

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine grožđa sorte pinot crni primjenom ultrazvuka

Sušac, Karolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:051206>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-19**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Karolina Sušac

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE
GROŽĐA SORTE PINOT CRNI PRIMJENOM
ULTRAZVUKA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada: prihvaćena je na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. svibnja 2024.
Mentor: prof. dr. sc. Stela Jokić
Komentor: -

EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE GROŽĐA SORTE PINOT CRNI PRIMJENOM ULTRAZVUKA Karolina Sušac, 0113147227

Sažetak: Primarni cilj ovog rada je istražiti mogućnost iskorištenja nusproizvoda koji nastaju tijekom proizvodnje vina sorte Pinot crni, s posebnim naglaskom na sjemenkama i kožici grožđa. Primijenjena je inovativna tehnika ekstrakcije potpomognuta ultrazvukom te različiti uvjeti ekstrakcije (otapalo, amplituda i impuls ultrazvuka). Dobiveni ekstrakti analizirani su se na udio ukupnih fenola (Folin-Ciocalteuovom metodom), antioksidacijsku aktivnost (DPPH metodom) te na pojedinačne fenole (HPLC analizom). Nadalje, provela se optimizacija procesa primjenom metode odzivnih površina s pomoću programa Design Expert®. Navedenim analizama utvrđeno je kako su udjeli ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost znatno veći u sjemenki grožđa u odnosu na kožicu grožđa. Provođenjem HPLC analize utvrđene su visoke koncentracije katehina i epikatehina u dobivenim ekstraktima. Statističkom analizom (ANOVA) utvrđeno je kako porastom amplitude i impulsa primijenjenog ultrazvuka raste udio ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost. Naposljetku, utvrđeno je kako su optimalni uvjeti za ekstrakciju fenola i antioksidacijsku aktivnost iz sjemenki i kožice grožđa s pomoću ultrazvuka sljedeći: 48%-tna vodena otopina etanola uz amplitudu i impuls ultrazvuka od 100%.

Ključne riječi: ultrazvučna ekstrakcija, komina grožđa, polifenoli, antioksidacijska aktivnost, optimizacija

Rad sadrži: 52 stranice
32 slike
14 tablica
0 priloga
32 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | predsjednik |
| 2. | prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | član- mentor |
| 3. | doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | član |
| 4. | izv. prof. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 27. 9. 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study

Department of process engineering
Subdepartment of technological design and pharmaceutical engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food engineering

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session VII. held on 28. May 2024.

Mentor: prof. dr. sc. Stela Jokić

Co-mentor: -

**ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE
POMACNE VARIETY PINOT CRNI
Karolina Sušac, 0113147227**

Summary: The primary goal of this work is to investigate the possibility of using the by-products that arise during the production of Pinot Noir wine, with a special emphasis on the grape seeds and skin. An innovative ultrasound-assisted extraction technique and different extraction conditions (solvent, amplitude and impulse) were applied. The obtained extracts were analyzed for the content of total phenols (by Folin-Ciocalteu method), antioxidant activity (by DPPH method) and individual phenols (by HPLC analysis). Optimization of the process was carried out using Response Surface Methodology with Design Expert® software. It was determined that the content of total phenols and antioxidant activity are significantly higher in grape seeds than in grape skins. The statistical analysis (ANOVA) showed that total phenols and antioxidant activity increased with increasing amplitude. Finally, it was determined that the optimal ultrasonic extraction conditions for phenols and antioxidant activity from grape seed and skin were: 48% aqueous ethanol solution, amplitude 100% and impulse 100%.

Key words: ultrasound extraction, grape pomace, polyphenols, antioxidant activity, optimization

Thesis contains: 52 pages
32 pictures
14 tables
0 supplementary material
32 references

Original in: Croatian

Review i defence committee:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. | <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. | <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. | <i>Ante Lončarić</i> , PhD, associate prof. | sti-in |

Defence date: 27. 9. 2024.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

27. rujna 2024.

TE OCIJENJEN USPJEHOM

izvrsnim (5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Darko Velić

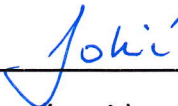
predsjednik



(potpis)

2. prof.dr.sc. Stela Jokić

član



(potpis)

3. doc.dr.sc. Krunoslav Aladić

član



(potpis)

Prije svega, želim zahvaliti mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci koju su mi pružili tijekom studija te što su mi isto i omogućili. Veliko hvala mami, tati, bratu i sestri, bez vas ne bih uspjela! Osobito se želim zahvaliti svojim nećakinjama koje su mi uljepšale period diplomskog studija.

Puno hvala mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na svim prenesenim znanjima, savjetima te mogućnostima koje mi je pružila. Također hvala svim profesorima fakulteta na svom trudu koji su uložili da bi prenijeli znanje.

Hvala gospođi Snježani Keleković, dipl.ing. koja je pomogla pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada te bila dostupna za sve nedoumice.

Hvala mojim prijateljicama koje su uvijek bile uz mene i učinile da vrijeme studiranja zaokružim lijepim uspomnama.

Na kraju želim zahvaliti mom Patriku koji je bio uz mene i bodrio me onda kada mi je najviše trebalo.

„ U životu nije važno koliko ciljeva postigneš već tko je uz tebe na putu prema ciljevima". Hvala svima što ste vjerovali u mene i učinili da ovaj cilj savladam s najboljim ljudima uz sebe!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Grožđe.....	4
2.2. Komina grožđa.....	5
2.2.1. Sjemenke grožđa.....	6
2.2.2. Kožica grožđa	6
2.2.3. Fenolni spojevi.....	7
2.3. Ekstrakcija.....	8
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	10
2.3.2. Parametri koji utječu na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom.....	13
2.4. Optimiranje procesnih parametara metodom odzivnih površina.....	13
2.4.1. Box-Behnken plan pokusa	14
3. Eksperimentalni dio.....	15
3.1. Zadatak.....	16
3.2. Materijali.....	16
3.2.1. Komina grožđa sorte Pinot crni	16
3.2.2. Reagensi.....	17
3.2.3. Uređaji	17
3.3. Metode	18
3.3.1. Priprema uzorka za ekstrakciju.....	18
3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	19
3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	21
3.3.4. Određivanje ukupnih fenola.....	22
3.3.5. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD)	23
3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina	26
4. Rezultati i rasprava.....	27
4. 1. Utjecaj procesnih parametara UAE na udio fenola u dobivenim ekstraktima.....	28
4. 2. Utjecaj procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost	30
4.3. Statistička analiza procesnih parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom	34
4.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD).....	42
5. Zaključak.....	47
6. Literatura	49

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

RSM – (*engl. Response Surface Metodology*) metoda odzivnih površina

UAE – (*engl. Ultrasound-Assisted Extraction*) ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

ANOVA – (*engl. Analysis of Variance*) analiza varijance

R² – (*engl. Coefficient of Determination*) koeficijent determinacije

HPLC – (*engl. High- Performance Liquid Chromatography*) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

DPPH – (*engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

GAE – (*engl. Gallic acid equivalents*) ekvivalent galne kiseline

DAD – (*engl. Diode-array Detector*) detektor niza dioda

PTFE – (*engl. Polytetrafluoroethylene*) politetrafluoroetilen

Y – (*engl. Observed Response*) promatrani odziv

SS – (*engl. Sum of Squares*) suma kvadrata

df – (*engl. Degrees of Freedom*) stupnjevi slobode

MS – (*engl. Mean Square*) varijanca

1. UVOD

U prehrambenoj industriji nastaju velike količine visokovrijednih nusproizvoda koji predstavljaju veliku količinu otpada te negativno utječu na okoliš, društveni i gospodarski sektor. Nastali nusproizvodi industrije većinom se odlažu na odlagališta za otpad te se zanemaruje njihova potencijalna primjena i daljnje korištenje u svrhu maksimalnog iskorištenja. Nusproizvodi prerade voća čine više od polovice svježeg voća, a ponekad sadrže i puno bolji funkcionalni ili nutritivni sadržaj nego onaj u konačnom proizvodu (Pleadin i sur. 2022).

Velike količine nusproizvoda u prehrambenoj industriji stvara industrija vina. Prema Državnom zavodu za statistiku u 2023. godini proizvedeno je 94.905 t grožđa te 612.000 hl vina (“Ministarstvo Poljoprivrede, Šumarstva i Ribarstva - Vinogradarstvo i Vinarstvo”). Porastom proizvodnje grožđa i vina raste i količina nusproizvoda te industrije. Grožđe (glavna sirovina za proizvodnju vina) je voće bogato bioaktivnim komponentama koje velikim dijelom zaostaju u komini nakon proizvodnje vina, stoga imaju veliki potencijal daljnje primjene u drugim industrijama. Primjenom suvremenih metoda ekstrakcije na takvom i sličnim nusproizvodima prehrambene industrije upotunjuju se neka od načela zelene kemije; smanjena primjena organskih, štetnih otapala te smanjene količine otpada u okolišu (Ferreira i sur. 2023). Osim ispunjavanja zahtjeva zelene kemije primjena suvremenih metoda ekstrakcije omogućava ekstrakciju vrlo važnih komponenata za ljudsko zdravlje. Polifenolni spojevi mogu imati blagotvorne učinke na sprječavanje bolesti poput tumora, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, raznih kroničnih bolesti. Antioksidacijski učinak polifenola temelji se na njihovoj sposobnosti vezanja vodikova peroksida, peroksidnih iona i lipidnih peroksi radikala koji štetno djeluju na ljudsko zdravlje. Vezanjem polifenola na slobodne radikale smanjuje se štetno djelovanje slobodnih radikala u organizmu te na taj način polifenoli doprinose ukupnom smanjenju oksidacijskog stresa organizma. Također su učinkoviti pri prevenciji neurodegenerativne patologije te pri prevenciji neurokognitivnih disfunkcija (Kamenjašević i sur. 2017).

Maksimalnim iskorištenjem nusproizvoda industrija povećava ekonomičnost te se potiče kružno gospodarstvo. Suvremenim metodama ekstrakcije smanjuje se vrijeme potrebno za ekstrakciju i povećava se njezina učinkovitost što olakšava iskorištenje nusproizvoda industrije. Stoga je cilj ovog rada odrediti polifenolne spojeve iz komine grožđa ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom kako bi komina, zbog svojih vrijednih komponenti, pronašla svoju daljnju primjenu u razvoju novih funkcionalnih, kozmetičkih i drugih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Grožđe

Grožđe je bobičasto voće koje potječe od drvenaste biljke -vinove loze. Čokot (pojedinačna biljka vinove loze) se sastoji od generativnih i vegetativnih organa. Vegetativni organi su: korijen, list, pupovi, stablo i vitice dok su generativni organi: sjemenka, bobica, cvast, cvat i grozd. Grozd se razvija iz cvjetnog pupa vinove loze. Iz cvjetnog pupa se razvija cvijet vinove loze koji se, nakon oplodnje, formira u bobicu (Žunić, 2008).

Bobica grožđa sastoji se od: kožice ili epikarpa, mesa ili mezokarpa te sjemenke. Na površini kožice nalazi se kutikula a ispod nje nalaze se stanice bogate taninskim tvarima. Najveći dio bobice čini meso, odnosno mezokarp (70-80%) koji se sastoji od više slojeva stanica te sadrži vodu, organske kiseline, šećere, aromatične tvari i dr. U središtu bobice su sjemenke, u jednoj bobici nalaze se jedna do četiri sjemenke. Sjemenke su pri početnim fazama u razvoju bobice meke i zelene, dok nakon sazrijevanja poprimaju žuto-smeđu boju i čvrstu opnu (Žunić, 2008).

Grožđe predstavlja glavnu sirovinu za proizvodnju vina. Nakon sazrijevanja grožđa i njegovog branja u trenutku tehnološke zrelosti slijedi muljanje grožđa koje se provodi u cilju otpuštanja grožđanog soka ili mošta. Nakon muljanja slijedi prešanje te sumporenje. Mošt nastao nakon prešanja se sumpori kako bi se spriječilo djelovanje nepoželjnih bakterija i kvasaca te kako bi se, uz pomoć sumpora, potpomoglo koagulacija i taloženje tvari mutnoće (Maletić i sur. 2015).

Glavni postupak u proizvodnji vina je alkoholna fermentacija pri kojoj se, s pomoću kvasaca, šećeri prisutni u vinu prevode u glavne produkte: ugljični dioksid i etilni alkohol. Kvasac odgovoran za fermentaciju vina je *Saccharomyces cerevisiae* koji se nalazi na pokožici bobica grožđa. Završni koraci u proizvodnji vina su: pretakanje, filtracija i na kraju punjenje vina u boce. Kao vrijedni nusprodukt proizvodnje vina zaostaje komina grožđa koja, zbog svog sastava, može imati veliku primjenu u prehrambenoj industriji (Maletić i sur. 2015).

Pinot crni je sorta grožđa *Vitis vinifera* koja potječe iz Francuske pokrajine Burgundije. Prema tome, naziv mu potječe od francuskog jezika gdje Noir označava njegovu tamnu boju, a Pinot grozdove u obliku češera (Herrero i sur. 2016). U Republici Hrvatskoj sorta grožđa Pinot crni značajno se proizvodi u podregiji Slavonija (požeško-pleterničko i kutjevačko vinogorje), zatim u podregiji Moslavina te u podregiji Istra (Vinopedia, 2022)

2.2. Komina grožđa

Komina je čvrsta tvar koja zaostaje nakon prešanja grožđa u proizvodnji vina, čini 75% krutog otpada koji nastaje preradom u vino te 20-30% početne mase grožđa. Komina se sastoji od 55-75% vode, 30% polisaharida te 6-15% lipida, proteina, nezasićenih masnih kiselina i šećera. Tijekom proizvodnje vina 70% ukupnih bioaktivnih spojeva zaostaje u komini što je čini vrlo vrijednim nusproizvodom. Zbog bioaktivnih spojeva koji se nalaze u komini sve više se primjenjuje njezina daljnja prerada i primjena u farmaceutskoj, prehrambenoj te drugim industrijama u cilju što većeg iskorištenja nusproizvoda te obogaćivanja novih proizvoda bioaktivnim komponentama. Najčešće se komina zbrinjava odlaganjem, spaljivanjem i kompostiranjem dok se dijelom teži novim primjenama u industriji poput proizvodnje likera gdje se dodaje u procesu destilacije. Pored proizvodnje likera komina svoju primjenu nalazi i u proizvodnji tjestenina i brašna, krema u kozmetičkoj industriji, u proizvodnji gnojiva i stočne hrane (Ferreira i sur. 2023; González-Centeno i sur. 2015). Neki od načina primjene komine grožđa prikazani su na **Slici 1**.



Slika 1 Načini iskorištenja komine grožđa (Ferreira i sur. 2023)

2.2.1. Sjemenke grožđa

Prešana komina sadrži oko 20-30 % sjemenki grožđa. U sjemenci se nalaze rezervni sastojci koji su potrebni za ishranu klice, a osim toga nalaze se i brojne taninske tvari. Sjemenke grožđa sadrže flavonoide miricetin i kvarcetin, a u sluzavom filmu koji se nalazi oko sjemenke nalaze se procijanidi (Nowshehri, Bhat i Shah 2015).

Tablica 1 prikazuje osnovni kemijski sastav sjemenke grožđa.

Tablica 1 Kemijski sastav sjemenki grožđa (Ribéreau-Gayon i sur. 2005)

Sastojak	%
Voda	25-45
Ugljikohidrati	34-36
Ulja	13-20
Tanini	4-6
Dušični spojevi	4-6,5
Minerali	2-4
Masne kiseline	1

Iz kemijskog sastava sjemenki vidljivo je kako se udio ulja u sjemenkama kreće od 13 do 20 % zbog čega se sve više primjenjuje za proizvodnju ulja sjemenki grožđa. Dobar su izvor nezasićenih masnih kiselina, tokoferola i sterola (Górnaš i sur. 2025). Ulje sjemenki grožđa je korisno pri liječenju određenih metaboličkih komplikacija poput pretilosti, dijabetesa, metaboličkog sindroma i slično (Shiri-Shahsavari i sur. 2023).

2.2.2. Kožica grožđa

Kožica predstavlja omotač bobice grožđa koji se sastoji od 6 do 10 slojeva građenih od elastičnih stanica. Sastoji se od hipoderme, epiderme i kutikule. Epiderma se sastoji od jedne regije koja sadrži izdužene stanice, a hipoderma se sastoji od vanjske i unutarnje regije. Vanjska regija hipoderme sadrži pravokutne stanice dok unutarnja sadrži poligonalne stanice. Debljina kožice ovisi o sorti grožđa, za sorte *Vitis Vinifera* se kreće od 1,5 do 4 μm dok za pojedine vrste doseže i do 10 μm debljine (Ribéreau-Gayon i sur. 2005).

Fenolni spojevi kožice grožđa su: cimetna i benzojeva kiselina, tanini i flavonoidi. U hipodermalnim stanicama nalaze se pigmenti antocijani koji daju tamnu boju grožđa. Kožica

sadrži velike količine prekursora arome, aromatičnih tvari i većinu slobodnih terpena bobice (Ribéreau-Gayon i sur. 2005).

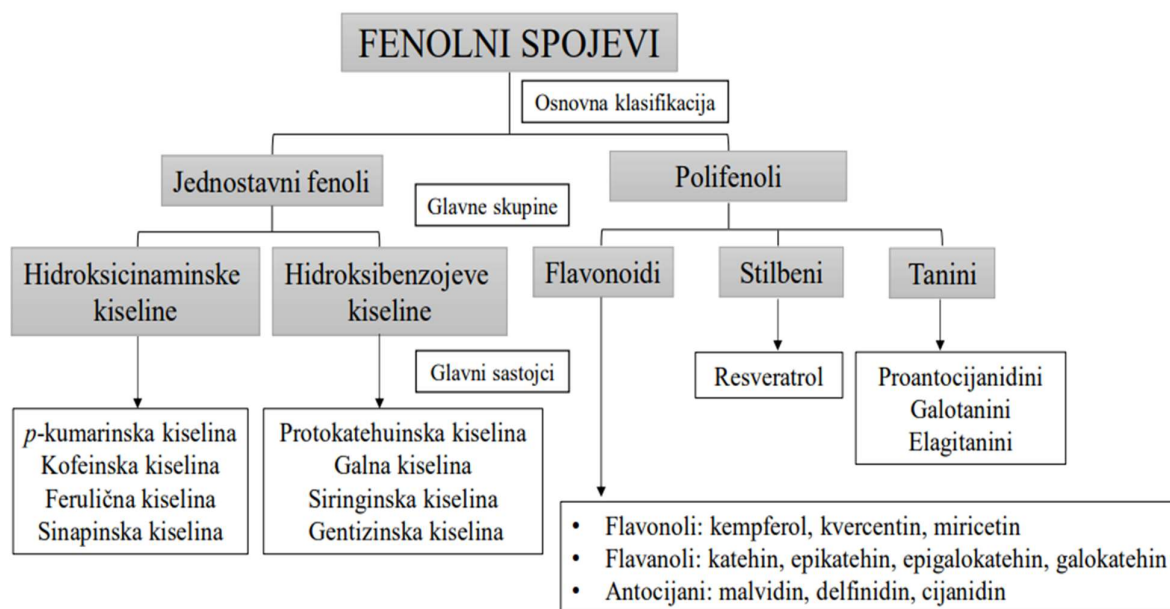
2.2.3. Fenolni spojevi

Fenoli su organski spojevi koji sadrže hidroksilnu (-OH) skupinu vezanu na benzenski prsten (“Fenoli - Hrvatska Enciklopedija”). Osnovna podjela fenola prikazana je na **Slici 2**.

Vrlo su značajni zbog svojih bioaktivnih svojstava, djeluju antioksidativno, protuupalno, antikarcinogeno, vazodilatacijski itd. (Machado i sur. 2024) a u komini grožđa nalaze se unutar kože, sjemenki pa i peteljki grožđa. U grožđu se nalaze dvije skupine polifenola a to su: neflavonoidi i flavonoidi. Neflavonoidi su zastupljeni u mesu grožđa dok su flavonoidi zastupljeni u kožici, sjemenki i peteljki grožđa. Karakteristični flavonoidi za kožicu grožđa su: flavonoli i antocijani dok su flavan-3-oli karakteristični za sjemenke i peteljke grožđa (Ribéreau-Gayon i sur. 2005).

Antocijani su biljni pigmenti koji daju ljubičastu boju grožđa, građeni su od antocijanidina i šećera. U grožđu se nalaze u obliku delphinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina. Boja grožđa sorte Pinot crni dolazi upravo od antocijana. pH medija utječe na boju antocijana, pa tako u kiselom mediju se nalaze u obliku flavilijum kationa koji su crveno obojeni, rastom pH prelaze u ljubičaste kinoidalne baze a daljnjim porastom pH prelaze u hidratizirani (bezbojni) oblik (Ribéreau-Gayon i sur. 2005).

Također se u grožđu nalaze i tanini koji daju opor okus grožđa. To su polimeri neflavonoidnih i flavonoidnih fenola a nalaze se u sjemenkama i u kožici grožđa. Razlikujemo kondenzirane i hidrolizirajuće tanine. Kondenzirani tanini ili proantocijanidini se pretežito nalaze u grožđu, nastaju kao produkt kondenzacije flavan-3-ola ili kao produkt kondenzacije flavan-3,4-diola (Ribéreau-Gayon i sur. 2005).

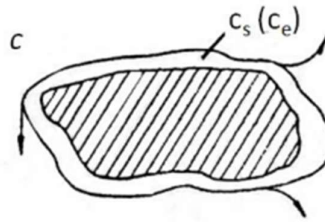


Slika 2 Polifenolni spojevi (Izvor: Ferreira i sur. 2023)

Grožđe je vrlo dobar izvor polifenola a njihov sadržaj ovisi o: sorti grožđa, stupnju zrelosti grožđa, regiji te o agroekološkim uvjetima.

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija podrazumijeva odvajanje određene tvari iz smjese tvari uz pomoć otapala ili u otapalu otopljenih organskih reaktanata. Princip kruto-tekuće ekstrakcije temelji se na topljivosti različitih tvari u otapalu a kao preduvjet ekstrakcije potrebna razlika u koncentraciji između graničnog sloja i središnjeg sloja otapala. Prilikom otapanja čestice krute tvari u otopini uz površinu čestice nastaje granični sloj otopine (C_c) koji je zasićen otopljenom tvari, odnosno ima veću koncentraciju otopljene tvari u odnosu na ostatak otopine (C). Uslijed razlike u koncentraciji otopljena tvar difundira iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije i na taj način se ekstrahira iz krute tvari u otopinu (Bucić-Kojić, 2008). Na **Slici 3** prikazan je granični sloj otopine uz česticu krute tvari u otapalu.



Slika 3 Shematski prikaz čestice u otapalu prilikom ekstrakcije (Sigal i Zhang 2022)

Brzina ekstrakcije može se izračunati s pomoću sljedećeg izraza (1):

$$\frac{dm}{dt} = \sigma \cdot A \cdot (C_e - C) \left[\frac{kg}{s} \right] \quad (1)$$

Gdje je: dm/dt [kg/s] brzina prijenosa tvari, σ [m/s] koeficijent prijenosa tvari, A [m²] površina dodirne plohe između čvrste tvari i otapala, C_e [kg/m³] koncentracija u graničnom sloju te C [kg/m³] koncentracija u ostatku otopine (Bucić-Kojić, 2008).

Postupak ekstrakcije može se ubrzati na nekoliko načina:

- 1) Usitnjavanjem krutog materijala prilikom čega se povećava kontaktna površina između materijala i otopine
- 2) Povećanjem gradijenta koncentracije što se može postići konstantnim dovođenjem čistog otapala te povećanjem temperature
- 3) Miješanjem čime se povećava koeficijent prijenosa tvari

Otapala koja se koriste za ekstrakciju moraju biti:

- 1) Selektivna
- 2) Učinkovita
- 3) Kemijski inertna
- 4) Niže viskoznosti i površinske napetosti
- 5) Nekorozivna
- 6) Nižeg vrelišta
- 7) Netoksična i ekološki prihvatljiva
- 8) Ne smiju biti zapaljiva

Najčešće korištena otapala za ekstrakciju u prehrambenoj industriji su: voda, heksan, cikloheksan, etanol te superkritični fluidi poput butana, propana i ugljičnog dioksida (Bucić-Kojić, 2008).

Ekstrakcija ima veliku primjenu u prehrambenoj industriji a njezina učinkovitost može se izraziti distribucijskim omjerom, odnosno omjerom ekstrahirane tvari u vodenoj i u organskoj fazi nakon ekstrakcije. Zbog velike primjene u prehrambenoj industriji javlja se sve veća potreba za novijim tzv. zelenim tehnikama ekstrakcije. Neke od suvremenih tehnika su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom te ekstrakcija superkritičnim fluidima. Primjenom suvremenih metoda smanjena je upotreba organskih, štetnih otapala, smanjeno je vrijeme potrebno za provođenje ekstrakcije te su potrebne niže temperature prilikom ekstrahiranja što uključuje manji utrošak energije prilikom primjene navedenih metoda (Banožić, 2022).

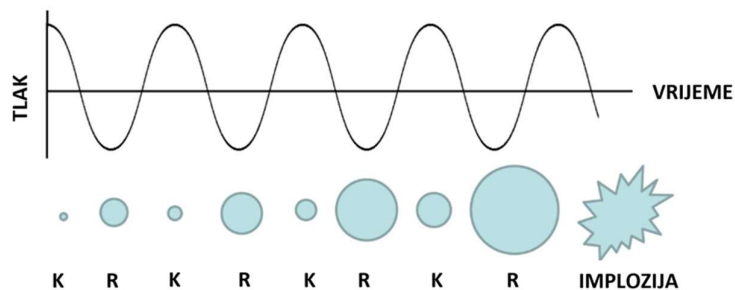
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk čine mehanički zvučni valovi koji nastaju molekularnim pokretima u mediju u kojem se šire. Za klasifikaciju primjene ultrazvuka ključni kriterij leži u količini proizvedene energije, snazi zvuka [W] te intenzitetu snage [W/m^2]. S obzirom na intenzitet, razlikujemo visokointenzivne i niskointenzivne zvučne valove (Gallo, Ferrara i Naviglio 2018). Ultrazvuk niskog intenziteta koristi visoku frekvenciju (od 100 kHz do 1 MHz), slabiju snagu ($<1W/cm^2$) te se koristi za nedestruktivne analize i procjenu kvalitete. Nasuprot tome, ultrazvuk visokog intenziteta koristi nisku frekvenciju (16-100 kHz) i jaču snagu ($10-1000 W/cm^2$) a upotrebljava se većinom za ubrzavanje i progresiju efektivnosti pripreme uzoraka (Holban, 2017).

Razlika između ultrazvuka i zvuka je u frekvenciji vala. Valovi zvuka su pri frekvencijama koje ljudsko uho može čuti (od 16 Hz do 20 kHz), dok ultrazvuk čine mehanički valovi frekvencija iznad ljudskog sluha ali ispod mikrovalnih frekvencija (od 20 kHz do 10 MHz) (Han i sur. 2018).

Razaranje čvrstog materijala, do kojeg dolazi prilikom kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, odvija se na tri načina. U otopini, pod djelovanjem ultrazvuka, dolazi do stvaranja asimetričnih mjehurića. Mjehurići intenzivno pucaju u blizini čvrstog materijala i na taj način povećavaju propusnost čvrstog materijala te oslobađanje unutarstaničnog materijala. Prilikom implozije mjehurića dolazi do naglog porasta tlaka i temperature što dovodi do bolje topljivosti

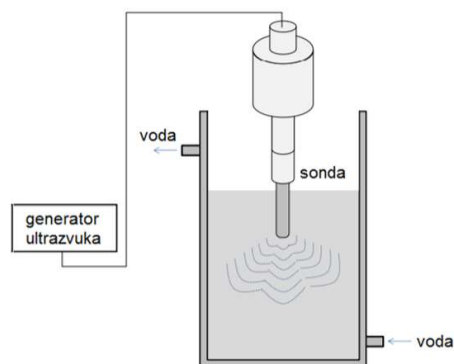
čvrste tvari u otopini. Mikrostrujanje u otopini uzrokovano ultrazvukom povećava difuziju čvrste tvari u otapalo (González-Centeno i sur. 2015). Implozija mjehurića prilikom primjene ultrazvuka u postupku ekstrakcije prikazana je na **Slici 4** gdje "K" označava kompresiju a "R" označava razrijeđivanje.



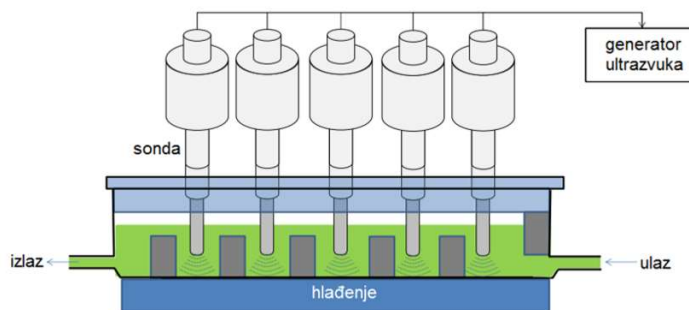
Slika 4 Fenomen akustične kavitacije, prikaz formacije, rasta i implozije mjehurića (Holban, 2017)

Ultrazvuk se, u prehrambenoj industriji, najčešće generira s pomoću električne energije. Istosmjerna struja se, uz pomoć ultrazvučnih pretvarača ili generatora, prevodi u visoke frekvencije. Postoje ultrazvučne sonde te ultrazvučne kupelji. Ultrazvučne sonde mogu biti kontinuirane (**Slika 6**) i diskontinuirane (**Slika 5**) (Tiwari, 2015).

Ultrazvuk visokog intenziteta koji djeluje u rasponu frekvencija od 20 do 100 kHz uzrokuje kemijske reakcije te promjene materijala u kojem se primjenjuje. Koristi se za otplinjavanje i čišćenje tekućina, sušenje, emulgiranje, destilaciju, ekstrakciju, sterilizaciju itd. Primjena ultrazvuka vrlo je bitna u prehrambenoj industriji kao netermička metoda obrade uzorka a veliki potencijal ultrazvuka je u njegovoj sposobnosti inaktivacije mikroorganizama i enzima, poboljšanja emulgiranja i dispergiranja te ubrzanja kemijskih reakcija (Drmić i Režek Jambrak 2010).



Slika 5 Diskontinuirani ultrazvučni ekstraktor sa sondom (Tiwari, 2015)



Slika 6 Kontinuirani ultrazvučni ekstraktor sa sondom (Tiwari, 2015)

Zbog jednostavnosti, niže cijene te visoke učinkovitosti ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom sve češće se primjenjuje u praksi a osobito za ekstrakciju polifenolnih spojeva (Bucić-Kojić i sur. 2013). Osim toga, moguće je simultano provesti više ekstrakcija te je relativno jeftina laboratorijska tehnika za razliku od ostalih modernih ekstrakcijskih metoda. Zbog svojih karakteristika, ultrazvučna ekstrakcija može se koristiti i kao predtretman sofisticiranijim metodama ekstrakcije (Holban, 2017). Primjena ultrazvuka pri ekstrakciji nalazi sve veću primjenu, u **Tablici 2** prikazani su neki od radova na uzorcima bobica, kože i sjemenki grožđa.

Tablica 2 Prikaz odabranih znanstvenih radova na fenolnim spojevima grožđa (bobica, sjemenka, kožica) primjenom UAE

Uzorak	Uvjeti UAE	Fenolni spojevi	Referenca
Bobice grožđa	otopina vode, etanola i klorovodične kiseline 0-75°C 200 W, 24 kHz	antocijani tanini	Carrera <i>et al.</i> , 2012
Kožice grožđa sorte Syrah	80% etanol 25-60°C 55 kHz	galna kiselina miricetin	de Irade <i>et al.</i> , 2021
Sjemenke grožđa	70% etanol 50°C 200 W	procijanidin	Sun <i>et al.</i> , 2024

2.3.2. Parametri koji utječu na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom

Na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom utječu sljedeći faktori: snaga i frekvencija ultrazvuka, temperatura i vrijeme ekstrakcije, karakteristike uzorka te otapalo. Ultrazvučno zračenje pridonosi razgradnji čvrste tvari i poboljšanju ekstrakcije, međutim, prevelik intenzitet ultrazvuka može dovesti do degradacije pojedinih komponenti. Duže vrijeme tretiranja ultrazvukom može dati ekstrakt s većim udjelom željene tvari, ali s druge strane predugo vrijeme tretiranja može dovesti do kemijske interakcije komponenata te promjena u nastalom ekstraktu. Veličina čestica kao i omjer tekuće/kruto glavne su karakteristike uzorka koje mogu utjecati na ishod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Velike dimenzije čestica usporavaju difuziju tvari zbog manje kontaktne površine s otapalom, zbog čega je uzorak potrebno usitniti prije provođenja ekstrakcije. Također, nedovoljna količina otapala može dovesti do usporavanja difuzije a samim time i procesa ekstrakcije (Banožić, 2022).

Fizikane karakteristike odabranog otapala za ekstrakciju poput viskoziteta, površinske napetosti, tlaka para iznad otapala, i dielektrične konstante, izravno utječu na selektivnost ekstrakcije kao i na konačni kemijski sastav ekstrakata. Tako je kod otapala većeg viskoziteta i površinske napetosti smanjen utjecaj ultrazvučne kavitacije na fenomene prijenosa te je preporučljivo u tim slučajevima primijeniti zračenje većeg intenziteta (Beach i Kundu, 2017). S obzirom na navedene čimbenike koji utječu na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, potrebno je pažljivo odrediti procesne parametre kako bi dobili maksimalan prinos željene komponente.

2.4. Optimiranje procesnih parametara metodom odzivnih površina

Optimizacija je poboljšanje karakteristika određenog sustava u svrhu njegovog maksimalnog iskorištenja. Prilikom optimizacije određuju se procesni parametri te se prati njihov utjecaj na dobivene rezultate analize. Na taj način se određuju procesni parametri koji daju najtočnije rezultate. Tradicionalno se optimizacija radila promjenom samo jednog od parametara dok su drugi bili konstantni. Međutim, takav način optimizacije nije uključivao utjecaj jednog parametra na drugi zbog čega nije davao najbolje rezultate, osim toga, praćenje jednog po jednog procesnog parametra iziskuje puno veći utrošak vremena, materijala te reagensa. Kako bi se izbjegao gubitak vremena i resursa koji su se javljali pri tradicionalnim metodama optimizacije uvedene su metode multivarijantne statistike među kojima veliku primjenu u

određivanju optimalnih parametara analize zauzima metoda odzivnih površina (*engl. Response Surface Methodology - RSM*) (Bezerra i sur. 2008).

Provođenje RSM metode odvija se u tri koraka:

- 1) Preliminarna faza kojom se određuju nezavisni parametri te njihove razine.
- 2) Drugi korak uključuje izbor eksperimentalnog dizajna i formiranje modela koji opisuje odnos nezavisnih i zavisnih varijabli zatim i njegovu verifikaciju.
- 3) U trećem koraku aproksimiraju se rezultati funkcijama drugog ili prvog reda, ovisno o procesu te o nezavisnim varijablama (Baş i Boyacı, 2007).

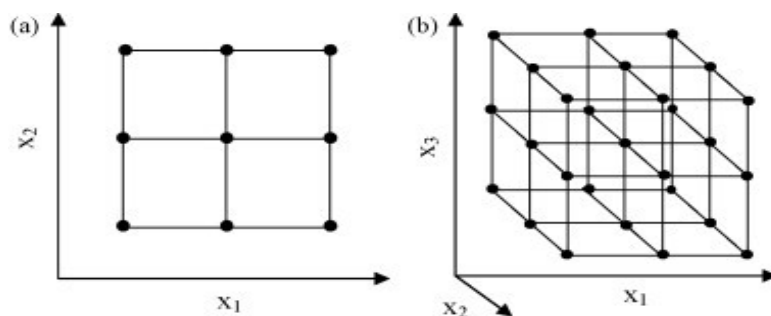
2.4.1. Box-Behnken plan pokusa

RSM metoda uključuje Box-Behnken plan pokusa koji se primjenjuje kada je broj faktora, pri određivanju broja eksperimenata, veći od dva. Box-Behnken plan predlaže način odabira točki iz faktorijela raspoređenih na tri razine. Eksperimentalne točke nalaze se na hipersferi na jednakoj udaljenosti od središnje točke kao što je prikazano na **Slici 6**. Određivanje broja eksperimenata prema Box-Behnken planu pokusa vrši se prema formuli (2):

$$N = 2k \cdot (k - 1) + C_p \quad (2)$$

Gdje N označava broj eksperimenata, k broj faktora, a C_p broj središnjih točaka.

Razine faktora svode se na tri razine (-1, 0, 1) s međusobno jednakim intervalom (Bezerra i sur. 2008).



Slika 7 Prikaz trostraničnog dizajna pri optimizaciji s tri varijable (Izvor: Bezerra i sur. 2008)

3. Eksperimentalni dio

3.1. Zadatak

Ciljevi ovog rada su:

- 1) Provesti ultrazvučnu ekstrakciju na uzorcima sjemenki i kožice grožđa sorte Pinot crni, te odrediti kako različiti parametri ultrazvučne ekstrakcije utječu na antioksidacijsku aktivnost, te sadržaj fenola u dobivenim ekstraktima.
- 2) Odrediti antioksidacijsku aktivnost u dobivenim ekstraktima.
- 3) Odrediti udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima.
- 4) Identificirati i kvantificirati pojedinačne fenole s pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) u ekstraktima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom
- 5) Optimirati proces ultrazvučne ekstrakcije metodom odzivnih površina.

3.2. Materijali

3.2.1. Komina grožđa sorte Pinot crni

Komina grožđa sorte Pinot crni dobivena je iz vinarije Belje (Kneževi Vinogradi, Hrvatska) 2023. godine. Na **Slici 8** je prikazana komina grožđa prethodno osušena 24 sata na 60°C.



Slika 8 Komina grožđa sorte Pinot crni (Izvor: autor)

3.2.2. Reagensi

- Destilirana voda,
- 96%-tni etanol Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 48%tna vodena otopina etanola (vodene otopine reagensa pripremljene s ultračistom Milli-Q vodom, Millipore/Simplicity 185 sustav),
- 1,1-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Na₂CO₃, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska),
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- Galna kiselina, čistoće 97,5 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- 0,1%-tna mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka)
- 0,1%-tna mravlja kiselina u metanolu

3.2.3. Uredaji

- Analitička vaga Crystal - 200 CAL CE (Gibertini Elettronica, Italija)
- Uređaj za usitnjavanje uzorka SM-4500C (mrc Sample mill, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda UP400St (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka)
- Vakuum uparivač SpeedVac SPD1030 (TermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- HPLC sustav Agilent 1260 Infinity 0 II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Spektrofotometar UV/VIS LLG-uniSPEC 2 (LLG Labware, Wilmington, Delaware, SAD)

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzorka za ekstrakciju

Nakon čišćenja komine od nečistoća i odvajanja kožice od sjemenki dobiveni su uzorci na **Slikama 9 i 10.**



Slika 9 Kožica grožđa (Izvor: autor)



Slika 10 Sjemenke grožđa (Izvor: autor)

Sljedeći korak u pripremi uzorka je njegovo usitnjavanje koje je provedeno na uređaju za usitnjavanje (SM-4500C) jednu minutu pri 4000 rpm. Usitnjavanje, pri pripremi uzorka za ekstrakciju, je važno zbog učinka ekstrakcije. Nakon usitnjavanja dobije se veća količina sitnijih čestica čime se povećava kontakt između čestice i otapala i povećava brzina ekstrakcije. Na **Slici 11** i **Slici 12** prikazan je postupak usitnjavanja uzorka (sjemenki grožđa). Uzorak kožice grožđa i uzorak sjemenki grožđa zasebno su usitnjavani.



Slika 11 Postupak usitnjavanja sjemenki grožđa
(Izvor: autor)



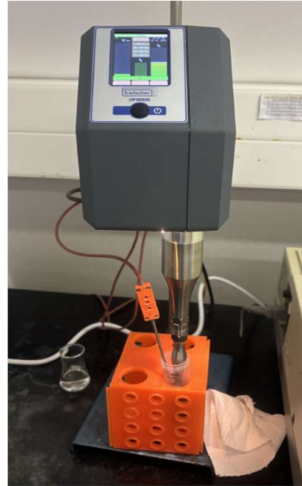
Slika 12 Usitnjen uzorak sjemenki grožđa
(Izvor: autor)

3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

U epruvete je odvagano 1,5 g usitnjenog uzorka te dodano 30 mL otapala. Korištena otapala su: destilirana voda, 96%-tni etanol te 48%-tna vodena otopina etanola. Na taj način pripremljeno je 17 uzoraka s različitim koncentracijama otapala prema Box-Behnkenovom planu pokusa (**Tablica 3**). Nadalje su uzorci homogenizirani te podvrgnuti ultrazvučnoj ekstrakciji. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je uz pomoć ultrazvučne sonde Hielscher UP400St (**Slika 13**). Vrijeme izlaganja uzorka ultrazvuku bilo je 120 sekundi (konstantni parametar) uz primjenu različitih vrijednosti amplituda te impulsa. Omjer usitnjenog uzorka [g] i otapala [mL] bio je 1:20 (konstantni parametar).

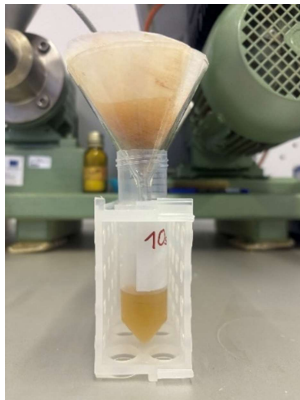
Tablica 3 Procesni parametri za ultrazvučnu ekstrakciju

Broj uzorka	Otapalo [% EtOH]	Amplituda [%]	Impuls [%]
1	48	60	60
2	48	60	60
3	48	60	60
4	48	20	100
5	48	20	20
6	0	60	100
7	48	60	60
8	48	100	20
9	48	100	100
10	96	100	60
11	0	100	60
12	96	20	60
13	0	20	60
14	96	60	100
15	0	60	20
16	48	60	60
17	96	60	20



Slika 13 Ultrazvučna sonda (Izvor: autor)

Nakon ultrazvučne ekstrakcije dobiveni ekstrakt filtriran je s pomoću filter papira. Postupak filtracije prikazan je na **Slikama 14 i 15**.



Slika 14 Filtracija ekstrakta sjemenki grožđa



Slika 15 Filtracija ekstrakta kože grožđa



Slika 16 Profiltrirani ekstrakt sjemenki grožđa



Slika 17 Profiltrirani ekstrakt kože grožđa

Nakon ekstrakcije vidljiva je različita boja dobivenih ekstrakta (**Slika 16** i **Slika 17**) što ukazuje na ovisnost ekstrakcije o primijenjenom otapalu. Dobiveni, profiltrirani ekstrakti koristili su se za daljnju analizu. U prethodno izvagane epruvete otpipetiralo se po 8 mL ekstrakta te su uzorci postavljeni na uparavanje u uređaju SpeedVac SPD1030, prikazanom na **Slici 18**, pri temperaturi 40-45°C i tlaku od 7,5 bara.



Slika 18 Uparavanje u uređaju SpeedVac (Izvor: autor)

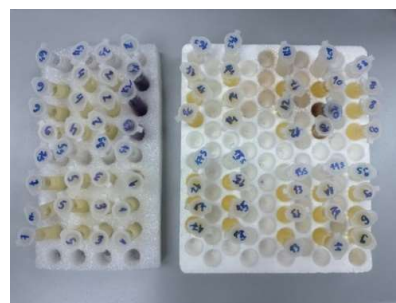
3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost uzoraka ekstrakta sjemenki i kožice grožđa određena je spektrofotometrijski, DPPH metodom. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljene su otopine ekstrakta dobivenog ultrazvučnom ekstrakcijom i svježe pripremljene DPPH otopine. U epruvetu je dodano 1,2 mL razrijeđenog ekstrakta koncentracije 0,5 mg/mL te 0,5 mL DPPH u tri ponavljanja. Za slijepu probu korišten je metanol, u epruvetu je dodano 1,2 mL razrijeđenog ekstrakta koncentracije 0,5 mg/mL te 0,5 mL metanola. Za kontrolu apsorbancije pripremljena je otopina 1,2 mL metanola i 0,5 mL DPPH. Tako pripremljeni uzorci prikazani na **Slici 20** stajali su 30 min na tamnom i zatim im je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru UV/VIS LLG pri 517 nm prikazanom na **Slici 19**.



Slika 19 Spektrofotometar UV/VIS LLG

(Izvor: autor)



Slika 20 Pripremljeni uzorci

(Izvor: autor)

Antioksidacijska aktivnost određena je prema jednadžbi (3):

$$\%DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Gdje je:

A_{DPPH} - kontrola apsorbancije

A_b - slijepa proba

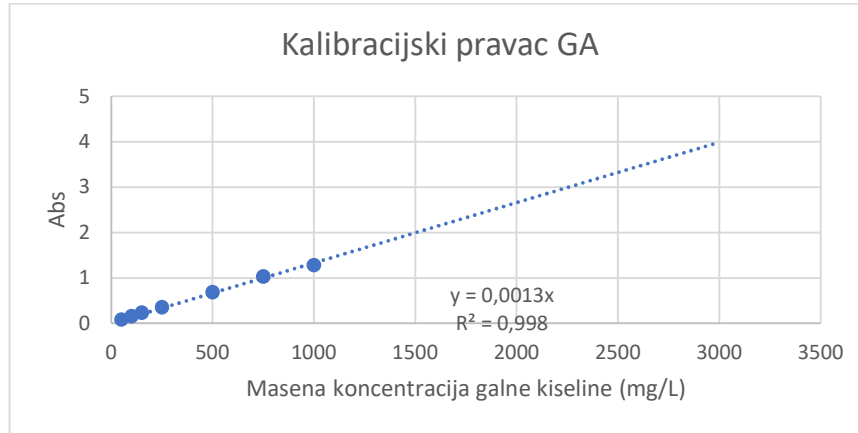
A_s – apsorbancija uzorka

Dobiveni rezultati izražavaju se u postotku (%) redukcije slobodnog radikala DPPH.

3.3.4. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski, metodom s Folin-Ciocalteuovim reagensom. Folin-Ciocalteuov reagens smjesa je fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. U reakciji s fenolnim spojevima dolazi do redukcije fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline u molibdenov i volframov oksid.

Za određivanje ukupnih fenola pripremljene su otopine od ekstrakta dobivenog ultrazvučnom ekstrakcijom, Folin-Ciocalteuovog reagensa, natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te destilirane vode. U epruvetu je dodano 20 μg razrijeđenog ekstrakta koncentracije 0,5 mg/mL, 100 μg Folin-Ciocalteuovog reagensa te 300 μg 20%-tnog Na_2CO_3 . Nakon dodanog natrijevog karbonata (nakon 3 min) vidljiva je promjena boje iz žute u plavu (nastaje reducirani oblik Folin-Ciocalteuovog reagensa) što ukazuje na prisutnost fenola. Intenzitet obojenja je proporcionalan količini fenola u uzorku. U uzorak je dodano 1580 μg destilirane vode. Nadalje se uzorak termostatirao 30 min na 40°C te mu je određena apsorbancija u spektrofotometru UV/VIS LLG pri 765 nm prikazanom na **Slici 19**. Uzorci su pripremljeni u tri paralele a rezultati se izračunavaju prema kalibracijskoj krivulji (**Slika 21**) galne kiseline.



Slika 21 Graf kalibracijske krivulje galne kiseline

3.3.5. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD)

Za analizu pojedinih fenola u uzorcima kože i sjemenki grožđa primijenjena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC - engl. High Performance Liquid Chromatography) na uređaju HPLC Agilent 1260 Infinity 0 II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) (**Slika 24**). Ekstrakti dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom pročišćeni su od nečistoća kako eventualni zaostatci krutih čestica ne bi oštetili kromatografski sustav. Uzorci su profiltrirani kroz PTFE (politetrafluoroetilen) filtre (**Slika 22**) kroz pore veličine 0,45 μm u vialle od 6 mL. Tako pripremljeni uzorci (**Slika 23**) analizirani su se HPLC sustavom prikazanim na **Slici 24**



Slika 22 Filtracija uzoraka s PTFE filterima (Izvor: autor)



Slika 23 Pripremljeni uzorci za HPLC analizu (Izvor: autor)



Slika 24 (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2024)

HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II sastoji se od:

- 1) kvarterne pumpe (G7111B)
- 2) grijača kolone (G7116A) (raspona temperatura 10°C- 85°C)
- 3) DAD detektora (G7115A)
- 4) autosamplera (G7129A) (kapacitet: 36 viala po 6 mL)
- 5) sakupljača frakcija (G1364E)
- 6) kolone InfinityLab Inertsil ODS-3V (duljina: 250 mm, unutarnji promjer: 4,6 mm, veličina čestica: 5 μm)

Odvajanje spojeva u analiziranim uzorcima odvijalo se gradijentnim eluiranjem pri protoku od 1 mL/min kroz 55 min. Za fazu A korištena je 0,1%-tna mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka) a za fazu B korištena je 0,1%-tna mravlja kiselina u metanolu. Gradijent eluiranja je postavljen na sljedeći način:

- 0,00-8,00 min 90% A
- 8,00-16,00 min 75% A
- 16,00-28,00 min 55% A
- 28,00-55,00 min 20% A

Nakon navedenih gradijenata uslijedio je period od 20 min gdje su se uvjeti analize vratili na početno stanje. Volumen injektiranja uzoraka iznosio je 10 μL , valna duljina (UV detekcije) je bila 240, 250, 260, 270, 280, 330 i 360 nm, a pri kojoj se provela analiza je 50 °C.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva iz ekstrakata sjemenki i kože grožđa provedena je računalnim programom ChemStation u kojemu se, osim obrade podataka, vršilo i upravljanje sustavom. Identifikacija je provedena na način da su se uspoređivala vremena zadržavanja pojedinih spojeva sa izdvojenim, dostupnim pikovima stiarda. Kvantifikacija je provedena s pomoću kalibracijskih krivulja, metodom vanjskog standarda. Vremena zadržavanja pojedinih fenolnih spojeva koja su se koristila za identifikaciju spojeva prikazana su u **Tablici 4**.

Tablica 4 Vremena zadržavanja pojedinih fenolnih spojeva

FENOLNI SPOJ	VRIJEME ZADRŽAVANJA [min]	R^2
Galna kiselina	6,724	0,99904
Epigalokatehin	12,406	0,99505
Neoklorogenska kiselina	12,613	0,99997
Katehin	12,952	0,99997
Procijanidin B2	13,78	0,99997
Epikatehin	17,773	0,99736
Siringična kiselina	19,84	0,99995
7-hidroksi kumarin	24,436	0,99998
p- kumarinska kiselina	24,962	0,99992
Sinapična kiselina	27,522	0,99986
Benzojeva kiselina	29,833	0,99997
Reservatrol	31,503	0,99939
Elagična kiselina	31,708	0,95516
Miricetin	33,402	0,98601
Procijanidin A2	25,13	0,99996

Standardne kalibracijske krivulje za sve standarde fenola pripremljene su u rasponu od 1,00-50,0 $\mu\text{g/mL}$. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s R^2 vrijednostima prikazanim u **Tablici 4**.

3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina

Za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije primijenjena je metoda odzivnih površina (*engl. Response Surface Methodology - RSM*) pomoću koje se optimiraju utjecaji parametara ekstrakcije na dobivene odzive.

RSM metoda uključila je Box-Behnken plan pokusa. Dizajn je uključivao sedamnaest eksperimenata s pet ponavljanja u centralnoj točki.

Procjena koeficijenata regresijskom analizom, analiza značajnosti parametara na procese (ANOVA) i numerička optimizacija provedeni su s pomoću programa Design-Expert[®], v.9 (Stat Ease, Minneapolis, USA).

Koeficijentom determinacije (R^2), p -vrijednostima modela te nedostatkom prilagođavanja određena je adekvatnost modela.

Na temelju nastalog polinoma (matematičkog modela) određene su odzivne površine kojima se omogućuje vizualni prikaz ovisnosti ispitivanih parametara i promatranih procesa.

4. Rezultati i rasprava

4. 1. Utjecaj procesnih parametara UAE na udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima

Postoje dvije metode određivanja ukupnih fenola iz biljnog materijala a to su: metoda s pomoću Folin-Denisovog reagensa i metoda s pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa. Navedene metode temelje se na reakciji redukcije. Fenolni spojevi reduciraju navedene reagense pri čemu dolazi do formiranja plavo obojenog kompleksa uslijed oksidacije reagensa. Obje metode, zbog svoje nespecifičnosti, određuju sve prisutne fenolne skupine u uzorcima (Bucić-Kojić, 2008). Nakon primjene ultrazvučne ekstrakcije pri različitim procesnim parametrima (amplituda, impuls te otapalo) udio ukupnih fenola u ekstraktu odredio se spektrofotometrijski, Folin-Ciocalteuovom metodom. U **Tablicama 5 i 6** prikazani su primijenjeni procesni parametri te udjeli ukupnih fenola u uzorcima (izraženi u mg/L galne kiseline).

Tablica 5 Udio ukupnih fenola u ekstraktima kože grožđa

Broj uzorka	Otapalo [% etOH]	Amplituda [%]	Impuls [%]	GAE [mg/L]
1	48	60	60	50
2	48	60	60	46,41
3	48	60	60	52,56
4	48	20	100	55,38
5	48	20	20	44,1
6	0	60	100	41,54
7	48	60	60	49,23
8	48	100	20	57,69
9	48	100	100	60,26
10	96	100	60	50
11	0	100	60	46,92
12	96	20	60	49,49
13	0	20	60	36,41
14	96	60	100	46,15
15	0	60	20	44,1
16	48	60	60	46,15
17	96	60	20	23,08

Iz **Tablice 5** vidljivo je kako je najveći udio ukupnih fenola zabilježen pri primjeni 48%-tne vodene otopine etanola, amplitudi od 100% te impulsu od 100% te iznosi 60,26 mg/L GAE. Najmanji udio ukupnih fenola određen je pri korištenju 96%-tne vodene otopine etanola, amplitudi od 60% te impulsu od 20% te iznosi 23,08 mg/L GAE. Iz navedenog se može zaključiti kako otapalo u kombinaciji s primijenjenim impulsom utječe na udio ukupnih fenola u uzorcima kože grožđa.

Tablica 6 Udio ukupnih fenola u ekstraktim sjemenki grožđa

Broj uzorka	Otapalo [% etOH]	Amplituda [%]	Impuls [%]	GAE [mg/L]
1	48	60	60	155,13
2	48	60	60	163,08
3	48	60	60	171,03
4	48	20	100	167,95
5	48	20	20	130,51
6	0	60	100	97,69
7	48	60	60	170,26
8	48	100	20	236,67
9	48	100	100	237,95
10	96	100	60	117,18
11	0	100	60	122,31
12	96	20	60	103,08
13	0	20	60	94,62
14	96	60	100	105,9
15	0	60	20	118,97
16	48	60	60	168,97
17	96	60	20	91,03

Iz **Tablice 6** vidljivo je kako je najveći udio ukupnih fenola zabilježen pri primjeni 48%-tne vodene otopine etanola, amplitudi od 100% te impulsu od 100% te iznosi 237,95 mg/L GAE. Vrlo slična količina ukupnih fenola (236,67 mg/L GAE) dobivena je primjenom 48%-tne

vodene otopine etanola, amplitude od 100% te impulsa od 20%. Količina ukupnih fenola se neznatno smanjila primjenom manjeg postotka impulsa.

Najmanji udio ukupnih fenola zabilježen je pri korištenju 96%-tne vodene otopine etanola, amplitude od 60% te impulsu od 20% te iznosi 91,03 mg/L GAE. Pri određivanju ukupnih fenola u ekstraktima iz uzoraka sjemenki grožđa značajan utjecaj je imao izbor otapala, u ovom slučaju koncentracija etanola. Iz **Tablice 6** je vidljivo kako su najveće količine ukupnih fenola određene pri 48%-tnoj vodenoj otopini etanola kao otapala. Općenito, udio ukupnih fenola znatno je veći u uzorcima sjemenki grožđa u odnosu na uzorke kožeice grožđa.

Za određivanje udjela ukupnih fenola ultrazvučnom ekstrakcijom najbolje su se pokazali parametri: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% i impuls 100%.

Carrera i sur. (2012) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva na uzorcima bobica grožđa. Ekstrakciju su proveli na dva načina: ekstrakcija konvencionalnom metodom te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom te su utvrdili kako je udio ukupnih fenola veći u uzorcima koji su ekstrahirani s pomoću ultrazvuka.

4.2. Utjecaj procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost

Antioksidansi su tvari koje štite organizam od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Antioksidansi se vežu na slobodne radikale i na taj način sprječavaju njihovo oksidacijsko djelovanje. Fenolni spojevi imaju antioksidacijsko svojstvo, a njihova antioksidacijska aktivnost ovisi o količini hidroksilnih skupina, strukturi konjugacija, te prisutnosti elektron-donorskih i elektron-akceptorskih supstituenata na benzenskom prstenu. Postoji nekoliko metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti u biljnim uzorcima:

- 1) TEAC (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity),
- 2) FRAP (engl. Ferric Reducing/Antioxidant Power),
- 3) DPPH metoda (Jakobek i sur. 2007; Bucić-Kojić 2008).

U ovom radu primijenjena je DPPH metoda primjenom koje dolazi do redukcije slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) u prisustvu antioksidanasa pri čemu dolazi do postupne promjene boje od ljubičaste preko zelene pa do žute.

U **Tablicama 7 i 8** prikazani su primijenjeni procesni parametri te antioksidacijska aktivnost u uzorcima (izražena u % DPPH)

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost u ekstraktima kožice grožđa

Broj uzorka	Otapalo [% etOH]	Amplituda [%]	Impuls [%]	% DPPH
1	48	60	60	22,873
2	48	60	60	22,092
3	48	60	60	22,756
4	48	20	100	21,077
5	48	20	20	20,414
6	0	60	100	17,447
7	48	60	60	21,624
8	48	100	20	21,311
9	48	100	100	24,161
10	96	100	60	11,397
11	0	100	60	5,386
12	96	20	60	8,275
13	0	20	60	1,444
14	96	60	100	13,154
15	0	60	20	1,093
16	48	60	60	22,795
17	96	60	20	10,5

Iz **Tablice 7** vidljivo je kako je najveća antioksidacijska aktivnost pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola, primjeni amplitude od 100% te impulsa od 100% te iznosi 24,161% DPPH. Primjenom 48%-tnog etanola te amplitude i impulsa od 60% određena je manja antioksidacijska aktivnosti (22%) što ukazuje na činjenicu da smanjenje amplitude i impulsa utječe na smanjenje antioksidacijske aktivnosti. Najmanja antioksidacijska aktivnost određena je pri primjeni čiste vode kao otapala, amplitudi od 60%, impulsu od 60% te iznosi 1,0935% DPPH. Najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti zabilježene su pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola što ukazuje na činjenicu da izbor otapala uvelike utječe na oksidacijsku aktivnost.

Tablica 8 Antioksidacijska aktivnost u ekstraktima sjemenki grožđa

Broj uzorka	Otapalo [% etOH]	Amplituda [%]	Impuls [%]	%DPPH
1	48	60	60	65,886
2	48	60	60	67,018
3	48	60	60	66,706
4	48	20	100	61,007
5	48	20	20	60,109
6	0	60	100	54,45
7	48	60	60	66,237
8	48	100	20	64,169
9	48	100	100	77,83
10	96	100	60	54,333
11	0	100	60	49,766
12	96	20	60	53,63
13	0	20	60	45,941
14	96	60	100	54,801
15	0	60	20	43,911
16	48	60	60	67,096
17	96	60	20	48,322

Iz **Tablice 8** vidljivo je kako je najveća antioksidacijska aktivnost pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola, primjeni amplitude od 100% te impulsa od 100% (uzorak broj 9) te iznosi 77,83% DPPH. Kod uzorka broj 4, uz 48%-tni etanol i impuls od 100%, primijenjena je amplituda od 20% te je određena antioksidacijska aktivnost od 61,077% DPPH što je znatno manje u odnosu na uzorak broj 9. Iz toga se može zaključiti kako se primjenom manje amplitude smanjuje antioksidacijska aktivnost uzoraka. Najmanja antioksidacijska aktivnost određena je pri korištenju vode kao otapala pri amplitudi od 60% i impulsu od 20%. Općenito, antioksidacijska aktivnost sjemenki grožđa znatno je veća u odnosu na antioksidacijsku aktivnost kožice grožđa što se može pripisati većem udjelu ukupnih polifenola u sjemenkama grožđa.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ultrazvučnom ekstrakcijom najbolje su se pokazali parametri: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% i impuls 100%.

González-Centeno i sur. (2015) usporedili su konvencionalne metode ekstrakcije sa ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom na uzorku komine grožđa sorte Syrah. Obje vrste ekstrakcija provedene su pri različitim temperaturama (20°C, 35°C, 50°C) i vremenu gdje su alikvoti ekstrakta uzimani nakon 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60 minuta te uz vodu kao otapalo. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je pri frekvenciji od 55 ± 5 kHz. Pri konvencionalnim metodama miješanje uzorka se odvijalo mehaničkim putem dok je pri ultrazvučnoj ekstrakciji to miješanje zamijenila ultrazvučna sonda. Uočeno je značajno povećanje antioksidativnog kapaciteta te udjela ukupnih fenola porastom temperature, a osobito primjenom ultrazvuka. Nakon ultrazvučne ekstrakcije od 1 sata pri temperaturi od 50°C ukupni sadržaj fenolnih spojeva bio je 3,3 puta veći, dok je antioksidativni kapacitet bio 2,5 puta veći u odnosu na konvencionalne metode.

González-Centeno i sur. (2015) zaključuju kako ultrazvučna ekstrakcija daje bolje rezultate u pogledu ukupnih sadržaja fenola i antioksidacijske aktivnost, te da je brzina ultrazvučne ekstrakcije veća u odnosu na konvencionalne metode.

4.3. Statistička analiza procesnih parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

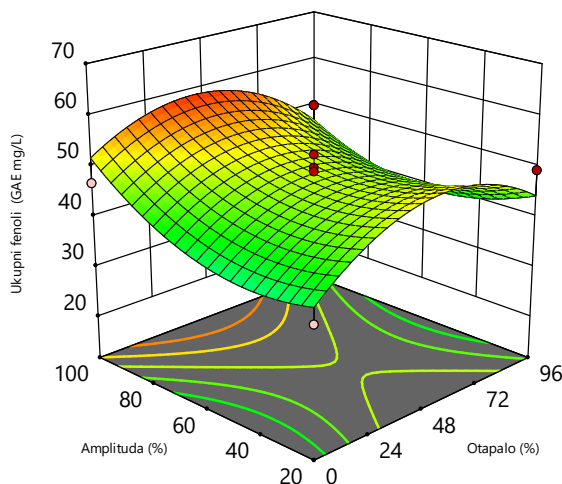
S pomoću programa Design-Expert® provedena je optimizacija procesa ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, metodom odzivnih površina. Cilj je bio pronaći optimalne uvjete ekstrakcije u odnosu na udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost u dobivenim ekstraktima. Statistička analiza značajnosti parametara na procese (ANOVA) provedena je za promatrane odzive.

Statistička analiza (ANOVA) za određivanje ukupnih fenola iz uzoraka kože grožđa prikazana je u **Tablici 9**. Kada je p -vrijednost manja od 0,05 tada taj parametar ima statistički značajan utjecaj na promatrani odziv.

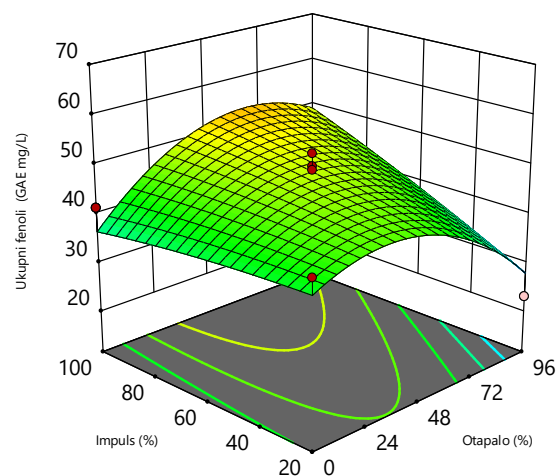
Tablica 9 Statistička analiza (ANOVA) za ukupne fenole kože grožđa

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F -vrijednost	p -vrijednost
Model	979,59	9	108,84	4,39	0,032
Otapalo-X_1	0,0078	1	0,0078	0,0003	0,9863
Amplituda-X_2	108,71	1	108,71	4,38	0,0745
Impuls-X_3	147,58	1	147,58	5,95	0,0448
X_1X_2	25	1	25	1,01	0,3487
X_1X_3	164,22	1	164,22	6,62	0,0368
X_2X_3	18,97	1	18,97	0,765	0,4108
X_1^2	372,24	1	372,24	15,01	0,0061
X_2^2	163,82	1	163,82	6,61	0,037
X_3^2	2,37	1	2,37	0,0955	0,7663
Ostatak	173,56	7	24,79		
Nedostatak modela	145,08	3	48,36	6,79	0,0476
Pogreška	28,47	4	7,12		
Ukupno	1153,15	16			
R^2	0,9607				

Iz **Tablice 9** vidljivo je da je regresijski model statistički značajan s obzirom na p -vrijednost koja iznosi: 0,032 te s R^2 vrijednosti koja iznosi: 0,9607. Promatranjem pojedinačnih parametara na odziv vidljivo je kako impuls, interakcija otapala i impulsa, kvadratni član otapala te kvadratni član amplitude imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odziv. Od navedenog, najveći statistički utjecaj ima kvadratni član otapala. **Slika 25** i **Slika 26** prikazuju 3D model odzivnih površina za ukupne fenole kože grožđa.



Slika 25 3D model utjecaja amplitude i otapala na udio ukupnih fenola u koži grožđa



Slika 26 3D model utjecaja impulsa i otapala na udio ukupnih fenola u koži grožđa

Iz **Slike 25** i **Slike 26** vidljivo je kako porastom amplitude raste i udio ukupnih fenola u koži grožđa dok porast postotka impulsa nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola. Također je vidljivo kako je najveći udio ukupnih fenola pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola.

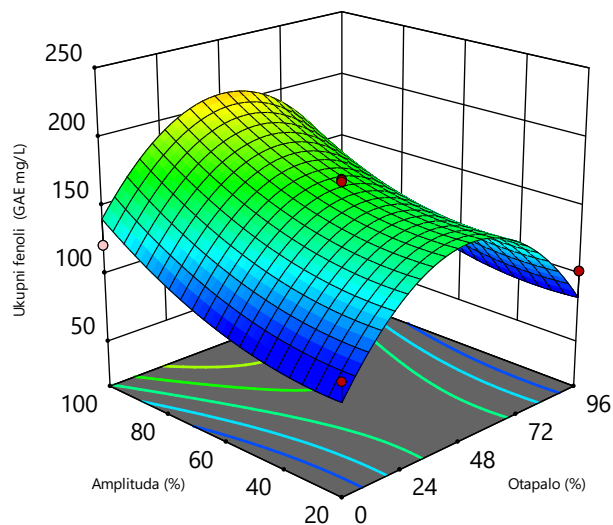
Statistička analiza (ANOVA) za određivanje ukupnih fenola iz uzoraka sjemenki grožđa prikazana je u **Tablici 10**.

Tablica 10 Statistička analiza (ANOVA) za ukupne fenole sjemenki grožđa

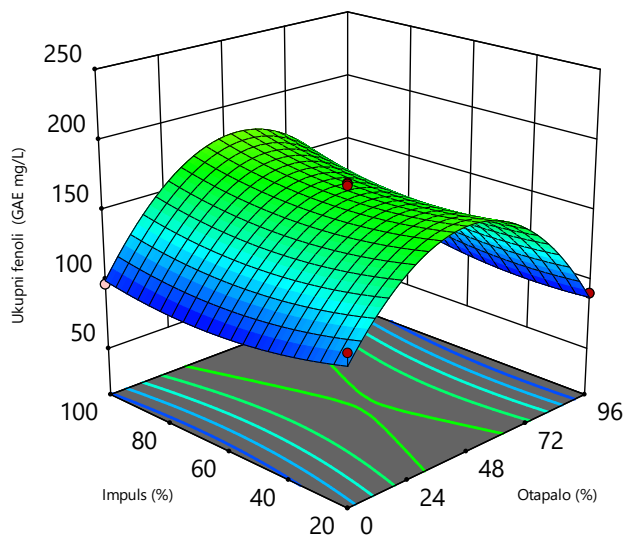
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	30275,13	9	3363,9	8,54	0,0049
Otapalo-X_1	33,62	1	33,62	0,0854	0,7786
Amplituda-X_2	5937,78	1	5937,78	15,08	0,006
Impuls-X_3	130,49	1	130,49	0,3314	0,5829
X_1X_2	46,17	1	46,17	0,1173	0,7421
X_1X_3	326,71	1	326,71	0,8297	0,3927
X_2X_3	326,89	1	326,89	0,8301	0,3925
X_1^2	22520,65	1	22520,65	57,19	0,0001
X_2^2	1179,62	1	1179,62	3	0,1271
X_3^2	494,58	1	494,58	1,26	0,2994
Ostatak	2756,46	7	393,78		
Nedostatak modela	2577,97	3	859,32	19,26	0,0077
Pogreška	178,48	4	44,62		
Ukupno	33031,59	16			
R^2	0,9166				

Iz **Tablice 10** vidljivo je da je regresijski model statistički značajan s obzirom na p -vrijednost koja iznosi: 0,0049 te s R^2 vrijednosti koja iznosi: 0,9166. Promatranjem pojedinačnih parametara na odziv vidljivo je kako amplituda te kvadratni član otapala statistički imaju značajan utjecaj na promatrani odziv. Od navedena dva parametra veći statistički utjecaj ima kvadratni član otapala.

Slika 27 i **Slika 28** prikazuju 3D model odzivnih površina za određivanje ukupnih fenola u uzorcima sjemenki grožđa.



Slika 27 3D model utjecaja amplitude i otapala na udio ukupnih fenola u sjemenkama grožđa



Slika 28 3D model utjecaja impulsa i otapala na udio ukupnih fenola u sjemenkama grožđa

Iz **Slike 27** i **Slike 28** vidljivo je kako porastom amplitude raste i udio ukupnih fenola u sjemenkama grožđa dok porast postotka impulsa nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola. Također je vidljivo kako je najveći udio ukupnih fenola pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola.

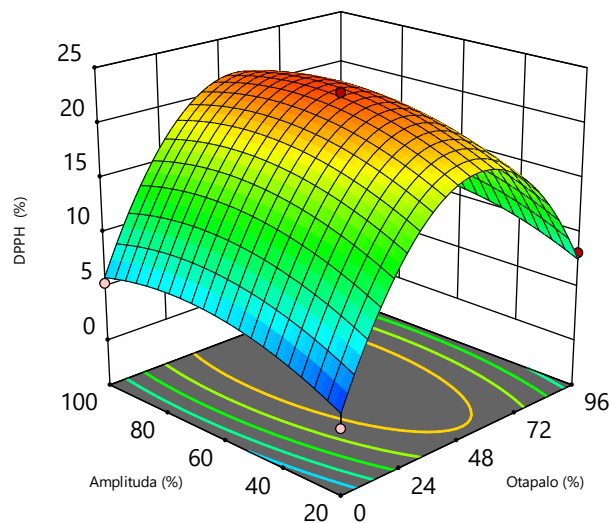
Statistička analiza (ANOVA) za određivanje antioksidacijske aktivnosti iz uzoraka kože grožđa prikazana je u **Tablici 11**.

Tablica 11 Statistička analiza (ANOVA) za antioksidacijsku aktivnost kože grožđa

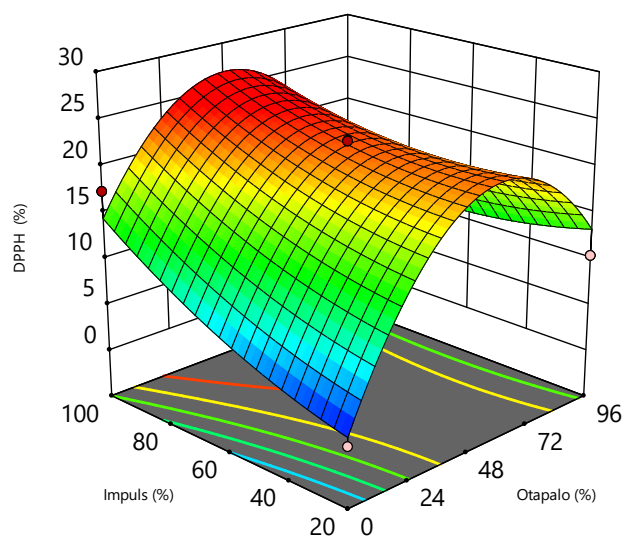
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	975,02	9	108,34	19,02	0,0004
Otapalo-X_1	40,3	1	40,3	7,08	0,0325
Amplituda-X_2	15,25	1	15,25	2,68	0,1458
Impuls-X_3	63,4	1	63,4	11,13	0,0125
X_1X_2	0,1681	1	0,1681	0,0295	0,8685
X_1X_3	46,92	1	46,92	8,24	0,024
X_2X_3	1,2	1	1,2	0,21	0,6607
X_1^2	767,07	1	767,07	134,69	<0,0001
X_2^2	22,37	1	22,37	3,93	0,0879
X_3^2	11,02	1	11,02	1,94	0,2068
Ostatak	39,86	7	5,69		
Nedostatak modela	38,67	3	12,89	42,98	0,0017
Pogreška	1,2	4	0,2999		
Ukupno	1014,88	16			
R^2	0,9607				

Iz **Tablice 11** vidljivo je da je regresijski model statistički značajan s obzirom na p -vrijednost koja iznosi: 0,0004 te s R^2 vrijednosti koja iznosi: 0,9607. Promatranjem pojedinačnih parametara na odziv vidljivo je kako otapalo, impuls, interakcija otapala i impulsa te kvadratni član otapala imaju značajan utjecaj na promatrani odziv. Od navedenog, najveći statistički utjecaj ima kvadratni član otapala ($p = 0,0001$).

Slika 29 i **Slika 30** prikazuju 3D model odzivnih površina za određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima kože grožđa.



Slika 29 3D model utjecaja amplitude i otapala na antioksidacijsku aktivnost u kožici grožđa



Slika 30 3D model utjecaja impulsa i otapala na antioksidacijsku aktivnost u kožici grožđa

Iz **Slike 29** i **Slike 30** vidljivo je kako porastom impulsa raste i antioksidacijska aktivnost u kožici grožđa dok porast amplitude nema značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. Također je vidljivo kako je najveća antioksidacijska aktivnost pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola.

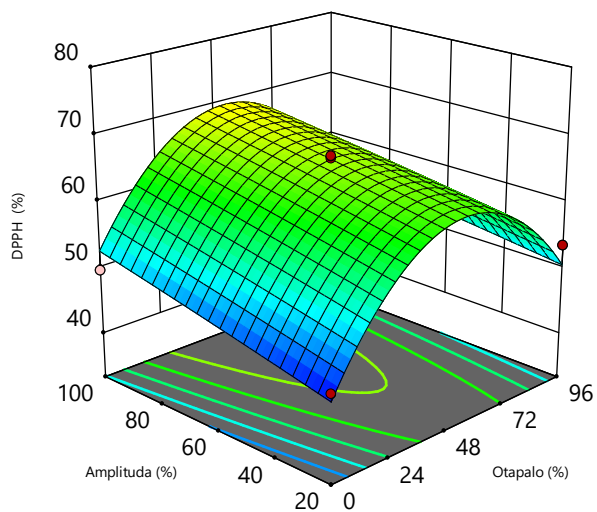
Statistička analiza (ANOVA) za određivanje antioksidacijske aktivnosti iz uzoraka sjemenki grožđa prikazana je u **Tablici 12**.

Tablica 12 Statistička analiza (ANOVA) za antioksidacijsku aktivnost sjemenki grožđa

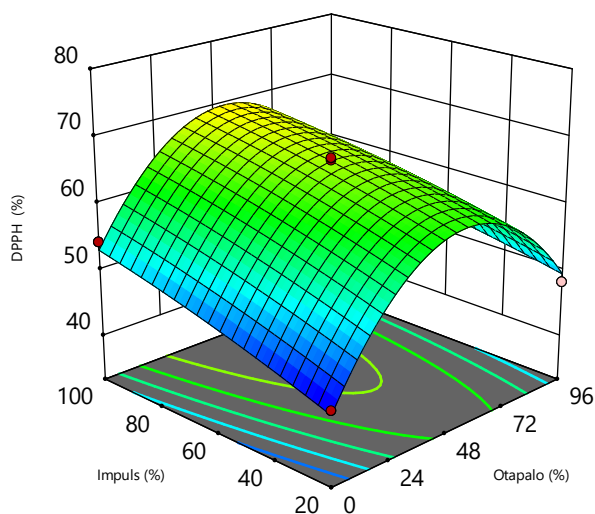
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1319,53	9	146,61	24,27	0,0002
Otapalo-X_1	36,2	1	36,2	5,9	0,0442
Amplituda-X_2	80,71	1	80,71	13,36	0,0081
Impuls-X_3	124,64	1	124,64	20,63	0,0027
X_1X_2	2,44	1	2,44	0,4034	0,5455
X_1X_3	4,12	1	4,12	0,6822	0,4361
X_2X_3	40,72	1	40,72	6,74	0,0356
X_1^2	1016,73	1	1016,73	168,32	0,0001
X_2^2	0,073	1	0,073	0,0121	0,9155
X_3^2	1,94	1	1,94	0,3206	0,5889
Ostatak	42,28	7	6,04		
Nedostatak modela	41,21	3	13,74	51,22	0,0012
Pogreška	1,07	4	0,2682		
Ukupno	1361,82	16			
R^2	0,9689				

Iz **Tablice 12** vidljivo je da je regresijski model statistički značajan s obzirom na p -vrijednost koja iznosi: 0,0002 te s R^2 vrijednosti koja iznosi: 0,9689. Promatranjem pojedinačnih parametara na odziv vidljivo je kako linearni član otapala, te amplitude i impulsa, kao i interakcija otapala i impulsa te kvadratni član otapala imaju statistički značajan utjecaj na promatrani odziv. Od navedenog, najveći statistički utjecaj ima kvadratni član otapala ($p=0,0001$).

Slika 31 i **Slika 32** prikazuju 3D model odzivnih površina za antioksidacijsku aktivnost uzoraka sjemenki grožđa.



Slika 31 3D model utjecaja amplitude i otapala na antioksidacijsku aktivnost u sjemenkama grožđa



Slika 32 3D model utjecaja impulsa i otapala na antioksidacijsku aktivnost u sjemnkama grožđa

Iz **Slike 31** i **Slike 32** vidljivo je kako porastom impulsa i amplitude raste antioksidacijska aktivnost u sjemenkama grožđa. Također je vidljivo kako je najveća antioksidacijska aktivnost pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola.

Statističkom obradom podataka utvrđeno je kako su optimalni uvjeti pri provođenju ultrazvučne ekstrakcije za uzorke sjemenki i kožice grožđa: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 100%.

4.4. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD)

Kromatografija je metoda kojom se komponente iz smjese razdjeljuju u dvije faze: mobilna ili pokretna faza i stacionarna ili nepokretna faza. Prema mobilnoj fazi razlikujemo: plinsku i tekućinsku kromatografiju te kromatografiju u superkritičnim uvjetima. U ovom radu primijenjena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s pomoću koje su identificirani i kvantificirani pojedini fenolni spojevi.

HPLC analizom uzoraka kože grožđa utvrđeno je 14 spojeva za koje su nam bili dostupni standardi (**Tablica 13**). Među određenim spojevima u najvećim koncentracijama prisutni su: katehin i epikatehin. U nižim koncentracijama prisutni su: epigalokatehin i procijanidin B2, dok su među najnižim koncentracijama prisutni: neoklorogenska kiselina, p-kumarinska kiselina, sinapična kiselina te resveratrol. Najveća koncentracija katehina (231,01 mg/L) određena je pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 100%. Dok je najmanja koncentracija katehina (55,68 mg/L) određena pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: voda kao otapalo, amplituda 20% te impuls 60%. Najveća koncentracija epikatehina (154,34 mg/L) određena je pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: koncentracija etanola od 48%, amplituda 100% te impuls 100%. Dok je najmanja koncentracija epikatehina (48,43 mg/L) određena pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 96%-tna vodena otopina etanola, amplituda 20% te impuls 60%.

S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako su najveće koncentracije pojedinačnih spojeva određene pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 100%.

HPLC analizom uzoraka sjemenki grožđa utvrđeno je 11 spojeva (**Tablica 14**). Među određenim spojevima u najvećim koncentracijama prisutni su: epigalokatehin, katehin i epikatehin. U nižim koncentracijama prisutan je procijanidin B2, dok su među najnižim koncentracijama prisutni: sinapična kiselina i resveratrol. Najveća koncentracija epigalokatehina (120,09 mg/L) određena je pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 20%. Dok je najmanja koncentracija epigalokatehina (19,83 mg/L) određena pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 96%-tna vodena otopina etanola,

amplituda 20% te impuls 60%. Najveća koncentracija katehina (530,51 mg/L) određena je pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 20%. Najmanja koncentracija katehina (157,02 mg/L) određena pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: voda kao otapalo, amplituda 20% te impuls 60%. Najveća koncentracija epikatehina (333,94 mg/L) određena je pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola, amplituda 100% te impuls 20%, dok je najmanja koncentracija epikatehina (80,43 mg/L) određena pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 96%-tna vodena otopina etanola, amplituda 60% te impuls 20%.

S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako su najveće koncentracije pojedinačnih spojeva određene pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola kao otapalo, amplituda 100% te impuls 20%.

U uzorcima kožice grožđa, za razliku od uzoraka sjemenki, pronađeni su: sirinjična kiselina, p-kumarinska kiselina, elagična kiselina, miricetin. U uzorcima sjemenki, za razliku od uzoraka kožice, pronađen je procijanidin A2. Općenito, veći broj pojedinačnih spojeva određen je u kožici grožđa u odnosu na sjemenku ali veće koncentracije pojedinačnih spojeva određene su u sjemenkama grožđa. I u sjemenkama i u kožici grožđa se u najvećim koncentracijama nalaze: fenolni spojevi - katehin i epikatehin čije su najveće koncentracije određene pri korištenju 48%-tne vodene otopine etanola te amplitude od 100% tijekom ultrazvučne ekstrakcije. Vrlo važan polifenolni spoj, određen i u sjemenkama i u kožici grožđa, je resveratrol. U ekstraktima sjemenki grožđa prisutan je u nešto većoj koncentraciji u odnosu na ekstrakte kožice grožđa, a najveća koncentracija (1,94 mg/L) određena mu je u ekstraktu dobivenom primjenom 48%-tne vodene otopine etanola kao otapala, amplitude od 100% te impulsa od 20%. Resveratrol je vrlo važan zbog svog visokog antioksidativnog djelovanja, također može se koristiti u liječenju tumora te se smatra potencijalnim polifenolnim spojem za liječenje i prevenciju određenih vrsta raka. Njegova antikarcinogena svojstva ističu se činjenicom da mogu inhibirati sve faze razvoja raka od inicijacije do progresije. Nadalje, zabilježeni su i drugi važni učinci resveratrola poput protuupalnih, kardioprotektivnih, vazorelaksantnih i neuroprotektivnih učinaka (Salehi i sur. 2018).

Tablica 13 Rezultati HPLC analize ekstrakata kože grožđa prema BBD

BROJ UZORKA	Galna kiselina mg/l	Epigalokatehin mg/l	Neoklorogensk a kiselina mg/l	Katehin mg/l	Procijanidin B2 mg/l	Epikatehin mg/l	Siringična kiselina mg/l	7- hidroksi kumarin mg/l	p- kumarinska kiselina mg/l	Sinapična kiselina mg/l	Benzojeva kiselina mg/l	Resveratrol mg/l	Elagična kiselina mg/l	Miricetin mg/l
RT	6,724	12,406	12,613	12,952	13,780	17,773	19,840	24,436	24,962	27,522	29,833	31,503	31,708	33,402
1.	6,56	48,97	2,12	216,80	23,94	144,35	3,55	12,16	3,53	2,24	11,65	1,34	2,35	4,04
2.	6,01	46,68	2,18	209,08	23,44	134,16	3,77	10,84	3,34	1,85	10,75	1,30	1,78	4,01
3.	5,96	46,59	2,20	208,8	23,17	142,25	3,73	10,96	3,32	1,86	10,81	1,29	1,91	4,03
4.	5,46	41,74	1,92	186,94	20,71	119,72	3,32	9,59	2,89	1,65	9,73	1,25	1,32	4,14
5.	6,20	48,53	2,33	216,39	24,35	143,09	3,35	11,84	3,93	2,22	11,42	1,36	2,12	4,03
6.	1,92	-	0,55	155,13	8,75	91,19	2,94	4,07	1,11	1,33	7,40	1,27	0,91	3,82
7.	6,09	54,59	2,08	209,57	22,79	142,44	3,66	8,10	3,26	2,13	10,82	1,28	1,99	4,20
8.	5,90	53,03	2,08	201,98	22,36	132,71	3,65	10,81	3,46	1,52	10,29	1,26	2,04	4,41
9.	6,61	51,84	2,44	231,01	25,35	154,34	3,58	7,52	2,27	2,17	11,99	1,43	2,39	4,05
10.	1,69	-	0,52	124,05	6,11	69,89	2,57	3,85	0,77	0,98	6,12	1,28	0,24	3,80
11.	5,72	30,66	0,22	93,35	16,80	72,46	2,39	0,28	0,15	0,72	3,44	-	-	-
12.	1,82	-	0,63	96,84	4,06	48,43	2,13	0,93	0,96	0,81	3,43	1,20	-	3,78
13.	5,23	23,53	0,85	55,68	12,75	52,39	2,55	-	-	0,56	2,47	-	-	-
14.	1,73	-	0,52	132,25	6,60	73,38	2,62	3,18	0,78	0,98	5,95	1,26	0,32	3,81
15.	5,19	22,20	0,80	57,16	12,24	52,58	2,47	-	-	1,96	3,57	-	-	-
16.	6,39	47,53	2,20	221,20	24,59	146,82	3,86	11,78	3,81	2,11	11,47	1,30	2,18	4,00
17.	1,60	-	0,41	109,7	5,36	61,16	2,53	2,65	0,67	0,94	5,41	1,21	0,21	4,10

Tablica 14 Rezultati HPLC analize u sjemenkama grožđa

BROJ UZORKA	Galna kiselina mg/l	Epigalokatehin mg/l	Neoklorogenska a kiselina mg/l	Katehin mg/l	Procijanidin B2 mg/l	Epikatehin mg/l	7- hidroksi kumarin mg/l	Procijanidin A2 mg/l	Sinapična kiselina mg/l	Benzojeva kiselina mg/l	Resveratrol mg/l
RT	6,724	12,406	12,613	12,952	13,780	17,773	24,436		27,522	29,833	31,503
1.	11,66	88,98	12,45	439,7	55,94	281,76	3,32	10,94	1,75	1,46	1,60
2.	11,53	91,52	12,77	423,28	54,13	271,66	21,27	9,55	1,80	1,54	1,58
3.	12,21	100,51	14,03	454,71	58,14	290,04	22,98	8,74	1,83	1,50	1,62
4.	12,07	90,76	12,74	419,62	52,59	263,10	27,58	11,75	13,46	2,63	1,80
5.	12,51	104,52	14,7	466,96	59,89	297,67	4,39	8,45	13,53	2,78	1,88
6.	10,83	82,8	12,80	284,59	50,71	180,28	12,99	9,06	0,88	4,05	-
7.	12,77	110,75	15,49	481,21	62,05	307,40	23,61	7,50	1,86	1,55	1,90
8.	13,89	120,09	16,86	530,51	67,11	333,94	123,49	9,16	15,60	2,94	1,94
9.	13,08	113,03	15,86	484,47	61,86	312,59	4,17	10,93	1,99	1,56	1,92
10.	5,26	42,04	1,5	315,52	21,22	174,46	-	11,12	9,22	9,47	1,50
11.	12,23	94,75	13,31	319,10	51,06	214,87	3,06	8,12	0,94	4,49	-
12.	4,04	19,83	1,20	242,22	16,01	130,13	9,66	11,97	0,75	2,17	1,40
13.	10,16	57,06	8,76	157,02	35,86	112,04	-	10,38	15,68	2,75	1,60
14.	5,29	25,61	1,47	308,0	20,89	172,40	-	9,69	0,87	2,85	1,40
15.	10,65	58,63	3,38	166,88	35,73	119,43	1,51	4,557	0,58	2,61	-
16.	12,58	107,01	15,03	464,09	59,14	294,05	111,85	8,92	1,83	1,59	1,61
17.	1,75	-	0,79	163,69	8,59	80,43	3,94	9,55	1,60	-	1,25

De Irade i sur. (2021) proveli su ultrazvučnu ekstrakciju u cilju određivanja utjecaja različitih parametara ekstrakcije na dobivene ekstrakte na uzorcima komine grožđa sorte Syrah. HPLC analizom ekstrakata utvrđena je najveća koncentracija kaftarinske kiseline u svim ekstraktima. Fenolna i galna kiselina određene su u visokim koncentracijama, međutim, te kiseline su karakteristične za sjemenke grožđa. Resveratrol, koji je također karakterističan za sjemenke grožđa, nije detektiran ovom analizom. Najzastupljeniji flavonoid, u kožici grožđa, određen metodom je procijanidin B2. Istraživanjem je utvrđeno da tretman ekstrakcije od 20 min daje ekstrakte bogate flavonoidima te ekstrakte antioksidativnog potencijala. Primjenom temperature od 60°C dobiveni su najbolji rezultati u pogledu ukupnih fenola, fenolnih kiselina, flavanola i stilbena. Temperatura od 60°C povezana s primjenom ultrazvuka pokazala je lošije rezultate. Iz navedenog se može zaključiti kako upotreba ultrazvuka može pogodovati ekstrakciji ali je pri tome potrebno odrediti idealne parametre za njezino provođenje (de Irade i sur. 2021).

5. Zaključak

Iz ovog rada može se zaključiti sljedeće:

- Udio ukupnih fenola znatno je veći u uzorcima sjemenki grožđa u odnosu na uzorke kože grožđa sorte Pinot crni.
- Antioksidacijska aktivnost sjemenki grožđa znatno je veća u odnosu na antioksidacijsku aktivnost kože grožđa što ukazuje i na korelaciju između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.
- Statistička analiza (ANOVA) pokazala je kako porastom amplitude raste i udio ukupnih fenola dok porast postotka impulsa nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u uzorcima kože grožđa. Također je pokazala kako porastom impulsa raste i antioksidacijska aktivnost dok porast amplitude nema značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost u uzorcima kože grožđa.
- Statistička analiza (ANOVA) pokazala je kako porastom amplitude raste i udio ukupnih fenola dok porast postotka impulsa nema značajan utjecaj na udio ukupnih fenola u uzorcima sjemenki grožđa. Također je pokazala kako porastom impulsa i amplitude raste antioksidacijska aktivnost u uzorcima sjemenki grožđa.
- Statističkom obradom podataka utvrđeno je kako su optimalni uvjeti pri provođenju ultrazvučne ekstrakcije: 48%-tna vodena otopina etanola kao otapalo, primjena amplitude od 100% te impulsa od 100%.
- HPLC analizom veće koncentracije pojedinačnih spojeva određene su u sjemenkama grožđa.
- Katehin i epikatehin su najzastupljeniji fenolni spojevi i u sjemenkama i koži grožđa.
- Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom predstavlja inovativnu tehniku koja omogućuje izolaciju vrijednih bioaktivnih spojeva iz komine grožđa. Ova tehnika poboljšava učinkovitost ekstrakcije, omogućujući da se komina, bogata antioksidansima, polifenolima, vlaknima i drugim korisnim komponentama, iskoristi u razvoju novih funkcionalnih proizvoda. Time bi se proces proizvodnje hrane mogao optimizirati uz maksimalno iskorištenje otpada što je i cilj prelaska s modela linearne na kružnu ekonomiju.

6. Literatura

- de Andrade, R.B., Machado, B. A. S., Barreto, G.A., Nascimento, R.Q., Correa, L.C., Leal, I.L., Tavares, P.P.L.G., Ferreira, E.S., Umsza-Guez, M.A. (2021): 'Syrah Grape Skin Residues Has Potential as Source of Antioxidant and Anti-Microbial Bioactive Compounds', *Biology (Basel)*, 10(12), 1262.
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/biology10121262>.
- Banožić, M. (2022): 'Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada'. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Baş D., Boyaci I.H. (2007): 'Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology.' *Journal of Food Engineering* 78,836–845.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>.
- Beach, E.S. i Kundu, S. (2017): 'Tools for Green Chemistry', Izdanje 10. John Wiley & Sons.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A.(2008): 'Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.' *Talanta* 76,965–977
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- Bucić-Kojić, A. (2008): 'Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa'. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Bucić-Kojić, A., Sovova, H., Planinić, M., Tomas, S. (2013): 'Temperature dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*,' 136, 1136- 1140.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.087>.
- Carrera, C., Ruiz-Rodriguez, A., Palma, M., Barroso, C.G. (2012): 'Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes', *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>.
- Drmić, H., i Režek Jambrak, A. (2010): 'Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva', *Croatian journal of food science and technology*, 2.(2.), 22–33.
- Fenoli - Hrvatska enciklopedija (2024).
Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/fenoli> (Pristupljeno: 26. kolovoza 2024).
- Ferreira, C., Moreira, M.M., Delelue-Matos, C., Sarraguca, M. (2023): 'Subcritical Water Extraction to Valorize Grape Biomass—A Step Closer to Circular Economy', *Molecules*, 28(22), 7538.
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/molecules28227538>.
- Gallo, M., Ferrara, L. i Naviglio, D. (2018): 'Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective', *Foods*, 7(10), 164.
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/foods7100164>.

- González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rossello, C., Simal, S. (2015): 'Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling', *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>.
- Górnaś, P., Mišina, I., Waskiewicz, A., Perkons, I., Pugajeva, I., Seglina, D. (2025): 'Simultaneous extraction of tocochromanols i flavan-3-ols from the grape seeds: Analytical and industrial aspects', *Food Chemistry*, 462, 140913.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140913>.
- Han, H., Wang, S., Rakita, M., Wang, Y., Han, Q., Xu, Q., (2018): 'Effect of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds on the Characteristics of Walnut Shells', *Food i Nutrition Sciences*, 9(8), 1034–1045.
Dostupno na: <https://doi.org/10.4236/fns.2018.98076>.
- Herrero, P., Saenz-Navajas, P., Cullere, L., Ferreira, W., Chatin, A., Chaperon, W., Litouks-Desrués, F., Escudero, A. (2016): 'Chemosensory characterization of Chardonnay and Pinot Noir base wines of Champagne. Two very different varieties for a common product', *Food Chemistry*, 207, 239–250.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.068>.
- Holban, A.M. i Grumezescu, A.M. (2017): 'Handbook of Food Bioengineering. Foods Therapeutic,' 8, 538. - References - Scientific Research Publishing.
Dostupno na: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3450371> (Pristupljeno: 17 September 2024).
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidovic-Kosanovic, M. (2007): 'Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits.' *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 103, 369– 377.
- Kamenjašević, M., Oršolić, N., Matković, A., Matković, B.R. (2017): 'Učinkovitost polifenolne prehrane na zdravlje i funkcionalnu sposobnost sportaša i rekreativaca', *Hrvatski športskomedicinski vjesnik*, 32(1/2), 5–21.
- Machado, T., de O.X. Portugal, I., Kodel, H.A.C., Fathi, A., Fathi, F., Oliveira, M.B.P.P., Dariva, C., Souto, E.B. (2024): 'Pressurized liquid extraction as an innovative high-yield greener technique for phenolic compounds recovery from grape pomace', *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 40, 101635.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101635>.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj mihaljević, M., Ilijaš, I., Marković, D., (2015): *Zelena knjiga: 'Hrvatske izvorne sorte vinove loze' | MINGOR*.
Dostupno na: <https://www.haop.hr/hr/publikacije/zelena-knjiga-hrvatske-izvorne-sorte-vinove-loze> (Pristupljeno: 15. rujna 2024).
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i ribarstva - Vinogradarstvo i vinarstvo (2024).
Dostupno na: <https://poljoprivreda.gov.hr/vinogradarstvo-i-vinarstvo/193> (Pristupljeno: 14. rujna 2024).

- Newshehri, J.A., Bhat, Z.A., Shah, M.Y. (2015): 'Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts', *Food Research International*, 77, 333–348.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.026>.
- Pleadin, J., Bogdanović, T., Murati, T., Kmetić, I. (2022): 'Kontaminanti u nusproizvodima prehrambene industrije' u Šubarić, D., Jozinović, A., Panjičko, M. 'Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije. Knjiga 4. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 3.
Dostupno na: <https://plus.cobiss.net/cobiss/bh/bs/bib/55534854#full> (Pristupljeno: 21. rujna 2024).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2005): 'Handbook of Enology': The Microbiology of Wine and Vinifications. 1st edn. Wiley.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/0470010363>.
- Salehi, B., Salehi, B., Mishra, A.B., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P.V.T., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2018): 'Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits', *Biomedicines*, 6(3),91.
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>.
- Shiri-Shahsavari, M.R., Aliani, S., Parsamanesh, N., Nazari, S., Moazzen, S., Sadeghi, N., Majnoui, A., (2023): 'The effect of grape-seed oil on diabetes-related hyperglycemia, dyslipidemia, inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats', *Obesity Medicine*, 37, 100476.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2022.100476>.
- Sigal, I.M. i Zhang, J. (2022): 'On propagation of information in quantum many-body systems.'
Dostupno na: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2212.14472>.
- Sun, L., Wang, H., Du, J., Wang, T., Yu, D. (2024): 'Ultrasonic-assisted extraction of grape seed procyanidins, preparation of liposomes, and evaluation of their antioxidant capacity', *Ultrasonics Sonochemistry*, 105, 106856.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106856>.
- Tiwari, B.K. (2015): 'Ultrasound: A clean, green extraction technology', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109.
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>.
- Vinopedia (2022): 'Pinot crni', *Vinopedia*.
Dostupno na: <https://vinopedia.hr/pinot-crni-2/> (Pristupljeno: 19 Rujna 2024).
- Žunić, D., Matijašević, S. (2008): 'Rezidba vinove loze.' (Poljoprivredna biblioteka Agrohit). Bjelovar: Neron.