100 °C za 15,7%.

Vrijeme trajanja ekstrakcije prema različitim istraživanjima ima različit utjecaj na količinu fenolnih spojeva u ekstraktu. Neki autori smatraju da je poželjno provesti kraći period ekstrakcije, dok drugi smatraju da je duži period ekstrakcije učinkovitiji. Bonilla i sur. (1999) proučavali su učinkovitost ekstrakcije na 4 različita vremena od 5, 10, 20 i 30 minuta u zdrobljenoj i neznječenoj komini grožđa te su optimalne vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva dobivene u ekstraktima koji su se ekstrahirali 10 i 20 minuta. Prema istraživanju koje su proveli Spigno i de Faveri (2007) određeno je kako pri ekstrakciji fenola iz komine grožđa nema značajne razlike između trajanja ekstrakcije 5 i 24 h, dok je drugim istraživanjem Lapornika i suradnika (2005) ustanovljen porast prinosa kod ekstrakcije u trajanju od 12 do 24 sata pri sobnoj temperaturi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci sjemenki komine grožđa

U istraživanju su korišteni uzorci komine grožđa sorti Merlot, Teran te Cabernet Sauvignon izuzeti iz organskog otpada od proizvodnje vina u Agrolaguni d.d. (Poreč, Hrvatska). Postupak liofilizacije proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska). Prethodno zamrznut uzorak komine (-60 °C) od cca 500 g, postavi se u jednom sloju na šest plitica smrznute komine nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao 24 sata. Sublimacija je provedena pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi -30 do 0 °C/24 sata, a izotermna desorpcija pri 20 °C/12 sati. Iz liofilizirane komine ručno su odvojeni uzorci sjemenki grožđa te su odmašćeni primjenom superkritičnog CO₂ i usitnjeni u prah.

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje ukupne suhe tvari

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Svaka sirovina se sastoji od dijela vode i suhe tvari. U suhoj tvari sadržani su svi oni parametri koji čine prehrambenu vrijednost neke namirnice. Određivanjem ukupne suhe tvari proizvoda (topljive i netopljive) sušenjem na 105 °C određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase.

Aparatura i pribor:

- Plastična ladica za vaganje
- Aluminijske posudice
- Stakleni štapići
- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Laboratorijski sušionik (ST-01/02, INSTRUMENTARIA)
- Eksikator

Priprema uzorka:

Liofilizirane i odmašćene uzorke praha sjemenki grožđa potrebno je prije samog mjerenja homogenizirati.

Postupak određivanja:

U osušenu aluminijsku posudicu stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić, te se suši u sušioniku na 105 °C u trajanju od 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja

posudica se s polu poklopljenim poklopcem hladi u eksikatoru a zatim se izvaže s točnošću od $\pm 0,0002$ g. U ovako pripremljenu posudicu izvaže se 2,5 g pripremljenog uzorka s točnošću $\pm 0,0002$ g i pomoću staklenog štapića dobro se izmiješa s kvarcnim pijeskom. Zatim se posudica s uzorkom stavi u sušionik zagrijan na $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zagrijava 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja, sušenje se nastavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Važe se s točnošću 0,0002 g.

Izračunavanje:

Nakon hlađenja u eksikatoru posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar pomoću sljedeće formule:

$$\text{Suha tvar (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \cdot 100$$

Gdje su:

m_0 – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić)

m_1 – masa iste posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja

m_2 – masa iste posudice s ostatkom uzorka nakon sušenja

Na istome uzorku obave se najmanje dva određivanja.

3.2.2. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka odmašćenih sjemenki grožđa

Ekstrakcija polifenola iz odmašćenih, usitnjenih sjemenki grožđa provedena je primjenom 50% vodene otopine etanola i 50 % vodene otopine acetona. Postupak se provodio pri konstantnoj temperaturi od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u ultrazvučnoj vodenoj kupelji, uz različito vrijeme trajanja ekstrakcije od 15, 30 te 45 minuta (Tablica 1.).

Tablica 1. Plan pokusa ekstrakcije polifenola iz odmašćenih sjemenki grožđa

OTAPALO	VRIJEME TRAJANJA EKSTRAKCIJE (min)	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)
50% etanol	15	30
	30	30
	45	30
50% aceton	15	30
	30	30
	45	30

Aparatura i pribor:

- Falkon epruvete od 25 ml
- Pipeta volumena 5 ml
- Vortex
- Centrifuga
- Odmjerna tikvica od 10 ml
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex)
- Tehnička vaga

Reagensi:

1. Etanol, 96%-tni
2. Aceton, 100 %-tni

Postupak ekstrakcije:

U falkon epruvete od 25 ml se izvaže 0,5 g ($\pm 0,01$ g) uzorka praha sjemenki grožđa komine te se doda 5 mL odgovarajućeg otapala (50 % vodene otopine etanola ili 50 % vodene otopine acetona). Ekstrakcija se vrši na 30 °C u trajanju od 15, 30 te 45 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Slijedi homogenizacija uzorka uz primjenu vortex-a (3 minute) te se ekstrakt centrifugira 10 minuta na 3000 okretaja. Centrifugiranjem se odvoji talog od bistrog dijela koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 ml. Dobiveni talog iz prvog dijela ekstrakcije se ponovno miješa sa odgovarajućim ekstrakcijskim otapalom te se ponavlja proces ekstrakcije. Nakon centrifugiranja bistri dio se ponovno kvantitativno prenosi u odmjernu tikvicu od 10 ml u kojoj se nalazi bistri dio iz prvog dijela ekstrakcije te se odmjerna tikvica nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Ekstrakti se skladište na +4 °C do daljnje analize, a svako mjerenje provedeno je u paraleli.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/acetonskom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL

- Mikropipete od 100 i 1000 μL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)

Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 ml vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 ml i nakon 24 h filtrira.

2. Standard galne kiseline

Priprema: Odvaje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 ml 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 ml i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu od 25 ml otpipetira se redom: 0,25 ml ekstrakta, 15 ml destilirane vode i 1,25 ml Folin Ciocalteu reagensa (F-C se razrijedi u omjeru 1:2) i sve skupa se promiješa. Smjesi se potom doda 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, nadopuni otapalom do oznake i ostavi stajati 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 ml i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 ml tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se 0,25 ml otopine standarda u odmjernu tikvicu od 25 ml te se doda 15 ml destilirane vode i 1,25 ml Folin Ciocalteu reagensa (F-C se razrijedi u omjeru 1:2) i sve skupa se promiješa. Nakon toga se doda 3,75 ml zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa nadopuni otapalom do oznake i ostavi stajati 2 h na sobnoj temperaturi ili se uzorci termostatiraju 30 minuta pri temperaturi od 60 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija

(optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Za slijepu probu uzima se 0,25 ml destilirane vode umjesto standarda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$Y = 0,00117 \times X \qquad R^2 = 0,961$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta obojenja pri 320 i 360 nm.

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
2. Etanol, 96%
3. Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} HCl (u 96% etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.

4. Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L^{-1} HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

5. Standard kafeinske kiseline (100 mg L^{-1})

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg L⁻¹. Odvaje se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

6. Standard kvercetina (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg L⁻¹. Odvaje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g L⁻¹ HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

a) Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg L⁻¹ potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg L⁻¹ na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g L⁻¹ HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0053X - 0,0189$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija kafeinske kiseline (mg L⁻¹)

b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg L⁻¹ potrebno je prirediti razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg L⁻¹ na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa

proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g L⁻¹ HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.

Na temelju dobivenih rezultata, jednažba pravca glasi:

$$Y = 0,0028X + 0,0026$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg L⁻¹)

3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/VIS PDA - metoda vanjskog standarda temelji se na gradijentnoj eluciji, pri čemu se ekstrahirani polifenoli eluiraju u nizu padajuće polarnosti.

Aparatura i pribor:

- Agilent 1260 Infinity HPLC sustav koji se sastoji od: Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu te 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora
- Reverzna kolona: Nucleosil C-18
- Ultrazvučna vodena kupelj (Elmasonic 40H , Elma, Njemčka)
- Viale 2 mL
- Filter 0,45 μ m, Marchery-Nagel, Njemačka
- Staklene čaše;
- Menzure 0,5 L i 1L
- Automatska pipeta 5 mL

Reagensi:

Za mobilnu fazu:

1. Acetonitril, 100% HPLC čistoće
2. Metanol, 100% HPLC čistoće
3. Mravlja kiselina, 99% HPLC čistoće
4. Voda, redestilirana

Standardi za HPLC analizu:

Flavanoli:

Katehin

Epikatehin

Procijanidini:

Procijanidin B1

Procijanidin B2

Fenolne kiseline:

Galna kiselina

Parametri kromatografske analize:

Kolona: Nucleosil 100-5C18, 5 μ m (250 $\times$ 4,6 mm I.D.)

Pokretna faza: otapalo A: 3% mravlja kiselina u redestiliranoj vodi

otapalo B: 3% mravlja kiselina u 80% acetonitrilu

Detektor: UV/VIS PDA

Eluiranje: gradijentno

Temperatura: 22 °C

Vrijeme trajanja: 55 min

Injektirani volumen: 5 μ L

Protok: 0,8 ml/min

Vrijeme uravnoteženja kolone: 2 min

Tablica 2. Gradijent za HPLC-UV/VIS/PDA analizu fenolnih spojeva:

t (min)	Otapalo A(%)	Otapalo B(%)	Protok (ml/min)
0	100	0	0,8
28	75	25	0,8
35	50	50	0,8
40	20	80	0,8
45	100	0	0,8
55	100	0	0,8

Postupak određivanja:

Prije kromatografske analize uzorci se profiltriraju kroz 0,45 μ m filter (Machery-Nagel, Njemačka). Identifikacija fenolnih spojeva provodi se usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom sa karakterističnim UV/VIS-spektrima standarda. Spektre se skeniraju u rasponu od 280 do 510 nm, a kvantitativne vrijednosti fenolnih spojeva izračunaju se iz jednadžbi baždarnih pravaca. Otapala korištena kao pokretne faze, prije korištenja odzračuju se 10 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji (Elmasonic 40H, Elma, Njemačka). Razdvajanje fenolnih spojeva provodi se

visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom uz UV Photo Diode Array detekciju (HPLC UV/PDA).

Izrada baždarnog pravca:

Standardi fenolnih spojeva otope su u 100 % metanolu. Za svaki standard napravi se još 4 razrjeđenja, čime se dobije 5 različitih koncentracija za baždarni pravac. Koncentracije su u rasponu: epigalokatehin galat 4,58-36,67 mg L⁻¹; epikatehin galat 4,166-33,33 mg L⁻¹; katehin 6,25-50 mg L⁻¹; epikatehin 7,5-60 mg L⁻¹; reservatrol 5-40 mg L⁻¹; procijanidin B1 5-40 mg L⁻¹; procijanidin B2 12,5-100 mg L⁻¹; cijanidin-3-glukozid 20-200 mg L⁻¹; delfinidin-3-glukozid 16,26-81,33 mg L⁻¹; cijanidin-3-glukozid 15,746-78,73 mg L⁻¹; petunidin-3-glukozid 16,722-83,61 mg L⁻¹; peonidin-3-glukozid 16,202-81,01 mg L⁻¹; malvidin-3-glukozid 17,176-85,88 mg L⁻¹. Početne koncentracije klorogenske i kafeinske kiseline iznose 52 mg L⁻¹, *p*-kumarinske 48 mg L⁻¹, ferulinske 46 mg L⁻¹, kvercetin 3- β -glukozida 400 mg L⁻¹ i kamferol 3-*O*-rutinozida 200 mg L⁻¹. Te otopine pomiješane su u omjeru 1:1:1:1:1 te su iz dobivene smjese pripravljena još četiri razrjeđenja. Pet različitih koncentracija svakog standarda se kromatografski analizira, pri čemu su površine pikova očitane pri 280 nm (galna, B1, katehin, B2, kafeinska kiselina, epikatehin, epigalokatehin galat, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin galat i reservatrol), pri 340 nm (kvercetin i kamferol) i pri 510 nm (antocijani). Iz površine pikova i masenih koncentracija spojeva crtaju su baždarni pravci i izračunaju pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard. Jednadžba pravca glasi: $Y = k \times X$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 280, 340 ili 510 nm,

k - koeficijent

X – koncentracija standarda (mg L⁻¹)

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za standard fenolnih spojeva:

Standard	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije, R ²
Katehin	$Y = 4,367 x$	0,9999
Epikatehin	$Y = 6,3058 x$	0,9991
Procijanidin B1	$Y = 2,696 x$	0,9967
Procijanidin B2	$Y = 2,4693 x$	0,9963
Galna kiselina	$Y = 17,441 x$	0,9997

Izračunavanje koncentracija:

Kvantifikacija fenolnih spojeva provodi se pomoću odgovarajućih jednažbi pravaca. Koncentracije derivata katehina i epikatehina određene su prema jednažbama pravaca katehina i epikatehina, a derivat hidroksibenzojeve kiseline prema jednažbi pravca galne kiseline.

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta dpph metodom

Metoda se temelji na uporabi stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) za određivanje antioksidativnog kapaciteta u hrani. DPPH posjeduje nespareni elektron koji postiže apsorpcijski maksimum na 517 nm i ljubičaste je boje. Rezultat sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa je prijelaz ljubičaste boje u žutu te stvaranje reduciranog DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Brand-Williams i sur., 1995).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 15 mL
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Otopina DPPH

Priprema: Otopi se 10 mg DPPH u 45 mL metanola

2. Standard Troloxa

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 1,45 mL metanola, 0,4 mL 0,56 mM otopine DPPH i 0,15 mL fenolnog ekstrakta. U drugu epruvetu koja predstavlja kontrolni uzorak otpipetira se 1,6 mL metanola i 0,4 mL 0,56 mM otopine DPPH. Epruvete se promućkaju, stave na vortex 10 sekundi te stoje 40 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri 520 nm. Kao slijepa proba uzima se deionizirana voda. Rezultati antioksidativnog kapaciteta se izračunavaju preko baždarnog pravca Trolox ekvivalenta.

Izrada baždarnog pravca Trolox ekvivalenta:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u koncentraciji od $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ tako da se odvaži 0,0250 g Troloxa, otopi u metanolu te nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Iz otopine standarda Troloxa koncentracije $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ priredi se 14 mL $0,5 \text{ mM}$ otopine Troloxa tako da se u epruvetu od 15 mL doda 0,7 mL otopljenog Troloxa te 13,3 mL destilirane vode. Iz dobivene otopine u epruvetama se pripreme razrjeđenja u koncentracijama 6,25; 12,5; 18,75; 25,00; 31,25; 37,50; 43,75 μM na način da se redom otpipetira 25, 50, 75, 100, 125, 150 i 175 μL alikvot otopine Troloxa, 400 μL DPPH te nadopuni metanolom do 2 mL. Nakon toga ostavi se 40 minuta u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija na 520 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije otopine Troloxa (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 520 nm. Antioksidacijski kapacitet izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca:

$$Y = 0,1008X + 0,0069$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 520 nm,

X – koncentracija Troloxa (mg L^{-1}).

4. REZULTATI

U ovom radu ispitivan je utjecaj ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji na prinose fenolnih spojeva (masene udjele ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola, pojedinačnih fenolnih spojeva) izoliranih iz liofiliziranih i odmašćenih uzoraka sjemenki grožđa izdvojenih iz komine sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon. Ekstrakcija je provedena uz primjenu 50 % vodene otopine etanola i acetona, pri temperaturi od 30 °C te različitim vremenima ekstrakcije (30, 45 i 60 minuta). Također u svim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode.

Tablica 4. Ukupna suha tvar u liofiliziranim i odmašćenim uzorcima sjemenki komine grožđa Merlot, Teran i Cabernet Suvignon

Uzorak odmašćenog sjemena grožđa	Udio suhe tvari (%)
Merlot	94,60
Teran	96,45
Cabernet Sauvignon	94,83

Tablica 5. Maseni udjeli ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima odmašćenih sjemenki komine grožđa izdvojenih iz komine sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon

Sorta grožđa	Otapalo	t (min)	UF (mg GAE /100g s.t.)	UHCK (mg GAE /100g s.t.)	UFL (mg GAE /100g s.t.)
MERLOT	50% etanol	15	1750,96±1,62	172,68±0,14	180,16±0,12
		30	1682,30±2,20	180,66±0,40	194,50±0,45
		45	1794,33±1,90	159,12±0,18	167,32±0,23
	50% aceton	15	2274,67±4,36	229,52±0,36	256,57±0,58
		30	2251,64±5,60	233,43±0,52	245,47±0,56
		45	2280,41±4,65	236,51±0,89	251,13±0,78
TERAN	50% etanol	15	1432,03±0,90	180,72±0,79	204,84±0,58
		30	1435,94±1,23	162,05±0,32	175,02±0,27
		45	1515,33±1,25	173,67±0,50	186,33±0,45
	50% aceton	15	1886,50±1,89	223,05±0,03	246,81±0,89
		30	2039,94±2,30	257,40±0,81	284,09±0,57
		45	1958,24±2,26	236,63±0,69	253,10±0,25
CABERNET SAUVIGNON	50% etanol	15	1750,60±4,60	159,90±0,05	173,53±0,47
		30	1651,77±1,56	153,85±0,24	165,71±0,29
		45	1671,82±2,36	152,11±0,56	160,69±0,91
	50% aceton	15	2219,00±1,25	248,67±0,39	271,61±0,38
		30	2297,39±2,56	222,88±0,48	242,57±0,69
		45	2285,69±1,80	229,96±0,28	249,02±0,55

* UF- ukupni fenoli; UHCK- ukupne hidroksicimetne kiseline; UFL- ukupni flavonoli

Tablica 6. Maseni udjeli flavonoida u ekstraktima odmašćenih sjemenki komine grožđa izdvojenih iz komine sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon određeni HPLC metodom

Sorta grožđa	Otapalo	t (min)	mg/100 g s.tv.						
			K	E	dK	dE	B1	B2	Σ
Merlot	50% etanol	15	220,62±1,56	184,88±10,52	42,35±2,03	4,73±0,02	54,36±1,08	133,47±5,63	640,41
		30	240,88±20,57	200,98±12,20	45,14±1,50	4,85±0,03	55,28±4,58	138,33±4,20	685,46
		45	240,67±21,35	197,36±5,50	45,97±2,30	4,43±0,05	59,43±4,25	145,13±2,50	692,99
	50% aceton	15	230,56±15,64	194,11±12,30	49,02±3,45	4,75±0,32	58,10±2,20	151,79±4,56	688,33
		30	276,56±22,69	231,45±9,69	57,31±4,58	5,77±0,45	70,03±1,30	181,74±5,36	822,86
		45	283,10±25,89	233,38±12,02	53,12±4,90	5,42±0,36	66,27±2,36	167,34±9,80	808,63
Teran	50% etanol	15	86,14±5,69	37,16±2,50	1,54±0,01	nd	16,52±1,20	46,95±2,20	188,31
		30	93,13±8,56	41,00±2,03	1,56±0,05	nd	17,65±0,32	50,13±2,30	203,47
		45	97,25±4,69	41,66±1,05	1,71±0,09	nd	17,99±0,70	51,65±2,50	210,26
	50% aceton	15	97,34±7,03	49,14±1,06	8,54±0,20	nd	19,00±0,80	55,16±2,30	229,18
		30	105,84±9,08	53,90±2,05	8,97±0,40	nd	20,54±1,25	58,45±4,02	247,7
		45	111,77±10,56	55,42±3,50	9,26±0,58	nd	21,72±0,56	59,86±2,36	258,03
Cabemet Sauvignon	50% etanol	15	151,92±10,45	91,22±5,63	17,38±0,98	27,99±1,52	42,82±2,25	117,23±2,03	448,56
		30	151,58±7,06	91,73±7,23	15,78±0,99	28,03±1,50	38,73±2,50	106,95±2,36	432,8
		45	164,26±14,32	92,30±8,01	16,70±1,20	27,66±1,20	38,73±0,98	106,95±5,03	446,6
	50% aceton	15	152,93±5,60	80,40±2,04	17,28±1,25	9,33±0,45	40,51±2,36	114,84±4,56	415,29
		30	151,45±10,50	79,02±5,50	17,09±1,36	9,37±0,25	40,82±1,25	114,59±5,60	412,34
		45	163,97±14,50	83,78±4,21	16,90±1,28	9,42±0,40	41,32±2,50	114,66±2,03	430,05

*K- katehini; E- epikatehini; dK- derivat katehina; dE- derivat epikatehina, B1- procijanidin B1; B2- procijanidin B2

** nd – nije detektirano

Tablica 7. Maseni udjeli fenolnih kiselina u ekstraktima odmašćenih sjemenki komine grožđa izdvojenih iz komine sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon određeni HPLC metodom

Sorta grožđa	Otapalo	t (min)	mg/100 g s.tv.		
			GK	dHBK	Σ
Merlot	50% etanol	15	17,35±1,02	30,12±2,98	47,47
		30	18,03±1,06	32,92± 2,59	50,95
		45	17,43±1,01	28,02± 2,61	45,45
	50% aceton	15	1,23±0,10	2,95± 0,12	4,18
		30	1,25±0,11	2,87±0,18	4,12
		45	1,24±0,09	2,63±0,20	3,87
Teran	50% etanol	15	9,81±0,78	20,10±1,96	29,91
		30	10,98±0,98	26,28±2,41	37,26
		45	11,14±0,89	31,93±2,95	43,07
	50% aceton	15	0,89±0,07	1,25±0,09	2,14
		30	0,91±0,08	1,22±0,08	2,13
		45	1,02±0,07	1,19±0,04	2,21
Cabernet Sauvignon	50% etanol	15	9,09±0,15	24,10±2,11	33,19
		30	10,05±0,99	26,61±2,42	36,66
		45	9,77±0,92	25,20±2,20	34,97
	50% aceton	15	0,91±0,08	1,97±0,08	2,88
		30	0,97±0,07	2,10±0,18	3,07
		45	0,96±0,09	1,98±0,11	2,94

*GK- galna kiselina; dHBK- derivat hidroksibenzojeve kiseline

Tablica 8. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima odmašćenih sjemenki komine grožđa izdvojenih iz komine sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon

Sorta grožđa	Otapalo	t (min)	DPPH (mg TE/100g s.t.)
MERLOT	50% etanol	15	24,73±0,02
		30	24,46±0,05
		45	24,84±0,20
	50% aceton	15	24,10±0,24
		30	24,64±0,32
		45	25,11±0,55
TERAN	50% etanol	15	23,87±0,98
		30	24,36±0,20
		45	24,40±0,08
	50% aceton	15	23,70±0,07
		30	24,59±0,04
		45	24,28±0,20
CABERNET SAUVIGNON	50% etanol	15	23,80±0,30
		30	25,30±0,52
		45	24,37±0,78
	50% aceton	15	24,94±0,09
		30	25,54±0,50
		45	25,01±0,26

5. RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio usporediti masene udjele ukupnih te pojedinačnih polifenola kao i antioksidacijski kapacitet u uzorcima liofiliziranih i odmašćenih sjemenki grožđa sorti Merlot, Teran i Cabernet Sauvignon, u ovisnosti o primjenjenim uvjetima ekstrakcije. Prema rezultatima prikazanim u Tablici 4. udio suhe tvari u ispitivanim uzorcima sjemenki komine grožđa bio je u rasponu od 94,60 % (Merlot) do 96,45 % (Teran).

5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju polifenola

Maseni udio ukupnih fenola (UF), hidroksicimetnih kiselina (UHCK) i flavonola (UFL) u ekstraktima odmašćenih sjemenki komine grožđa ekstrahiranim različitim otapalima i pri različitom vremenu ekstrakcije određen spektrofotometrijski prikazan je u tablici 5., a pojedinačni fenolni spojevi određeni HPLC metodom prikazani su u tablicama 6. i 7. U ovom istraživanju korištene su 50% vodene otopine etanola i acetona jer istraživanjima je utvrđeno da su vodene otopine efikasnije od njihovih monokomponentnih otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva iz sjemenki grožđa (Alonso i sur., 1991; Yilmaz & Toledo, 2006; Pinelo i sur., 2006).

Sadržaj ukupnih fenola etanolnih odnosno acetonskih ekstrakata je različit pri različitom vremenu trajanja ekstrakcije kao i kod različitih sorti grožđa. Ukupni fenoli u ispitivanim ekstraktima su u rasponu od 1432,03 do 2297,39 mg/100 g s.tv., ukupne hidroksicimetne kiseline od 152,11 do 257,40 mg/100g s.tv., a ukupni flavonoli od 160,69 do 284,09 mg/100g s.tv. Najveća vrijednost UF određena je u 50%-tnom acetonskom ekstraktu dobivenom iz sjemenki komine grožđa Cabernet Sauvignon, i vremenu ekstrakcije od 30 minuta. Pri istim ekstrakcijskim uvjetima u sjemenkama komine grožđa sorte Teran određena je najveća koncentracija UHCK i UFL.

Pojedinačni fenolni spojevi određeni primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju u sjemenkama komine grožđa su galna kiselina, derivat HBK, katehin, epikatehin, derivati katehina i epikatehina te procijanidini B1 i B2. Samo u sjemenkama komine grožđa sorte Teran nije detektiran derivat epikatehina. Najveća ukupna količina flavonoida (kao zbroj svih pojedinačnih spojeva) određena je u 50%-tnom acetonskom ekstraktu dobivenom iz sjemenki grožđa sorte Merlot i vremenu ekstrakcije od 30 minuta (822,86 mg/100 g s.tv.), a najmanja u 50% etanolnom ekstraktu dobivenom iz sjemenki grožđa sorte Teran i vremenu ekstrakcije od 15 minuta (188,31 mg/100 g s.tv.). Dok je najveća ukupna količina fenolnih kiselina (kao zbroj galne kiseline i derivata hidroksibenzojeve kiseline) određena u 50% etanolnom ekstraktu dobivenom iz sjemenki grožđa sorte Merlot i vremenu ekstrakcije od 30 minuta

(50,95 mg/100 g s.tv.), a najmanja u 50% acetonском ekstraktu dobivenom iz sjemenki grožđa sorte Teran i vremenu ekstrakcije od 30 minuta (2,13 mg/100 g s.tv.). U ukupnoj količini identificiranih fenolnih spojeva, u svim su ispitivanim uzorcima najviše zastupljeni flavanoli katehin i epikatehin te od procijanidina, procijanidin B2. Samo u sjemenkama grožđa sorte Cabernet Sauvignon je veća koncentracija procijanidina B2 od epikatehina. Za razliku od flavanola i procijanidina, uzorci sjemenki grožđa koji su ekstrahirani s 50% acetonom su imali značajno manje koncentracije galne kiseline i derivata HBK. Prema istraživanju Foo i Portera (1981) dokazano je da se spojevi manje molekulske mase kao što su fenolne kiseline bolje ekstrahiraju u alkoholnim otopinama. Hidroksibenzojeve kiseline su određene u značajno manjim koncentracijama od flavanola i procijanidina u svim ispitivanim uzorcima (0,91-32,92 mg/100 g s.tv.).

Prema rezultatima prikazanim u tablicama 5., 6. i 7. utvrđeno je da ekstrakti acetona pokazuju veći sadržaj polifenola, na temelju čega možemo zaključiti da je vodena otopina acetona učinkovitije otapalo od vodene otopine etanola prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva u odmašćenim sjemenkama komine grožđa. Rezultati naših istraživanja su u skladu s istraživanjima drugih autora koji su također dobili bolje prinose fenolnih spojeva iz sjemena komine grožđa primjenom acetonskih otopina (Weidner i sur., 2012; Kallithraka i sur., 1995).

5.2. Utjecaj vremena trajanja na ekstrakciju polifenola

Važan parametar koji utječe na ekstrakciju fenolnih spojeva je vrijeme ekstrakcije. Prema rezultatima prikazanim u tablici 5. u dobivenim ekstraktima vrijeme ekstrakcije je nejednako utjecalo na koncentracije fenolnih spojeva. Uglavnom, povećanjem vremena ekstrakcije povećavala se koncentracija UF dok se najveća količina UHCK i UFL ekstrahirala nakon 15 minuta ekstrakcije. Najveća koncentracija ukupnih fenola određena je u acetonском ekstraktu sorte Cabernet Sauvignon (2297,39 mg/100 g s.tv.) u trajanju ekstrakcije od 30 min. Pri istom vremenu ekstrakcije određena je i najveća koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina (257,40 mg/100 g s.tv.) i flavonola (284,09 mg/100 g .tv.), ali u acetonском ekstraktu sorte Teran.

Rezultati pojedinačnih fenolnih spojeva prikazani u tablicama 6. i 7. pokazuju da je najveća koncentracija procijanidina B1 i B2 određena u acetonskim ekstraktima sorte Merlot također u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta dok se produljenjem vremena ekstrakcije do 45 minuta povećala koncentracija katehina i epikatehina. Najveće vrijednosti fenolnih kiselina određene su u sjemenkama komine sorte grožđa Merlot, u etanolnom ekstraktu nakon trajanja ekstrakcije od 30 minuta. Ako usporedimo koncentracije ukupnih fenola kao

zbroj pojedinačnih fenolnih spojeva, najveća koncentracija je određena u acetonskom ekstraktu sorte Merlot nakon 30 minuta ekstrakcije (826,98 mg/100 g s.tv.), a najmanja u etanolnom ekstraktu sorte Teran nakon 15 minuta ekstrakcije (218,22 mg/100 g s.tv.). Na temelju prikazanih rezultata u tablicama 5., 6. i 7. možemo zaključiti da se u većini uzoraka ekstrahirala najveća koncentracija ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva nakon 30 minuta i da je to optimalno vrijeme ekstrakcije.

Rezultati istraživanja o utjecaju vremena trajanja ekstrakcije na koncentraciju fenola iz otpada u prehrambenoj industriji su različiti, iako većina autora zaključuje da je kraće vrijeme trajanja ekstrakcije bolje (Pekić i sur., 1998; Pinelo i sur., 2005; Lapornik i sur., 2005; Jayaprakasha i sur., 2007; Spigno & De Faveri, 2007). Prema istraživanjima Lafka i sur. (2007) povećanje vremena ekstrakcije utječe na povećanje koncentracije fenolnih spojeva, ali nakon određenog vremena daljnji rast može utjecati na neekonomičnost ekstrakcijske procedure bez značajnog rasta koncentracije ekstrahiranih fenola.

5.3. Utjecaj otapala i vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određeni primjenom DPPH metode u fenolnim ekstraktima sjemenki komine grožđa prikazani su u tablici 8. U svim ekstraktima određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Promjena uvjeta ekstrakcije nije značajno utjecala na promjenu antioksidativnog kapaciteta, koji se kreće u rasponu od 23,80 do 25,54 mg TE/100g s.tv. U istraživanim uzorcima sjemni komine grožđa najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u acetonskom ekstraktu sorte grožđa Cabernet Sauvignon sa vremenom ekstrakcije od 30 minuta, a najmanja u sorti Teran u acetonskom ekstraktu nakon 15 minuta ekstrakcije.

Unatoč tome što je koncentracija ukupnih fenola bila manja u ekstraktima sa 50% etanolom vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta nisu se značajno razlikovale od acetonskih ekstrakata. Između antioksidacijskog kapaciteta i ukupnih fenola ne mora uvijek postojati značajna korelacija zbog različitih mehanizama djelovanja DPPH radikala te Folin-Ciocalteu reagensa sa različitim supstratima koji pridonose antioksidacijskom kapacitetu. Različiti fenolni spojevi zbog razlike u molekulskoj strukturi različito pridonose antioksidacijskom kapacitetu, što se odražava i na kinetiku mehanizama djelovanja antioksidanata (Sagdic i sur., 2011). Smatra se da antioksidativnom kapacitetu sjemenki grožđa značajno pridonose flavonoidi, posebice flavanoli katehin i epikatehin (Yilmaz i sur., 2004). Unutar istraživanih sorti grožđa etanolni i acetonski ekstrakti pokazuju najveći antioksidacijski kapacitet pri vremenu trajanja ekstrakcije od 30 do 45 minuta, stoga možemo

zaključiti da je vrijeme ekstrakcije od 30 minuta dovoljno za postizanje optimalne antioksidativne aktivnosti.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Kao bolje otapalo za izolaciju flavan-3-ola, flavonola te hidroksicimetnih kiselina iz liofiliziranih i odmašćenih sjemenki komine grožđa sorti Merlot, Teran te Cabernet Sauvignon primjenom ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi 30 °C, pokazala se 50% vodena otopina acetona.
2. Najveći prinosi (ukupnih fenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola, katehina, epikatehina, derivata katehina i epikatehina, procijanidina B1 i B2 galne kiseline te derivata hidroksibenzojeve kiseline) tijekom ekstrakcije fenolnih spojeva iz sjemenki komine grožđa uz primjenu ultrazvučne kupelji, ostvareni su pri vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta
3. U svim uzorcima sjemenki komine grožđa određene su visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta bez obzira na uvjete ekstrakcije i koncentracije fenolnih spojeva.

7. LITERATURA

1. Adams, D.O. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *American J. Enology and Viticulture*, **57**, 249–256.
2. Alonso, E., Bourzeix, M. i Revilla, E. (1991) Suitability of water-ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery byproduct. *Seed Sci. Technol.*, **19**(3), 545–552.
3. Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D. i Mavromatis, A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 475–487.
4. Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.L. i Haroutounian, A. (2012) Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *Food Sci. Technol.*, **48**, 316–322.
5. Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S. i Hansen, A°. (2000) Ferulic acid dehydrodimers in rye (*Secale cereale* L.). *J. Cereal Sci.* **31**: 303–307.
6. Balasundram, N., Sundram, K. i Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **99**, 191–203.
7. Bertelli, A.A.E., Giovannini, L., De Caterina, F., Miglioni, M., Bernini, W., Fregoni, M., Bavaresco, J., Trevisan, M., Bertelli, A. (1996) Antiplatelet Activity of cis-Resveratrol; Feuillet Bleu 25; *Office Int. de la Vigne et du Vin*: Paris, France
8. Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* **66**, 209–215.
9. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. Velić D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.*, **81**, 236–242.
10. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., Seruga, M. (2009) Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **44**, 2394–2401.
11. Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2007) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 992–1002.

12. Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C. (2003) Polyphenols extraction from foods. In: *Methods in Polyphenol Analysis* (edited by Santos-Buelga, C., Williamson, G.) Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, str. 1–16.
13. FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations –Statistic Division, <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Pristupljeno 29. svibnja 2015.
14. Foo, L.Y., Porter, L.J. (1981) The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 711–716.
15. Fuleki, T., Da Silva, J.M.R. (1997). Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1156–1160.
16. Gaur Rudra, S., Nishad, J., Jakhar, N., Kaur, C. (2015) Food industry waste: Mine of nutraceuticals. *Int. J. Science, Environment ISSN 2278-3687 (O) and Tech., Vol. 4, No 1*, 205 – 229.
17. Godevac, D., Tešević, V., Veličković, M., Vujisić, Lj., Vajs, V., Milosaljević, S. (2010) Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *J. Serb. Chem. Soc.* **75** (12) 1641–1652.
18. Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, JF. (1998) Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J. Agric Food Chem.*, **46**: 1698–1705
19. Harborne, J.B. (1994) *The Flavonoids. Advances in Research Since*, Chapman & Hall, London, UK.
20. Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. (John Wiley, ured.), Chichester.
21. Hornsey, I. (2007) *The Chemistry and Biology of wine making*, RSC Publishing, Cambridge, UK, str. 104-109.
22. Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
23. Iora, S.R.F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., M.V., de A. Pontes, P.V., Haminiuk, C.W.I., Granato, D. (2014) Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food Sci.*, **50**, 62-69.
24. Jackson, R. S. (2008) *Wine science*, 3. izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam / Boston, str. 353-399.
25. Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakaria, K.K. (2003) Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res.Int.*, **36**, 17–122.

26. Jayaprakasha, G. K, Mandadi, K. K., Shibu, M., Poulouse, Y., Jadegoud, G. A., Nagana, G., Bhimanagouda, S. (2007) Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 15: 4923–493.
27. Jeffery, D.W., Parker, M., Smith, P.A. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Aust.J.Grape Wine R.*, **14**, 153–161.
28. Kalhitharka, S., Garcia Viguera, C., Bridle, P., Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem. Analysis*, **6**, 265-267.
29. Karvela, E., Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T. (2009) Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, **79**, 1311–1321.
30. Kashif, A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape- derived products, *Phytochem Rev.*, **9**, 357-378.
31. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55, 279-290.
32. Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and Wine Phenolics: History and Perspective, *Am. J. Enol. Vitic*, **57**, 239-242.
33. Lafka, T.I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **104**, 1206-1214.
34. Lapornik, B., Prosek, M. i Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214–222.
35. Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), *CRC Press*, str. 1-24.
36. Luque-Rodriguez, J.M., Luque de Castro, M.D. i Perez-Juan, P. (2005). Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, **68**, 126–130.
37. Macheix, J.J, Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, *CRC Press*, Boca Raton, Florida, USA.
38. Magalhães M.L., Segundo A.M. , Siquet C., Reis S., Lima J.L.F.C. (2007) Multi-syringe flow injection system for the determination of the scavenging capacity of the diphenylpicrylhydrazyl radical in methanol and ethanolic media. *Microchim. Acta, Issue 1*, str. 113-118.

39. McMurrough, I., Madigan, D., Smyth, M.R. (1996) Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1731-1735.
40. Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E.N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.*, **61**, 71-75.
41. Naczek, M., Shahidi, F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 95–111.
42. Naczek, M. i Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523–1542.
43. Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G.S., Kakuda, Y. (2006) Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.*, **48**, 176–181.
44. Pekić, B., Kovač, V., Alonso, E., Revilla, E. (1998) Study of extraction of proanthocyanidins from grape extract and procyanidins. *Food Chem.*; **61**: 201–206.
45. Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* **92**, 109-117.
46. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 579–590.
47. Rajha, H.N., Louka, N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G. (2014a) Multiple Response Optimization of High Temperature, Low Time Aqueous Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. *Food Nutrit. Sci.* **5**, 351-360.
48. Rice-Evans, C.A. and Miller, N.J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Society Transactions* **24**: 790-795.
49. Robards, K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* **1000**, 657-691.
50. Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Gonçalves, A.E.S.S., Genovese, M.I., Fett, R. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Intern.*, **44**, 897–901.
51. Rostagno, M.A., Prado, J.M., (2013) Natural Product Extraction - Principles and Applications. RSC, Cambridge, UK.

52. Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C. (2007) Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem.*, 100, str. 203–210.
53. Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Tahsin Yilmaz, M. (2011) RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices, *Food Chem.*, 126, 1749-1758.
54. S. Arvanitoyannis I., Ladas D., Mavromatis A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *Int.J.Food Sci.Technol.* **41**, 475–487.
55. Shahidi, F., Naczk, M. (2004) Phenolics in Food and Nutraceuticals, *CRC Press*, London/New York/Washington D.C., str. 1-9; 146-152; 270-281.
56. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Young, C.J., Bryan, M., Wu, Y. (2003) Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ.* 1, 42–47.
57. Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**, 793–801.
58. Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200–208.
59. Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., Gerós, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18711-18739.
60. Varzakas, T.H., Leach, G.C., Israilides, C.J. i Arapoglou, D. (2005) Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods. *Enzyme and Microbial Tech.*, **37**, 29–41.
61. Weidner, S., Powalka, A., Karamać, M. I., Amarowicz, R. (2012) Extracts of Phenolic Compounds from Seeds of Three Wild Grapevines—Comparison of Their Antioxidant Activities and the Content of Phenolic Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(3): 3444–3457.
62. Yeo, J.D., Jeong, M.K., Park, C.U., Lee, J. (2010) Comparing antioxidant effectiveness of natural and synthetic free radical scavengers in thermally-oxidized lard using DPPH method. *J. Food Sci.* 75: C258–262
63. Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2004) Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Tech.*, **15**, 422–433.

64. Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2006) Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 41–48.