

# Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa

---

**Gavranić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:393356>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-06**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Marija Gavranić**

# **DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, rujan 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Marija Gavranić**

**MIKROVALNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA**  
**IZ KOŽICE GROŽĐA**

**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: *Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger*

Članovi povjerenstva: *Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger*

*Izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec*

*Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić*

Zagreb, rujan 2015.

*Diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju,  
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije,  
Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo, Agronomskog fakulteta,  
Sveučilišta u Zagrebu*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ukazanom povjerenju, ugodnoj suradnji, radu i slobodnom vremenu kojega mi je cijelo vrijeme poklanjala. U suradnji sa svojom mentoricom postala sam samostalna u radu, stekla nova znanja i iskustva na kojima ću joj zauvijek biti zahvalna.*

*Veliko hvala red. prof. dr. sc. Jasminki Karoglan Kontić i Ivani Tomaz, dipl. ing. chem. s Agronomskog fakulteta na uzorcima kože grožđa, obradi statističkih podataka i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pruženoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje, te cijelo vrijeme vjerovali u mene i podržavali me u mojim odlukama.*

*Veliko hvala i svim mojim prijateljima koji su tijekom studiranja bili uz mene.*

## SAŽETAK

### Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti sadržani u biljkama. Obuhvaćaju veliki broj spojeva koji imaju aromatske prstenove s jednom ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli imaju učinak na ljudsko zdravlje: antibakterijsko, protuupalno, antioksidativno i antikancerogeno. Biološke funkcije polifenola pripisuju se njihovoj izvanrednoj antioksidacijskoj i antiradikalskoj aktivnosti. Bobica grožđa predstavlja osnovno mjesto gdje se odvija biosinteza sekundarnih metabolita koji su od velike važnosti za kakvoću vina. Kod grožđa, izuzevši fenolne spojeve sjemenke, najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u kožici bobice. Predmet našeg istraživanja su bili polifenoli: antocijani, flavonoli i flavan-3-oli u kožici grožđa sorte Regent. Polifenoli iz kože grožđa ekstrahirani su ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Dobiveni ekstrakti analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom fotodioda (DAD), fluorescencijskim detektorom (FLD). Za analizu je korištena kolona Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex, USA). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina zrnaca je 5  $\mu$ m, sa predkolonom Phenyl (4.0\*3.0). Pokretna faza se sastojala od: A voda/fosforna kiselina (99,5/0,5/v/v) i B acetonitril/voda/fosforna kiselina (50/49,5/0,5/v/v/v). Cilj ovog istraživanja bio je iz kože grožđa sorte Regent ekstrahirati polifenolne spojeve i optimizirati metodu ekstrakcije. Provedene analize pokazale su da mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija je vrlo učinkoviti način ekstrakcije antocijana s 50 % etanola pri  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  za  $t = 10$  minuta; flavonola s 60 % acetonitrila pri  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  za  $t = 30$  minuta; te flavan-3-ola s 20 % acetonitrila pri  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  za  $t = 5$  minuta. Za postupak optimizacije svih skupina spojeva ekstrakcija se provodi s 60 % EtOH, pri  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  za  $t = 5$  minuta. RSD vrijednosti novooptimizirane metode su vrlo niske ( $< 2\%$  za antocijane i flavonole, te oko  $9\%$  za flavan-3-ole), te se može zaključiti da je metoda precizna i točna. Ovo znanstveno istraživanje može se koristiti za bolju iskoristivost grožđa kao sirovine za dobivanje flavonoida u komercijalne svrhe.

**Ključne riječi:** grožđe, polifenoli, mikrovalna ekstrakcija,  
tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

## ABSTRACT

### Microwave extraction of polyphenols in grape skin

Polyphenol compounds are secondary metabolites contained in plants. Comprise a large number of compounds having aromatic rings with one or more hydroxyl groups. Polyphenols have an effect on human health: antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer. The biological function of polyphenols attributed to their excellent antioxidant and antiradical activities. Grapes, the main place where takes place the biosynthesis of secondary metabolites that are of great importance for the quality of wine. In grapes, except phenolic compounds seeds, the largest share of phenolic compounds is in the skin of the berries. The subjects of our research were polyphenols: anthocyanins, flavonols, and flavan-3-ol in the skin of grapes Regent. Polyphenols from grape skins, we extracted microwave-assisted extraction. The obtained extracts were analysed by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector (DAD) and fluorescence detector (FLD). For chromatographic separation was used column Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex, USA). Column dimensions were 250 mm x 4.6 mm and the grain size is 5 microns, with a Phenyl precolumn (4.0 \* 3.0). The mobile phase consisted of: A water / phosphoric acid (99,5 / 0,5 / v / v) and B is acetonitrile / water / phosphoric acid (50 / 49,5 / 0,5 / v / v / v). The aim of this study was extract polyphenolic compounds from the skins of grapes varieties Regent and optimize the microwave extraction method. Analyses show that microwave assisted extraction is a very effective methods of extracting anthocyanins from 50 % ethanol at  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $t = 10$  minutes; flavonols with 60 % acetonitrile at  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $t = 30$  min; flavan-3-ol with 20 % acetonitrile at  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $t = 5$  minutes. In the process of optimization of the extraction of compounds is performed with 60 % EtOH at  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $t = 5$  minutes. RSD values newoptimized methods are very low ( $< 2\%$  of flavonols and anthocyanins, and about 9 % of flavan-3-ole), which indicates that the method is accurate and precise. This scientific research can be used for better use grapes as a basis for obtaining the flavonoids for commercial purposes.

**Keywords:** grapes, polyphenols, microwave extraction,  
high performance liquid chromatography

# SADRŽAJ

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD</b>                                                        | <b>1</b>  |
| <b>2. OPĆI DIO</b>                                                    | <b>3</b>  |
| 2.1. Vinova loza                                                      | 4         |
| 2.2. Plod vinove loze                                                 | 4         |
| 2.2.1. Podrijetlo i uzgojne značajke vina sorte Regent                | 4         |
| 2.2.2. Anatomska građa bobice grožđa                                  | 5         |
| 2.2.3. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa                      | 6         |
| 2.2.4. Kemijski sastav bobice grožđa                                  | 7         |
| 2.3. Polifenolni spojevi                                              | 8         |
| 2.3.1. Antocijani                                                     | 9         |
| 2.3.2. Flavanoli i flavonoli                                          | 11        |
| 2.3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva                               | 13        |
| 2.4. Priprava čvrstog uzorka za kromatografsku analizu                | 14        |
| 2.4.1. Klasične metode ekstrakcije                                    | 16        |
| 2.4.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće                                    | 16        |
| 2.4.2. Moderne metode ekstrakcije                                     | 17        |
| 2.4.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija                           | 18        |
| 2.4.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom                           | 18        |
| 2.4.2.3. Mikrovalna ekstrakcija                                       | 19        |
| 2.4.2.3.1. Pregled primjene mikrovalne ekstrakcije u znanstvene svrhe | 23        |
| 2.5. Analiza polifenola tekućinskom kromatografijom                   | 24        |
| 2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti                | 24        |
| 2.5.1.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti | 25        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>                                         | <b>28</b> |
| 3.1. Materijali                                                       | 29        |
| 3.1.1. Osušeni uzorci kože grožđa                                     | 29        |
| 3.1.2. Kemikalije                                                     | 29        |
| 3.2. Instrumenti, uređaji i pribor                                    | 30        |
| 3.2.1. Analitička vaga                                                | 30        |
| 3.2.2. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju                               | 31        |
| 3.2.3. Centrifuga                                                     | 31        |
| 3.2.4. Uparivač (rotavapor)                                           | 32        |
| 3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti                   | 32        |
| 3.3. Metode rada                                                      | 33        |
| 3.3.1. Priprava otopina za mikrovalnu ekstrakciju                     | 33        |
| 3.3.2. Priprava uzorka za mikrovalnu ekstrakciju                      | 33        |
| 3.3.3. Mikrovalna ekstrakcija                                         | 34        |
| 3.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti                | 34        |
| 3.3.5. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza                   | 36        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>                                        | <b>37</b> |
| 4.1. Preliminarna ispitivanja za mikrovalnu ekstrakciju               | 38        |
| 4.2. Optimizacija uvjeta mikrovalne ekstrakcije                       | 43        |
| 4.3. Potvrda modela                                                   | 58        |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b>                                                   | <b>61</b> |
| <b>6. DODATAK</b>                                                     | <b>63</b> |
| 6.1. Popis slika                                                      | 64        |
| 6.2. Popis tablica                                                    | 66        |
| 6.3. Popis kratica                                                    | 67        |
| <b>7. LITERATURA</b>                                                  | <b>68</b> |
| <b>8. ŽIVOTOPIS</b>                                                   | <b>72</b> |



## ***1. UVOD***

Vinova loza se nalazi među vrstama voća koje je čovjek uzgajao od davne povijesti i danas je jedan od najraširenijih poljoprivrednih kultura u svijetu. Smatra se da je domovina vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Maloj Aziji između Crnog mora i Kaspijskog jezera. Danas je u svijetu vinovom lozom zasađeno oko 8,2 milijuna hektara, što daje oko 60 milijuna tona grožđa godišnje. Od toga se 68 % koristi za proizvodnju vina, 20 % se konzumira kao stolno grožđe, 11 % se prerađuje u groždice, a 1 % u sok [1].

Specifični polifenolni sastav biljnih materijala predmet je brojnih studija pa tako i u tehnologiji i analitici vina gdje su polifenoli (antocijani, flavonoli i flavan-3-oli) od iznimnog značaja. Antocijani su važni jer su upravo oni zaslužni za crnu boju vina te postoji mogućnost korištenja profila antocijana kao kemotaksonomskog kriterija za utvrđivanje razlika između vrsta grožđa što bi omogućilo kontrolu patvorenja vina [2]. Tanini također pridonose organoleptičkim svojstvima vina, a najveći utjecaj imaju na trpkocú i gorčinu vina. Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje takve metode zahtijevaju. Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije od kojih je jedna i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

Zbog kompleksnosti strukture polifenolnih spojeva i zahtijevnih analitičkih metoda objavljen je veliki broj radova koji se bave ekstrakcijom polifenolnih spojeva iz kože grožđa klasičnim načinima ekstrakcije. Istraživanja vezana uz ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala primjenom mikrovalnog zračenja tek su u začetku, tako da postoji tek mali broj objavljenih radova vezanih uz tu tematiku, gdje su uglavnom određivani standardi polifenolnih spojeva, a nije se radila njihova ekstrakcija iz biljnog materijala. Određivani su standardi polifenolnih spojeva jednostavnije strukture (galna kiselina, elaginska kiselina), dok su kompleksne i polimerne flavonoidne strukture ( $C_6C_3C_6$ ) kao što su antocijani i flavonoli potpuno neistraženi.

U ovom radu istraživala se mogućnost mikrovalne ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kože grožđa sorte Regent različitim udjelima organskih otapala pri optimizaciji udjela organske faze, temperature i vremena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom dioda (DAD) i fluorescencijskog detektora (FLD).

## ***2. OPĆI DIO***

## 2.1. Vinova loza

Vinova loza (*lat. Vitis vinifera* L.) je višegodišnja biljka penjačica iz porodice *Vitaceae* koja potječe s područja Bliskog Istoka odakle se proširila po čitavom svijetu. Listovi su različitih oblika i različite nijanse zelene boje što ovisi o sorti vinove loze. Vinova loza cvate od lipnja do srpnja, a cvatnja traje samo 4 do 5 dana. Plod vinove loze (grožđe) je u obliku grozda, a vrijeme dozrijevanja ploda ovisi o sorti i podneblju gdje raste stoga u našem podneblju grožđe dozrijeva od srpnja do listopada. Vinova loza jedna je od najzastupljenijih poljoprivrednih kultura na svijetu, a procjenjuje se da godišnja proizvodnja grožđa iznosi oko 65 milijuna tona (FAO,1998). Oko 80 % godišnjeg usjeva se koristi za proizvodnju vina, a ostatak se koristi za konzumaciju. Razlikujemo dvije velike skupine grožđa, europska i sjeverno-američka vrsta. Europsko grožđe pripada vrsti *Vitis vinifera* L. i čini oko 95 % proizvedenog grožđa dok sjeverno-američko grožđe pripada vrstama *Vitis labrusca* i *Vitis rotundifolia*. Europski tip grožđa karakterizira relativno debela kožica koja pranja uz čvrstu i slatku pulpu [3].

## 2.2. Plod vinove loze

Većina grožđa vrste *Vitis vinifera* najbolje uspijeva u području s mediteranskom klimom gdje su duga i relativno suha ljeta te blage zime [4]. U diplomskom radu za istraživanje korištena je crna sorta Regent.

Zbog dobrih uzgojnih svojstava i velike kakvoće vina, sorta Regent jedna je od rijetkih međuvrsnih križanaca koja se sve više širi u proizvodnji. U Njemačkoj se danas uzgaja na oko 2200 ha (oko 2 % ukupni površina), a sadi se i u Velikoj Britaniji i hladnijim područjima SAD-a. Vina Regenta za sada se ne proizvode u Hrvatskoj. Sorta nije preporučena za naša vinogradarska područja i tek je u fazi ispitivanja, no sudeći prema prvim iskustvima iz pokusnih nasada u Zelini i Zagrebu, sorta ima potencijal za širenje i u našim kontinentalnim vinogradima. Za uzgoj Regenta sve više zanimanja pokazuju proizvođači u sustavu ekološke proizvodnje [5].

### 2.2.1. Podrijetlo i uzgojne značajke sorte Regent

Roditelji Regenta su dvije manje poznate sorte Diana i Chamburcine. Sorta Diana nastala je križanjem sorata Silvanac i Müller-Thurgau (nekima poznatiji kao Rizvanac) koje su među najvažnijim bijelim sortama u Njemačkoj. Sorta Chambourcin nastala je u Francuskoj početkom 20. st. međuvrsnim križanjem. U njezinom pedigreu uz europsku ima i dio američke „krvi“ te se zbog toga odlikuje i visokom otpornošću prema plamenjači i pepelnici. Tek 1994. godine, nakon dugotrajne selekcije i evaluacije, Regent (dotada poznat kao

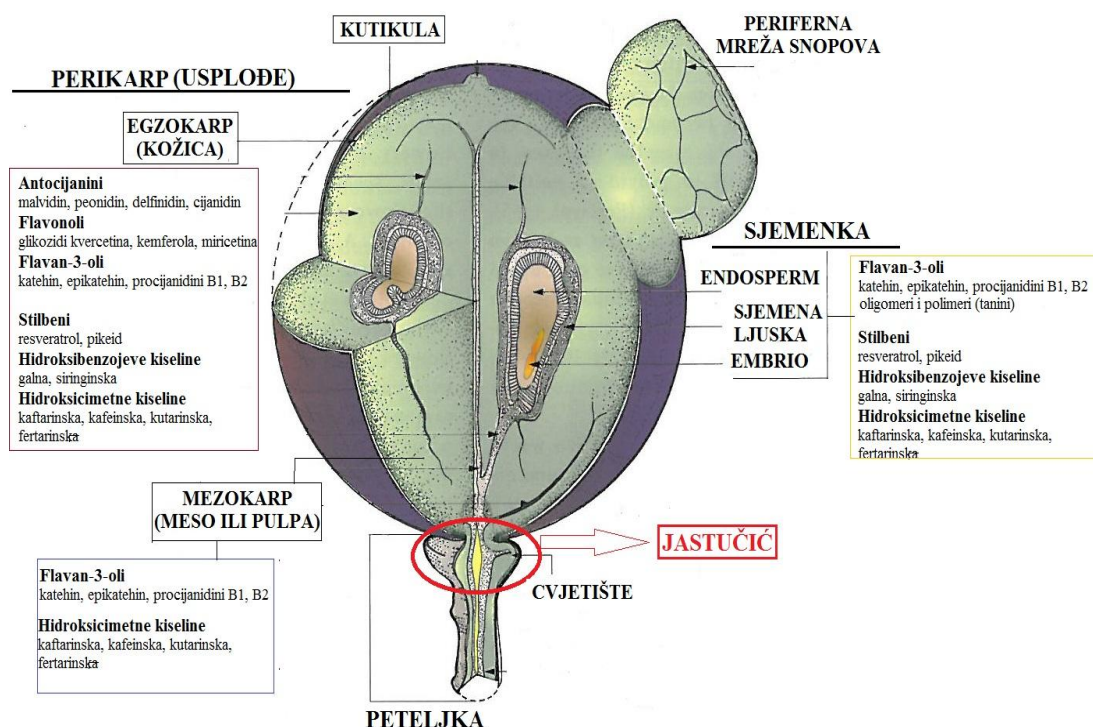
sjemenjak Gf. 67-198-3) priznat je kao nova sorta, a 1996. godine postaje preporučena sorta te je od nje danas dopušteno proizvoditi kvalitetna vina u svim vinogradarskim područjima Njemačke. Regent dobro podnosi niske zimske temperature pa je sve više interesa za njegovo širenje u hladnija vinogradarska područja. Kiselost mu je umjerena, a vrlo dobrom obojenošću nadmašuje sve ostale crne sorte koje se mogu uzgajati u istom području. Od Regenta se mogu dobiti alkoholična vina, intenzivne boje, dobrog tijela i umjerene kiselosti s prepoznatljivim aromama trešnje i crnog ribiza. Iako su već kao mlada meka i pitka, vina Regenta s dobrih položaja i u boljim godinama mogu dozrijevati u „barrique bačvicama“. Po svojim obilježjima ta vina često podsjećaju na vina južnijih vinogradarskih područja [5].

### 2.2.2. Anatomski građa bobice grožđa

Tijekom razvoja bobice grožđa dolazi do transformacije plodnice u perikarp. Na Slici 1 je prikazana pojednostavljena građa bobice grožđa. Perikarp se sastoji od egzokarpa koji čini vanjski dio bobice grožđa (kožica), mezokarpa (središnji dio) i endokarpa (unutarnji dio). Mezokarp i endokarp čine pulpu, a unutar pulpe se nalaze sjemenke.

Tkivo perikarpa tvori više od 65 % volumena bobice. Kožica bobice grožđa (egzokarp) se sastoji od dvije anatomske različite regije. Vanjski dio kože čini epiderma, a unutarnji dio čini hipoderma. Epiderma sadrži jedan sloj spljoštenih stanica u obliku diska sa nepravilno valovitim krajevima. To su ujedno i stanice u kojima se ne odvija fotosinteza već se u njihovim vakuolama nalaze kapljice ulja. Ovisno o vrsti, mogu razviti zadebljanu ili lignificiranu stjenku. Na epidermi se nalazi nekolicina puči koje s vremenom tj. zrenjem gube funkciju, postaju plutaste i u njima se akumuliraju polifenoli. Iznad epiderme se nalazi kutikula sa debelim slojem voska. Na njoj se nalaze mikrofisure i mikropore preko kojih se odvija transpiracija. Hipoderma se sastoji od više slojeva usko nabijenih mezofilnih stanica, a njihov broj ovisi o vrsti grožđa. Stanice su spljoštene i imaju zadebljane kutove stjenke. U ranom stadiju razvoja, stanice imaju fotosintetsku ulogu, a nakon šare plastidi gube klorofil i škrob i počimnju akumulirati kapljice ulja. Takvi modificirani plastidi postaju mjesto sinteze i skladištenja terpena i norizoprenoida. Većina stanica hipoderme također akumulira flavonoide dok su antocijani, prisutni u vrstama crnog grožđa, akumulirani u njenim krajnjim slojevima. Kod mezokarpa bobice razlikujemo vanjski dio koji se nalazi između hipoderme i perifernih vaskularnih vlakana i unutarnji dio koji je ograničen perifernim i aksilarnim vaskularnim nitima. Većina stanica mezokarpa je okruglog, jajastog oblika i sadrže velike vakuole koje mogu pohraniti fenole, dok iste rijetko sudjeluju u fotosintezi. Sloj stanica koji predstavlja granicu između mesnatog dijela bobice i sjemene lože se često naziva unutarnja epiderma.

Septum je središnji dio gdje se spajaju dva oplodna listića tučka. Razvoj sjemenki je povezan sa sintezom regulatora rasta koji su neophodni za razvoj voća, a broj sjemenki djelomično ovisi o veličini voća. Glavni dio sjemenke čini endosperm koji služi kao izvor hrane embriju jer sadrži ulje, škrob, bjelančevine te mineralne tvari. Endosperm je okružen parom integumenata od kojih se samo jedan značajnije razvija. Embrij zauzima najmanji dio volumena sjemenke. Građen od dva klicina listića (kotiledona), epikotila (gornji dio izdanka) i sjemenskog korjenčića na vrhu hipokotila (donji dio izdanka) [3].

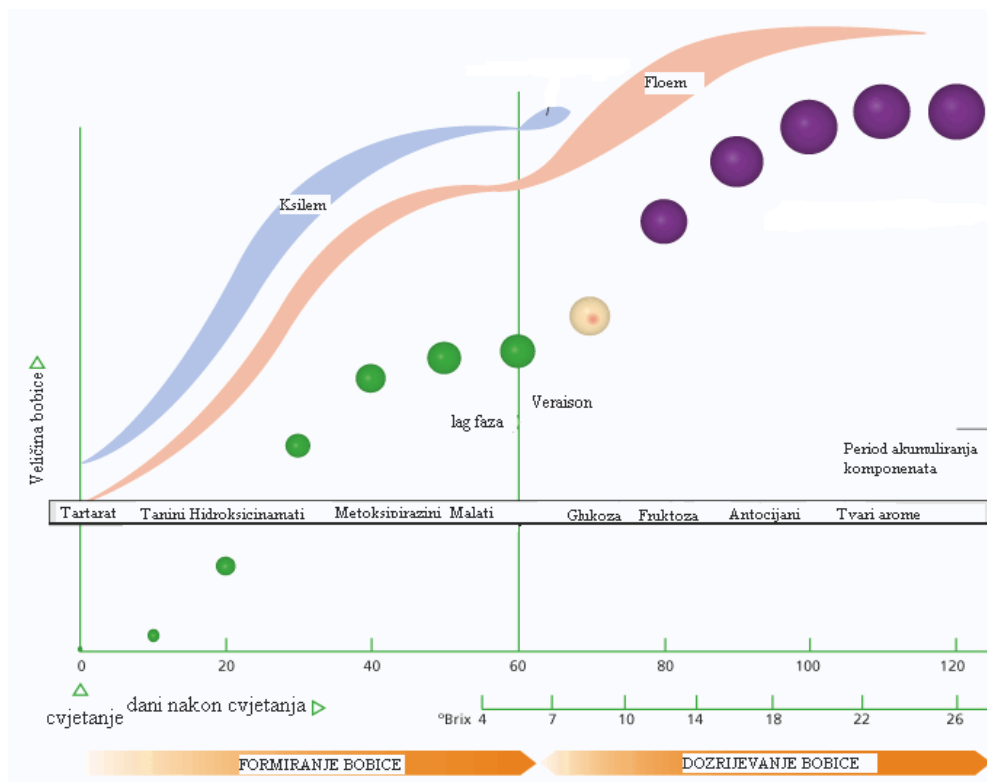


Slika 1. Građa bobice grožđa [1]

### 2.2.3. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa

Razvoj bobice sastoji se od dvije faze rasta (Slika 2). Prva faza razvoja bobice traje otprilike 60 dana nakon cvatnje. Tijekom tog perioda formira se bobica i stvaraju se zametci sjemenki. Prvih nekoliko tjedana dolazi do brzog dijeljenja stanica i na kraju tog perioda unutar bobice uspostavlja se konačan broj stanica. Tijekom prve faze razvoja bobice dolazi do akumulacije spojeva kao što su minerali [6], aminokiseline [7], mikronutrijenti i spojevi arome (metoksipirazini) [8]. Bobica se opskrbljuje hranjivim tvarima preko vaskularnog sistema koji se sastoji od ksilema i floema. Drugu fazu razvoja bobice ili šaru karakterizira pojava boje i

omekšavanje bobice grožđa. Bobica grožđa predstavlja osnovno mjesto gdje se odvija biosinteza sekundarnih metabolita koji su od velike važnosti za kakvoću vina [9].



Slika 2. Formiranje bobice i dozrijevanje grožđa [2]

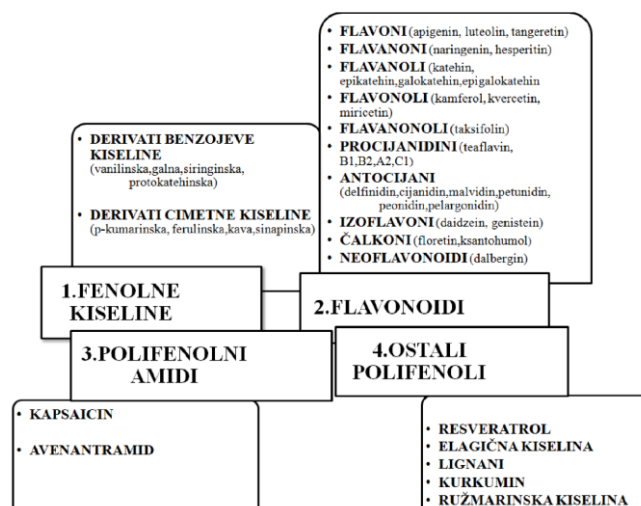
#### 2.2.4. Kemijski sastav bobice grožđa

Na kemijski sastav grožđa utječu brojni čimbenici, a neki od njih su zrelost, vrsta, područje u kojem raste te godina berbe [10]. Šećeri su kvantitativno najznačajniji organski sastojci u voću. Tijekom ranog razvoja bobice grožđa dio ugljikohidrata sudjeluje u fotosintezi pri čemu se dobiva energija koja je potrebna za daljnji razvoj bobice. Tijekom zrenja dolazi do akumulacije šećera i to najviše u vakuolama stanica pulpe. Tijekom zrenja još dolazi i do redukcije kiselosti. Vinska i jabučna kiselina čine 70-90 % ukupnih kiselina bobice. U grožđu nalazimo neke organske kiseline (npr. limunska), fenolne kiseline, aminokiseline i masne kiseline. Od prisutnih mineralnih tvari u bobici grožđa najznačajniji je kalij. Kalij utječe na sintezu i ionizaciju kiselina tijekom zrenja. Čimbenici koji utječu na akumulaciju kalija u bobici nisu dobro poznati. Njegova količina se povećava nakon dozrijevanja, pogotovo u kožici. Kožica zauzima 10 % mase bobice, a sadrži 30-40 % ukupnog sadržaja kalija koji se ponaša kao regulator osmotskog potencijala stanice. Pektinske tvari se nalaze u staničnoj

stijenci i daju čvrstoću stanicama. Tijekom zrenja dolazi do razgradnje pektina uslijed djelovanja enzima ili uslijed smanjenja koncentracije kalcija u staničnoj stijenci, a posljedica toga je mekšanje bobica. Mekšanje dovodi do lakšeg izdvajanja soka iz pulpe te fenolnih spojeva i tvari arome iz kože. Lipidi su prisutni u grožđu kao masne kiseline, kutin, fosfolipidi i glikolipidi membrane, kutikularni i epikutikularni vosak te kao ulja u sjemenkama. Tijekom zrenja u grožđu raste koncentracija u vodi topljivih proteina, a najčešće je to glutation. Od slobodnih aminokiselina prvenstveno su prisutne prolin i arginin [3].

### 2.3. Polifenolni spojevi

Polifenoli su važni organski spojevi koji su prisutni u različitim biljnim vrstama. Važnost polifenolnih spojeva je bila uglavnom vezana uz organoleptička svojstva (boja, trpkost, gorčina, okus), a posljednjih desetljeća je prepoznata njihova nutritivna vrijednost jer istraživanja pokazuju da imaju pozitivne učinke na zdravlje. Njihov blagotvoran učinak na organizam proizlazi iz sposobnosti vezanja slobodnih radikala (antioksidansi), kelatnog djelovanja (vezanje dvovalentnih kationa) te inaktivacije određenih enzima zbog čega im se pripisuju antikancerogena, antiteratogena, protuupalna, antimikrobna, antialergijska i mnoga druga svojstva [11]. To je mnogobrojna skupina spojeva koja uključuje velik broj podgrupa spojeva, ali svima je zajedničko svojstvo da su topljivi u vodi i staničnom soku. One se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima. Na Slici 3 prikazane su skupine unutar polifenola i njihovi glavni predstavnici.



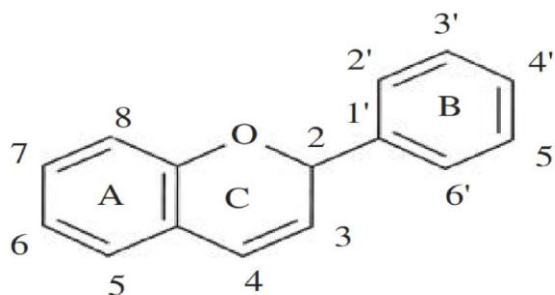
**Slika 3.** Podjela polifenola [3]

Kod grožđa, izuzevši fenolne spojeve sjemenke, najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u koži bobice [3]. Polifenolni spojevi su vrlo važni u tehnologiji crnih vina jer utječu na boju



vina i daju karakterističan okus. Pigmentacija crnih sorti je ograničena na epidermu i vanjske slojeve hipoderme kože [12], a potječe od antocijana [3]. Bijelo grožđe sadrži manje ukupnih fenola od crnog grožđa i ne sadrži antocijane. Boja bijelog grožđa potječe od karotenoida, ksantofila i flavonola kao što je npr. kvercetin. Karotenoidi se akumuliraju u plastidima, a flavonoidi u vakuolama [3].

Predmet našeg istraživanja u ovom diplomskom radu su bili polifenoli: antocijani, flavonoli i flavan-3-oli koji pripadaju skupini flavonoida. Flavonoide karakterizira  $C_6-C_3-C_6$  struktura kao što je prikazano na Slici 4. Sastoje se od dva fenolna prstena (A i B) koji su povezani preko centralnog piranskog prstena (C). Flavonoidi mogu postojati kao slobodni ili kao polimeri vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili njihovom kombinacijom. Njihova primarna funkcija u biljkama je prva linija obrane protiv patogenih mikroorganizama, štetnih insekata i biljojeda [3].



**Slika 4.** Osnovna kemijska struktura flavonoida [4]

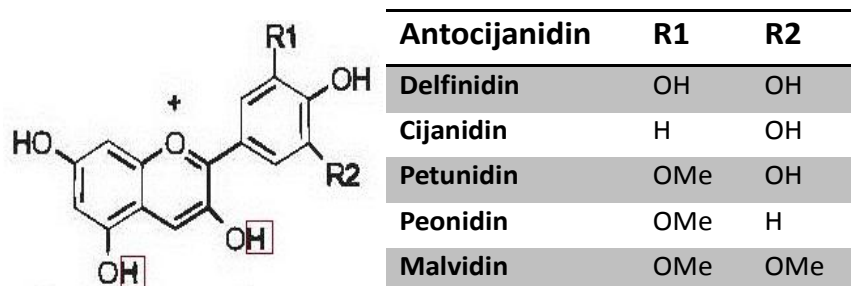
### 2.3.1. Antocijani

Antocijani su najveća i najvažnija grupa pigmenata topljivih u vodi u prirodi [13], s preko šest stotina različitih spojeva. Riječ antocijan svoje podrijetlo ima u dvjema grčkim riječima, *anthos* što znači cvijet i *kyanos* što znači tamno plavo. Oni su glavni sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većini cvjetnih latica, voća i povrća te određenih žitarica [14]. Temeljnu strukturu antocijana čini 2-benzil-1-benzopirilijev kation (flavilijev ion) čiji su položaji 3,5,7,4' hidroksilirani. Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikozilaciji sa različitim šećerima [15].

Antocijani se u biljkama, pa tako i u sortama *Vitis vinifera*, uglavnom nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer [14]. U strukturi antocijana jedan ili više položaja mogu biti zamijenjeni molekulom monosaharida (glukozom, galaktozom, ramnozom, ksilozom ili arabinozom), disaharida ili trisaharida [13]. U antocijanima najčešće

nalazimo glukozu koja se može vezati na C-3 i/ili C-5 položaj molekule antocijanidina i na taj način se povećava kemijska stabilnost i topljivost antocijana. Osim toga, glukozni dio u molekuli antocijana može biti esterificiran kiselinama (*p*-kumarinskom, kafeinskom kiselinom ili alifatskom octenom kiselinom) obično na C-6 položaju [3], što utječe na svojstva antocijana poput otpornosti na toplinu, svjetlo, SO<sub>2</sub>, visoki pH, poboljšanje kakvoće i stabilnosti boje [13].

U grožđu su antocijani u većini slučajeva prisutni u kožici. Iznimke su bojadiseri tj. sorte grožđa koje sadrže antocijane i u pulpi. Najčešće identificirani antocijani u kožici grožđa i vinu iz vrste *Vitis vinifera* su 3-*O*-monoglukozidi i 3-*O*-acilirani monoglukozidi sastavljeni od 5 najčešćih antocijanidina, a to su delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin (Slika 5). Raspodjela i sadržaj antocijana u grožđu ovisi o vrsti, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima, području proizvodnje te prinosu. U grožđu je malvidin-3-*O*-glukozid najzastupljeniji antocijan.



Slika 5. Kemijska struktura antocijana [1]

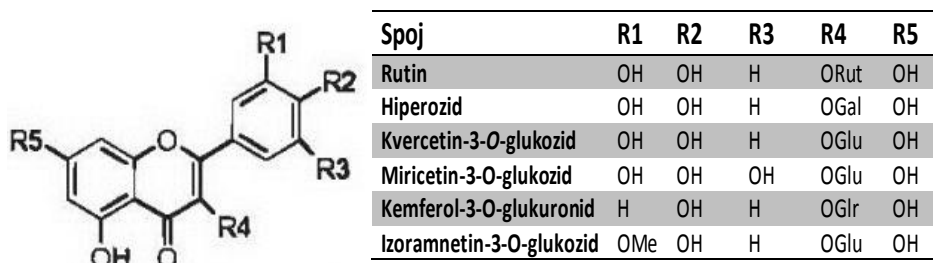
Antocijani su vrlo osjetljivi spojevi i na njihovu stabilnost utječu brojni čimbenici poput pH, temperature, svjetla, prisutnosti drugih fenolnih spojeva, enzima, iona metala, šećera, askorbinske kiseline, kisika i sumporova dioksida.

Antocijani su od iznimne važnosti u kemiji i tehnologiji vina iz više razloga. Jedan od njih je mogućnost korištenja profila antocijana vina kao kemotaksonomskog kriterija kako bi se ustanovile razlike između vrsta grožđa, lokalizacija vinograda i prinos, godište, tehnika proizvodnje vina. Vrste grožđa se mogu karakterizirati na više načina. Jedan se temelji na povezanosti između ukupne i individualne koncentracije antocijana, a drugi se temelji na acetil ili cinamoil transferaznoj aktivnosti u grožđu. Acetil ili cinamolil transferazna aktivnost se određuje s obzirom na prisutnost, odnosno odsutnost, antocijana aciliranih octenom ili *p*-kumarinskom kiselinom [2]. Drugi razlog je utjecaj na boju vina. Dakle, antocijani su uz enološku praksu odgovorni za boju vina. Enološka praksa podrazumijeva tehnologiju proizvodnje vina, temperaturu skladištenja, vrijeme skladištenja i izloženost kisiku.

Antocijani grožđa najstabilniji su u kiselom mediju i pri sobnoj temperaturi, tada se nalaze u crvenoj kationskoj flavilijevoj formi [16], koja je odgovorna za boju grožđa i mladih vina. Pri pH vina, koji prema Mazzi (1995) iznosi između 3,2 i 3,9, antocijani grožđa dolaze većinom kao bezbojni, karbinol oblik. Dodatak bisulfita uzrokuje reakcije sulfitnih iona s antocijanskim flavilijevim ionom dajući bezbojne oblike. Ovaj je kemizam poznat kao efekt posvjetljivanja [17]. Razlog smanjenja koncentracije antocijana tijekom čuvanja i starenja vina je njihova reaktivnost s drugim fenolnim sastojcima (najčešće flavanolima) jer na taj način postaju stabilniji, a to rezultira promjenom boje vina (plavkasto-crvena boja mladih vina postaje smečkasto-crvena boja kod zrelih vina). Postoji nekoliko načina konverzije antocijana u nove, stabilnije spojeve. Prvi tip konverzije je direktna reakcija sa flavanolima, drugi tip je reakcija sa flavanolima uz posredovanje acetaldehida, a treći tip je cikloadicija antocijana sa nekim metabolitima kvasaca koji sadrže polarnu dvostruku vezu [18]. U mladim vinima koncentracija antocijana je između 100 i 1500 mg/L, a starenjem vina njihova koncentracija drastično opada čak do 50 mg/L. Antocijani utječu na kemijska i organoleptička svojstva vina jer osim interakcija sa fenolnim spojevima, reagiraju i s proteinima i ugljikohidratima [19].

### 2.3.2. Flavanoli i flavonoli

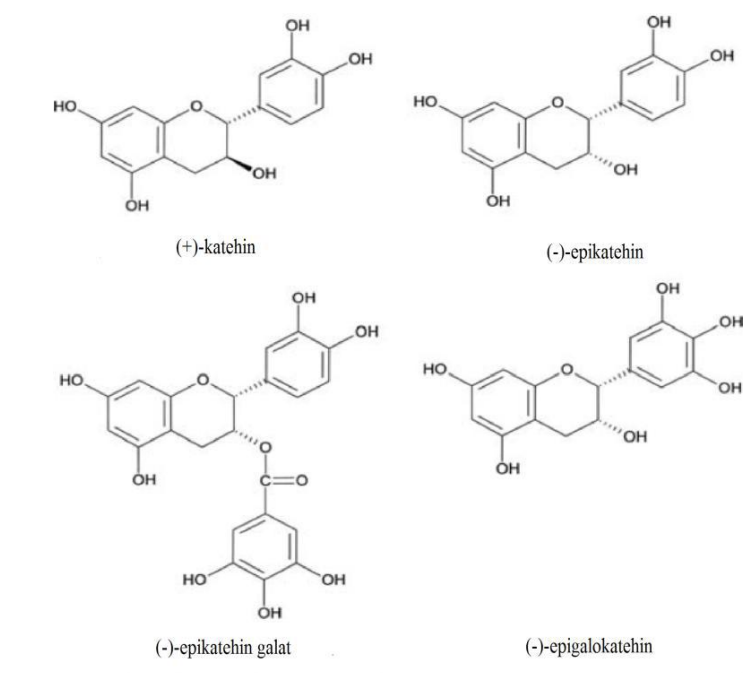
U gotovo svakoj biljci pronađeni su flavonoli i u manjoj mjeri flavoni. Najpoznatiji flavoni su apigenin i luteolin. Najvažniji izvori flavona su masline, peršin i celer [20]. Najrašireniji flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin, prikazani su na Slici 6. Važni izvori flavonola su luk, kelj, jabuke i crno vino [20]. Flavanoni i flavoni često se nalaze zajedno, npr. u agrumima i povezani su sa specifičnim enzimima za razliku od flavona i 4 flavonola koji se međusobno isključuju u mnogim biljkama.



Slika 6. Kemijska struktura flavonola [1]

Proantocijanidini ili tanini nastaju polimerizacijom flavanola (katehina). Mogu se klasificirati na više načina, s obzirom na flavonoidne monomere, vezanje, esterifikaciju drugih komponenata ili funkcionalna svojstva. Najčešći strukturni oblik tanina sadrži samo jednovalentne ugljikove veze između flavonoidnih podjedinica. Na Slici 7 su prikazani tipični flavan-3-oli u grožđu, a to su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehingalat i najrjeđi (-)-epigalokatehin [3]. Većina flavanola i polimernih tanina se sintetizira u sjemenkama i stabljici, a samo 15-20 % se sintetizira u kožici [21, 22].

Proantocijanidini karakteristični za grožđe i vino su procijanidini B tipa u kojima dolazi do povezivanja C-4 položaja piranskog prstena gornjeg flavonoida s C-8 položajem na A prstenu donjeg flavonoida. Procijanidini B1, B2, B3 i B4 se razlikuju samo u poretku početnih i završnih katehinskih i epikatehinskih jedinica. Povezivanje flavonoida između C-4 i C-6 položaja omogućava grananje inače linearnog procijanidinskog polimera. Procijanidini A nastaju povezivanjem C-4 i C-8 položaja ili povezivanjem C-2 položaja s hidroksilnom grupom na C-7 položaju, ali takvi procijanidini su rijetki [3].



**Slika 7.** Kemijska struktura najčešćih flavan-3-ola u taninima grožđa [3]

### 2.3.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili suhih uzoraka biološkog materijala. Često se prije same ekstrakcije biljni materijal usitnjava i homogenizira čemu mogu prethoditi operacije sušenja. Sušenje se može provoditi na zraku ili se provodi pri niskim temperaturama (liofilizacija) [23].

Ekstrakcija polifenolnih spojeva najčešće se provodi klasičnim metodama ekstrakcije, koja uključuju razna organska otapala, te se upravo ekstrakcija otapalima smatra najraširenijom metodom pripreme uzorka za kromatografsku analizu [24]. Sve metode ekstrakcije otapalima baziraju se na miješanju uzorka prikladnim otapalom i/ili prevođenje uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobnoslabo topljiva. Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala obzirom na polarnost, vrijeme ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka [23]. Metode ekstrakcije koje se koriste za ekstrakciju raznih polifenolnih spojeva međusobno se razlikuju obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva sa različitom strukturom i svojstvima. Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju [25]. Najčešće korištena otapala su metanol, aceton, acetonitril, etanol, etil acetat te njihove kombinacije koje se u različitim omjerima miješaju s vodom, a upravo pravilan odabir otapala utječe na iskorištenje ekstrakcije polifenola. Klasične metode ekstrakcije kao što su maceracija i Soxhletova ekstrakcija pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*eng.* microwave-assisted extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* ultrasonic-assisted extraction, UAE) te metode ekstrakcije potpomognute visokim tlakom (*eng.* pressurized liquid extraction, PLE). U ovom radu korištena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa.

Mikrovalna ekstrakcija ili MAE je proces u kojem je korištena energija mikrovalova za poboljšanje difuzije analita iz uzorka u otapalo. A najveća prednost metode je smanjenje trajanja ekstrakcije te manje količine korištenih otapala. Neki polifenolni spojevi, kao što su tanini i antocijani, ipak nisu pogodni za MAE zbog moguće degradacije pri uvjetima ekstrakcije potpomognute mikrovalovima [26].

Mehanizam UAE temelji se na energiji koja se oslobađa implozijom kavitacijskih mjehurića pod utjecajem zvučnih valova niske frekvencije i visoke snage pri čemu dolazi do razaranja stanične membrane i povećanja brzine difuzije polifenolnih spojeva iz uzorka u otapalo [27].

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom je novija metoda ekstrakcije polifenola koja se odvija u uvjetima visokog tlaka i temperature, a moguće je korištenje otapala (npr. voda) koja su pri atmosferskim uvjetima neefikasna. Ju i Howard su u svojem istraživanju pokazali da je PLE u ekstrakciji antocijana iz kože grožđa, korištenjem zakiseljene vode pod tlakom i pri temperaturama od 80-100 °C jednako efikasna kao i zakiseljeni 60 %-tni metanol koji se uobičajeno upotrebljava za ekstrakciju antocijana [28].

#### **2.4. Priprava čvrstog uzorka za kromatografsku analizu**

Analiza uzorka iz okoliša obuhvaća pet osnovnih koraka: uzorkovanje, pripravu uzorka, odjeljivanje analita, detekciju i procjenu mjernih podataka kojom dobivamo informaciju o identifikaciji uzorka i njegovom kvantitativnom sastavu. Razvojem novih tehnika i instrumenata povećala se mogućnost određivanja sve nižih koncentracija tvari u okolišu, što uzrokuje i sve veće probleme pri njihovom određivanju. Uzorci iz okoliša vrlo su složeni pa se ne mogu izravno analizirati, a kada je riječ o analizi tragova zahtjevi za pripravu uzorka postaju sve stroži. Premda je najčešći uzrok nedovoljne točnosti i loše ponovljivosti kromatografskih analiza priprava uzorka, mogući izvor onečišćenja uzorka može biti svaki korak analitičkog procesa, od uzorkovanja do provedbe analize.

Osnovni princip priprave uzorka je prevesti realni uzorak u uzorak pogodan za analizu, a tada su neizbježne interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita i matrice uzorka pa mogu utjecati na primjenjivost, djelotvornost i ponovljivost postupaka priprave uzorka. Važno je prije priprave uzorka odrediti njegovo početno fizikalno-kemijsko stanje.

Priprava uzorka mora biti usklađena s ciljem analize, uzimajući u obzir instrumente kojima će se mjeriti i stupanj željene točnosti. Pri tome se nastoji:

- Povećati selektivnost metode uklanjanjem interferencija iz matrice uzorka.
- Povećati koncentraciju analita da bi se dostigla granica kvantifikacije (ili detekcije) metode.
- Prevesti analit u oblik najpogodniji za odjeljivanje i određivanje.
- Osigurati otpornost i ponovljivost metode kako bi bila neovisna o promjeni matičnoga uzorka.

Premda su još uvijek u uporabi mnoge tradicijske metode priprave uzorka, razvoj novih usmjeren je prema:

- Mogućnost uporabe manje početne količine uzorka, pa i kada je riječ o analizi tragova analita ( $< 0,01 \%$ ).
- Specifičnosti ili većoj selektivnosti postupka.
- Povećavanju mogućnosti automatizacije ili izravnoga povezivanja s mjernom metodom, što smanjuje utjecaj sustavne pogreške.
- Obzirkom odnosu prema okolišu uporabom manje količine organskih otapala.

Kada je riječ o tekućim i plinovitim uzorcima, priprava uzorka je relativno jednostavna jer se laboratorijski uzorak homogenizira miješanjem ili mućkanjem. Čvrsti uzorci nisu homogeni što zahtijeva puno individualniji i složeniji pristup pripravi uzorka jer se oni prije otapanja moraju usitniti i homogenizirati.

Postupci priprave uzorka mogu se podijeliti na one koji se temelje na fizikalnim procesima poput usitnjavanja, filtracije, destilacije, ekstrakcije, ionske izmjene te derivatizacije. Izbor postupka ovisi o sastavu uzorka. Uzorci mogu biti organski i anorganski, a uzorci iz okoliša vrlo često sadržavaju i organske i anorganske sastojke. Organski se sastojak, bez obzira na maticu uzorka, najčešće izolira ekstrakcijom [29].

U daljnom tekstu daje se naglasak na ekstrakciju iz čvrstih uzoraka.

Ekstrakcija organskih sastojaka iz čvrstih uzoraka je proces u kojemu se tvar desorbira iz matice uzorka i otapa u prikladnom otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o tri međuovisna čimbenika: topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka. Matica uzorka ima veliki utjecaj na ekstrakciju analita i može znatno utjecati na djelotvornost. Kad je riječ o analizi bioloških uzoraka, priprava uzorka je prilično složena jer je uzorak onečišćen masnoćom i proteinima. Klasičnim metodama, poput Soxhleta, ekstrahiraju se i spomenute nečistoće što dodatno pridonosi lošoj djelotvornosti.

U usporedbi s takvim uzorcima, ekstrakcija uzoraka tla i sedimenta je jednostavnija. Topljivost analita ovisi o vrsti otapala te temperaturi i tlaku prilikom prijenosa analita iz uzorka u otapalo. To uključuje prodiranje otapala u maticu uzorka i uklanjanje analita s adsorbirane površine, što ovisi o koeficijentu difuzije, veličini čestica uzorka i strukturi matice. Prijenosu analita pogoduju visoka temperatura i tlak, niska viskoznost otapala i mala veličina čestica. Izbor otapala ovisan je o prirodi analita i matice uzorka. Ni jedno čisto otapalo nije univerzalno za sve analite, pa je ponekad potrebno koristiti se smjesom vode i organskih otapala [29].

Ekstrakcijske se metode mogu razvrstati prema temperaturi i tlaku koji imaju važnu ulogu u kinetici ekstrakcije.

Ekstrakcija provedena u ovom radu je mikrovalna ekstrakcija i spada u skupinu modernih ekstrakcijskih metoda, provodi se pri povišenom tlaku ili temperaturi. One su brže, djelotvornije, troše manje organskih otapala pa manje zagađuju okoliš.

Većina ekstrakcijskih metoda bolje se provodi na suhome uzorku manjih čestica pa se preporučuje sušenje uzorka i usitnjavanje do finoga praha. Ekstrakti tla, mulja i otpada obično zahtijevaju prethodno pročišćavanje kako bi se uklonili sastojci koji mogu uzrokovati sustavnu pogrešku određivanja, onečišćenje i uništenje opreme te pogoršanje kromatografskoga razlučivanja. Kao metoda pročišćavanja obično se rabi ekstrakcija čvrstom fazom [29].

#### **2.4.1. Klasične metode ekstrakcije**

Ekstrakcija analita iz matice uzorka zahtjeva pravu kombinaciju otapala i metode. Mnoge klasične metode postoje već više od 100 godina tako da su ih mnogi znanstvenici prihvatili. Većina klasičnih metoda koristi organska otapala često u obilatim količinama, iako se u zadnje vrijeme pokušava prilagoditi sustave da se smanji potreba za velikim količinama otapala i uzorka [30].

##### **2.4.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće**

Ekstrakcija čvrsto-tekuće se može provoditi na razne načine (metoda mućkanjem, ultrazvučna ekstrakcija i Soxhlet ekstrakcija). Najpoznatija metoda je metoda mućkanjem. Metoda mućkanjem uključuje jedino dodatak otapala (npr. organskog otapala za organske komponente i razrijeđenu kiselinu ili bazu za anorganske komponente) uzorku i zatim mućkanjem omogućava analitu da se otopi u tekućini koja ga okružuje sve dok je to u potpunosti moguće. Ova metoda je dobra dok je analit jako topljiv u otapalu kojim se radi ekstrakcija i dok je uzorak veoma porozan. Da bi imali učinkovit kontakt čvrsto-tekuće, uzorci moraju biti dobro usitnjeni. Zagrijavanje ili refluksiranje uzorka u vrućem otapalu može se koristiti da bi se ubrzao proces ekstrakcije. Metoda mućkanja se može raditi u serijama što povećava ukupnu propusnost uzorka. Jednom kad je analit uklonjen, netopiv sadržaj je uklonjen filtracijom ili centrifugiranjem.

Sonikacija ili ultrazvučna ekstrakcija koristi se energijom ultrazvuka u svrhu poboljšanja ekstrakcijskog procesa. Uzorak se kratko vrijeme izlaže velikoj količini energije pri čemu se zagrijava i povisuje tlak. Frekvencija ultrazvuka koji se primjenjuje u kemijskim reakcijama je 20–100 kHz, što izaziva stvaranje, rast i snažan raspad šupljina u tekućini.



Prednosti metode: brza, jednostavna, osjetno skraćanje vremena ekstrakcije (10-45 minuta) i smanjenje obujma otapala (do 100 mL).

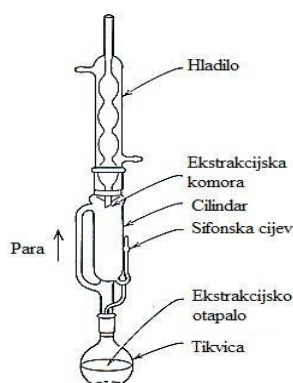
Nedostatci metode: postiže se niža djelotvornost ekstrakcije nego nekim drugim metodama, pa ponekad treba pribjeći višestrukoj ekstrakciji. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakti se moraju filtrirati, a prije analize često ih treba upariti i pročistiti.

Ultrazvučna ekstrakcija primijenjena je uspješno u analizi ostataka antibiotika i različitih sastojaka hrane, te za određivanje pesticida i dioksina u uzorcima tla i sedimenta [29].

Najčešće korištena metoda ekstrakcije je Soxhlet ekstrakcija, prilično je spora metoda pripreme uzorka koja je u primjeni od 1980-ih. Čvrsti uzorak se stavi u Soxhletov cilindar koji je napravljen od čvrstog filter papira. Cilindar se zatim stavi u Soxhletovu aparaturu, gdje se refluksirano ekstrakcijsko otapalo kondenzira u cilindar i ispire topljive komponente. Soxhlet aparatura je dizajnirana tako da kad se komora koja drži cilindar napuni do određenog volumena otapalo koje sadrži ekstrahirane komponente ispušta se pomoću sifonske cijevi u tikvicu koja sadrži otapalo i proces se ponavlja sve dok se analit uspješno ukloni iz čvrstog uzorka. Soxhlet aparatura je prikazana na Slici 8.

Nedostatci Soxhlet ekstrakcije su: dugotrajna je (18 do 24 sata); potrebna je veća količina otapala za ekstrakciju; zbog toga što se otopljeni analit ispušta u tikvicu s otapalom, analit mora biti stabilan na temperaturi vrenja otapala i za svaki uzorak je potreban poseban ekstraktor.

Prednosti Soxhlet ekstrakcije su: mogu se koristiti male količine uzorka (nekoliko mg) i jeftinija je u odnosu na neke modernije metode ekstrakcije [30].



**Slika 8.** Soxhlet aparatura [5]

#### 2.4.2. Moderne metode ekstrakcije

Mnogo godina analitičari su bili zadovoljni klasičnim metodama ekstrakcije. Međutim, kako su trebali povećati produktivnost, ubrzati analize, i kako se povećavala automatizacija tako su

se razvijale nove metode ekstrakcije. Neke od tih metoda su automatizirale klasične metode i tako ih ubrzale i olakšale njihovo korištenje. Većinom su te metode skuplje pri početnoj kupnji, ali su jeftinije što se tiče troškova po jednom uzorku [31].

#### **2.4.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija**

Moderni Soxhlet ekstraktori su ubrzali proces ekstrakcije i smanjili količinu potrebnog otapala, ali su zadržali princip Soxhlet ekstrakcije. Kod ovih ekstraktora uzorak se uranja u kipuće otapalo, a nakon toga se uzorak vadi iz otapala i smješta iznad otapala. Zatim se skuplja destilat koji sadrži ekstrahirani materijal. Kod ove ekstrakcije može se istodobno pripremiti četiri do šest uzoraka. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija se koristi za ekstrakciju: ukupnih masti u mesu; pesticida; polikloriranih bifenila i policikličkih aromatskih ugljikovodika u tlu i biljkama; ulja i masnoća u tlu, mulju i vodi; aditiva u plastici i gumi; pesticida u zobenoj kaši; i masti u čipsu [30, 31].

#### **2.4.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom**

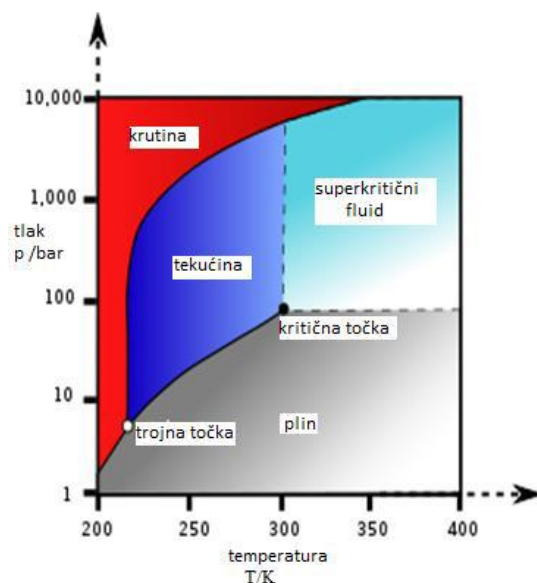
Ekstrakcija superkritičnim fluidom omogućuje određivanje organskih sastojaka u uzorcima vode, tla i sedimentima.

Glavne su joj prednosti:

- Superkritični fluidi imaju više difuzijske koeficijente i nižu viskoznost od tekućih otapala, što rezultira boljom topljivošću analita te brзом kinetikom ekstrakcije.
- Promjenom tlaka i temperature može se utjecati na jakost otapala što je posebice korisno za ekstrakciju složenih uzoraka.
- Dotok svježeg fluida je kontinuiran, čime se omogućuje kvantitativnost ekstrakcije.
- Smanjenje obujma opasnih otapala, zbog primjene fluida koji nisu otrovni i zapaljivi, kraće trajanje (30-75 min), manja masa uzorka te mogućnost povezivanja s tekućinskim i plinskim kromatografom.
- Dobivene ekstrakte ne treba filtrirati ili dodatno pročišćavati, jer ekstraktor ima poroznu keramičku pločicu koja omogućuje dobivanje čistih ekstrakata [29].

Superkritični se uvjeti postižu zagrijavanjem plina ili tekućine na temperaturu kritične, pri čemu je i tlak iznad kritičnog. Pri tim uvjetima fluid može imati svojstva slična plinu i tekućini. To ponašanje se vidi na faznom dijagramu prikazanom na Slici 9 [32]. Trenutačno se najviše rabi CO<sub>2</sub> jer superkritične uvjete postiže jednostavno, nisko je toksičan, nezapaljiv, visoke je čistoće, a cijena mu je pristupačna.

Velika prednost postupka je u tome što većina superkritičnih fluida pri sobnim uvjetima je plinovita, pa analiti prelaze u otopinu jednostavnim sniženjem tlaka ili uvođenjem u male količine odgovarajućeg otapala [29].



Slika 9. Fazni dijagram CO<sub>2</sub> [6]

Ekstrakcija superkritičnim fluidom našla je široku primjenu u analizi okoliša, hrane i polimera. U analizi okoliša koristi se za ekstrakciju naftnih ugljikovodika, policikličkih aromatskih ugljikovodika i organskih kloriranih pesticida u tlu i mulju. Kako je superkritični CO<sub>2</sub> odlično otapalo za masti koristi se u prehrambenoj industriji. Farmaceuti su otkrili da je ekstrakcija superkritičnim fluidom korisna za ekstrakciju lijeka iz tableta i tkiva [31].

#### 2.4.2.3. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija, (engl. *microwave assisted extraction*) je metoda u kojoj se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo i uzorak, čime se pospješuje prijelaz ispitivanih spojeva iz uzorka u otapalo, kao i u mikrovalnom razlaganju uzorka. Navedena metoda ekstrakcije koristila se u ovom radu, jer su se uz pomoć mikrovalova ekstrahirali polifenoli iz kože grožđa.

Kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalnu energiju približno u omjeru njihovih dielektričnih konstanti, što je veća vrijednost dielektrične konstante veća je apsorpcija mikrovalne energije. Postoje dva granična pristupa ekstrakciji mikrovalovima: primjena otapala koje apsorbira mikrovalove i ima veliku dielektričnu konstantu i primjena otapala koje ne apsorbira mikrovalove i ima malu dielektričnu konstantu. Kod primjene otapala koje apsorbira mikrovalove uzorak i otapalo su smješteni u zatvorenu posudu. Pod mikrovalnim zračenjem

otapalo se zagrije preko točke vrenja i tako omogućuje brzu ekstrakciju analita pod umjerenim tlakom.

Ekstrakcija se, kao i razlaganje, automatski kontrolira osjetilima za tlak i temperaturu. To je brza ekstrakcijska metoda koja troši relativno malo otapala, a u istom se vremenu može ekstrahirati više uzoraka odjednom. Djelotvornost ekstrakcije je relativno visoka i raste s temperaturom i vremenom. Toplinski labilni sastojci se porastom temperature i vremena razgrađuju, što uzrokuje smanjenje djelotvornosti ekstrakcije.

Mikrovalna energija može djelovati na uzorak u zatvorenim posudama uz nadziranje tlaka i temperature, ili u otvorenim posudama pod atmosferskim tlakom. Pri ekstrakciji u zatvorenim posudama mogu se primijeniti temperature više od vrelišta uporabljenih otapala, što znatno skraćuje trajanje ekstrakcije.

Zagrijavanje otapala djelovanjem mikrovalova temelji se na ionskoj vodljivosti i dipolnoj rotaciji molekule. Ionska vodljivost je elektroforetsko kretanje iona pod utjecajem primijenjenog elektromagnetskog polja. Posljedica otpora otopine kretanju iona je trenje, a time i zagrijavanje otopine. Primjenom elektromagnetskog polja dolazi i do usmjeravanja dipola, a to također za posljedicu ima zagrijavanje otopine [29].

Različiti materijali različito se ponašaju djelovanjem mikrovalova (Slika 10):

- nepolarni materijali reflektiraju mikrovalove,
- mikrovalovi prolaze kroz keramiku, staklo i porculan,
- hrana, ljudsko tkivo i polarni materijali ih apsorbiraju.



**Slika 10.** Djelovanje mikrovalova na različite materijale [7]

Prednost metode:

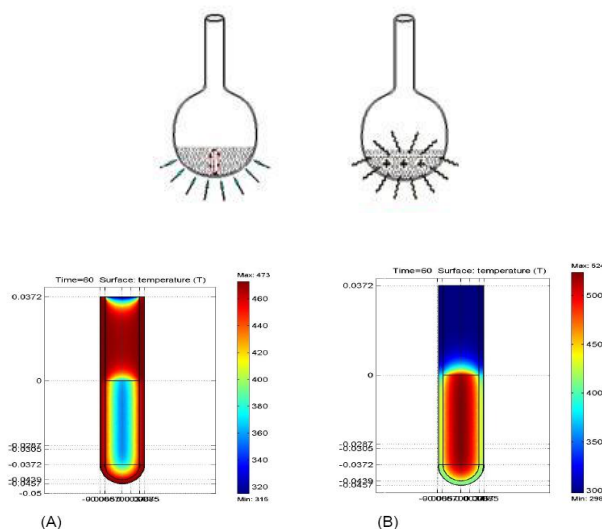
Mikrovalna ekstrakcija omogućuje smanjenje vremena ekstrakcije i količine potrebnog otapala za ekstrakciju. Upotrebom mikrovalnog zračenja može se izbjeći i razgradnja uzorka zbog visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matice. Razvoj uređaja za mikrovalnu ekstrakciju omogućio je dobru kontrolu tlaka i temperature, čime se postižu precizni i reproducibilni uvjeti. Temperatura je važan čimbenik radi utjecaja na brzinu reakcije, razgradnju termolabilnih vrsta i topljivosti spojeva. Tlak ima važnu ulogu jer izrada posuda koje mogu izdržati tlak od čak 4,1 MPa omogućava ekstrakciju na vrlo visokim temperaturama, čime se povećava djelotvornost ekstrakcije i smanjuje vrijeme potrebno za analizu. Automatiziranom mikrovalnom ekstrakcijom moguće je istovremeno ekstrahirati do 12 uzoraka [33]. Mikrovalnom se energijom koristimo češće za ekstrakciju nego za razlaganje uzoraka. Metoda je primijenjena pri određivanju različitih zagađivala u uzorcima okoliša. Osim za ekstrakciju analita iz matice uzorka, energija mikrovalova primjenjuje se za derivatizaciju analita pri ekstrakciji [29, 30].

Nedostatci metode:

- Nemogućnost uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima, što ovisi i o dielektričnosti otapala (što je dipolnost veća, to je jača interakcija).
- Hlađenje posude za mikrovalnu ekstrakciju nakon ekstrahiranja na sobnu temperaturu prije otvaranja, čime se gubi dosta vremena koje se dobiva ovom brzom metodom ekstrakcije.
- Potreba za razdvajanjem ekstrakta od uzorka dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem [33].

Kako je riječ uglavnom o nepolarnim otapalima, ekstrakcija se nepolarnih spojeva provodi smjesom otapala različite polarnosti. Kod primjene otapala koje ne apsorbira mikrovalove uzorak i otapalo su smješteni u otvorenu posudu. Otapalo ne postaje vruće jer ne apsorbira mikrovalno zračenje. Međutim, uzorci često sadrže vodu ili neke druge spojeve koji imaju veliku konstantu dielektričnosti, oni mogu apsorbirati mikrovalno zračenje i mogu otpustiti zagrijane analite u otapalo koje je hladno i koje je odabrano tako da su oni topivi u njemu. Provodi se pod atmosferskim ili niskim tlakovima. Može se koristiti za analite koji su osjetljivi na toplinu ili su termički labilni. Ovakva primjena mikrovalova koristi se kod ekstrakcije eteričnih ulja iz biljnih materijala.

Kada se uzorak zagrijava na uobičajeni način, on se zagrijava izvana prema unutra, kod mikrovalnog zagrijavanja situacija je obrnuta, uzorak se zagrijava iznutra (Slika 11).



**Slika 11.** Zagrijavanje uzorka a) na uobičajeni način i b) djelovanjem mikrovalova [7]

U ovom radu ekstrakcija polifenola iz čvrstog uzorka kože grožđa, provedena je djelovanjem mikrovalnog zračenja u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju je prikazan na Slici 12.



**Slika 12.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju [7]

## 2.4.2.3.1. Pregled primjene mikrovalne ekstrakcije u znanstvene svrhe

Tablica 1. Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz prirodnih uzoraka

| Uzorak                                                    | Analit                                                                  | Otapalo                                                  | Parametri                                                                                                                       | Spektralna analiza                                    | Rezultati                                                                                                                                                                       | Literatura |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Lišće kineske medicinske biljke <i>Perilla Frutescens</i> | Ekstrakcija flavonoida iz lišća                                         | Voda                                                     | Optimizacija snage (200, 400, 600 i 800 W), vremena (10 i 20 min) pomoću jednog faktora i Box-Behnken eksperimentalnim dizajnom | Mikrovalna ekstrakcija<br>Spektrofotometrija UV1600   | Podudarnost između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti. Pri snazi 600 W U 23 min dobiveno je 6,07 mg/g flavonoida                                                        | [34]       |
| Analiza fenolnih spojeva u biljkama                       | Aromatične biljke                                                       | 60 % aceton, etil-acetat/voda (60 %/30 %), 60 % metanola | Usporedba mikrovalne ekstrakcije s konvekcionalnim postupkom                                                                    | Mikrovalna ekstrakcija<br>RP – HPLC s UV - detektorom | Smanjeno je vrijeme ekstrakcije, manje otapala se koristi, a količina ekstrahiranih fenolnih spojeva se povećala s MAE.                                                         | [35]       |
| MAE polifenola iz komine jabuka                           | Komina industrijske jabuke                                              | Etanol 62,1 %                                            | Optimizacija MAE snage, otapala, vremena i usporedba s Box-Behnken eksperimentalnim dizajnom                                    | Mikrovalna ekstrakcija<br>HPLC analiza                | Polifenoli iz komine jabuke su klorogenska i kafeinska kiselina, sirigin, procijanidin B2 (219,4 mg / kg), (-) - epikatehina, cimetne kiseline, kumarinske kiseline, florizina. | [36]       |
| MAE polifenola iz sjemenki grožđa                         | Sjemenke sorti Cabernet Sauvignon, Shiraz, Sauvignon Blanc i Chardonnay | Etanol 47,2 %                                            | Optimizacija konc. etanola, vrijeme i odnos (tekućina:čvrsta faza). Ukupni polifenoli određeni su Folin-Ciocalteu metodom       | Mikrovalna ekstrakcija                                | Mikrovalna ekstrakcija je brža i oko 92 % polifenola je izolirano u prvom stupnju uz održavanje konstantne temperature.                                                         | [37]       |

## 2.5. Analiza polifenola tekućinskom kromatografijom

Kromatografija je tehnika u kojoj se sastojci smjese odjeljuju ovisno o brzinama kojima ih plinovita ili tekuća mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze. Služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama. Svim kromatografskim postupcima zajedničko je postojanje stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Pri kromatografskim analizama plinovita ili tekuća pokretna faza nosi sastojke uzorka kroz nepokretnu fazu, a odjeljivanje sastojaka temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz nepokretnu fazu [32]. Vrste kromatografskih metoda dane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Podjela kromatografskih metoda obzirom na pokretnu i nepokretnu fazu

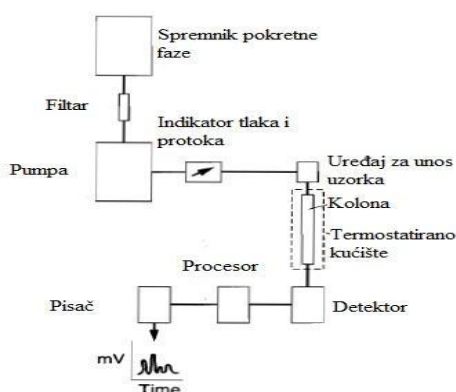
| <b>Pokretna faza</b>       |      | <b>Nepokretna faza</b> | <b>Metoda</b>                                        |
|----------------------------|------|------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Plin</b>                | GC   | tekućina               | Plinsko-tekućinska kromatografija, GLC               |
|                            |      | krutina                | Plinsko-čvrsta kromatografija, GSC                   |
| <b>Tekućina</b>            | LC   | tekućina               | Tekućinsko-tekućinska kromatografija, LLC            |
|                            |      | krutina                | Tekućinsko-čvrsta kromatografija, LSC                |
| <b>Superkritični fluid</b> | SCFC | tekućina               | Superkritični fluid-tekućinska kromatografija, SCFLC |
|                            |      | krutina                | Superkritični fluid-čvrsta kromatografija, SCFSC     |

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) razvijena je u kasnim 1960.-im i ranim 1970.-im. Danas je široko prihvaćena separacijska metoda za analizu uzorka također i za pročišćavanje u različitim područjima uključujući farmaceutsku, biotehnološku, ekološku, polimernu i prehrambenu industriju. HPLC doživljava neprekidan rast u količini prodaje instrumenata i u publikacijama koje opisuju nove i inovativne primjene. Nedavna područja rasta uključuju minijaturizaciju HPLC sistema, analizu nukleinskih kiselina, neoštećenih proteina i probavljenih proteina, analizu ugljikohidrata i kiralne analize. Uzorci moraju biti u tekućem stanju. Najčešće se injektira volumen od 5 do 10  $\mu\text{L}$  uzorka. Vrijeme analize je u rasponu od 5 minuta pa do 2 sata. Ograničenja HPLC metode su: identifikacija spoja može biti otežana ako HPLC nije povezan s spektrometrom masa; razlučivost je teško postići s kompleksnim uzorcima; ne može se analizirati više uzoraka istovremeno; za optimizaciju separacije potrebno je znanje i iskustvo rada na instrumentu; vrijeme analize može biti dosta dugo i često je potrebna priprema uzorka [32].



Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) visoko je efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75 % primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza [33]. Sustav se sastoji od pumpe (s kontroliranim protokom pokretne faze), mjesta u koje se unosi uzorak (injektor), kolone, detektora (apsorpcijski, fluorescentni, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa), jedinice za obradu podataka i pisaa [33]. Shematski prikaz HPLC kromatografa dan je na Slici 13.

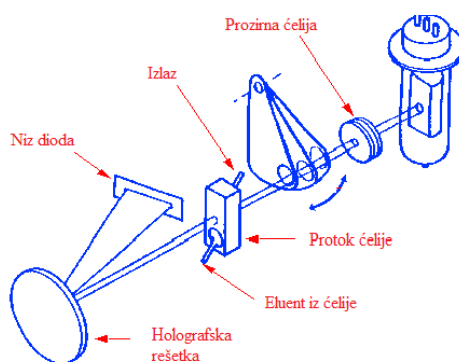


**Slika 13.** Shematski prikaz HPLC-a [8]

### 2.5.1.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza. Njihovo razdvajanje se zasniva na njihovoj raspodjeli između pokretne i nepokretne faze. Uspješna primjena tekućinske kromatografije za zadani problem zahtijeva pravu kombinaciju iz različitih radnih uvjeta kao što su vrsta punjenja kolone i pokretne faze, duljina i promjer kolone, protok pokretne faze, temperatura kolone i količina uzorka. Kako bi odabrali najbolju kombinaciju kromatografskih uvjeta potrebno je razumjeti razne faktore koji mogu utjecati na razdvajanje. Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće (kromatografske, HPLC čistoće) i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtara pod vakuumom. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom ( $0,1-10 \text{ cm}^3/\text{min}$ ) u kolonu. Uzorak se unosi automatskim uzorkivačem, ili ručno mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju [zapremina 5 do  $500 \text{ mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ )] u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Analitička kolona je najčešće cijev izrađena iz nehrđajućeg čelika, duljine 250 ili 150 mm, a unutarnjeg dijametara 4,6 mm, punjena česticama veličine 3,5 ili  $5 \mu\text{m}$ . Kao detektori

važni su spektroskopski detektori, detektori fluorescencije, detektori indeksa loma i elektrokemijski detektori. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa je analit, odnosno otopljena tvar dokazan neizravno promjenom ovih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vid ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Vrlo su dobri detektori s diodnim nizom ("*photodiode array detector*") (HPLC-DAD ili HPLC-PDA sustav) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vid: apsorpcija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini [38]. Na Slici 14 prikazan je detektor s nizom dioda.



**Slika 14.** Detektor s nizom dioda [6]

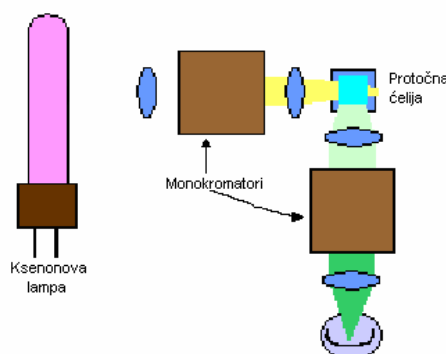
Svjetlo iz deuterijeve lampe usmjereno je prozirnom lećom da cijeli snop svjetla može proći kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Tako je uzorak podvrgnut svjetlu svih valnih duljina koje dolaze iz lampe. Raspršeno svjetlo od rešetke je fokusirano na niz dioda. Niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je redovno odabran računalom i pohranjen. Spektar otopljene tvari može se dobiti iz krivulje koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Jedinim nedostatak ovog tipa detektora je da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu dioda [32].

Valja razlikovati izokratnu od gradijentne HPLC: kod izokratne radi se s jednim otapalom stalnog sastava, ali bolje se i brže odjeljivanje postiže primjenom gradijentnog ispiranja kada se sastav pokretne faze stalno mijenja. Danas je široko prihvaćena separacijska metoda za analizu uzorka te za pročišćavanje u različitim područjima, uključujući farmaceutsku, biotehnološku, ekološku, polimernu i prehrambenu industriju [32].

Kao što je prethodno spomenuto, osim UV/Vid detektora s nizom dioda (DAD), postoji i fluorescencijski detektor (FLD). Fluorescencijski detektor je najosjetljiviji među postojećim modernim HPLC detektorima. Moguće je detektirati čak i prisutnost jedne molekule analita u protočnu ćeliju. Fluorescencija za FLD detektor je osjetljivosti 10 - 1000 puta veća nego od

UV detektora. Fluorescencijski detektori su vrlo specifični i selektivni među ostalima optičkim detektorima na tržištu. Ovakav tip detektora se zbog većeg broja prednosti koristi u mjerenju specifičnih fluorescentnih uzoraka za analize umjetnih sladila, vitamina, karbamata, mikotoksina i glifosata. Kod spojeva koji imaju određene funkcionalne skupine, uzorak je nanesen na stjenke fluorescentne žarulje koja apsorbira ultraljubičasto zračenje i procesom fluorescencije emitira vidljivo zračenje niže valne duljine. Na taj način fluorescentna žarulja većinu emitiranog zračenja emitira u vidljivom području. Obično, emisija je mjerena pod pravim kutom u odnosu na pobudu. Otprilike 15 % od svih spojeva su prirodne fluorescencije. Prisutnost konjugiranih  $\pi$ -elektrona, posebno u aromatskim prstenovima daje najintenzivniju fluorescentnu aktivnost. Također, alifatski ili aliciklički spojevi s karbonilnom skupinom i spojevima s vrlo konjugiranim dvostrukim vezama fluoresciraju, ali obično u manjem stupnju. Većina nesupstituiranih aromatski ugljikovodika svijetli kako raste broj prstenova, stupnjem njihove kondenzacije i strukturne čvrstoće.

Otkrivanje bilo koje komponente značajno ovisi o odabranoj valnoj duljini, a jedna komponenta može biti otkriven na 280 nm i 340 nm. Većina modernih detektora omogućuju brzi prelazak valnih duljina, pa time nude mogućnost otkrivanja neke komponente u smjesi. Na primjer, u vrlo važnom policikličkom aromatskom kromatogramu pobuda i emisija valne duljine su 280 i 340 nm za prvih 6 komponenti, a zatim se pretvaraju u odgovarajuće vrijednosti za 305 i 430 nm. Ove vrijednosti predstavljaju najbolji primjer osjetljivosti takvog jednog detektora. Na Slici 16 prikazana je optička shema tipičnog fluorescencijskog detektora za tekućinsku kromatografiju. Detektori dostupni na tržištu razlikuju se u načinu kontrolirane valne duljine. Jeftiniji instrumenti koriste filtre. Uređaji srednje cijene nude monokromatore koji vrše kontrolu najmanje valne duljine, a punu sposobnost istraživanja imaju instrumenti koji pružaju kontrolu monokromatora pri upadnom i emitiranom zračenju [39].



**Slika 15.** Fluorescencijski detektor [9]

### ***3. EKSPERIMENTALNI DIO***

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Osušeni uzorci kože grožđa

U diplomskom radu korišteni su uzorci kože grožđa sorte Regent.



**Slika 16.** Izgled grožđa sorte Regent [10]

Uzorci crne sorte grožđa Regent uzeti su 2013. godine iz vinograda na Pokušalištu Jazbina, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Grožđe je ubrano u fazi pune zrelosti te je neposredno nakon toga doneseno u *Laboratorij za grožđe, mošt i vino, Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo*. Bobice su odvojene od peteljkovine i potom podvrgnute postupku flotacije. Bobice grožđa su se uronile u vodenu otopinu s najvišom koncentracijom saharoze. Bobice koje otplutaju na površinu imaju manju gustoću od otopine te se one prenose u otopinu niže koncentracije saharoze. Postupak se ponavlja sve dok se ne razdvoje sve bobice temeljem gustoće, a sve u svrhu dobivanja homogenog uzorka. Bobice koje imaju manju gustoću imaju manje šećera, što znači da su manje zrele te imaju lošiji polifenolni profil. Takve se bobice odbacuju. Postupkom flotacije dobiva se homogeni uzorak, ujednačene gustoće, koncentracije šećera i stupnja zrelosti. Homogene bobice grožđa su pohranjeni u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$  u trajanju od šest mjeseci. Nakon šest mjeseci uslijedio je proces skidanja kože sa odmrznute bobice. Nakon odvajanja kožica je podvrgnuta procesu sušenja na zraku pri  $25^{\circ}\text{C}$  u trajanju od sedam dana.

#### 3.1.2. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su kemikalije navedene u Tablici 3. Ekstrakcijska otopala s različitim udjelima organske faze pripravljena su u laboratoriju *Zavoda za vinarstvo i vinogradarstvo*, Agronomskog fakulteta.

**Tablica 3.** Naziv, kratice, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

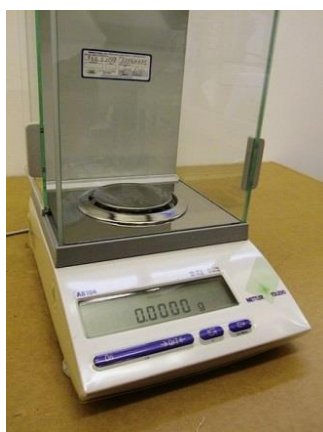
| Naziv             | Kratice | Molekulska formula                 | Čistoća    | Proizvođač                         |
|-------------------|---------|------------------------------------|------------|------------------------------------|
| Acetonitril       | ACN     | CH <sub>3</sub> CN                 | HPLC       | J. T. Baker (Deventer, Nizozemska) |
| Etanol            | EtOH    | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH | p. a.      | Kemika (Zagreb, Croatia)           |
| Fosforna kiselina |         | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>     | p. a.      | Fluka (Buchs, Switzerland)         |
| Mravlja kiselina  |         | HCOOH                              | 98 – 100 % | Riedel-De Haën (Seelze, Njemačka)  |

Za pripravu otopina korištena je MilliQ voda.

### 3.2. Instrumenti, uređaji i pribor

#### 3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje uzoraka kože grožđa, u radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na Slici 17.



**Slika 17.** Analitička vaga marke Mettler Toledo, AB104, Švicarska [11]

#### 3.2.2. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

Ekstrakcija polifenola iz uzoraka kože grožđa, provedena je djelovanjem mikrovalnog zračenja u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju, MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) 1200 W. Uređaj omogućuje istovremenu ekstrakciju do 12 uzoraka. U referentnoj posudi nalazi se osjetilo tlaka i temperature što omogućuje izravno praćenje ovih parametara tijekom postupka ekstrakcije te automatsku regulaciju unaprijed definiranih uvjeta ekstrakcije. Za ekstrakciju su korištene 100 mL teflonske “GreenChem” posude zatvorene tijekom postupka ekstrakcije tako da se spriječi gubitak otapala i analita.

**Radni uvjeti:**

- Napon: 220/110 V
- Temperatura: 40 °C, 50 °C, 60 °C
- Snaga: 600 W, 1200 W Tlak: 2 psi
- Vrijeme:       za preliminarna istraživanja: 5, 10, 15, 30, 45 i 60 min.  
                  za eksperimentalni dizajn: 10, 15 i 20 min.



**Slika 18.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s teflonskim posudama za uzorke [11]

**3.2.3. Centrifuga**

Nakon mikrovalne ekstrakcije uzorci se prebacuju u prethodno označene kivete i centrifugiraju pri snazi od 45 rpm, 7 minuta. Nakon centrifugiranja, slijedi dekantiranje bistrog dijela u okrugle tikvice za uparavanje. Za centrifugiranje korištena je centrifuga marke Hettich Zentifugen, Eba 20, Njemačka.



**Slika 19.** Centrifuga marke Hettich Zentifugen, Eba 20, Njemačka [12]

### 3.2.4. Uparivač (rotavapor)

Za uparavanje ekstrakata nakon mikrovalne ekstrakcije korišten je rotavapor, Büchi Rotavapor R-114, Švicarska. Uređaj se sastoji od jedinice za rotiranje tikvice, vodene kupelji za održavanje povišene temperature te povratnog hladila i tikvice za prikupljanje kondenzata. Nakon mikrovalne ekstrakcije, centrifugirani i dekantirani ekstrakti preneseni su u tikvicu okruglog dna koja se uranja u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C. Tikvica je spojena na sustav u kojemu vlada sniženi tlak koji se postiže vodenom vakuum sisaljkom. Tijekom uparavanja tikvica rotira u vodenoj kupelji.



**Slika 20.** Rotavapor, Büchi Rotavapor R-114 [13]

### 3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Dobiveni ekstrakti analizirani su kromatografom Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA) koji je prikazan na Slici 21. Sastoji se od automatskog uzorkivača 1100, detektora s nizom dioda 1100, binarne pumpe 1100, Agilent 1200 fluorescentnog detektora, boca za pokretnu fazu i računala preko kojeg se upravlja programom za HPLC-om. U istom programu se nakon analize obrađuju dobiveni podatci. Za analizu je korištena kolona Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex, USA). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina zrnaca je 5  $\mu$ m, sa predkolonom Phenyl (4,0x3,0).





**Slika 21.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1100 [14]

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Priprava otopina za mikrovalnu ekstrakciju

Kao ekstrakcijska otapala za mikrovalnu ekstrakciju pripremale su se vodene otopine različitih udjela organske faze. Priređene su otopine od:

- 20 % ACN + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O,
- 20 % EtOH + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O,
- 50 % ACN + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O,
- 50 % EtOH + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O,
- 80 % ACN + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O,
- 80 % EtOH + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O.

#### 3.3.2. Priprava uzorka za mikrovalnu ekstrakciju

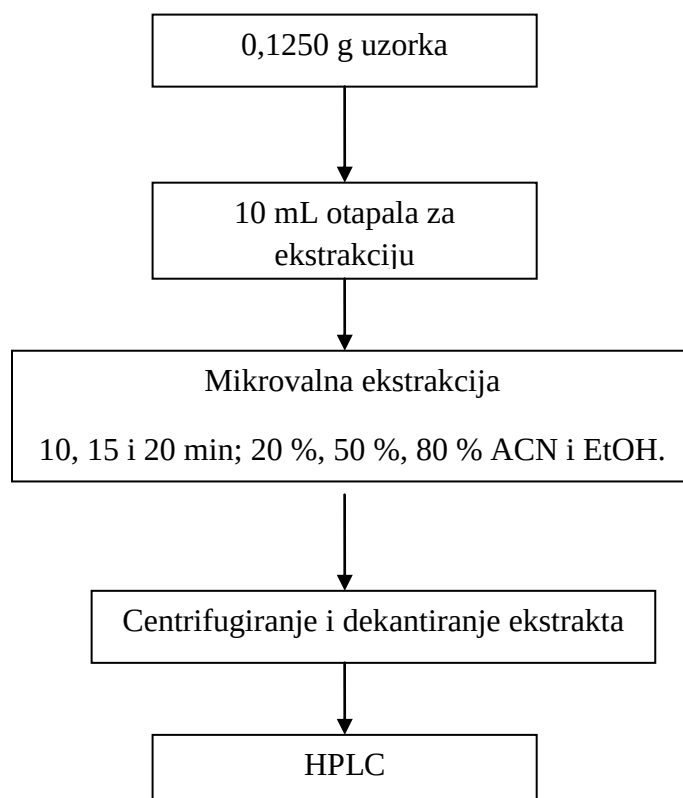
Nakon što je uzorak kože grožđa sasušen, usitnjen i pohranjen krenulo se u daljna istraživanja. Za preliminarna istraživanja određivali su se optimalni omjeri faza (uzorak/ekstrakcijsko otapalo) 1:40 g/mL (125 mg uzorka + 20 mL otapala); 1:60 g/mL (165 mg uzorka + 10 mL otapala); 1:80 g/mL (125 mg uzorka + 10 mL otapala). Vagana je spomenuta masa uzorka i to slijepa proba sa dodatne tri probe. Kao otapalo korišten je 20 % ACN + 1 % HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O. Trajanje ekstrakcije je 15 minuta uz temperaturu od 50 °C. Osim optimalnog omjera faza, određivan je optimalan raspon trajanja ekstrakcije: 5, 10, 15, 30, 45 i 60 min pri temperaturi od 50 °C uz omjer faza 1:80 te kao otapalo 20 % ACN + 1 %

HCOOH + 79 % H<sub>2</sub>O. Preliminarnim istraživanjima dobiven je najbolji omjer faza 1:80 (125 mg uzorka + 10 mL ekstrakcijskog otapala). Temeljem dobivenih rezultata eksperimenti su rađeni omjerom faza 1:80 (125 mg uzorka + 10 mL ekstrakcijskog otapala) u vremenskom periodu od 10, 15 i 20 minuta koji je korišten prilikom izrade eksperimentalnog dizajna.

### 3.3.3. Mikrovalna ekstrakcija

Proces ekstrakcije polifenola iz kože grožđa prikazan je na Slici 22.

Ovom metodom pokušala se provesti optimizacija mase uzorka, te vremena, temperature i volumena ekstrakcije.



**Slika 22.** Shematski prikaz postupka ekstrakcije polifenola iz kože grožđa mikrovalnom ekstrakcijom [15]

### 3.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Nakon mikrovalne ekstrakcije centrifugirani ekstrakti se uparavaju, a ostatak što ostane nakon uparavanja prebacuje se u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni s 0,5 % fosfornom kiselinom. Nakon opisanog postupka dobivena otopina se profiltrira pomoću mikrofiltra (Phenex-PTFE 0,20 µm, Phenomenex, SAD) i prebacuje direktno u vijalice. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija polifenola u koži grožđa provedena je na tekućinskom

kromatografu visoke djelotvornosti Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA). Pokretna faza se sastojala od: A voda/fosforna kiselina (99,5/0,5/v/v) i B acetonitril/voda/fosforna kiselina (50/49,5/0,5/v/v/v). Separacija se provodila na koloni Luna Phenyl-Hexyl (250 mm × 4,6 mm × 5 µm) uz protok od 0,9 mL/min. Temperatura kolone je iznosila 50 °C uz izravno injektiranje 20 µL dobivenog ekstrakta. Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Gradijent pokretne faze korišten u analizi

| Vrijeme / min | Volumen pokretne faze A / % | Volumen pokretne faze B / % |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0             | 100                         | 0                           |
| 2             | 100                         | 0                           |
| 7,00          | 80                          | 20                          |
| 35,00         | 60                          | 40                          |
| 40,00         | 60                          | 40                          |
| 45,00         | 20                          | 80                          |
| 50,00         | 0                           | 100                         |
| 52,00         | 0                           | 100                         |
| 60,00         | 100                         | 0                           |
| 64,00         | 100                         | 0                           |

Za detekciju i kvantifikaciju spojeva kromatogrami su snimljeni na 360 i 518 nm na detektoru s nizom dioda, te pri valnoj duljini ekscitacije od 225 nm i emisije od 320 nm na fluorescencijskom detektoru. UV/Vid spektri snimljeni su u području od 200 do 700 nm. Identifikacija kromatografskih krivulja temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka s vremenima zadržavanja kao i usporedbom s UV spektrima standarada, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe mase kože grožđa. Maseni udio određene skupine polifenola, koji su korišteni kao odzivi ( $Y$ , ovisne varijable) izraženi su kao zbroj sadržaja pojedinačnih spojeva te skupine određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

### 3.3.5. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza

Raspon ekstrakcijskih faktora (udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu, temperatura i vrijeme ekstrakcije) odabrani su na temelju rezultata prije provedenih istraživanja. Za proučavanje utjecaja navedenih faktora na konačni ukupni sadržaj polifenola u dobivenim ekstraktima korišten je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn (BBD). Kao odzivi ( $Y$ , ovisne varijable) korišteni su dobiveni maseni udjeli: delfinidin-3,5- $O$ -diglukozida, cijanidin-3,5- $O$ -diglukozida, peonidin-3,5- $O$ -diglukozida, malvidin-3,5- $O$ -diglukozida, delfinidin-3- $O$ -glukozid, cijanidin-3- $O$ -glukozida, peonidin-3- $O$ -glukozida te malvidin-3- $O$ -glukozida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio antocijana); miricetin-3- $O$ -glukozida, rutina, kvercetin-3- $O$ -glukonorida, kvercetin-3- $O$ -glukozida te kemferol-3- $O$ -glukonorida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavonola) te galokatehina, epigalokatehina, katehina, epikatehina, procijanidina B1 i B2 izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavan-3-ola). Rezultati BBD-eksperimenata analizirani su nelinearnom višestrukom regresijom s povratnom eliminacijom da bi pristajali slijedećoj jednadžbi drugog reda za  $Y$  ovisne varijable:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (i=1, 2 \dots k) \quad (1)$$

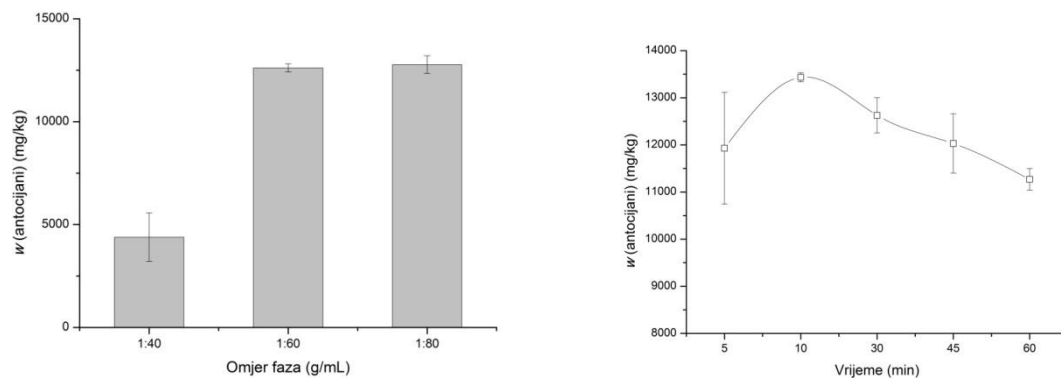
$\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  te  $\beta_{ij}$  koeficijenti su za linearne, kvadratne odnosno faktore međudjelovanja,  $x_i$  i  $x_j$  su razine neovisnih faktora za kodirane vrijednosti. U optimizaciji uvjeta ekstrakcije korištena je metodologija koja uzima u obzir više kriterija (Derringerova funkcija). Ova se metodologija primjenjuje kada je istovremeno potrebno uzeti u obzir više odziva te je potrebno naći optimalan kompromis između ukupnog broja razmotrenih odziva [40]. Analiza eksperimentalnog dizajna te izračun predviđenih vrijednosti provedeni su primjenom specijaliziranog računalnog programa Design Expert (Trial Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Koeficijenti su tumačeni pomoću  $F$ -testa. Da bi se odredili optimalni uvjeti za dobivanje maksimalnog masenog udjela polifenola u kožici grožđa korištene su analiza varijance (ANOVA), regresijska analiza kao i izrada grafičkog prikaza površina odziva.

## ***4. REZULTATI I RASPRAVA***

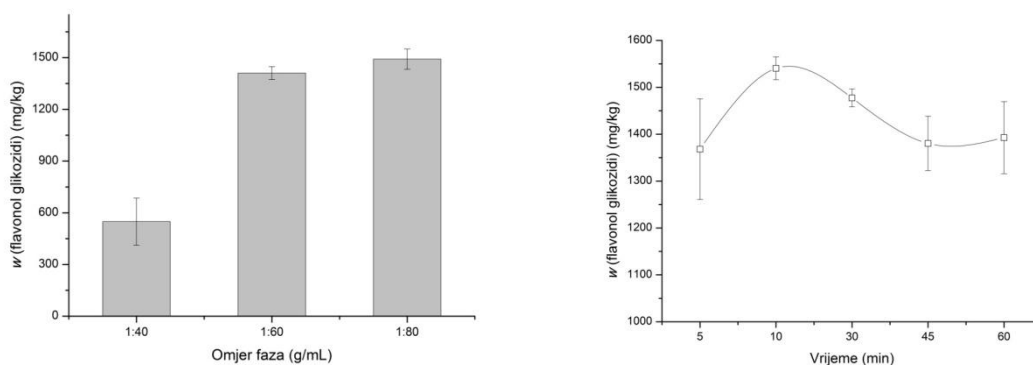
#### 4.1. Preliminarna ispitivanja za mikrovalnu ekstrakciju

Cilj ovog rada je ekstrakcija polifenola iz kože grožđa. U uvodu je spomenuto da postoje mnoge metode ekstrakcije. Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku efikasnost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te vremena koje takve metode zahtijevaju. Posljednjih se godina istražuju brojne alternativne metode ekstrakcije od kojih je jedna i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Istraživanja vezana uz ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala primjenom mikrovalnog zračenja tek su u začetku, tako da postoji tek mali broj objavljenih radova vezanih uz tu tematiku. Prije postavljanja razina faktora u eksperimentalnom dizajnu potrebno je provesti preliminarna. U ovim istraživanjima kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 20 %-tna vodena otopina acetonitrila u koju je bilo dodano i 1 % mravlje kiseline, dok je temperatura ekstrakcije bila 50 °C. Dobiveni ekstrakti polifenola iz kože grožđa analizirali su se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s primjenom detektora s nizom dioda (DAD), te fluorescencijskim detektorom (FLD). U Tablici 5 nalaze se određivani polifenoli s karakterističnim valnim duljinama pomoću kojih se očitavaju iz kromatograma. Na slici 26 prikazani su kromatogrami polifenola pri valnoj duljini od: A)  $\lambda = 518$  nm; B)  $\lambda = 360$  nm; C)  $\lambda_{\text{ex}} = 225$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 320$  nm.

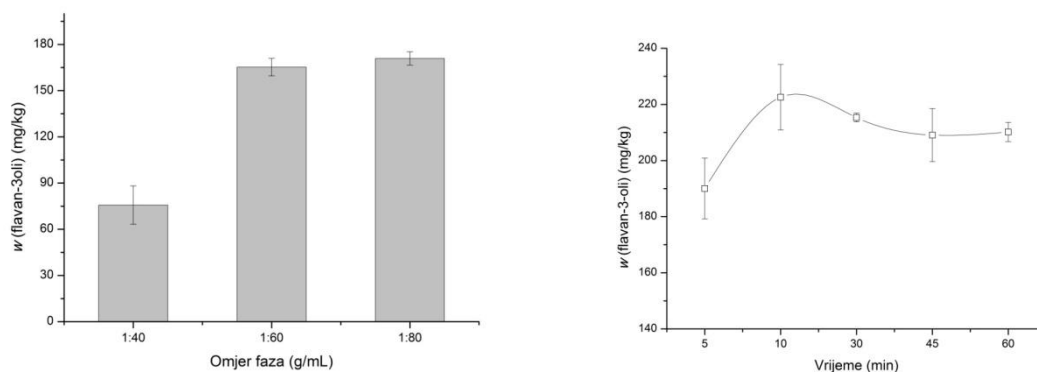
Slike 23, 24 i 25 prikazuju preliminarna istraživanja kojima se određivao optimalan omjer faza (uzorak/ekstrakcijsko otapalo) 1:40 g/mL (125 mg uzorka + 20 mL otapala), 1:60 g/mL (165 mg uzorka + 10 mL otapala) te 1:80 g/mL (125 mg uzorka + 10 mL otapala). Omjer mase uzorka i volumena ekstrakcijskog otapala važan je faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije. On je izravno povezan s principom prijenosa mase. Pokretačka sila tijekom prijenosa mase unutar čvrstine je gradijent koncentracije, koji je to veći što je ispitani omjer faza veći jer dolazi do povećanja brzine difuzije. Prilikom povećanja omjera faza s 1:40 g/mL na 60 g/mL dolazi do značajnog povećanja masenog udjela svih ispitanih skupina spojeva u dobivenim ekstraktima kao i do značajnog smanjenja standardnog odstupanja. Daljnim povećanjem omjera faza opaženo je povećanje masenog udjela svih ispitanih spojeva, ali to povećanje nije bilo toliko značajno kao u prvom slučaju. Temeljem dobivenih rezultata u daljnjim eksperimentima korišten je omjer faza od 1:80 g/mL.



**Slika 23.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio antocijana (mg/kg) u ovisnosti o omjeru faza (g/mL) i vremenu (min)



**Slika 24.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio flavonola (mg/kg) u ovisnosti o omjeru faza (g/mL) i vremenu (min)

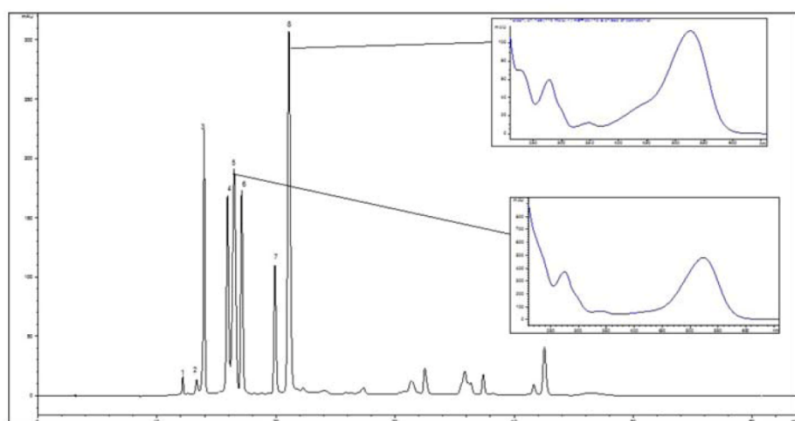


**Slika 25.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio flavan-3-ol (mg/kg) u ovisnosti o omjeru faza (g/mL) i vremenu (min)

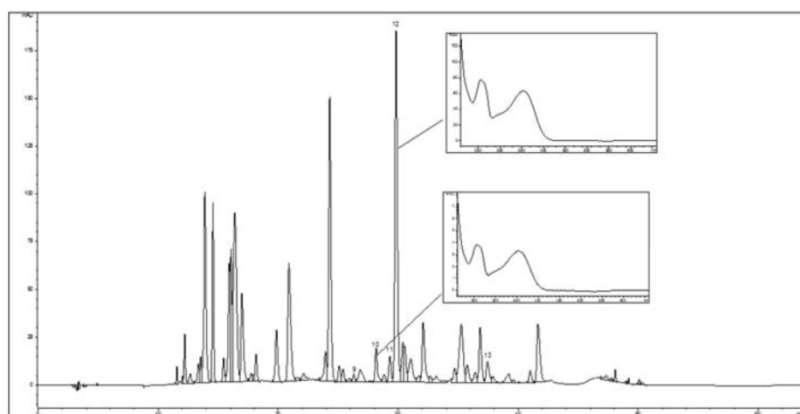
Osim optimalnog omjera faza, određivalo se optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije: 5, 10, 15, 30, 45 i 60 min pri temperaturi od 50 °C uz omjer faza od 1:80 g/mL. Značajno povećanje sadržaja antocijana, flavonola i flavan-3-ola opaženo je produžetkom trajanja ekstrakcije s 5 na 10 min. U vremenskom periodu između 10 i 60 min dolazi do vrlo malog smanjenje sadržaja flavonola i flavan-3-ola, dok je smanjenje sadržaja antocijana posebno izraženo nakon 30 min ekstrakcije (Slike 23-25). Ovo opažanje se može pripisati izrazitoj termičkoj nestabilnosti antocijana. Termička je nestabilnost posebno izražena pri temperaturama višim od 50 °C. Temeljem dobivenih rezultata, u eksperimentalnom dizajnu odabran vremenski period u rasponu od 5 do 30 min.



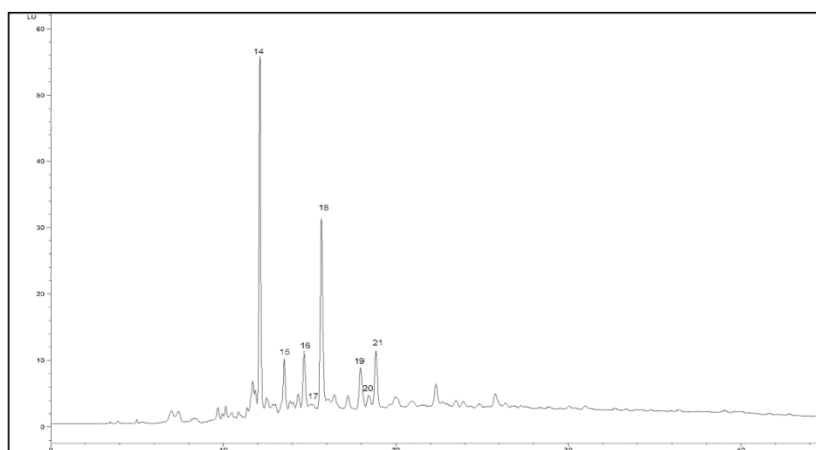
A)



B)



C)



**Slika 26.** HPLC profil ekstrakta kože gr̄zda sorte Regent. Kromatogrami su snimljeni na: A)  $\lambda = 518$  nm; B)  $\lambda = 360$  nm; C)  $\lambda_{\text{ex}} = 225$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 320$  nm. Za oznake kromatografskih krivulja vidjeti Tablicu 5.

**Tablica 5.** Parametri valnih duljina za određivanje polifenolnih spojeva

|     | <b>Spoj</b>                 | <b>Skraćenica</b> | <b>DAD<br/><math>\lambda/\text{nm}</math></b> | <b>FLD<br/><math>\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}</math><br/><math>\lambda_{\text{em}}/\text{nm}</math></b> | <b><math>\lambda_{\text{max}}/\text{nm}</math></b> |
|-----|-----------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1.  | Delfinidin-3,5-O-diglukozid | Del-dglc          | 518                                           |                                                                                                          | 277, 525                                           |
| 2.  | Cijanidin-3,5-O- diglukozid | Cy-dglc           | 518                                           |                                                                                                          | 279, 516                                           |
| 3.  | Delfinidin -3-O- glukozid   | Del-glc           | 518                                           |                                                                                                          | 277, 342, 524                                      |
| 4.  | Peonidin-3,5-O- diglukozid  | Pd-dglc           | 518                                           |                                                                                                          | 280, 516                                           |
| 5.  | Malvidin-3,5-O- diglukozid  | Mv-dglc           | 518                                           |                                                                                                          | 275, 524                                           |
| 6.  | Cijanidin-3-O-glukozid      | Cy-dglc           | 518                                           |                                                                                                          | 279, 516                                           |
| 7.  | Peonidin-3-O-glukozid       | Pd-glc            | 518                                           |                                                                                                          | 280, 517                                           |
| 8.  | Malvidin-3-O-glukozid       | Mv-dglc           | 518                                           |                                                                                                          | 277, 348, 528                                      |
| 9.  | Miricetin-3-O-glukozid      | My-glc            | 360                                           |                                                                                                          | 261,300(s),349                                     |
| 10. | Rutin                       | Rut               | 360                                           |                                                                                                          | 256, 264 (s), 300 (s), 353                         |
| 11. | Kvercetin-3-O-glukozid      | Q-glc             | 360                                           |                                                                                                          | 256, 265 (s), 295(s), 353                          |
| 12. | Kempferol- 3-O- glukuronid  | K-glur            | 360                                           |                                                                                                          | 265,300(s),346                                     |
| 13. | Izoramnetin-3-O- glukozid   | I-glc             | 360                                           |                                                                                                          | 255, 265(s), 297(s), 354                           |
| 14. | Galokatehin                 | GC                | 280                                           | 225; 320                                                                                                 | 274                                                |
| 15. | Procianidin B1              | B1                | 280                                           | 225; 320                                                                                                 | 280                                                |

|     |                 |     |     |          |     |
|-----|-----------------|-----|-----|----------|-----|
| 16. | Epigalokatehin  | EGC | 280 | 225; 320 | 278 |
| 17. | Procijanidin B3 | B3  | 280 | 225; 320 | 279 |
| 18. | Katehin         | CAT | 280 | 225; 320 | 279 |
| 19. | Procijanidin B2 | B2  | 280 | 225; 320 | 280 |
| 20. | Procijanidin B4 | B4  | 280 | 225; 320 | 280 |
| 21. | Epikatehin      | EC  | 280 | 225; 320 | 279 |

#### 4.2. Optimizacija uvjeta mikrovalne ekstrakcije

Preliminarnim istraživanjima dobiven je najbolji omjer faza 1:80 g/mL (125 mg uzorka + 10 mL ekstrakcijskog otapala), te optimalan raspon trajanja ekstrakcije (5-30 min). U tablici 6 prikazani su korišteni faktori i eksperimentalni podaci za 28 pokusa uključujući i tri ponavljanja u središnjoj točki eksperimentalnog dizajna za oba ekstrakcijska otapala na uzorku kože grožđa u određivanju vrste polifenola za MAE 1 i MAE 2 inačice eksperimentalnog dizajna.

**Tablica 6.** Pokusi provedeni u sklopu optimizacije MAE 1 Box-Behnkenovim dizajnom

| Redni broj | Udio organske faze (%) | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Otapala | Antocijani (mg/kg) | Flavonoli (mg/kg) | Flavan-3-oli (mg/kg) |
|------------|------------------------|------------------|---------------|---------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 1          | 50                     | 60               | 30            | EtOH    | 10985,10           | 1419,13           | 308,18               |
| 2          | 80                     | 40               | 17,5          | ACN     | 11065,70           | 1485,70           | 263,24               |
| 3          | 80                     | 40               | 17,5          | EtOH    | 11207,00           | 1438,72           | 253,88               |
| 4          | 50                     | 40               | 30            | ACN     | 11550,80           | 1520,24           | 229,53               |
| 5          | 20                     | 60               | 17,5          | ACN     | 10680,20           | 1350,98           | 299,25               |
| 6          | 20                     | 50               | 5             | ACN     | 10340,20           | 1416,73           | 285,05               |
| 7          | 80                     | 60               | 17,5          | EtOH    | 11383,70           | 1525,20           | 268,30               |
| 8          | 80                     | 50               | 5             | EtOH    | 11138,50           | 1461,00           | 261,04               |
| 9          | 50                     | 40               | 5             | EtOH    | 12730,50           | 1583,27           | 281,23               |
| 10         | 20                     | 60               | 17,5          | EtOH    | 9382,57            | 1278,87           | 326,52               |
| 11         | 20                     | 40               | 17,5          | ACN     | 11411,30           | 1420,56           | 212,13               |
| 12         | 50                     | 60               | 5             | ACN     | 11825,70           | 1430,89           | 315,96               |
| 13         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 11757,50           | 1483,51           | 287,66               |
| 14         | 50                     | 40               | 30            | EtOH    | 12129,70           | 1508,16           | 243,54               |
| 15         | 20                     | 50               | 5             | EtOH    | 9858,16            | 1264,88           | 249,03               |
| 16         | 20                     | 50               | 30            | ACN     | 11437,90           | 1397,37           | 252,97               |
| 17         | 80                     | 50               | 30            | ACN     | 12667,00           | 1489,51           | 227,76               |
| 18         | 50                     | 40               | 5             | ACN     | 11966,50           | 1488,48           | 192,27               |
| 19         | 50                     | 60               | 5             | EtOH    | 11698,00           | 1481,21           | 303,30               |
| 20         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 11750,30           | 1466,59           | 256,04               |
| 21         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 11853,20           | 1547,66           | 216,98               |
| 22         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 12317,00           | 1455,98           | 215,13               |
| 23         | 80                     | 50               | 5             | ACN     | 10912,40           | 1336,43           | 218,45               |
| 24         | 20                     | 50               | 30            | EtOH    | 10455,20           | 1290,79           | 212,04               |
| 25         | 50                     | 60               | 30            | ACN     | 11599,40           | 1372,30           | 281,47               |
| 26         | 80                     | 60               | 17,5          | ACN     | 11864,90           | 1513,40           | 234,58               |
| 27         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 12031,70           | 1449,00           | 249,38               |
| 28         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 11523,80           | 1343,11           | 290,44               |

**Tablica 7.** Pokusi provedeni u sklopu optimizacije MAE 2 Box-Behnkenovim dizajnom

| Redni broj | Udio organske faze (%) | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Otapala | Antocijani (mg/kg) | Flavonoli (mg/kg) | Flavan-3-oli (mg/kg) |
|------------|------------------------|------------------|---------------|---------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 1          | 50                     | 60               | 30            | EtOH    | 10985,10           | 1419,13           | 308,18               |
| 2          | 80                     | 40               | 17,5          | ACN     | 11065,70           | 1485,70           | 247,24               |
| 3          | 80                     | 40               | 17,5          | EtOH    | 11207,00           | 1464,72           | 283,88               |
| 4          | 50                     | 40               | 30            | ACN     | 11654,60           | 1520,24           | 229,53               |
| 5          | 20                     | 60               | 17,5          | ACN     | 10680,20           | 1350,98           | 315,71               |
| 6          | 20                     | 50               | 5             | ACN     | 10340,20           | 1416,73           | 285,05               |
| 7          | 80                     | 60               | 17,5          | EtOH    | 11383,70           | 1525,20           | 268,30               |
| 8          | 80                     | 50               | 5             | EtOH    | 11138,50           | 1461,00           | 261,04               |
| 9          | 50                     | 40               | 5             | EtOH    | 12636,60           | 1538,27           | 281,23               |
| 10         | 20                     | 60               | 17,5          | EtOH    | 9382,57            | 1278,87           | 326,52               |
| 11         | 20                     | 40               | 17,5          | ACN     | 11411,30           | 1420,56           | 212,13               |
| 12         | 50                     | 60               | 5             | ACN     | 11825,70           | 1430,89           | 315,96               |
| 13         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 11757,50           | 1483,51           | 287,66               |
| 14         | 50                     | 40               | 30            | EtOH    | 12129,70           | 1508,16           | 243,54               |
| 15         | 20                     | 50               | 5             | EtOH    | 10230,80           | 1358,88           | 249,03               |
| 16         | 20                     | 50               | 30            | ACN     | 11437,90           | 1397,37           | 252,98               |
| 17         | 80                     | 50               | 30            | ACN     | 11902,00           | 1489,51           | 227,76               |
| 18         | 50                     | 40               | 5             | ACN     | 11966,50           | 1488,48           | 220,65               |
| 19         | 50                     | 60               | 5             | EtOH    | 11698,00           | 1481,21           | 303,30               |
| 20         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 11750,30           | 1466,59           | 256,04               |
| 21         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 11853,20           | 1475,66           | 216,98               |
| 22         | 50                     | 50               | 17,5          | ACN     | 12317,00           | 1455,98           | 215,13               |
| 23         | 80                     | 50               | 5             | ACN     | 10912,40           | 1379,77           | 218,45               |
| 24         | 20                     | 50               | 30            | EtOH    | 10455,20           | 1290,79           | 219,04               |
| 25         | 50                     | 60               | 30            | ACN     | 11599,40           | 1472,20           | 281,47               |
| 26         | 80                     | 60               | 17,5          | ACN     | 11864,90           | 1513,40           | 234,58               |
| 27         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 12031,70           | 1449,00           | 249,38               |
| 28         | 50                     | 50               | 17,5          | EtOH    | 11523,80           | 1443,11           | 290,44               |

Obradom rezultata za optimizaciju uvjeta mikrovalne ekstrakcije polifenola, dobivene su dvije verzije eksperimentalnog dizajna s optimalnim vrijednostima: MAE 1 i MAE 2. MAE 1 se odnosi na neprilagođene podatke koji su dobiveni kao srednje vrijednosti bez da je gledano da li su podaci u skladu s očekivanim vrijednostima. MAE 2 se odnosi na djelomično korigirane vrijednosti gdje je za većinu pokusa uzeta srednja vrijednost dok je za neke pokuse uzeta ona vrijednost koja bolje odgovara eksperimentalnom dizajnu.

Prilagođavanje podataka različitim modelima pokazalo je da se ukupni sadržaj antocijana, flavonola i flavan-3-ola u kožici grožđa može najbolje opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom (1). Signifikantnost modela kao i svakog regresijskog koeficijenta određena je analizom varijance (ANOVA). Primjenom povratne eliminacije uklonjeni su statistički neznčajni članovi. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ),  $p$ -vrijednosti za model te za njegovu neprikladnost, prilagođeni  $R^2$  i predviđeni  $R^2$  kao i preciznost, parametri su koji opisuju prikladnost modela. Da bi model bio prikladan  $p$ -vrijednost mora biti manja od 0,05 dok  $p$ -

vrijednost neprikladnosti modela mora biti veća od 0,05. Razlika između vrijednosti prilagođenog  $R^2$  i predviđenog  $R^2$  mora biti manja od 0,2. Vrijednost veća od 0,2 može upućivati na veliki učinak bloka ili mogući problem s podacima i/ili modelom. Preciznost je mjera omjera signala i šuma te su poželjne njezine vrijednosti veće od 4. Analize varijance za dobivene inačice modela navedene su u Tablicama 8 i 9. Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) za MAE 1 bili su u rasponu od 0,69 do 0,79, a za MAE 2 od 0,82 do 0,92 dok su  $p$ -vrijednosti za modele MAE 1 i MAE 2 bile u rasponu od  $< 0,0001$  pa do 0,0083 što ukazuje na visoku signifikantnost svih četiriju modela. Veće vrijednosti koeficijenata determinacije za MAE 2 mogu ukazivati na to da navedena inačica modela bolje opisuje ekstrakciju polifenola iz kožica grožđa. Modeli također imaju statistički beznačajnu neprikladnost modela jer su u sva četiri slučaja  $p$ -vrijednosti veće od 0,17, osim za slučaj MAE 1 kod antocijana gdje je neprikladnost modela 0,16. Najznačajniji koeficijenti kvadratnih jednadžbi na temelju kojih su izrađene površine odziva dobivenih modela prikazani su u Tablicama 8 i 9.

**Tablica 8.** Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene modele MAE 1

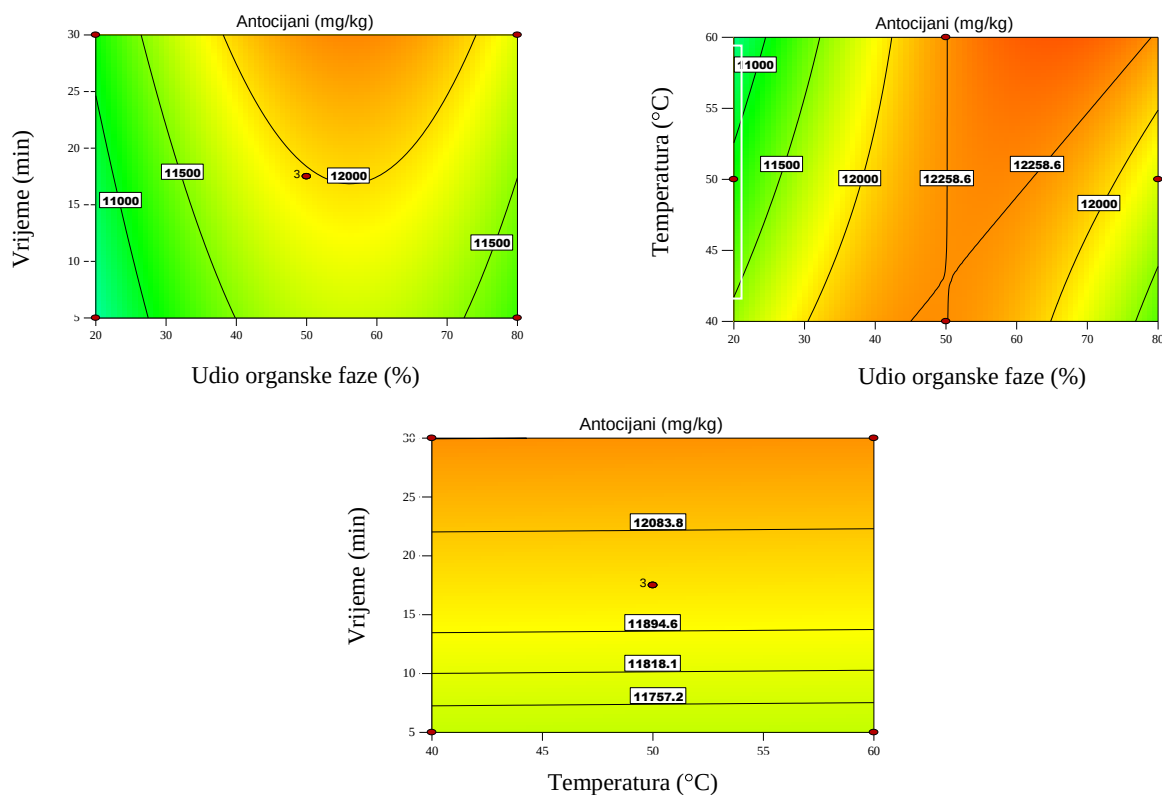
| Odzivi                                     | Sadržaj antocijana | Sadržaj flavonola | Sadržaj flavan-3-ola |
|--------------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Odsječak                                   | 11837,08           | 1452,65           | 254,36               |
| A: Udio organske faze                      | 416,29             | 57,14             | -2,94                |
| B: Temperatura                             | -248,49            | -29,26            | 28,48                |
| C: Vrijeme                                 | 104,75             | 0,87              | -5,13                |
| D: Otapalo                                 | -143,54            | -9,72             | 10,29                |
| AB                                         | 457,28             | 37,48             | -27,72               |
| AC                                         |                    | 20,61             | 10,76                |
| AD                                         | 86,25              | 27,21             | 10,23                |
| BD                                         | -245,48            |                   |                      |
| CD                                         | -171,54            | -12,49            |                      |
| $A^2$                                      | -808,36            | -56,89            | -8,79                |
| $B^2$                                      | -496,98            | 26,55             | 13,75                |
| $C^2$                                      | 209,50             | 0,76              | -26,32               |
| MODEL ( $p$ -vrijednost)                   | 0,0002             | 0,0083            | 0,0016               |
| Neprikladnost modela<br>( $p$ -vrijednost) | 0,1587             | 0,6579            | 0,5480               |
| $R^2$                                      | 0,79               | 0,69              | 0,72                 |
| Prilagođeni $R^2$                          | 0,45               | 0,12              | 0,32                 |
| Preciznost                                 | 10,81              | 7,44              | 8,10                 |

**Tablica 9.** Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene modele MAE 2

| Odzivi                                          | Sadržaj antocijana | Sadržaj flavonola | Sadržaj flavan-3-ola |
|-------------------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Odsječak                                        | 11890,64           | 1462,38           | 254,75               |
| A: Udio organske faze                           | 322,10             | 55,77             | -3,22                |
| B: Temperatura                                  | -260,15            | -22,64            | 26,97                |
| C: Vrijeme                                      | 33,97              | 2,33              | -6,26                |
| D: Otapalo                                      | -112,73            | -5,30             | 10,60                |
| AB                                              | 479,37             | 35,86             | -31,76               |
| AC                                              |                    | 28,91             | 10,29                |
| AD                                              | 87,69              | 20,42             | 14,01                |
| BD                                              | -244,16            |                   |                      |
| CD                                              | -159,67            | -18,10            |                      |
| A <sup>2</sup>                                  | -841,19            | -51,29            | -8,19                |
| B <sup>2</sup>                                  | -446,96            | 19,89             | 16,63                |
| C <sup>2</sup>                                  | -92,48             | 5,43              | 39,19                |
| MODEL ( <i>p</i> -vrijednost)                   | < 0,0001           | < 0,0001          | < 0,0001             |
| Neprikladnost modela<br>( <i>p</i> -vrijednost) | 0,3574             | 0,2249            | 0,8495               |
| R <sup>2</sup>                                  | 0,86               | 0,92              | 0,82                 |
| Prilagođeni R <sup>2</sup>                      | 0,62               | 0,70              | 0,64                 |
| Preciznost                                      | 13,30              | 16,54             | 10,91                |

Najznačajniji faktor u svim ispitanim slučajevima bio je udio organske faze u ekstrakcijskom otapalu. Povećavanjem udjela organske faze opaženo je značajno povećanje masenog udjela antocijana, te flavonola. Temperatura ekstrakcije je najznačajniji faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije flavan-3-ola. Povišenjem temperature dolazi do povećanja topljivosti ove skupine spojeva jer dolazi do smanjenja viskoznosti otapala. Neka su istraživanja pokazala da je ova skupina spojeva vrlo stabilna pri visokim temperaturama. Navedena opažanja mogu se objasniti građom bobice grožđa kao i položajem samih polifenola unutar bobice grožđa te njihovom fizikalno-kemijskim svojstvima. Važan su faktor i vrijeme ekstrakcije i vrsta korištene organske faze. Vrijeme ekstrakcije za postizanje maksimalne učinkovitosti ekstrakcije značajno se razlikuje za ispitane skupine spojeva. Međudjelovanje ekstrakcijskih faktora određeno je iz grafova kontura (engl. *Conotur plots*). Kružni oblik kontura znači da su međudjelovanja između odgovarajućih faktora zanemariva dok eliptični oblik kontura ukazuje na vrlo značajno međudjelovanje između odgovarajućih faktora [41]. Opaženo je da za sve ispitane skupine

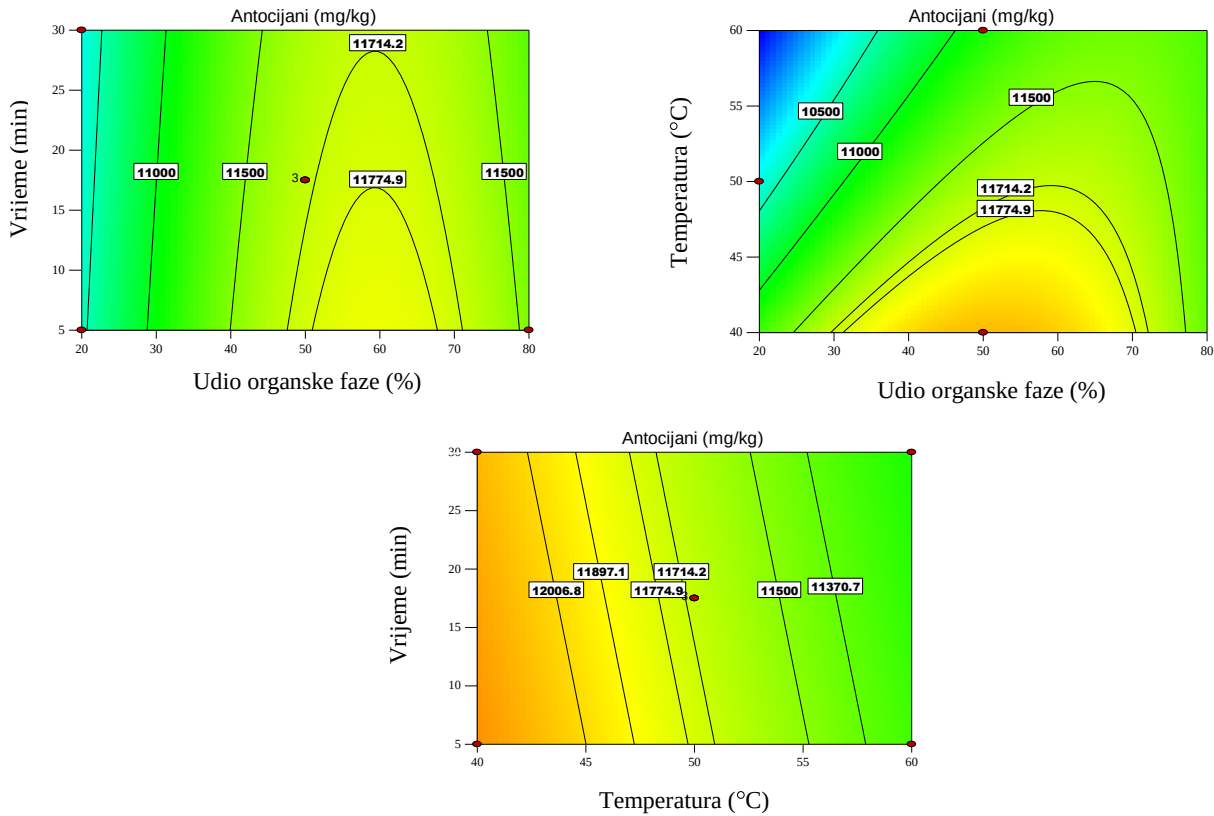
spojeva postoji značajno međudjelovanje između različitih ekstrakcijskih faktora koje su opisane na dolje priloženim slikama za slučajeve MAE 1 i MAE 2.



**Slika 27.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

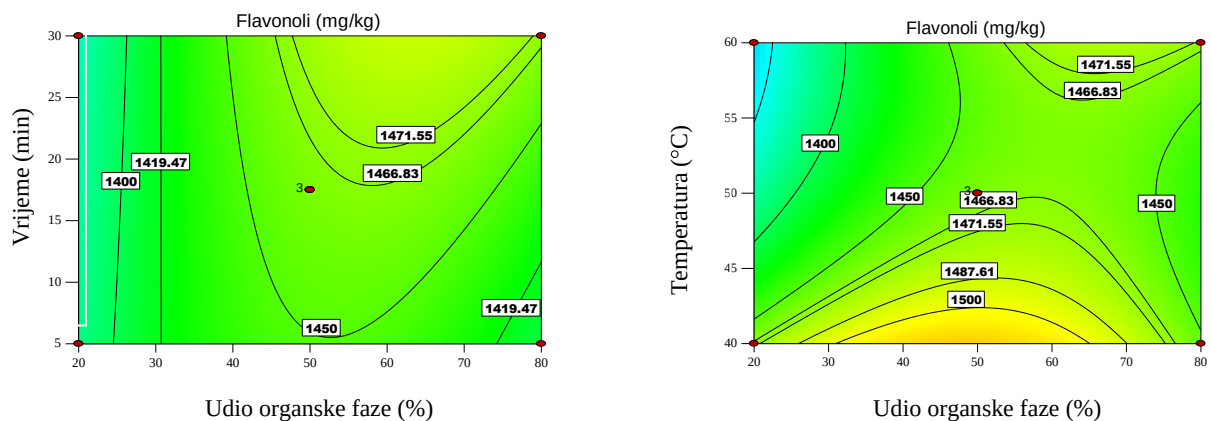
Primjenom eksperimentalnog dizajna dobivena je ovisnost udjela acetonitrila pri različitoj temperaturi i vremenu (Slika 27). Međudjelovanje između udjela acetonitrila i temperature ima značajan učinak na učinkovitost ekstrakcije antocijana kože grožđa što je vidljivo iz eliptičnog oblika konture. Povećanjem udjela acetonitrila do 55 % te istovremenim povećanjem trajanja ekstrakcije dolazi do značajnog povećanja masenog udjela antocijana u dobivenim ekstraktima. Međudjelovanja između udjela organske faze i temperature te temperature i vremena nisu značajna.

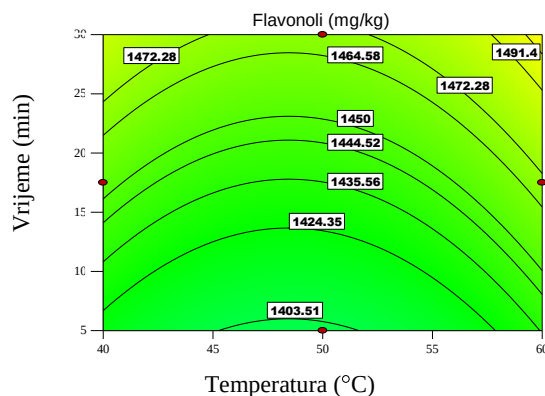




**Slika 28.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijom otapalu koje sadrži etanol

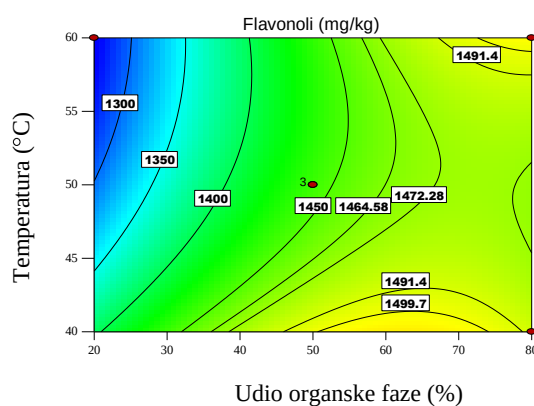
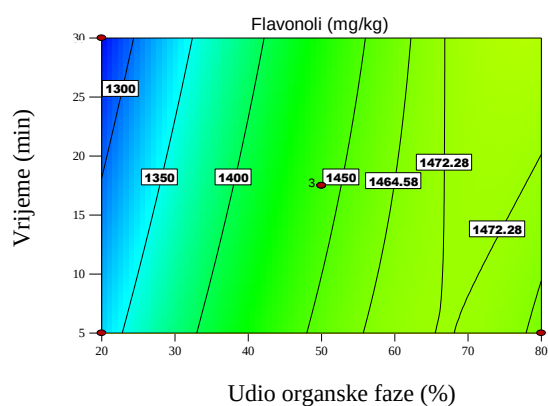
Prema dobivenim konturama, može se zaključiti da se antocijani u većoj mjeri ekstrahiraju pri većem udjelu organske faze, kraćem vremenu i manjoj temperaturi sustava (Slika 28).

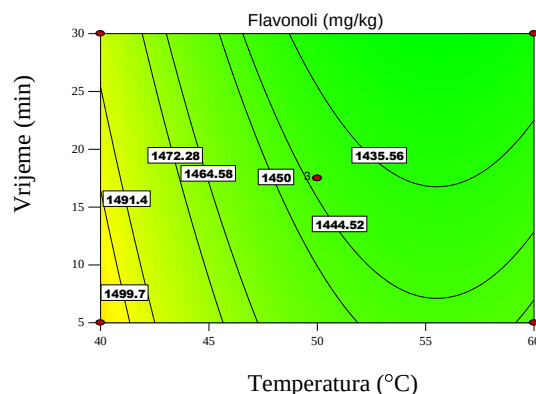




**Slika 29.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

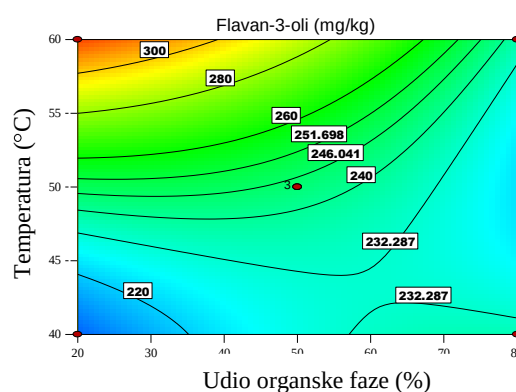
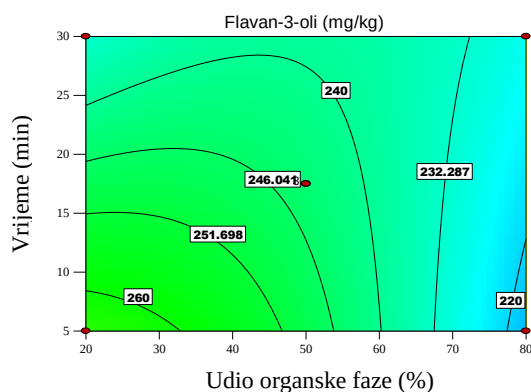
Prema dobivenim konturama, može se zaključiti da postoje značajni interakcijski učinci triju faktora jer kao rezultat dobivamo elipse. Produžetkom trajanja ekstrakcije zajedno s povećanjem udjela organskog otapala (acetonitril) do približno 55 % značajno se povećava učinkovitost ekstrakcije flavonola. Pri udjelu otapala u rasponu od 30 do 65 % najveći udio ove skupine spojeva dobiva se u ekstraktima dobivenim pri nižim temperaturama (40 - 45 °C). Ovakvo se opažanje može objasniti termičkom labilnošću ove skupine spojeva te eventualno hidrolizom šećerne skupine u kiselom mediju (Slika 29).

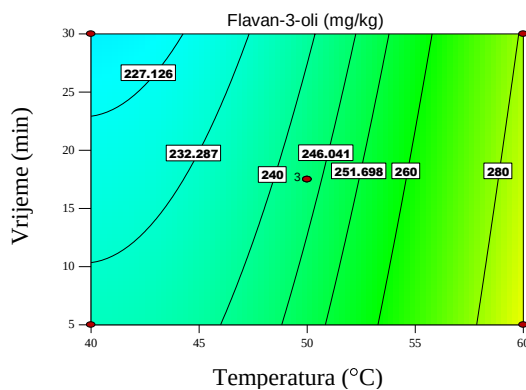




**Slika 30.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakciji otapala koje sadrži etanol

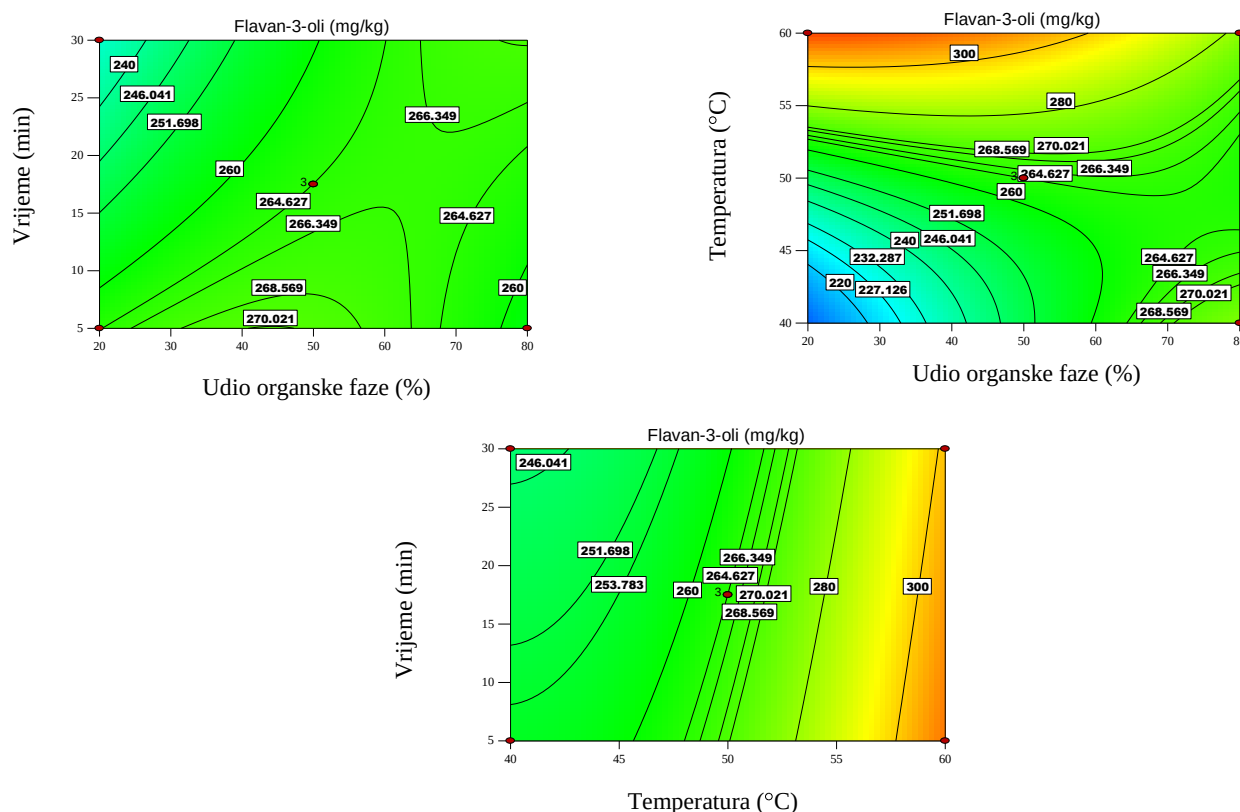
Pratila se međusobna ovisnost triju faktora, udjela organske faze, temperature i trajanja ekstrakcije. Prema dobivenim konturama, može se zaključiti da povećanjem temperature (45 - 50 °C) uz istovremeno povećanje udjela etanola (50 %) dovodi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije flavonola. Produžetkom trajanja ekstrakcije zajedno s povećanjem udjela organskog otapala do približno 55 % značajno se povećava sadržaj flavonola u dobivenom ekstraktu. Pri udjelu otapala u rasponu od 30 do 65 % najveći sadržaj ove skupine spojeva dobiva se u ekstraktima dobivenim pri višim temperaturama (45 - 50 °C).





**Slika 31.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-ole u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

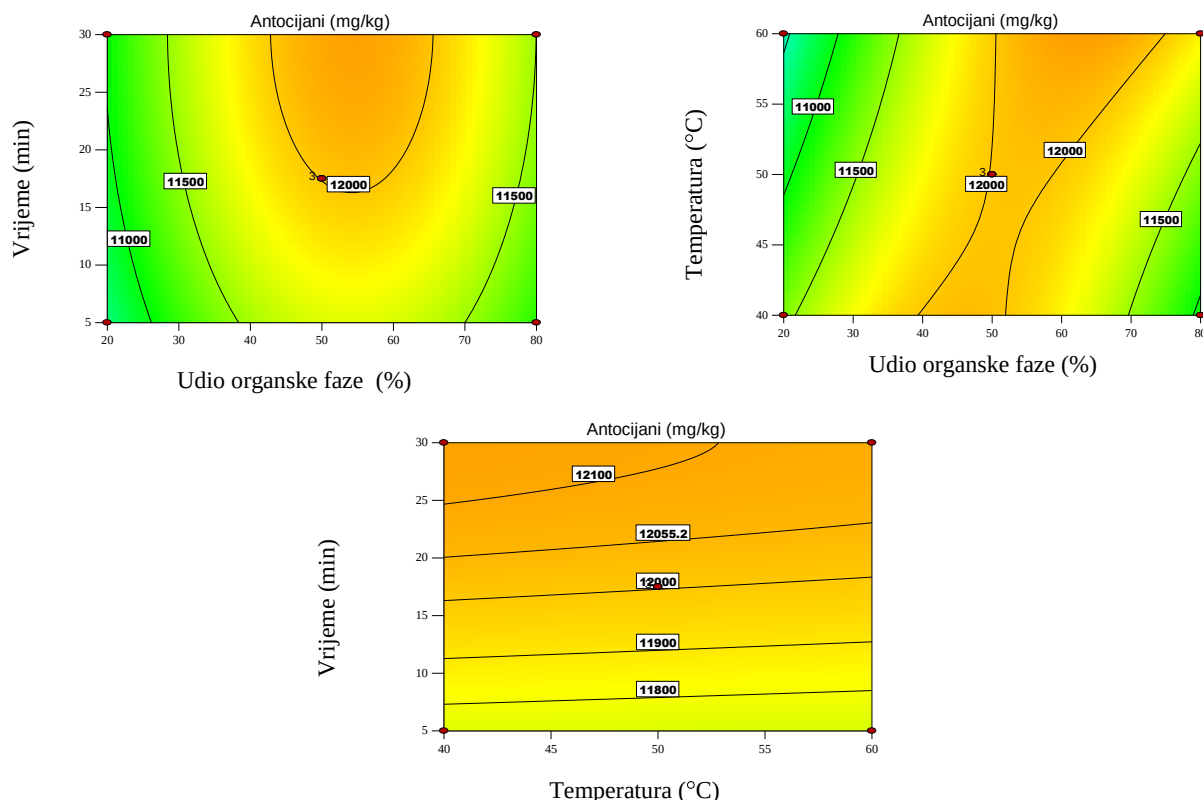
Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da povećanjem vremena (5-20 min) i udjela organske faze (55 %) dolazi do povećavanja učinka ekstrakcije flavan-3-ola. Dok je interakcijski učinak između temperature i ostala dva ispitana faktora (vrijeme i udjela organske faze) je zanemariv (Slika 31).



**Slika 32.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-oli u ekstrakcijom otapalu koje sadrži etanol

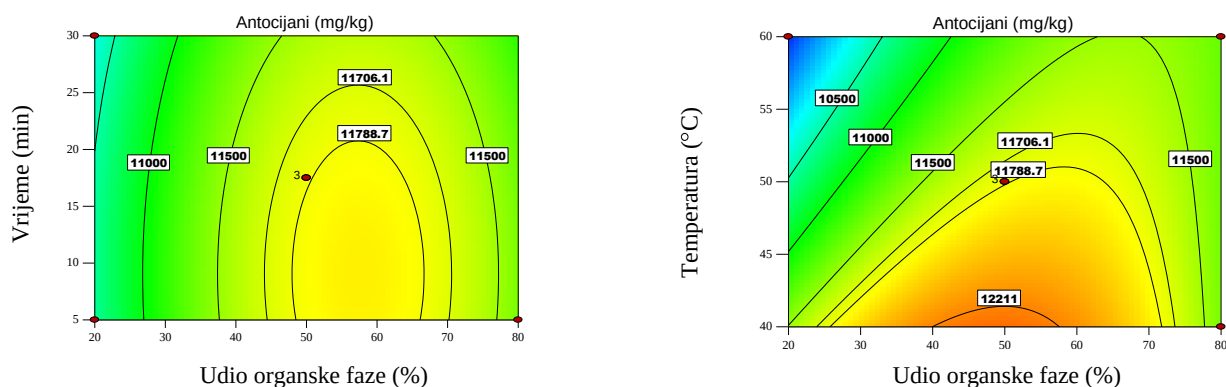
Na Slici 32 prikazani grafovi kontura koji prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore, a koji utječu na ekstrakciju flavan-3-ola ekstrakcijskom otapalu koje sadrži etanol. Prema

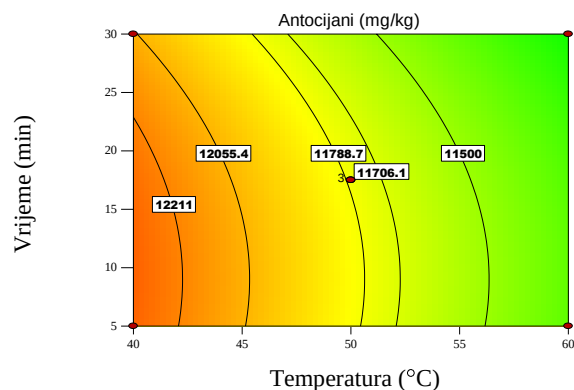
dobivenim konturama, može se zaključiti da povećanjem vremena (15-20 min) uz istovremeno smanjenje udjela etanola povećava se učinak ekstrakcije flavan-3-ola. Pri udjelu organskog otapala u rasponu od 30 do 65 % najveći sadržaj ove skupine spojeva dobiva se u ekstraktima ekstrahiranim pri nižim temperaturama (40 - 50 °C).



**Slika 33.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

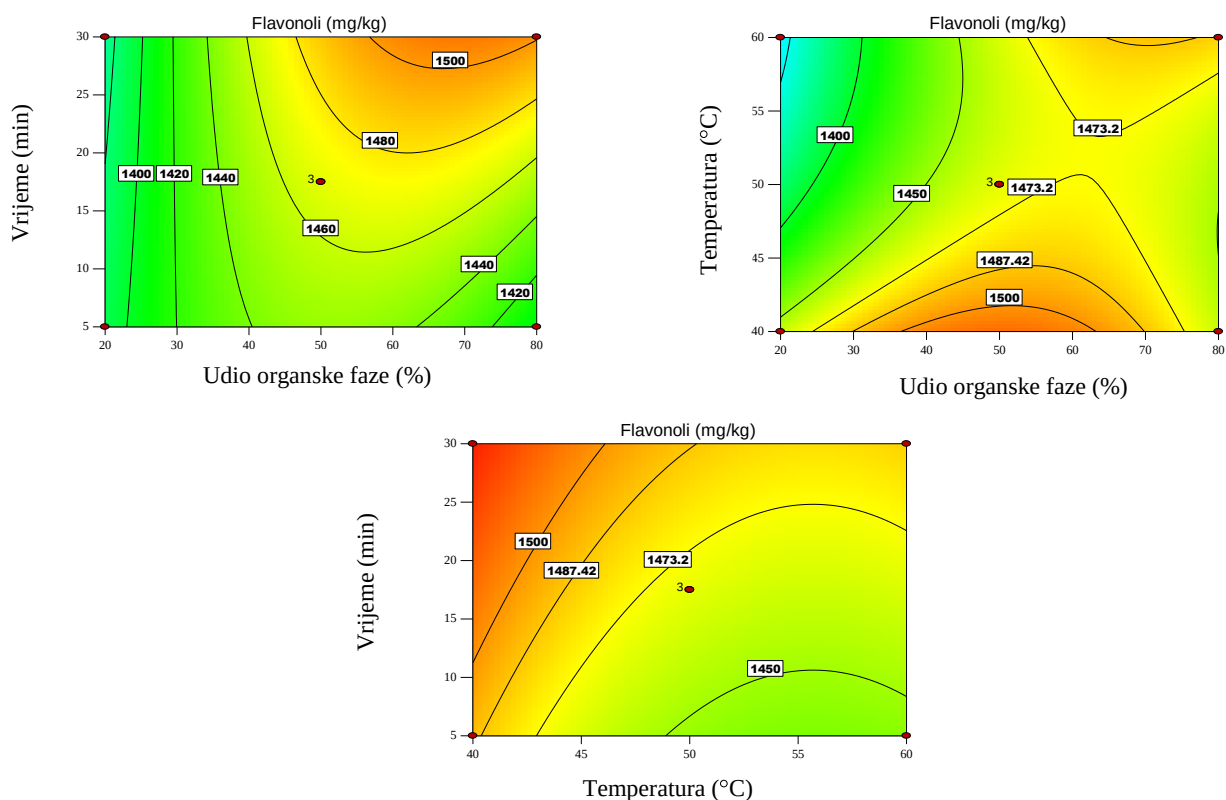
Prema prikazanim konturama, može se zaključiti da dolazi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije antocijana povećanjem vremena (15 - 20 min) i udjela acetonitrila (45 - 50 %) . Interakcijski učinak između vremena i temperature ekstrakcije nije statistički signifikantan (Slika 33).





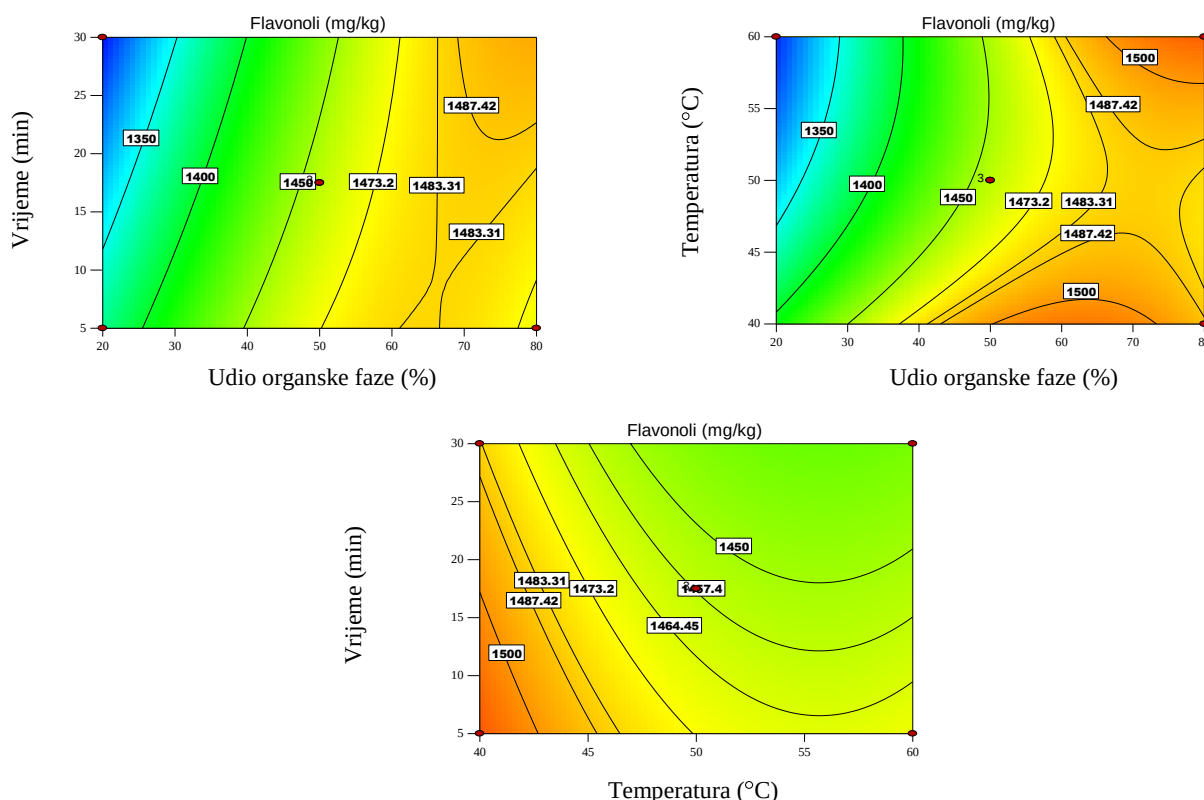
**Slika 34.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijom otapalu koje sadrži etanol

Prema prikazanim konturama, može se zaključiti da povećanjem vremena (15-20 min), uz istovremeno povećanje udjela etanola (50 %) pozitivno utječe na učinkovitost ekstrakcije antocijana, dok povišenje temperature uz istovremeno povećanje udjela etanola negativno utječe na ekstrakciju antocijana. Povećanjem vremena ekstrakcije uz istovremeno sniženje temperature povećava se učinkovitost ekstrakcije ove skupine spojeva primjenom etanola kao organske faze u ekstrakcijskom otapalu (Slika 34).



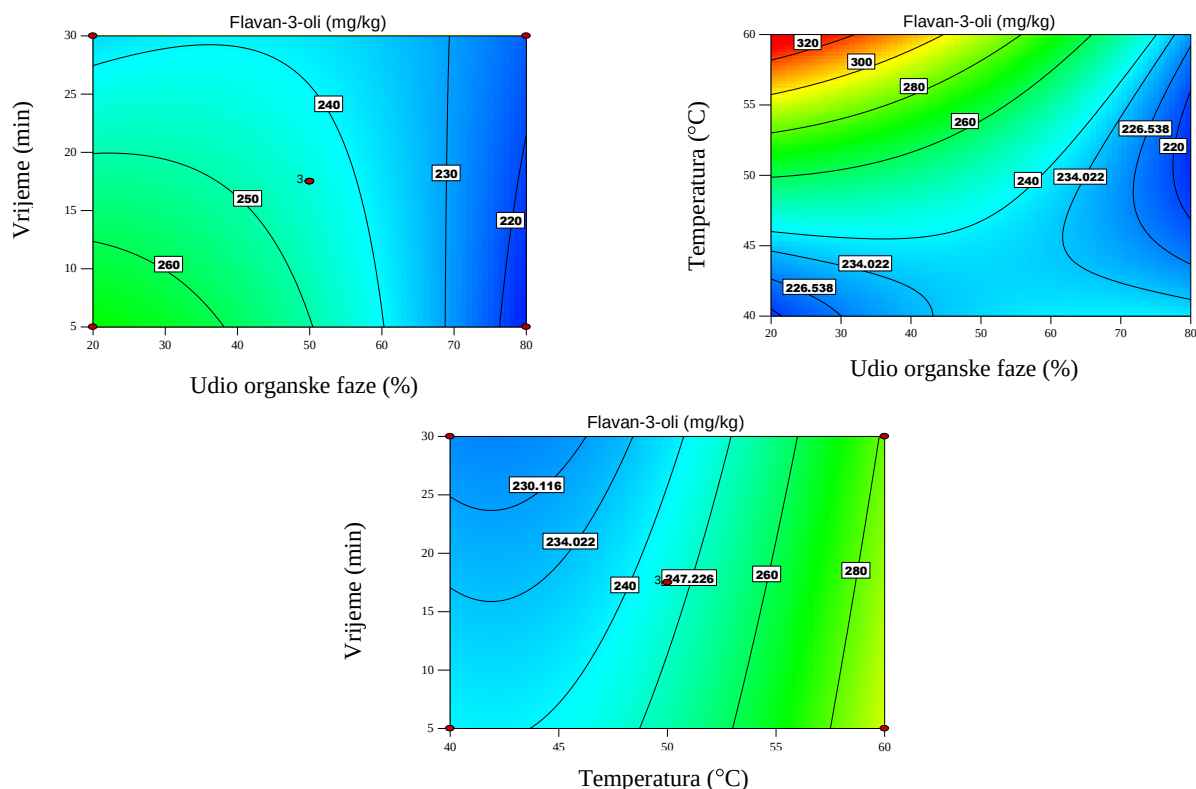
**Slika 35.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

Pratila se međusobna ovisnost triju faktora, vremena i temperature ekstrakcije te udjela acetonitrila u ekstrakcijskom otapalu. Prema dobivenim konturama, može se zaključiti da povećanjem vremena (15-20 min) i udjela organske faze (45-50 %) dolazi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije flavonola iz kože grožđa. Prilikom povišenja temperature uz istovremeno povećanje udjela acetonitrila dolazi do smanjenja učinkovitosti, tj. veća učinkovitost ekstrakcije se postiže pri nižoj temperaturi i većem udjelu acetonitrila. Produžetak trajanja ekstrakcije uz istovremeno smanjenje temperature pozitivno utječe na učinkovitost flavonola iz kože grožđa (Slika 35).



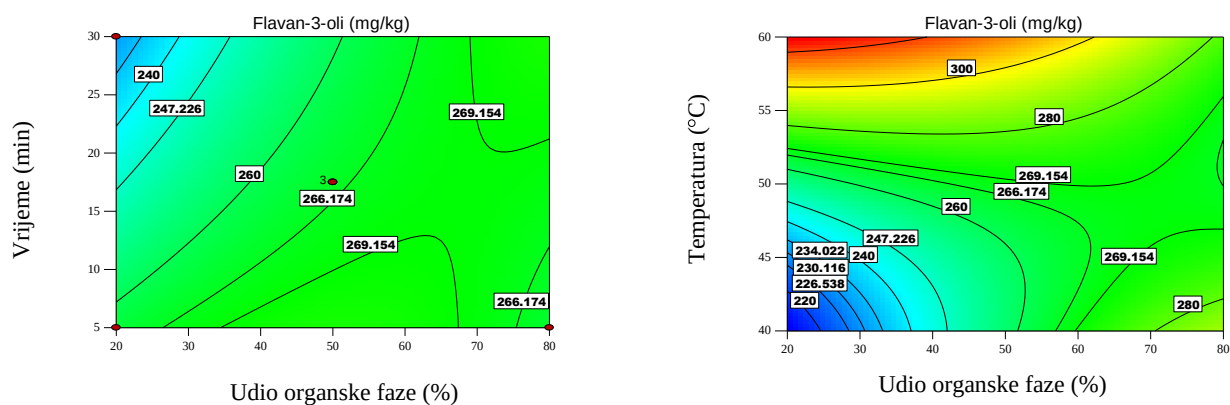
**Slika 36.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijom otapalu koje sadrži etanol

Prema dobivenim konturama, može se zaključiti da povećanjem vremena i temperature, a smanjenjem udjela etanola (50 %) postizemo značajan pozitivan učinak na ekstrakciju flavonola, dok se prema obliku kontura može zaključiti da su navedeni interakcijski učinci između triju faktora statistički signifikantni (Slika 36).

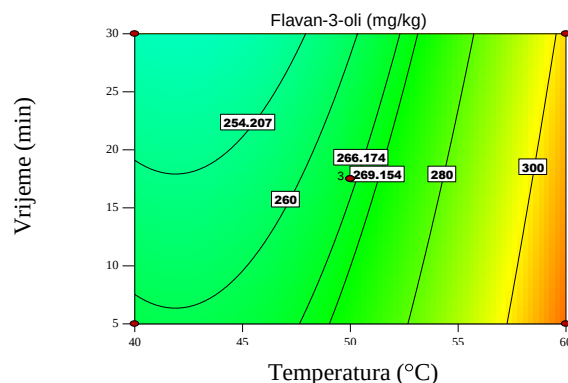


**Slika 37.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-ole u ekstrakcijom otapalu koje sadrži acetonitril

Povećanjem vremena ekstrakcije (15-20 minuta) i udjela organske faze (55 %) dolazi do povećanja ekstrakcije flavan-3-ola. Međutim na drugom prikazu ovisnosti temperature o udjelu organske faze, vidljivo je da se veća učinkovitost ekstrakcije postiže pri višoj temperaturi i manjem udjelu acetonitrila (Slika 37).







**Slika 38.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-ole u ekstrakcijom otapalu koje sadrži etanol

Prema dobivenim prikazima kontura, može se zaključiti da povećanjem udjela organske faze (40-50 %), pri kraćem vremenu ekstrakcije i pri višoj temperaturi (45-50 °C) dolazi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije flavan-3-ola.

Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta provedena je za svaki pojedinačni odziv (maseni udio antocijana, flavonola i flavan-3-ola) te uzimajući u obzir istovremeno sve skupine spojeva pri čemu je korištena Derringerova funkcija ili funkcija poželjnosti (Tablica 10 i 11). S obzirom na više dobivene i predviđene vrijednosti kao i bolje slaganje eksperimentalnih i predviđenih podataka uzeti je MAE 2 za potvrdu dizajna. Dobiveni optimalni udjeli značajno ovise o ispitanjoj skupini spojeva. Takvo se opažanje može objasniti različitim fizikalno-kemijskim svojstvima analita.

**Tablica 10.** Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti odziva za MAE 1

|                     | Udio organske faze (%) | Organsko otapalo | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Predviđena vrijednost (mg/kg) | Dobivena vrijednost (mg/kg) | Odstupanje (%) |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>Antocijani</b>   | 60                     | ACN              | 60               | 30            | 12426                         | 12536                       | 0,88           |
| <b>Flavonoli</b>    | 60                     | ACN              | 40               | 30            | 1532                          | 1534,76                     | 0              |
| <b>Flavan-3-oli</b> | 20                     | ACN              | 60               | 5             | 343                           | 339                         | 1,17           |
| <b>Svi skupa</b>    | 60                     | ACN              | 60               | 30            | 12422/1495/270                | 11916/1527,24/245           | 4,04/2,1/5,49  |

**Tablica 11.** Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti odziva za MAE 2

|                     | Udio organske faze (%) | Organsko otapalo | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Predviđena vrijednost (mg/kg) | Dobivena vrijednost (mg/kg) | Odstupanje (%) |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>Antocijani</b>   | 50                     | EtOH             | 40               | 10            | 12324                         | 12347,3                     | 0,19           |
| <b>Flavonoli</b>    | 60                     | ACN              | 40               | 30            | 1534                          | 1530,04                     | 0,26           |
| <b>Flavan-3-oli</b> | 20                     | ACN              | 60               | 5             | 345                           | 324,58                      | 5,80           |
| <b>Svi skupa</b>    | 60                     | EtOH             | 40               | 5             | 12199/1514/270                | 12660/1528,20/252,18        | 3,41/0,92/6,67 |

### 4.3. Potvrda modela

Prikladnost modela za optimalne vrijednosti odziva ispitana je primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije prikazanih u Tablicama 10 i 11. S obzirom da su za optimizaciju mikrovalne ekstrakcije polifenola dobivene dvije verzije eksperimentalnog dizajna s optimalnim vrijednostima: MAE 1 i MAE 2. Statističkom analizom potvrđeno je da model MAE 2 bolje opisuje ekstrakciju polifenola iz kože grožđa. Eksperimentalne vrijednosti bile su vrlo bliske vrijednostima predviđenim modelom (Tablica 12, 13, 14 i 15) što ukazuje da su dobiveni modeli zadovoljavajući i pouzdani.

**Tablica 12.** Sadržaj pojedinačnih antocijana ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

| Naziv mg/kg                 | PROSJEK         | SD           | RSD         | PREDVIĐENO      | DOBIVENO        | ODSTUPANJE (%) |
|-----------------------------|-----------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Delfinidin-3,5-O-diglukozid | 0,00            | 0,00         | 0,00        |                 |                 |                |
| Cijanidin-3,5-O-diglukozid  | 124,35          | 1,46         | 1,18        |                 |                 |                |
| Delfinidin-3-O-glukozid     | 2597,48         | 47,35        | 1,82        |                 |                 |                |
| Peonidin-3,5-O-diglukozid   | 377,70          | 1,67         | 0,44        |                 |                 |                |
| Malvidin-3,5-O-diglukozid   | 4038,56         | 33,96        | 0,84        |                 |                 |                |
| Cijanidin-3-O-glukozid      | 1038,85         | 8,55         | 0,82        |                 |                 |                |
| Peonidin-3-O-glukozid       | 273,03          | 0,67         | 0,25        |                 |                 |                |
| Malvidin -3-O-glukozid      | 3883,79         | 1,03         | 0,03        |                 |                 |                |
| <b>UKUPNI ANTOCIJANI</b>    | <b>12333,74</b> | <b>19,17</b> | <b>0,16</b> | <b>12324,00</b> | <b>12333,74</b> | <b>0,08</b>    |

**Tablica 13.** Sadržaj pojedinačnih flavonola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

| Naziv mg/kg              | PROSJEK        | SD          | RSD         | PREDVIĐENO     | DOBIVENO       | ODSTUPANJE (%) |
|--------------------------|----------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| Miricetin-3-O-glukozid   | 122,43         | 8,07        | 6,59        |                |                |                |
| Rutin                    | 110,54         | 12,58       | 11,38       |                |                |                |
| Kvercetin-3-O-glukonorid | 72,58          | 3,56        | 4,90        |                |                |                |
| Kvercetin-3-O-glukozid   | 1177,60        | 1,96        | 0,17        |                |                |                |
| Kemferol-3-O-glukonorid  | 42,18          | 0,59        | 1,41        |                |                |                |
| <b>UKUPNI FLAVONOLI</b>  | <b>1525,31</b> | <b>6,70</b> | <b>0,44</b> | <b>1534,00</b> | <b>1525,31</b> | <b>0,57</b>    |

**Tablica 14.** Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

| Naziv mg/kg                | PROSJEK       | SD           | RSD         | PREDVIĐENO    | DOBIVENO      | ODSTUPANJE (%) |
|----------------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|---------------|----------------|
| Galokatehin                | 13,48         | 1,90         | 14,12       |               |               |                |
| Procijanidin B1            | 104,59        | 1,87         | 1,79        |               |               |                |
| Epigalokatehin             | 47,13         | 2,71         | 5,75        |               |               |                |
| Katehin                    | 37,73         | 2,00         | 5,30        |               |               |                |
| Procijanidin B2            | 82,28         | 4,05         | 4,92        |               |               |                |
| Epikatehin                 | 46,61         | 2,14         | 4,58        |               |               |                |
| <b>UKUPNI FLAVAN-3-OLI</b> | <b>331,94</b> | <b>14,45</b> | <b>4,35</b> | <b>345,00</b> | <b>331,94</b> | <b>3,79</b>    |

Tijekom analize polifenola iz grožđa najčešće je potrebno odrediti čitav profil flavonoida. S obzirom da je sama ekstrakcija dugotrajan proces u praksi se u jednom koraku ekstrahiraju sve skupine flavonoida. S obzirom da se za pojedine skupine spojeva značajno razlikuju optimalni uvjeti ekstrakcije, prilikom postupka optimizacije ekstrakcije svih skupina spojeva potrebno je učiniti kompromis, a u tu svrhu se koristi Derringerova funkcija. Potvrda predviđenog modela provedena je prema uvjetima navedenim u Tablici 11. Eksperimentalno dobivene vrijednosti zajedno s vrijednostima predviđenim modelom prikazane su u Tablici 15. Razlika između eksperimentalno dobivenih i vrijednosti predviđenih modelom su u rasponu od 0 do 2,53 %, što ukazuje da je dobiveni model prikladan i točan.

**Tablica 15.** Sadržaj svih skupina polifenola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

| Naziv mg/kg                 | PROSJEK         | SD            | RSD         | PREDVIDENO      | DOBIVENO        | ODSTUPANJE (%) |
|-----------------------------|-----------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Delfinidin-3,5-O-diglukozid | 0,00            | 0,00          | 0,00        |                 |                 |                |
| Cijanidin-3,5-O-diglukozid  | 117,06          | 5,52          | 4,72        |                 |                 |                |
| Delfinidin-3-O-glukozid     | 2764,58         | 64,49         | 2,33        |                 |                 |                |
| Peonidin-3,5-O-diglukozid   | 374,55          | 6,34          | 1,69        |                 |                 |                |
| Malvidin-3,5-O-diglukozid   | 3865,57         | 62,92         | 1,63        |                 |                 |                |
| Cijanidin-3-O-glukozid      | 1120,49         | 45,11         | 4,03        |                 |                 |                |
| Peonidin-3-O-glukozid       | 285,30          | 12,93         | 4,53        |                 |                 |                |
| Malvidin -3-O-glukozid      | 4017,82         | 101,81        | 2,53        |                 |                 |                |
| <b>UKUPNI ANTOCIJANI</b>    | <b>12545,19</b> | <b>162,51</b> | <b>1,30</b> | <b>12228,00</b> | <b>12545,19</b> | <b>2,53</b>    |
| Miricetin-3-O-glukozid      | 122,27          | 4,52          | 3,70        |                 |                 |                |
| Rutin                       | 130,33          | 22,05         | 16,92       |                 |                 |                |
| Kvercetin-3-O-glukonorid    | 70,49           | 1,17          | 1,66        |                 |                 |                |
| Kvercetin-3-O-glukozid      | 1144,14         | 3,85          | 0,34        |                 |                 |                |
| Kemferol-3-O-glukonorid     | 46,85           | 0,23          | 0,50        |                 |                 |                |
| <b>UKUPNI FLAVONOLI</b>     | <b>1514,06</b>  | <b>20,00</b>  | <b>1,32</b> | <b>1514,00</b>  | <b>1514,06</b>  | <b>0,00</b>    |
| Galokatehin                 | 12,94           | 2,59          | 20,00       |                 |                 |                |
| Procijanidin B1             | 82,51           | 16,76         | 20,31       |                 |                 |                |
| Epigalokatehin              | 38,37           | 0,87          | 2,27        |                 |                 |                |
| Katehin                     | 28,99           | 1,42          | 4,90        |                 |                 |                |
| Procijanidin B2             | 63,58           | 0,39          | 0,61        |                 |                 |                |
| Epikatehin                  | 40,45           | 7,81          | 19,30       |                 |                 |                |
| <b>UKUPNI FLAVAN-3-OLI</b>  | <b>266,83</b>   | <b>24,47</b>  | <b>9,17</b> | <b>270,00</b>   | <b>266,83</b>   | <b>1,17</b>    |

Tijekom optimizacije ekstrakcije određena su i relativna standardna odstupanja koja ukazuju na točnost i preciznost novo optimizirane metode. Vrlo niske vrijednosti izračunate su za antocijane i flavonole (manje su od 2 %), dok je ona za flavan-3-ole oko 9 %. Takvo opažanje može biti posljedica vrlo niskog sadržaja flavan-3-ola u dobivenim ekstraktima. Uzimajući u obzir dobivene vrijednosti relativnih standardnih odstupanja može se zaključiti da je novo optimizirana metoda precizna i točna.

## ***5. ZAKLJUČAK***

Na temelju provedenih istraživanja, te na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Mikrovalna ekstrakcija za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa je jedna od modernijih metoda u kvantitativnoj kemijskoj analizi. Pomoću ove metode uspješno su izolirani polifenoli (antocijani, flavonoli, te flavan-3-oli) pri različitim udjelima organske faze, vremenu ekstrakcije i temperaturi.
2. Odabirom optimalnih uvjeta omogućilo se dobivanje što točnijeg i pouzdanijeg krajnjeg rezultata analize.
3. Optimizacija MAE je izvedena pomoću eksperimentalnog dizajna Box-Behnken i kvalitativnom analizom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s dva detektora (DAD i FLD).
4. Eksperimenti su rađeni sa 1:80 g/mL (125 mg uzorka + 10 mL otapala). Dobiveni optimalni uvjeti ekstrakcije su prikazani u Tablici 10.
5. Uvidom u optimalne uvjete može se zaključiti da su polifenolni spojevi uspješno ekstrahirani pomoću 20 i 60 % acetonitrila, te 50 i 60 % etanola pri različitoj temperaturi i kratkom ekstrakcijskom vremenu. Takav rezultat ukazuje da su dobiveni modeli zadovoljavajući i pouzdani.
6. Kožica sorte Regent ima velike sadržaje antocijana, flavonola i flavan-3-ola, te mogu biti vrlo vrijedan izvor za dobivanje ovih spojeva u komercijalne svrhe (prehrambena, kozmetička i farmaceutska industrija).

**Tablica 10.** Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti odziva za MAE

|                     | Udio organske faze (%) | Organsko otapalo | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Predviđena vrijednost | Dobivena vrijednost  | Odstupanje     |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------|---------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| <b>Antocijani</b>   | 50                     | EtOH             | 40               | 10            | 12324                 | 12347,3              | 0,19%          |
| <b>Flavonoli</b>    | 60                     | ACN              | 40               | 30            | 1534                  | 1530,04              | 0,26%          |
| <b>Flavan-3-oli</b> | 20                     | ACN              | 60               | 5             | 345                   | 324,58               | 5,80%          |
| <b>Svi skupa</b>    | 60                     | EtOH             | 40               | 5             | 12199/1514/270        | 12660/1528,20/252,18 | 3,41/0,92/6,67 |

## **6. *DODATAK***

**6.1. Popis slika**

**Slika 1.** Građa bobice grožđa

**Slika 2.** Formiranje bobice i dozrijevanje grožđa

**Slika 3.** Podjela polifenola

**Slika 4.** Osnovna kemijska struktura flavonoida

**Slika 5.** Kemijska struktura antocijana

**Slika 6.** Kemijska struktura flavonola

**Slika 7.** Kemijska struktura najčešćih flavan-3-ola u taninima grožđa

**Slika 8.** Soxhlet aparatura

**Slika 9.** Fazni dijagram CO<sub>2</sub>

**Slika 10.** Djelovanje mikrovalova na različite materijale

**Slika 11.** Zagrijavanje uzorka: a) na uobičajen način b) djelovanje mikrovalova

**Slika 12.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

**Slika 13.** Shematski prikaz HPLC

**Slika 14.** Detektor s nizom dioda

**Slika 15.** Fluorescencijski detektor

**Slika 16.** Izgled grožđa sorte Regent

**Slika 17.** Analitička vaga marke Mettler Toledo, AB 104, Švicarska

**Slika 18.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s teflonskim posudama za uzorke

**Slika 19.** Centrifuga marke Hettich Zentifugen, EBA 20, Njemačka

**Slika 20.** Rotavapor, Buchi Rotavapor R-114

**Slika 21.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1100

**Slika 22.** Shematski prikaz postupka ekstrakcije polifenola iz kože grožđa mikrovalnom ekstrakcijom

**Slika 23.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio antocijana (mg/kg) u ovisnosti o vremenu (min) i omjeru faza (g/mL)

**Slika 24.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio flavonola (mg/kg) u ovisnosti o vremenu (min) i omjeru faza (g/mL)

**Slika 25.** Prikaz rezultata preliminarnog ispitivanja za maseni udio flavan-3-ola (mg/kg) u ovisnosti o vremenu (min) i omjeru faza (g/mL)



**Slika 26.** HPLC profil ekstrakta kože grožđa sorte Regent. Kromatogrami su snimljeni na: A)  $\lambda = 518$  nm; B)  $\lambda = 360$  nm; C)  $\lambda_{\text{ex}} = 225$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 320$  nm. Za oznake kromatografskih krivulja vidjeti Tablicu 5

**Slika 27.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 28.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijskom otapalu etanolu

**Slika 29.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 30.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijskom otapalu etanolu

**Slika 31.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-oli u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 32.** Prikaz kontura MAE 1 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-oli u ekstrakcijskom otapalu etanolu

**Slika 33.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 34.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj antocijani u ekstrakcijskom otapalu etanolu

**Slika 35.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 36.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavonoli u ekstrakcijskom otapalu etanolu

**Slika 37.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-oli u ekstrakcijskom otapalu acetonitrilu

**Slika 38.** Prikaz kontura MAE 2 koje prikazuju interakcijske učinke za pojedine faktore za slučaj flavan-3-oli u ekstrakcijskom otapalu etanolu

## 6.2. Popis tablica

**Tablica 1.** Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz prirodnih uzoraka

**Tablica 2.** Podjela kromatografskih metoda obzirom na pokretnu i nepokretnu fazu

**Tablica 3.** Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

**Tablica 4.** Gradijent pokretne faze korišten u analizi

**Tablica 5.** Parametri valnih duljina za određivanje polifenolnih spojeva

**Tablica 6.** Pokusi provedeni u sklopu optimizacije MAE 1 Box-Behnkenovim dizajnom

**Tablica 7.** Pokusi provedeni u sklopu optimizacije MAE 2 Box-Behnkenovim dizajnom

**Tablica 8.** Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene modele MAE 1

**Tablica 9.** Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene modele MAE 2

**Tablica 10.** Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti odziva za MAE 1

**Tablica 11.** Optimalni uvjeti, predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti odziva za MAE 2

**Tablica 12.** Sadržaj pojedinačnih antocijana ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

**Tablica 13.** Sadržaj pojedinačnih flavonola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

**Tablica 14.** Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

**Tablica 15.** Sadržaj svih skupina polifenola ekstrahiranih iz kože grožđa primjenom mikrovalne ekstrakcije, rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

### 6.3. Popis kratica

**MAE** - Microwave assisted extraction – (hrv. *Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija*)

**HPLC-DAD** - High performance liquid chromatography with diode array detector – (hrv. *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda*)

**FLD** – Fluorescence detector - (hrv. *Fluorescencijski detektor*)

**UV/Vid** – Ultraviolet/ Visible area - (hrv. *Ultraljubičasto/ Vidljivo područje*)

**ACN** – acetonitrile – (hrv. *acetonitril*)

**EtOH** – ethanol – (hrv. *etanol*)

## ***7. LITERATURA***

- [1] **Perić P.**, *Sok od grožđa*. Seminarski rad, Veleučilište u Požegi. 2013.
- [2] **Moreno-Arribas, M. V., Polo, C. M.**, Wine chemistry and biochemistry, Methoxypyrazines of grapes and wines: Chemistry of Wine Flavor (Waterhouse, A. L. i Ebeler S. E., ured.) American Chemical Society, Washington DC, 1999., str. 31-38.
- [3] **Jackson, R. S.**, Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. U. Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine R.* 2000., str. 150-158.
- [4] **Nelson, K. E.**, The grape. U: Quality and Preservation of Fruits (Eskin, N. A. M., ured.), CRC Press, Boca Ration, 1991., str. 125.
- [5] **Karoglan Kontić, J.**, Regent sorta otporna na gljivične bolesti, *Gospodarski list*, rujan 2014., str. 39-49
- [6] **Possner, D. R. E., Kliewer, W. M.**, The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*.1985, **24**, str. 229-240.
- [7] **Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., van Heeswijck, R.**, Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. U Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine R.* **6**, 2000., str: 150-158.
- [8] **Allen, M. S., Lacey, M. J.**, Methoxypyrazines of grapes and wines. U: Chemistry of Wine Flavor (Waterhouse, A. L. i Ebeler S. E., ured.) American Chemical Society, Washington DC, 1999., str. 31-38.
- [9] **Gholami, M., Hayasaka, Y., Coombe, B. G., Jackson, J. F., Robinson, S. P. Williams, P. J.**, Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Aust. J. Grape Wine R.* **1**, 1995., str. 19-24.
- [10] **Ribereau-Gayon, P. Stonestreet, E.**, Determination of anthocyanins in red wine. *B.Soc. Chim. Fr.* **9**, 1965, str. 2649-2652.
- [11] **Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L.**, Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 2009, str. 7143-7172.
- [12] **Walker, A. R., Lee, E., Robinson, S. P.**, Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *PlantMol. Biol.* **62**, 2006, str. 623–635.
- [13] **Clifford, M. N.**, Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 2000, 1063-1072.
- [14] **Anderson, O. M., Jordheim, M.**, The anthocyanins. U: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications (Anderson, O. M. i Markham, K. R., ured.), CRC Press, BocaRaton, 2006, str. 472-551.
- [15] **Tsao, R., McCallum, J.**, Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, 2009, str. 131-153.
- [16] **Brouillard, R., Chassaingf, S., Fougerousse, A.**, Why are grape fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long. *Phytochemistry.* **64**, 2003, 1179-1186.
- [17] **Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni Manchado, P., Fulcrand, H.**, Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol.Vitic.* **57**, 2006, str. 298-305.
- [18] **Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheyneir, V., Moutounet, M.**, Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta.* **458**, 2001, str. 15-27.

- [19] **Mezza, G.**, Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci.* **35**(4), 1995., str: 341-371.
- [20] **Migić I.**, Mehanizmi protutumorskog djelovanja flavonoida, Seminarski rad, Sveučilište u Zagrebu, PMF-Biološki odsjek, Zagreb, 2014.
- [21] **Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N., Desfeux, N.**, Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. O.I.V.* **59**, 1986, 1171–1254.
- [22] **Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P.**, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J. Grape Wine Res.* **9**, 2003, str: 15–27.
- [23] **Dai, J., Mumper, R. J.**, Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules*. **15**, 2010., 7313-7352.
- [24] **Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., Qui, C.**, Sample preparation. *J. Chromatogr. A.* **1184**, 2008, str.191-219.
- [25] **Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borrás, E., Arola, L.**, Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 2009, str: 7143-7172.
- [26] **Liaizid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G.**, Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **1140**, 2007, str. 29-34.
- [27] **Anastas, P. T., Warner, J. C.**, Green Chemistry: Theory and practice, Ionic liquids: Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* Oxford University Press, New York, 2000, str: 1391-1398.
- [28] **Ju, Z. Y., Howard, L. R.**, Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2003, 5207-5213.
- [29] **Pavlović, D. M., Ašperger, D.**, *Analitika okoliša*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 140.- 165.
- [30] **Soxhlet apparatus:** <http://www.google.hr/imgres?q=soxhlet+apparatus> (13.06.2015.)
- [31] **Reeve, R. N.**, *Introduction to environmental analysis*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2002., str. 169-171.
- [32] **Kaštelan-Macan M.**, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, 2003, str. 79. - 83.
- [33] **Luque-Gracia, J. L.**, *Microwave-assisted solvent extraction*: U: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Encyclopedia of Analytical Science, Elsevier, Amsterdam, 2005, str. 584-590.
- [34] **Shao, P., He, J., Sun, P., Zhao, P.**, Analysis of conditions for microwave-assisted extraction of total water-soluble flavonoids from *Perilla frutescens* leaves, Association of Food Scientists & Technologists, India, 2011.
- [35] **Proestos, C., Kanaitis, M.**, Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds; Agricultural University of Athens, Greece, 2008., str. 32-38.
- [36] **Bai, X. L., Yue, T. L., Yuan, Y. H., Zhang, H.W.**, Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, PR China, 2010., str. 19-24.
- [37] **Yinping, L., George K. Skouroumounis, Gordon M. Elsey, Dennis K. Taylor**; Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols, School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide, Australia, 2011., str. 14-20.
- [38] **Luterotti, S.**, *Uvod u kemijsku analizu*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 5. Izdanje, 2012. str. 93-97.

- [39] **Fluorescencijski detektor;** [https://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/Detectors/det\\_flur.html](https://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_flur.html) (23.06.2015)
- [40] **Almeida Bezerra, M., Erthal Santelli, R., Padua Oliveira, E., Silveira Villar, L., Escaleira, L.A.,** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008., 76:965-977
- [41] **Liu, Y., Wei, S., Liao, M.,** Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 2013., 49:837-843-3

## **8. ŽIVOTOPIS**



**MARIJA GAVRANIĆ**

Rođena je 14. travnja 1988. godine u Dubrovniku. Završila je osnovnu školu Blato u Blatu na Korčuli, nakon koje upisuje srednju školu Zdravstveno Učilište u Zagrebu, smjer farmaceutska tehničarka. Studirala je preddiplomski studij: Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Svoju stručnu praksu odradila je u Pliva-Hrvatska d.o.o., TAPI R&D, Zagreb na odjelu: Istraživanje i razvoj lijekova, pod mentorstvom: Borke Lučić, dipl. kem. ing i mentorice završnog rada: izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger. Od 25.09.-28.09.2013. sudjelovala je poster prezentacijom na 19<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences u Poreču pod naslovom: *Sediment sample preparation for chromatographic determination of veterinary pharmaceuticals*, pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Danijele Ašperger. Na istom Fakultetu nastavlja sa studiranjem diplomskog studija: Primijenjena organska kemija. U listopadu, 2014. godine dobitnica je Dekanove nagrade za zapaženi studentski znanstveni rad koji je bio prijavljen na natječaj za Rektorovu nagradu u akademskoj godini 2013./2014. Ove godine je sudjelovala na 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera s poster prezentacijom s naslovom: *Uklanjanje enrofloksacina iz otpadnih voda sorpcijom na kominu grožđa*.