

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Josipa Matanić

6765/N

**EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ
KOMINE GROŽĐA SORTE PLAVAC MALI**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Verica Dragović – Uzelac

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE GROŽĐA SORTE PLAVAC MALI

Josipa Matanić, 6765/N

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj vremena ekstrakcije na izolaciju ukupnih fenolnih spojeva, polimernih proantocijanidina, monomernih antocijana te na antioksidacijski kapacitet u sjemenkama i pokožici grožđa sorte Plavac mali izdvojenih iz komine nakon proizvodnje vina. Ekstrakcija je provedena uz primjenu 80 %-tne vodene otopine metanola za sjemenke i 80 %-tne vodene otopine metanola sa 1 %-tnom mravljom kiselinom za pokožicu, kroz vrijeme ekstrakcije 30, 50 i 70 minuta. Ukupni fenoli određivani su spektrofotometrijskom Folin – Ciocalteu metodom, polimerni proantocijanidini vanilin metodom, monomerni antocijani spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, sjemenke i pokožica grožđa, fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 35 stranica, 13 slika, 1 tablicu, 44 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Verica Dragović – Uzelac

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ivona Elez Garofulić, viši asistent

Rad predan: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Nutrition

Department of Food Engineering

Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM WASTE OF GRAPE *PLAVAC MALI*

Josipa Matanić, 6765/N

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of extraction time to the isolation of total phenolic compounds, polymeric proanthocyanidins, monomeric anthocyanins and antioxidant capacity in the grape seeds and skin of grape variety *Plavac mali*, separated from the pomace after wine production. Extraction was made with the use of 80% aqueous methanol for the seeds and with 80% aqueous methanol containing 1% formic acid for the skin, through the extraction time of 30, 50 and 70 minutes. Total phenolic compounds were determined by spectrophotometric Folin – Ciocalteu method, polymeric proanthocyanidins by vanillin method, monomeric anthocyanins by spectrophotometric pH differential method and antioxidant capacity by FRAP method.

Keywords: ultrasonic – assisted extraction, grape seeds and skin, phenolic compounds, antioxidant capacity

Thesis contains: 35 pages, 13 figures, 1 table, 44 references

Original in: Croatian

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

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

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić, Scientific Assistant*

Thesis delivered: June, 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. Vinova loza i proizvodnja crnih vina	2
2.1.1. Sorta <i>Plavac mali</i>	2
2.1.2. Nusprodukti proizvodnje vina.....	3
2.2. Fenolni spojevi	4
2.2.1. Flavonoidi	5
2.2.2. Neflavonidi	7
2.3. Antioksidacijska aktivnost.....	8
2.4. Ekstrakcija	9
2.4.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Liofilizirani uzorci sjemenki i pokožica sorte <i>Plavac mali</i>	11
3.1.2. Kemikalije i standardi	11
3.1.3. Aparatura i pribor.....	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva u ultrazvučnoj kupelji	15
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	15
3.2.3. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom	17
3.2.4. Određivanje monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom.....	19
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	20
4. REZULTATI.....	23
4.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola iz pokožice i sjemenki komine grožđa sorte <i>Plavac mali</i>	23

4.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki komine grožđa sorte <i>Plavac mali</i>	24
4.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice komine grožđa sorte <i>Plavac mali</i>	25
4.4 Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom	25
5. RASPRAVA.....	27
5.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola	27
5.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina	28
5.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana.....	28
5.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet	29
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA.....	32

1. UVOD

Proizvodnja vina u Republici Hrvatskoj predstavlja važan poljoprivredni sektor u sklopu kojeg je primjerice u 2013. godini proizvedeno oko 90.000 tona grožđa odnosno 565.000 hL vina i 18.000 tona organskog otpada u obliku vinske komine, od čega se 80 % koristilo za proizvodnju vina, a 20 % su nusprodukti, komina koju čine pokožica, sjemenke i peteljke. Važno je pronaći dodatnu primjenu komine grožđa jer se još uvijek podcjenjuje njezina vrijednost te se uglavnom koristi za proizvodnju gnojiva i stočne hrane. Komina grožđa je vrijedan izvor polifenola, budući da se visoka razina ovih spojeva zadržava i nakon industrijskih procesa proizvodnje. Polifenoli imaju značajno pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje i mogu pružiti preventivno djelovanje protiv tumora, kardiovaskularnih te neurodegenerativnih oboljenja.

Osim fenolnih spojeva komina sadrži i lignin, minerale i vitamine te se može učinkovito preraditi u različite vrste proizvoda uz ostvarenje profita. Primjenom novih tehnologija stvara se dodatna vrijednost u cijelom proizvodnom procesu obrade nusprodukata proizvodnje vina te se stvaraju preduvjeti za proizvodnju prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda.

Ispuštanje nusproizvoda od proizvodnje vina u okoliš može uzrokovati razne probleme (povećavaju kiselost tla, uzrokuju fitotoksičnost, proizvodnju metana. S obzirom na strogu zakonsku regulativu EU, nusprodukte proizvodnje vina potrebno je adekvatno zbrinjavati kako ne bi došlo do onečišćenja okoliša te narušavanja kvalitete tla, podzemnih voda te flore i faune.

Cilj ovog istraživanja bio je izolirati fenolne spojeve iz liofiliziranih sjemenki i pokožice grožđa sorte Plavac mali koje zaostaju kao sastavni dio komine primjenom ultrazvučne ekstrakcije te ispitati utjecaj vremena (30, 50 i 70 minuta) na ekstrakciju i antioksidacijsku aktivnost. U dobivenim ekstraktima cilj je bio odrediti udio ukupnih fenola, polimernih proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vinova loza i proizvodnja crnih vina

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je jedna od najstarijih i ekonomski najisplativijih biljnih kultura u svijetu (This i sur., 2007). Smatra se da vinova loza potječe s euroazijskog područja, odakle se s vremenom širila prema područjima na kojima se danas uzgaja. Najbolje uspijeva unutar umjerenog pojasa, odnosno na područjima mediteranske i kontinentalne klime (Azija, Sjeverna Amerika i Europa te u južnim dijelovima Južne Amerike, Afrike i Australije). Ljudi su je odabrali zbog njezinih osobina koje se odnose na plodnost, cvjetanje, visoke prinose, veličinu plodova, sadržaj šećera i kiselina, budući da su to ključne komponente za uspješnu proizvodnju vina (Bacilieri i sur., 2013).

Crno vino dobiva se vrenjem masulja crnoga grožđa, a temeljno svojstvo daju polifenoli, crveno obojeni antocijani i tvari trpka i opora okusa – tanini. Crna vina se razlikuju od bijelih po svojoj crvenoj boji i po sadržaju drugih sastojaka, koji u crni (crveni) mošt pa zatim i u vino prelaze iz čvrstih dijelova grožđa. Proizvodnja crnih vina obuhvaća: berbu i prijevoz grožđa do podruma, ruljanje – muljanje (uz odvajanje peteljke), maceraciju i alkoholnu fermentaciju, odvajanje mošta od taloga cijedenjem i prešanjem te završna alkoholna fermentacija (Zoričić, 1998).

2.1.1. Sorta *Plavac mali*

Plavac mali je hrvatska autohtona sorta grožđa. Rasprostranjen je u području srednje i južne Dalmacije, na obalnom i otočnom dijelu. To su čista ekološka područja s obzirom na mali broj tretiranja loze zaštitnim sredstvima. Takav način zaštite vinove loze moguć je zbog mikroklima na spomenutim područjima, koja se očituje stalnim strujanjem suhog zraka, koji s obzirom na malu količinu vlažnosti ne pogoduje razvoju gljivičnih bolesti – pepelnice i peronospore. Od ove sorte grožđa proizvode se vrhunska i kvalitetna vina, jaka i ekstraktna, lagano trpka okusa, tamnocrvene boje i specifične arome, koja bi na temelju navedenog trebala nositi oznaku ekoloških vina (Zoričić, 1998).

2.1.2. Nusprodukti proizvodnje vina

Nakon prerade grožđa ostaje značajna količina otpada koji ima veliki utjecaj na okoliš. Razlikuju se otpadne vode i čvrsti organski otpad koji obuhvaća kominu grožđa koja čini 62%, vinski talog 14%, peteljka izdvojena prije fermentacije 12% te nevodeni talog (Cotoras i sur., 2014). Komina kao nusprodukt u proizvodnji vina, bogat je izvor fenolnih spojeva, etanola, tartarata, limunske i jabučne kiseline te vlakana (Rajha i sur., 2013). Takav otpad predstavlja sekundarnu sirovinu za izolaciju visokovrijednih, biološki aktivnih spojeva. Različitim tehnikama i metodama ekstrakcije vrši se izolacija biološki aktivnih komponenti koje se koriste u prehrambenoj industriji kao funkcionalni dodaci, u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (deSá, 2014). S druge strane, korištenje komine za izdvajanje biološki aktivnih spojeva iziskuje velike troškove pa je korištenje mljevene komine grožđa kao dodatak za obogaćivanje prehrambenih proizvoda pobudilo veliki interes, kako prehrambene industrije tako i znanstvenika (Teixeira i sur., 2014).

Pokožica grožđa koja zaostaje kao nusprodukt čini čak 65% ukupne količine komine, a dokazano je kako je pokožica bogat izvor fenolnih tvari poput antocijana, katehina, flavonola, alkohola, stilbena i fenolnih kiselina. Više od 70% polifenola grožđa zaostaje u komini zbog slabe ekstrakcije prilikom fermentacije te komina zbog toga postaje visoko vrijedan izvor nutrijenata koji imaju pozitivno djelovanje na zdravlje (Brahim i sur., 2013).

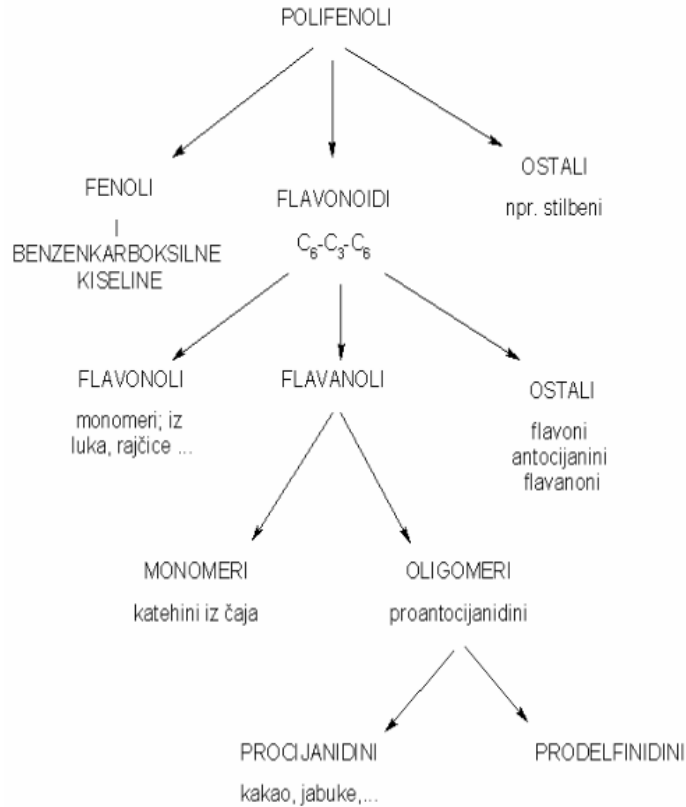
Udio sjemenki u komini čini 38 do 52% suhe tvari, što ovisi o metodi proizvodnje i rukovanju otpadom, a polifenoli sjemenki grožđa čine 60 do 70% ukupnih polifenola koji se ekstrahiraju iz komine. Sjemenke sadrže do 40% vlakana, 16% eteričnih ulja, 11% proteina, 7% kompleksnih fenolnih komponenti kao što su tanini te tvari poput šećera i minerala (Teixeira i sur., 2014).

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Uključuju spojeve različite kemijske strukture čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidoksiliranih benzenskih prstenova. Imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu te doprinose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća. Dokazana su protuupalna, protualergijska i protukancerogena djelovanja nekih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju, kao npr. crno vino i zeleni čaj (Berend i Grabarić, 2008).

Od fenofaze – dozrijevanja grožđa polifenoli se počinju stvarati u bobici grozda, najprije monomeri (jednostavni), a poslije polimeri (složeni), smješteni u pokožici i opni sjemenke, malo u soku, a nešto u mesu. Oksidativni procesi ubrzavaju polimerizaciju tih spojeva u moštu, a nastavljaju se u vinu. Njihova prisutnost utječe na stabilnost i čuvanje vina, na njegovu boju, miris i okus te na hranjivu vrijednost vina. Zahvaljujući bogatstvu polifenola, vino je uvršteno u prehrambene proizvode učinkovita antiviralnog i baktericidnog djelovanja (Zoričić, 1998).

Fenolni spojevi se dijele na flavonoide i ne - flavonoidne spojeve. U skupinu flavonoida svrstavaju se: flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavonoli te antocijani, a razlikuju se prema stupnju oksidacije piranskog prstena. Neflavonoidni spojevi su fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), lignani te stilbeni (Riedel i sur., 2012).



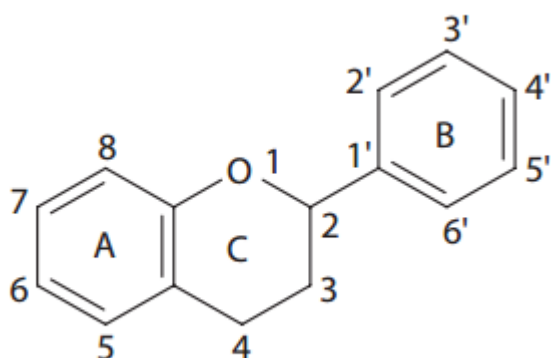
Slika 1. Osnova podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008)

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji su koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Pripisuju im se mnoga terapijska djelovanja, a znatno utječu na boju i okus hrane. U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti oprašivača i za zaštitu od UV zračenja (Kazazić, 2004). Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida, a spojevi iz ove skupine spojeva su se pokazali kao najjači antioksidansi (Berend i Grabarić, 2008).

Osnovna struktura flavonoida sastoji se od C₁₅ (C₆C₃C₆) flavonskog kostura odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 2). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani,

glikolizirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama. Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, flavonoidi se dijele u brojne podskupine (Kazazić, 2004; Ivanova i Stefova, 2011).



Slika 2. Kemijska struktura flavonoida (Ivanova i Stefova, 2011)

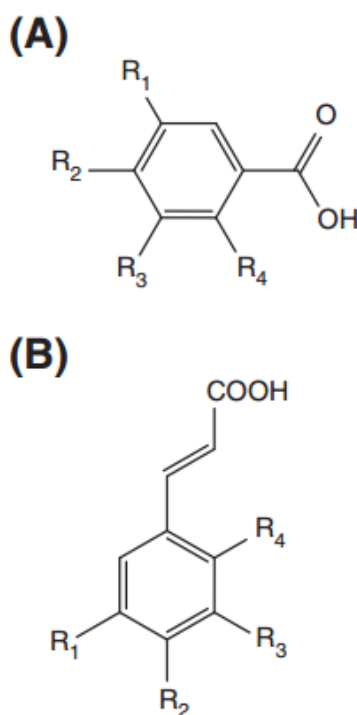
Antocijani su pigmenti topivi u vodi i staničnom soku, nosioci su prirodne boje plodova voća i povrća koje ima crvenu, ljubičastu i plavu boju (Dipalmo i sur., 2015). Uglavnom se nalaze u vakuolama pokožice grožđa, a prisutni su u obliku: delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina pri čemu je u najzastupljeniji antocijan grožđa: malvidin-3-O-glikozid (Ivanova i Stefova, 2011). Antocijani su prilično nestabilni i lako se oksidiraju i hidroliziraju, a s metalima daju obojene soli. Voće koje sadržava antocijanske pigmente, narušavanjem strukture gubi prirodnu boju zbog pojave posmeđivanja. Većina degradacijskih promjena na antocijanima izazvana je hidrolizom. Ona se zbiva enzimatski uz prisutnost specifičnih enzima (glikozidaze, fenolaze i antocijanaze) ili u jako kiseloj sredini pri temperaturi vrenja. Produkti hidrolize su antocijanidin (aglikon) i šećer (Bonilla i sur., 1999). Boja crnih vina ovisi o količini i obliku antocijana. U mladim vinima zastupljeni su slobodni antocijani vezani s taninom. U tijeku starenja vina količina antocijana postupno se smanjuje pa tako nakon 10 – 15 godina iznosi svega 10% početne količine. U kilogramu grožđa Plavac mali sadrži 760 mg antocijana (Zoričić, 1998).

Proantocijanidini su poznati i pod nazivom kondenzirani tanini te su prisutni kao dimeri, oligomeri i polimeri katehina (flavan-3-ola). Sintetizirani su kao krajnji produkti biosintetskog puta

flavonoida i uključeni u posmeđivanje voća (Zuiter i sur., 2014). Najviše ih se nalazi u sjemenci (80%), peteljkovini (12%), pokožici (8%), dok ih meso ne sadrži. Djeluju baktericidno i antivirusno, a djelotvorni su kod srčanih bolesti, smanjuju kolesterol i trigliceride. Crna vina sadrže oko 20 puta više proantocijanidina nego bijela, a količina se razlikuje i ovisno o sortama. Tijekom starenja vina, proantocijanidini se povezuju s monomernim flavonoidima stvarajući tako polimerne strukture (tanine) (Jackson, 2008).

2.2.2. Neflavonidi

Neflavonoidi su dio lignina i tkiva biljaka, a dolaze vezani na antocijane i šećere. Nalaze se u pokožici bobice u količini 0,1 – 30 mg/L. U vinu se nalaze slobodni ili u obliku estera te pridonose aromi vina. Najzastupljeniji neflavonoidni spojevi u grožđu i vinu su derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te u manjim količinama stilbeni. Ovi spojevi u strukturi sadrže samo jedan aromatski prsten (Goncalves i sur., 2013) (Slika 3).



Slika 3. Kemijska struktura hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih kiselina (B) (Goncalves i sur., 2013)

2.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kada su oni u štetnom suvišku tj. kada je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Antioksidansi inaktiviraju djelovanje slobodnih radikala pa tako zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Osim toga, mogu doprinijeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala (Halliwell, 1990). Antioksidansi se mogu svrstati u dvoje skupine: pravi antioksidansi i sinergisti. U prvu grupu ubrajaju se spojevi koji imaju jasno izražena antioksidacijska svojstva, a drugu grupu spojeva čine oni koji pojačavaju antioksidacijsko djelovanje pravih antioksidansa. Pravi antioksidansi su većinom spojevi fenolnog karaktera s dvije hidroksilne skupine u *orto*- ili *para* – položaju (Lafka i sur., 2007; Lelas, 2008).

Istraživanja su pokazala da antioksidansi iz prehrambenih izvora imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, među njima se najviše ističu fenolni spojevi zbog čega im se pripisuju brojna terapijska djelovanja (Fang i sur., 2002). Polifenoli imaju zaštitnu ulogu u organizmu u borbi protiv kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, a mnogi od tih pozitivnih učinaka su povezani sa njihovom sposobnošću hvatanja slobodnih radikala (Villano i sur., 2004). Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina. Najvažniji je kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. Flavonoid kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta: 1) kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije, 2) iz njega nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju. Sljedeći mogući način antioksidacijskog djelovanja je interakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E koji štite polifenole od oksidacijske degeneracije (Kazazić, 2004).

Zbog kompleksnih oksidacijskih procesa, potrebno je više metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta jer na osnovi samo jedne metode dobivene rezultate ne možemo točno interpretirati i konačno ih potvrditi. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste se direktne metode (ORAC metoda, određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β – karotenom) i indirektne metode (DPPH, ABTS⁺, FRAP).

2.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Odnosi se na prijenos jedne ili više tvari, iz materijala u kojem se nalaze, u tekuću fazu, a nakon toga slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze (Conde i sur., 2010). Važno je odrediti optimalne uvjete za provođenje ekstrakcije kako bi se povećala učinkovitost procesa. Tvari izolirane ekstrakcijom mogu se koristiti kao prehrambeni aditivi, pomoćne tvari u proizvodnji farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda ili kao fitokemikalije sa izrazito pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje (Pinelo i sur., 2004).

Ekstrakcija je vrlo važan korak u izolaciji i identifikaciji fenolnih spojeva i ne postoji samo jedna standardna metoda ekstrakcije. Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija superkritičnim fluidima su jedne od najčešće primjenjivanih metoda izolacije fenola. Uspješnost ekstrakcije ovisi o uvjetima provođenja samog procesa te mnogi čimbenici mogu utjecati na učinkovitost: sastav i vrsta otapala, omjer uzorak/otapalo, vrijeme i temperatura ekstrakcije, tlak, pH, veličina čestica (Ignat i sur., 2011). Vrijeme i temperatura ekstrakcije pokazali su se kao važni čimbenici u kvaliteti i kvantiteti ekstrahiranih fenolnih spojeva kao i za optimizaciju energetske troškova procesa. Iako povećanjem temperature dolazi do poboljšanja u procesu ekstrakcije fenola, zbog povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije, fenolni spojevi podložni su degradaciji pri temperaturama višim od 60°C (Spigno i De Faveri, 2007). Osim navedenih parametara, bitno je obratiti pozornost na pH vrijednost otapala kao i na veličinu čestica koja se koristi prilikom ekstrakcije. Mehaničkim smanjenjem veličine koštica komine dolazi do poboljšanja ekstrakcije polifenola otapalima, uglavnom zbog povećane dostupnosti spojeva dok se korištenjem enzima postiže degradacija polisaharida vezanih na fenole (Fontana i sur., 2013).

Konvencionalne metode ekstrakcije kao što su maceracija i Soxhlet ekstrakcija mogu se primjenjivati za izolaciju prirodnih fenola, ali postoje određeni nedostaci: gubitak polifenola zbog ionizacije, hidroliza i oksidacija tijekom ekstrakcije (loše iskorištenje), dugo vrijeme postupka ekstrakcije (Teixeira i sur., 2014). U posljednje vrijeme razvijene su novije metode ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz biljaka, kao što su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HHP) (Ignat i sur., 2011).

2.4.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jednostavna, jeftina i učinkovita alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije. Temelji se na korištenju energije dobivene ultrazvukom (zvučni valovi frekvencije iznad 20 kHz) kako bi se olakšala ekstrakcija tvari iz čvrstog uzorka pomoću otapala koje se bira ovisno o prirodi otopljene tvari koja se ekstrahira (Carrera i sur., 2012). Ova metoda se koristi za izolaciju nehlapljivih organskih spojeva iz uzoraka kao što su tlo, mulj i otpad, a često se koristi kako bi se poboljšala ekstrakcija lipida, proteina i fenolnih spojeva iz biljaka (Ignat i sur., 2011).

Prednosti ove metode su: skraćeno vrijeme trajanja ekstrakcije, smanjena potrošnja otapala, povećana količina ekstrahiranih fenolnih tvari koje su sačuvale svoju kemijsku strukturu i biološku aktivnost, a zbog veće kontaktne površine između uzorka i otapala (zbog smanjene veličine čestica uzorka) ova se metoda pokazala bržom od konvencionalnih metoda poput ekstrakcije otapalom (Teixeira i sur., 2014; Fontana i sur., 2013).

Poboljšanje ekstrakcije ciljanih spojeva iz biljnog tkiva pomoću ultrazvuka uglavnom se pripisuje učinku akustičnih kavitacija proizvedenih u otapalu prolaskom ultrazvučnog vala. Mehanički učinak ultrazvuka ubrzava oslobađanje organskih spojeva sadržanih u biljkama, intenzivira prijenos mase i omogućava brže prodiranje otapala u stanicu (Chen i sur., 2007; Ghafoor i sur., 2009).

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o varijablama koje utječu na temperaturu kavitacijskog procesa, viskoznost, prisutnost krutih čestica, visinu vodenog stupca, učestalost te o posuđu koje se koristi za ekstrakciju. Međutim, sve dok su eksperimentalni uvjeti konstantni, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija odličan je način za provođenje ekstrakcije kruto – tekuće (Nascentes i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Liofilizirani uzorci sjemenki i pokožica sorte *Plavac mali*

Nusprodukt proizvodnje vina sorte *Plavac mali* podvrgnut je prešanju. Uzorak komine podvrgnut je liofilizaciji, nakon čega su liofilizirani uzorci mehanički razdijeljeni na pokožice, sjemenke te dijelove peteljke. Razdvojeni dijelovi odvojeno su pakirani u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni i skladišteni pri -20°C do provođenja analize.



Slika 4. a) Liofilizirana komina (pokožica, sjemenke, peteljka); b) sjemenke grožđa; c) pokožica

3.1.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupak ekstrakcije

- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (za pokožice)
- 80 %-tni metanol (za sjemenke)

Kemikalije i standardi za određivanje ukupnih fenola

- 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.

- Standard galne kiseline
 - Priprema: Odvaže se 500 mg galne kiseline, u plastičnoj lađici 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 dopuni destiliranom vodom.

Kemikalije i standardi za određivanje proantocijanidina

- 100 %-tni metanol
- 1 %-tna etanolna otopina vanilina
 - Priprema: 1 g vanilina se u odmjernoj tikvici od 100 mL nadopuni metanolom do oznake.
- Koncentrirana 96 %-tna H₂SO₄
- 25 %-tna otopina H₂SO₄
 - Priprema: 13,02 mL 96 %-tne H₂SO₄ prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. H₂SO₄ se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.
- Standard katehina (5g/L)
 - Priprema: Odvaže se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Kemikalije i standardi za određivanje monomernih antocijana

- Kalijev kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)
 - Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 1,86 g kalijeva klorida (KCl) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te se doda 980 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podese na vrijednost 1,0 (±0,05) s klorovodičnom kiselinom (37% HCl), čiji utrošak približno iznosi 6,3 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1L, koja se prije

upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrijev acetatni pufer pH 4,5 (natrijev acetat 0,4 M)
 - Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvažuje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te se doda 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH i podesi na vrijednost 4,5 ($\pm 0,05$) s klorovodičnom kiselinom (37% HCl), čiji utrošak približno iznosi 20 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom te se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Kemikalije i standardi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna
- Klorovodična kiselina, 40 mM
 - Priprema: Otpipetira se 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- TPTZ-a (2, 4, 6 – tripiridil – s - triazin), 10 Mm
 - Priprema: Odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III) – klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina
 - Priprema: Odvažuje se 0,541 g željezo (III) – klorida heksahidrata u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake deioniziranom vodom.
- Glacijalna octena kiselina, 99 – 100 %-tna
- Acetatni pufer
 - Priprema: Odvažuje se 3,1 g natrij – acetat trihidrata u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens
 - Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III) – klorida u omjeru 10:1:1.
- Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)
 - Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L. odvažuje se 0,1000 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3.1.3. Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV – 1600PC Spectrophotometer) ili (UV UNICAM HELIOS β)
- Staklene kivete
- Tehnička vaga Mettler (točnost ±0,01 g)
- Analitička vaga Kern ABT 220 – 4M
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL, 500 mL i 1 L
- Menzure, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- pH metar Mettler Toledo Seven easy
- Staklena čaša, volumena 1 L i 100 mL
- Mikropipeta, volumena 100 μL i 1000 μL
- Vortex MS2 Minishaker IKA

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva u ultrazvučnoj kupelji

U Erlenmeyerove tikvice odvažuje se 1 g samljevenog uzorka ($\pm 0,05$) pokožice ili sjemenki grožđa sorte *Plavac mali* te se doda 40 mL otapala (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu za pokožice, 80 %-tni metanol za sjemenke). Zatim slijedi ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji kroz 30, 50 i 70 min. Nakon toga se sadržaj svake od tikvica prebaci u odmjerne tikvice od 50 mL i nadopuni otapalom do oznake. Potom se uzorci prebace u falkonice i podvrgnu centrifugiranju na 5500 rpm/10 minuta. Bistri dio uzorka se onda dekantira u falkonice te pohranjuje za daljnje analize.

Tablica 1. Plan ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji

UZORAK	OTAPALO	VRIJEME TRAJANJA EKSTRAKCIJE
SJEMENKE	80%tni metanol	30 min
		50 min
		70 min
POKOŽICE	1%tna mravlja kiselina u 80%tnom metanolu	30 min
		50 min
		70 min

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode

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

Priprema uzorka

Kako bi se ekstrakt razrijedio, u staklenu epruvetu se otpipetira 20 μL pripremljenog ekstrakta pokožice i 80 μL otapala – 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (razrjeđenje 5 puta) odnosno 10 μL pripremljenog ekstrakta sjemenke i 90 μL otapala – 80 %-tni metanol (razrjeđenje 10 puta).

Postupak određivanja

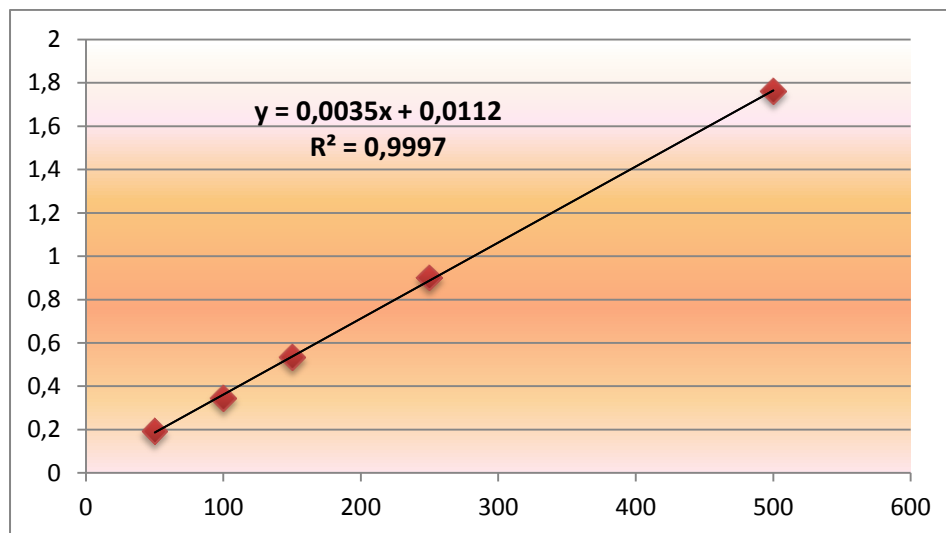
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL razrijeđenog ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri 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 odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja 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. iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 5. Baždarni pravac za ekvivalent galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom

Princip metode

Određivanje polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

Priprema uzorka

Kako bi se ekstrakt razrijedio 25 puta, u staklenu epruvetu otpipetira se 40 μL pripremljenog ekstrakta sjemenke i 960 μL otapala – 80 %-tni metanol.

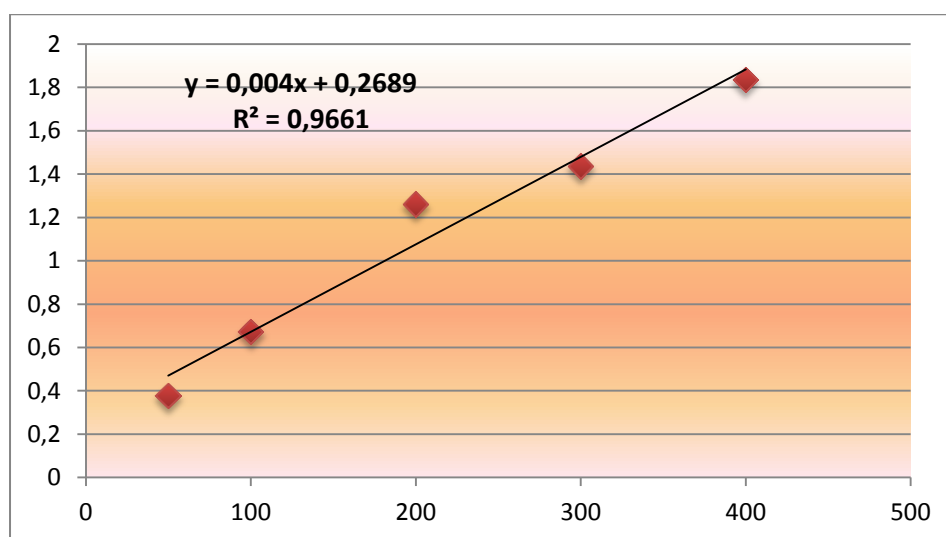
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne H_2SO_4 te 1 mL razrijeđenog ekstrakta. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina koncentracije 5 g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine prirede se slijedeća razrijeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se otpipetira redom: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H_2SO_4 . Uzorci se ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima metanol.



Slika 6. Baždarni pravac za ekvivalent katehina

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,004 X + 0,2689$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm

X – koncentracija katehina (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom

Princip metode

Kvantitativno određivanje monomernih antocijana zasniva se na svojstvu antocijana da pri promjeni pH vrijednosti reverzibilno mijenjaju svoju strukturu pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog spektra. Sniženje pH otopine izaziva povećanje apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorbancija u otopinama kod dva različita pH pri valnoj duljini maksimalne apsorbancije za pojedine antocijane (AOAC 2005.02).

Priprema uzorka

Kako bi se ekstrakt razrijedio 5 puta, u staklenu epruvetu otpipetira se 1 mL pripremljenog ekstrakta pokožice i 4 mL otapala – 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu.

Postupak određivanja

Reakcija se postavlja tako da se za jedan uzorak pripreme dvije staklene epruvete. U svaku se otpipetira po 5 mL razrijeđenog ekstrakta, a potom se u jednu epruvetu doda 4 mL pufera pH 1,0, a u drugu epruvetu pufer pH 4,5. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama, mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu.

Izračunavanje

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za cijanidin – 3 – glukozid 449,2 g mol⁻¹)

DF = faktor razrijeđenja (5)

10³ = faktor za preračunavanje g u mg

ε = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin – 3 – glukozid 26900 L mol⁻¹ cm⁻¹)

l = debljina kivete (1 cm)

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip metode

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo–2,4,6–tripiridil–s–triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero–tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema uzorka

Kako bi se ekstrakt razrijedio, u staklenu epruvetu otpipetira se 20 μL pripremljenog ekstrakta sjemenki i 980 μL vode (razrjeđenje 50 puta) odnosno u drugu epruvetu 10 μL pripremljenog ekstrakta pokožice i 290 μL vode (razrjeđenje 30 puta).

Postupak određivanja

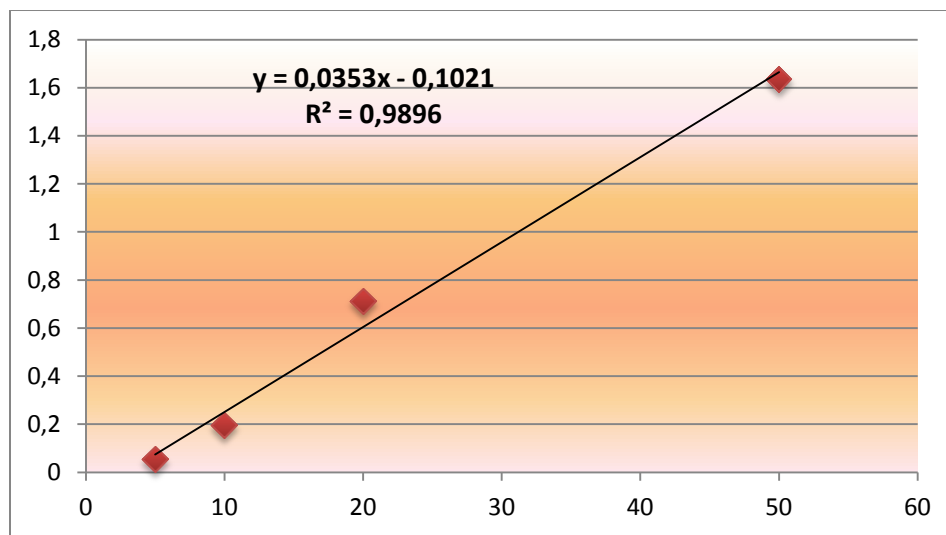
U staklenu epruvetu redom se otpipetira 300 μL razrijeđenog ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37°C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L od koje se pripreme razrijeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0.5, 1, 2, 1 i 5 mL alikvota otopine askorbinske kiseline te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μ L otopine standarda i 2250 μ L FRAP reagens, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37°C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravce izračuna se antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAPP metodom.



Slika 7. Baždarni pravac za ekvivalent askorbinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0353X - 0,1021$$

gdje je:

Y - apsorbancija pri 593 nm

X - ekvivalent askorbinske kiseline (AAE)(mg/L)

R² – koeficijent determinacije

Račun

Obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe³⁺ u Fe²⁺ je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti sa 2 (Fegredo et al., 2009).

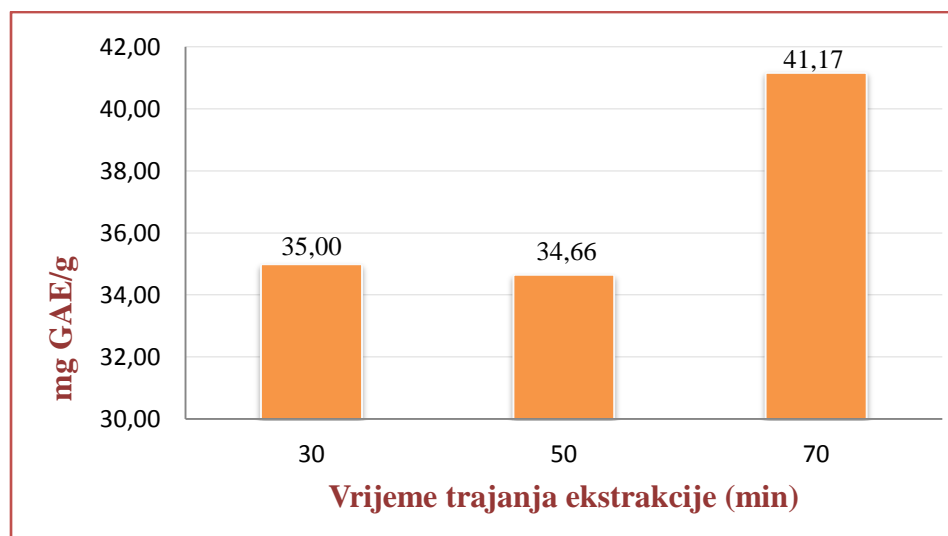
$$\text{FRAP} = \text{ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

4. REZULTATI

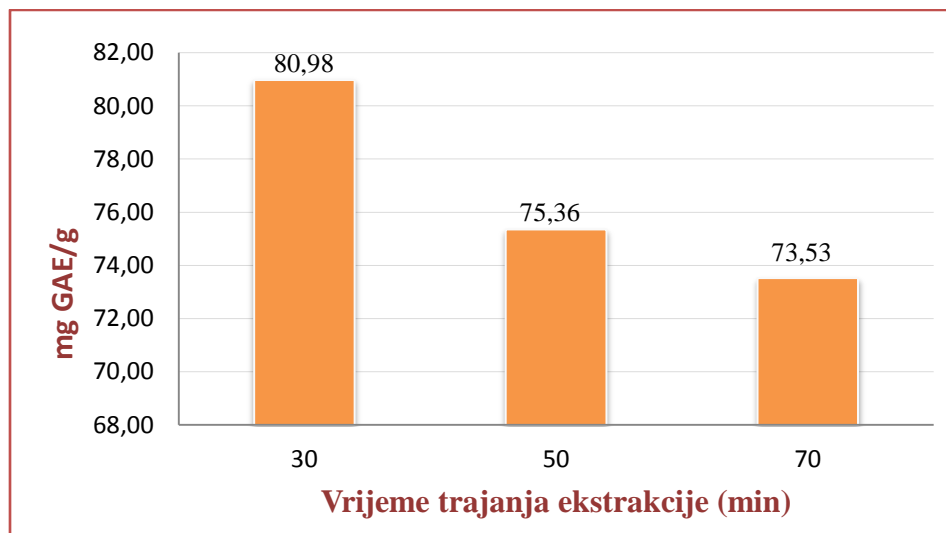
U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine grožđa sorte Plavac mali primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz upotrebu 80 %-tne vodene otopine metanola kao otapala za sjemenke te vodene otopine 1 %-tne mravlje kiseline u 80 %-tnom metanolu kao otapala za pokožice, kroz različito vrijeme trajanja ekstrakcije (30, 50 i 70 min). U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola Folin – Ciocalteu metodom, određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom, određivanje monomernih antocijana spektrofotometrijskom pH diferencijanom metodom te antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.

4.1. UTJECAJ VREMENA NA EKSTRAKCIJU UKUPNIH FENOLA IZ POKOŽICE I SJEMENKI KOMINE GROŽĐA SORTE *PLAVAC MALI*

Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju ukupnih fenola prikazani su grafički na slikama 1 i 2, uzimajući pri tome srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g).



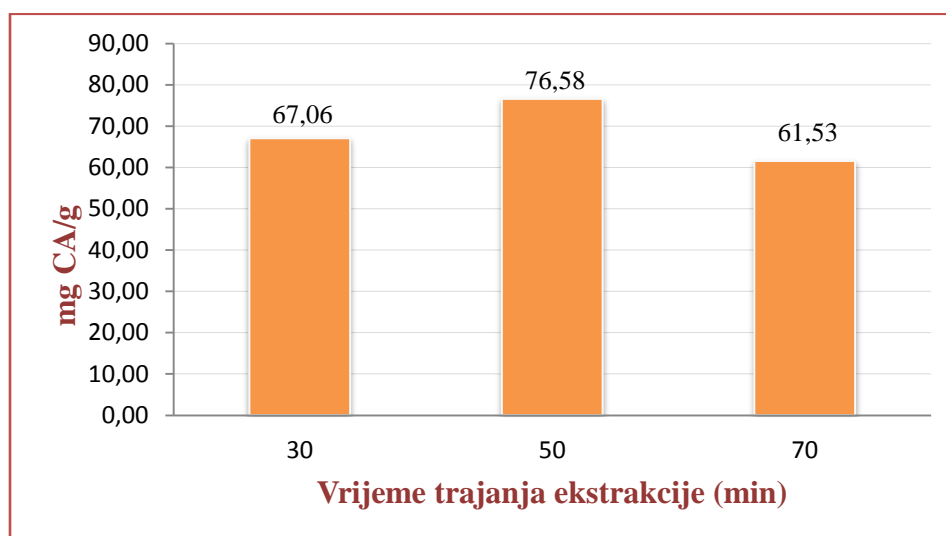
Slika 8. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz pokožice grožđa sorte *Plavac mali* (mg GAE/g); GAE = ekvivalent galne kiseline



Slika 9. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz sjemenki grožđa sorte *Plavac mali* (mg GAE/g); GAE=ekvivalent galne kiseline

4.2. UTJECAJ VREMENA NA EKSTRAKCIJU POLIMERNIH PROANTOCIJANIDINA IZ SJEMENKI KOMINE GROŽĐA SORTE *PLAVAC MALI*

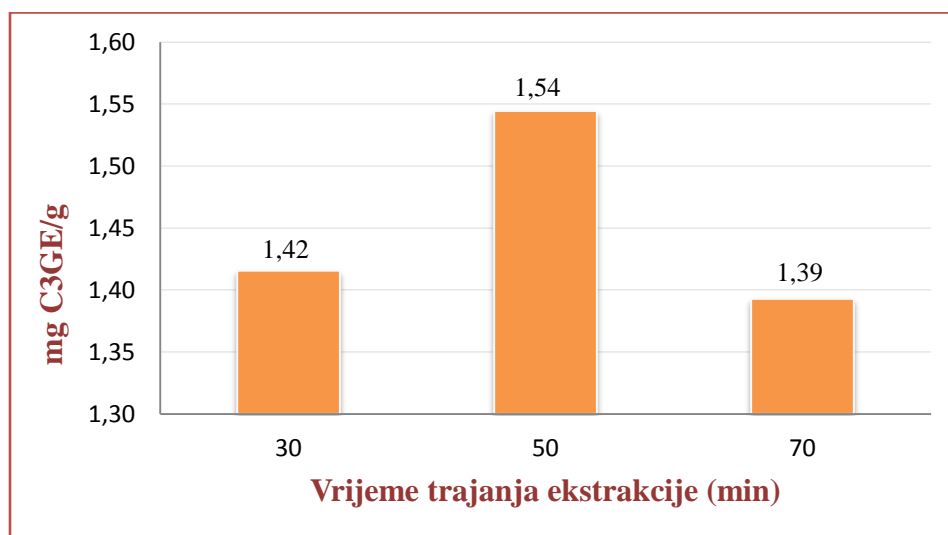
Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina prikazani su grafički na slici 3, uzimajući pri tome srednju vrijednost dvaju paralelnih mjerenja. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta katehina po gramu uzorka (mg CA/g).



Slika 10. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju polimernih proantocijanidina iz sjemenki grožđa sorte *Plavac mali* (mg CA/g); CA=ekvivalent katehina

4.3. UTJECAJ VREMENA NA EKSTRAKCIJU MONOMERNIH ANTOCIJANA IZ POKOŽICE KOMINE GROŽĐA SORTE *PLAVAC MALI*

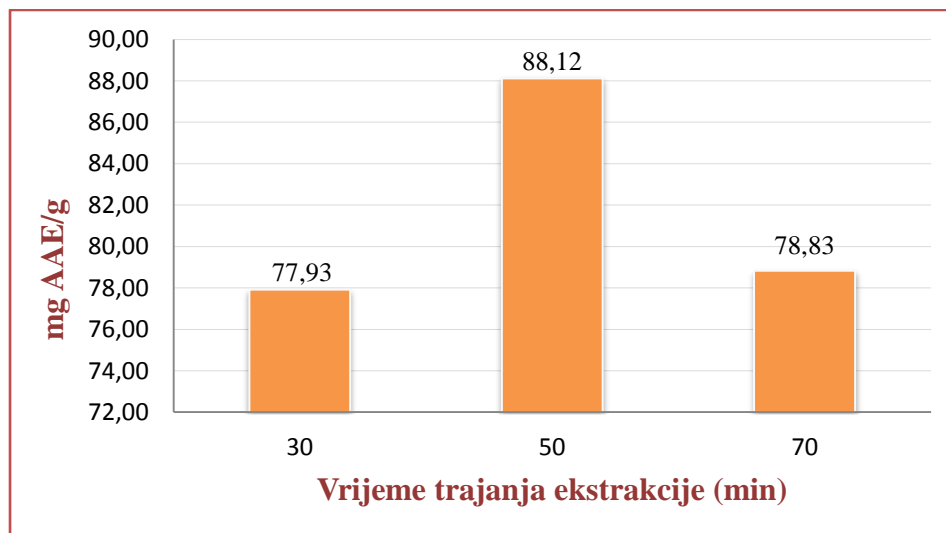
Rezultati utjecaja vremena na ekstrakciju monomernih antocijana prikazani su grafički na slici 4, uzimajući pri tome srednje vrijednosti dvaju paralelnih mjerenja. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po gramu uzorka (mg C3GE/g).



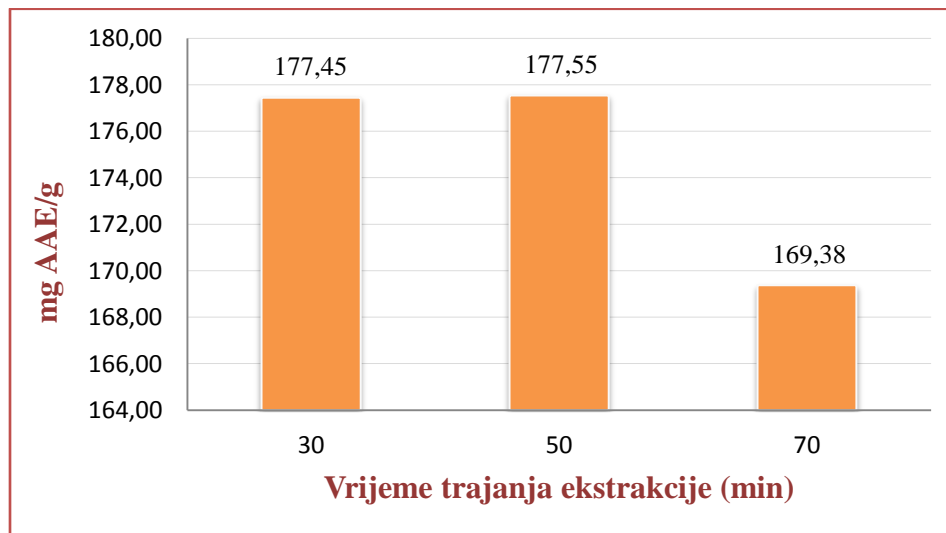
Slika 11. Utjecaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju monomernih antocijana iz pokožice grožđa sorte *Plavac mali* (mg C3GE/g); C3GE=ekvivalent cijanidin-3-glukozida

4.4 UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ODREĐEN FRAP METODOM

Rezultati utjecaja vremena na antioksidacijski kapacitet prikazani su grafički na slikama 5 i 6, uzimajući pri tome srednje vrijednosti dvaju paralelnih mjerenja. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu uzorka (mg AAE/g).



Slika 12. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet u pokožicama grožđa sorte *Plavac mali* (mg AAE/g); AAE=ekvivalent askorbinske kiseline



Slika 13. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet u sjemenkama grožđa sorte *Plavac mali* (mg AAE/g); AAE=ekvivalent askorbinske kiseline

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj vremena na ekstrakciju ukupnih fenola

Na slikama 8 i 9 vidljivo je kako vrijeme trajanja ekstrakcije značajno utječe na koncentraciju ukupnih fenola u pokožici i sjemenkama grožđa. Koncentracija ukupnih fenola u pokožici grožđa povećava se porastom vremena trajanja ekstrakcije dok se u sjemenkama proporcionalno smanjuje.

Najveća koncentracija ukupnih fenola iz pokožice komine grožđa dobivena je pri trajanju ekstrakcije 70 min (41,17 mg GAE/g), dok su vrijednosti dobivene pri trajanju ekstrakcije 30 i 50 min približno slične (35 mg GAE/g i 34,66 mg GAE/g). Do najznačajnijeg povećanja ukupne koncentracije fenola došlo je u periodu od 50. do 70. minute ekstrakcije te je to povećanje iznosilo 18,8 %. Promjena koncentracije ukupnih fenola između 30. i 50. min je minimalna i iznosi 0,98 %. Sasvim suprotan trend zabilježen je pri ekstrakciji ukupnih fenola iz sjemenki komine grožđa. Pri trajanju ekstrakcije 30 min koncentracija ukupnih fenola je najveća (80,98 mg GAE/g), zatim pri vremenu trajanja ekstrakcije 50 min (75,36 mg GAE/g), a najmanja koncentracija ukupnih fenola je zabilježena pri vremenu trajanja ekstrakcije 70 min (73,53 mg GAE/g). Do najvećeg smanjenja koncentracije ukupnih fenola došlo je u periodu od 30. do 50. min te je iznosilo 7,4 %. Daljnjim produljenjem vremena ekstrakcije od 50. do 70. minute zabilježen je pad koncentracije ukupnih fenola od 2,5 %.

Usporedbom prinosa ukupnih fenola između pokožice i sjemenki komine grožđa, može se uočiti da sjemenke grožđa sadrže znatno veći udio fenolnih spojeva od pokožice. Sadržaj fenola pri istom vremenu ekstrakcije je približno 2 puta veći u sjemenkama nego u pokožici.

Spigno i sur. (2007) istraživali su optimalne uvjete klasične ekstrakcije fenolnih spojeva te došli do zaključka da je vrijeme trajanja ekstrakcije varijabla koja značajno utječe na prinos fenolnih spojeva. Utvrdili su da je, s ekonomskog stajališta, ekstrakciju bolje provoditi pri višim temperaturama (60°C), kroz kraći vremenski period (<8 sati). Nadalje, pri ekstrakcijama dužim od 20 sati dolazi do reducirane ekstrakcije fenolnih spojeva te su prinosi značajno manji, međutim, nije jasno je li uzrok tome degradacija ili reakcije polimerizacije kojima nastaju novi kemijski spojevi koji imaju drugačiji odgovor na analitičke instrumente. Prema istraživanju Lafka

i sur. (2007), povećanje vremena trajanja klasične ekstrakcije do 3 sata uzrokuje maksimalnu ekstrakciju fenolnih spojeva dok daljnje povećanje vremena ekstrakciju čini dugotrajnom i neekonomičnom, bez značajnijeg porasta u količini ekstrahiranih fenola.

5.2. Utjecaj vremena na ekstrakciju polimernih proantocijanidina

Na slici 10 je prikazano kako vrijeme trajanja ekstrakcije utječe na koncentraciju polimernih proantocijanidina u sjemenkama komine grožđa. Može se zaključiti da je optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije 50 minuta jer su tada koncentracije polimernih proantocijanidina najveće.

Najveća koncentracija polimernih proantocijanidina iz sjemenki komine grožđa dobivena je pri trajanju ekstrakcije 50 minuta (76,58 mg katehina/g), zatim pri vremenu trajanja ekstrakcije 30 minuta (67,06 mg katehina/g), a najmanja koncentracija dobivena je pri vremenu trajanja ekstrakcije 70 minuta (61,53 mg katehina/g). Povećanje koncentracije polimernih proantocijanidina u periodu od 30. do 50. minute je iznosilo 14,2 %, a smanjenje koncentracije do kojeg je došlo u periodu od 50. do 70. minute iznosilo je 24,5 %.

Brahim i sur. (2014) su dobili veće količine ekstrahiranih proantocijanidina pri dužem vremenu trajanja ekstrakcije te su to objasnili činjenicom da se proantocijanidini sporo ekstrahiraju. Također su utvrdili da su, uz duže vrijeme trajanja ekstrakcije, veći prinosi pri nižim temperaturama (60°C) jer ne dolazi do degradacije (tek pri temperaturama >120°C). Liazid i sur. (2012) su s druge strane zaključili kako najveći utjecaj na ekstrakciju ima otapalo te da vrijeme trajanja ekstrakcije ne utječe značajno na uspješnost ekstrakcije, reducirajući pri tome vrijeme ekstrakcije od 5 sati na 5 minuta.

5.3. Utjecaj vremena na ekstrakciju monomernih antocijana

Na slici 11 je prikazan utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju monomernih antocijana u pokožici komine grožđa. Koncentracija monomernih antocijana se povećava porastom vremena trajanja ekstrakcije do 50. minute te se nakon tog perioda smanjuje.

Koncentracija monomernih antocijana nakon 30 minuta ekstrakcije je iznosila 1,42 mg cijanidin-3-glukozida/g te je nakon toga, u periodu do 50. minute, zabilježen porast (1,54 mg cijanidin-3-glukozida/g) koji je iznosio 8,5 %. Potom, u periodu od 50. do 70. minute dolazi do smanjenja koncentracije monomernih antocijana (1,39 mg cijanidin-3-glukozida). Smanjenje koncentracije između 50. i 70. minute iznosilo je 10,8%. Do ovakvih rezultata je vjerovatno došlo zbog nestabilnosti antocijana te njihove podložnosti degradaciji djelovanjem temperature, svjetlosti, kisika, otapala i pH.

Eksperimentalni podaci koje su dobili Mantell i sur. (2002) pokazuju da je najpogodnije vrijeme trajanja ekstrakcije antocijana između 30 i 60 minuta, s maksimalnim koncentracijama antocijana u 45. minuti, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Nakon tog perioda prinosi antocijana nisu značajni te nema prednosti od daljnjeg produljenja ekstrakcije. Kammerer i sur. (2004) dokazali su da je pokožica grožđa bogat izvor antocijana (izuzevši pri tome bijelo grožđe). Najveća koncentracija antocijana bila je ekstrahirana unutar perioda od 33 minute. Podaci dobiveni njihovim istraživanjem potvrđuju da je kontrola kvalitete nusprodukata pri proizvodnji vina preduvjet za kvalitetnu ekstrakciju bioaktivnih spojeva i prehrambenih bojila.

5.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet

Na slikama 12 i 13 prikazano je kako vrijeme ekstrakcije utječe na antioksidacijski kapacitet biološki aktivnih tvari u sjemenkama i pokožicama komine grožđa. Antioksidacijski kapacitet u pokožici grožđa se povećava porastom vremena trajanja ekstrakcije do određene točke, nakon čega počinje opadati, a u sjemenkama grožđa nema značajne razlike u periodu do 50. minute trajanja ekstrakcije, a nakon 50. minute zabilježeno je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta.

Najveća antioksidacijska aktivnost u pokožici grožđa zabilježena je u vremenu trajanja ekstrakcije 50 minuta (88,12 mg AAE/g), dok pri vremenu trajanja ekstrakcije 30 i 70 minuta nema značajnih razlika (77,93 mg AAE/g i 78,83 mg AAE/g). Povećanje antioksidacijskog kapaciteta u periodu od 30. do 50. minute je iznosilo 13,1 % dok je smanjenje koje je uslijedilo daljnjim povećanjem vremena ekstrakcije, u periodu od 50. do 70. minute, iznosilo 11,8 %. Pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta u sjemenkama komine grožđa zabilježen je nešto drugačiji trend. Naime, pri trajanju ekstrakcije 30 i 50 minuta razlika iznosi svega 0,06 %, dok

povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti koje je iznosilo 4,8 %. Najveći antioksidacijski kapacitet u sjemenkama komine grožđa je dakle zabilježen pri vremenu trajanja ekstrakcije 50 minuta (177,55 mg AAE/g), a najmanji tijekom ekstrakcije 70 minuta (169,38 mg AAE/g). Kod ekstrakcije u trajanju 30 minuta, zabilježen je antioksidacijski kapacitet od 177,45 mg AAE/g.

Usporedbom antioksidacijskog kapaciteta između sjemenki i pokožica komine grožđa, uočava se da aktivne tvari sjemenki grožđa (kompleksne fenolne komponente, npr. tanini) imaju znatno veći antioksidacijski kapacitet od onih koje su prisutne u pokožici grožđa (uglavnom antocijani i fenolne kiseline). Antioksidacijski kapacitet sjemenki pri istom vremenu ekstrakcije je u prosjeku za 114,6 % veći nego u pokožici.

Rockenbach i sur. (2011) su određivali antioksidacijsku aktivnost sjemenki i pokožica komine grožđa DPPH i FRAP metodom te utvrdili kako ekstrakti sjemenki imaju znatno veći antioksidacijski kapacitet nego ekstrakti pokožice. To se može objasniti činjenicom da su sjemenke bogatije fenolnim spojevima odnosno oligomernim i polimernim spojevima sa većim antioksidacijskim kapacitetom. Katalinić i sur. (2010) su također proučavali antioksidacijsku aktivnost ekstrakta sjemenki i pokožica (etanolni ekstrakti, trajanje ekstrakcije: 60 minuta) primjenom DPPH i FRAP metode te dobili znatno veće rezultate za antioksidacijski kapacitet crnih sorti grožđa nego za bijele te takve rezultate objasnili prisutnošću antocijana u crnim sortama.

6. ZAKLJUČAK

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

1. Udio ukupnih fenola u pokožici komine grožđa sorte Plavac mali povećava se sa porastom vremena trajanja ekstrakcije dok se udio ukupnih fenola u sjemenkama grožđa proporcionalno smanjuje.
2. Udio ukupnih fenola značajno je veći u sjemenkama nego u pokožici komine grožđa.
3. Učinkovitost ekstrakcije polimernih proantocijanidina iz sjemenki komine grožđa ovisi o vremenu ekstrakcije. Optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije uz upotrebu 80%-tnog metanola kao otapala je 50 minuta, a produljenje vremena ekstrakcije ima negativan utjecaj na izolaciju ovih spojeva.
4. Vrijeme nije imalo značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije monomernih antocijana iz pokožice komine grožđa uz upotrebu 80%-tne vodene otopine metanola sa 1%-tnom mravljom kiselinom kao otapala.
5. Najveći antioksidacijski kapacitet u ekstraktima sjemenki i pokožice grožđa postiže se pri trajanju ekstrakcije 50 minuta. Daljnje produljenje vremena ekstrakcije negativno utječe na antioksidacijsku aktivnost.
6. Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima sjemenki značajno je veći u odnosu na ekstrakte pokožice komine grožđa, što je u skladu sa udjelom fenolnih spojeva u ekstraktima.

7. LITERATURA

1. AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines.
2. Bacilieri, R., Lacombe, T., Cunff, L., Di Vecchi-Staraz, M., Laucou, V., Genna, B., Péros, J. P., This, P., Boursiquot, J. M. (2013) Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biology* **13**, 25.
3. Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol.* **59**, 205-212.
4. Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* **66**, 209±215
5. Brahim, M., Gambier, F., Brosse, N. (2013) Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products* **52**, 18-22.
6. Brahim, M., Gambier, F., Brosse, N. (2014) Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products* **52**, 18– 22.
7. Carrera, C., Ruiz-Rodriguez, A., Palma, M., Barroso, C. G. (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* **732**, 100-104.
8. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007) Optimization of ultrasound – assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high – performance liquid chromatography – mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 767 – 778.
9. Conde, E., Moure, A., Domínguez, H. and Parajó, J.C. (2010) Extraction of natural antioxidants from plant foods. *Separation, extraction and concentration processes*, 506-594.
10. de Sá, M., Justino, V., Spranger, M.I., Zhao, Y. Q., Hanc, L. iSuna, B.S. (2014) Extraction Yields and Anti-oxidant Activity of Proanthocyanidins from Different Parts of Grape Pomace: Effect of Mechanical Treatments. *Phytochem. Anal.* **25**, 134–140.
11. Dipalmo, T., Crupi, P., Pati, S., Clodoveo, M. L., Di Luccia, A. (2015) Studying the evolution of anthocyanin-derived pigments in a typical red wine of Southern Italy to assess its resistance to ageing. *LWT - Food Science and Technology* **71**, 1 – 9.
12. Fang, Y., Yang, S., Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-879.

13. Femenia, A., Waldron, K. (2007) High-value co-products from plant foods: Cosmetics and pharmaceuticals. U: Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing (Waldron, K., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, str. 470–501.
14. Fontana, A.R., Antonioli, A., Bottini, R. (2013) Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61** (38), 8987–9003.
15. Ghafoor, K., Choi, J. H. (2009) Optimization of ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape Peel through Response Surface Methodology. *J. Korean Soc. Appl. Boil. Chem.* **52**, 295 – 300.
16. Goncalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., Camara, J. S. (2013) An attractive, sensitive and high – throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC – PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal* **106**, 129 – 138.
17. Halliwell, B., (1990). How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications* **9**(1), 1-32.
18. 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.
19. Iora, S.R.F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., da Silva, M.V., Pontes, P.V. de A., Haminiuk, C.W.I., Granato, D. (2014) Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food. Sci. Technol.* **50**(1), 62–69.
20. Ivanova, V., Stefova, M. (2011) Phenolic bioactives in grapes and grape – base products. U: Fruit and cereal bioactives, London, str. 171- 185.
21. Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam/Boston.
22. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/ MS. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **52**, 4360–4367.
23. Katalinić, V., Smole Možina, S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M. (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis Vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food chemistry* **119**, 715 – 723.

24. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290.
25. 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.
26. Lelas, V. (2008) Procesi pripreme hrane, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, str. 16-18.
27. Liazid, A., Guerrero, R.F., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C. G. (2012) Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food chemistry* **124**, 1238-1243.
28. Mantel, C., Rodriguez, M., Martinez de la Ossa, E. (2002) Semi – batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. *Chemical Engineering Science* **57**, 3831- 3838.
29. Monrad, J.K., Suárez, M., Motilva, M.J., King, J.W., Srinivas, K., Howard, L.R. (2014) Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with modified expeller. *Food Res. Int.* **65**, 77-87.
30. Nascentes, C. C., Kornb, M., Arrudaa, M. A. Z. (2001) A fast ultrasound – assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* **69**, 37 – 43.
31. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. (2005). A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol, and grape extract cases. *Eur. Food Res. Technol.* **221**(3–4), 284–290.
32. Rajha, H.N., Darra, N.E., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R.G. (2013) An environment friendly, low-cost extraction process of phenolic compounds from grape byproducts. Optimization by multi-response surface methodology. *Food and Nutrition Sciences* **4**, 650-659.
33. Riedel, H., Saw, N.M.M.T., Akumo, D.N., Kütük, O., Smetanska, I. (2012) Wine as Food and Medicine. U: *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (Valdez, B., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, 399–418.
34. Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Schmidt Gonçalves, A.E. de 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. Int.* **44**, 897-901.

35. Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**(4), 828-834.
36. 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.
37. 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.
38. Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4267-4274.
39. Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(10), 4267-4274.
40. 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: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.
41. This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., Owens, C. L. (2007) Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 723-730.
42. Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2004) The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. *Talanta* **64**, 501-509.
43. Zoričić, M. (1996) Crna i ružičasta vina, 2. proš. izd. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 12-17.; 125-127.
44. Zwitter, AS, Zarqa, Jordan (2014) Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From phenolic compounds to proanthocyanidins. *Elsevier Inc.*