

# Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na polifenolni sastav vina

---

Tomljanović, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

*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:159:661695>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ana Tomljanović**

7071/PT

**UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA POLIFENOLNI SASTAV VINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija vina

Mentor: Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić

**Zagreb, 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na polifenolni sastav vina**

**Ana Tomljanović, 0058206814**

**Sažetak:** Proučavan je utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu udjela polifenolnih spojeva u bijelom i crnom vinu. Polifenolni spojevi odgovorni su za organoleptičke karakteristike vina kao što su boja, trpkoca, gorčina i aroma. Primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije ( HPLC ) određeni su slobodni antocijani u crnom vinu te fenolne kiseline u bijelom vinu. Identifikacija je provedena usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $t_R$ ) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom karakterističnih UV/VIS spektara.

**Ključne riječi:** antocijani, polifenolne kiseline, vino, visoki hidrostatski tlak

**Rad sadrži:** 32 stranica, 7 slika, 11 tablica, 17 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10**

**000 Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić

**Pomoć pri izradi:** Katarina Lukić, asistent

**Datum obrane:** 13. lipnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Impact of high hydrostatic pressure on polyphenolic compounds of wine**

Ana Tomljanović, 0058206814

**Abstract:** The influence of high hydrostatic pressure primarily on polyphenolic compounds in white and red wine was examined. Polyphenolic compounds are responsible for organic characteristics of wine such as color, bitterness, astringency and flavour. Free anthocyanins in red wine and phenolic acids in white wine were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). Identification was performed by comparing retention time ( $t_R$ ) of separated compounds with retention times of standards and by comparing it to characteristic UV/VIS spectra.

**Keywords:** high hydrostatic pressure, wine, anthocyanins, phenolic acids

**Thesis contains:** 32 pages, 7 figures, 11 tables, 17 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. Karin Kovačević Ganić

**Technical support and assistance:** Katarina Lukić, Assistant

**Defence date:** June 13<sup>th</sup> 2017

## **SADRŽAJ**

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Visoki hidrostatski tlak	2
2.2. Polifenolni spojevi	3
2.3. Metoda vanjskog standarda	7
2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	8
2.5. Tekućinska kromatografija obrnutih faza	10
2.6. Detektori	11
3. MATERIJAL I METODE	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI	25
6. LITERATURA	26

## 1. UVOD

Razvojem prehrambene industrije nove tehnologije kao što su: visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće svjetlo visoke snage, pulsirajuće električno polje i ultrazvuk visokog intenziteta nalaze sve veću, ali još uvijek nedovoljnu primjenu tijekom proizvodnog procesa. Ove netoplinke tehnologije tijekom tretiranja prehrambenih proizvoda ne utječu značajno na povišenje temperature čime ostaju sačuvana senzorska, teksturalna i organoleptička svojstva proizvoda. Primjenom visokog hidrostatskog tlaka kao i ostalih tehnika mogu se inaktivirati patogeni mikroorganizmi i mikroorganizmi odgovorni za kvarenje hrane.

Vino kao namirnica osjetljiva je na povišenje temperature te ne može biti tretirano toplinom zbog negativnog utjecaja na aromu, okus i boju vina. Kao konzervans u proizvodnji vina koristi se sumporov dioksid koji istovremeno ima antioksidativno, antiseptičko i koagulacijsko svojstvo. Prevelike količine sumporovog dioksida koje nisu dozvoljene zakonskim propisima mogu negativno utjecati na aromu vina (miris na H<sub>2</sub>S, merkaptani). Također sumporov dioksid može negativno utjecati na zdravlje ljudi, uzrokuje alergije i glavobolje. Jedna od prednosti primjene visokog hidrostatskog tlaka je i osiguravanje mikrobne zaštite uz smanjenu upotrebu SO<sub>2</sub>.

Polifenolni spojevi čine veliku i kompleksnu skupinu spojeva koji značajno utječu na kakvoću vina. Polifenoli su prisutni u svim dijelovima grozda odakle se ekstrahiraju u mošt, u određenoj koncentraciji, ovisno o tehnologiji proizvodnje i željenom tipu vina. To su spojevi koji utječu na stabilnost boje, na okus gorčine i osjet trpkocće vina te na sklonost oksidaciji i posmeđivanju. Njihova zdravstvena vrijednost se očituje kroz antioksidativna, baktericidna svojstva (Ribereau Gayon i sur., 2006.).

Cilj ovog rada bit će utvrditi utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjene udjela polifenolnih spojeva u bijelom i crnom vinu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Visoki hidrostatski tlak

Visoki hidrostatski tlak (High hydrostatic pressure - HHP) podrazumijeva korištenje pritiska u rasponu od 100-1000 MPa sa ili bez dodatka vanjske topline. Najčešće korištene jedinice tlaka i njihove pretvorbe navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Jedinice tlaka

	Atm	Bar	MPa	Psi
1 atm	1.000	0.987	9.901	0.068
1 bar	1.013	1.000	10.000	0.060
1 MPa	0.101	0.100	1.000	0.00689
1 psi	14.696	14.504	145.038	1.000

Primjena visokog hidrostatskog tlaka kao alternativa termičkoj obradi ima brojne prednosti:

- postizanje antimikrobnog učinka uz istodobnu eliminaciju ili znatno skraćivanje postupka zagrijavanja, čime se izbjegava toplinska degradacija komponenti hrane, zadržava okus, boja i nutritivna vrijednost
- ravnomjerno i brzo tretiranje namirnice
- smanjenje potrebe za dodatkom kemijskih aditiva
- stvaranje golemog potencijala za kreiranje novih struktura, okusa, funkcionalnih svojstava hrane ili njezinih komponenata

Unatoč velikim naprezanjima u sustavu se postiže stanje ravnoteže budući da se djelovanje visokog tlaka zasniva na Le Chatelier-Braunovom principu (ako sustavu primijenimo neku intenzivnu veličinu, sustav će nastojati tu promjenu umanjiti) na temelju kojega dolazi do smanjenja radnog volumena kako se tlak u sistemu povećava. HHP može poremetiti velike molekule i mikrobne stanične strukture, kao što su enzimi, lipidi, proteini i stanične membrane, dok male molekule kao što su vitamini i komponente okusa ostaju netaknute (Linton i Patterson, 2000.). Nevalentne veze (vodikove, ionske, i hidrofobne) osjetljive su na djelovanje povišenog tlaka dok kovalentne veze ostaju netaknute tijekom procesiranja. Proizvod podliježe izostatskoj kompresiji što uzrokuje redukciju volumena do 19% ovisno o primjenjenom tlaku i postignutoj temperaturi. Prednosti primjene visokih tlakova u odnosu na ostale tehnike obrade je da se visoki tlak ravnomjerno raspoređuje oko namirnice koja se obrađuje što dovodi do očuvanja fizikalno-kemijskih svojstava namirnice, prije i nakon obrade (Bosiljkov i sur., 2010.). Treba naglasiti da tretiranje viskoim hidrostatskim tlakom ne može razoriti kemijske veze, premda kemijske reakcije u hrani, uključujući one koje podrazumijevaju razbijanje veza mogu biti ubrzane ili usporene djelovanjem povišenog tlaka.

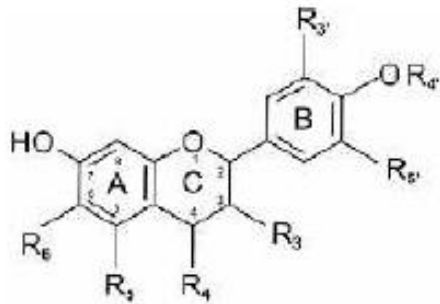
## 2.2. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi u vinu mogu se podijeliti u dvije skupine: flavonoide i neflavonoide. Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana do složenijih flavonoida i tanina čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih spojeva.

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji su pronađeni u voću, povrću, sjmenkama, cvijeću te pićima poput čaja i vina. Pokazalo se da imaju antibakterijsko, protuupalno, antimutageno, antiviralno, antikancerogeno i antialergijsko djelovanje. Ta svojstva su rezultat sposobnosti flavonoida da hvataju slobodne radikale, inhibiraju specifične enzime i stimuliraju hormone i neurotransmitere. Zbog pozitivnog učinka na zdravlje izuzetno su važan dio ljudske prehrane. Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost

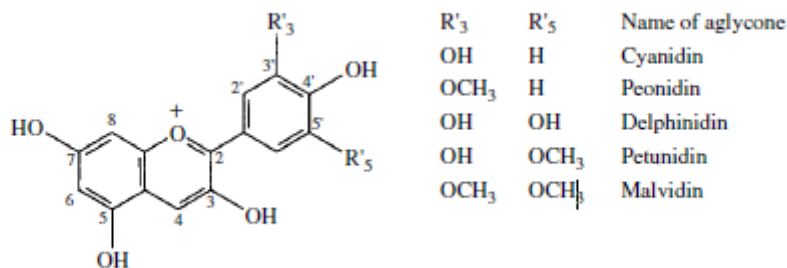
flavonoida ovisi o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih grupa unutar njihove nuklearne strukture (Kumar i Pandey, 2013). Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C prsten). Danas je identificirano više od 6000 flavonoida. Podijeljeni su u nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoni, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli te antocijani. Strukturna raznolikost rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskih sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa ( O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Pojavljuju se kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati, a u grožđu su ove molekule prisutne u glikozidnoj formi. Razlikuju se po supstituciji koja se nalazi na zadnjem atomu, kampferol (1OH), kvercetin (2OH) i miricetin (3OH). Sva tri pigmenta su prisutna u crnom vinu, dok se u bijelom nalaze samo prva dva. Služe kao zaštita za UV-A i UV-B zračenje i kako je grožđe više izloženo UV zračenju njihov udio se povećava. U vinu su značajni kao kopigmenti sa antocijanima čime se pojačava boja crnih vina.





Slika 1. Osnovna kemijska struktura flavonoida  
(Hertzog i Tica, 2012)

Antocijani pripadaju skupini flavonoida. To su pigmenti odgovorni za crvenu boju vina, nalaze se u hipodermi pokožice i najčešće su glukozidno vezani. Ove molekule su stabilnije u glikozidnoj (antocijani) formi nego u aglikon (antocijanidin) formi. Glukozidi se mogu vezati sa octenom, kumarinskom i kafeinskom kiselinom. U grožđu postoje pet grupa antocijanidina: cijanin, delfinidin, malvidin, peonin i petunidin. Razlikuju se po broju hidroksilnih i metilnih grupa na molekuli antocijanidina. Antocijani ovisno o broju hidroksilnih grupa imaju manji ili veći potencijal za oksidaciju. U vinu se nalaze u ravnoteži između pet različitih molekulskih stanja. Četiri forme predstavljaju slobodne molekule, a jedna forma predstavlja molekulu povezanu sa sumpornim dioksidom. Malvidin je najdominantnija molekula u svim sortama. Može se smatrati da je malvidin monoglukozid baza boje crvenog grožđa i vina (Ribereau Gayon i sur., 2006.). Koja će forma prevladavati ovisi o pH vrijednosti vina i udjelu slobodnog sumpornog dioksida. Niža pH pogoduje nastanku flavijevog kationa (crvena boja), a viša pH vrijednost pogoduje nastanku kvionidalne forme (plavo-ljubičasta boja). Antocijani su u vinu nestabilni i dugoročno ne doprinose boji vina. Za stabilnost boje vina važni su u formama polimera kada se vežu sa taninima.

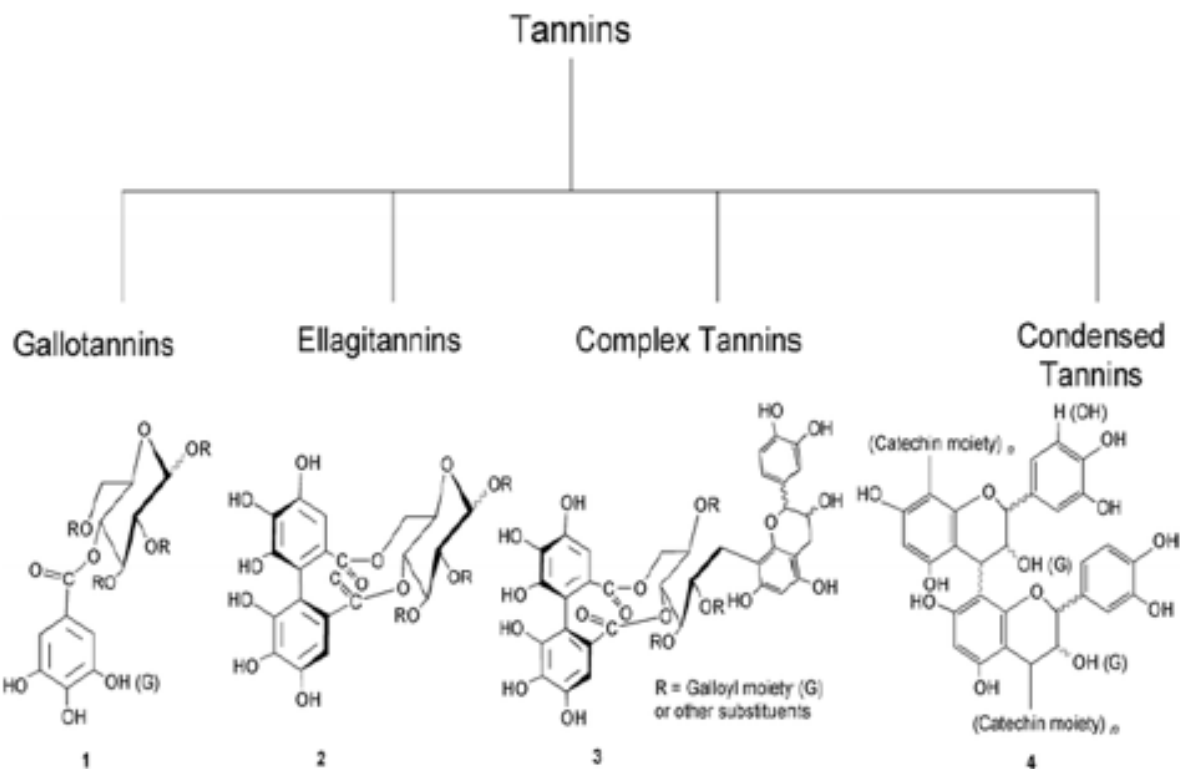


Slika 2. Struktura antocijanidina u grožđu i vinu.

Tanini su prirodni organski spojevi, esteri hiroksikarboksilnih kiselina s viševalntnim alkoholima ili šećerima. Važnu ulogu imaju u postizanju kvalitete vina. U grožđu tanine nalazimo u pokožici, sjemenki i peteljki. Visoke količine tanina imaju crna vina, enološki tanini se dodaju u određenim količinama, a sadržavaju 12-48 % tanina. Udio tanina u vinu ima utjecaj na finalnu kvalitetu vina te na senzorska svojstva. U reakcijama sa solima željeza vinu daju plavu, crnu ili zelenu boju i trpak okus. U grožđu tanina, kao polimera leukoantocijana i katehina koji su derivati flavana, ima u sjemenkama (2-7%), kožici (1-3%) u bijelim sortama, a u crnim i do 4,5% te u peteljci (0,7-3%). Ovisno o tehnološkom procesu prerade više ili manje prelaze u mošt i vino. S proteinima vina tanini se talože u vidu amorfnog taloga uz to tanini polimeriziraju pa je to jedan od razloga zašto ih u starijim odležalim vinima ima u manjim količinama.

Hidrolizirajući tanini nisu prirodno nađeni u grožđu već potječu iz hrastove bačve ukoliko se vino u njoj proizvodi ili se čuva tijekom starenja ili dozrijevanja. Za razliku od njih galna kiselina iz pokožice i sjemenke je uvijek prisutna u vinu.

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su polimeri monomernih flavan-3-ola i najzastupljenija su skupina fenola u grožđu. Nalaze se u pokožici, sjemenkama i peteljka grožđa. Mogu imati od dvije do preko 40 monomernih jedinica (Teixeira, 2013.) pa se proantocijanidini u pokožici i sjemenkama razlikuju prema molekularnoj masi. U pokožici su zastupljeni proantocijanidini većih molekularnih masa nego u sjemencima, a također se razlikuju i u sastavu monomera (Adams, 2006.) Procijanidine sjemenke većinom sačinjavaju katehini, epikatehini i epikatehin galat jedinice, dok se ovi u pokožici uglavnom sastoje od epikatehina i epigalokatehina. Vrlo su jaki antioksidansi, prema brojnim istraživanjima pokazalo se kako procijanidini iz sjemenki imaju 20 do 50 puta jači antioksidacijski učinak od vitamina C i E (Kashif, 2010.)



Slika 3. Podijela tanina

Od neflavonoida, u grožđu su prisutne fenolne kiseline koje se dijele u dvije osnovne grupe, a to su hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te stilbeni. Samo su hidroksicimetne kiseline prisutne u većim količinama u grožđu dok hidroksibenzojevih kiselina i stilbena ima malo.

Hidroksicimetne kiseline imaju C3-C6 kostur. Treća su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u bobicama grožđa. U bijelom vinu doprinose posmeđivanju pri oksidaciji s nefenolnim 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. Najzastupljenija je galna kiselina (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.)

Fenolne kiseline su bezbojne u razrijeđenom alkoholu, ali zbog oksidacije mogu postati žute.

Stilbeni, 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. U biljci je povećana

sinteza u slučaju infekcije i visokoj izloženosti UV svjetlosti (Adams, 2006.). Resveratrol je glavni stilben prisutan u grožđu, a postoji u dva izomerna oblika. *Trans*-resveratrol služi kao prekursor za oligo- i polimerne stilbene poput viniferina. (Kashif, 2010., Teixeira, 2013.) Ekstrahira se tijekom fermentacije crnih vina te mu se pripisuju mnogobrojna ljekovita svojstva. U većim koncentracijama se nalazi u crnom vinu zbog postupka maceracije.

### 2.3. Metoda vanjskog standarda

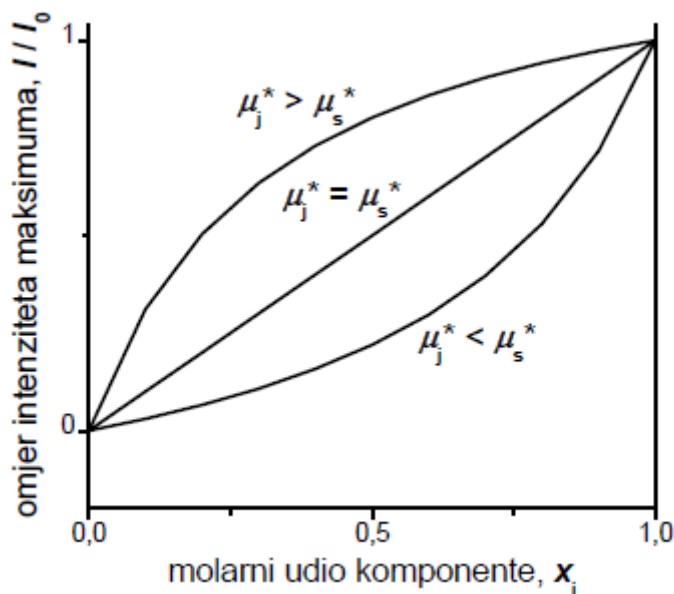
Kao vanjski standard u ovoj metodi rabi se čista komponenta čiji udio treba odrediti. To se postiže usporedbom intenziteta,  $I_{ij}$ , s intenzitetom istog maksimuma za čistu komponentu:

$$I_{ij,0} = K_i \frac{1}{\rho_j \mu_j^*}$$

iz čega slijedi:

$$\frac{I_{ij}}{I_{ij,0}} = x_j \frac{\mu_j^*}{\mu_s^*}$$

U ovom slučaju omjer intenziteta linearno ovisi o sastavu samo kada  $\mu_j^* = \mu_s^*$ , to jest kada sve komponente smjese imaju isti kemijski sastav. Dakle, ova metoda se može izravno upotrebljavati samo za analizu smjesa polimorfnih modifikacija. U ostalim slučajevima krivulja može aproksimirati pravcu za male raspone  $x_j$ , te se crta baždarni pravac.

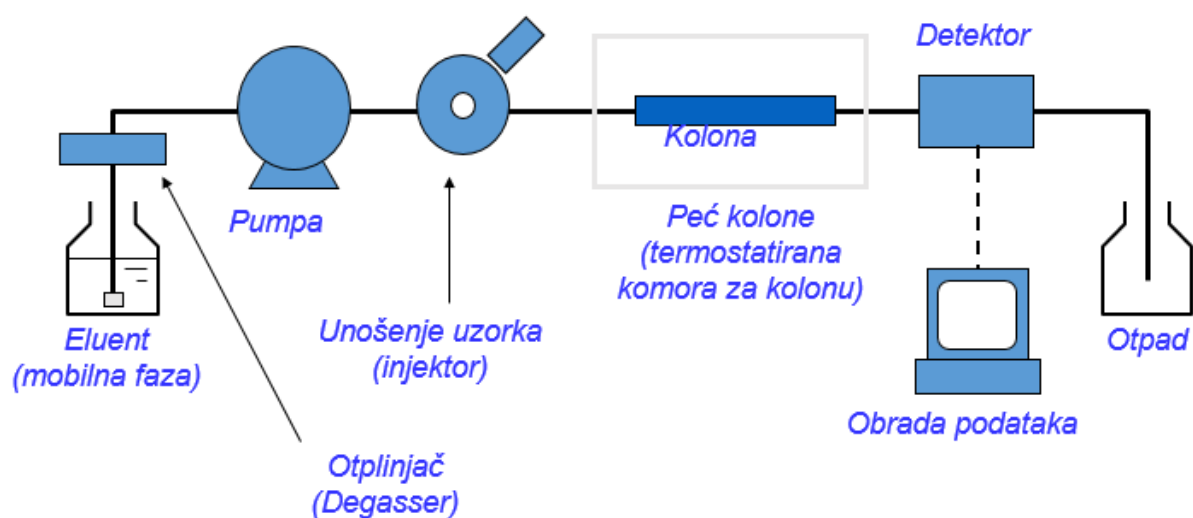


Slika 4. Metoda vanjskog standarda

Egzaktna ravnotežna krivulja za dvokomponentni sustav jest:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\mu_1^* x_1}{x_1(\mu_1^* - \mu_2^*) + \mu_2^*}$$

#### 2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti



Slika 5. Shematski prikaz rada HPLC uređaja

Pojam kromatografija podrazumijeva razdvajanje složenih smjesa na pojedinačne komponente, odnosno spojeve, gdje razlikujemo mobilnu i stacionarnu fazu. Eluiranje se vrši pokretnom fazom, dok je stacionarna faza čvrsta tvar ili tanki tekući film vezan na čvrsti inertni nosač, odnosno kromatografska kolona.

Razdvajanje pojedinačnih spojeva temelji se na činjenici da spoj iz otopine započinje interakciju sa stacionarnom i pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, raspodijeli među fazama ili veličini tvari koja se razdvaja, što utječe na njegovo vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) na kromatografskoj koloni.

HPLC se sastoji od sustava za dobavu pokretne faze, sustava za injektiranje, kućišta kolone i detektora. Sustav za dobavu pokretne faze sastoji se od spremnika mobilne faze, pumpe, regulacijskih ventila pumpe, odzračivača, ventila za ispiranje sustava, regulatora tlaka i miješalice. Sustav za injektiranje omogućava unos uzorka, a sastoji se od injekcijskog ventila, automatskog termostatisanog uzorkivača (autosamplera), injekcijske igle, graduirane injekcije i kapilare. Na detektoru se vrši detekcija analiziranih spojeva, pri čemu se mogu koristiti

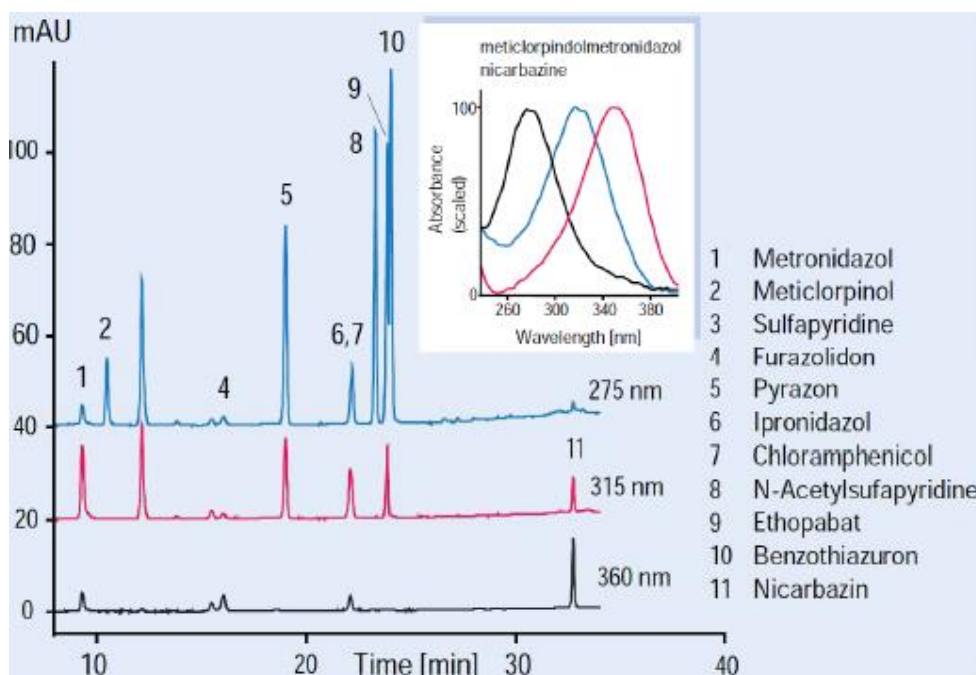
UV/VIS, multiodni (PDA, DAD), fluorescentni, indeks loma, elektrokemijski, amperometrijski ili spektrometar masa detektori.

Kolona je centralni dio kromatografskog sustava. To je zatvorena cijev napunjena nepokretnom fazom na kojoj se odvija razdvajanje.

Može se reći da je analit u ravnoteži između faza kada je:

$$A_{\text{pokr}} \leftrightarrow A_{\text{nepokr}}$$

Konstanta ravnoteže  $K$  određena je koeficijentom razdijeljena, a definira se kao koncentracija analita u nepokretnoj fazi u odnosu na koncentraciju u pokretnoj fazi. Vrijeme od injektiranja u analita do vremena kada pik analita izađe s kolone i dođe u detektor zove se vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ).

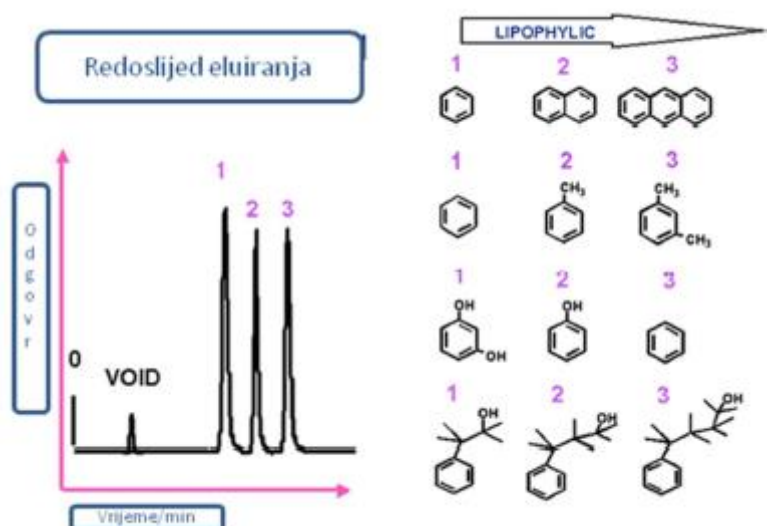


Slika 6. Idelan kromatogram

## 2.5. Tekućinska kromatografija obrnutih faza

Kromatografija obrnutih faza je popularnija vrsta tekućinske kromatografije, a korištena je i u svrhu ovog rada. Nepokretna faza je nepolarna, a pokretna faza je polarna, dok je u tekućinskoj kromatografiji normalnih faza obrnuto. Nepolarna nepokretna faza dobiva se vezanjem nepolarnih skupina na kemijski aktivnu površinu silikagela i umreženih polimera. Pokretna faza je polarna, smjesa vode i organskih otapala: acetonitrila, metanola i u posebnim slučajevima tetrahidrofurana. U identičnim kromatografskim uvjetima zadržavanje na nepokretnoj fazi povećava se proporcionalno duljini ugljikovodičnog lanca. Za ovu vrstu kromatografije općenito vrijedi da se polarniji spojevi razdvajaju na nepokretnoj fazi s kraćim ugljikovodičnim lancima polarnijom pokretnom fazom (više vode, a manje organskog otapala).

Dulji ugljikovodični lanci (C22 i C18) rabe se s pokretnom fazom u kojoj je veći udio organskog otapala pa je ta kombinacija pogodna za razdvajanje nepolarnih, hidrofobnih molekula. Razdvajanje kromatografiranih spojeva posljedica je hidrofobne interakcije s ugljikovodičnom površinom nosača. Eluiranje se odvija u nizu padajuće polarnosti (povećane hidrofobnosti), a s povećanjem polarne sastavnice pokretne faze povećava se zdržavanje spojeva na koloni. Kolone za ovu vrstu kromatografije karakterizira dobra ponovljivost rezultata i visoka djelotvornost separacije.



Slika 7. Razdvajanje spojeva s tekućinskom kromatografijom obrnutih faza

## 2.6. Gradijentsko razdvajanje

Gradijentsko razdvajanje podrazumijeva dva ili više sustava otapala različite polarnosti. Odnos se mijenja kontinuirano ili stupnjevito tijekom elucije što za učinak ima poboljšanje djelotvornosti odjeljivanja. Postiže se skraćenje  $t_R$  i poboljšanje kromatograma.

## 2.7. Detektori

Detektor je dio kromatografskog instrumenta kojim se utvrđuje promjena sastava eluenta mjerenjem nekog njegovog fizikalnog ili kemijskog svojstva. Prema vrsti odgovora detektori mogu biti diferencijalni (mjere razliku u sastavu eluenta) i integralni (mjere udio komponente uzorka u eluentu). Prema temeljnim svojstvima detektori mogu biti osjetljivi na koncentraciju (odgovor detektora je proporcionalan koncentraciji komponente uzorka) i masu (odgovor detektora je proporcionalan masi komponente uzorka). Prema selektivnosti detektori mogu biti

univerzalni (reagiraju na svaku komponentu u eluentu) i selektivni (reagiraju na jednu komponentu ili ograničen broj komponenata sličnih kemijskih svojstava). Spojevi eluirani s kromatografske kolone detektiraju se na temelju njihovih fizikalno kemijskih svojstava. Tako se za detekciju može upotrijebiti: refrakcija svjetla, fluorescencija, svojstva nuklearne magnetske rezonancije, apsorpcija u UV-, VIS- i bliskom IR- području elektromagnetskih valova, masena spektroskopija i dr.

UV- detektori mjere svojstvo apsorpcije spojeva u UV- području elektromagnetskih valova. Svojstvo UV- apsorpcije specifično je za pojedine funkcionalne skupine po intenzitetu i po valnoj duljini. Tako su prilikom mjerenja hidroksibenzojeve kiseline i flavan-3-oli određivani pri valnoj duljini 280 nm, hidroksicimetne kiseline pri valnoj duljini 320 nm, a slobodni antocijani pri valnoj duljini 520 nm. Diode Array detektori su tip UV- detektora koji s pomoću niza dioda skeniraju kromatografski pik u malim razmacima i pohranjuju snimljene spektre. Photo Diode Array detektor korišten pri analiziranju fenolnih spojeva u vinu, mjeri apsorbanciju analita na više vanih duljina. Koristi seriju ili niz različitih detektoriskih ćelija u instrumentu, a svaka odgovara na promjene apsorbancije na različitim valnim duljinama. Prednosti su snimanje kompletnog spektra u vrlo malom vremenu te mogućnost razlikovanja slabo razlučenih pikova ili pikova kontaminanata.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Uzorci vina

U ovom radu istraživana je utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na fenolne spojeve u vinu. Ispitivan je utjecaj na bijelo vino Graševina te na crno vino Cabernet Sauvignon. U Tablici 2. prikazani su osnovni fizikalno-kemijski parametri tretiranih vina.

Tablica 2. Osnovni fizikalno-kemijski parametri tretiranih vina.

Parametar	Graševina	Cabernet Sauvignon
Alkohol (vol %)	12,0	12,9
Ukupna kiselost (g/L vinske kiseline)	8,1	6,4
Hlapiva kiselost (g/L octene kiseline)	1,88	0,59
Reducirajući šećeri (g/L)	7,1	3,7
pH	3,45	3,46
Jabučna kiselina (g/L)	1,0	0,5
Mliječna kiselina (g/L)	2,1	1,5

##### 3.1.2. Kemikalije

- Acetonitril HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Metanol HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Etanol HPLC grade, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Mravlja kiselina 98-100%, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska

##### 3.1.3. Aparatura i pribor

###### 3.1.3.1. Aparatura

- Uređaj za visoki tlak, FPG7100 Stansted Fluid Power Iso-lab High Pressure System; Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK
- Ultrazvučna kupelj Bandelin, Sonorex, Berlin, Njemačka
- HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
  - *Binarna Pumpa (Bin Pump SL) G1312B*

- *Autosampler (HiP-ALS) G1367B*
- *Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B*
- *Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL ) G1316B*
- *Diode Array Detector (DAD SL) G1315C*
- *Agilent Chemstation Softver*

#### *3.1.3.2.Pribor*

- Menzura od 50 mL
- Odmjerna tikvica od 1000 mL
- Staklena čaša od 250 mL
- Plastične bočice od 100 mL
- Viale za HPLC od 1,5 mL

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Obrada visokim hidrostatskim tlakom

Uzorci vina tretirani su visokim hidrostatskim tlakom pomoću uređaja Stansted Fluid Power, Velika Britanija koji postiže maksimalne tlakove do 1000 MPa.

#### **Postupak tretiranja:**

Plastičnu bočicu od 100 mL napuniti vinom do vrha te dobro zatvoriti čepom. Potom ju postaviti u radni cilindar volumena 2000 mL ispunjenim tlačnom tekućinom (propilen – glikol). Pritom je važno naglasiti da vrijeme tretiranja uzoraka ne uključuje vrijeme potrebno za postizanje radnog tlaka. Tretiranja su izvršena pri tlakovima od 200, 400 i 600 MPa i vremenu obrade od 5, 15 i 25 minuta. Primijenjeni procesni parametri prikazani su u Tablici 3. Svaki pojedini tretman proveden je u triplikatu.

Tablica 3. Parametri tretiranja visokim hidrostatskim tlakom

<b>Šifra uzorka</b>	<b>Sorta vina</b>	<b>Tlak (MPa)</b>	<b>Vrijeme (min)</b>
Aa	Graševina	200	5
Ab	Graševina	200	15
Ac	Graševina	200	25
Ba	Graševina	400	5
Bb	Graševina	400	15
Bc	Graševina	400	25
Ca	Graševina	600	5
Cb	Graševina	600	15
Cc	Graševina	600	25
Da	Cabernet Sauvignon	200	5
Db	Cabernet Sauvignon	200	15
Dc	Cabernet Sauvignon	200	25
Ea	Cabernet Sauvignon	400	5
Eb	Cabernet Sauvignon	400	15
Ec	Cabernet Sauvignon	400	25
Fa	Cabernet Sauvignon	600	5
Fb	Cabernet Sauvignon	600	15
Fc	Cabernet Sauvignon	600	25

### 3.2.2. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav 9 slobodnih antocijana (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat, peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima crnog vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

#### Priprema uzorka:

Prije same kromatografske analize uzorak vina filtrirati kroz filter Nylon Membranes, promjera 25 mm i veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Supelco, Sigma-Aldrich, SAD). Injektirati 20  $\mu\text{L}$  ovako pripremljenog uzorka.

#### Kromatografski uvjeti:

Analiza je provedena primjenom HPLC uređaja Agilent1200 Series te uz detekciju na DAD detektoru. Za razdvajanje analiziranih spojeva korištena je kolona Nucleosil C18, dimenzija 250x4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 40 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze su odzračene u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 30 minuta. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici 4. uz protok mobilne faze od 1 mL/min.

Tablica 4. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana

<b>t</b> (min)	<b>A</b> (%)	<b>B</b> (%)	<b>Protok</b> (mL/min)
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

### Identifikacija i kvantifikacija:

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm, usporedbom retencijskog vremena ( $t_R$ ) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Kvantifikacija analiziranih spojeva provedena je primjenom metode vanjskog standarda malvidin-3-glukozid klorida kao najzastupljenijeg slobodnog antocijana, a dobivene koncentracije izražene su u mg/L. Izrada baždarnog pravca pripadajućeg standarda provedena je prilikom razvoja metode (Tablica 5.). Svaki uzorak analiziran je u triplikatu.

Tablica 5. Jednadžba pravca standarda malvidin-3-glukozid klorida

Spoj	Jednadžba regresijskog pravca	Koeficijent determinacije
Malvidin-3-glukozid klorid	$y = 34,025 x + 15,663$	$R^2 = 0,9999$

### 3.2.3. Određivanje fenolnih kiselina i flavan-3-ola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav hidroksibenzojevih (galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska) i hidroksicimetnih (kaftarinska, klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska) kiselina te flavan-3-ola ((+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidin B1 i B2) u uzorcima bijelog vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

#### Priprema uzorka:

Prije same kromatografske analize uzorak vina filtrirati kroz filter Nylon Membranes, promjera 25 mm i veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Supelco, Sigma-Aldrich, SAD). Injektirati 20  $\mu\text{L}$  ovako pripremljenog uzorka.

#### Kromatografski uvjeti:

Analiza je provedena primjenom HPLC uređaja Agilent1200 Series te uz detekciju na DAD detektoru. Za razdvajanje analiziranih spojeva korištena je kolona Gemini C18, dimenzija 250x4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 25 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 98:2; v/v) i otapalo B (metanol), prema metodi Komes i sur. (2007) uz manju modifikaciju mobilne faze, odnosno otapala A gdje je umjesto 3 % vodene otopine mravlje kiseline korištena 2 % otopina te modifikaciju gradijenta. Pripremljene mobilne faze su odzračene u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 30 minuta. Razdvajanje navedenih skupina spojeva provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici 6. uz protok mobilne faze od 1 mL/min.

Tablica 6. Gradijent korišten za razdvajanje fenolnih kiselina i flavan-3-ola

<b>t</b> (min)	<b>A</b> (%)	<b>B</b> (%)	<b>Protok</b> (mL/min)
0	98	2	1
20	68	32	1
30	60	40	1
40	50	50	1
50	50	50	1
53	98	2	1
55	98	2	1

Identifikacija i kvantifikacija:

Detekcija i identifikacija provedene su pomoću DAD detektora pri valnim duljinama od 280 (hidroksibenzojeve kiseline i flavan-3-oli) i 320 (hidroksicimetne kiseline). Identifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spoja i pripadajućeg standarda, te uvidom u UV spektar spoja i standarda. Kvantifikacija analiziranih spojeva provedena je primjenom metode vanjskog standarda galne, protokatehinske, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, siringinske, kaftarinske, klorogenske, kafeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline te (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B1 i B2, a dobivene koncentracije izražene su u mg/L. Izrada baždarnih pravaca pripadajućih standarda provedena je prilikom razvoja metode (Tablica 7.). Svaki uzorak analiziran je u triplikatu.

Tablica 7. Jednadžbe pravaca standarda fenolnih kiseline i flavan-3-ola

<b>Spoj</b>	<b>Jednadžba regresijskog pravca</b>	<b>Koeficijent determinacije</b>
<b>Galna kiselina</b>	$y = 34,008 x - 2,593$	$R^2 = 0,9996$
<b>Protokatehinska kiselina</b>	$y = 18,984 x + 1,950$	$R^2 = 0,9997$
<b><i>p</i>-Hidroksibenzojeva kiselina</b>	$y = 18,073 x - 3,161$	$R^2 = 0,9993$
<b>Vanilinska kiselina</b>	$y = 20,825 x - 2,760$	$R^2 = 0,9997$
<b>Siringinska kiselina</b>	$y = 35,452 x - 0,457$	$R^2 = 0,9998$
<b>Kaftarinska kiselina</b>	$y = 42,173 x - 8,876$	$R^2 = 0,9999$
<b>Klorogenska kiselina</b>	$y = 35,622 x - 17,277$	$R^2 = 0,9995$
<b>Kafeinska kiselina</b>	$y = 63,511 x - 6,578$	$R^2 = 0,9999$
<b><i>p</i>-Kumarinska kiselina</b>	$y = 76,113 x - 1,568$	$R^2 = 0,9999$
<b>Ferulinska kiselina</b>	$y = 66,287 x - 8,548$	$R^2 = 0,9999$
<b>(+)-Katehin</b>	$y = 8,832 x + 1,408$	$R^2 = 0,9999$
<b>(-)-Epikatehin</b>	$y = 8,311 x - 1,409$	$R^2 = 0,9999$
<b>Procijanidin B1</b>	$y = 6,304 x + 1,306$	$R^2 = 0,9998$
<b>Procijanidin B2</b>	$y = 4,362 x - 0,009$	$R^2 = 0,9998$

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 8. Udjel slobodnih antocijana (mg/L) u uzorcima crnog vina nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom.

Antocijan/ Uzorak	Kontrola	Da	Db	Dc	Ea	Eb	Ec	Fa	Fb	Fc
<b>Delfinidin-3-glukozid</b>	6,45 ± 0,23	6,89 ± 1,00	4,52 ± 0,33	5,74 ± 0,45	6,31 ± 0,89	12,76 ± 0,71	7,38 ± 0,56	12,89 ± 0,24	12,88 ± 0,27	11,75 ± 0,57
<b>Cijnidin-3-glukozid</b>	0,83 ± 0,01	0,98 ± 0,07	0,48 ± 0,06	0,59 ± 0,08	0,67 ± 0,13	2,48 ± 0,18	0,78 ± 0,10	1,76 ± 0,06	1,67 ± 0,06	1,58 ± 0,11
<b>Petunidin-3-glukozid</b>	6,27 ± 0,40	6,78 ± 0,98	4,41 ± 0,27	5,56 ± 0,43	6,10 ± 0,79	12,10 ± 0,71	6,96 ± 0,53	12,34 ± 0,27	12,13 ± 0,32	11,19 ± 0,52
<b>Peonidin-3-glukozid</b>	5,20 ± 0,64	5,71 ± 0,98	3,66 ± 0,21	4,57 ± 0,39	4,90 ± 0,61	9,82 ± 0,59	5,40 ± 0,38	10,00 ± 0,24	9,53 ± 0,30	9,12 ± 0,36
<b>Malvidin-3-glukozid</b>	33,87 ± 4,73	36,89 ± 4,87	24,53 ± 1,16	30,12 ± 2,31	32,49 ± 3,70	62,24 ± 4,06	35,42 ± 2,58	63,62 ± 1,53	61,01 ± 1,75	57,95 ± 2,23
<b>Peonidin-3-glukozid acetat</b>	1,60 ± 0,09	1,66 ± 0,30	0,89 ± 0,21	1,29 ± 0,15	1,43 ± 0,23	3,17 ± 0,22	1,62 ± 0,17	3,25 ± 0,11	3,15 ± 0,10	2,93 ± 0,15
<b>Malvidin-3-glukozid acetat</b>	9,50 ± 1,22	10,44 ± 1,51	6,86 ± 0,36	8,46 ± 0,71	9,09 ± 1,09	17,77 ± 1,09	9,95 ± 0,70	17,78 ± 0,53	16,93 ± 0,49	16,17 ± 0,64
<b>Peonidin-3-glukozid p-kumarat</b>	0,54 ± 0,23	0,47 ± 0,20	0,26 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,53 ± 0,13	1,49 ± 0,10	0,67 ± 0,08	1,47 ± 0,04	1,45 ± 0,05	1,35 ± 0,05
<b>Malvidin-3-glukozid p-kumarat</b>	3,02 ± 0,18	3,41 ± 0,33	2,09 ± 0,28	2,83 ± 0,23	3,12 ± 0,45	6,42 ± 0,40	3,62 ± 0,30	6,10 ± 0,20	5,96 ± 0,18	5,62 ± 0,12

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Šifre uzoraka su prikazane u Tablica 3.



Tablica 9. Udjel hidroksibenzojevih kiselina (mg/L) u bijelom vinu nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom.

	<b>Galna kiselina</b>	<b>Protokatehinska kiselina</b>	<b>p-hidroksibenzojeva kiselina</b>	<b>Vanilinska kiselina</b>	<b>Siringinska kiselina</b>
<b>Kontrola</b>	2,58±0,04	5,26±0,42	0,54±0,07	0,74±0,09	0,28±0,05
<b>Aa</b>	2,63±0,02	5,58±0,06	0,80±0,26	0,39±0,03	0,22±0,05
<b>Ab</b>	2,60±0,03	5,53±0,10	0,89±0,24	0,40±0,01	0,20±0,04
<b>Ac</b>	2,64±0,01	5,61±0,05	0,92±0,02	0,45±0,07	0,19±0,01
<b>Ba</b>	2,58±0,04	5,56±0,33	0,63±0,04	0,62±0,14	0,17±0,01
<b>Bb</b>	2,59±0,04	5,76±0,08	0,67±0,12	0,48±0,01	0,20±0,01
<b>Bc</b>	2,54±0,01	5,65±0,03	0,68±0,14	0,50±0,03	0,18±0,03
<b>Ca</b>	2,64±0,04	5,86±0,11	0,80±0,05	0,64±0,16	0,23±0,05
<b>Cb</b>	2,59±0,04	5,72±0,09	0,86±0,17	0,57±0,12	0,21±0,02
<b>Cc</b>	2,60±0,04	5,83±0,10	0,74±0,13	0,61±0,16	0,18±0,03

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Šifre uzoraka su prikazane u Tablica 3.

Tablica 10. Udjel hidroksicimetnih kiselina (mg/L) u bijelom vinu nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom.

	<b>Kaftarinska kiselina</b>	<b>Klorogenska kiselina</b>	<b>Kafeinska kiselina</b>	<b>p-kumarinska kiselina</b>	<b>Ferulinska kiselina</b>
<b>Kontrola</b>	29,36±0,22	9,57±0,05	2,37±0,07	1,44±0,02	0,58±0,01
<b>Aa</b>	29,48±0,39	9,49±0,08	2,27±0,02	1,45±0,01	0,59±0,02
<b>Ab</b>	30,05±0,64	9,96±0,25	2,26±0,04	1,43±0,02	0,57±0,02
<b>Ac</b>	30,37±0,27	9,81±0,06	2,29±0,01	1,43±0,02	0,57±0,02
<b>Ba</b>	28,55±0,45	9,28±0,38	2,28±0,13	1,44±0,03	0,56±0,01
<b>Bb</b>	29,06±0,32	9,26±0,10	2,26±0,04	1,45±0,01	0,56±0,00
<b>Bc</b>	28,75±0,33	9,18±0,11	2,20±0,02	1,43±0,00	0,55±0,00
<b>Ca</b>	30,33±0,09	9,40±0,13	2,25±0,01	1,50±0,02	0,56±0,01
<b>Cb</b>	30,35±0,49	9,51±0,04	2,25±0,04	1,47±0,03	0,56±0,01
<b>Cc</b>	30,36±0,19	9,60±0,11	2,28±0,05	1,47±0,01	0,56±0,01

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Šifre uzoraka su prikazane u Tablica 3.

Tablica 11. Udjel flavan-3-ola i procijanidina (mg/L) u bijelom vinu nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom.

	<b>Procijanidin B1</b>	<b>Procijanidin B2</b>	<b>(+)-katehin</b>	<b>(-)-epikatehin</b>
<b>Kontrola</b>	11,20±0,10	2,41±0,30	6,53±0,52	7,80±0,06
<b>Aa</b>	11,21±0,16	2,54±0,23	5,76±0,48	8,34±0,37
<b>Ab</b>	10,99±0,07	2,22±0,51	4,19±0,42	9,19±0,60
<b>Ac</b>	11,16±0,02	2,20±0,78	3,74±0,58	9,67±0,39
<b>Ba</b>	10,70±0,27	1,50±0,15	2,94±0,05	8,88±0,40
<b>Bb</b>	10,78±0,27	1,45±0,81	2,96±0,02	9,03±0,74
<b>Bc</b>	10,91±0,18	1,61±0,13	2,91±0,04	8,99±0,20
<b>Ca</b>	11,22±0,12	1,73±0,37	3,58±0,20	10,34±0,33
<b>Cb</b>	10,98±0,31	1,67±0,34	3,27±0,11	9,74±0,41
<b>Cc</b>	11,33±0,24	1,73±0,11	3,18±0,11	10,20±0,07

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Šifre uzoraka su prikazane u Tablica 3.

U ovom radu cilj je bio identificirati i odrediti udjel polifenolnih spojeva u crnom i bijelom vinu nakon tretiranja pri različitim uvjetima visokog hidrostatskog tlaka.

U Tablici 8. prikazan je udjel slobodnih antocijana u uzorcima vina Cabernet Sauvignon nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom. Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti određeno je 9 slobodnih antocijana i to: delphinidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, petunidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid, malvidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid acetat, malvidin-3-glukozid acetat, peonidin-3-glukozid p-kumarat i malvidin-3-glukozid p-kumarat. Svaki od uzoraka analiziran je u triplikatu. Uzroci su tretirani pri različitim tlakovima (200, 400 i 600 MPa) te pri različitim vremenima (5, 15 i 25 minuta). Iz rezultata je vidljivo da je u uzorcima vina najzastupljeniji slobodni antocijan malvidin-3-glukozid te je njegova vrijednost najviša u uzorku vina tretiranog pri tlaku 600 MPa 5 minuta i iznosi  $63,62 \pm 1,53$  mg/L. Od ostalih antocijana u uzorcima je u najmanjem udjelu određeno peonidin-3-glukozid p-kumarata i to  $0,26 \pm 0,07$  mg/L u vinu tretiranom pri tlaku od 200 MPa i vremenu od 15 minuta. Sveukupno gledano u svim uzorcima vina najmanji udio antocijana se nalazi u uzorku tretiranom pri tlaku od 200 MPa 15 minuta. Najviše antocijana se nalazi u uzorcima tretiranim najvišim tlakom (600 MPa). U uzorcima vina tretiranim tlakom od 200 MPa može se uočiti da najviše antocijana ima u uzorku tretiranom 5 minuta, zatim se udjel smanjuje u uzorku tretiranom 15 minuta te opet malo povećava u uzorku tretiranom 25 minuta. Kod uzoraka tretiranih tlakom 400 MPa najmanji udio antocijana je u uzorku koji je tretiran najkraće (5 minuta), a najviše u uzorku koji je tretiran 15 minuta. U uzorcima tretiranim tlakom 600 MPa udio antocijana opada povećanjem vremena tretiranja. U odnosu na kontrolu uzorci tretirani visokim hidrostratskim tlakom imaju veće udjele antocijana.

U Tablici 9. prikazan je udjel hidroksibenzojevih kiselina određenih u bijelom vinu (Graševina) nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom pri tlakovima 200, 400 i 600 MPa i vremenima 5, 15 i 25 minuta. Od hidroksibenzojevih kiselina u uzorcima vina određene su: galna kiselina, protokatehinska kiselina, p-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina i siringinska kiselina. U uzorcima vina nakon tretiranja u najvećem udjelu određena je protokatehinska kiselina  $5,86 \pm 0,11$  mg/L pri tlaku od 600 MPa tretiranom 5 minuta. Ukupno gledano u najmanjem udjelu određeno je siringinske kiseline i to pri tlaku od 400 MPa 5 minuta i iznosi  $0,17 \pm 0,01$  mg/L. U odnosu na kontrolu sve fenolne kiseline osim vanilinske i siringinske u uzorcima tretiranim visokim tlakom pokazuju veće vrijednosti.

Tablica 10. prikazuje udio hidroksicimetnih kiselina nađenih u bijelom vinu sorte Graševina nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom pri tlakovima 200, 400 i 600 MPa i vremenima

5, 15 i 25 minuta . Nakon tretiranja najveću vrijednost pokazuje kaftarinska kiselina i to pri tlaku od 600 MPa 25 min, a iznosi  $30,36 \pm 0,19$  mg/L. Najmanje je pronađeno ferulinske kiseline, a najmanju vrijednost pokazuje pri tlaku 400 MPa i vremenu 25 minuta i iznosi  $0,55 \pm 0,00$  mg/L. Vrijednosti kaftarinske, klorogenske i kafeinske kiseline rastu povećanjem vremena tretiranja pri 200 MPa, dok vrijednosti p-kumarinske i ferulinske kiseline opadaju. U uzorcima tretiranim 400 MPa vrijednosti klorogenske, kafeinske i ferulinske kiseline opadaju poduljenjem vremena tretiranja, a vrijednosti kaftarinske i p-kumarinske kiseline, u odnosu na uzorak tretiran 5 minuta, rastu pri 15 minuta tretiranja, te opadaju pri 25 minuta tretiranja. Porastom vremena tretiranja pri tlaku od 600 MPa vrijednosti kaftarinske, klorogenske i kafeinske kiseline pokazuju porast.

U Tablici 11. prikazani su udjeli flavan-3-ola i procijanidina u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom pri tlakovima 200, 400 i 600 MPa i vremenima 5, 15 i 25 minuta . Najveći udio ima procijanidin B1 i to pri tlaku od 600 MPa u uzorku tretiranom 25 minuta. Najmanje vrijednosti pokazuje procijanidin B2 pri tlaku 400 MPa i vremenu tretiranja 15 minuta, a iznosi  $1,45 \pm 0,81$  mg/L. Udio procijanidina B1 i (+)-katehina je najveći u uzorcima tretiranim tlakom 200 MPa, a udio procijanidina B2 i (-)-epikatehina u uzorcima tretiranim tlakom 600 MPa. U odnosu na kontrolu produljenje vremena tretiranja na svim tlakovim (200, 400 i 600 MPa) nije pokazalo veći značaj.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pokazala se kao adekvatna metoda za analiziranje polifenolnih spojeva u bijelom i crnom vinu.
2. Analizom je identificirano devet slobodnih antocijana u crnom vinu te fenolne kiseline i flavan-3-oli u bijelom vinu.
3. Utvrđeno je da povećanjem primjenjenog tlaka u crnom vinu udjel slobodnih antocijana raste, dok vrijeme tretiranja nije pokazalo značajan utjecaj.
4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na fenolne kiseline i flavan-3-ole u bijelom vinu se nije pokazao kao značajan.
5. Sveukupno, može se zaključiti da visoki hidrostatski tlak ne utječe značajno na polifenolni sastav vina, čime je ova tehnologija prikladna za primjenu na vinu zbog očuvanja glavnih komponenti vina, poput polifenolnih spojeva.

## 6. LITERATURA

Adams D. O. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 249-256.

Bosiljkov T., Brnčić M., Karlović S., Tripalo B., Ježek D., Dujmić F., Vadlja D. (2013) Primjena ultrazvuka i visokih hidrostatskih tlakova na promjenu raspodjele veličine masnih globula i kemijski sastav kravljeg mlijeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**: 82-89.

Buzrul S. (2012) High hydrostatic pressure treatment of beer and wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **13**: 1-12.

Choudhary A. (2008) Principles of HPLC (Liquid Chromatography) <http://www.pharmaguideline.com/2013/07/principle-of-hplc-liquid-chromatography.html>, Pristupljeno 17. ožujka 2017.

Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I. (2007) HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **98**: 120-125.

Herceg Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci, Profil Zagreb. str. 96

Hertzog D. I., Tica O. S. (2012) Molecular mechanisms underlying the anticancerous action of flavonoids. *Current Health Science Journal* **38**: 4.

Kashif A., Federica M., Young H. C., Robert V. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* **6**: 344-350.

Kazazić P. S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 4.

Kennedy J. A., Saucier C., Glories Y. (2006) Grape and Wine Phenolics: History and Perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* **35**: 107-120.

Komes, D., Ulrich, D., Kovačević Ganić, K., Lovrić, T. (2007) Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage. *Vitis* **46**: 77-84.

Kumar S., Pandey A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids, *The Scientific World Journal* **2013**: 162750.

Lampir L., Pavloušek P. (2013) Influence of locality on content of phenolic compounds in white wines. *Czech Journal Food Science* **6**: 619-626.

Legac A., Ljubičić I. (2011) Inovativne formulacije čajnih mješavina s prirodnim sladilima-karakterizacija nutritivnog sastava i biološke aktivnosti, Zagreb

Linton M., Patterson M. F. (2000) High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* **47**: 175-182.

Lorrain B., Chira K., Teissedre P.-L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry* **126**: 1991-1999.

Lovrić, T. (2003) Procesi u Prehrambenoj Industriji s Osnovama Prehrambenog Inženjstva, HINUS. str. 95

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley and Sons. str. 76, 146

Teixeira A., Baenas N., Dominguez-Perles R., Barros A., Rosa E., Moreno D. A., Garcia-Viguera C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters. *International Journal of Molecular Science* **15**: 15638-15678.

Victoria Moreno-Arribas, M., Carmen Polo, M. (2009) Wine chemistry and Biochemistry, Springer Science+Business. str. 129

Yang Tao, Da-Wen Sun, Adrian Górecki, Wioletta Błaszczak, Grzegorz Lamparski, Ryszard Amarowicz, Józef Fornal, Tomasz Jeliński (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of red wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **39**: 141-147.

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Ana Tomljanović

ime i prezime studenta