

Određivanje polifenola, indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona u vinima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Maslov, Luna

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:282243>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Luna Maslov

**DETERMINATION OF POLYPHENOLS, INDOLE-3-
ACETIC ACID AND 2-AMINOACETOPHENONE IN
WINES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Luna Maslov

**ODREĐIVANJE POLIFENOLA, INDOL-3-OCTENE
KISELINE I 2-AMINOACETOFENONA U VINIMA
TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE
DJELOTVORNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof.dr.sc. Marica Medić Šarić

Zagreb, 2014



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Luna Maslov

**DETERMINATION OF POLYPHENOLS, INDOLE-3-
ACETIC ACID AND 2-AMINOACETOPHENONE IN
WINES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof.dr.sc. Marica Medić Šarić

Zagreb, 2014

Posebno zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Marici Medić Šarić na korisnim savjetima, razumijevanju te pomoći pruženoj prilikom izrade doktorskog rada. Također, zahvaljujem se na ukazanom povjerenju prilikom prihvatanja obveze mentorstva.

Najsrdanije se zahvaljujem prof.dr.sc. Vlasti Drevenčar na susretljivosti te vrlo konstruktivnim savjetima i primjedbama.

Hvala prof.dr.sc. Ani Jeromec na stručnim savjetima i suradnji tijekom eksperimentalnog rada.

Veliko hvala prof.dr.sc. Bernardu Kozini na eksperimentalnim vinima kao i na divnoj suradnji.

Hvala Ivani Tomaz na prijateljskoj podršci prilikom izrade i pisanja rada.

Hvala svim kolegama Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo na nesebičnoj podršci, pomoći i prijateljstvu.

Hvala suprugu Matiji na podršci i pomoći kod statističke obrade podataka.

Veliko hvala Teti na bezgraničnom razumijevanju i bezrezervnoj podršci.

SADRŽAJ

SAŽETAK	viii
ABSTRACT	ix
1. Uvod	1
1.1. Svrha rada	6
2. Literaturni pregled	9
2.1. Polifenoli u vinu	11
2.1.1. Flavonoidi	12
2.1.1.1. Antocijani	14
2.1.1.2. Flavan-3-oli	17
2.1.1.3. Flavonoli	20
2.1.2. Fenolne kiseline i stilbeni	21
2.1.2.1. Hidroksicimetne kiseline	21
2.1.2.2. Hidroksibenzojeve kiseline	22
2.1.2.3. Stilbeni	22
2.2. Sadržaj polifenola u vinu	24
2.3. Analiza ukupnih polifenola u vinu	36
2.4. Priprava uzoraka vina za kromatografsku analizu	38
2.4.1. Direktno injektiranje uzorka u kromatografski sustav	39
2.4.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće	39
2.4.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	39
2.5. Kvantitativna i kvalitativna analiza polifenola u vinu	44
2.5.1. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	44
2.5.1. Ostale metode analiza	47
2.6. Netipična aroma starenja	49
2.6.1. Određivanje indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona	52
2.7. Biološki učinci vina	55
2.7.1. Vino i zdravlje	55
2.7.2. Antioksidansi	56

2.7.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti polifenola	57
3. Materijali i metode	61
3.1. Kemikalije, instrumenti i pribor	63
3.2. Uzorci vina	65
3.2.1. Solarizacija vinove loze	65
3.2.2. Utjecaj kvasaca na pojavu netipične arome starenja u uzorcima vina Rizling rajnski	67
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, flavan-3-ola i antocijana u vinu te antioksidacijske aktivnosti vina	68
3.3.1. Priprava standardnih otopina za spektrofotometrijska mjerenja	68
3.3.2. Određivanje ukupnih fenola	69
3.3.3. Određivanje ukupnih flavan-3-ola	69
3.3.4. Određivanje ukupnih antocijana	70
3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS-metodom	70
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH-metodom	71
3.4. Tekućinskokromatografska analiza polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u vinu	71
3.4.1. Analiza polifenolnih spojeva u vinu bez prethodne obrade uzorka	73
3.4.2. Postupak ekstrakcije polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz vina na čvrstoj fazi	73
3.4.3. Priprava standardnih otopina za validaciju metode određivanja polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u vinu tekućinskom kromatografijom	75
3.4.3.1. Priprava otopine za određivanje analitičkog povrata polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz vina	76
3.5. Plinskokromatografska analiza 2-aminoacetofenona u vinu	78
3.5.1. Postupak mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u vino	79
3.5.2. Postupak mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona na čvrstoj fazi pomognute ultrazvukom iz para iznad otopine	80

3.5.3. Priprava standardnih otopina za validaciju metode određivanja 2- aminoacetofenona u vinu plinskom kromatografijom	80
3.6. Statistička obrada rezultata	80
4. Rezultati i rasprava	81
4.1. Određivanje polifenola i indol-3-octene kiseline u vinima	82
4.1.1. Validacija metode	82
4.2. Učinkovitost odvajanja polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrakcijom iz vina na čvrstoj fazi	91
4.3. Analitički postupak određivanja polifenola i indol-3-octene kiseline u vinima	97
4.4. Polifenolne sastavnice i indol-3-octene kiselina u uzorcima vina	100
4.4.1. Računalno simuliranje klasifikacije različitih kultivara vina	122
4.4.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka vina	125
4.5. Analitički postupak određivanja 2-aminoacetofenona	128
4.5.1. Optimiranje uvjeta mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona iz vina na čvrstoj fazi	129
4.6. 2-Aminoacetofenon, polifenolni spojevi i indol-3-octena kiselina u vinima Rizling rajnskog	136
5. Zaključci	139
6. Literaturna vrela	145
7. Dodatak	x
8. Životopis	xxvii



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ODREĐIVANJE POLIFENOLA, INDOL-3-OCTENE KISELINE I 2-AMINOACETOFENONA U VINIMA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Luna Maslov
Agronomski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb

Razvijena je i validirana metoda istodobnog određivanja 31 polifenola i indol-3-octene kiseline u vinu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom dioda i fluorescencijskog detektora. Optimirani su uvjeti ekstrakcije pojedinačnih polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline na kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu. U bijelim i crnim vinima iz Hrvatske utvrđeni su sastav i masene koncentracije polifenola i indol-3-octene kiseline. Po prvi puta određene su masene koncentracije indol-3-octene kiseline u crnim vinima iz Hrvatske, koje su bile od 0,076 mg L⁻¹ do 1,031 mg L⁻¹. Za autohtone hrvatske kultivare Teran i Plavac mali uočen je kemotaksonomijski uzorak za antocijane i njihove acilne oblike. Uspoređene su i optimirane dvije tehnike ekstrakcije 2-aminoacetofenona iz vina, spoja odgovornog za netipičnu aromu bijelih vina: mikroekstrakcija na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem vlakna u uzorak vina i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognuta ultrazvukom. Kvalitativna i kvantitativna analiza 2-aminoacetofenona provedena je plinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor.

(XXXI +168 stranica, 33 slika, 45 tablica, 172 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: 2-aminoacetofenon / indol-3-octena kiselina / ekstrakcija na čvrstoj fazi / mikroekstrakcija na čvrstoj fazi / netipična aroma starenja / polifenoli / vino

Mentor: Prof. dr. sc. Marica Medić Šarić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ocjenitelji: Dr. sc. Vlasta Drevenkar, znan.savj. IMI i nasl.prof. PMF
Prof. dr. sc. Marica Medić Šarić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Izv. prof. dr. sc. Ana Jeromel, Agronomski fakultet

Rad prihvaćen: 02. travnja 2014.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF POLYPHENOLS, INDOLE-3-ACETIC ACID AND 2-AMINOACETOPHENONE IN WINES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Luna Maslov
Faculty of Agriculture, Svetošimunska 25, Zagreb

Method for determination of 31 polyphenols and indole-3-acetic acid in wines was developed using high performance liquid chromatography with diode array detector and fluorescence detector. Solid phase extraction of polyphenolic compounds and indole-3-acetic acid using *N*-vinylpyrrolidone-divinylbenzene copolymer as sorbent was optimized. Polyphenolic composition and indole-3-acetic acid were determined in white and red wines from Croatia. Indole-3-acetic acid was determined for the first time in red wines from Croatia, in mass concentrations ranging from 0.076 mg L⁻¹ to 1.031 mg L⁻¹. Anthocyanins pattern as chemotaxonomic marker was observed for autochthonic cultivars Teran and Plavac mali from Croatia. Ultrasound-assisted headspace solid-phase microextraction and direct immersion solid-phase microextraction were compared and optimized for determination of 2-aminoacetophenone. Identification and quantification of 2-aminoacetophenone was performed by gas chromatography-mass spectrometry.

(XXXI +168 pages, 33 figures, 45 tables, 172 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: 2-aminoacetophenone / indole-3-acetic acid / polyphenols/ solid-phase extraction/ solid-phase microextraction/ untypical aging off-flavour/ wine/

Supervisor: Professor Marica Medić Šarić, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: Dr. Vlasta Drevenkar, Senior scientist, IMI and Professor, Faculty of Science
Professor Marica Medić Šarić, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Assoc. Professor Ana Jeromel, Faculty of Agriculture

Thesis accepted: 2nd April 2014

UVOD

1. UVOD

Vino je proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta od grožđa.¹ Najstariji, do sada poznati, dokazi o spravljanju vina sežu 5000 do 5400 godina prije Krista, a nađeni su na području današnjeg sjevernog Irana.²

U proizvodnji bijelih vina, prvi korak nakon runjenja i muljanja je postupak prešanja. Taj postupak razdvaja čvrste dijelove (kožicu, sjemenke i eventualno peteljke) iz soka i sok se tada fermentira odvojeno.

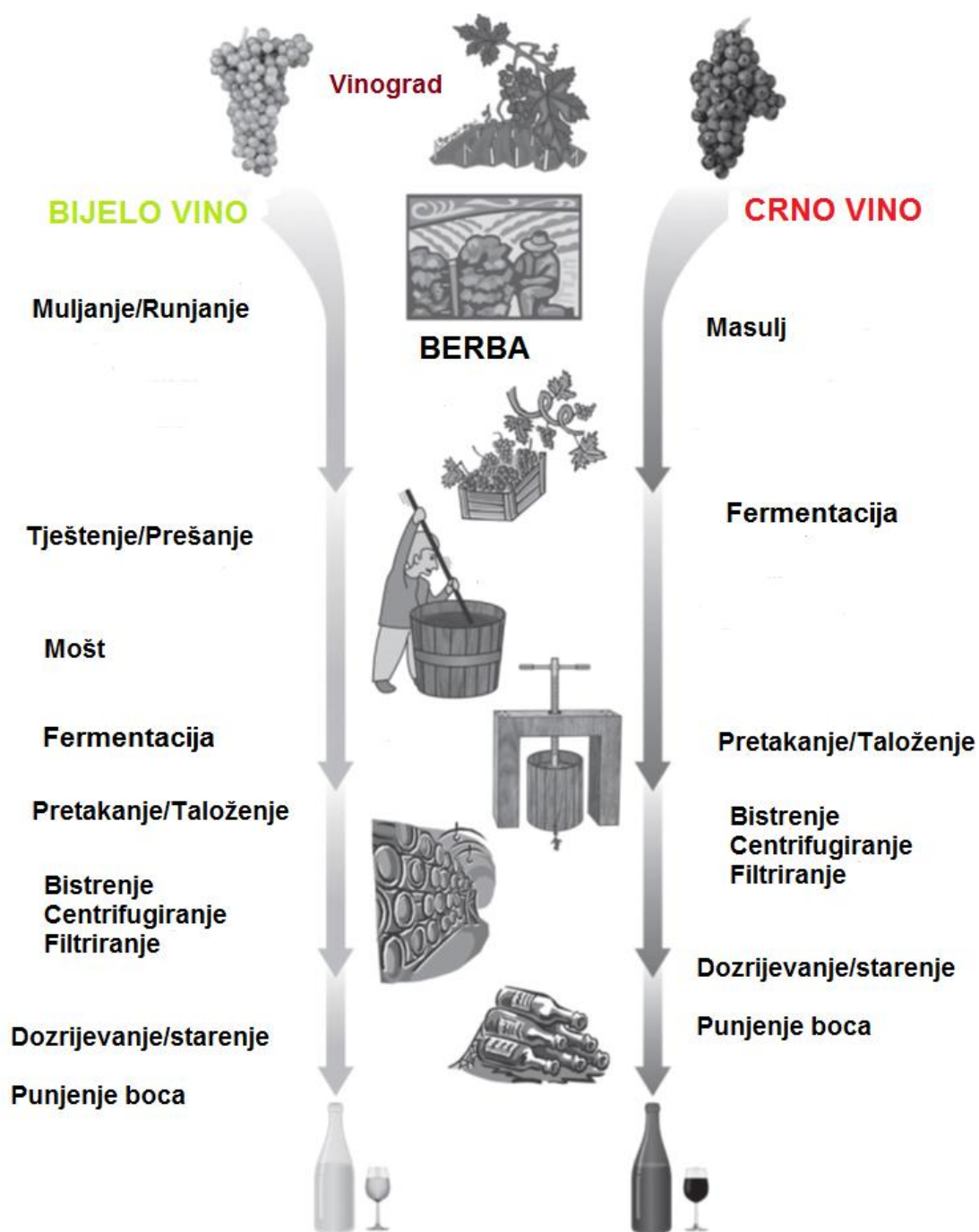
U proizvodnji crnih vina, fermentacija se provodi na masulju dobivenom poslije runjenja i muljanja i prešanje se izvodi nakon maceracije. Maceracija omogućava ekstrakciju komponenti, prisutnih u kožici i sjemenki, u fermentirajući mošt. Na slici 1.1 prikazana je proizvodnja vina.

Na kvalitetu vina utječu brojni kemijski spojevi poput polifenola. Polifenolni spojevi potječu iz različitih dijelova biljke vinove loze (*Vitis vinifera* L.) i ekstrahiraju se tijekom vinifikacije. Polifenoli se dijele na flavonoide (antocijani, flavan-3-oli i flavonoli), fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline) i stilbene. Antocijani su skupina polifenola izravno povezana s bojom u grožđu i mladim vinima. Određivanje sastava pojedinačnih antocijana u vinu može poslužiti za provjeru autentičnosti i starosti proizvoda.³ Flavan-3-oli (monomerni katehini i proantocijanidini) druga su najveća skupina polifenola, uglavnom odgovorna za astringenciju, gorčinu i strukturu vina. Posljednja skupina flavonoida su flavonoli koji utječu na gorčinu, boju crnog vina i antioksidacijsku aktivnost. Fenolne kiseline unatoč niskim koncentracijama utječu na senzorna svojstva vina. Sastav polifenola značajno se mijenja tijekom starenja vina. Na njihov sastav u vinu značajno utječu ampelotehnički zahvati u vinogradu, sorta vinove loze, klima te način vinifikacije.⁴

Pojedini fenoli, poput stilbena, odgovorni su za pozitivne učinke konzumacije vina na zdravlje ljudi. Zahvaljujući njihovim jakim antioksidacijskim svojstvima, vezanju radikala, keliranju metalnih iona, mogućnosti stabiliziranja te delokaliziranja nesparenih elektrona, oni štite staničnu građu od oksidacijskih oštećenja i ograničavaju rizik razvoja degenerativnih oboljenja povezanih s oksidativnim stresom.⁵ Flavonoidi i većina fenolnih kiselina u vinu izvrsni su kromofori te ih je jednostavno detektirati u UV-Vis području dok flavan-3-oli imaju fluorescirajuća svojstva. Polifenolne sastavnice u vinu mogu biti odijeljene, identificirane i

kvantificirane u jednom koraku pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz UV-Vis ili fluorescencijske detektore.

Vino sadrži brojne različite kemijske sastavnice koje utječu na njegova senzorna svojstva. Od 1989. godine pojavio se određen broj bijelih vina s neugodnom, atipičnom aromom okarakteriziranom kao miris naftalena, mokre vune ili akacije u cvatu.⁶ Taj neugodan miris nazvan je netipičnom aromom starenja vina (engl. *UnTypical Aging off-flavor*, UTA). Tijekom kontrole puštanja u promet, 20 % bijelih vina bilo je odbijeno zbog UTA-e što je dovelo do ogromnih ekonomskih gubitaka. UTA se razvija par mjeseci poslije fermentacije i sulfitiranja u mladim vinima. Godine 1993. 2-aminoacetofenon (engl. *2-AminoAcetoPhenone*, 2-AAP) je identificiran kao uzročnik UTA-e u vinu već pri mirisnom pragu detekcije od 0,5 µg L⁻¹. Istraživanja mehanizma nastajanja 2-AAP tijekom vinifikacije pokazala su da oksidacijskom razgradnjom indol-3-octene kiseline (engl. *Indole-3-Acetic Acid*, IAA), fitohormona koji se prirodno pojavljuje u grožđu, uz prisutnost superoksidnih radikala nastalih sulfitiranjem, nastaje 2-AAP.^{6,7} UTA nije detektirana u crnim vinima zbog polifenolnih sastavnica koje sprječavaju oksidacijsku razgradnju IAA u 2-AAP. Određivanje 2-AAP analitički je zahtjevan postupak s obzirom na vrlo niske koncentracije u vinu te kompleksnost vina kao matrice.



Slika 1.1. Proizvodnja vina, od grožđa do gotovog proizvoda

1.1. Svrha rada

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj i validacija metode istodobnog određivanja 32 spoja, uključujući pojedinačne polifenole i indol-3-octenu kiselinu (tablica 1.1), u vinu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz UV-Vis i fluorescencijski detektor. Radi lakše identifikacije i točnije kvantifikacije spojeva cilj je bio usporediti rezultate direktnog injektiranja uzoraka vina u kromatografski sustav s rezultatima analize spojeva ekstrahiranih iz vina na čvrstoj fazi uz primjenu različitih komercijalno dostupnih sorbensa poput oktaedecilsilicijevog dioksida, ionskih izmjenjivača i *N*-vinilpirolidon divinilbenzenskih kopolimera. Analizom vina dobivenih od različitih sorata vinove loze željelo se proširiti saznanja o utjecaju ampelotehničkih zahvata, poput solarizacije, na sastav polifenola i koncentraciju indol-3-octene kiseline. Zadatak ovog rada bio je razvoj i optimizacija određivanja 2-aminoacetofenona u vinima vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) uz prethodnu mikroekstrakciju analita na čvrstoj fazi. Po prvi su put utvrđene razine 2-aminoacetofenona u vinima iz Hrvatske. Temeljem dobivenih rezultata željela se utvrditi povezanost sadržaja polifenola u vinu s količinom indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona.

Tablica 1.1. Analizirani spojevi u ovom radu

Spoj	IUPAC ime
2-Aminoacetofenon	2-amino-1-feniletanon
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]- β -D-glukopiranozid
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	[2-(3,4,5-trihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]- β -D-glukopiranozid
Epigalokatehin	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)kroman
Epikatehin	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman
Epikatehin galat	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7-dihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman-3-il-3,4,5-trihidroksibenzoat
Ferulinska kiselina	(<i>E</i>)-3-(4-hidroksi-3-metoksifeni)propen-kiselina
Galna kiselina	3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina
Indol-3-octena kiselina	indol-3-iloctena kiselina
Izoramnatin	3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on
Kafeinska kiselina	(<i>E</i>)-3-(3,4-dihidroksifenil)propen-kiselina
Kaftarna kiselina	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-[(<i>E</i>)-3-(3,4-dihidroksifenilpropenoiloksi)]-3-hidroksibutan-dikiselina
Katehin	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman
Kemferol	3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on
Kvercetin	5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on-3-il]- β -D-galaktopiranozid

Tablica 1.1. – nastavak

Spoj	IUPAC ime
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on-3-il]- β -D-glukopiranozid
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	[5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on-3-il]- β -rutinopiranozid
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	[2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-6- <i>O</i> -acetil- β -D-glukopiranozid
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	[2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-6- <i>O</i> -[(<i>E</i>)-3-(4-hidroksifenil)propenol]- β -D-glukopiranozid
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	[2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]- β -D-glukopiranozid
Miricetin	3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-4 <i>H</i> -kromen-4-on
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-6- <i>O</i> -acetil- β -D-glukopiranozid
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]-6- <i>O</i> -[(<i>E</i>)-3-(4-hidroksifenil)propenol]- β -D-glukopiranozid
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	[2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]- β -D-glukopiranozid
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	[2-(3,4-dihidroksi-5-metoksifenil)-5,7-dihidroksikromenilij-3-il]- β -D-glukopiranozid
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	(<i>E</i>)-3-(4-hidroksifenil)propen-kiselina
Procijanidin B1	<i>cis,trans</i> "-4,8"-bi-(3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman)
Procijanidin B2	<i>cis,cis</i> "-4,8"-bi-(3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)kroman)
Siringinska kiselina	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	(<i>E</i>)-3-fenilpropen-kiselina
<i>trans</i> -Resveratrol	5-[(<i>E</i>)-2-(4-hidroksifenil)etenil]rezorcinol
Vanilinska kiselina	4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina

LITERATURNI PREGLED

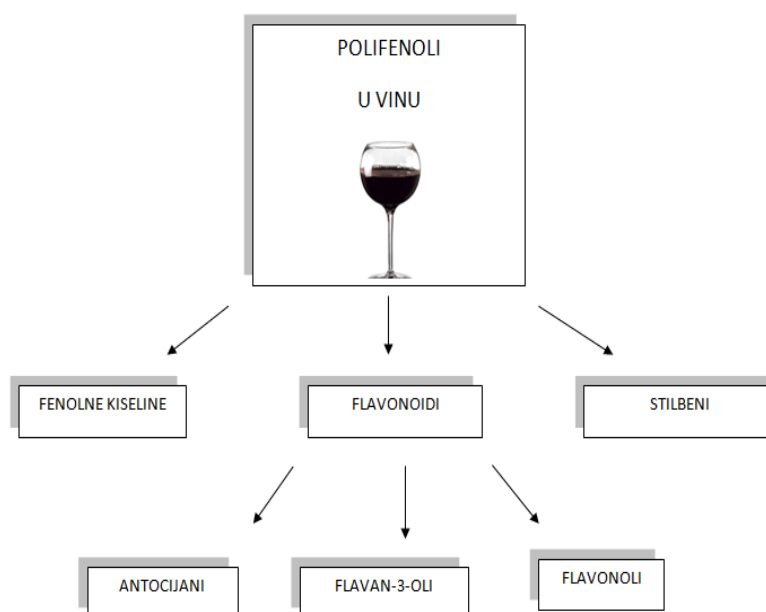
2. Literaturni pregled

2.1. Polifenoli u vinu

Polifenoli se nalaze u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima, djeluju kao zaštita od UV-zračenja, privlače oprašivače i pridonose pigmentaciji biljaka.⁸

Izraz fenoli ili polifenoli opisuje spojeve koje imaju benzenski prsten supstituiran s jednom ili više hidroksilnih skupina (-OH). Njihovoj reaktivnosti pridonosi kiseli karakter fenolne skupine i nukleofilni karakter benzenskog prstena. Polifenole dijelimo na flavonoide, fenolne kiseline i stilbene. Svaka se skupina dalje dijeli u nekoliko skupina prema strukturi i svojstvima (slika 2.1).

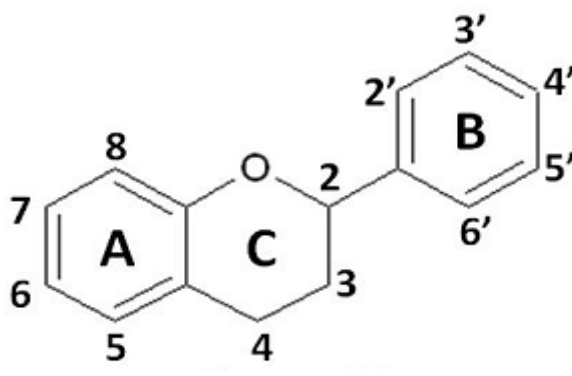
Grožđe sadrži brojne polifenole koji ne pripadaju flavonoidima i to uglavnom u mesu, dok su flavonoidi sadržani u kožici, sjemenkama i stabiljci. Fenolni sastav vina uvjetovan je sortom vinove loze i drugim faktorima koji utječu na razvoj grožđa (bobica) poput tla, geografske lokacije i vremenskih uvjeta.⁹ Također, tehnika vinifikacije ima važnu ulogu u ekstrakciji polifenola iz grožđa te u daljnjoj stabilnosti vina. Na fenolni sastav vina utječe duljina maceracije i fermentacije u kontaktu s kožicom i sjemenkama, prešanje, dozrijevanje, bistrenje i starenje u boci.



Slika 2.1. Glavne skupine polifenola u vinu

2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su kemijski spojevi s benzenskim prstenom koji imaju jednaku građu C6-C3-C6. Sastoje se od dva benzenska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C-prsten) (slika 2.2). Među njima se razlikuje nekoliko klasa spojeva koji se baziraju na oksidacijskom stanju C-prstena.^{8,9}



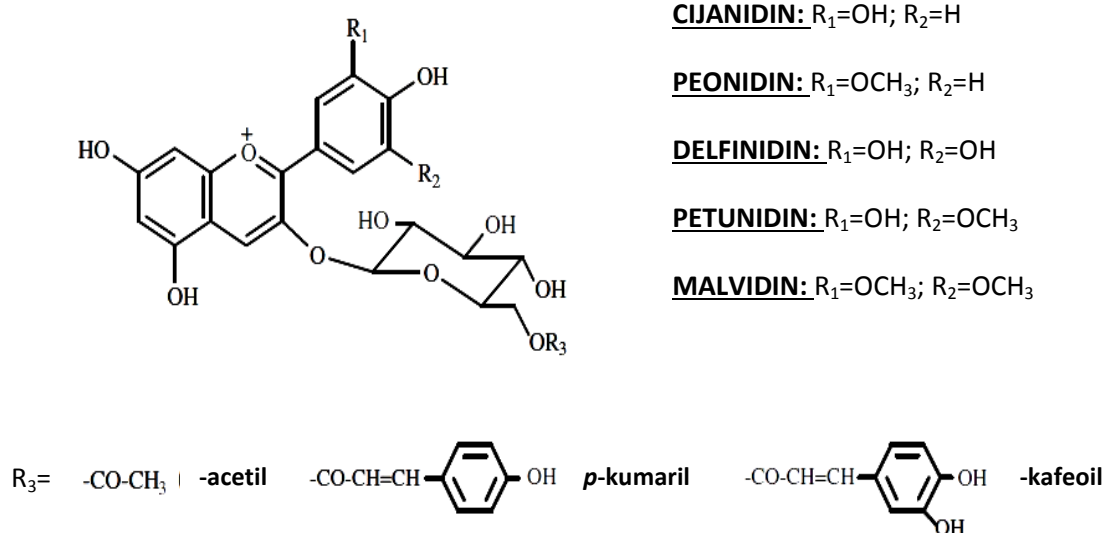
Slika 2.2. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi su temeljeni na 2-fenilbenzenopironskoj strukturi karakteriziranoj dvostrukom vezom između ugljika C2 i C3 i ketonske skupine C4. U grožđu su predstavnici flavonoli. Flavonoidi u širem smislu predstavljaju skupinu spojeva koji se međusobno razlikuju prema modifikaciji njihove osnovne građe C6-C3-C6 što uključuje:

- hidroksilaciju
- metilaciju
- glikozilaciju
- aciliranje alkoholne hidroksilne skupine
- polimerizaciju

Flavonoidi grožđa su hidroksilirani na ugljicima C5 i C7 prstena A i na položaju C4' prstena B. Također mogu biti hidroksilirani na položaju 3 ili 3'.

2.1.1.1. Antocijani



Slika 2.3. Antocijani iz vrste *Vitis vinifera* L.

Antocijani (slika 2.3.) sadržani su u kožici grožđa. Antocijani identificirani u kožici grožđa i vinu iz vrste *Vitis vinifera* L. su 3-O-monoglukozidi i 3-O-acilirani monoglukozidi pet antocijanidina: delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin, koji se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih i metoksi skupina smještenih na prstenu B molekule.¹⁰ Acilirani derivati nastaju esterifikacijom s octenom, *p*-kumarinskom i kafeinskom kiselinom na položaju C-6 molekule glukoze. Raspodjela i koncentracija antocijana u grožđu ovisi o kultivaru, zrelosti i klimatskim uvjetima. Glavni antocijanidin u grožđu je malvidin. Količina aciliranih antocijana uvelike je uvjetovana sortom, pa tako naprimjer u kultivaru Pinot crni ne postoje acilirani antocijani.¹¹

Profil antocijana može se koristiti kao kemotaksonomijski kriterij za utvrđivanje razlika između sorti. Odnos između pojedinačnih ili ukupnih koncentracija različitih antocijana predložen je za karakterizaciju kultivara. Taj je odnos povezan s enzimskom aktivnošću flavonoid-3-hidroksilaze i *o*-dihidrobifenol-*o*-metiltransferaze. Druga vrsta klasifikacije temeljena je na prisutnosti i relativnoj zastupljenosti antocijana aciliranih s

octenom i *p*-kumarinskom kiselinom.¹² Sastav antocijana ne ovisi samo o sortnom profilu već i o maceraciji i vinifikaciji. Maceracija koja omogućava difuziju antocijana i ostalih fenolnih sastavnica iz čvrstog dijela grožđa u mošt može se pojaviti i prije fermentacije.³ Koncentracija antocijana smanjuje se nakon postizanja maksimalne razine u početnoj fazi fermentacije, kao posljedica adsorpcije na stanične stijenke kvasaca, precipitacije u obliku koloida s tartaratima i eliminacijom tijekom filtracije i bistrenja. Reakcije hidrolize kao i reakcije kondenzacije s drugim fenolima tijekom vinifikacije također modificiraju sastav antocijana u vinu.^{13,14}

Unatoč progresivnom snižavanju koncentracije antocijana tijekom starenja, boja crnog vina je zadržana. Novi i puno stabilniji pigmenti nastaju reakcijom antocijana s drugim sastavnicama u vinu.¹⁵ Antocijani su uobičajeno u obliku crvenog flavilijevog kationa, a boja vina se mijenja od narančaste prema ljubičastoj kako broj supstituenata na prstenu B raste. Otapanjem flavilijevog kationa u vodi dolazi do prijenosa hidronijevog iona i reakcije hidratacije te nastaju plave kinonoidne baze i bezbojni hemiketali (karbinoli). Nastajanje tih spojeva određeno je pH vrijednošću. Flavilijev oblik prisutan je u jako kiselim otopinama (pH manji od 2). Pri pH vina (pH=3,0 do 3,5), antocijani grožđa pojavljuju se uglavnom kao bezbojni, u hidriranom hemiketalnom obliku. Crvena boja je postojana kroz dva stabilizacijska procesa: pretvorba antocijana u druge pigmente i mehanizmima asocijacije nazvanih skupnim nazivom kopigmentacija.^{13,16} Obojeni antocijani (crveni flavilijev kation ili plava kinonoidna baza) planarne su strukture koje mogu reagirati s drugim planarnim molekulama (kopigmentima) kako bi nastala molekulaska stupica (stog) iz koje je isključena voda. Flavilijev kation je tada u stupici, zaštićen od hidratacije te je ravnoteža pomaknuta od bezbojnog hidratiziranog oblika prema crvenom flavilijevom kationu, a potom prema plavoj kinonoidnoj bazi. To je vrlo važno pri pH vina gdje prevladavaju hidratizirani oblici.¹⁷

Mehanizmi nastajanja pigmentiranih polimera su sljedeći:

- Direktne kondenzacijske reakcije: antocijan-tanin, tanin-antocijan, antocijan-vinilfenol^{15,18}
- Cikloadicijske reakcije koje uzrokuju transformaciju antocijana praveći novi piranski prsten u strukturi vezanjem različitih sastavnica prisutnih u vinu na ugljik na položaju C4 i hidroksilnu grupu na položaju C5. Te sastavnice su piruvična kiselina, glioksilna kiselina, acetaldehid, 4-etilfenol, 4-etilgvajakol, dimerni i monomerni procijanidini i aceton. Nastali spojevi nazivaju se piroantocijani.^{14,15,16,18}

Derivirani pigmenti antocijana pokazuju širok spektar boja od narančaste do plave. Cikloadicijske reakcije uzrokuju hipsokromni pomak maksimuma u vidljivom dijelu spektra antocijana, pri čemu se boja vina mijenja prema narančastim nijansama. Adukti tanin-antocijanin su crveni kao i njihov prekursor (apsorpcijski maksimumi pri valnim duljinama $\lambda=515$ nm i $\lambda=526$ nm). Piroantocijani su narančasti (apsorpcijski maksimumi pri valnim duljinama $\lambda=480$ nm i $\lambda=510$ nm) dok su pigmenti premošćeni etilnom skupinom ljubičaste boje (apsorpcijski maksimumi pri valnim duljinama $\lambda=528$ nm i $\lambda=540$ nm). Nedavne studije su pokazale da piroantocijani mogu reagirati s drugim sastavnicama u vinu, poput vinil-flavanola nastalog cijepanjem etilnih veza flavanolnih oligomera i antocijan-etil-flavanol oligomera. Nastala komponenta zove se portisin s apsorpcijskim maksimum na oko $\lambda=575$ nm te se boja vina mijenja u plavu.¹³ Te reakcije uzrokuju batokromni pomak u vidljivom apsorpcijskom spektru antocijana, praveći nove pigmente plavo crvene nijanse u vinu. Svi navedeni pigmentirani polimeri su puno otporniji na nukleofilni napad sumporovog dioksida, nego li njihov prekursor malvidin-3-O-glukozid.^{14,19}

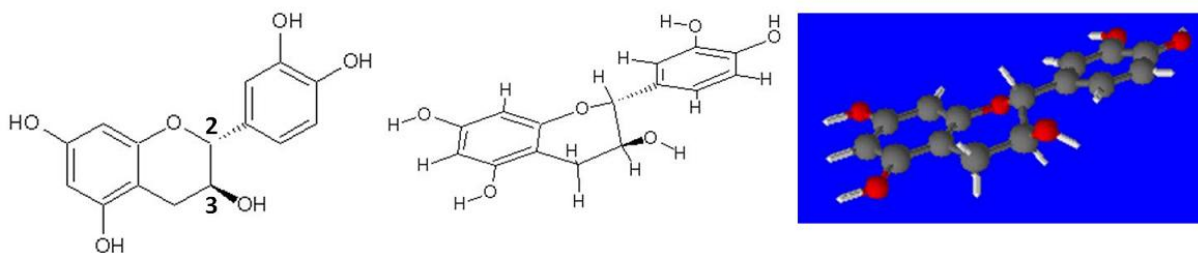
2.1.1.2. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli predstavnici su flavanola u grožđu (slika 2.4). Nalaze se u različitim tkivima biljke vinove loze, lišću, drvetu, peteljka i plodu. Najzastupljeniji su u sjemenkama i kožici. U vinu potječu iz sjemenke i kožice te su odgovorni za gorčinu i mogu utjecati na astringenciju. Na sastav flavan-3-ola u vinu utječe vrijeme ekstrakcije, tj. vrijeme maceracije, temperatura i koncentracija alkohola u vinu.^{8,10}

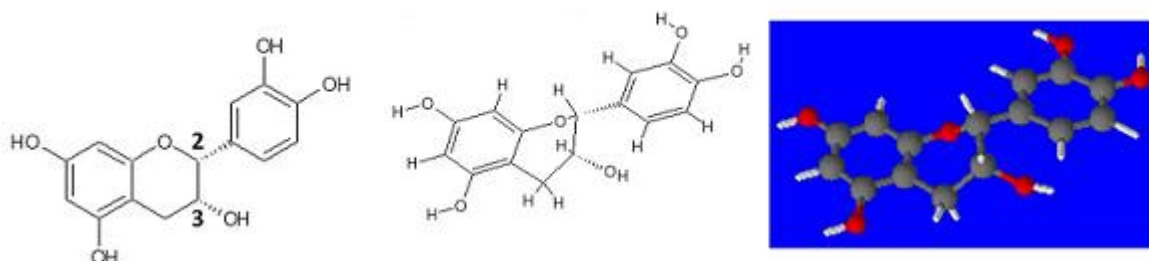
Flavan-3-oli mogu biti monomeri, oligomeri i polimeri. Glavni monomeri flavan-3-ola su (+)-katehin i njegov izomer (-)-epikatehin te ester galne kiseline i (-)-epikatehina, epikatehin-3-O-galat.⁹

Oligomeri i polimeri flavan-3-ola nazivaju se kondenzirani tanini ili proantocijanidini. Proantocijanidini se razlikuju po dužini lanca i prirodi interflavanske veze. Oligomeri su najveća molekula u smjesi koja se može individualno identificirati, a to su proantocijanidini sa stupanjem polimerizacije (engl. *mean Degree of Polymerization*, mDP) između 2 i 5 jedinica. Kao polimeri označavaju se molekule s mDP > 5 jedinica koje se ne mogu posebno odrediti i izdvojiti zbog velikog broja mogućih izomera. Postoje dva tipa proantocijanidina prema svojstvima interflavanske veze (slika 2.5): tip B sastoji se od flavanola kao konstituirajuće jedinice povezane vezama C4-C8 i/ili C4-C6 s mogućnošću razgranate strukture i tip A proantocijanidina uz veze C4-C8 i C4-C6 ima još i veze C2-O-C7 i C2-O-C5. Proantocijanidini sudjeluju u kemijskim i enzimskim oksidacijskim reakcijama rezultat kojih je posmeđenje i zamućenje bijelih vina te u reakcijama s proteinima kao i u brojnim kondenzacijskim reakcijama tijekom dozrijevanja i starenja vina.

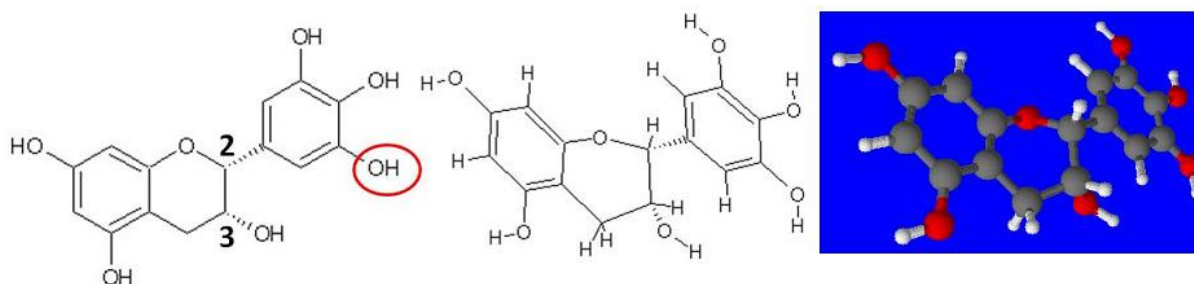
(+) -katehin



(-) -epikatehin



(-) -epigalokatehin



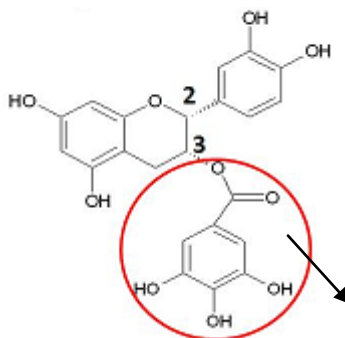
(-) -epikatehin galat

(+) -katehin: $R=H$, $R_1=OH$, $R_2=H$

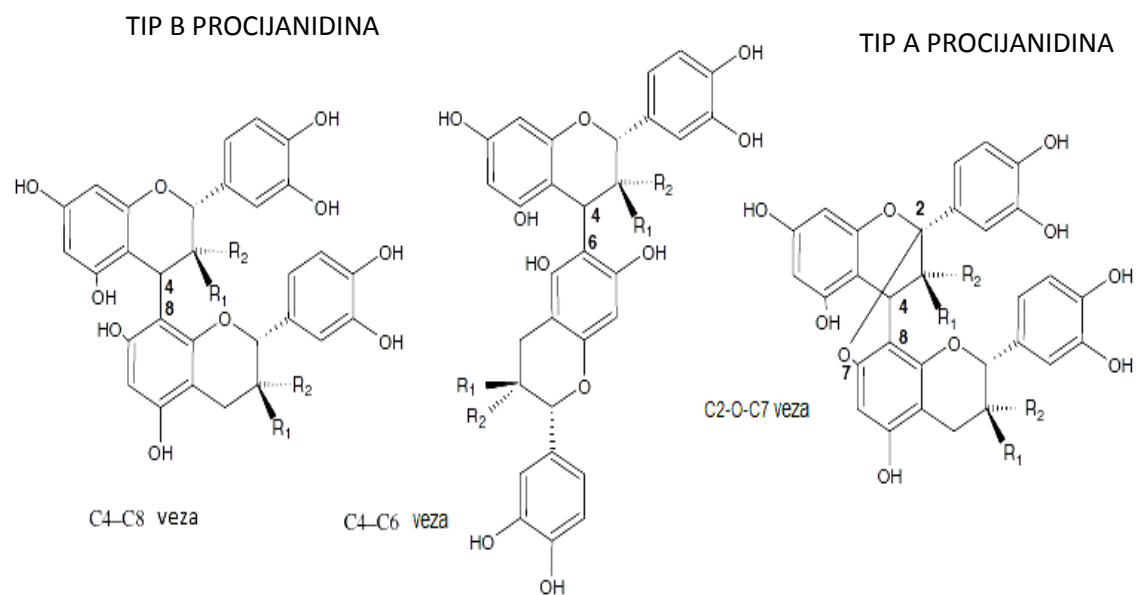
(-) -epikatehin: $R=H$, $R_1=H$, $R_2=OH$

(-) -epikatehin-3-galat: $R=H$, $R_1=H$,
 $R_2=O-G$

(-) -epigalokatehin: $R=OH$, $R_1=H$,
 $R_2=O-G$

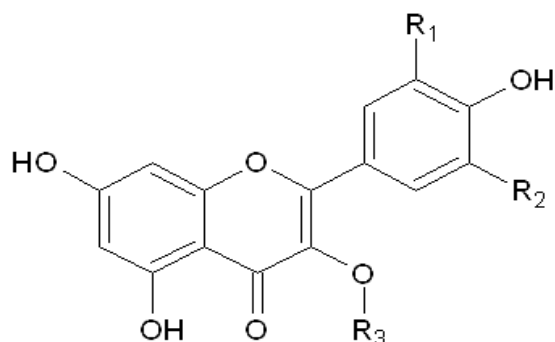


Slika 2.4. Strukturne formule flavan-3-ola



Slika 2.5. Strukture procijanidina

2.1.1.3 Flavonoli



KEMFEROL: $R_1=R_2=H$; $R_3=GLUKOZA, GALAKTOZA, GLUKURONSKA KISELINA$

KVERCETIN: $R_1=OH; R_2=H$; $R_3=GLUKOZA, GALAKTOZA, GLUKURONSKA KISELINA$

MIRICETIN: $R_1=OH; R_2=OH$; $R_3=GLUKOZA, GALAKTOZA, GLUKURONSKA KISELINA$

IZORAMNETIN: $R_1=OCH_3; R_2=OH$; $R_3=GLUKOZA, GALAKTOZA, GLUKURONSKA KISELINA$

Slika 2.6. Strukturne formule flavonola

Flavonoli (slika 2.6) se u grožđu nalaze u kožici i lišću. Imaju zaštitnu ulogu od UV - zračenja.¹⁰ Flavonoli su žuti pigmenti koji se nalaze uglavnom u vakuolama epidermnog tkiva. U grožđu vrste *Vitis vinifera* L. postoje u 3-O-glikozidinom obliku četiri glavna aglikona: miricetin, kvercetin, kemferol i izoramnetin.²⁴ Glukoza je uobičajeni šećer vezan na ugljiku C-3 flavonola. Međutim nađena je i glikozidna veza između glukuronske kiseline i kemferola, kvercetina i miricetina te nemetoksiliranih flavonola. Kvercetin je u grožđu nađen i kao 3-O-ramnozilglukozid, 3-O-glukozilgalaktozid i 3-O-glukozilksilozid. Identificirani su još i kemferol-3-O-glikozidi koji su uključivali i 3-O-glukozilarabinozide i 3-O-galaktozide. Izoramnetin je metoksilirani produkt kvercetina. Metoksilirani produkt miricetina na položaju C-3' je laricitrin, dok se 3',5'-dimetoksi derivat miricetina naziva siringetin. Laricitrin i siringetin su u crnom grožđu i vinu iz vrste *Vitis vinifere* L. utvrđeni u svega nekoliko istraživanja.^{2,5}

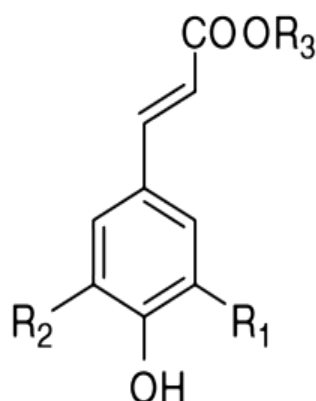
Profil flavonola u vinu razlikuje se od profila u grožđu zbog dodatno prisutnih aglikona, nastalih hidrolizom tijekom vinifikacije, starenja i dozrijevanja vina.

Biosinteza flavonola ovisna je o svjetlosti. Visok sadržaj flavonola zabilježen je u grožđu i njegovu vinu koje je jače bilo izloženo sunčevoj svjetlosti. Visoke razine flavonola povezane su sa kultivarima koji imaju tanju kožicu ili s dobrom ekstrakcijskom tehnikom prilikom vinifikacije.²⁶

Flavonoli izravno utječu na boju bijelih vina, dok su u crnim vinima maskirani antocijanima. Izoramnetin i miricetin te laricitrin i siringetin nalaze se samo u crnim, a kemferol i kvercetin u bijelim i crnim vinima.²⁷

2.1.2. Fenolne kiseline i stilbeni

2.1.2.1. Hidroksicimetne kiseline



KAFEINSKA KISELINA: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$

KAFTARNA KISELINA: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=\text{vinska kiselina}$

***p*-KUMARINSKA KISELINA:** $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$

***p*-KUTARNA KISELINA:** $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=\text{vinska kiselina}$

FERULINSKA KISELINA: $R_1=OCH_3$; $R_2=H$; $R_3=H$

FERTARNA KISELINA: $R_1=OCH_3$; $R_2=H$; $R_3=\text{vinska kiselina}$

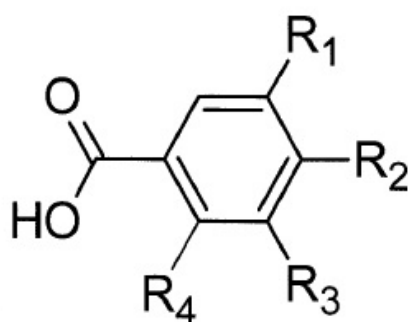
SINAPINSKA KISELINA: $R_1=OCH_3$; $R_2=OCH_3$; $R_3=H$

Slika 2.7. Strukturne formule hidroksicimetnih kiselina u vinu

Hidroksicimetne kiseline (slika 2.7) imaju građu C6-C3 i formalno pripadaju skupini fenilpropanoida. U grožđu se nalaze u vakuolama kožice i mesu u obliku estera vinske kiseline.²⁸ U vinu su hidroksicimetne kiseline sadržane u malim količinama u slobodnom obliku, dok su esteri L-(+)-vinske kiseline dominantni. Uglavnom prevladavaju *trans*-izomeri, dok su *cis*-izomeri zastupljeni u malim količinama. Hidroksicinamati se nalaze u crnim vinima i najzastupljenija su skupina fenola u bijelim vinima. Uz estere vinske kiseline postoje

i etilni esteri kafeinske i *p*-kumarinske kiseline kao i etilni esteri kaftarne kiseline. Hidroksicinamati važni su konstituenti aciliranih antocijana u crnom vinu.^{29,30}

2.1.2.2. Hidroksibenzojeve kiseline



GALNA KISELINA: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=OH$

GENTIZINSKA KISELINA: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=OH$

***p*-HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA:** $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=OH$; $R_4=H$

PROTOKATEHINSKA KISELINA: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=H$

SIRINGINSKA KISELINA: $R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$; $R_4=OCH_3$

VANILINSKA KISELINA: $R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$; $R_4=H$

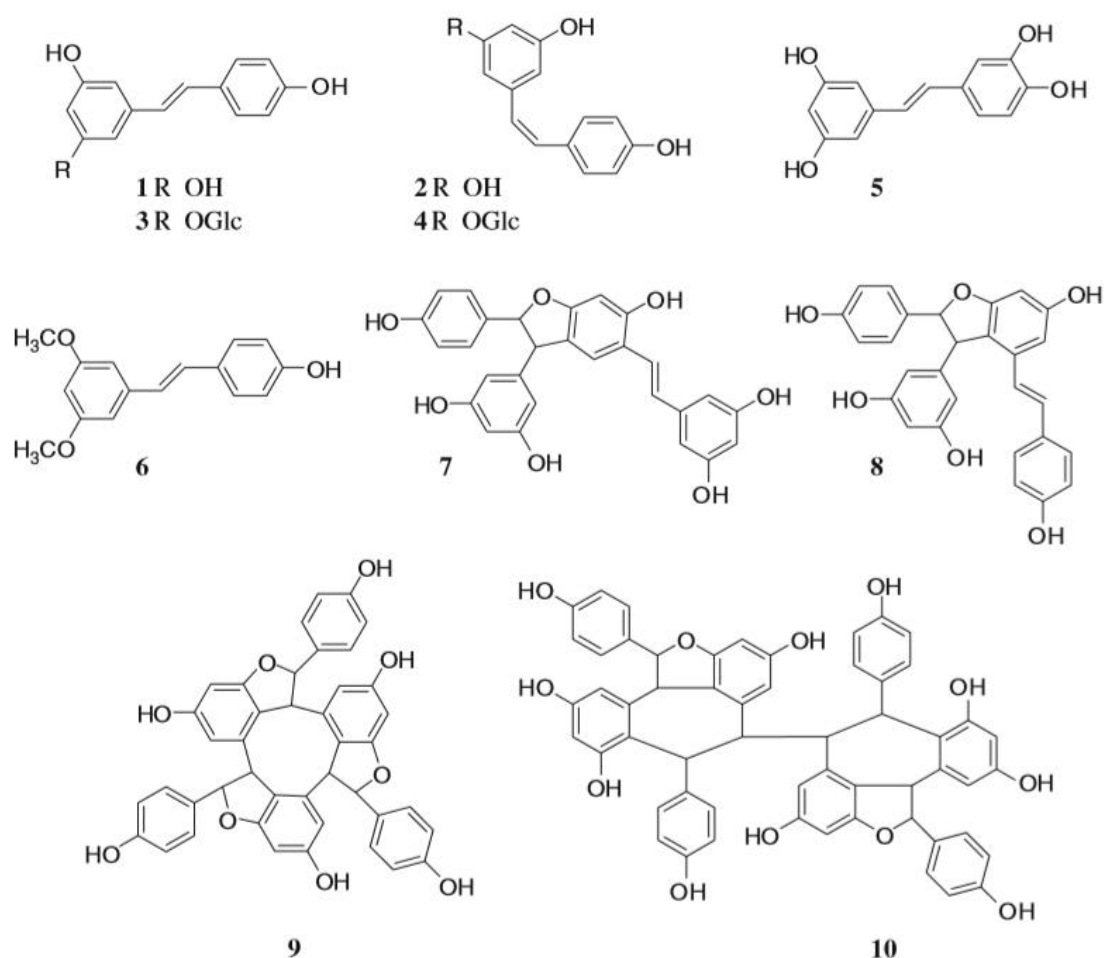
Slika 2.8. Strukturne formule hidroksibenzojevih kiselina

Hidroksibenzojeve kiseline (slika 2.8) imaju karakterističnu građu C6-C1. Osnovna struktura razlikuje se prema položaju hidroksilnih i metoksi skupina na benzenskom prstenu.²⁸ Četiri hidroksibenzojeve kiseline: 4-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i protokatehinska konstituensi su lignina.³⁰ U vinu su nađene različite hidroksibenzojeve kiseline u slobodnoj formi. Galna kiselina jedna je od najzastupljenijih i u najvišim koncentracijama u vinu, a može nastati hidrolizom tanina.

2.1.2.3. Stilbeni

Stilbeni pripadaju skupini fitoaleksina. Fitoaleksini se akumuliraju u lišću i grožđu vinove loze kao odgovor na patogene poput *Plasmopara viticola*, sive plijesni *Botrytis cinerea* te se mogu pojaviti kao odgovor na abiotički stres poput UV-zračenja ili prisutnost teških metala.^{31,32} Stilbeni mogu biti prisutni kao monomeri, oligomeri i polimeri (slika 2.9).

Oligomerni i polimerni oblici se nazivaju viniferini. Identificirani su dimerni resveratrol (ϵ -viniferin), trimerni resveratrol (α -viniferin) i tetramerni oblici resveratrola.^{33,34,35,36,37} Glavni predstavnici stilbena u vinu su *trans*- i *cis*-resveratrol. Oni se nalaze u koži grožđa u glikoziliranom obliku. Kako UV-zračenje pospješuje sintezu *cis*-resveratrola, njegova prisutnost u vinima izravno je povezana s vremenskim prilikama.³⁹



Slika 2.9. Kemijske strukture stilbena: (1) *trans*- resveratrol, (2) *cis*- resveratrol, (3) *trans*-resveratrol glukozid, (4) *cis*- resveratrol glukozid, (5) 3',4',3,5-tetrahidroksi-*trans*-stilben, (6) 3',5'-dimetoksi-4-stilbenol, (7) *trans*- δ -viniferin, (8) *trans*- ϵ -viniferin, (9) α -viniferin, (10) tetramerni resveratrol

2.2. Sadržaj polifenola u vinu

Crno vino može sadržavati od 1000 mg L⁻¹ do 4000 mg L⁻¹ ukupnih fenola, dok bijela vina sadrže od 200 mg L⁻¹ do 400 mg L⁻¹.³⁹ Crna vina sadrže više polifenolnih sastavnica od bijelih vina. Uz vinifikaciju na sadržaj polifenola utječe i sam kultivar grožđa, geografski položaj te ampelotehničke mjere u vinogradu. Općenito, smatra se da vina iz područja hladnijih klima imaju niže šećere i niske masene koncentracije polifenola od vina iz područja toplijih klima.⁴⁰ Ampelotehničke mjere primjenjuju se u vinogradu kako bi se unaprijedila kvaliteta grožđa i vina. Jedne od najznačajnijih ampelotehničkih mjera u vinogradu su prorjeđivanje trsa i micanje listova tzv. defolijacija. Di Porfio i suradnici⁴¹ postavili su pokuse u vinogradu i tijekom vinifikacije s enološkim enzimima. Prorjeđivanje trsova kombinirano s defolijacijom ili bez defolijacije najviše je utjecalo na sadržaj ukupnih antocijana u vinu. Sadržaj nekoliko pojedinačnih antocijana povećao se primjenom defolijacije. Ti rezultati upućuju da povećanje svjetlosti ili povišenje temperature u okolini ploda direktno utječe na sintezu fenolnih sastavnica. Tretmani enološkim enzimima nisu rezultirali nikakvim promjenama u polifenolnom sastavu. Price i suradnici⁴² izlagali su grozdove Pinota crnog izravno sunčevoj svjetlosti te pratili razine kvercetina, *trans*-resveratrola i kaftarne kiseline u kožici i vinu. Sadržaj *trans*-resveratrola, kvercetina i ostalih flavonola značajno se povećao i u kožici i u vinu, a sadržaj kaftarne kiseline se u kožici povećao, ali u vinu smanjio.

U tablicama od 2.1 do 2.6 uspoređene su masene koncentracije polifenolnih spojeva određenih u bijelim i crnim vinima proizvedenim u različitim dijelovima svijeta u proteklih 10 godina.

Tablica 2.1. Masene koncentracije fenolnih kiselina u crnim vinima proizvedenim u različitim zemljama

FENOLNE KISELINE	Masena koncentracija / mg L ⁻¹						
	Čile ⁷¹		Španjolska ⁵⁷			SAD ⁴¹	
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Sauvignon	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon
Galna	82,12	63,49	15,29	13,69	14,17	6,49 do 9,79	12,41 do 26,44
Protokatehinska	10,76	5,92	0,81	1,47	1,25		
Vanilinska	4,15	10,58	2,35	1,34	1,24		
Kafeinska	15,40	21,17	0,41	0,26	0,42	4,10 do 12,69	7,08 do 16,22
Siringinska	6,91	7,05	2,60	4,93	4,26		
<i>p</i> -Kumarinska	9,94	19,23	0,99	0,17	0,31	1,30 do 2,31	1,11 do 2,76
Kaftarna			2,15	4,09	0,72		
Kutarna			0,8	1,12	0,77		

Tablica 2.2. Masene koncentracije fenolnih kiselina u bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

FENOLNE KISELINE	Masena koncentracija / µg L ⁻¹			
	Španjolska ⁶⁷ (<i>n</i> =10)	Srbija ⁷⁷ (<i>n</i> =3)	Portugal ⁷⁵ (<i>n</i> =17)	Grčka ⁶⁵ (<i>n</i> =26)
Galna	0,2 do 6,2		8,4 do 35,2	1,9 do 84,7
Protokatehinska	0,5 do 2,2		n.d.	
Vanilinska			1,9 do 3,9	
Kafeinska	2,2 do 5,26	1,6 do 7,7	7,7 do 114,9	5,9 do 206,7
Siringinska			n.d do 3,3	
<i>p</i> -Kumarinska	0,3 do 0,60	0,7 do 2,0	3,5 do 33,8	2,5 do 58,7
Kaftarna	16,0 do 51,7	7,6 do 22,0		2,4 do 99,7
Kutarna	2,4 do 7,5	1,4 do 3,7		
Ferulinska	0,5 do 0,9		1,3 do 6,9	n.d. do 7,7
Fertarna	1,1 do 5,4			5,0 do 39,8

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

Tablica 2.3. Masene koncentracije antocijana u crnim vinima kultivara Pinot crni, Merlot i Cabernet Sauvignon proizvedenim u različitim zemljama

	Masene koncentracije / $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Mađarska ⁸⁶ (<i>n</i> = 4)	Italija ⁴⁶ (<i>n</i> =20)	Španjolska ⁴⁷ (<i>n</i> =3)	Italija ⁴⁶ (<i>n</i> =18)
ANTOCIJANI	Pinot crni	Merlot	Cabernet Sauvignon	
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	43,2	18,1 do 40,9	10,4 do 13,1	15,2 do 26,9
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	2,4 do 5,7	n.d.	0,5 do 2,6
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	39,9	27,0 do 47,4	18,8 do 17,7	23,2 do 31,3
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	48,1	21,6 do 45,7	2,58 do 5,63	5,4 do 18,1
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	316,2	267,8 do 370,5	157,0 do 184,0	283,3 do 394,0
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid		9,3 do 24,0	6,21 do 7,4	5,4 do 14,8
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid		83,9 do 139,8	94,9 do 106,0	110,8 do 166,1
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid		5,6 do 10,14	0,85 do 1,25	2,0 do 7,2
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid		36,6 do 72,7	13,4 do 16,8	33,2 do 66,9

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

Tablica 2.4. Masene koncentracije flavan-3-ola u a) crnim i b) bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

a) Crna vina

	Masena koncentracija / mg L ⁻¹				
FLAVAN-3-OLI	Španjolska ²³ (n=8)	Italija ⁷³ (n=11)	Francuska ⁸² (n=6)	Mađarska ⁸⁶ (n=67)	Brazil ⁵⁴ (n=9)
Katehin	15,5 do 41,7	5,5 do 99,0	16,9 do 36,3	21,3 do 89,1	n.d. do 74,7
Epikatehin	9,8 do 34,3	31,7 do 136,0	19,2 do 25,7	11,7 do 126,0	5,0 do 43,6
Epikatehingalat			n.d. do 1,7		
Epigalokatehin			n.d. do 1,2		
Procijanidin B1	4,9 do 16,0	8,1 do 127,5	13,1 do 23,6		
Procijanidin B2	6,8 do 18,1	17,5 do 81,0	13,5 do 18,5		

b) Bijela vina

	Masena koncentracija / mg L ⁻¹			
FLAVAN-3-OLI	Mađarska ⁸⁴ (n=4)	Španjolska ⁸³ (n=8)	Francuska ⁸² (n=4)	Italija ⁷⁴ (n=3)
Katehin	1,4 do 3,3	7,0 do 17,1	1,7 do 2,3	0,1 do 4,9
Epikatehin	16,6 do 22,6	1,7 do 28,7	0,6 do 3,6	0,6 do 2,8
Epikatehingalat	n.d.		n.d. do 0,3	n.d. do 1,3
Epigalokatehin	n.d.		n.d.	
Procijanidin B1	n.d.	11,9 do 25,3	n.d. do 2,3	
Procijanidin B2	n.d.	4,5 do 30,7	n.d. do 0,9	

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

Tablica 2.5. Masene koncentracije flavonola u a) crnim i b) bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

a) Crna vina

FLAVONOLI	Masena koncentracija / mg L ⁻¹		
	Australija ⁵¹ (n=121)	Španjolska ^{58,81} (n=10)	Grčka ⁷⁹ (n=10)
Kvercetin	3,5 do 37,4	Ispod granice određivanja do 25,9	
Miricetin	2,7 do 28,8	Ispod granice određivanja do 13,1	
Izoramnetin	n.d. do 18,1		
Kemferol	n.d. do 2,5	Ispod granice određivanja do 3	
Kvercetin-3-O-glukozid	n.d. do n.q.	0,5 do 6	
Kvercetin-3-O-galaktozid	n.d. do 6,5	8 do 10,6	
Kvercetin-3-O-glukuronid	n.d. do 39,7	0,8 do 3,6	
Kvercetin-3-O-rutinozid	n.d.	n.d.	7,9 do 47,3

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

b) Bijela vina

FLAVONOLI	Masena koncentracija / mg L ⁻¹	
	Australija ⁵¹ (n=44)	Španjolska ⁵⁹ (n=10)
Kvercetin	n.d. do 2,0	
Miricetin	n.d.	
Izoramnetin	n.d.	
Kemferol	n.d. do ispod granice određivanja	
Kvercetin-3-O-glukozid	n.d. do ispod granice određivanja	0,4 do 3,8
Kvercetin-3-O-galaktozid	n.d.	
Kvercetin-3-O-glukuronid	n.d. do ispod granice određivanja	
Kvercetin-3-O-rutinozid	n.d.	1,9 do 7,1
Kvercetin-3-O-ramnozid	n.d.	0,3 do 1,4

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

Tablica 2.6. Masene koncentracije stilbena u a) crnim i b) bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

a) Crna vina

	Masena koncentracija / mg L ⁻¹				
STILBENI	Kanada ³² (n=15)	Francuska ³¹ (n=19)	Hrvatska ⁸⁷ (n=20)	Španjolska ⁵⁷ (n=4)	Portugal ⁷⁸ (n=34)
<i>trans</i> -Resveratrol	0,5 do 1,9	0,9 do 3,8	0,1 do 6,7	Ispod granice određivanja do 1,4	n.d. do 3,9
<i>cis</i> -Resveratrol	0,4 do 3,7	n.d. do 0,9	0,1 do 2,1	Ispod granice određivanja do 0,2	0,7 do 4,0
Ukupni resveratrol-glukozid	1,0 do 7,0	0,1 do 26,0		0,1 do 2,3	n.d. do 50,6

b) Bijela vina

	Masena koncentracija / mg L ⁻¹				
STILBENI	Francuska ³¹ (n=30)	Portugal ⁷⁸ (n=50)	Hrvatska ⁸⁷ (n=14)	Grčka ⁷⁰ (n=18)	Mađarska ⁸⁵ (n=3)
<i>trans</i> -Resveratrol	n.d. do 0,2	n.d. do 2,1	0,1 do 0,5	0,01 do 0,6	0,2 do 0,8
<i>cis</i> -Resveratrol	n.d. do 0,1	n.d. do 1,7	0,02 do 0,3		
Ukupni resveratrol-glukozid	n.d. do 2,9	n.d. do 5,8			2,7 do 6,3

n= broj uzoraka

n.d.= nije detektirano

U svim crnim vinima dobivenim od grožđa iz vrste *Vitis vinifera* L. antocijanidin-3-glukozidi najzastupljenija su skupina pigmenata, a malvidin 3-O-glukozid je najdominantniji.^{43,44,45} Casavecchia i suradnici⁴⁶ utvrdili su antocijanski profil sicilijanskih mladih vina sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Syrah. Masene koncentracije pojedinačnih antocijanidin-3-glukozida u Merlotu i Syrahu sljedile su niz: malvidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > delfinidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid. Kod Cabernet Sauvignona masene koncentracije antocijanidin glukozida snižavale su se sljedećim redoslijedom: malvidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > delfinidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid.

Monagas i suradnici⁴⁷ proučavali su utjecaj različitih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na sastav polifenolih sastavnica u vinima Cabernet Sauvignon i španjolskog kultivara Tempranillo. Utvrđen je antocijanski profil tih dvaju kultivara. Određivani su antocijanidin-3-glukozidi, antocijanidin-3-O-(6-acetil)-glukozidi, antocijanidin-3-O-(6-*p*-kumaril)-glukozidi, *cis*-izomer malvidin-3-O-(6-*p*-kumaril)glukozida i malvidin-3-O-(6-kafeoil)-glukozid te piroantocijanidini. Cabernet Sauvignon sadržavao je više acetiliranih (33,7 %), a manje cimetnih (6,2 %) glukozida, dok su vina Tempranillo sadržavala više cimetnih (12,7 %) nego acetiliranih (8,1 %) glukozida. Kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae* sadrže pektinaze koje kataliziraju hidrolizu pektina u kožici grožđa što pospješuje ekstrakciju antocijana.⁴⁸

Sadržaj flavonola u crnim vinima određen je duljinom maceracije. Pokazalo se da postupna ekstrakcija aglikona i glikozida flavonola tijekom kontakta macerata s fermentirajućim moštom, doseže vrhunac u periodu od 8 do 14 dana.⁴⁹ Tretmani nakon fermentacije poput bistrenja s kazeinom, bentonitom, polivinilpirolidinom i aktivnim ugljenom uzrokuju značajno smanjenje sadržaja flavonol-aglikona i flavonol-glukozida u vinima Sherry.⁵⁰

Jeffery i suradnici⁵¹ istraživali su sadržaj flavonola u australskim crnim komercijalnim vinima. Dominirali su aglikoni flavonola, a najzastupljeniji su bili miricetin i kvercetin. Vrijednosti njihovih masenih koncentracija bile su od 2,78 mg L⁻¹ do 28,78 mg L⁻¹ za miricetin te od 3,49 mg L⁻¹ do 37,36 mg L⁻¹ za kvercetin. Od glikozida, najzastupljeniji je bio kvercetin-3-O-glukuronid. Rezultati upućuju da je glukuronid najstabilniji kvercetin-O-glikozid u crnim vinima. Istraživanja su također pokazala da sadržaj flavonola nije bio

povezan s kultivarom ili regijom, ali u vinima Pinot crni glikozidi kvercetina nisu uopće detektirani ili su bili sadržani u tragovima.

Hermozin-Gutierrez i suradnici⁵² koristili su sadržaj flavonola u grožđu i vinu za određivanje autentičnosti pojedinih kultivara. Njihovo istraživanje pokazalo je da su derivati 3-O-glukuronida i siringetina najotporniji na hidrolizu. Glavni flavonoli u crnim vinima bili su miricetin i njegovi derivati (od 33,3 % do 50,6 %) i kvercetin i njegovi derivati (od 20,0 % do 46,6 %).

Revilla i suradnici⁵³ proučavali su utjecaj nekoliko komercijalnih pektolitičkih enzima na sastav flavan-3-ola u vinu. Dodatak pektolitičkih enzima uobičajena je praksa u vinarijama kako bi se povećao sadržaj polifenola u vinima, pogotovo sadržaj antocijana. Vina tretirana pektolitičkim enzimima imala su visok sadržaj katehina u usporedbi s epikatehinom. Od oligomera, najzastupljeniji su bili dimeri. Starenjem vina masene su se koncentracije pojedinačnih flavan-3-ola postupno snižavale, a uočeno je povišenje koncentracije tetramera flavan-3-ola. Općenito, flavan-3-ol-monomeri zastupljeni su u vinu u višim masenim koncentracijama od dimera. Koncentracija (+)-katehina viša je od koncentracije (-)-epikatehina.

Dias i suradnici⁵⁴ određivali su vrijednosti katehina i epikatehina u brazilskim crnim vinima s područja Sao Francisco, Bahia. Masene koncentracije katehina bile su od 7,51 mg L⁻¹ do 73,20 mg L⁻¹, a epikatehina od 5,08 mg L⁻¹ do 43,32 mg L⁻¹. Visoke koncentracije mogu se objasniti prisutnošću sjemenki tijekom postupka maceracije.

Najzastupljenije skupine fenola u crnim vinima poslije flavonoida su hidroksibenzojeve kiseline i njihovi derivati, hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati te fenolni alkoholi.^{49, 23}

Galna kiselina najzastupljenija je hidroksibenzojeva kiselina određena u crnim vinima i čini 36 % svih benzoata, a slijedi je siringinska i vanilinska kiselina.^{55, 56, 57 58} Hernandez i suradnici⁵⁹ proučavali su utjecaj pojedinih sojeva kvasaca tijekom malolaktične fermentacije na fenolne kiseline u crnim vinima s područja La Rioje. Masene koncentracije galne kiseline bile su do 41,6 mg L⁻¹.

Glavna komponenta fenolnih kiselina u crnim vinima je *trans*-kaftarna kiselina, a slijedi ju *trans*-kutarna. Ginjom i suradnici⁶⁰ pratili su koncentracije fenolnih spojeva tijekom različitih etapa vinifikacije i dozrijevanja crnih vina (Cabernet Sauvignon i Shiraz). Masene koncentracije kaftarne i kutarne kiseline kao i produkata njihove hidrolize (kafeinske i kumarinske kiseline) povišavale su se tijekom vinifikacije. Nakon skladištenja vina u hrastovim bačvama, koncentracije kaftarne i kutarne kiseline postupno su se snižavale, dok su se masene koncentracije kafeinske i *p*-kumarinske kiseline lagano povišavale. Prisutnost kafeinske i *p*-kumarinske kiseline u fermentirajućem vinu dokazuje da hidroliza kaftarne i kutarne kiseline nije ograničena samo na proces starenja vina nego se događa i u mladim vinima.

Koncentracija resveratrola u crnom vinu varira ovisno o više faktora: kultivaru grožđa, geografskom podrijetlu, agronomskim faktorima, klimatskim faktorima, stresu kojem je izložena biljka te enološkoj praksi.⁶¹ Teško je predvidjeti količinu resveratrola u vinu jer jako puno faktora utječe na njegovu biosintezu. Koncentracije mogu biti od tragova do visokih vrijednosti od više od 10 mg L⁻¹. Visoke koncentracije su obično u vinima s produljenom maceracijom. Dva različita tipa reakcija vode do nastajanja derivata stilbena iz *trans*-resveratrola ovisno o kultivaru vinove loze. Postoje kultivari koji su osjetljivi na plamenjaču (peronospora), bolest vinove loze koju uzrokuje gljivica *Plasmopara viticola* i one koje su rezistentne na tu bolest. U osjetljivim se kultivarima vinove loze *trans*-resveratrol sintetizira u velikim količinama, ali brzo glikozilira u netoksični *trans*-resveratrol-glukozid. U rezistentnim se sortama u velikim količinama sintetizira *trans*-resveratrol, koji vrlo brzo oksidira u toksične viniferine.⁶² Landrault i suradnici⁶³ prvi su objavili podatke o koncentraciji oligomernih spojeva u komercijalnim vinima s juga Francuske. Koncentracija viniferina u crnim i slatkim bijelim vinima proizvedenim od grožđa zahvaćenog plemenitom plijesni *Botrytis cinerea* bila je od 0,1 mg L⁻¹ do 1,63 mg L⁻¹. Tetramer resveratrola (engl. *Pallidol*) nađen je u crnim vinima kod kojih je maceracija obuhvaćala i peteljke, a masene koncentracije bile su od 0,38 mg L⁻¹ do 2,22 mg L⁻¹.

Suha i slatka bijela vina rezultat su alkoholne fermentacije čistog mošta. U bijelim suhim vinima ukupni sadržaj polifenola u rasponu je od 50 mg L^{-1} do 450 mg L^{-1} što je 10 % od sadržaja u crnim vinima.⁶⁴ Moštev i vina bijelih kultivara sadrže hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, katehine, procijanidine i flavonole. Tirosol (*p*-hidroksifeniletil-alkohol) glavna je fenolna sastavnica u različitim bijelim vinima. Nastaje iz tirozina djelovanjem kvasaca i sadržan je u koncentracijama od 1 mg L^{-1} do 25 mg L^{-1} .⁶⁴ Bijela vina sadrže *p*-kumarinsku i kafeinsku kiselinu s tragovima ferulinske kiseline. Nalazimo ih u izvornom obliku i u kombinaciji s vinskom kiselinom u obliku kutarne, kaftarne odnosno fertarne kiseline. Najzastupljenija je kaftarna kiselina. Sadržaj katehina općenito je viši od sadržaja epikatehina. U vinima u kojima katehin i epikatehin nisu detektirani, pretpostavlja se da su se obje sastavnice oksidirale obzirom da lako podliježu oksidaciji.⁶⁵ Koncentracije polifenolnih spojeva u bijelim vinima proizvedenim iz grožđa zahvaćenog s *Botrytis cinerea* su niže obzirom na razgradnju fenolnih sastavnica koju uzrokuje navedena plijesan.⁶⁶

Hernanz i suradnici⁶⁷ pratili su utjecaj temperature i duljine maceracije na fenolni profil bijelih vina. Istražili su utjecaj trajanja kontakta kože s moštom (2 h, 6 h, 12 h i 24 h) i različitih temperatura maceracije ($5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) na laboratorijskoj (600 L) i industrijskoj (30 000 L) razini proizvodnje. Vina kod kojih je bio produljen kontakt s kožicom značajno su se razlikovala u polifenolnom sastavu u odnosu na kontrolna vina. U svim slučajevima sadržaj fenola se povećao. U industrijski proizvedenim vina utvrđen je viši sadržaj hidroksicimetnih kiselina, prvenstveno kafeinske i kaftarne kiseline, i niži sadržaj epikatehina i kvercetin-3-*O*-rutinozida.

Badeschneider i suradnici⁶⁸ detektirali su kvercetin-3-*O*-glukuronid i kemferol-3-*O*-glukozid u vinima Rizling. Iako je uvriježeno mišljenje da bijela vina sadrže samo kemferol i kvercetin te njihove derivate u vrlo niskim koncentracijama, nedavna istraživanja potvrđuju da sadrže i izoramnetin i njegove derivate. Potvrđena je prisutnost 3-*O*-glukozida i 3-*O*-galaktozida kemferola, kvercetina i izoramnetina te 3-*O*-glukuronida kemferola i kvercetina u bijelim kultivarima grožđa.^{68,69} Jefferey i suradnici⁵¹ analizirali su 44 bijela vina u kojima su najzastupljeniji bili kvercetin i izoramnetin-3-heksozid.

Koncentracije *trans*-resveratrola u bijelim su vinima niže nego u crnim, i te vrijednosti se kreću oko $0,3 \text{ mg L}^{-1}$.

U Hrvatskoj se svega nekoliko skupina istraživača bavilo polifenolima u vinu. Katalinić i suradnici⁸⁷ istraživali su prisutnost i odnos monomera *trans*- i *cis*-resveratrola u vinima karakterističnih dalmatinskih kultivara. Rastija i suradnici⁸⁸ prvi su objavili studiju o pojedinačnim polifenolnim spojevima (sedam fenolnih kiselina, sedam flavonoida i *trans*-resveratrol) u komercijalnim vinima iz Hrvatske.

Iz podataka u tablicama 2.7 i 2.8 možemo vidjeti polifenolni sastav bijelih i crnih vina proizvedenih u Hrvatskoj. Na sastav polifenola u vinima utječe geografsko podrijetlo, tj. vinogradarska regija koja se u Hrvatskoj dijeli na kontinentalnu i primorsku. Naime, vina s područja primorske regije bogatija su polifenolima od vina s područja kontinentalne regije. Svjetlo omogućava fotosintezu u listu, odnosno nastajanje organske tvari neophodne za razvoj loze. Pri manjoj količini svjetla grožđe slabije dozrijeva. Količina svjetla izražava se zbrojem sunčanih sati tijekom vegetacije. Najveći je broj sunčanih sati tijekom vegetacije u južnim krajevima, Dalmaciji. Blizina mora povećava ukupno osvjetljenje vinogradarskog položaja zbog reflektirajuće svjetlosti.⁴⁰

Tablica 2.7. Masene koncentracije ukupnih polifenola u bijelim vinima Hrvatske

Broj uzoraka	Masena koncentracija / mg L ⁻¹	Lit. ref.
2	252	92
14	161 do 424	87
11	228 do 345	91
3	191 do 652	88
4	292 do 402	89

Tablica 2.8. Masene koncentracije ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u crnim vinima Hrvatske

Masena koncentracija / mg L ⁻¹			
Broj uzoraka	Ukupni fenoli	Ukupni antocijani	Lit.ref.
6	2372 do 3183	68,7 do 398	89
4	1455 do 2718	291 do 377	90
9	1156 do 2619	Nije određivano	88
20	825 do 3068	88 do 551	87

2.3. Analiza ukupnih polifenola u vinu

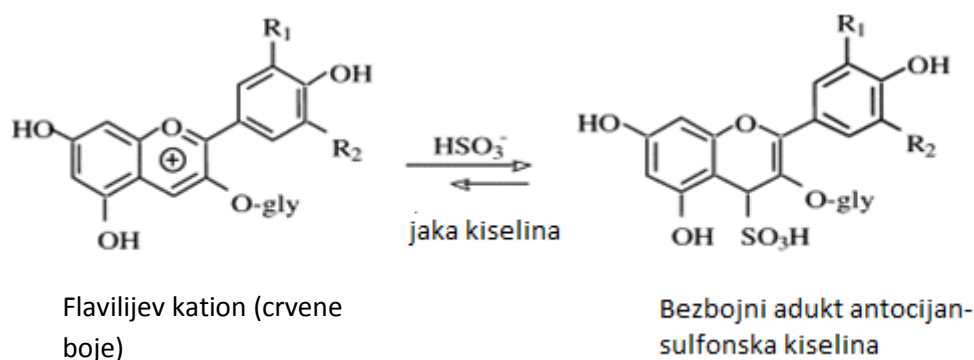
Fenolne sastavnice u vinu mogu se određivati rutinski spektrofotometrijskim metodama koje su jeftine i brze te služe za praćenje promjena tijekom vinifikacije ili starenja vina. Najčešće se primjenjuju metode za određivanje ukupnih fenola,⁹³ antocijana⁹⁴ i flavan-3-ola.

Ukupni fenoli

Ukupni fenoli obično se kvantificiraju pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa. Ta se metoda koristi u vinarskoj industriji, ali se rutinski primjenjuje i u laboratorijima u kojima se istražuju antioksidacijska svojstva prehrambenih namirnica. Metoda se temelji na oksido-redukcijskim reakcijama Folin-Ciocalteuovog reagensa s fenolima. Folin-Ciocalteuov reagens kompleks je fosfomolibdata i fosfovolframata žute boje. Reagens oksidira fenole te se molibden (VI) reducira u molibden (V) što rezultira promjenom žute boje kompleksa u plavu. Oksidirani fenoli pokazuju svoj apsorpcijski maksimum u području između $\lambda=725$ nm i $\lambda=765$ nm. Uvjet za oksidaciju fenola su alkalni uvjeti pri pH=10.

Ukupni antocijani

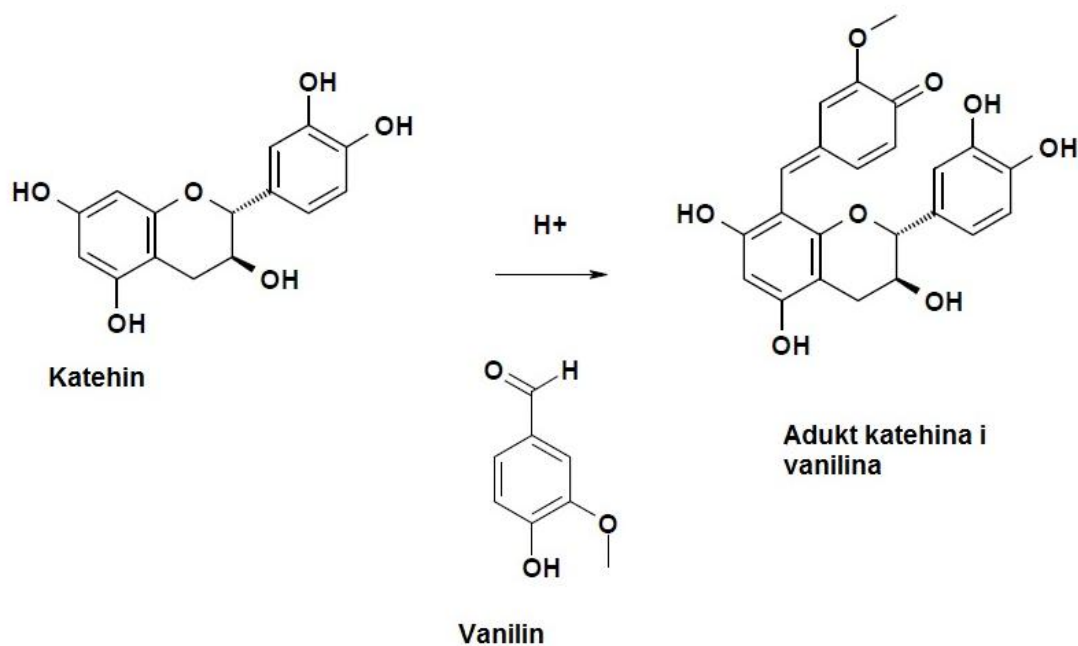
Sadržaj ukupnih antocijana može se određivati metodom izbjeljivanja natrijevim bisulfitom koju su razvili Ribereau-Gayon i Stonestreet.⁹⁴ Dodatkom natrijevog bisulfita mijenja se apsorpcija monomernih antocijana, a apsorpcija polimernih pigmenata ostaje ista. Sumporov dioksid reagira kao elektrofil na atomu C-4 antocijana te nastaje bezbojni adukt antocijan-sulfonska kiselina (slika 2.10). Polimerni pigmenti ne reagiraju s bisulfitom s obzirom da je položaj C-4 blokiran.



Slika 2.10. Reakcija flavilijevog kationa s bisulfitom prilikom spektrofotometrijskog određivanja ukupnih antocijana

Ukupni flavan-3-oli

Ukupni flavan-3-oli određuju se pomoću vanilina. Određivanje flavan-3-ola temelji se na reakciji B-prstena (slika 2.2) s vanilinom. Nastali adukt crvene je boje s apsorpcijskim maksimumom na $\lambda=500$ nm, a relativno je stabilan pri visokim koncentracijama sumporne ili klorovodične kiseline.^{95,96} Reakcija obuhvaća katehin, epikatehin te proantocijanidine. Reakcija je prikazana na slici 2.11.



Slika 2.11. Reakcija katehina s vanilinom

2.4. Priprava uzoraka vina za kromatografsku analizu

Koncentracije polifenola u vinu relativno su visoke, pogotovo u crnim vinima. Zbog izuzetno složenog polifenolnog sastava vina, razvijeni su brojni postupci priprave uzoraka za kromatografsku analizu polifenola u vinu. Priprava uzorka treba omogućiti što djelotvornije izdvajanje ciljanih analita iz matrice uzorka uz istovremeno uklanjanje što većeg broja interferirajućih spojeva. Način priprave vina za analizu polifenola ponajprije ovisi o tehnikama analize, a zatim o skupinama polifenola koje se želi analizirati i opremljenosti laboratorija.

2.4.1. Direktno injektiranje uzorka u kromatografski sustav

U posljednje vrijeme sve je veća primjena direktnog injektiranja uzoraka vina bez prethodne pripreme u sustav HPLC-a. Postupak se sastoji od prethodne filtracije uzorka vina kroz politetrafluoroetilenski membranski filter veličine pora 0,22 μm ili 0,45 μm .^{97,98,99} Gomez-Alonso i suradnici⁹⁸ identificirali su i kvantificirali 48 fenolnih sastavnica u vinu direktnim injektiranjem u sustav HPLC-a uz primjenu dvaju različitih detektora.

2.4.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid Liquid Extraction*, LLE) obično se koristi za frakcioniranje flavonoida iz vina. Vino se ekstrahira dietil-eterom ili etil-acetatom.¹⁰⁰ S dietil-eterom ekstrahiraju se flavanol-monomeri i flavanol-aglikoni, dok antocijani, flavanol-glikozidi i proantocijanidini zaostaju u vodenoj fazi. Etil-acetatom ekstrahiraju se flavanol-monomeri i oligomeri zajedno s flavonolima.^{101,102} LLE ima široku primjenu u protustrujnoj kromatografiji (engl. *Counter Current Chromatography*, CCC). Nedostatak ove metode je nepotpuni polifenolni profil vina.¹⁰³

2.4.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) ima niz prednosti u usporedbi s ekstrakcijom tekuće-tekuće, jer je brža, zahtjeva manju količinu organskih otapala, omogućuje visoku koncentraciju analita u konačnom ekstraktu, a moguća je i automatizacija postupka. Ključni korak prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi pravilan je izbor sorbensa. Najčešće se koristi oktadecilsilicijev dioksid C₁₈ (u sustavu obrnutih faza) i ionsko-izmjenjivačka faza. Zadnjih par godina na tržištu su dostupni novi sorbensi od polimernih materijala i sorbensi mješovitog tipa s dvije različite vrste funkcionalnih skupina.

SPE na oktadecilsilicijevu dioksidu C₁₈ omogućava odjeljivanje polifenolnih sastavnica u vinu na četiri frakcije: fenolne kiseline (frakcija 1), katehine, procijanidine i monomere antocijana (frakcija 2), flavonole (frakcija 3) i polimerne proantocijane (frakcija 4). Koriste se tri različita eluenta: dietil-eter, etil-acetat i metanol. Svaka frakcija se zasebno analizira HPLC-om. Prije ekstrakcije na čvrstoj fazi, vino je potrebno zaluziti (pH=7).^{104,105,106}

Gel-filtracijskom kromatografijom na Toyopearl[®] 40 (S) smoli kao nepokretnoj fazi frakcioniraju se polimerne fenolne sastavnice u vinu, posebice proantocijanidini. Kao eluens najčešće se koristi smjesa metanola i vode ili etanola i vode.¹⁰⁵

Pinelo i suradnici¹⁰⁶ razradili su metodu za odjeljivanje polimernih i nepolimernih fenola pomoću SPE. Separacijom na stupcu C₁₈ pripravljene su tri frakcije: fenolne kiseline (frakcija 1), katehini, flavonoli i antocijani (frakcija 2) te polimerna frakcija (frakcija 3). Uzorak vina se prethodno dealkoholizira i zaluži (pH=7) te se nanosi na kolonu koja je prethodno kondicionirana s metanolom i vodom. Fenolne kiseline se ne adsorbiraju na hidrofobnu stacionarnu fazu te se skupljaju u prvoj frakciji. Matrica na koloni se zakiseli pomoću 0,01 mol L⁻¹ HCl te se etil-acetatom eluira frakcija 2. Smjesom acetona, vode i metanola u različitim omjerima ispiru se polimerne frakcije.

Nedostaci separacije fenolnih sastavnica u vinu na sorbensu C₁₈ su niski analitički povrati jako polarnih sastavnica poput hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina i njihovih derivata. Alkohol često mora biti uklonjen iz uzorka jer smanjuje zadržavanje hidroksibenzojevih kiselina.

Polimerni sorbensi poput polistiren-divinilbenzena jače vežu polarne komponente nego sorbens C₁₈. Chilla i suradnici¹⁰⁷ koristili su kolonice s polistiren-divinilbenzenom za ekstrakciju i koncentriranje fenolnih kiselina iz vina. Fenolne kiseline eluirane su sa sorbensa tetrahidrofuranom (THF).

U novije vrijeme sve širu primjenu u području analize polifenola u prehrambenim namirnicama imaju polimerni sorbensi s otiskom molekule analita (engl. *Molecularly-Imprinted Polymers*, MIPs) koji služe kao strukturno selektivni sorbensi u SPE. Željeni analit koji služi kao predložak ulazi u interakcije sa svojom komplementarnom funkcionalnom skupinom odgovarajućeg funkcionalnog monomera. Te interakcije se ‘zamrzu’ polimerizacijom koja se izvodi u otopini s visokom koncentracijom sredstva za umrežavanje. Nakon uklanjanja željenog analita ekstrakcijom, nastaje mjesto vezivanja na sorbensu.¹⁰⁸ Molinelli i suradnici¹⁰⁹ prvi su primjenili MIPs za selektivnu ekstrakciju i koncentriranje kvercetina u Merlotu. MIPs za kvercetin bio je pripremljen termičkom polimerizacijom koristeći 4-vinilpiridin kao funkcionalni monomer i etilen-glikol-dimetakrilat kao sredstvo umreženja. U tablici 2.9 prikazane su različite vrste SPE-sorbensa koje se primjenjuju u analizi fenolnih sastavnica u vinu.

Tablica 2.9. Postupak ekstrakcije na različitim vrstama sorbensa primijenjenih u analizi fenolnih sastavnica vina

Naziv	Vrsta sorbensa	Postupak ekstrakcije *	Ekstrahirani spojevi	Lit. ref.
LiChrolut EN 200 mg	Etilvinilbenzen-divinilbenzen kopolimer	a) 5 mL CH ₃ OH 3 mL H ₂ O b) 9,8 mL vina razrijeđenog s vodom c) 0,6 mL H ₂ O, sušenje u struji helija d) 1,2 mL tetrahidrofuran	<i>Cis-</i> i <i>trans</i> -resveratrol <i>Cis-</i> i <i>trans</i> -resveratrol-glukozid	110
RP-105	Polistiren-divinilbenzen	a) 3 mL CH ₃ OH 3 mL H ₂ O b) 2 mL vina c) ψ (0,1 mol L ⁻¹ HCl, CH ₃ OH) = 9:1, sušenje u struji dušika d) 10 mL dietil-etera, upareno do suha i otopljeno u pokretnoj fazi	Hidroksicimetne kiseline i derivati, hidroksibenzojeve kiseline i derivati te furaldehidi	111
C-18-Maxi Clean	Oktadecilsilicijev dioksid	a) 5 mL CH ₃ OH 10 mL fosfatnog pufera (pH=7) b) 5 mL neutraliziranog vina (pH=7) c) 20 mL fosfatnog pufera d) 5 mL etil-acetata	Kvercetin, <i>cis-</i> i <i>trans</i> -resveratrol, <i>cis-</i> i <i>trans</i> -resveratrol-glukozid	112

Tablica 2.9. -nastavak

Naziv	Vrsta sorbensa	Postupak ekstrakcije*	Ekstrahirani spojevi	Lit. ref.
Oasis MCX	Mješoviti oblik kationskog izmjenjivača i kopolimera <i>N</i> -vinilpirolidon-divinilbenzena	a) 5 mL CH ₃ OH 5 mL H ₂ O b) 5 mL vina zakiseljenog s 0,1 mol L ⁻¹ HCl c) 5 mL 0,1 mol L ⁻¹ HCL 5 mL H ₂ O d) 3x5 mL CH ₃ OH (frakcija 1), 3x5 mL smjese otapala ψ (NH ₄ OH, CH ₃ OH, H ₂ O)=2:80:8 (Frakcija2) Frakcija 1 uparena do suha i otopljena u pokretnoj fazi	Frakcija 1: Flavonoli, flavan-3-oli, derivati hidroksicimetnih kiselina Frakcija 2: Antocijani	24
Oasis HLB	<i>N</i> -vinilpirolidon-divinilbenzen	a) 3 mL CH ₃ OH 3 mL sintetskog vina b) 2 mL vina c) 5 mL smjese otapala ψ (CH ₃ OH, sintetsko vino)=12:88 d) 1 mL smjese otapala ψ (CH ₃ CN, CH ₃ COOH)= 10:90 (frakcija 1) te 1 mL smjese otapala ψ (CH ₃ CN , NH ₄ OH)=98: 2 Frakcije spojene, uparene do suha i otopljene u 0,5 mL smjesi otapala ψ (CH ₃ CN, H ₂ O)=20:80	Flavan-3-oli, hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzojeve kiseline i benzaldehidi	113

Tablica 2.9. -nastavak

Naziv	Vrsta sorbensa	Postupak ekstrakcije*	Ekstrahirani spojevi	Lit. ref.
Nexus ABS Elut	Stiren-divinilbenzen metakrilat kopolimer	a) 1 mL CH ₃ OH 1 mL acetatni pufer 0,05 mol L ⁻¹ (pH=3,6) b) 1 mL razrijeđenog vina c) 2 mL 0,05 mol L ⁻¹ acetatnog pufera d) 1 mL CH ₃ OH upareno do suha i otopljeno u 1 mL smjese otapala ψ (CH ₃ OH, acetatni pufer)=30:70	Rutin, <i>trans</i> -resveratrol, miricetin, kvercetin i kemferol	114
Oasis HLB	N-vinilpirolidon-divinilbenzen kopolimer	a) 3 mL CH ₃ OH 3 mL H ₂ O b) 2,5 mL zakiseljenog vina s 0,5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ c) 5 mL H ₂ O d) 5 mL etil-acetata (frakcija 1), a zatim 5 mL CH ₃ OH (frakcija 2) obje frakcije uparene do suha, ostatak otopljen u smjesi otapala ψ (CH ₃ OH, H ₂ O)=20:80 i frakcije spojene	33 fenolne sastavnice: hidroksibenzojeve kiseline i derivati, hidroksicimetne kiseline i derivati, stilbeni, fenolni alkoholi, flavan-3-oli, flavonoli	115

*Postupak ekstrakcije obuhvaća :

- a) kondicioniranje sorbensa u kolonici
- b) propuštanje uzorka
- c) ispiranje sorbensa-uklanjanje matrice uzorka
- d) ispiranje analita sa sorbensa

2.5. Kvantitativna i kvalitativna analiza polifenola u vinu

Za analizu pojedinačnih polifenola u vinu najčešće se rabe kromatografske metode kao što su tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) te kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE).

2.5.1. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Od svih kromatografskih tehnika tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi pojedinačnih polifenola. Odabir metode ovisi o načinu pripreve uzoraka vina, skupini spojeva koji se žele analizirati te opremljenosti laboratorija. Za određivanje antocijana, proantocijanidina, flavonola i fenolnih kiselina najčešće se primjenjuju sustavi obrnutih faza uz oktadecilsilicijevu (C_{18}) ili njoj ekvivalentnu nepokretnu fazu. U zadnje vrijeme za analizu polifenola u grožđu i vinu su se kao alternativa kolonama C_{18} pojavile kolone s monolitnim nepokretnim fazama. Te su kolone napravljene od poroznog materijala u jednom komadu koji nastaje u kapilari polimerizacijom monomera. Različitim dodacima i promjenom uvjeta polimerizacije mogu se varirati dimenzije pora i svojstva o kojima ovisi odjeljivanje analita. Specifična struktura monolitnih kolona omogućuje veći protok pokretne faze, kraće vrijeme analize i brže uravnotežavanje kromatografskog sustava između injektiranja. Nekoliko je istraživanja pokazalo prednosti monolitne kolone u analizi polifenolnih sastavnica u vinu. Castellari i suradnici¹¹⁷ usporedili su običajene C_{18} -kolone s monolitnom te pokazali da monolitna kolona podnosi veći protok pokretne faze te da je pad tlaka duž kolone manji, a vrijeme ispiranja i uravnoteženja kolone kraće. Postignuto je brzo razdvajanje monomernih fenola te je poboljšan omjer signala osnovne linije i šuma. Liazid i suradnici¹¹⁸ razvili su brzu metodu za razdvajanje 13 uobičajenih polifenolnih sastavnica u vinu na monolitnoj C_{18} koloni u vremenu od 8 minuta u kojem je postignuto odvajanje i kvantifikacija. Rezultati kvantitativnog određivanja bili su reproducibilni, a razlučivanje pikova visoko.

Vergare i suradnici¹¹⁹ koristili su novu vrstu kolona s mješovitom nepokretnom fazom koja ima hidrofobna i ionsko-izmjenjivačka svojstva. Ta specifična nepokretna faza sadrži osnovne grupe s pozitivnim nabojem ugrađene u hidrofobni lanac, a pokazala se dobrom za separaciju antocijana i proantocijana sadržanih u mladim i starim vinima Cabernet

Sauvignona. U usporedbi s klasičnom C₁₈-kolonom, redoslijed ispiranja antocijana i proantocijana s kolone se promijenio, a drugačija je i selektivnost. Unatoč vremenski dužoj analizi, ova vrsta kolone omogućava jasno odjeljivanje prvo monoglukozidinih antocijana, zatim njihovih acetiliranih derivata te na kraju kumarilnih derivata. Proantocijani se eluiraju između kumarilnih derivata, a zadnji pik u kromatogramu je pik polimerne sastavnice što je povezano sa kultivarom i starošću vina. Specijalne kolone s nepokretnom fazom koju čine nanočestice sastavljene od čvrste jezgre silikagela obložene poroznim slojem polimera (engl. *Core Shell*), koristile su se prilikom analize polifenola u grožđu, soku i vinu međukrižnih kultivara kao alternativa analizi tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC). Tehnologija *Core shell* razvijena je za primjenu na klasičnim HPLC-instrumentima. Manns i Mansfield¹²⁰ primjenili su kolone *core shell* kako bi poboljšali analizu atipičnih fenolnih komponenata, antocijan-diglukozida. Pokazalo se da *core shell* kolone C₁₈ i PFP (pentafluorfenil) omogućuju značajno poboljšanje selektivnosti i razlučivanja te postizanje niske granice detekcije i visoke reproducibilnosti. Također, smanjena je potrošnja otapala.

Osim odabira kolone, vrlo je važan i odabir pokretnih faza i načina eluiranja. Najčešće se primjenjuje gradijentno eluiranje uz uporabu dvaju sustava otapala, jednog polarnog kao što je vodena otopina octene, perklorne, fosforne ili mravlje kiseline te drugog manje polarnog otapala, najčešće zakiseljenog metanola ili acetonitrila. Također se primjenjuju sustavi s tri ili četiri otapala koji ponekad mogu sadržavati soli. Trajanje analize obično je od 30 min do 150 min, dok je protok pokretne faze od 0,10 mL min⁻¹ do 1,8 mL min⁻¹. Temperature kolone su od 20 °C do 50 °C, a obujam injektiranog uzorka od 10 µL do 20 µL.¹²²

Tekućinska kromatografija obrnutih faza prikladna je za analizu različitih grupa fenolnih spojeva u vinu, ali su mogućnosti njene primjene za analizu polimernih spojeva ograničene. Kennedy i Waterhouse¹²¹ predložili su upotrebu tekućinske kromatografije normalnih faza (engl. *Normal Phase-Liquid Chromatography*, NP-LC) za analizu proantocijana u prisutnosti antocijana. Nepokretna faza bila je silikagel, a koristili su gradijentno eluiranje uz četiri pokretne faze: diklormetan, metanol, mravlju kiselinu i heptansulfonsku kiselinu. Metoda nije obuhvaćala prethodno pročišćavanje uzorka. Fenoli su se eluirali s kolone prema rastućoj molekulskoj masi. Ta metoda najčešće je korištena za kvantifikaciju polimera s obzirom da se mogu odvojiti polimeri različitih molekulskih masa.

Pri analizi polifenolnih sastavnica u vinu HPLC-om koriste se različiti načini detekcije analita. Najčešće se primjenjuje UV-Vis-detekcija jer fenolni spojevi apsorbiraju svjetlo u UV-području. Antocijani imaju dva apsorpcijska maksimuma u području od $\lambda=265$ nm do $\lambda=275$ nm i od $\lambda=520$ nm do $\lambda=546$ nm. Glikozilacija potiče hipsokromni pomak apsorpcijskog maksimuma, a aciliranje s hidroksicimetnom kiselinom rezultira pojavom karakterističnog ramena oko $\lambda=310$ nm za *p*-kumarinsku kiselinu i $\lambda=325$ nm za kafeinsku kiselinu. Flavanoli imaju apsorpcijske maksimume na $\lambda=210$ nm i $\lambda=270$ nm.¹²² Ta svojstva omogućavaju detekciju i kvantifikaciju fenola pomoću UV-Vis-detektora. U analizi polifenola korisiti se i fluorescencijski detektor (engl. *Fluorescence Detector*, FLD). Kombinacijom detektora s nizom dioda i fluorescencijskog detektora, Porgali i Buyuktuncel¹²³ istovremeno su odredili 14 fenolnih sastavnica u crnom vinu. Prema literaturi kombinacija UV-detekcije ($\lambda=320$ nm) i fluorescencijskog signala ($\lambda_{ex}=280$ nm, $\lambda_{em}=320$ nm) služi za selektivnu detekciju flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina. Epikatehin galat i procijanidin B2-galat mogu se identificirati pri $\lambda_{ex}=270$ nm, $\lambda_{em}=377$ nm. Valne duljine ekscitacije i emisije polifenolnih spojeva prikazane su u tablici 2.10.

Tablica 2.10. Valne duljine ekscitacije i emisije polifenolnih spojeva¹²⁴

SASTOJAK	λ_{ex}/nm	λ_{em}/nm
Galna kiselina	278	366
Prokatehinska kiselina	270	358
Prokatehinski aldehid	265	360
(+)-Katehin	278	360
2,5-Dihidroksibenzaldehid	278	360
Vanilinska kiselina	278	360
Kafeinska kiselina	262	426
Siringinska kiselina	278	360
(-)-Epikatehin	278	360
Siringaldehid	260	422
<i>p</i>-Kumarinska kiselina	260	422
Ferulinska kiselina	260	422
<i>trans</i>-Resveratrol	330	374
Miricetin	268	370
Kvercitrin	260	426
Kvercetin	264	420
Kemferol	268	422

Analiza polifenola HPLC-om ograničena je na male i jednostavne molekule, a to je samo manji udio ukupnih flavonoida u vinu. Analizom proantocijanidina HPLC-om postiže se slabo razlučivanje i teško je identificirati pojedine komponente. Prosječni sastav proantocijanidina u grožđu i vinu može se odrediti nakon kataliziranog cijepanja kiselinom u prisutnosti nukleofila. Najčešće se kao nukleofili koriste benzilhidroksisulfid, floroglucinol i cisteamin. Te metode omogućuju određivanje sadržaja proantocijanidina u frakciji tanina zbrajanjem koncentracije oslobođenih jedinica kako bi se odredio prosječni stupanj polimerizacije. Tioliza se također pokazala korisnom za analizu deriviranih tanina. Tiolizom ekstrakata crnog vina oslobađaju se benziltioeterski derivati nekoliko antocijanin-flavanol adukata, pokazujući da su takve strukture bile vezane za proantocijanidine.

Vezni sustav HPLC-a i spektrometra masa omogućava nedvojbenu identifikaciju struktura sastavnica nastalih starenjem crnog vina reakcijom antocijana s drugim sastavnicama, te karakterizaciju procijanidina, proantocijanidina i tanina. Koriste se blage tehnike ionizacije analita poput ionizacije elektroraspršenjem (engl. *ElectroSpray Ionization*, ESI) ili kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Analiza crnog vina pomoću sustava HPLC-ESI-MS prvi put je primijenjena 1996. godine te su detektirana dva nova pigmenta molekulskih masa ($M_r = 609$ i $M_r = 755$), fenilpiranomalvidin-3-O-glukozid i njegov *p*-kumarilni derivat.^{125, 126}

Antocijani se najbolje detektiraju uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem, u kiselom mediju (100 %-tna mravlja kiselina). Uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem postiže se najbolja detekcija nenabijenih flavonoida poput flavanola, flavonola i dihidroflavonola te deriviranih pigmenata antocijana koji imaju karboksilnu skupinu. Tandemna spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry-Mass spectrometry*, MS/MS) te spektrometrija masa primjenom stupice iona (engl. *Ion Trap Mass Spectrometry*) omogućuju fragmentiranje odabranog iona te u vezanim sustavima s HPLC-om sve više zamjenjuju klasične kvadrupolne spektrometre masa.^{125, 126}

2.5.2. Ostale metode analiza

U posljednje vrijeme kapilarna elektroforeza pokazala se kao brza, učinkovita i relativno jeftina metoda analize polifenola u vinu.¹²⁶ Analiza kapilarnom elektroforezom ne zahtjeva uobičajenu složenu pripravu uzoraka te smanjuje volumene uzorka potrebne za analizu na manje od 1 μL . Metodom otiska prsta i primjenom umjetnih neuronskih mreža moguće je iz dobivenih elektroferograma s velikom točnošću utvrditi sortu vina i godinu

berbe. Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MECC) vrsta je kapilarne elektroforeze koja omogućava razdvajanje neutralnih analita pod utjecajem električnog polja. Princip razdvajanja temelji se na različitoj raspodjeli analita između micela dodane površinski aktivne tvari koje predstavljaju nepokretnu fazu i vodene faze koje ih okružuje. Međudjelovanje između flavonoida i micela je snažno, pa se selektivnost razdvajanja može modificirati koncentracijom micela.¹²⁷

Jedna od najjednostavnijih i najjeftinijih tehnika određivanja polifenola u vinu je tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC). U tu svrhu najčešće se upotrebljavaju TLC-ploče presvučene slojem silikagela. Polifenoli apsorbiraju u ultraljubičastom dijelu spektra, pa se nakon prskanja ploča s polietilen-glikolom ili 1%-tnom alkoholnom otopinom aluminijeva klorida uglavnom detektiraju pod UV-svjetlom pri valnim duljinama od $\lambda=250$ nm do $\lambda=260$ nm ili $\lambda=350$ nm do $\lambda=360$ nm. Kvantitativna analiza uzoraka provodi se pomoću skenirajućeg denzitometra.¹²⁸

Vinas i suradnici¹²⁹ razvili su metodu određivanja polifenola u vinu mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase MicroExtraction*, SPME) uz analizu analita sustavom GC-MS. Polifenoli su ekstrahirani iz vina uranjanjem poliakrilatnog SPME-vlakna direktno u uzorak, a zatim je vlakno postavljeno u pare iznad otopine derivatizirajućeg reagensa, bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, BSTFA, kako bi se polarne nehlapljive sastavnice prevele u hlapljive derivate. Ova osjetljiva metoda razvijena je za određivanje *cis*- i *trans*-resveratrola, 3',4',3,5-tetrahidroksi-*trans*-stilbena, katehina i epikatehina. Interpretacija rezultata na temelju fragmenta zabilježenih u spektrima masa je kompleksna i teška zbog prethodne derivatizacije analita.

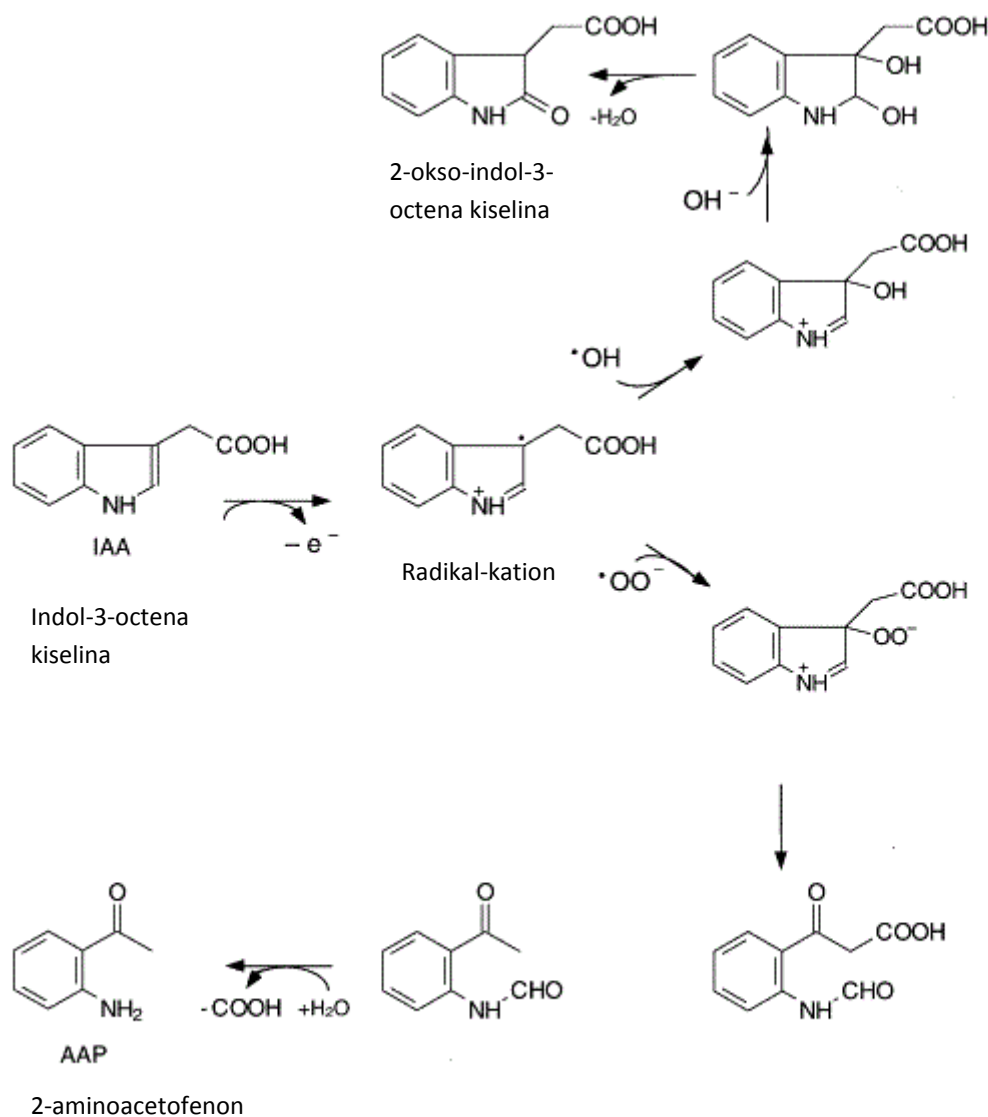
2.6. Netipična aroma starenja

Netipična aroma starenja prvi put je opisana 1989. godine u bijelim vinima čiji je miris podsjećao na miris mokrog krzna psa ili miris akacije u cvatu. UTA se može pojaviti u boci ili tanku u svega nekoliko mjeseci. Kod tipičnog starenja vina oksidacija je spora te se promjene specifične arome odvijaju tijekom nekoliko godina čuvanja vina. Rapp i suradnici¹³¹ su 1993. godine u vinu detektirali 2-aminoacetofenon (2-AAP), spoj odgovoran za miris UTA-e. 2-Aminoacetofenon može biti uzrok nepoželjnih mirisa u mliječnim proizvodima i proizvodima kukuruza. Nastajanje 2-AAP povezano je s metabolizmom triptofana.

Fitohormoni auksini su organski spojevi odgovorni za izduživanje (elongaciju) stanice. Među najpoznatijim prirodnim auksinima kod većine biljaka je indol-3-octena kiselina (IAA), koja se sintetizira iz triptofana ili indola, ponajprije u lisnim primordijima i mladom lišću, te rastućim sjemenkama. Prenosi se iz stanice u stanicu, uglavnom kambijem, a prijenos prema korijenu najvjerojatnije uključuje i floem.¹³² U biljkama je IAA uglavnom u konjugiranom obliku. Uloga konjugata je višestruka: IAA-konjugati uključeni su u prijenos, čuvanje i zaštitu IAA od enzimske razgradnje. Konjugati mogu kontrolirati razine IAA u stanici (homeostatični mehanizam) te mogu omogućiti i katabolizam IAA. Triptofan se može izravno razgraditi triptofanazom na indol ili pomoću određenih mikroorganizama do skatola. Enzimska razgradnja triptofana odvija se putem formilkinurenina i kinurenina do antranilne kiseline. Potrebno je naglasiti da se triptofan i njegovi metaboliti mogu razgraditi i neenzimski. Takvi mehanizmi igraju ključnu ulogu u nastajanju nepoželjnih mirisa u prehrambenim proizvodima. IAA u vinu je prisutna u slobodnom i konjugiranom obliku. IAA je vrlo nestabilna komponenta koja se vrlo lako razgrađuje enzimskim ili neenzimskim mehanizmima u 2-AAP ili druge metabolite triptofana tijekom starenja vina. Sulfiti su jedine komponente koje se dodaju u vino tijekom vinifikacije kako bi se postigle dovoljne razine slobodnog sumporovog dioksida u vinu. U vino se dodaju kao otopine sumporovog dioksida ili kao bisulfit u koncentracijama od 50 mg L⁻¹ do 100 mg L⁻¹. Time se vino stabilizira i štiti od mikroorganizama te se postižu redukcijski uvjeti tj. sprječava se oksidacija vina.^{133, 134, 135}

2-Aminoacetofenon poznat je kao produkt razgradnje oksidacijskih procesa. Eksperimenti u kojima je modelna otopina visoke koncentracije IAA u 10 %-tnom etanolu tretirana s kalijevim bisulfitom pokazali su tipičnu pojavu UTA nakon 14 dana pri sobnoj temperaturi. IAA se brzo raspada istovremeno s oksidacijom sulfita u sulfate. Superoksidni (O₂⁻),

hidroksilni ($\cdot\text{OH}$) i sulfitni radikal ($\text{SO}_3\cdot^-$) mogu generirati od rezidualnog kisika reakcijama oksidacije sa sulfitima. Ti su radikali odgovorni za širenje reakcijskih lanaca sulfit-kisik te uzrokuju kooksidaciju biljnih konstituenata poput IAA.



Slika 2.12. Mehanizam nastajanja 2-aminoacetofenona iz indol-3-octene kiseline¹³⁴

Hoenicke i suradnici¹³⁴ proučavali su mehanizam nastajanja 2-AAP-a u modelnim otopinama fermentacije i sulfuracije u koje su dodani kinurenin i indol-3-octena kiselina kao potencijalni prekursori 2-AAP-a. Na slici 2.12 prikazan je potencijalni mehanizam nastajanja 2-AAP. Intenzitet UTA-e se pojačava ukoliko je vino proizvedeno od grožđa koje je bilo izloženo suši ili prekomjernoj opskrbi dušikom, kao i uslijed prevelike rodnosti ili preranog

roka berbe. Isti autori tvrde da je isključivo slobodni oblik IAA odgovoran za sintezu 2-AAP, s obzirom da nije zabilježena korelacija s esterificiranim ili s amidinim oblikom IAA.

Hoenicke i suradnici¹³⁴ navode da je u moštovima kultivara Kerner izmjereno manje od 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ slobodne IAA, dok je razina vezane IAA bila značajno viša: od 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 120 $\mu\text{g L}^{-1}$. U odgovarajućim vinima iste sorte izmjerena je značajno viša razina slobodne IAA (od 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) te niža razina vezanog oblika IAA ($\leq 40 \mu\text{g L}^{-1}$). Autori ovakvo stanje tumače ili neosinteza slobodne IAA od strane kvasca ili hidrolizom vezane IAA tijekom fermentacije. Ipak, ukupna koncentracija IAA (slobodne i vezane) u moštu i vinu bila je slična.

Istraživanja istih autora nadalje su pokazala da je ukupna koncentracija IAA bila viša u moštu i vinu kasnijih rokova berbe, ali je razina slobodne IAA bila niža. UTA se pojavila u vinima ranog roka berbe, ali ne i u vinima kasnog roka berbe. Pojava UTA-e nije povezana s višim razinama prekursora IAA u moštu ili vinu.

Linsenmeier i suradnici¹³⁶ proučavali su u vinima proizvedenim između 1996. i 1999. godine povezanost koncentracija 2-AAP s dušičnom gnojdbom. Dušična gnojdba povećava razine 2-AAP u vinu.

Mattivi i suradnici¹³⁷ pratili su razine slobodne IAA u vinima kultivara Chardonnay s dva različita lokaliteta različite kvalitete tla. Masene koncentracije slobodne IAA bile su se između 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 58 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Važno je napomenuti da UTA još uvijek nije detektirana u crnim vinima, što navodi na zaključak da polifenoli u crnom vinu sprječavaju oksidacijsku razgradnju IAA. Prema literaturi, samo su Creasy i suradnici¹³⁸ određivali IAA u crnim vinima, a srednje vrijednosti masenih koncentracija bile su oko 838,3 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Antioksidansi, pogotovo hvatači superoksidnih radikala, mogu smanjiti tendenciju nastajanja UTA-e. Gessner i suradnici¹³⁹ pokazali su da je nastajanje 2-AAP iz IAA smanjeno nakon dodatka fenolnih sastavnica u mošt prije alkoholne fermentacije.

Točni mirisni prag detekcije 2-AAP u vinu teško je definirati (otprilike od 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) s obzirom da na miris može utjecati i neka druga komponenta maskirajući pritom miris UTA-e. Jake voćne arome u mladim vinima mogu maskirati miris 2-AAP.¹³⁶

2.6.1. Određivanje indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona

Uz triptofan i ostale metabolite triptofana, IAA se najčešće određuje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza. Uzorak vina ili mošta prethodno se pročišćava pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi uz anionske izmjenjivače ili na sorbensu C₁₈. Postupak ekstrakcije na anionskom izmjenjivaču sastoji se od kondicioniranja kolonice ispiranjem s metanolom i smjesom octene kiseline, acetonitrila i vode, nanošenja uzorka koji je prethodno zalužen do pH 7 te eluiranja neutralnih komponenti poput triptofana smjesom acetonitrila i vode, a zatim kiselih komponenti koje uključuju IAA smjesom octene kiseline i acetonitrila. Eluat se analizira HPLC-om na C₁₈-koloni, najčešće uz UV ili fluorescencijski detektor. Indoli obično pokazuju dva apsorpcijska maksimuma, na $\lambda=219$ nm i $\lambda=279$ nm. Zbog prirodnog svojstva IAA da fluorescira, puno osjetljivijom pokazala se detekcija FLD-om pri valnim duljinama $\lambda_{ex}=225$ nm i $\lambda_{em}=365$ nm. Mattivi i suradnici¹³⁷ razvili su metodu određivanja IAA, triptofana, triptofola, skatola i drugih indola u vinu uz prethodno frakcioniranje uzorka primjenom SPE. Usporedili su djelotvornost ekstrakcije analita na polistiren-divinilbenzenskim i C₁₈ sorbensima. Polimerni sorbensi pokazali su se puno boljima zbog toga što uzorak vina nije bilo potrebno prethodno razrjeđivati kako bi se smanjio sadržaj alkohola. Analiti su eluirani smjesom fosfatnog pufera i metanola u volumnom omjeru 1:1.

U laboratoriju za grožđe, mošt i vino Agronomskog fakulteta u Zagrebu razvijena je metoda određivanja IAA i triptofana u vinu ekstrakcijom na sorbensu MAX (engl. *Mixed mode Anion exchange*, MAX) mješanoj čvrstoj fazi koju čini anionski izmjenjivač i *N*-vinilpirolidin-divinilbenzenski kopolimer. Nakon kondicioniranja kolone s metanolom i vodom i propuštanja uzorka, ispiranjem sorbensa s 5 %-tnom otopinom amonijaka uklanjaju se interferencije. Triptofan se eluira metanolom, a IAA eluira 2 %-tnom mravljom kiselinom u metanolu (v/v).

Dollman i suradnici¹⁴⁰ kvantificirali su IAA u moštu uz unutarnji standard ¹³C₆-indol-3-octenu kiselinu označen izotopom. U uzorak mošta, neposredno prije SPE na sorbensu C₁₈, dodan je unutarnji standard. Identifikacija i kvantifikacija IAA provedena je sustavom HPLC-ESI-MS/MS. Ta se metoda pokazala izuzetno osjetljivom i selektivnom.

Analiza 2-AAP u vinu zahtjevana je zbog složenosti matrice i vrlo niskih koncentracija. Svega nekoliko istraživačkih skupina određivalo je 2-AAP u vinu. Taj se spoj zbog svoje termičke stabilnosti i dovoljne hlapivosti određuje plinskom kromatografijom, kojoj prethodi ekstrakcija analita i pročišćavanje ekstrakta. Ekstrakcija je ključni korak analize. Devedesetih godina prošlog stoljeća te početkom ovog stoljeća primjenjivana je ekstrakcija tekuće-tekuće s otapalima poput triklorfluorometana, *n*-pentana, diklormetana te smjesa *n*-pentana i diklormetana u različitim volumnim omjerima.

Schmarr i suradnici¹⁴¹ primijenili su SPE na sorbensu etilvinilbenzen-divinilbenzen kopolimeru (Lichrolut EN). Volumen od 50 mL vina propustili su kroz prethodno kondicionirani sorbens, a zatim eluirali analit s 1 mL diklormetana. Eluat je ispran otopinom natrijeva hidrogenkarbonata te sušen na natrijevu sulfatu.

Košmerl i suradnici¹⁴² primijenili su za određivanje 2-AAP u vinu ekstrakciju miješalom na koje je nanesen sloj sorbensa (engl. *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE). SBSE tehnika se sastoji od postupka ekstrakcije i desorpcije. Ekstrakcija se provodi izravnim uranjanjem magnetskog miješala presvučenog polimerom PDMS, u otopinu ili izlaganjem miješala parama iznad otopine. Desorpcija može biti termička ili otapalom. Termička desorpcija isključuje upotrebu otapala te se najčešće korisiti u plinskokromatografskoj analizi uz termičko-desorpcijsku jedinicu koja je vrlo skupa.¹⁴³ Postupak određivanja 2-AAP koji su koristili Košmerl i suradnici¹⁴² sastojao se od direktnog uranjanja miješala u zaluzeno vino i desorpcije analita u termičko-desorpcijskoj jedinici.

Od modernijih tehnika ekstrakcije, koristi se mikroekstrakcija na čvrstoj fazi. Tehnika uključuje izlaganje vlakna presvučenog tankim filmom čvrste faze parama iznad otopine uzorka ili izravno uranjanje vlakna u otopinu. Vlakno je najčešće načinjeno od je taljenog silicijevog dioksida i presvučeno tankim filmom jedne ili više polimernih faza. Postupak uključuje dva koraka: raspodjelu analita između ekstrakcijske faze na vlaknu i uzorka te desorpciju analita s vlakna. SPME se rutinski koristi u kombinaciji s plinskom kromatografijom za određivanje hlapljivih i poluhlapljivih organskih sastavnica u uzorcima hrane. Prednosti SPME tehnike su brzina ekstrakcije, nekorištenje organskih otapala te poboljšanje razina detekcije.^{144, 145}

Fan i suradnici¹⁴⁶ primijenili su SPME za određivanje 2-AAP u vinu. Postupak se sastojao od izravnog uranjanja vlakna u vino te analize sustavom GC-MS.

U zadnje vrijeme sve se češće u analizi mirisa koristi metoda izotopnog razrjeđenja koja značajno pridonosi pouzdanosti kvantitativnih rezultata s obzirom na identična kemijsko-fizička svojstva analita i izotopom obilježenog unutarnjeg standarda.¹⁴⁷ U analizi 2-AAP koristi se d_3 -AAP kao unutarnji standard koji se dodaje u vino neposredno prije postupka ekstrakcije.

Za analizu 2-AAP-a plinskom kromatografijom upotrebljavaju se nepolarne kolone sa nepokretnom fazom poput 5% fenil- 95 % dimetil-polisiloksana stacionarne faze i polarne kolone u kojima je nepokretna faza 100% polietilen-glikol. Temperaturni program zagrijavanja plinskokromatografske kolone najčešće uključuje nekoliko koraka s različitim brzinama porasta temperature.

Schmarr i suradnici¹⁴¹ primjenili su za analizu 2-AAP u vinu tehniku višedimenzijsku plinsku kromatografiju koja značajno poboljšava razlučivanje analita kvantitativnim i ponovljivim prijenosom malih frakcija pokretne faze s nerazdvojenim spojevima iz prve u drugu kolonu na kojoj se njihovo razdvajanje poboljšava. Prva je kolona bila polarna, a druga nepolarna te je na taj način 2-AAP uspješno odvojen od interferirajućih spojeva u vinu poput laktone.

Prilikom plinskokromatografskog određivanja 2-AAP u vinu koristi se spektrometar masa uz praćenje odabranih iona (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM) i detektori selektivni za spojeve dušika kao što su dušik-fosfor i kemiluminiscencijski detektor.

2.7. Biološki učinci vina

2.7.1. Vino i zdravlje

Već od davnih vremena vino je cijenjeno kao „najzdravije i najhigijenskiije” piće (Pasteur). Naime, vino ima baktericidno djelovanje, što je bilo od izrazite važnosti u vremenima kad izvori pitke vode nisu mogli biti mikrobiološki provjeravani. Dokazano je da umjerena konzumacija vina blagotvorno djeluje na funkcioniranje dišnih organa, srca i krvotoka te da pospješuje probavu i pridonosi boljem iskorištenju hrane u probavnom traktu.¹⁴⁸

Početkom ranih devedesetih godina prošlog stoljeća mediji su popratili „francuski paradoks” i time popularizirali prednosti konzumacije crnog vina u SAD-u te potaknuli znanstvenike da istraže i objasne nove poveznice između vina i zdravlja. „Francuski paradoks” temeljen je na epidemiološkim studijama koje su pokazale niže stope oboljenja od bolesti srca i krvožilnog sustava u Francuskoj, unatoč konzumaciji visoke razine zasićenih masti u tradicionalnoj prehrani. Umjerena dnevna konzumacija crnog vina smatra se objašnjenjem tog paradoksa.¹⁴⁹

Umjerena dnevna konzumacija vina povezana je s blagotvornim učincima na homeostazu lipida. Vino povišuje razine HDL-kolesterola (engl. *High Density Lipoproteins*, HDL) u organizmu koji je važan za oslobađanje tijela od viška kolesterola. Vino snižava razine LDL-kolesterola (engl. *Low Density Lipoproteins*, LDL) što je povezano s prehranom namirnicama visokog udjela masti. Konzumacija vina uz obrok smatra se idealnom jer se kolesterol uklanja iz tijela prije njegovog transporta na neželjene lokacije u tijelu.¹⁵⁰

Promjene upalnih biomarkera u ljudskom tijelu sugeriraju da je crno vino sposobno štititi od mnogih poremećaja u imunostavu, stimulirajući urođene i stečene imuno odgovore te reducirajući upalu.

Mehanizmi odgovorni za učinke vina na zdravlje vrlo su kompleksni. Alkohol i polifenolne sastavnice vina istraživani su vrlo iscrpno te postoje mnoge rasprave na temu koja je komponenta bitnija. U svjetskoj literaturi dobro je dokumentirano da umjereno uzimanje alkoholnih pića pozitivno utječe na antioksidanse, lipide i trombocite. Pojedine studije pokazale su da vino ima korisna svojstva neovisno o sadržaju alkohola te da su ona povezana s polifenolima.^{151,152} Poznato je da polifenoli mogu biti antioksidansi. Cano i suradnici¹⁵³

istraživali su antioksidacijsku aktivnost indolnih sastavnica u vodenom i alkoholnom mediju. Istraživanje je pokazalo da indol-3-octena kiselina i njezini derivati mogu u vinu također imati antioksidacijsku ulogu.

2.7.2. Antioksidansi

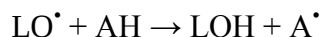
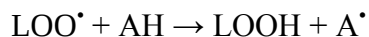
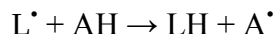
Radikali su atomi ili skupine atoma koje posjeduju nespareni elektron. Radikali oštećuju različita mjesta u stanici (membrane, citoplazmu i jezgru). Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog nastajanja radikala kisika ili dušika, pri čemu se narušava ravnoteža između nastajanja radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi što rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica.

Glavni reaktivni spojevi kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivni spojevi dušika (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) koji uzrokuju oštećenje glavnih makromolekula u fiziološkom i hranidbenom sustavu su:

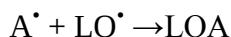
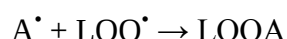
- 1.) superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$)
- 2.) vodikov peroksid (H_2O_2)
- 3.) peroksilni radikal ($ROO^{\bullet}$)
- 4.) hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$)
- 5.) singletni kisik (1O_2)
- 6.) peroksinitrit ($ONOO^-$)
- 7.) nitrozil-kation (NO^+)
- 8.) dušikasta kiselina (HNO_2)
- 9.) dušikov(II) oksid ($NO^{\bullet}$)
- 10.) dušikov(IV) oksid ($NO_2^{\bullet}$)
- 11.) alkilperoksinitrit ($ROONO$)

Antioksidansi su molekule koje reagiraju s radikalima i tako prekidaju lančane reakcije koje mogu oštetiti vitalne stanične molekule. Antioksidansi se mogu podijeliti u dvije skupine: primarne tj. one koji prekidaju lančane reakcije i sekundarne ili preventivne. Sekundarni antioksidansi su molekule koje usporavaju oksidaciju. To se može postići na različite načine, primjerice uklanjanjem supstrata ili „gašenjem” singletnog kisika. Primarni antioksidansi, kad su prisutni u tragovima, mogu odgoditi ili inhibirati korak inicijacije reagirajući s lipidnim

radikalom ili inhibirati propagacijski korak reagirajući s peroksilnim ili alkoksilnim radikalom:



Radikal nastao od antioksidansa može dalje interferirati s lančanim propagacijskim reakcijama praveći pritom peroksi antioksidans:



Djelotvornost antioksidansa povećava se sa smanjenjem jakosti veze A—H.

2.7.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti polifenola

U posljednjih dvadeset godina enormno je porastao interes za istraživanje antioksidansa u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Na Prvom međunarodnom kongresu o metodama određivanja antioksidansa (*First International Congress on Antioxidant Methods*), održanom 2004. godine u Orlando na Floridi predloženo je da se razmotri standardizacija sljedećih triju metoda: ORAC-metode, TEAC-metode i Folin-Ciocalteuove metode. ORAC-metoda predstavlja reakcijski mehanizam prijenosa vodika, najčešćeg u biologiji čovjeka. Folin-Ciocalteuova metoda i TEAC-metoda temeljene su na prijenosu elektrona.¹⁵⁴ U posljednje vrijeme razvijene su visokorezolucijske metode za brzo određivanje antioksidansa u multikomponentnoj matrici. Najčešće se koriste obojeni, relativno stabilni radikali poput 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (engl. *DiPhenylPicrilHydrasil*, DPPH) i 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (engl. *2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzThiazoline-6-Sulphonic acid*, ABTS), koji se dodaju u pokretnu fazu na izlazu iz tekućinskokromatografske kolone te se antioksidansi detektiraju smanjenjem apsorbanije u vidljivom dijelu spektra, uzrokovane provođenjem radikala u bezbojan reducirani oblik.¹⁵⁵ Metode koje se najčešće koriste u analizi vina su: TBARS-metoda (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*, TBARS), TEAC-metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC), DPPH-

metoda, ORAC-metoda (engl. *Oxygen-Radical Absorbing Capacity*, ORAC), Folin-Ciocalteuova metoda i PCL-metoda (engl. *PhotoChemiLuminescence*, PCL)

TBARS-metoda

Tiobarbiturna kiselina kao reaktivna supstancija najčešće se koristi u testiranju lipidne peroksidacije. Kao rezultat lipidne peroksidacije nastaje malondialdehid koji reagira s tiobarbiturnom kiselinom praveći ružičasti pigment s apsorpcijskim maksimumom na $\lambda=532$ nm. Reakcija nije specifična. Mnoge druge komponente uključujući ugljikovodike, proteine, saharozu i ureu mogu reagirati s tiobarbiturnom kiselinom. Jardine i suradnici¹⁵⁵ su prvi istraživali glavne produkte TBARS reakcije LC-MS-om. Linolenska kiselina poslužila je kao model lipida, a oksidacija je izazvana Cu^{2+} -ionima. Nastali ružičasti pigment kondenzacijski je produkt tiobarbiturne kiseline i malondialdehida u molarnom omjeru 2:1.

TEAC-metoda

Tijekom posljednjih dvadeset godina, testiranje antioksidacijskog kapaciteta izraženog u ekvivalentima troloksa, najčešće se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti *in vitro*. Miller i suradnici¹⁵⁶ su 1993. godine razvili ovu metodu za praćenje antioksidacijskog statusa u nedonoščadi. Koristili su aktivnost peroksidaze u metmioglobinu za oksidaciju 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline (ABTS) u prisutnosti vodikovog peroksida i pri tome se formirao dugo živi radikal kation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s apsorpcijskim maksimumima na $\lambda=650$ nm, 734 nm i 820 nm. U prisutnosti antioksidansa reducens i donora vodika, apsorbanacija $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se smanjuje. Za standardizaciju metode autori su koristili Trolox, analog vitaminu E, topljiv u vodi. Apsorbanacija je mjerena na $\lambda=734$ nm nakon točno šest minuta nakon početka oksidacije. U ovoj reakciji preklapaju se dva mehanizama. Neki antioksidansi odgađaju nastajanje $\text{ABTS}^{\bullet+}$, drugi „gase” nastali radikal-kation, a neki su sposobni i jedno i drugo. Alonso i suradnici razvili su metodu temeljenu na ubrzanoj elektrokemijskoj oksidaciji ABTS-a. Konstantne struje od 10 mA primijenjene su na smjesu uzorka i otopine ABTS-a te su konstantno bilježene apsorbanacije na $\lambda=414$ nm i $\lambda=734$ nm. Ključni trenutak testa je početak oksidacije ABTS-a. U tom trenutku pojavljuju se u spektru radikal-kationa $\text{ABTS}^{\bullet+}$ apsorpcijski maksimum na $\lambda=414$ nm i $\lambda=734$ nm te omjer apsorbanacija izmjerenih na valnim duljinama tih maksimuma postaje konstantan. TEAC-metoda najčešće se koristi pri

ispitivanju antioksidacijske aktivnosti alkoholnih i bezalkoholnih pića, a može se primijeniti i na lipofilne antioksidanse uz male modifikacije pripreve otopine ABTS-a.

DPPH-metoda

Radikal DPPH[•] ima apsorpcijski maksimum na $\lambda=515$ nm, koji nestaje nakon redukcije s antioksidansom. Antioksidacijska aktivnost definira se kao količina potrebnog antioksidansa da smanji početnu koncentraciju DPPH[•] na 50 %.

$$EC_{50} = \frac{AO \text{ (mol L}^{-1}\text{)}}{DPPH^{\bullet} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}}$$

Snaga antioksidansa (engl. *AntiRadical Power*, ARP) se definira kao $1/EC_{50}$.¹⁵⁷ Bandoineen i suradnici¹⁵⁸ razvili su metodu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH-metodom on-line pomoću HPLC-a. Nakon separacije polifenola u sustavu obrnutih faza i UV-detekcije analita na $\lambda=280$ nm započinje poslijekolonska reakcija s otopinom DPPH[•] u metanolu. Nestajanje DPPH[•] detektira se kao negativni pik na $\lambda=515$ nm. Duljina kapilare za poslijekolonsku reakciju i protok reagensa prilagođeni su tako da se postigne vrijeme reakcije od 0,6 minuta.

ORAC-metoda

ORAC-metodom mjeri se inhibicija oksidacije peroksilnog radikala antioksidansom čime se prekida lančana reakcija prijenosom H-atoma. Peroksilni radikal reagira s fluorescirajućim reagensom formirajući pritom nefluorescirajući reagens. U početku se kao reagens koristio B-fikoeritrin, protein izoliran iz crvene alge vrste *Porphyridium cruentum*, ali je zbog svojih nedostataka poput nekonzistentnih rezultata, fotoosjetljivosti prilikom izlaganja ekscitacijskom svjetlu te vezivanja proantocijanidina nespecifičnim proteinskim vezivanjem, u današnje vrijeme zamijenjen s fluoresceinom ili diklorfluoresceinom.

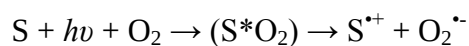
Folin-Ciocalteuova metoda

Folin Ciocalteuova metoda poznata je još od 1927. godine i prvotno je bila namjenjena za analizu proteina. Singleton i Rossi⁹³ su je šezdesetih godina primijenili za određivanje

ukupnih fenola u vinu. U današnje vrijeme koristi se i kao standardizirana metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Glavni mehanizam su oksido-redukcijske reakcije te se mjeri reducirajući kapacitet uzorka.

PCL-metoda

Fotokemiluminiscencijska metoda (engl. *PhotoChemoLuminescence*, PCL) temelji se na fotokemijskom generiranju radikala u kombinaciji s osjetljivom detekcijom pomoću kemiluminiscencije. Reakcija se inducira optičkom ekscitacijom s fotosenzibilizatorom S što rezultira generiranjem superoksidnih radikala $O_2^{\bullet-}$



Radikali se vizualiziraju s kemiluminscencijskim reagensom, luminolom koji ujedno služi i kao fotosenzibilizator. Potpuni mehanizam nije do kraja poznat.¹⁵⁴ Reakcija se provodi pomoću instrumenta Photochema[®] tvrtke Jena, Njemačka.

Materijali i metode

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije, instrumenti i pribor

Kemikalije

- Kemikalije stupnja čistoće *pro analysi*: natrijev karbonat, kalijev peroksodisulfat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, 25 %-tni amonijak, 36,5 %-tna klorovodična kiselina, 96 %-tni etanol, 96 %-tna sumporna kiselina, volumetrijska otopina natrijevog hidroksida 1 mol dm⁻³, dietil-eter i etil-acetat proizvodi su Kemike, Zagreb.
- Kemikalije stupnja čistoće *puriss.*: 85%, -tna *ortho*-fosforna kiselina, L-(+)-vinska kiselina, mravlja kiselina i amonijev acetat nabavljeni su od tvrtke Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka.
- Natrijev metabisulfit i 99 %-tni vanilin proizvodi su tvrtke Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD.
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) je od tvrtke Sigma, St. Louis, MO, SAD.
- 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil proizvod je tvrtke Aldrich, St. Louis, MO, SAD.
- 5-Amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindion proizvod je tvrtke Acros Organics, Geel, Belgija.
- Otapala HPLC čistoće: metanol i acetonitril pribavljeni su od tvrtke J. T. Baker, Deventer, Nizozemska.
- Helij visoke čistoće, 5.0 (99,999 %) proizvod je tvrtke Messer Croatia plin, Zagreb.

Standardi

- Delfinidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-glukozid, peonidin-3-O-glukozid, malvidin-3-O-glukozid, epigalokatehin, procijanidin B1, procijanidin B2, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-3-O-galaktozid i miricetin nabavljeni su od tvrtke Extrasynthese iz Genay Cedex, Francuska.
- Kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *trans*-ferulinska kiselina, kaftarna kiselina, *trans*-cimetna kiselina, (-)-epikatehin, (+)-katehin, epikatehin galat, *trans*-resveratrol, 2-aminoacetofenon te 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina proizvodi su tvrtke Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD.

- Kemferol, izoramnetin, kvercetin proizvodi su tvrtke Fluka, Steinheim, Njemačka
- Kvercetin-3-O-glukozid, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, galna kiselina, indol-3-octena kiselina proizvodi su tvrtke Sigma, St. Louis, MO, SAD.
- 2-Nitroacetofenon proizvod je tvrtke Merck, Darmstadt, Njemačka.

Instrumenti i pribor

- Spektrofotometar „Specord 400”, AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s automatskim uzorkivačem „Agilent 1100” opremljen detektorom s nizom dioda i fluorescencijskim detektorom serije Agilent 1200, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD
- Plinski kromatograf „HP 6890” vezan sa spektrometrom masa „Agilent 5973N”, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD
- Analitička vaga Sartorius CP225D, Sartorius, Goettingen, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj „Sonorex RK 100H”, Bandelin, Berlin, Njemačka
- Rotacioni uparivač „HEI-VAP Advantage”, Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka
- Vakuumska stanica za ekstrakciju na čvrstoj fazi za deset uzoraka, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD
- Držač vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Aluminijsko postolje za posudice za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Magnetna mješalica „RCT basic”, IKA, Staufen, Njemačka
- 50/30µm DVB/CAR/PDMS, 2 cm vlakno za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Membranski filtri od PTFE veličine pora 0,22 µm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Vodena kupelj „WBU 45”, Memmert, Schwabach, Njemačka
- Sustav za filtriranje mobilne faze, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD
- Membranski filtri, celulozni, za filtriranje mobilne faze, veličine pora 0,45 µm, Advantec, Japan
- pH-metar „Lab 850”, Schott Instruments, Mainz, Njemačka

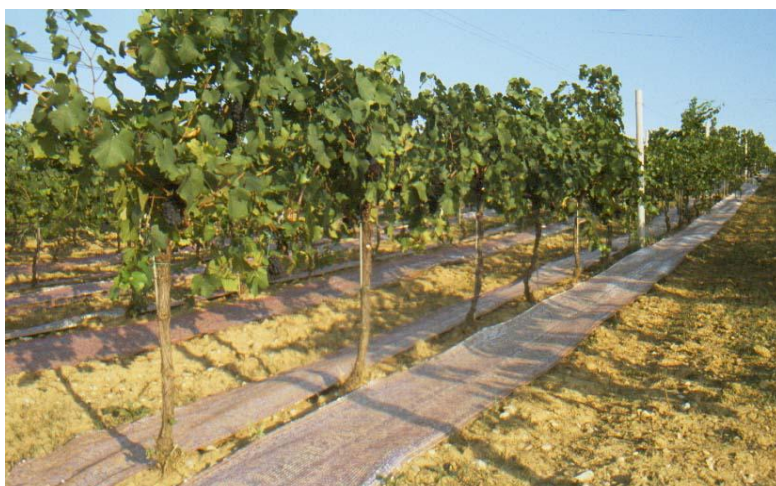
- kolonice za ekstrakciju na čvrstoj fazi trgovačkih naziva Oasis MAX (3 mL/60 mg), Oasis HLB (3 mL/60 mg) tvrtke Waters, Milford, MA, SAD, Strata X (6 mL/ 500 mg) tvrtke Phenomenex, Torrance, CA, SAD te C₁₈ (6 mL/500 mg) i SampliQ SAX (3 mL/500 mg) tvrtke Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD.

3.2. Uzorci vina

3.2.1. Solarizacija vinove loze

Pokus je postavljen 2008. i 2009. godine na tri lokacije:

- znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, vinogorje Zagreb, regija Kontinentalna Hrvatska, podregija Prigorje-Bilogora
- u Brtonigli, vinogorje Zapadna Istra, regija Primorska Hrvatska, podregija Istra
- na položaju Rota, vinogorje Pelješac, regija Primorska Hrvatska, podregija Srednja i Južna Dalmacija.



Slika 3.1. Postavljanje Vitexol folije između trsova

Pokus je postavljen po slučajnom bloknom rasporedu u tri ponavljanja. Reflektirajuća folija crvenog plastičnog tkanja postavljena je na tlo, neposredno uz trsove sa obje strane reda u trenutku šare grožđa (slika 3.1). Kao kontrolna varijanta poslužio je dio vinograda koji nije tretiran folijom, dakle bez solarizacije. Berba je obavljena ručno, u trenutku tehnološke zrelosti grožđa. Grožđe se bralo u plastične kašete, odvojeno po repetacijama unutar tretmana, tako da je u konačnici svaki kultivar bio zastupljen s po šest uzoraka. Kasnije se grožđe isto tako odvojeno i prerađivalo. Vina bijelih i crnih kultivara na kojima je istražen utjecaj solarizacije prikazana su u tablici 3.1.

Vinifikacija crnih kultivara

Nakon muljenja i runjenja grožđa električnom muljačom-runjačom marke „Vaslin“, masulj iz svakog tretiranja smješten je u inoks tankove za mikrovinifikaciju zapremine 15 L, te je tretirano s 5 %-tnom sumporastom kiselinom tako da konačna masena koncentracije slobodnog sumporovog dioksida iznosi 50 mg L⁻¹. Uzorci mošta za analizu uzeti su odmah nakon muljanja i runjenja grožđa. Nakon 24 sata masulj je inokuliran selekcioniranim sojem kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* Lallemend 245 tvrtke Lallemend, Kanada, te je pokrenuta alkoholna fermentacija. Istovremeno s fermentacijom odvijala se i maceracija u trajanju od osam dana, na temperaturi od 25 °C do 28 °C. Nakono sam dana masulj je isprešan pomoću ručne mehaničke preše, a alkoholna fermentacija se nastavila do trenutka kad je sav šećer profermentirao. Uzorci vina za analize uzimani su 24 sata nakon završetka alkoholne fermentacije i pohranjeni do provedbe analiza na -20 °C.

Vinifikacija bijelih kultivara

Na bijelom grožđu je provedena tradicionalna vinifikacija za bijela vina. Nakon muljanja i runjanja, masulj je ocijeđen na košu pneumatske preše. Taloženje samotočne frakcije mošta odvijalo se na temperaturi od 15 °C, u trajanju od 24 sata uz sulfitiranje s 5 %-tnom sumporastom kiselinom do konačne masene koncentracije slobodnog sumporovog dioksida od 50 mg L⁻¹. Nakon toga pokrenuta je alkoholna fermentacija selekcioniranim sojem kvasca EC1118 (*Saccharomyces cerevisiae*) u staklenim bocama od 10 L.

Tablica 3.1. Uzorci vina bijelih i crnih kultivara na kojima je primijenjena tehnika solarizacije

Kultivari	Položaj	Godina berbe
<u>Bijeli kultivari</u>		
Graševina	Jazbina	2008.
Traminac	Jazbina	2008.
Manzoni	Jazbina	2008.
<u>Crni kultivari</u>		
Pinot crni	Jazbina	2008.
Cabernet Sauvignon	Jazbina	2009.
Merlot	Jazbina	2008.
Teran	Brtonigla	2009.
Plavac mali	Pelješac	2009.

3.2.2. Utjecaj kvasaca na pojavu netipične arome starenja u uzorcima vina Rizling rajnski

Eksperiment je proveden 2009. godine na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta u Zagrebu, Zagrebačko vinogorje, regija Kontinentalna Hrvatska. Na grožđu je provedena tradicionalna vinifikacija za bijela vina. Taloženje samotočne frakcije mošta odvijalo se na temperaturi od 15 °C, u trajanju od 24 sata uz sulfitiranje s 5 %-tnom sumporastom kiselinom do konačne masene koncentracije slobodnog sumporovog dioksida od 50 mg L⁻¹. Nakon toga pokrenuta je fermentacija u staklenim bocama od 10 L s četiri različita soja komercijalnih kvasaca: Uvaferm CEG (*Saccharomyces cerevisiae*), Lalvin Cross Evolution (*Saccharomyces cerevisiae*), Anchor VIN 13 (*Saccharomyces cerevisiae* hibrid), Anchor Exotics SPH (*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces paradoxus* hibrid). Svi su kvasci nabavljeni od tvrtke Lallemmand, Kanada. Svaka fermentacija praćena je bez dodatka i uz dodatak 0,3 g L⁻¹ amonijevog sulfata kao hrane za kvasce. Svaki tretman proveden je u tri ponavljanja. Po završetku fermentacije obavljen je pretok uz sulfitiranje. Popis uzoraka prikazan je u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Popis uzoraka vina Rizlinga rajnskog tretiranih s različitim sojevima kvasaca i dodatkom hranjiva $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (svi tretmani su u tri ponavljanja)

Uzorci vina Rizling rajnskog	Tretman
RR A	Uvaferm CEG (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
RR B	Uvaferm CEG (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
RR C	Cross Evolution (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
RR D	Cross Evolution (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
RR E	Anchor VIN 13 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hibrid)
RR F	Anchor VIN 13 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hibrid) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
RR G	Anchor Exotics SPH (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces paradoxus</i> hibrid)
RR H	Anchor Exotics SPH (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces paradoxus</i> hibrid) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, flavan-3-ola i antocijana u vinu te antioksidacijske aktivnosti vina

3.3.1. Priprava standardnih otopina

Standardne otopine galne kiseline, (+)-katehina i malvidin-3-*O*-glukozida poslužile su za izradu baždarnih krivulja za određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavan-3-ola odnosno ukupnih antocijana. Standardi su pripremljeni otapanjem izvaganih masa pojedinih spojeva u 12 %-tnoj otopini etanola u vodi (v/v). Standardna otopina Troloxa poslužila je za izradu baždarne krivulje za određivanje antioksidacijske aktivnosti vina ABTS-om (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH-om (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Otopina Troloxa pripravljena je otapanjem izvagane mase u metanolu.

U tablici 3.3 prikazane su masene odnosno množinske koncentracije standardnih otopina koje su poslužile za izradu baždarnih krivulja. Rasponi množinskih koncentracija standardnih otopina Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS-om i DPPH-om bili su različiti.

Tablica 3.3. Koncentracije standardnih otopina za izradu baždarnih krivulja za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, flavan-3-ola i antocijana u vinu te antioksidacijske aktivnosti vina

Spoj	$\gamma/\text{mg L}^{-1}$	$c/\mu\text{mol L}^{-1}$
Galna kiselina	50 do 500	
(+)-Katehin	10 do 100	
Malvidin-3-O-glukozid	50 do 500	
Trolox (DPPH)		40 do 400
Trolox (ABTS)		200 do 800

3.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Odpipetira se alikvot uzorka vina od 1 mL i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju se doda 60 mL destilirane vode i 5 mL Folin-Ciocalteuovog reagensa. Reakcijska smjesa miješa se točno 8 minuta i 30 sekundi te se nakon toga doda 20 mL Na_2SO_4 ($\gamma = 200 \text{ g L}^{-1}$). Otopina se razrijedi do 100 mL s vodom i ostavi stajati u vodenoj kupelji na 20°C 2 sata. Apsorbancija se mjeri na $\lambda = 765 \text{ nm}$. Kao rezultat, uzima se njihova srednja vrijednost triju uzastopnih mjerenja. Rezultat se izražava u ekvivalentima galne kiseline, GAE/ mg L^{-1} . Crna se vina razrjeđuju s destiliranom vodom u volumnom omjeru 1:5 te se krajnji rezultat množi s faktorom razrjeđenja 5.

3.3.3. Određivanje ukupnih flavan-3-ola

Odpipetira se alikvot uzorka vina od 3 mL i prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL u koju se doda 10 mL $11,5 \text{ mol L}^{-1}$ HCl i 5 mL 1 %-tne otopine vanilina u etanolu (v/v). Otopina se nadopuni do 25 mL s 96 %-tnim etanolom i ostavi stajati 20 minuta. Apsorbancija se mjeri na $\lambda = 500 \text{ nm}$. Kao rezultat, uzima se njihova srednja vrijednost triju uzastopnih mjerenja. Rezultat se izražava u ekvivalentima (+)-katehina, CAE/ mg L^{-1} . Crna se vina razrjeđuju s destiliranom vodom u volumnom omjeru 1:10 te se krajnji rezultat množi s faktorom razrjeđenja 10.

3.3.4. Određivanje ukupnih antocijana

Odpipetira se alikvot uzorka vina od 1 mL i prenese u epruvetu u koju se doda 1 mL 0,1 %-tne HCl u 96 %-tnom etanolu (v/v) i 20 mL 2%-tne HCl u vodi (v/v). Otopina se podijeli u dvije epruvete tako da se u svaku doda 10 mL. U prvu se epruvetu s otopinom doda 4 mL vodene otopine natrijevog bisulfita ($\gamma=150 \text{ g L}^{-1}$), a u drugu 4 mL destilirane vode. Apsorbancije obaju uzoraka mjere se nakon 20 minuta na valnoj duljini od 520 nm. Apsorbancije uzorka bez dodatka natrijevog metabisulfita oduzima se od apsorbancije uzorka koji je reagirao s natrijevim metabisulfitom te se iz te razlike prema baždarnoj krivulji izračunava masena koncentracija ukupnih antocijana. Rezultat se izražava u ekvivalentima malvidin-3-O-glukozida, MAE/ mg L^{-1} .

3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS- metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka vina pripravi se otopina radikala $\text{ABTS}^{+\cdot}$, oksidacijom 7 mmol L^{-1} vodene otopine reagensa ABTS s 140 mmol L^{-1} otopinom kalijevog peroksodisulfata, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$. Za pripravu izvorne reakcijske otopine potrebno je $88 \text{ }\mu\text{L}$ otopine kalijevog peroksodisulfata koncentracije 140 mmol L^{-1} nadopuniti s otopinom reagensa ABTS koncentracije 7 mmol L^{-1} do volumena od 5 mL. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1: 0,5, oksidacija nije potpuna te je stoga pripremljenu otopinu potrebno držati u mraku i ostaviti 12 do 16 sati na sobnoj temperaturi. Ovako pripravljena otopina je stabilna najmanje tjedan dana pod uvjetom da se čuva u mraku pri sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize pripravi se razrijeđena otopina radikala $\text{ABTS}^{+\cdot}$ u 96 %-tnom etanolu tako da apsorbancija pri valnoj duljini od 734 nm bude $0,7 \pm 0,2$.

Alikvot od $50 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka vina pomiješa se s 5 mL otopine radikala $\text{ABTS}^{+\cdot}$ u epruveti te se nakon točno 6 minuta izmjeri apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepog uzorka koji se pripravlja tako da se umjesto uzorka pomiješa voda s istom količinom reagensa. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se razlika iz koje se prema baždarnoj krivulji određuje antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Troloxa, TEAC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH- metodom

Alikvot od 50 μL uzorka vina pomiješa se s 2 mL otopine radikala DPPH $\cdot$ koji je prethodno pripravljen otapanjem u metanolu do konačne množinske koncentracije od 0,065 mmol L $^{-1}$. Nakon 60 minuta uz mješanje pri 25 °C mjeri se apsorbancija na $\lambda=515$ nm. U slijepi uzorak se umjesto vina dodaje voda. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepog uzorka dobiva se razlika iz koje se prema baždarnoj krivulji određuje antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Troloxa, TEAC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$. Crna vina se razrjeđuju s destiliranom vodom 1:10 te se dobiveni rezultat množi s faktorom razrjeđenja 10.

3.4. Tekućinskokromatografska analiza polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u vinu

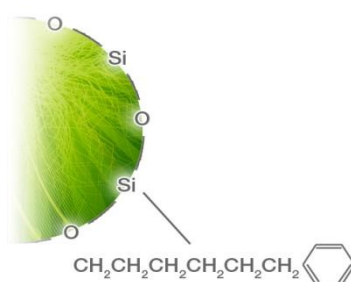
Radni uvjeti tekućinskokromatografske analize uz detektor s nizom fotodioda i fluorescencijskim detektorom bili su sljedeći:

- kolona Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex, Torrance, CA, SAD):
 - nepokretna faza: fenilne grupe vezane preko heksilnih lanaca na silikagel (slika 2.3)
 - duljina kolone: 250 mm
 - promjer kolone: 4,6 mm
 - veličina čestica: 5 μm
- temperatura kolone: 50 °C
- protok pokretne faze: 0,9 mL min $^{-1}$
- pokretna faza A: ψ (fosforna kiselina, voda)= 5: 995
- pokretna faza B: ψ (fosforna kiselina, voda, acetonitril)=5:495:500
- gradijentno eluiranje provedeno je prema programu koji je prikazan u tablici 3.4
- temperatura automatskog uzorkivača : 15 °C
- volumen injektiranog uzorka: 20 μL
- DAD: $\lambda=280$ nm, $\lambda=330$ nm, $\lambda=320$ nm, $\lambda=360$ nm, $\lambda=518$ nm
- FLD: $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm / $\lambda_{\text{em}}=320$, $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm / $\lambda_{\text{em}}=365$, $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm / $\lambda_{\text{em}}=392$ nm

Tablica 3.4. Uvjeti gradijentnog eluiranja za razdvajanje polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u ekstraktima vina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Vrijeme /min	Pokretna faza A	Pokretna faza B
	ϕ / %	ϕ / %
0	100	0
2	100	0
7	80	20
35	60	40
40	60	40
45	20	80
50	0	100
52	0	100
60	100	0
64	100	0

Kromatogrami su istovremeno bilježeni detektorom s nizom dioda pri različitim valnim duljinama i fluorescencijskim detektorom na različitim valnim duljinama ekscitacije i emisije. Istovremeno su snimljeni i UV-Vis spektri pojedinih sastavnica u rasponu valnih duljina od 200 nm do 650 nm. Identifikacija sastavnica vina provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni te pripadnih UV-Vis spektara i fluorescencije na karakterističnim valnim duljinama ekscitacije i emisije s vremenima zadržavanja, spektrima i fluorescencijom standardnih spojeva. Masene koncentracije identificiranih spojeva određene su pomoću baždarnih krivulja načinjenih analizom vanjskog standarda.



Slika 3.2. Shematski prikaz nepokretne faze u koloni Luna Phenyl Hexyl

3.4.1. Analiza polifenolnih spojeva u vinu bez prethodne obrade uzorka

Volumen od 2 mL vina profiltrira se kroz PTFE-membranski filter veličine pora 0,22 μm u tekućinskokromatografsku kolonu.

3.4.2. Postupak ekstrakcije polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz vina na čvrstoj fazi

U ovom su radu za ekstrakciju polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline testirane kolonice sa sljedećim sorbensima (tablica 3.5):

Tablica 3.5. Sorbensi testirani za ekstrakciju polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz vina na čvrstoj fazi

Komercijalni naziv kolonice	Sorbens	Dimenzije	
		Veličina čestice/ μm	Masa/mg
a) C18	Oktadecilsilicijev dioksid	50	500
b) Strata X	kopolimer <i>N</i> -vinilpirolidon-divinilbenzen	33	500
c) Oasis HLB	kopolimer <i>N</i> -vinilpirolidon-divinilbenzen	30	200
d) Oasis MAX	Mješoviti oblik anionskog izmjenjivača (kvarterni amin) i hidrofobnog kopolimera <i>N</i> -vinilpirolidon-divinilbenzen	30	150
e) SampliQ SAX	Mješoviti oblik anionskog izmjenjivača (kvarterni amin) i hidrofobnog sorbena divinilbenzena	25 do 30	500

a) Postupak ekstrakcije na oktadecilsilicijevom dioksidu (C₁₈)

Kolonica je kondicionirana ispiranjem s 3 mL metanola i 3 mL vode, a zatim je na sorbens nanosen 1 mL uzorka zakiseljenog s 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄. Potom je sorbens u kolonici ispran s 5 mL destilirane vode. Vezane fenolne sastavnice eluirane su sa sorbensa s 5 mL dietil-etera odnosno s 5 mL etil-acetata, a potom s 5 mL metanola. Eluati su upareni do suha na rotacionom uparivaču. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL pokretne faze.

b) Postupak ekstrakcije na Strata X

Kolonica je kondicionirana ispiranjem s 10 mL metanola i 10 mL vode, a zatim je na sorbens nanoseno 5 mL uzorka crnog vina ili 10 mL uzorka bijelog vina. Kolonica je potom sušena pod vakuumom 15 minuta. Analiti su sa sorbensa eluirani sa 40 mL smjese otapala $\psi(\text{acetonitril, mravlja kiselina}) = 95:5$. Eluat je uparen do suha na rotacionom uparivaču. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL smjese otapala $\psi(\text{etanol, mravlja kiselina, voda}) = 10:0,1:89,9$.

c) Postupak ekstrakcije na Oasis HLB

Kolonica je kondicionirana ispiranjem s 3 mL metanola i 3 mL vode, a zatim je na sorbens nanosen 1 mL uzorka crnog vina ili 3 mL uzorka bijelog vina. Kolonica je potom sušena pod vakuumom 15 minuta. Analiti su sa sorbensa eluirani s 40 mL smjese otapala $\psi(\text{acetonitril, mravlja kiselina}) = 95:5$. Eluat je uparen do suha na rotacionom uparivaču. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL smjese otapala $\psi(\text{etanol, mravlja kiselina, voda}) = 10:0,1:89,9$.

d) Postupak ekstrakcije na Oasis MAX

Kolonica se kondicionirala sa 3 mL metanola i 3 mL vode, a zatim je na sorbens nanosen 1 mL uzorka. Kolonica je isprana s 1 mL 25 mmol L⁻¹ amonijevog acetata. Neutralne fenolne sastavnice eluirane su sa sorbensa s 1 mL metanola, kisele s dva puta po 500 μ L 2 %-tne mravlje kiselinom u metanolu. Neutralni i kiseli ekstrakti upareni su do suha na rotacionom uparivaču, a suhi ostatak je otopljen u 1 mL smjese otapala $\psi(\text{etanol, mravlja kiselina, voda}) = 10:0,1:89,9$.

e) *Postupak ekstrakcije pomoću C18/ SAX*

Kolonica C_{18} kondicionirana je s 10 mL metanola i 5 mL vina koje je prethodno razrijeđeno zasićenom otopinom NaCl, čiji je pH=2 u volumnom omjeru 1:1. Nakon što je kolona C_{18} isprana s 1 mL zasićene otopine NaCl te s 1 mL 0,01 mol L⁻¹ HCl analiti su eluirani sa sorbensa s 0,5 mL metanola. U eluat je potom dodano 2,5 mL fosfatnog pufera te je otopina nanescena na SAX kolonu koja je prethodno isprana s 10 mL destilirane vode. Sa kolonice SampliQ SAX su potom analiti eluirani u dvije frakcije, prvu s 1 mL vode i drugu s 1 mL 1 mol L⁻¹ HCl.

3.4.3. Priprava standardnih otopina za validaciju metode određivanja polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u vinu tekućinskom kromatografijom

Priprava sintetskog vina

Odvaži se 3,5 g L-(+) vinske kiseline i prenese u odmjernu tikvicu od 1 L. Vinska kiselina otopi se u vodi, doda se 120 mL 96 %-tnog etanola i nadopuni do oznake s vodom. U otopinu se doda 1 mol L⁻¹ NaOH do pH=3,5.

Izvorne standardne otopine pojedinačnih fenolnih spojeva pripravljene su otapanjem izvagnih masa spojeva u metanolu. Standardne otopine smjese fenolnih spojeva za izradu baždarnih krivulja pripravljene su u sintetskom vinu razrjeđivanjem pojedinačnih izvornih standardnih otopina. Modelna otopina poslužila je za testiranje SPE kolonica. Rasponi masenih koncentracija polifenolih spojeva i indol-3-octene kiseline u standardnim otopinama i modelne otopine prikazani su u tablici 3.6.

3.4.3.1. Priprava otopine za određivanje analitičkog povrata polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz vina

Smjesa standarda (otopina A) pripravljena je dodavanjem 0,5 mg standarda i 1,2 mL etanola u odmjernu tikvicu od 10 mL i soniciranjem 5 minuta. Zatim je u tikvicu dodano 5 mL destilirane vode i otopina je ponovo sonicirana 5 minuta. Nakon toga otopina je dopunjena do oznake vodom. Volumen od 500 μL otopine A dopunjen je vinom u odmjernoj tikvici od 5 mL. Konačna masena koncentracija standarda u vinu bila je 5 mg L^{-1} . Za usporedbu, pripravljen je uzorak vina koji je u 5 mL umjesto 500 μL otopine A sadržavao 500 μL 12%-tne (v/v) otopine etanola.

Tablica 3.6. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u standardnim otopinama pripremljenim za određivanje linearnosti odziva detektora te u modelnoj otopini pripremljenoj za određivanje analitičkog povrata spojeva ekstrahiranih iz vina na različitim čvrstim fazama

Spoj	Standardne otopine $\gamma/\text{mg L}^{-1}$	Modelna otopina $\gamma/\text{mg L}^{-1}$
Delfinidin-3-O-glukozid	5 do 35	-
Cijanidin-3-O-glukozid	1 do 10	-
Peonidin-3-O-glukozid	1 do 25	-
Malvidin-3-O-glukozid	1 do 250	50
(-)-Katehin	1 do 100	3
(+)-Epikatehin	1 do 100	3
Epikatehin galat	1 do 100	5
Epigalokatehin	0,5 do 5	3
Procijanidin B1	1 do 20	-
Procijanidin B2	1 do 78	-
Kvercetin	0,5 do 35	7
Kvercetin-3-O-rutinozid	1 do 60	10
Kvercetin-3-O-glukozid	0,5 do 25	7
Kvercetin-3-O-galaktozid	1,6 do 16	5
Miricetin	0,5 do 20	7
Kemferol	0,5 do 5	7
Izoramnetin	0,5 do 10	7
<i>trans</i> -Resveratrol	0,5 do 25	0,5
Kaftarna kiselina	0,5 do 100	10
Kafeinska kiselina	0,5 do 10	5
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,5 do 40	7
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	0,5 do 10	5
Ferulinska kiselina	0,5 do 10	7
Galna kiselina	0,5 do 20	7
Vanilinska kiselina	0,5 do 20	7
Siringinska kiselina	0,5 do 20	7
Indol-3-octena kiselina	0,05 do 2	1

3.5. Plinskokromatografska analiza 2-aminoacetofenona u vinu

Radni uvjeti plinskokromatografske analize uz detekciju analita spektrometrijom masa bili su:

- Kapilarna kolona od taljenog silicijevog dioksida ZB-5 MS (Phenomenex, Torrance, CA, SAD):
 - Duljina kolone: 30 m
 - Unutarnji promjer kolone: 0,25 mm
 - Nepokretna faza: poli (5 % difenil - 95 % dimetilsiloksan)
 - Debljina filma nepokretne faze: 0,32 μm
- Temperaturni program kolone: programirano zagrijavanje kolone od početnih 40 °C (sa zadržavanjem 2 minute na 40 °C) do 250 °C brzinom od 6 °C min⁻¹, te izotermno na 250 °C sljedećih 10 minuta
- Temperatura injektora: 230 °C
- Plin nosilac: helij; protok 1 mL min⁻¹
- Temperatura međuspoja plinskog kromatografa i spektrometra masa: 280 °C
- Temperatura ionskog izvora: 230 °C
- Temperatura kvadrupola: 150 °C
- Desorpcija SPME-vlakna u staklenom insertu unutarnjeg promjera 0,75 mm tijekom temperaturnog programa kolone

Molekule su ionizirane elektronima (10 μA), energije 70 eV. Spojevi su mjereni praćenjem odabranih iona (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM) u različitim vremenskim razmacima. Bilježeni su ioni pri sljedećim vrijednostima m/z :

- 2-AAP: m/z 120 (dijagnostički ion) i m/z 135 (molekulski ion)
- 2-nitroacetofenon (unutarnji standard): m/z 150 (dijagnostički ion) i m/z 165 (molekulski ion)

3.5.1. Postupak mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u uzorak

Postupak mikroekstrakcije 2-AAP izravnim uranjanjem SPME-vlakna u uzorak (engl. *Direct Immersion Solid Phase Microextraction*, DI-SPME) proveden je na sljedeći način: 15 mL vina i 3 g natrijevog klorida prenese se u bočicu za ekstrakciju para iznad otopina (engl. *Headspace vial*). U bočicu s uzorkom doda se 37,5 μL otopine unutarnjeg standarda 2-nitroacetofenona ($\gamma=400 \mu\text{g L}^{-1}$). Posudica se čvrsto zatvori čepom od PTFE-septuma. Nakon 5 minuta uravnotežavanja otopine na temperaturi 30 °C uz miješanje na magnetskoj miješalici brzinom od 800 okretaja u minuti, SPME-vlakno je kroz PTFE-septum uronjeno u uzorak (slika 3.3). Nakon 45 minuta, vlakno je izvađeno iz uzorka i na sekundu uronjeno u mlaku vodu kako bi se s vlakna isprala sol. Vlakno se potom injektira u injektor plinskog kromatografa.



Slika 3.3. Prikaz tehnike DI-SPME

3.5.2. Postupak mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona na čvrstoj fazi pomognute ultrazvukom iz para iznad otopine

Postupak mikroekstrakcije 2-AAP pomognute ultrazvukom iz para iznad otopine (engl. *Ultrasound Assisted Headspace Microextraction*, UA-HS-SPME) proveden je na sljedeći način: u bočicu za analizu para iznad otopine stavi se 10 mL uzorka vina, 3,5 g natrijeva klorida i 25 μL otopine unutarnjeg standarda 2-nitroacetofenona ($\gamma=400 \mu\text{g L}^{-1}$). Bočica se uroni u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta pri temperaturi 50 °C tako da samo uzorak bude izložen ultrazvučnom polju od 35 kHz, a vlakno je izloženo parama iznad otopine uzorka. Poslije ekstrakcije, vlakno se injektira u injektor plinskog kromatografa.

3.5.3. Priprava standardnih otopina za validaciju metode određivanja 2-aminoacetofenona u vinu plinskom kromatografijom

Izvorna standardna otopina 2-AAP masene koncentracije 100 mg L^{-1} pripravljena je otapanjem izvagane mase spoja u 96 %-tnom etanolu. Izvorna otopina razrijeđena je smjesom $\psi(\text{voda, etanol})=9:1$ do masene koncentracije 2-AAP od 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Standardne otopine 2-AAP pripravljene su iz izvorne otopine razrjeđivanjem sintetskim vinom do odgovarajuće koncentracije. Raspon masenih koncentracija 2-AAP u standardnim otopinama bio je od 0,008 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP. Izvorna otopina unutarnjeg standarda 2-nitroacetofenona masene koncentracije 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ pripravljena je otapanjem izvagane mase spoja u 96 %-tnom etanolu.

3.6. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata napravljena je pomoću programa Wolfram Mathematica (verzija 4.0.1). Rezultati utjecaja solarizacije na sastav polifenola i razine indol-3-octene kiseline u vinu obrađeni su programom ANOVA (analiza varijance). Napravljena je analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) kako bi se utvrdili klasteri zapažanja i otkrila odstupanja. Regresijskom analizom ispitana je korelacija antioksidacijskih aktivnosti s polifenolnim sastavnicama.

Rezultati i rasprava

4. Rezultati i rasprava

4.1. Određivanje polifenola i indol-3-octene kiseline u vinima

U bijelim i crnim vinima iz Hrvatske, analizirane su kvalitativno i kvantitativno ukupno 32 sastavnice koje su obuhvaćale pojedinačne polifenole i indol-3-octenu kiselinu. Analize su provedene tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz UV-detektor s nizom dioda i fluorescencijski detektor.

Validacija metode obuhvatila je optimiranje tekućinskokromatografskih uvjeta: određivanje linearnosti odziva detektora, granice detekcije i granice određivanja pojedinačnih analita, njihovog analitičkog povrata te preciznosti i točnosti analitičkih rezultata.

Istražena je djelotvornost ekstrakcije polifenola i indol-3-octene kiseline na čvrstoj fazi primjenom različitih sorbensa. Optimirani su uvjeti ekstrakcije pojedinačnih sastavnica polifenola i indol-3-octene kiseline na *N*-vinilpirolidon-divinilbenzen kopolimeru. Svi istraživani spojevi eluirani su u prvoj frakciji, a polimerni polifenoli i interferirajući spojevi zaostali su na sorbensu. U dostupnoj literaturi¹¹⁶ pronađeno je da se sorbens kopolimera *N*-vinilpirolidon-divinilbenzena korisiti za ekstrakciju polimernih polifenola na čvrstoj fazi u crnim vinima, ali niti jedan postupak nije obuhvatio istovremenu ekstrakciju i koncentriranje ovako velikog broja analita.

4.1.1. Validacija metode

Redoslijed ispiranja analita s tekućinskokromatografske kolone utvrđen je analizom standardnih otopina te usporedbom njihovih vremena zadržavanja s UV-Vis-spektrima i fluorescencije pri određenim valnim duljinama ekscitacije i emisije. Razdvojeni spojevi detektirani su pomoću UV-DAD-a, pri valnoj duljini $\lambda=280$ nm kvantificirane su hidroksibenzojeve kiseline, pri $\lambda=320$ nm hidroksicimetne kiseline, pri $\lambda=330$ nm *trans*-resveratrol, pri $\lambda=360$ nm flavonoli i pri $\lambda=518$ nm antocijani. Apsorpcijski maksimum *trans*-

resveratrola je na $\lambda=308$ nm, ali je njegov molarni apsorpcijski koeficijent puno veći pri valnoj duljini od $\lambda=330$ nm. Kao dodatna potvrda, detektiran je i pomoću FLD-a pri valnoj duljini ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i valnoj duljini emisije $\lambda_{\text{em}}=392$ nm. Prema literaturnim podacima uvriježeno je da se flavan-3-oli uz UV-DAD kvantificiraju pri $\lambda=280$ nm ili pomoću osjetljivijeg FLD-a na $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm i $\lambda_{\text{em}}=320$ nm. U ovom radu postignuta je najveća osjetljivost na valnoj duljini ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i valnoj duljini emisije $\lambda_{\text{em}}=320$ nm te su flavan-3-oli kvantificirani pomoću FLD-a na navedenim valnim duljinama. Vanilinska i siringinska kiselina kvantificirane su UV-DAD-om na $\lambda=280$ nm, ali su za dodatnu potvrdu detektirane i FLD-om na valnoj duljini ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i valnoj duljini emisije $\lambda_{\text{em}}=365$ nm. Na istim valnim duljinama određivana je i indol-3-octena kiselina. U tablici 4.1 prikazan je redoslijed ispitivanja polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline s tekućinskokromatografske kolone i njihova vremena zadržavanja, apsorpcijski maksimumi u UV-Vis spektru i valne duljine na kojima su detektirani UV-DAD-om i FLD-om.

Linearnost odziva UV-DAD-a i FLD-a ispitana je analizom standardnih otopina pripremljenih u sintetskom vinu u kojima su koncentracije analita bile u rasponu koji se očekuje u uzorcima (tablica 4.2). Odziv detektora bio je za sve spojeve linearan uz koeficijente korelacije $r \geq 0,996$.

Standardi za petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-(6-acetil)-glukozid, malvidin-3-*O*-(6-acetil)-glukozid, peonidin-3-*O*-(6-*p*-kumaril)-glukozid i malvidin-3-*O*-(6-*p*-kumaril)-glukozid ne postoje na tržištu. Ovi su spojevi identificirani temeljem vremena zadržavanja i pripadnih UV-Vis spektara te specifičnom izgledu kromatograma antocijana zabilježenog na $\lambda=518$ nm pri analizi crnih vina koji su poput otiska prsta. Navedeni spojevi kvantificirani su prema malvidin-3-*O*-glukozidu te su njihove koncentracije izražene u ekvivalentima malvidin-3-*O*-glukozida.

Granica detekcije (GD) najniža je koncentracija analita za koju je odziv detektora mjerljiv. Granica određivanja (GO) najmanja je koncentracija analita koja može biti precizno određena. Statistički se granice detekcije i određivanja mogu odrediti temeljem standardne devijacije signala (s) i nagiba (a) baždarnog pravca prema jednadžbama: $GD = 3,3 s/a$, odnosno $GO = 10 s/a$.¹⁵⁹ Granice detekcije i granice određivanja ispitivanih spojeva prikazane su u tablici 4.2.

Najučinkovitije odjeljivanje ukupno 32 spoja postignuto je pri temperaturi kolone 50 °C, a analiza je trajala 65 minuta. Prednosti primjenjene fenil-heksilne kolone u odnosu na klasičnu kolonu C₁₈ su mogućnosti zadržavanja analita putem više mehanizama, a to su π - π interakcije kod preklapanja delokaliziranih elektrona analita i fenilne grupe nepokretne faze i razdjeljivanje analita između pokretne faze i hidrofobne aril-alkil-faze.

Tablica 4.1. Redosljed ispiranja analiziranih spojeva s tekućinskokromatografske kolone s pripadajućim vremenima zadržavanja i njihovim koeficijentom varijacije, valne duljine pri kojima su spojevi detektirani pomoću UV-DAD-a i FLD-a te valne duljine apsorpcijskih maksimumima u UV-Vis-spekttru

Redni broj	Spoj	Vrijeme zadržavanja/ t_R /min	CV/ % za t_R ($n=10$)	DAD λ /nm	FLD λ_{ex} / nm λ_{em} / nm	λ_{max} / nm
1.	Galna kiselina	8,9	0,52	280		272,3
2.	Delfinidin-3-O-glukozid	12,4	0,20	518		525
3.	Cijanidin-3-O-glukozid	13,5	0,21	518		530
4.	Procijanidin B1	14,4	0,20	280	225, 320	265
5.	Kaftarna kiselina	14,9	0,10	320		298, 328
6.	Epigalokatehin	15,0	0,23	280	225, 320	278
7.	Katehin	15,9	0,14	280	225, 320	277
8.	Petunidin-3-O-glukozid	16,6	0,22	518		525
9.	Kafeinska kiselina	17,7	0,56	320		298, 327
10.	Vanilinska kiselina	18,2	0,29	280	225, 365	271
11.	Procijanidin B2	19,0	0,12	280	225, 320	265
12.	Peonidin-3-O-glukozid	19,3	0,34	518		516
13.	Epikatehin	19,4	0,10	280	225, 320	277
14.	Siringinska kiselina	20,0	0,24	280	225, 365	272,3
15.	Malvidin-3-O-glukozid	20,4	0,43	518		528
16.	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	23,9	0,47	320		298,310
17.	Ferulinska kiselina	28,1	0,44	320		313
18.	Kvercetin-3-O-rutinozid	28,7	0,18	360		353
19.	Kvercetin-3-O-galaktozid	29,8	0,10	360		353
20.	Kvercetin-3-O-glukozid	30,5	0,14	360		353
21.	Peonidin-3-O-(6-acetil)-glukozid	30,7	0,30	518		525
22.	Malvidin-3-O-(6-acetil)-glukozid	31,6	0,32	518		528
23.	Epikatehin galat	30,6	0,19	280		278
24.	Indol-3-octena kiselina	34,9	0,09	280	225, 365	
25.	Miricetin	38,7	0,25	360		266, 304, 375
26.	Peonidin-3-O-(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	40,5	0,29	518		523
27.	Malvidin-3-O-(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	41,2	0,32	518		530
28.	<i>trans</i> -Resveratrol	43,4	0,08	330	225, 392	306 do 316
29.	<i>trans</i> -Cimetna kiselina	47,3	0,16	320		
30.	Kvercetin	47,8	0,20	360		254, 369
31.	Kemferol	50,1	0,15	360		265, 364
32.	Izoramnetin	50,7	0,18	360		254, 358

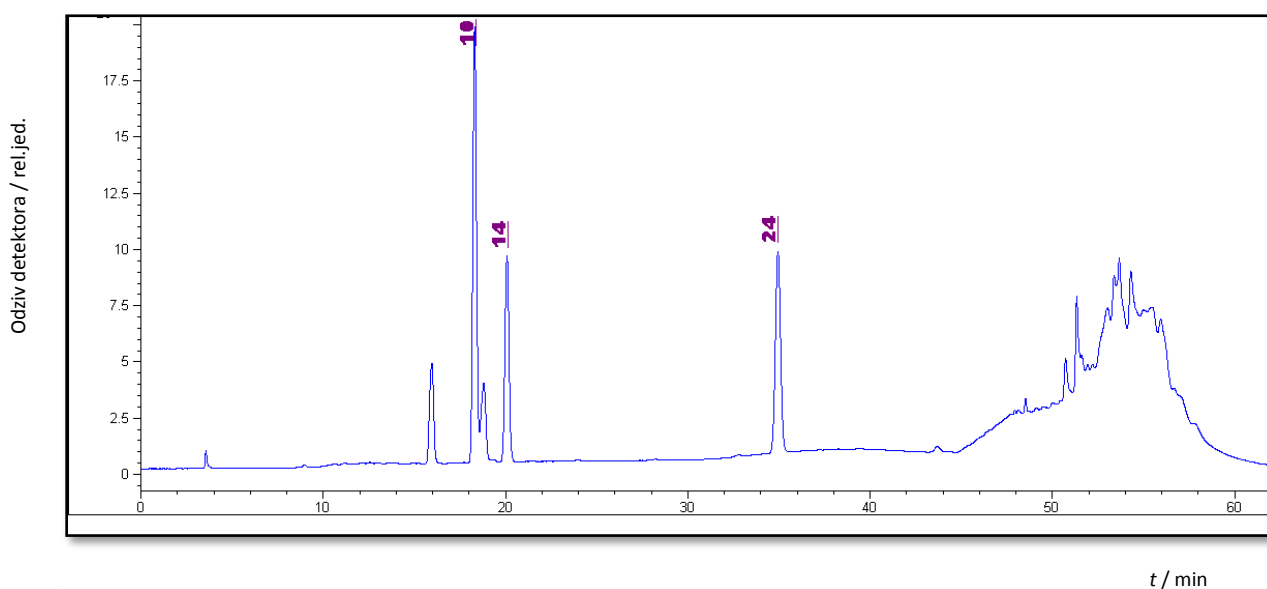
n = broj injektiranja

Tablica 4.2. Linearnost odziva FLD-a i DAD-a, granice detekcije i granice određivanja polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline

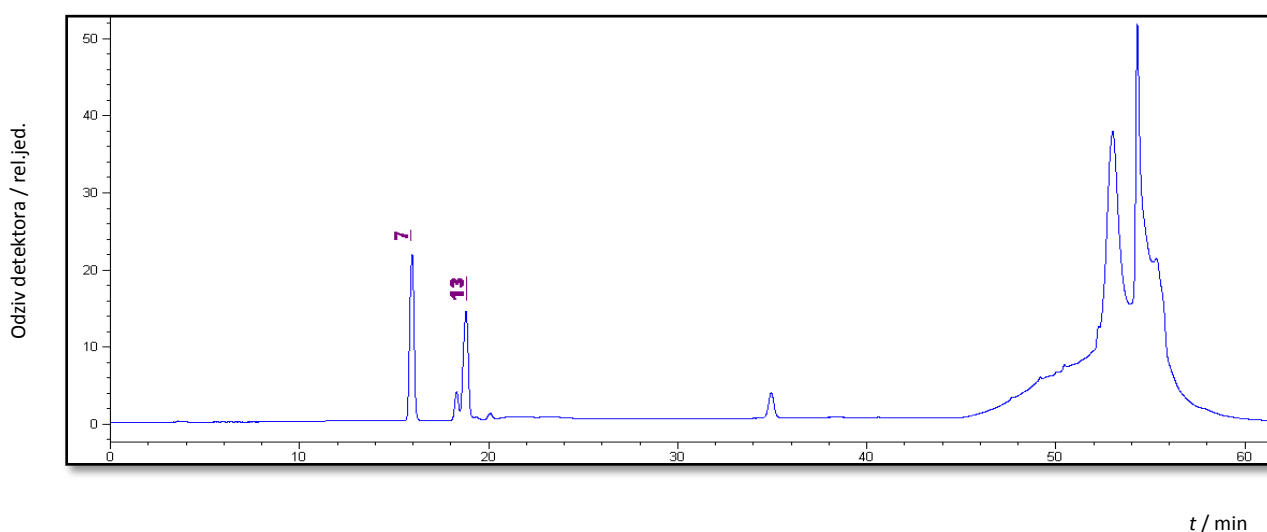
Spoj	Raspon masenih koncentracija u standardnim otopinama/ mg L ⁻¹	Jednadžba regresijskog pravca	Koeficijent korelacije <i>r</i>	Granica detekcije/ mg L ⁻¹	Granica određivanja/ mg L ⁻¹
Galna kiselina	0,5 do 20	y=53,38250x-7,600	0,9999	0,5	1,8
Delfinidin-3-O-glukozid	5 do 35	y=24,706x+47,919	0,9978	4	12
Cijanidin-3-O-glukozid	1 do 10	y=64,907x+23,359	0,9957	0,3	1
Procijanidin B1	1 do 35	y=16,67x+37,943	0,9995	0,3	0,9
Kaftarna kiselina	1 do 100	y=69,294x+27,535	0,9978	1	3
Epigalokatehin	1 do 20	y=24,148x+93,3737	0,9993	0,3	0,9
Katehin	5 do 75	y=112,42815x+9,325	1	0,7	2,1
Kafeinska kiselina	0,5 do 10	y=110,78795x+0,928	0,9990	0,8	2,4
Vanilinska kiselina	0,5 do 20	y=40,129x-5,377	0,9998	0,7	2,2
Procijanidin B2	1 do 78	y=12,259x-1,086	1	0,4	1,2
Peonidin-3-O-glukozid	5 do 20,5	y=121,579x+23,998	0,9994	1,3	4
Epikatehin	0,5 do 40	y=55,1245x-0,2060	0,9999	1,0	3
Siringinska kiselina	0,5 do 20	y=61,5106x-5,076	0,9999	0,4	1,2
Malvidin-3-O-glukozid	5 do 200	y=59,8515x+34,102	0,9999	5	15
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,5 do 40	y=129,6511x-32,885	0,9990	0,7	2,3
Ferulinska kiselina	0,5 do 10	y=97,7693x-12,045	0,9997	0,5	1,3
Kvercetin-3-O-rutinozid	0,5 do 35	y=32,717x-6,287	0,9999	0,6	2
Kvercetin-3-O-galaktozid	0,5 do 20	y=43,6862x-8,63	0,9997	0,6	2
Kvercetin-3-O-glukozid	0,5 do 25	y=41,2069x-8,016	0,9999	0,6	2
Epikatehin galat	1 do 15	y=185,9315x+29,242	0,9994	1	3
Indol-3-octena kis	0,01 do 2	y=0,1373x+5,3505	0,9998	0,003	0,01
Miricetin	1 do 20	y=68,122x-15,933	0,9997	2,7	8,3
<i>trans</i> -Resveratrol	0,05 do 25	y=117,386x-9,381	1	0,2	0,7
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	0,5 do 10	y=163,3013x-9,326	0,9999	0,3	0,9
Kvercetin	0,5 do 35	y=69,7599x-38,323	0,9996	1,7	4,8
Kemferol	0,5 do 5	y=86,393x-3,566	0,9998	0,3	0,8
Izoramnatin	0,5 do 10	y=37,2405x-7,477	0,9997	0,4	1,3

Na slici 4.1 prikazani su kromatogrami smjese standarda u sintetskom vinu zabilježeni pomoću FLD-a na valnim duljinama ekscitacije odnosno emisije, (a) $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i $\lambda_{\text{em}}=365$ nm i (b) $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i $\lambda_{\text{em}}=320$ nm te pomoću UV-DAD-a na valnim duljinama: (c) $\lambda=280$ nm, (d) $\lambda=360$ nm i (e) $\lambda=320$ nm pomoću DAD detektora. Iz priloženog kromatograma je vidljivo da se većina spojeva može detektirati pri $\lambda=280$ nm, ali da su pikovi pojedinih grupa spojeva poput flavonola i hidroksicimetnih kiselina izraženiji pri $\lambda=320$ nm odnosno $\lambda=360$ nm. Fluorescencijski detektor selektivniji je i osjetljiviji za flavan-3-ole pri valnim duljinama $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i $\lambda_{\text{em}}=320$ nm, a indol-3-octena, vanilinska i siringinska kiselina detektirane su pri valnim duljinama $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm i $\lambda_{\text{em}}=365$ nm.

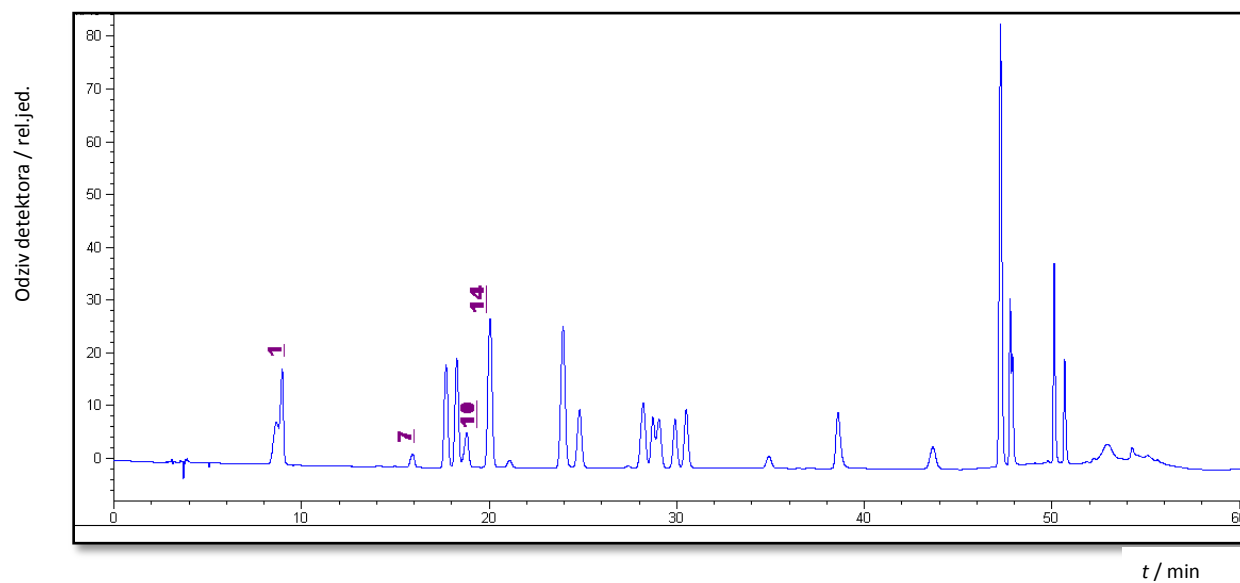
a)



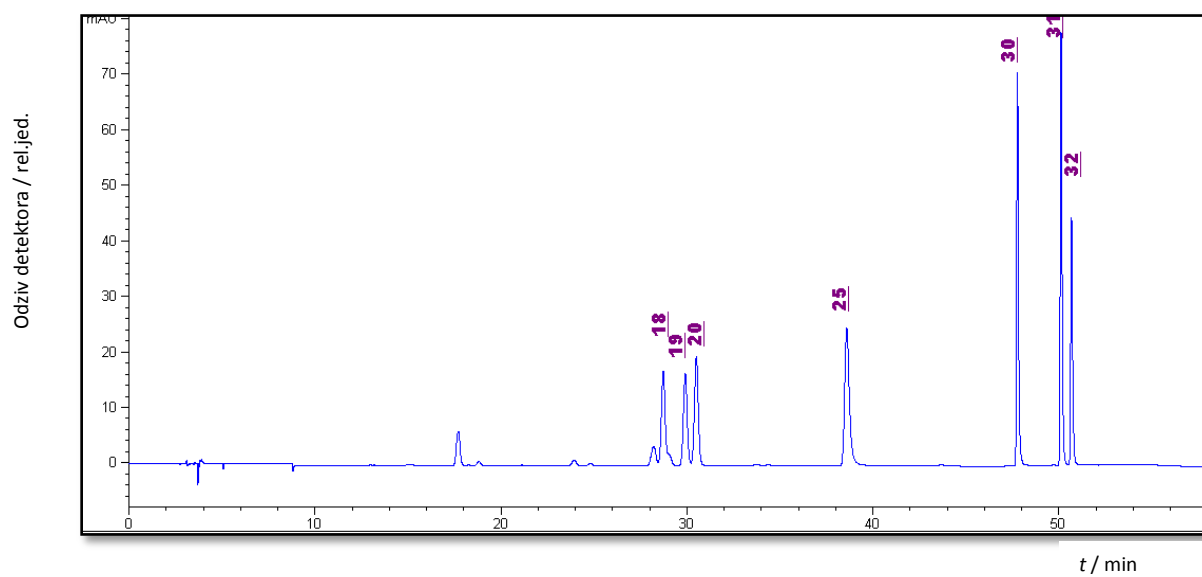
b)



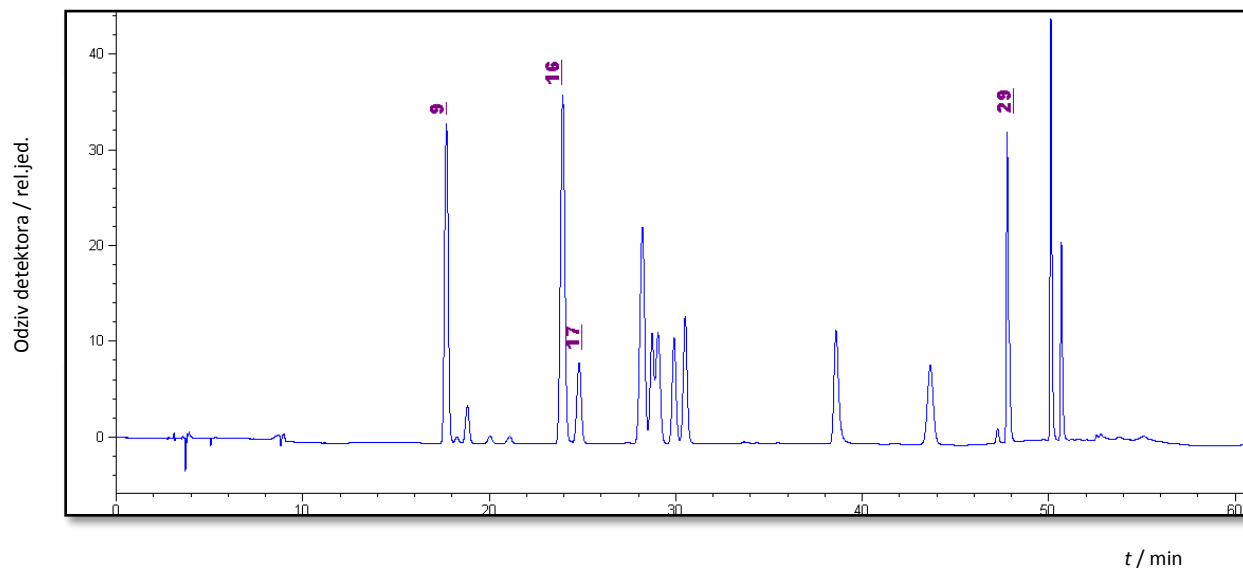
c)



d)



e)



Slika 4.1. Kromatogrami standardnih otopina polifenola i indol-3-octene kiseline pripremljenih u sintetskom vinu zabilježeni pri a) $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm, $\lambda_{\text{em}}=365$ nm (FLD), b) $\lambda_{\text{ex}}=225$ nm, $\lambda_{\text{em}}=320$ nm (FLD) c) $\lambda=280$ nm (DAD), d) $\lambda=360$ nm (DAD), e) $\lambda=320$ nm (DAD) (spojevi su numerirani kao u tablici 4.1)

4.2. Učinkovitost odvajanja polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrakcijom iz vina na čvrstoj fazi

Kako bi se istražila prikladnost različitih sorbensa za ekstrakciju polifenola i indol-3-octene kiseline iz vina na čvrstoj fazi, pripravljena je modelna otopina standardne smjese polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u sintetskom vinu. Učinkovitost ekstrakcije i frakcioniranja praćena je određivanjem analitičkog povrata, odnosno usporedbom masene koncentracije svakog pojedinog spoja u pojedinim frakcijama eluata s njegovom masenom koncentracijom u modelnoj otopini.

U tablici 4.3 prikazani su analitički povrati spojeva ekstrahiranih iz modelne otopine na čvrstoj fazi C_{18} . Analitički povrati analita u standardnoj smjesi bili su od 27 % do 83 %. Najviše spojeva eluirano je u prvoj frakciji s dietil-eterom. Frakcija eluirana s etil-acetatom sadržavala je malvidin-3-*O*-glukozid i flavonol- glukozide. Malvidin-3-*O*-glukozid nalazio se u obje frakcije, a njegov ukupni analitički povrat bio je 56 %. Frakcija eluirana metanolom nije sadržavala niti jedan analit iz standardne smjese. Najniži je bio analitički povrat galne kiseline od 27 %. Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi ponovljen je s uzorkom crnog vina kako bi se usporedile površine kromatografskih pikova antocijana u kromatogramu ekstrakta s površinama kromatografskih pikova antocijana u kromatogramu dobivenim direktnim injektiranjem uzorka. Ukupan zbroj površina kromatografskih pikova malvidin-3-*O*-glukozida u kromatogramima svih triju frakcija dobivenih ekstrakcijom iz crnog vina na fazi C_{18} bio je 49 % površine kromatografskog pika malvidin-3-*O*-glukozida u kromatogramu direktno injektiranog uzorka crnog vina. Frakcija eluirana metanolom sadržavala je ostatke pojedinačnih antocijana u tragovima te polimerne polifenole. Tijekom tekućinskokromatografske analize polimerni polifenoli ispiru se s kromatografske kolone između 45 minute i 55 minute te se u tom periodu uočavaju u kromatogramu kao grba (engl. *Hump*) i interferiraju s drugim polifenolnim sastavnicama određivanim pri valnim duljinama $\lambda=320$ nm, 330 nm i 360 nm. Primijećeno je da je sorbens C_{18} u kolonici nakon postupka ekstrakcije crnog vina i ponovnog kondicioniranja ostao ružičaste i na dnu kolonice tamnoljubičaste boje od pigmenata crnog vina, što upućuje na jako vezanje antocijana i polimernih polifenola na sorbens.

Ispitana je učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz modelne otopine pomoću sorbensa oktadecilsilicijevog dioksida i mješovitog sorbensa koji se

sastoji od anionskog izmjenjivača (kvarterni amin) i hidrofobnog polimera divinilbenzena. Postupak se sastojao od dva koraka. Prvi korak poslužio je za pročišćavanje i koncentriranje uzorka na kolonici C₁₈, a drugi korak za frakcioniranje uzorka na kisele i neutralne spojeve pomoću kolonice SampliQ SAX. U tablici 4.4 prikazani su postignuti analitički povrati spojeva iz modelne otopine. Ovim postupkom nije iz modelne otopine ekstrahiran niti jedan flavonol. Ova je metoda učinkovita za ekstrakciju kiselina, a neutralni spojevi se ekstrahiraju djelomično.

U tablici 4.5 prikazani su analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline iz modelne otopine ekstrakcijom na kolonicama Oasis MAX. Ovim postupkom ekstrahirani su iz otopine svi spojevi s analitičkim povratima u rasponu od 72 % do 96 %.

Postupkom ekstrakcije polifenola i indol-3-octene kiseline iz modelne otopine na kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu dvaju različitih proizvođača postignuti su za sve analite analitički povrati veći od 93 % (tablica 4.6). Svi analiti eluirani su sa sorbensa u prvoj frakciji. U ovom su radu za ekstrakciju i koncentriranje polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline iz bijelih i crnih vina korištene kolonice Strata X, koje su se pokazale dugotrajnijima te je s jednom kolonicom bilo moguće načiniti i do pet ekstrakcija. Učinkovitijoj ekstrakciji pridonijela je i veća masa sorbensa u kolonici Strata X od mase sorbensa u kolonici HLB.

Tablica 4.3. Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrahiranih na čvrstoj fazi C₁₈ iz modelne otopine pripravljene u sintetskom vinu

Spoj	ANALITIČKI POVRAT / %		
	(n=3)		
	Frakcija 1 Dietil-eter	Frakcija 2 Etil-acetat	Frakcija 3 Metanol
Malvidin-3-O-glukozid	3	53	U tragovima
(-)-Katehin	68	-	-
(+)-Epikatehin	57	-	-
Epikatehin galat	59	-	-
Epigalokatehin	44	-	-
Kvercetin	71	-	-
Kvercetin-3-O-rutinozid	-	73	4
Kvercetin-3-O-glukozid	-	76	-
Kvercetin-3-O-galaktozid	-	66	-
Miricetin	79	-	-
Kemferol	73	-	-
Izoramnetin	56	-	-
<i>trans</i> -Resveratrol	73	-	-
Kaftarna kiselina	69	-	-
Kafeinska kiselina	87	-	-
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	49	-	-
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	77	-	-
Ferulinska kiselina	56	-	-
Galna kiselina	27	-	-
Vanilinska kiselina	74	-	-
Siringinska kiselina	83	-	-
Indol-3-octena kiselina	44	-	-

n= broj uzoraka

Tablica 4.4. Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrahiranih na čvrstim fazama C₁₈ i SampliQ SAX iz modelne otopine pripravljene u sintetskom vinu

Spoj	ANALITIČKI POVRAT / % (n=3)	
	Frakcija 1 H ₂ O	Frakcija 2 1 mol L ⁻¹ HCl
Malvidin-3-O-glukozid	-	52
(-)-Katehin	67	23
(+)-Epikatehin	73	9
Epikatehin galat	47	13
Epigalokatehin	79	8
Kvercetin	-	-
Kvercetin-3-O-rutinozid	-	-
Kvercetin-3-O-glukozid	-	-
Kvercetin-3-O-galaktozid	-	-
Miricetin	-	-
Kemferol	-	-
Izoramnetin	-	-
<i>trans</i> -Resveratrol	-	42
Kaftarna kiselina	-	76
Kafeinska kiselina	-	74
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	-	79
<i>trans</i> -cimetna kiselina	-	62
Ferulinska kiselina	-	77
Galna kiselina	-	69
Vanilinska kiselina	-	69
Siringinska kiselina	-	61
Indol-3-octena kiselina	-	73

n= broj uzoraka

Tablica 4.5. Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrahiranih na čvrstoj fazi Oasis MAX iz modelne otopine pripravljene u sintetskom vinu

Spoj	ANALITIČKI POVRAT / %
	(n=3)
	Suhi ekstrakt frakcije 1 i frakcije 2 otopljen u ψ (etanol, mravlja kiselina, voda)= 10:0,1:89,9
Malvidin-3-O-glukozid	88
(-)-Katehin	88
(+)-Epikatehin	83
Epikatehin galat	78
Epigalokatehin	89
Kvercetin	79
Kvercetin-3-O-rutinozid	72
Kvercetin-3-O-glukozid	81
Kvercetin-3-O-galaktozid	77
Miricetin	94
Kemferol	96
Izoramnetin	95
<i>trans</i> -resveratrol	87
Kaftarna kiselina	92
Kafeinska kiselina	96
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	89
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	91
Ferulinska kiselina	87
Galna kiselina	89
Vanilinska kiselina	91
Siringinska kiselina	94
Indol-3-octena kiselina	89

n= broj uzoraka

Tablica 4.6. Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrahiranih na kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu dvaju različitih proizvođača (kolonice HLB i Strata X) iz modelne otopine pripremljene u sintetskom vinu

Spoj	ANALITIČKI POVRAT/ % (<i>n</i> =3)	
	HLB	StrataX
Malvidin-3-O-glukozid	94	93
(-)-Katehin	100	100
(+)-Epikatehin	98	99
Epikatehin galat	96	97
Epigalokatehin	95	99
Kvercetin	98	97
Kvercetin-3-O-rutinozid	99	99
Kvercetin-3-O-glukozid	98	99
Kvercetin-3-O-galaktozid	96	95
Miricetin	99	99
Kemferol	99	98
Izoramnetin	100	99
<i>trans</i> -Resveratrol	100	100
Kaftarna kiselina	98	98
Kafeinska kiselina	99	100
Kumarinska kiselina	99	98
<i>trans</i> -Cimetna kiselina	99	99
Ferulinska kiselina	98	97
Galna kiselina	94	93
Vanilinska kiselina	97	97
Siringinska kiselina	98	98
Indol-3-octena kiselina	97	97

n= broj uzoraka

4.3. Analitički postupak određivanja polifenola i indol-3-octene kiseline u vinima

Da bi se odredio analitički povrat analiziranih spojeva te ponovljivost i obnovljivost rezultata ispitana je djelotvornost analitičkog postupka dodatkom poznate količine standarda u uzorak vina neposredno prije ekstrakcije na čvrstoj fazi. Postupak je opisan u poglavlju 3.4.3.1. Analitički postupak uključivao je ekstrakciju na kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu te tekućinskokromatografsku analizu ekstrakta. Analitički povrat antocijana je zbog nedostatne količine standarda određen usporedbom površina pikova dobivenih direktnim injektiranjem i ekstrakcijom na čvrstoj fazi iz dva uzorka Merlota i tri uzorka Cabernet Sauvignona (kontrolne varijante od pokusa solarizacije). Raspon analitičkih povrata za malvidin-3-*O*-glukozid bio je od 90 % do 98 %, a relativna standardna devijacija bila je 4 %.

Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline iz pet paralelno pripremljenih uzoraka vina (2 bijela vina kultivara Graševine i 3 crna vina kultivara Cabernet Sauvignona, kontrolne varijante pokusa solarizacije) prikazani su u tablici 4.7. Relativne standardne devijacije kao mjera ponovljivosti analize bile su od 1 % za kvercetin-3-*O*-glukozid i katehin do 13 % za *trans*-ferulinsku kiselinu. Raspon analitičkih povrata bio je od 65 % do 111 %. Vidljivo je da su postignuti analitički povrati i pripadajuće relativne standardne devijacije zadovoljavajući.

Analitički postupak ekstrakcije i koncentriranja 31 polifenola i indol-3-octene kiseline na kopolimernim sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu pokazao se uspješnim. U prvoj frakciji dobili smo sve željene analite, a interferencije i polimerni polifenoli zaostali su na sorbensu. Posebno se ekstrakcija flavonola i indol-3-octene kiseline koje se u vinu nalaze u vrlo niskim masenim koncentracijama pokazala pogodnom na kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu.

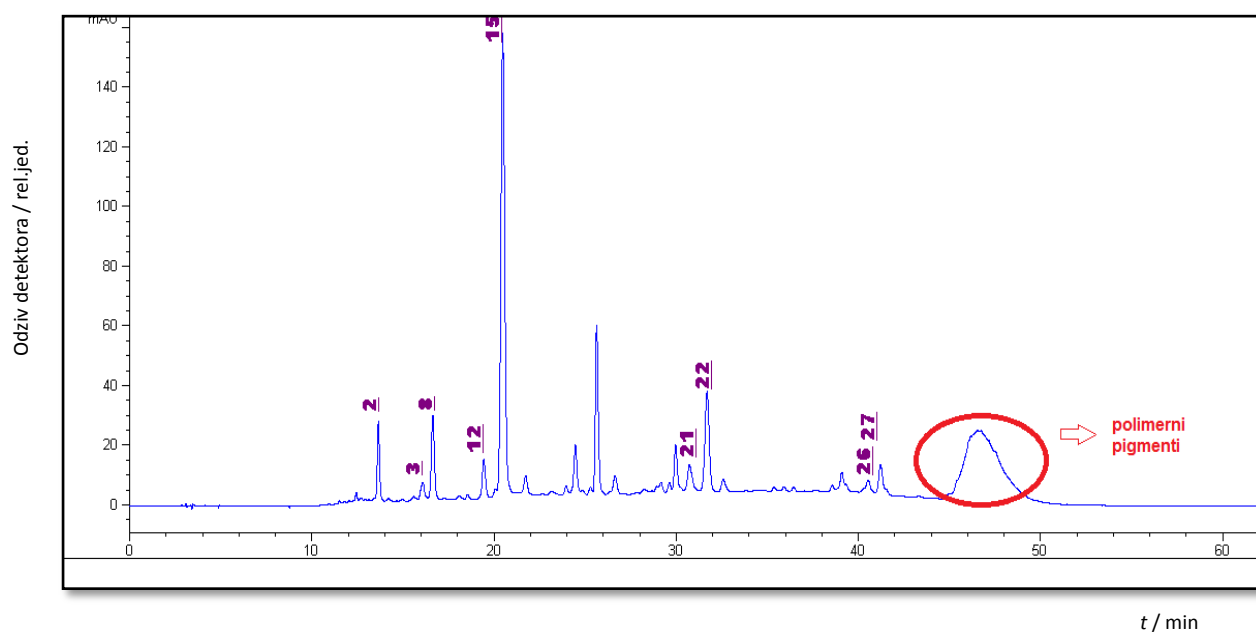
Na slici 4.2 uspoređeni su kromatogrami uzorka crnog vina Cabernet Sauvignona zabilježeni na $\lambda=518$ nm nakon direktnog injektiranja vina i analizom ekstrakta vina pripremljenog ekstrakcijom na čvrstoj fazi pomoću STRATA X kolonica.

Tablica 4.7. Analitički povrati polifenola i indol-3-octene kiseline ekstrahiranih iz vina na čvrstoj fazi STRATA X (2 bijela vina kultivara Graševine i 3 crna vina kultivara Cabernet Sauvignona)

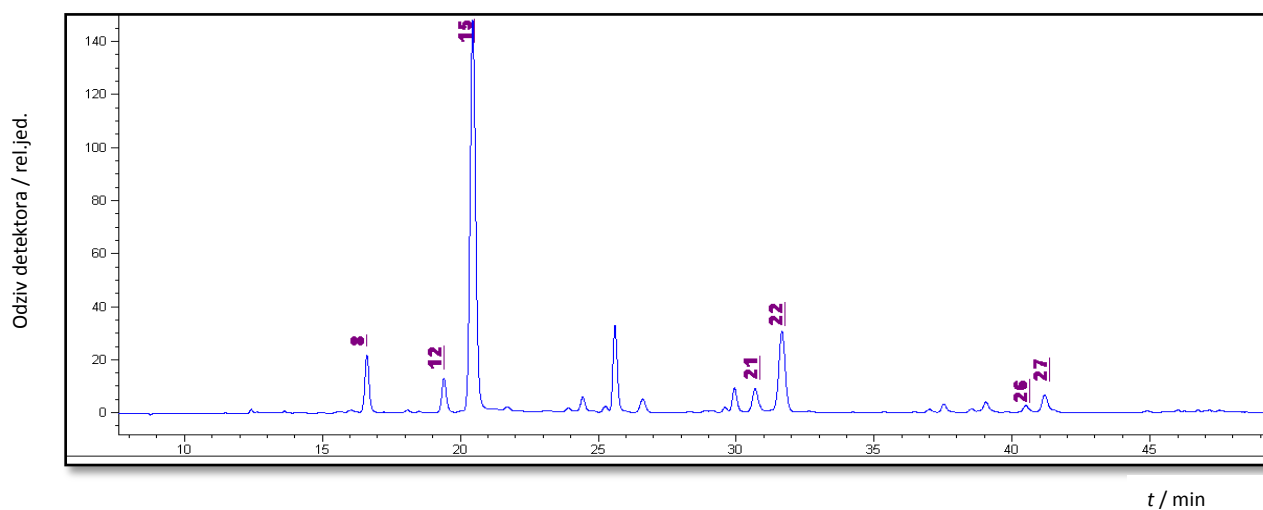
Spoj	ANALITIČKI POVRAT / %						
	(n=5)						
	Bijelo Vino 1	Bijelo Vino 2	Crno Vino 3	Crno Vino 4	Crno Vino 5	Srednja vrijednost	RSD %
(-)-Katehin	101	99	97	100	101	99	1
(+)-Epikatehin	98	92	96	91	99	96	4
Kvercetin	87	87	109	99	99	96	10
Kvercetin-3-O-rutinozid	81	90	83	84	83	84	4
Kvercetin-3-O-glukozid	87	85	88	87	86	86	1
Kvercetin-3-O-galaktozid	83	81	84	80	78	81	3
Miricetin	80	81	83	88	89	84	5
Kemferol	95	96	97	96	93	95	2
Izoramnetin	92	92	89	94	89	91	3
trans-Resveratrol	111	99	94	102	100	101	6
Kaftarna kiselina	90	92	92	88	89	90	2
Kafeinska kiselina	96	97	95	85	95	93	5
p-Kumarinska kiselina	88	76	86	85	83	83	5
trans-Cimetna kiselina	92	88	89	92	93	91	2
Ferulinska kiselina	90	65	89	88	90	84	13
Galna kiselina	74	79	85	83	93	83	9
Vanilinska kiselina	95	99	93	91	89	93	4
Siringinska kiselina	94	93	88	86	94	91	4
Indol-3-octena kiselina	92	89	96	92	94	93	3

n= broj uzoraka

a)



b)



Slika 4.2. Kromatogrami a) direktno injektiranog uzorka vina i b) ekstrakta vina pripravljenog ekstrakcijom na čvrstoj fazi STRATA X (spojevi su numerirani kao u tablici 4.1)

4.4. Polifenolne sastavnice i indol-3-octena kiselina u uzorcima vina

Radi poboljšanja kakvoće grožđa i vina neprestano se razvijaju iskušavaju nove tehnike i tehnološki postupci. Jedna od novijih tehnika je primjena specijalne reflektirajuće folije Vitexol koja u vinogradu mijenja režim i intenzitet osvjetljenja zone grožđa. Time se utječe na proces dozrijevanja grožđa uključujući sadržaj šećera i ukupnih kiselina i još više sintezu polifenolnih i aromatskih spojeva u grožđu. Folija omogućava da se u zonu grožđa reflektira najmanje 20 % više sunčeva svjetla i energije nego što je to uobičajeno, što značajno unapređuje ukupnost fizioloških procesa loze.

Od bijelih vina za istraživanje su odabrana tri kultivara karakteristična za kontinentalnu Hrvatsku: Graševina, Traminac i Manzoni bijeli.

Graševina je poznata još i pod sinonimima Talijanski rizling, Grašica, Laški rizling, Welschriesling. Ova sorta je iz Francuske prenesena u Heidelberg u Njemačkoj, odakle se širi u Švicarsku i Hrvatsku, a otuda dalje prema istoku. Uzgaja se na velikim površinama Panonske nizine, od Austrije, Slovačke, Mađarske, pa sve do Rumunjske.¹⁶⁰ U Hrvatskoj je najzastupljenija bijela sorta grožđa te najvažniji kultivar podregije Slavonija. Graševina je relativno osjetljivija na sivu plijesan, čemu pogoduje zbijen grozd, tanka kožica i kasno dozrijevanje u kombinaciji s kišovitom jeseni.^{161,162}

Traminac je sorta koja potječe iz južnog Tirola. Otporna je na niske temperature. Srednje je rodnosti. Slabo je osjetljiva na sivu plijesan. U Hrvatskoj je preporučena za sva vinogorja u regiji kontinentalna Hrvatska.^{160,161,162}

Manzoni bijeli kultivar je vinskog grožđa kojeg je oplodivanjem Pinota bijelog peludom Rizlinga rajnskog uzgojio prof. Luigi Manzoni radeći na usavršavanju kultivara. Pravilnikom o nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze sadnja ovog kultivara preporuča se u svim podregijama regije Kontinentalna Hrvatska, izuzev u podregiji Zagorje-Međimurje.¹⁶²

Svi uzorci bijelih vina bili su od kultivara grožđa uzgojenih na području vinogorja Zagreb na znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagreb.

Istraživanje crnih vina provodilo se tijekom 2 godine (2008. i 2009.), na kultivarima Merlot, Cabernet Sauvignon, Pinot crni, Teran i Plavac mali (*Vitis vinifera* L.). Pokus je zbog biološko-gospodarske različitosti istraživanih kultivara postavljen na tri lokacije: Jazbina (vinogorje Zagreb), Brtonigla (vinogorje Zapadna Istra), te Kuna Pelješka (vinogorje Pelješac).

Merlot potječe iz Francuske gdje se najviše i uzgaja. U manjoj se mjeri uzgaja i u drugim vinorodnim zemljama umjerene klime. Mjestimice se uzgaja i u sjevernim područjima Hrvatske, s uspjesima koji mogu tek uvjetno zadovoljiti. Prikladan je za područje sjevernog Jadrana. Traži svjež, toplu tlu, na suhim ocijeditim položajima. Ne podnosi vlagu zbog truljenja grožđa i bujnog razvitka. Prikladan je za umjerenu klimu, ako jesen nije redovito kišovita.^{160, 161, 162}

Teran ili Refoški istarski, Istrijanac (sa zelenom ogrozdom) tj. Terrano ili Refosco d'Istria, (Refosco del Carso), Terrano noir, blauer, black, smatra se autohtonim kultivarom Istre i bližeg kraškog područja. Ranije je u Istri to bila glavna sorta u svim vinogradima. Postoji više biotipova koji se razlikuju po veličini i obliku grozdova i bobice, zbijenosti, boji peteljčica i vremenu dozrijevanja te kvaliteti. Prvi opis Terana potječe od istarskog agronoma kanonika Petra Stankovića iz 1825. godine.¹⁶¹ S obzirom na kakvoću vina prikladnija su za uzgoj kraška ilovasto pjeskovita ili šljunčana tla na višim položajima (100 do 150 m nadmorske visine), južne ekspozicije. Otpornost prema smrzavicama i gljivičnim bolestima vrlo je dobra. U vlažnijim uvjetima dosta je osjetljiv na gljivične bolesti, naročito *Botrytis*.

Plavac mali crni (sinonimi: Pagadebit crni, Crljenak, Kaštelanac, Praskavac, Zeljenjak, Viška, Čvrstac i dr.) smatra se autohtonim kultivarom Dalmacije. Donedavno se pretpostavljalo da su Plavac mali, Primitivo crni (Italija) i Zinfandel (Kalifornija) jedan te isti kultivar, međutim dokazano je kako su Zinfandel i Primitivo jedna, a Plavac mali sasvim drugi kultivar. Rasprostranjena je jedino u Dalmaciji, pa se stoga smatra kultivarom vrlo uskog područja uzgoja. Najviše je ima na poluotoku Pelješcu, otocima Korčuli, Hvaru, Visu i Braču te na podbiokovskom priobalju i u Kaštelima.¹⁶³ Za uzgoj su prikladna propusna tla južnih ekspozicija s tipičnom mediteranskom klimom.

Cabernet Sauvignon jedan je od najpoznatijih vinskih kultivara crnog grožđa koji je u hrvatska vinogorja prenet iz njegove domovine Francuske (Bordeaux). Ovaj kultivar nastao

je križanjem kultivara Cabernet franc x Sauvignon blanc. Kultivar je vjerojatno nastao spontano u nekom bordoškom vinogradu gdje se roditeljski kultivari uzgajaju stoljećima. Vrlo je dobro otporan na sivu plijesan. Također, ima vrlo dobru otpornost prema niskim temperaturama. Uzgoj se preporuča u podregijama Podunavlje, Slavonija, Moslavina, Prigorje-Bilogora te u svim podregijama regije Primorska Hrvatska.

Pinot crni ili Burgundac crni potječe iz sjeveroistočne Francuske. U pokrajinama Burgundije (Bourgogne) i Champagne predstavlja osnovni kultivar vinove loze. Uzgaja se u kontinentalnim vinogorjima u zemljama Europe poput Njemačke, Švicarske, Austrije, Slovačke, Mađarske, Rumunjske, Slovenije, Hrvatske i Srbije.¹⁶⁰ Preporučeni je kultivar u svim vinogorjima regije Kontinentalna Hrvatska, a u regiji Primorska Hrvatska u sva tri vinogorja podregije Istra.¹⁶²

Ukupan broj uzoraka crnih vina analiziranih u ovom radu bio je 30, a uzoraka bijelih vina 18. Na temelju analize uzoraka željelo se utvrditi polifenolni profil navedenih kultivara i razine indol-3-octene kiseline te istražiti utječe li i na koji način tehnika solarizacije na polifenolni sadržaj u mladim vinima tih kultivara.

Bijela vina

U tablicama od 4.8 do 4.13 prikazani su rezultati analize pojedinačnih polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u bijelim vinima određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i rezultati spektrofotometrijskih mjerenja ukupnih fenola, ukupnih flavan-3-ola i antioksidacijske aktivnosti pomoću radikala DPPH i ABTS u uzorcima bijelih vina kultivara Graševine, Traminca i Manzonija bijelog. Masene koncentracije pojedinačnih polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline izražene su kao srednja vrijednost dva ponavljanja. Masene koncentracije ukupnih fenola, ukupnih flavan-3-ola srednja su vrijednost triju ponavljanja i izražene su u ekvivalentima galne kiseline (mg L^{-1}), katehina (mg L^{-1}). Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti također su srednja vrijednost tri ponavljanja i izraženi su ekvivalentima Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tablica 4.8. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Graševina (GRK=kontrolna varijanta, GRS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	GRK1	GRK2	GRK3	GRS1	GRS2	GRS3
Galna kiselina	3,88	2,73	4,25	5,02	2,41	3,35
Siringinska kiselina	0,17	0,23	0,14	0,36	0,27	0,15
Kafeinska kiselina	7,51	8,02	6,63	6,27	8,14	5,98
Kaftarna kiselina	75,66	83,62	59,34	78,91	71,44	74,33
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,11	1,55	2,53	2,89	1,25	1,84
Ferulinska kiselina	0,36	0,29	0,41	0,51	0,23	0,28
<i>trans</i> -Resveratrol	0,33	1,65	2,75	1,02	0,97	0,72
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	n.d.	0,32	n.d.	n.d.	0,48
Kvercetin	0,31	0,28	0,45	0,47	0,31	0,29
Kemferol	0,16	0,19	0,2	0,18	0,18	0,16
Katehin	12,55	15,71	57,52	34,86	35,16	29,08
Procijanidin B1	n.d.	0,42	0,51	n.d.	n.d.	n.d.
Procijanidin B2	n.d.	0,57	0,59	n.d.	n.d.	n.d.
Epikatehin	5,44	3,19	9,32	20,86	20,20	14,97
Epikatehin galat	6,80	8,57	6,77	6,86	5,35	6,97
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	0,78	n.d.	n.d.	n.d.
Indol-3-octena kiselina	0,010	0,010	0,014	0,014	0,013	0,015

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.9. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Graševine te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (GRK=kontrolna varijanta, GRS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) /mg L ⁻¹	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) /mg L ⁻¹	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / μ mol L ⁻¹	
			DPPH	ABTS
GRK1	279,48	3,21	783,12	450,16
GRK2	237,26	4,59	677,36	560,94
GRK3	267,92	5,74	826,32	546,79
GRS1	279,91	3,73	834,56	654,72
GRS2	287,19	4,63	845,78	637,78
GRS3	278,21	5,49	757,92	523,91

Tablica 4.10. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Traminac (TRK=kontrolna varijanta, TRS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	TRK1	TRK2	TRK3	TRS1	TRS2	TRS3
Galna kiselina	4,59	5,82	6,44	8,6	7,01	6,23
Siringinska kiselina	0,33	0,42	0,22	0,46	0,39	0,27
Kafeinska kiselina	1,3	1,62	1,98	1,45	2,31	1,62
Kaftarna kiselina	23,76	28,91	20,85	22,39	26,35	24,11
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,30	1,97	1,51	2,51	0,20	1,32
Ferulinska kiselina	0,42	0,51	0,27	0,61	0,34	0,29
<i>trans</i> -Resveratrol	0,96	0,68	0,67	0,77	0,66	0,95
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	0,28	n.d.	n.d.
Kvercetin	0,52	0,48	0,41	0,37	0,52	0,41
Kemferol	0,17	0,15	0,12	0,16	0,15	0,18
Katehin	19,79	33,28	36,35	31,81	34,81	26,45
Procijanidin B1	n.d.	0,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procijanidin B2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	n.d.
Epikatehin	14,98	18,62	29,93	1,95	5,84	7,34
Epikatehin galat	6,63	4,32	9,11	4,39	7,14	8,31
Epigalokatehin	0,21	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.
Indol-3-octena kiselina	0,010	0,010	0,014	0,013	0,013	0,015

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.11. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Traminac te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (TRK=kontrolna varijanta, TRS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) /mg L ⁻¹	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) /mg L ⁻¹	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / μ mol L ⁻¹	
			DPPH	ABTS
TRK1	212,35	3,89	606,03	436,48
TRK2	222,55	3,50	727,11	618,89
TRK3	251,30	3,71	603,28	447,23
TRS1	195,56	2,49	758,82	439,74
TRS2	224,30	3,59	763,17	481,32
TRS3	243,25	3,54	781,20	512,81

Tablica 4.12. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Manzoni (MZK= kontrolna varijanta, MZS= tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	MZK1	MZK2	MZK3	MZS1	MZS2	MZS3
Galna kiselina	4,26	5,48	2,46	1,71	3,74	5,09
Siringinska kiselina	0,19	0,28	0,23	0,29	0,31	0,22
Kafeinska kiselina	2,22	3,15	2,91	1,67	2,22	2,15
Kaftarna kiselina	18,79	29,79	21,92	23,08	27,31	24,56
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,17	0,48	1,01	0,36	0,55	0,41
Ferulinska kiselina	0,43	0,37	0,68	0,36	0,42	0,51
<i>trans</i> -Resveratrol	0,82	1,29	1,41	1,07	0,57	1,03
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26
Kvercetin	0,38	0,51	0,24	0,39	0,46	0,44
Kemferol	0,16	0,2	0,17	0,14	0,16	0,16
Katehin	28,67	30,76	31,03	25,84	21,63	23,32
Procijanidin B1	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procijanidin B2	n.d.	0,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epikatehin	20,22	8,68	9,82	2,76	4,37	6,26
Epikatehin galat	5,92	6,73	7,29	3,78	4,89	6,31
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Indol-3-octena kiselina	0,012	0,011	0,014	0,015	0,014	0,013

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.13. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Manzoni te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (MZK=kontrolna varijanta, MZS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) /mg L ⁻¹	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) /mg L ⁻¹	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / μ mol L ⁻¹	
			DPPH	ABTS
MZK1	248,30	3,70	794,13	523,41
MZK2	285,64	3,70	932,92	672,03
MZK3	262,36	5,03	792,64	497,93
MZS1	246,02	3,57	754,13	461,26
MZS2	255,96	3,97	723,66	447,28
MZS3	247,96	4,11	734,52	451,17

U svim vinima određeni su ukupni fenoli u rasponu masenih koncentracija od 195,56 mg L⁻¹ do 287,19 mg L⁻¹. U bijelim vinima određeno je ukupno 17 spojeva. U svim uzorcima bijelog vina najdominantniji spoj bila je kaftarna kiselina u rasponu masenih koncentracija od 18,79 mg L⁻¹ do 83,62 mg L⁻¹. Masena koncentracija indol-3-octene kiseline je u svim uzorcima bijelog vina bila niža od 0,015 mg L⁻¹. Od hidroksibenzojevih kiselina najzastupljenija bila je galna kiselina u rasponu masenih koncentracija od 1,77 mg L⁻¹ do 7,01 mg L⁻¹. Masene koncentracije siringinske kiseline bile su u rasponu od 0,14 mg L⁻¹ do 0,46 mg L⁻¹. Od flavonola, prisutni su bili kvercetin i kemferol i određeni su u svim uzorcima vina, dok je kvercetin-3-*O*-glukozid detektiran samo u pojedinim. Procijanidin B1 i procijanidin B2 određeni su u svega tri uzorka. U po jednom uzorku određen je samo procijanidin B1 i samo procijanidin B2. Epigallocatehin određen je u samo tri uzorka.

S obzirom da su svi uzorci grožđa brani u istom razdoblju te da su svi uzorci bijelog vina jednako tretirani kvascima visoke razine kaftarne kiseline u Graševini mogu se pripisati karakteristici kultivara. Također, tako visoke vrijednosti kaftarne kiseline mogu biti rezultat hidroksilacije kutarne kiseline u kaftarnu kiselinu. Taj je mehanizam slabo istražen. Proučavali su ga Arnous i Meyer¹⁶⁴ te dokazali da grožđe katalizira pretvorbu *p*-kumarinske kiseline u kafeinsku kiselinu enzimskom hidroksilacijom. Poznato je da vinska kiselina taloži zajedno s bjelančevinama tijekom zamrzavanja i odmrzavanja vina. S obzirom da su vina bila zamrznuta nakon fermentacije do početka analize na -20 °C, postoji mogućnost da je hidroksilacijom *p*-kumarinske kiseline nastala kafeinska kiselina te esterifikacijom kaftarna kiselina.

U svim uzorcima bijelih vina zabilježen je *trans*-resveratrol u rasponu masenih koncentracija od 0,33 mg L⁻¹ do 2,75 mg L⁻¹.

Crna vina

U tablicama od 4.14 do 4.18. prikazani su rezultati analize pojedinačnih polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u uzorcima crnih vina kultivara Plavac mali, Teran, Pinot crni, Cabernet Sauvignon i Merlot određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja ukupnih fenola, ukupnih flavan-3-ola te antioksidacijske aktivnosti pomoću radikala DPPH i ABTS u uzorcima crnih vina prikazani

su u tablicama od 4.19 do 4.23. Masene koncentracije pojedinačnih polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline izražene su kao srednja vrijednost dvaju ponavljanja. Masene koncentracije ukupnih fenola, ukupnih flavan-3-ola i ukupnih antocijana srednja su vrijednost triju ponavljanja i izraženih u ekvalventima galne kiseline (mg L^{-1}), katehina (mg L^{-1}) odnosno malvidin-3-*O*-glukozida (mg L^{-1}). Rezultati mjerenja antioksidacijskih aktivnosti također su srednja vrijednost triju mjerenja i izraženi su u ekvivalentima Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tablica 4.14. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Plavac mali (PMK=kontrolna varijanta, PMS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	PMK1	PMK2	PMK3	PMS1	PMS2	PMS3
Galna kiselina	16,23	15,51	13,92	12,63	10,68	14,58
Vanilinska kiselina	3,00	8,26	9,00	5,28	9,22	7,62
Siringinska kiselina	6,23	5,80	6,48	7,34	5,26	6,71
Epikatehin galat	7,84	n.d.	1,32	3,91	2,13	n.d.
Procijanidin B1	22,52	6,67	5,81	5,73	3,90	2,24
Epigalokatehin	1,32	0,93	0,32	n.d.	2,35	n.d.
Katehin	35,12	14,27	24,81	22,45	17,46	13,54
Procijanidin B2	26,90	7,10	3,71	6,59	1,50	3,24
Epikatehin	17,28	6,35	9,31	18,56	27,98	6,42
Kaftarna kiselina	56,10	31,80	27,34	31,60	11,07	30,69
Kafeinska kiselina	2,92	1,37	1,33	3,88	1,01	1,23
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,81	0,57	n.d.	0,99	1,11	0,83
Ferulinska kiselina	1,64	0,43	0,38	0,67	0,59	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	3,92	1,14	2,33	1,19	1,16	3,13
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	28,77	6,41	7,44	5,92	8,90	9,08
Miricetin	1,86	2,57	1,31	2,43	3,23	0,80
Kvercetin	5,12	0,71	4,94	3,76	0,95	6,30
Kemferol	1,84	1,76	1,84	0,98	n.d.	1,82
Izoramnatin	0,73	0,65	0,94	0,67	0,49	1,07
Indol-3-octena kiselina	0,262	0,158	0,388	n.d.	0,201	0,084
<i>trans</i> -Resveratrol	0,53	0,79	0,65	0,42	0,45	0,49
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	2,23	2,26	3,43	5,11	4,67	1,61
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	4,44	5,24	4,78	6,81	7,01	4,45
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,44	0,32	0,39	0,54	0,39	0,25
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	117,46	154,45	149,26	151,23	142,90	141,83
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	0,22	0,28	0,30	0,23	0,15	0,10
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	5,76	7,43	6,38	7,18	6,69	7,68
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	0,58	0,55	0,49	0,31	0,34	0,34
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	20,25	21,78	19,46	23,18	23,45	18,53

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.15. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Cabernet Sauvignon (CSK=kontrolna varijanta, CSS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	CSK1	CSK2	CSK3	CSS1	CSS2	CSS3
Galna kiselina	7,64	10,96	11,12	7,98	9,51	12,66
Vanilinska kiselina	8,56	3,71	8,60	4,19	2,97	4,83
Siringinska kiselina	4,03	4,19	3,93	6,17	5,42	3,82
Epikatehin galat	0,51	0,74	1,98	0,56	0,37	n.d.
Procijanidin B1	8,11	1,83	1,97	3,31	4,68	2,23
Epigalokatehin	n.d.	0,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Katehin	47,18	79,73	35,56	56,98	34,32	60,85
Procijanidin B2	4,91	4,06	1,10	2,37	n.d.	n.d.
Epikatehin	4,97	8,53	23,26	15,69	3,41	11,48
Kaftarna kiselina	55,86	53,80	46,83	53,32	45,23	49,09
Kafeinska kiselina	2,09	1,13	2,53	3,69	1,21	5,18
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,11	1,38	0,64	1,87	0,44	0,72
Ferulinska kiselina	0,53	0,61	0,58	0,73	0,91	0,69
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	0,56	0,69	0,71	0,93	0,89	1,35
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2,61	4,48	3,00	1,97	4,32	1,77
Miricetin	6,79	1,28	2,90	2,08	1,31	0,57
Kvercetin	2,98	3,60	7,39	14,78	8,61	4,09
Kemferol	1,69	1,64	2,03	1,51	0,72	1,10
Izoramnetin	0,51	0,46	0,65	0,79	0,57	0,82
Indol-3-octena kiselina	0,102	0,157	0,095	0,076	0,197	0,123
<i>trans</i> -Resveratrol	0,98	1,00	1,12	1,87	2,43	2,32
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,16	2,19	1,56	2,55	2,43	2,36
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,32	0,18	0,03	n.d.	0,31	0,24
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,92	2,33	2,28	3,89	3,98	5,14
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,42	0,36	0,38	1,23	0,98	1,39
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	125,78	132,62	134,58	168,27	172,10	185,99
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	0,83	0,82	1,00	0,98	0,83	0,68
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	44,68	50,90	50,80	43,69	51,13	30,88
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	0,33	0,24	0,28	0,31	0,32	0,36
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	11,02	9,08	11,73	8,91	9,23	6,57

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.16. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Pinot crni (PCK=kontrolna varijanta, PCS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	PCK1	PCK2	PCK3	PCS1	PCS2	PCS3
Galna kiselina	6,63	7,50	12,77	7,13	14,65	6,04
Vanilinska kiselina	14,57	11,78	16,62	13,48	12,37	9,49
Siringinska kiselina	11,29	12,00	14,56	12,31	13,52	10,54
Epikatehin galat	n.d.	n.d.	3,17	3,36	1,97	1,17
Procijanidin B1	0,92	2,81	1,94	3,42	4,44	n.d.
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	1,22	8,69	3,10
Katehin	17,22	25,03	19,23	21,85	35,34	26,78
Procijanidin B2	1,72	16,60	n.d.	13,05	26,39	n.d.
Epikatehin	8,30	2,88	2,73	5,42	5,54	6,29
Kaftarna kiselina	15,34	32,26	39,99	26,16	28,37	29,91
Kafeinska kiselina	4,80	3,36	5,11	2,79	4,68	1,50
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,34	0,96	1,55	1,24	0,65	1,13
Ferulinska kiselina	1,30	0,95	1,07	0,74	0,86	0,92
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	0,50	0,75	1,03	0,52	0,81	1,39
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,95	5,69	7,77	4,95	6,14	7,37
Miricetin	1,30	1,01	2,78	1,16	1,47	1,32
Kvercetin	1,18	2,39	5,95	0,81	3,71	1,23
Kemferol	0,99	0,80	n.d.	0,38	0,92	n.d.
Izoramnetin	n.d.	n.d.	1,34	n.d.	0,98	n.d.
Indol-3-octena kiselina	n.d.	0,144	0,163	0,171	0,163	0,155
<i>trans</i> -Resveratrol	0,53	2,09	3,07	1,42	2,93	2,14
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,32	3,22	0,95	6,34	8,22	7,34
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,23	0,19	0,21	0,31	0,19	0,16
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	2,44	9,86	6,17	1,28	1,92	4,18
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,22	1,67	1,52	1,31	1,91	1,55
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	112,38	100,21	105,83	128,16	130,44	141,33
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.17. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Teran (TK=kontrolna varijanta, TS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	TK1	TK2	TK3	TS1	TS2	TS3
Galna kiselina	7,23	5,52	6,38	7,21	6,44	9,79
Vanilinska kiselina	10,91	17,68	15,36	14,92	16,43	16,93
Siringinska kiselina	9,87	7,32	10,53	11,97	11,16	9,10
Epikatehin galat	n.d.	0,95	n.d.	0,81	0,96	0,74
Procijanidin B1	n.d.	5,27	5,71	1,59	1,23	3,08
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Katehin	4,90	2,69	6,13	3,75	3,00	7,41
Procijanidin B2	n.d.	2,77	n.d.	3,77	3,40	1,24
Epikatehin	5,13	5,34	9,81	5,03	4,79	7,37
Kaftarna kiselina	28,70	34,50	36,55	31,50	24,12	39,68
Kafeinska kiselina	3,21	1,59	1,99	0,99	1,61	1,84
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,99	1,52	1,25	n.d.	1,69	1,75
Ferulinska kiselina	0,76	0,81	0,89	1,37	1,41	2,11
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	1,14	0,92	2,42	0,86	1,26	12,73
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	10,91	4,86	8,92	5,34	6,20	9,03
Miricetin	2,81	1,97	2,34	1,24	1,69	1,84
Kvercetin	2,22	1,73	1,60	1,38	2,86	6,20
Kemferol	1,51	0,99	0,89	1,32	2,23	1,81
Izoramnetin	0,61	0,59	0,73	0,91	0,47	0,88
Indol-3-octena kiselina	0,456	0,462	0,516	0,488	0,339	0,479
<i>trans</i> -Resveratrol	1,12	1,62	0,82	3,20	1,89	2,54
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	8,90	8,34	7,30	6,87	5,51	7,55
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,44	0,52	0,33	0,29	0,83	0,69
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,27	1,58	0,67	0,79	1,26	1,33
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	5,50	1,54	0,94	3,21	2,89	3,09
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	262,13	117,34	197,77	231,78	228,51	217,66
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	2,77	0,67	0,62	1,78	0,86	2,03
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	62,10	21,49	24,04	33,91	29,89	41,62
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	1,96	0,40	0,23	0,36	0,44	0,51
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	42,70	13,79	12,05	15,71	18,91	12,62

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.18. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Merlot (MK=kontrolna varijanta, MS=tretman solarizacije)

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹					
	MK1	MK2	MK3	MS1	MS2	MS3
Galna kiselina	17,32	12,17	14,66	15,29	18,57	17,19
Vanilinska kiselina	3,42	6,13	6,39	7,44	10,18	7,65
Siringinska kiselina	2,58	2,09	3,54	2,23	3,25	3,17
Epikatehin galat	1,91	1,80	1,62	1,42	1,71	1,80
Procijanidin B1	2,64	1,89	3,73	2,13	1,40	0,92
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,26	n.d.
Katehin	23,78	25,64	21,98	22,56	21,60	23,31
Procijanidin B2	12,42	n.d.	20,54	n.d.	17,85	n.d.
Epikatehin	10,57	9,12	8,59	8,67	7,24	7,99
Kaftarna kiselina	29,37	23,00	23,55	23,82	26,60	26,81
Kafeinska kiselina	2,86	1,94	4,57	0,61	1,64	3,96
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,18	0,85	1,79	0,79	1,04	1,64
Ferulinska kiselina	2,28	1,96	1,58	2,04	2,36	1,13
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	1,48	0,59	1,63	1,42	0,90	0,96
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	3,57	4,36	6,82	2,93	5,32	6,71
Miricetin	6,39	2,28	3,04	2,65	5,55	4,08
Kvercetin	4,98	9,16	10,77	5,02	4,05	4,37
Kemferol	0,75	0,98	1,22	1,36	1,19	1,38
Izoramnetin	1,19	1,83	1,19	1,32	2,07	1,11
Indol-3-octena kiselina	1,031	0,127	0,113	0,202	0,104	0,167
<i>trans</i> -Resveratrol	5,32	4,43	1,92	1,86	3,27	2,76
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	8,98	11,45	7,00	10,61	8,37	9,67
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	12,73	10,13	11,33	12,92	7,67	12,41
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,00	1,85	2,00	1,00	1,32	2,00
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	156,89	148,75	147,97	199,20	113,06	201,19
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	2,34	2,76	2,11	2,69	2,25	2,19
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glukozid	42,12	39,61	38,28	34,11	33,51	35,89
Peonidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	2,71	1,40	0,83	2,49	1,29	3,58
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -kumaril)-glukozid	19,41	13,03	11,23	13,89	12,67	14,21

n.d.-nije detektirano

Tablica 4.19. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), ukupnih antocijana (ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Plavac mali te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (PMK=kontrolna varijanta, PMS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) / mg L^{-1}	Ukupni antocijani γ (MAE) / mg L^{-1}	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) / mg L^{-1}	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / mmol L^{-1}	
				DPPH	ABTS
PMK1	2287,13	311,88	222,48	21,62	19,89
PMK2	1802,75	226,26	141,43	19,22	17,63
PMK3	1859,31	266,56	141,00	19,63	17,01
PMS1	1986,91	263,20	162,20	21,9	18,9
PMS2	2335,20	308,48	236,2	25,21	20,59
PMS3	1568,15	229,66	91,65	16,14	14,24

Tablica 4.20. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), ukupnih antocijana (ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Cabernet Sauvignon te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (CSK=kontrolna varijanta, CSS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) / mg L^{-1}	Ukupni antocijani γ (MAE) / mg L^{-1}	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) / mg L^{-1}	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / mmol L^{-1}	
				DPPH	ABTS
CSK1	2305,65	345,25	163,45	21,80	20,10
CSK2	2345,12	297,64	173,26	23,53	20,36
CSK3	2299,64	318,20	157,13	21,17	18,96
CSS1	2004,32	360,71	211,42	21,34	19,74
CSS2	1941,62	242,23	200,38	21,49	18,11
CSS3	2186,82	348,21	232,71	20,64	17,69

Tablica 4.21. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), ukupnih antocijana (ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Pinot crni te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (PCK=kontrolna varijanta, PCS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) / mg L^{-1}	Ukupni antocijani γ (MAE) / mg L^{-1}	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) / mg L^{-1}	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / mmol L^{-1}	
				DPPH	ABTS
PCK1	1041,43	105,52	29,55	15,92	13,79
PCK2	1028,25	92,49	28,10	15,84	13,96
PCK3	1009,13	102,41	30,30	16,09	14,77
PCS1	1035,17	204,79	42,4	15,98	14,87
PCS2	1351,21	195,45	75,35	19,22	15,96
PCS3	1510,25	228,60	91,10	18,77	15,98

Tablica 4.22. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), ukupnih antocijana (ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Teran te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (TK=kontrolna varijanta, TS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) / mg L^{-1}	Ukupni antocijani γ (MAE) / mg L^{-1}	Ukupni flavan-3-oli γ (CAE) / mg L^{-1}	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / mmol L^{-1}	
				DPPH	ABTS
TK1	1196,22	238,41	96,31	15,66	12,82
TK2	1426,14	290,03	78,50	16,47	14,68
TK3	1240,22	303,14	80,20	17,79	13,27
TS1	1403,10	325,89	101,36	17,77	15,14
TS2	1348,05	358,85	81,50	17,04	14,26
TS3	1389,83	310,23	79,04	16,91	13,98

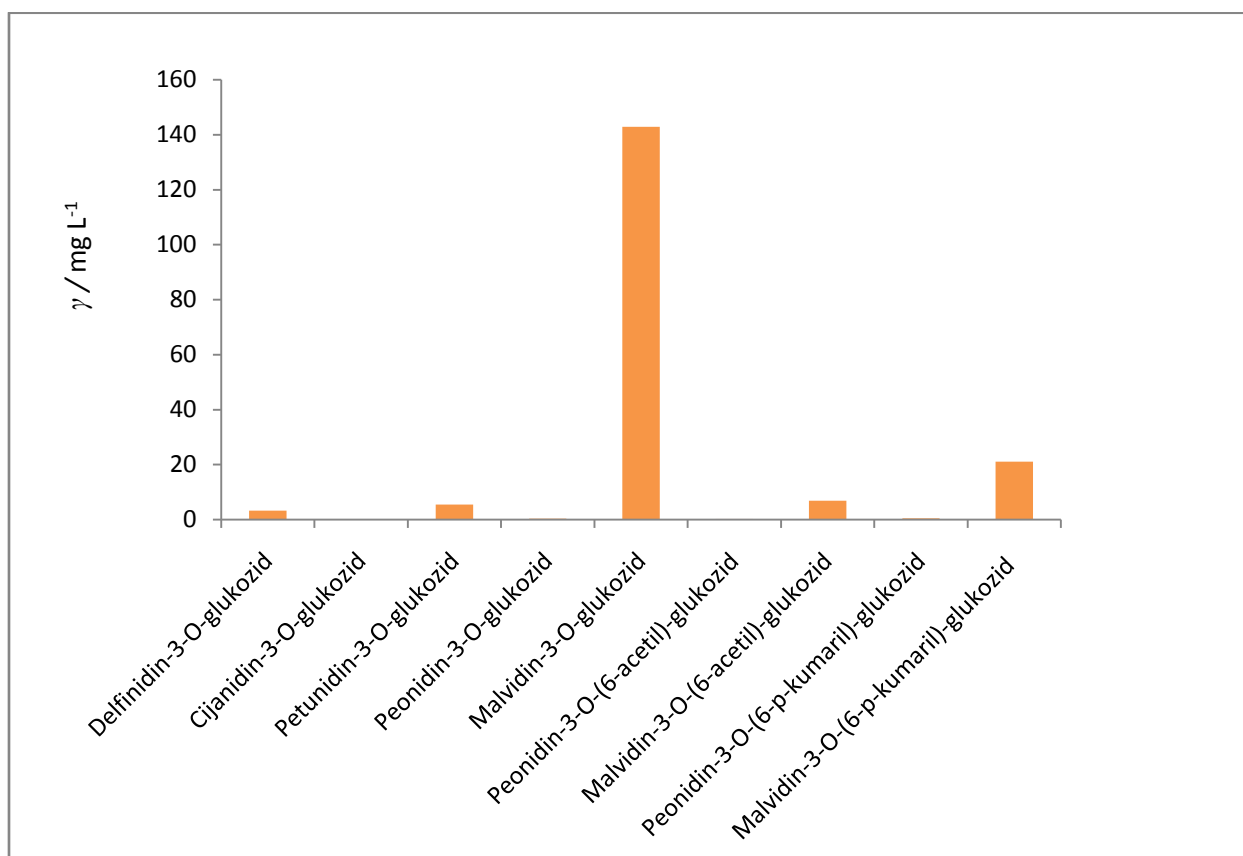
Tablica 4.23. Masene koncentracije ukupnih fenola (ekvivalenti galne kiseline), ukupnih antocijana (ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida) i ukupnih flavan-3-ola (ekvivalenti (+)-katehina) u vinima kultivara Merlot te antioksidacijske vrijednosti (ekvivalenti Troloxa) tih vina (MK=kontrolna varijanta, MS=tretman solarizacije)

Uzorak	Ukupni fenoli γ (GAE) / mg L^{-1}	Ukupni antocijani γ (MAE) / mg L^{-1}	Ukupni flavan- 3-oli γ (CAE) / mg L^{-1}	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / mmol L^{-1}	
				DPPH	ABTS
MK1	1740,34	268,20	75,45	18,97	16,71
MK2	1745,35	295,52	92,45	19,13	18,32
MK3	1936,70	278,20	93,75	18,63	20,59
MS1	1707,21	269,96	84,43	19,24	15,98
MS2	1802,35	268,40	103,20	19,36	16,63
MS3	1723,05	311,48	101,5	18,73	15,21

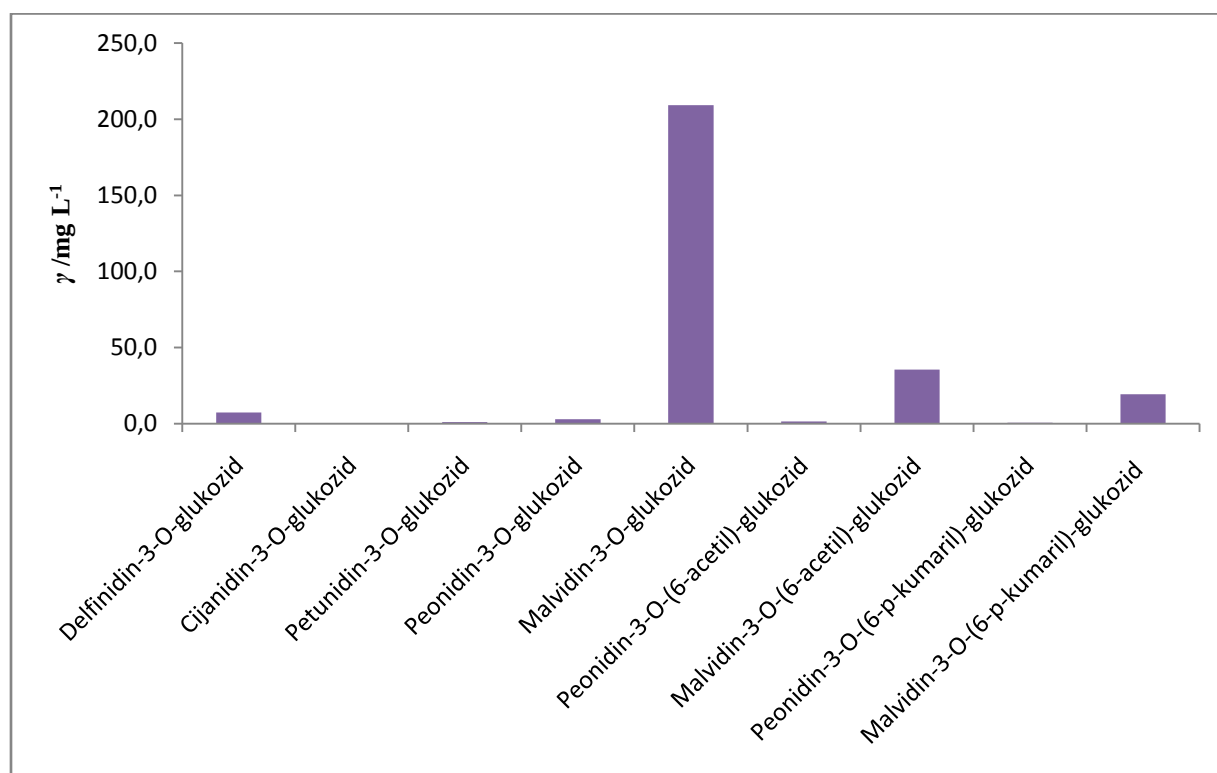
Sadržaj ukupnih fenola u crnim vinima bio je u rasponu od 1009,13 mg L^{-1} za Pinot crni do 2345,12 mg L^{-1} za Cabernet Sauvignon. Određen je i sadržaj ukupnih antocijana, čije su masene koncentracije bile u rasponu od 92,49 mg L^{-1} do 360 mg L^{-1} . U svim uzorcima najdominantniji spoj bio je malvidin-3-*O*-glukozid. Prema očekivanjima najniže razine antocijana, ukupnih i pojediničanih zabilježene su u uzorcima Pinota crnog. Karakteristike sorte Pinot crni su osim niskih masenih koncentracija antocijana i nepostojanje acetiliranih i kumarilnih oblika antocijana. Drugi po zastupljenosti u crnim vinima su flavan-3-oli. Njihov ukupan sadržaj bio je u rasponu od 28,10 mg L^{-1} do 236,2 mg L^{-1} . Najzastupljeniji spoj iz skupine flavan-3-ola bio je katehin u rasponu masenih koncentracija od 2,69 mg L^{-1} do 79,73 mg L^{-1} . Najniže koncentracije katehina zabilježene su u Teranu, a najviše u Cabernet Sauvignonu. Najzastupljeniji spoj iz skupine hidroksicimetnih kiselina bila je kaftarna kiselina u rasponu masenih koncentracija od 11,07 mg L^{-1} do 56,10 mg L^{-1} . Kaftarna i kafeinska kiselina zabilježene su u svim uzorcima crnih vina. Od flavonola najzastupljeniji spoj bio je kvercetin-3-*O*-glukozid, čije su se masene koncentracije od 1,77 mg L^{-1} do 28,77 mg L^{-1} . U svim uzorcima crnih vina bile su zastupljene galna, vanilinska i siringinska kiselina.

Trans-resveratrol zabilježen je u svim uzorcima crnih vina u masenim koncentracijama od 0,4 mg L^{-1} do 5,3 mg L^{-1} .

Na temelju masenih koncentracija antocijana u Teranu i Plavcu malom može se utvrditi profil antocijana u tim vinima. U Plavcu malom koncentracije antocijana snižavaju se u nizu: malvidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > delfinidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid. Vrlo važan kemotaksonomijski podatak je i da su masene koncentracije kumaril-glukozida bile više od koncentracija acetiliranih glukozida. U Teranu se masene koncentracije antocijana snižavaju u nizu: malvidin-3-O-glukozid > delfinidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid. Masene koncentracije acetiliranih glukozida bile su više od koncentracija kumarilnih glukozida. Cijanidin-3-O-glukozid najmanje je zastupljen antocijan i najčešće se ne može odrediti njegova masena koncentracija jer je niža od granice detekcije. U vinima Terana cijanidin-3-O-glukozid zabilježen je u svim uzorcima. Na slikama 4.3 i 4.4 prikazani su antocijanski profili Plavca malog i Terana.

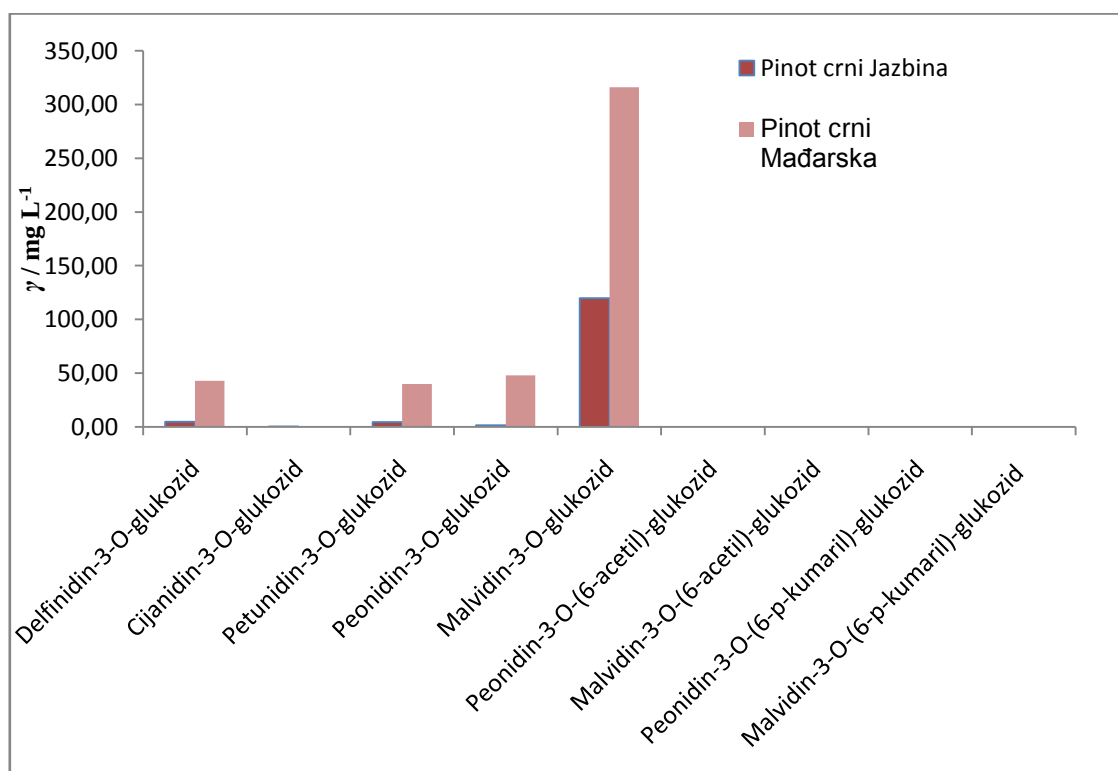


Slika 4.3. Antocijanski profil Plavca malog

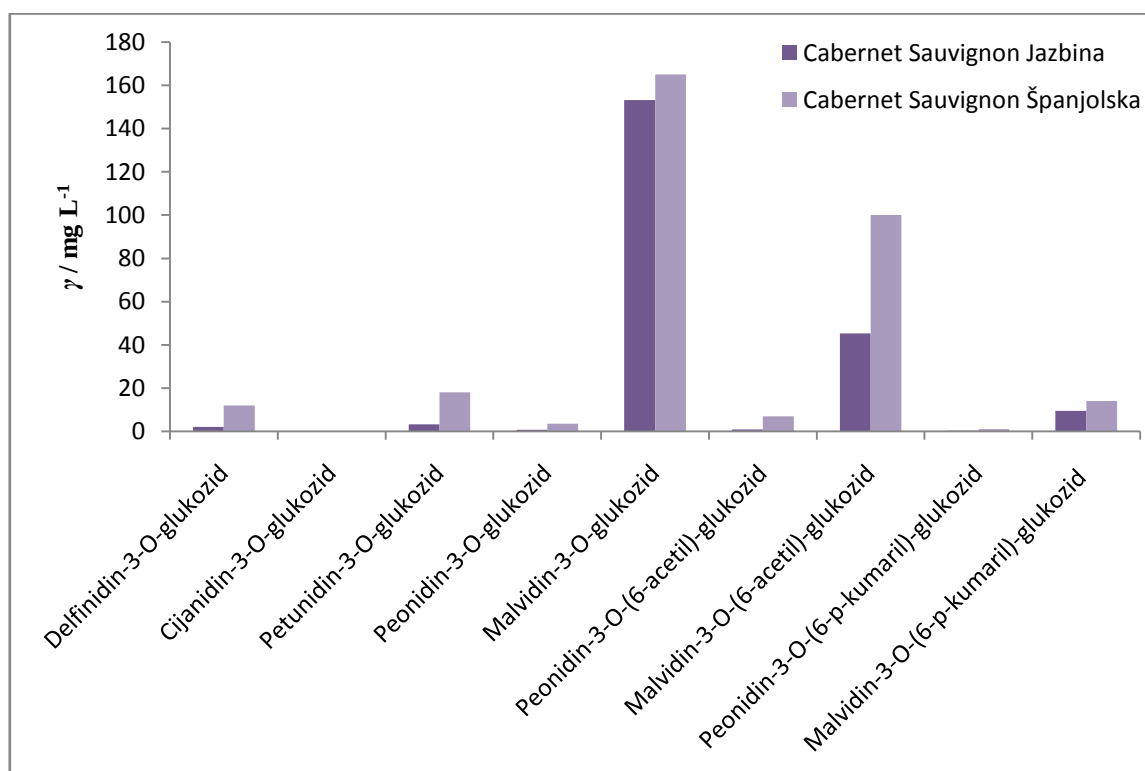


Slika 4.4. Antocijanski profil Terana

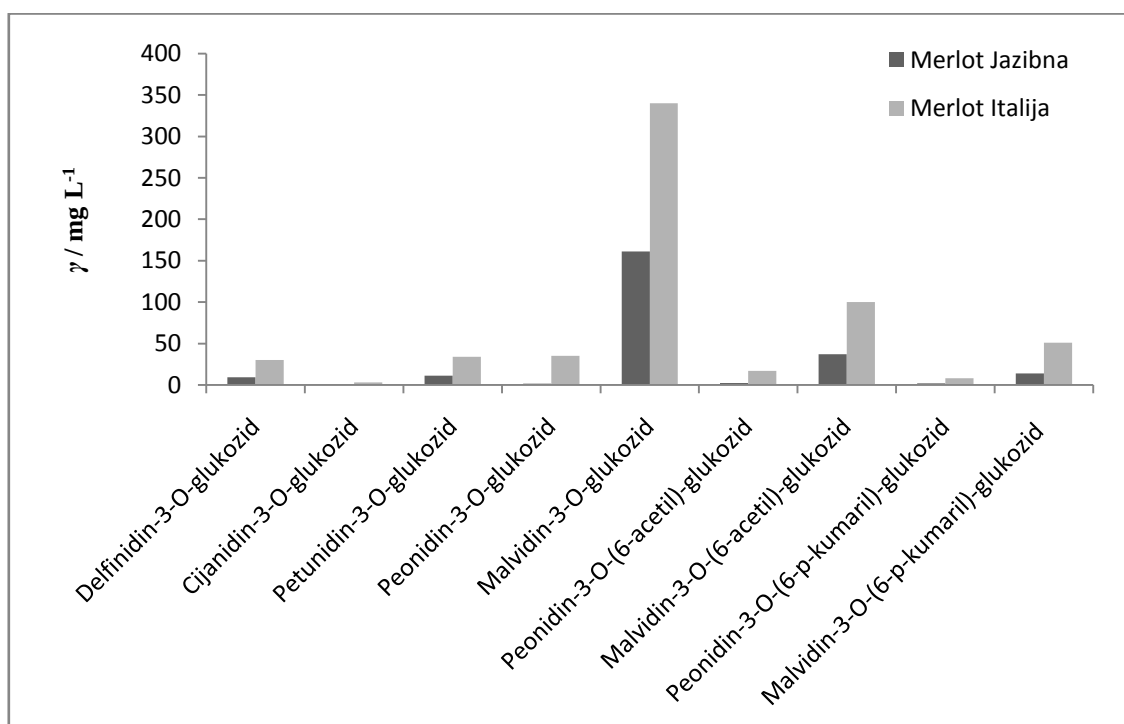
Usporedbom s podacima iz svjetske literature (tablica 2.3) vidljivo je da su masene koncentracije antocijana analiziranih u ovom radu u vinima Pinota crnog, Merlota i Cabernet Sauvignona s lokacije Jazbina usporedljive ili niže od koncentracija u vinima iz Španjolske, Italije i Mađarske (slike od 4.5 do 4.7). Na takve rezultate može utjecati geografski položaj (mediteranska klima), primijena različitih vrsta kvasaca te primjenjeni postupak vinifikacije.



Slika 4.5. Usporedba masenih koncentracija antocijana u uzorcima vina Pinot crni s lokacije Jazbina i Mađarske



Slika 4.6. Usporedba masenih koncentracija antocijana u uzorcima vina Cabernet Sauvignon s lokacije Jazbina i Španjolske



Slika 4.7. Usporedba masenih koncentracija antocijana u uzorcima vina Merlot s lokacije Jazbina i Italije

U crnim vinima su masene koncentracije indol-3-octene kiseline bile u rasponu od $76,2 \mu\text{g L}^{-1}$ do $1031,20 \mu\text{g L}^{-1}$. Najviše razine indol-3-octene kiseline zabilježene su u Teranu. U usporedbi s rezultatima Creasya i suradnika⁸⁵ koji su određivali IAA u crnim vinima iz Mađarske, koncentracije u vinima analiziranim u ovom radu niže su nego u mađarskim vinima. U dva uzorka, Pinotu crnom (kontrolna varijanta) i Plavcu malom (solarizacija), IAA uopće nije detektirana. Indol-3-octena kiselina u vinu je uglavnom u konjugiranom obliku.

Niti u jednom od 48 uzoraka bijelih i crnih vina u kojima su analizirani pojedinačni polifenoli i indol-3-octena kiselina, nije detektirana *trans*-cimetna kiselina i kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin). U literaturi^{59,79} se vrlo često objavljuju koncentracije *trans*-cimetne kiseline i rutina u vinima, međutim nekolicina autora^{3,9,51} tvrdi da kvercetin-3-*O*-rutinozida u vinima nema te da je vjerojatno došlo do zabune prilikom identifikacije s kvercetin-3-*O*-glukunoridom koji je najzastupljeniji glikozid u crnim vinima.

Suprotno istraživanju Jeffereya i suradnika⁵¹ koji u vinima Pinota crnog nisu detektirali glikozide, u ovom je radu kvercetin-3-*O*-glukozid je bio detektiran u svim uzorcima Pinota crnog u rasponu masenih koncentracija od $0,95 \text{ mg L}^{-1}$ do $7,77 \text{ mg L}^{-1}$. To se može objasniti koncentriranjem analita ekstrahiranog iz uzorka na čvrstoj fazi čime se povećala osjetljivost detekcije i određivanja flavonola općenito.

Masene koncentracije polifenolnih sastavnica u vinima određene u ovom radu slične su koncentracijama u vinima s područja južne i središnje Europe te Hrvatske (tablice 2.1 do 2.8).

U vinima čije je grožđe bilo podvrgnuto tretmanu solarizacije niti u jednom slučaju nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u odnosu na kontrolne varijante. Klimatološki su 2008. i 2009. bile prosječne godine s prosječnim satima sijanja sunca. Tehnika solarizacije možda bi bila učinkovitija u godinama u kojima su u vrijeme vegetacije (od 1. travnja do 30. listopada) temperature zraka i sati sijanja sunca ispod prosjeka.

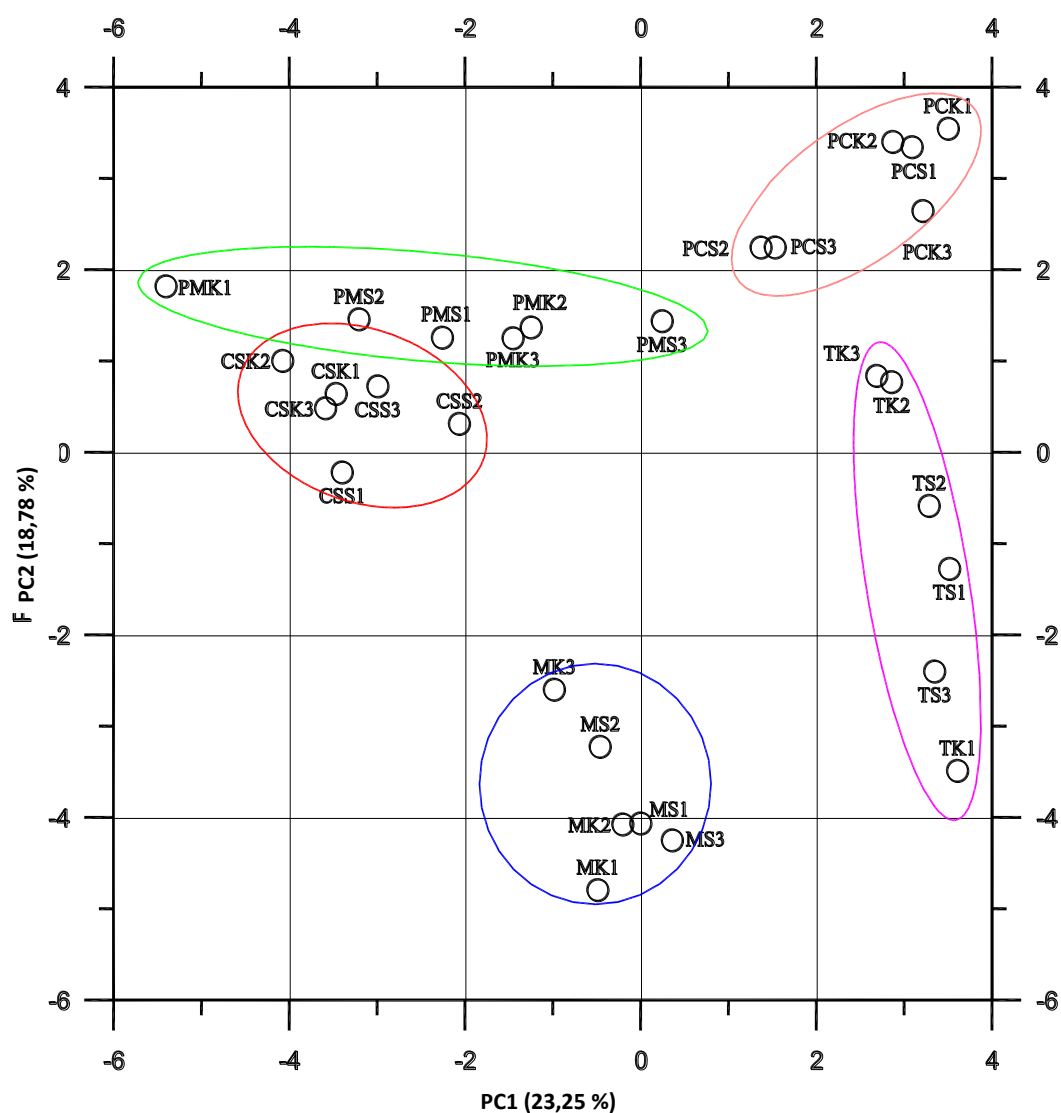
4.4.1. Računalno simuliranje klasifikacije različitih kultivara vina

Strojno je učenje automatizacija procesa induktivnog učenja. Standardne metode strojnog učenja pokušavaju pronaći i opisati strukturne pravilnosti u podacima, a mogu biti klasifikacijske ili asocijacijske. U asocijacijskom učenju primjeri (u našem slučaju biološka varijabla) nisu klasificirani (učenje bez učitelja ili nenadzirano učenje), a cilj je postupka uočiti implicitne odnose koji postoje među podacima (molekulskim deskriptorima).¹⁶⁵ U ovu skupinu analitičkih metoda svrstava se analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), samoorganizirajuće mape (engl. *Self-Organizing Map*, SOM), metoda *k*-najbližih susjeda (engl. *K-Nearest-Neighbour*, KNN), formiranje dendograma te analiza klastera i dr. Glavna prednost nenadziranog učenja je nepristranost algoritma u prilagođavanju zavisne varijable nezavisnoj, kao što je npr. traženje korelacije.¹⁶⁶

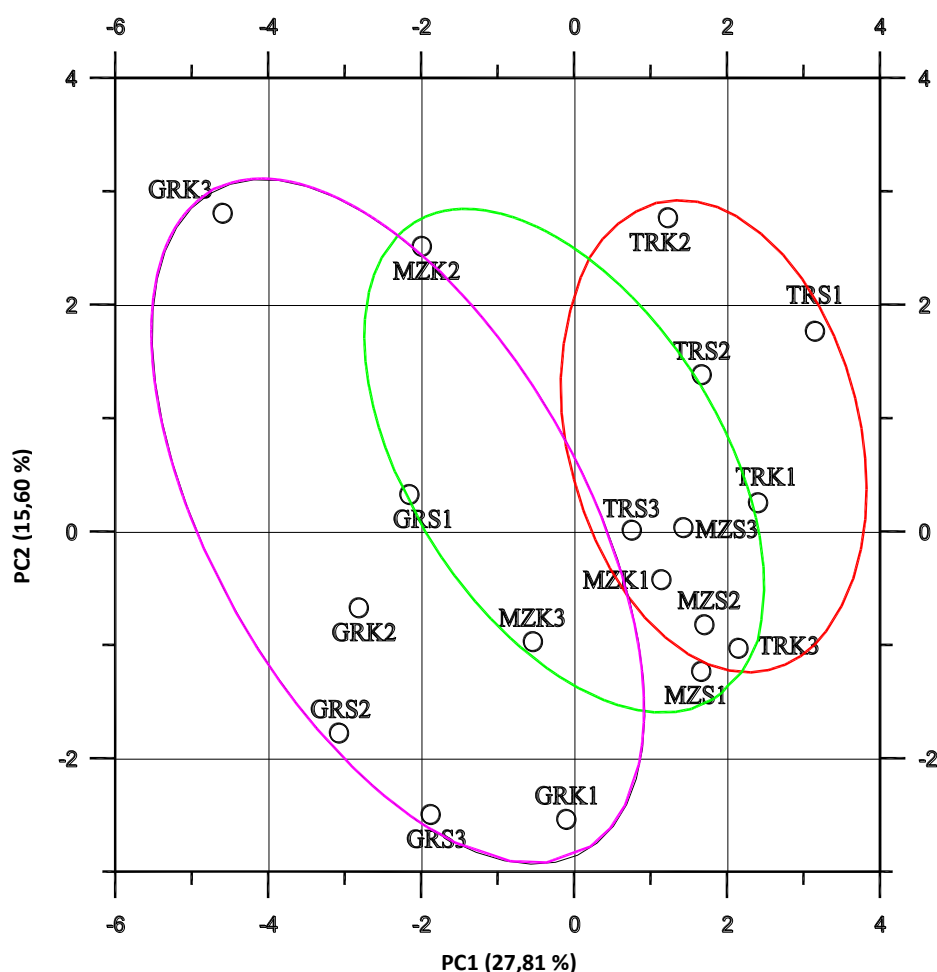
Analizu glavnih komponenti je prvi put opisao Karl Pearson 1901. godine, a metodu je primijenio Harold Hotelling 1933. godine. Metoda PCA je vrlo dobar alat za određivanje glavnih karakteristika skupa podataka i učinkovita je za smanjenje dimenzionalnosti i prepoznavanje uzorka.¹⁶⁸

U ovom radu primjenjena je analiza glavnih komponenti kako bi se istražilo moguće grupiranje uzoraka crnih i bijelih kultivara vina prema sadržaju pojedinačnih i ukupnih polifenola, flavan-3-ola, antocijana te antioksidacijskih aktivnosti određenih prema radikalu ABTS i DPPH.

Na slici 4.8 i 4.9 prikazani su PCA-dijagrami za uzorke crnih vina (Plavac mali, Merlot, Cabernet Sauvignon, Teran i Pinot crni) i bijelih vina (Graševina, Traminac, Manzoni)



Slika 4.8. Distribucija vina Plavac mali (PM), Merlot (M), Teran (T), Cabernet Sauvignon (CS) te Pinot crni (PC) u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih polifenola, indol-3-octene kiseline, ukupnih polifenola, flavan-3-ola, antocijana i antioksidacijskih aktivnosti određenih radikalima ABTS i DPPH



Slika 4.9. Distribucija vina Graševina (GR), Manzoni (MZ) i Traminac (TR) u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih polifenola, indol-3-octene kiseline, ukupnih polifenola, flavan-3-ola i antioksidacijskih aktivnosti određenih radikalima ABTS i DPPH

Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) u uzorcima crnih vina (slika 4.8) objašnjavaju 42,03 % ukupne varijance. Distribucija uzoraka u koordinatnom sustavu upućuje da razlika između uzoraka tretiranih solarizacijom i kontrolnih uzoraka nema, ali je vidljivo klasteriranje kultivara. Vina Plavca malog i Cabernet Sauvignona pozicionirana su u drugom kvadrantu, dok su Pinot crni i Teran pozicionirani u prvom i četvrtom kvadrantu. Uzorci vina Merlota grupirali su se u trećem kvadrantu.

U uzorcima bijelih vina prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) objašnjavaju 43,41 % ukupne varijance (slika 4.9). Uzorci su grupirani u koordinatnom sustavu tako da vina Traminca gravitiraju prema prvom kvadrantu, vina Manzonija prema četvrtom kvadrantu, a vina Graševine prema trećem kvadrantu.

4.4.2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka vina

Rezultati antioksidacijske aktivnosti vina određeni pomoću dviju metoda DPPH i ABTS međusobno su se razlikovali zbog različitih radikala primjenjenih za mjerenje, različite duljine reakcije kao i različite valne duljine apsorpcije. Sva analizirana vina pokazala su antioksidacijsku aktivnost. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti zabilježene su u vinima Cabernet Sauvignona. Antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Troloxa, bila je 23,53 mmol L⁻¹ pri određivanju metodom DPPH, a 20,36 mmol L⁻¹ pri određivanju metodom ABTS. Najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražene u ekvivalentima Troloxa zabilježene su u vinima Traminca i bile su 603 μmol L⁻¹ pri određivanju DPPH-metodom, odnosno 436,8 μmol L⁻¹ pri određivanju ABTS-metodom.

Rezultati su uspoređeni s rezultatima istraživanja antioksidacijske aktivnosti u crnim vinima iz Hrvatske i svijeta.^{77,79,80,83,89} Piljac i suradnici¹⁶⁸ određivali su antioksidacijsku aktivnost različitih crnih vina iz Hrvatske DPPH-metodom. Rezultati, izraženi u ekvivalentima Troloxa, bili su u rasponu od 8,22 mmol L⁻¹ do 11,43 mmol L⁻¹.

Šeruga i suradnici¹⁶⁹ mjerili su antioksidacijsku aktivnost 11 crnih vina i odredili metodom ABTS vrijednosti u rasponu od 7,5 mmol L⁻¹ do 30 mmol L⁻¹, a metodom DPPH od 8,6 mmol L⁻¹ do 40,6 mmol L⁻¹ izraženih u ekvivalentima Troloxa. Vinković Vrček i suradnici¹⁷⁰ mjerili su antioksidacijsku aktivnost u ekvivalentima Troloxa u različitim crnim i bijelim vinima. Antioksidacijske aktivnosti bijelih vina određenih metodom ABTS bile su u rasponu od 0,3 mmol L⁻¹ do 0,7 mmol L⁻¹, a za crna vina od 3 mmol L⁻¹ do 12 mmol L⁻¹. Vrijednosti određene metodom DPPH bile su u rasponu od 0,8 mmol L⁻¹ do 1,2 mmol L⁻¹ za bijela vina, a od 5 mmol L⁻¹ do 21 mmol L⁻¹ za crna vina.

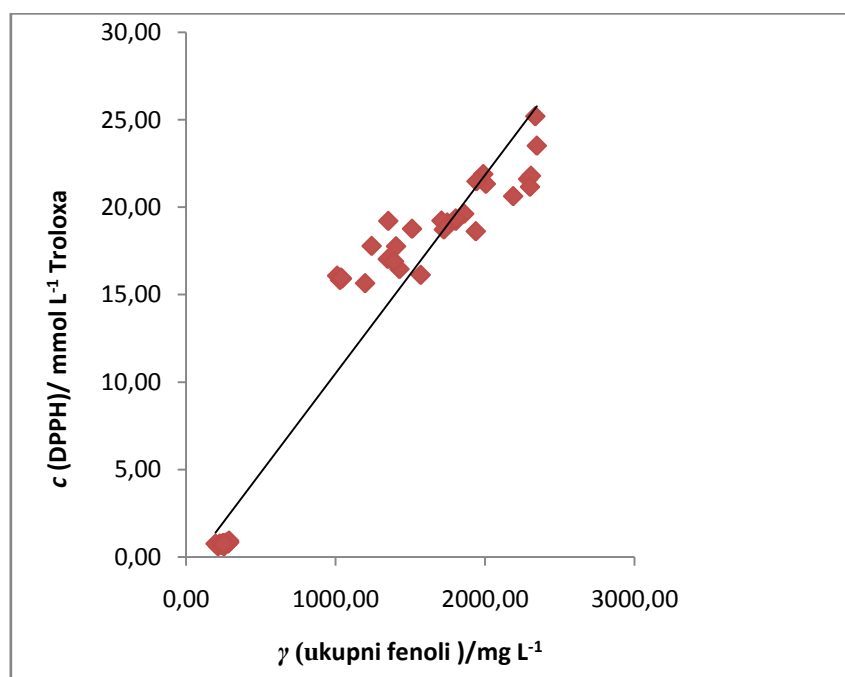
Kao što je vidljivo, više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivaju se metodom DPPH. Crna vina imaju višu antioksidacijsku aktivnost od bijelih vina. Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti ovise o sadržaju molekula antioksidansa u grožđu što je uvjetovano sortom i geografskim položajem, načinu vinifikacije tj. duljini maceracije te njezi

i skladištenju vina. S ciljem utvrđivanja povezanosti masenih koncentracija ukupnih fenola s antioksidacijskom aktivnosti vina određenom dvjema metodama izračunata je korelacija između tih parametara. Rezultati su prikazani u tablici 4.24 i na slici 4.10. Visoki korelacijski koeficijenti pokazuju da je korelacija između istraživanih pokazatelja pozitivna, vrlo jaka i visoko značajna.

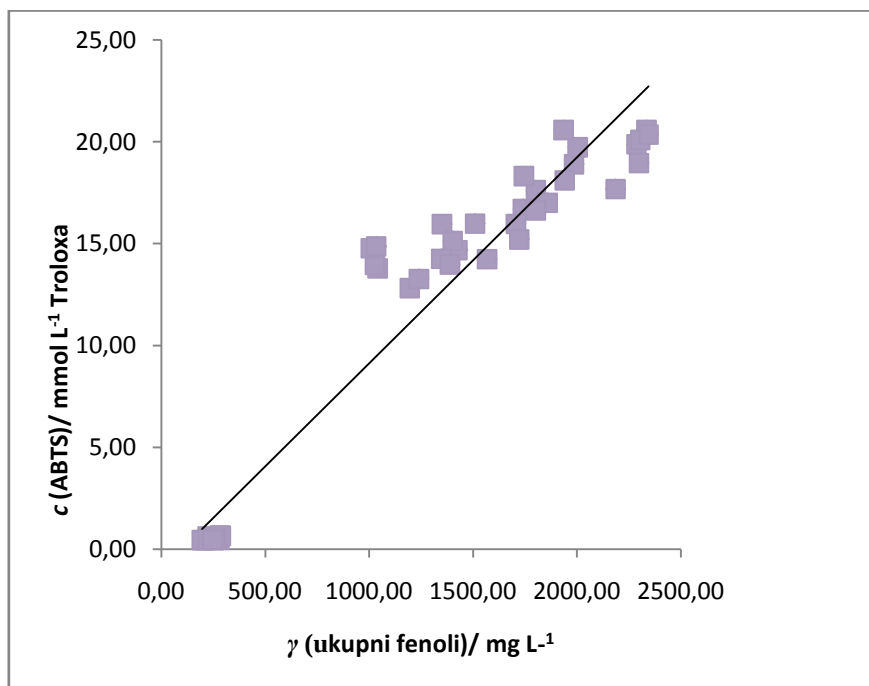
Tablica 4.24. Koeficijenti korelacije (r) masenih koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijskih aktivnosti vina određenih metodama ABTS i DPPH i koeficijent korelacije antioksidacijskih aktivnosti vina određenih dvjema različitim metodama

Pokazatelj	Korelacijski koeficijent (r)
Ukupni fenoli vs ABTS	0,967
Ukupni fenoli vs DPPH	0,964
DPPH vs ABTS	0,993

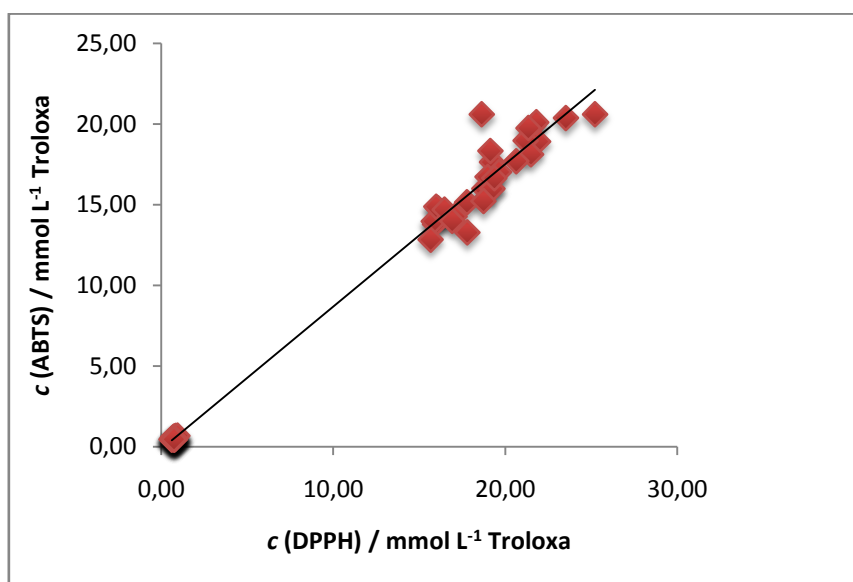
a)



b)



c)



Slika 4.10. Linearna korelacija masene koncentracije ukupnih fenola u vinu i antioksidacijske aktivnosti vina određene metodom a) DPPH i b) ABTS te c) linearna korelacija antioksidacijskih aktivnosti vina određenih dvjema različitim metodama

4.5. Analitički postupak određivanja 2-aminoacetofenona

Spoj 2-aminoacetofenon odgovoran je za netipičnu aromu starenja vina. Iako do danas još uvijek nije do kraja objašnjen mehanizam njegova nastajanja, smatra se da je indol-3-octena kiselina prekursor 2-aminoacetofenona. U ovom radu ispitane su četiri vrste komercijalnih kvasaca i njihov mogući utjecaj na nastajanje 2-aminoacetofenona. Također, ispitan je utjecaj amonijevog sulfata koji se u vino dodaje kao hrana za kvasce. Dodatak amonijeve soli u medij poput mošta utječe na smanjenu potrošnju triptofana što je povezano sa smanjenom sintezom indol-3-octene kiseline. Istraživanja su pokazala da su uzroci pojave UTA vrlo kompleksni, a obuhvaćaju prerani rok berbe, slabu ishranu loze, sušu i preopterećenost loze. Čini se da su aromatične sorte posebno podložne pojavi UTA, iako se UTA često se javlja i u vinima tipa Rizling rajnski. Kvaliteta i intenzitet ukupnih aroma vina ima odlučujući utjecaj na senzornu uočljivost UTA, te je moguće da pri određenoj koncentraciji 2-AAP u jednom tankom vinu UTA jako izražena, dok se pri istoj koncentraciji u snažnim i punim vinima ne osjeća. Nakon što se pojavi, netipičnu aromu starenja vina gotovo je nemoguće ukloniti primjenom enoloških sredstava. Iako je ovaj nedostatak organoleptički detektiran unazad par godina i u bijelim vinima Hrvatske, do sada nije znanstveno istraživano.

Razvijena je i validirana metoda određivanja 2-aminoacetofenona u vinu sustavom GC-MS uz prethodnu mikroekstrakciju na divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksanskom vlaknu. Optimirana su dva postupka SPME: mikroekstrakcija uranjanjem vlakna izravno u vino i mikroekstrakcija iz para iznad otopine pomognuta ultrazvukom. Postupak mikroekstrakcije iz para iznad otopine uzorka uronjenog u ultrazvučnu kupelj dosad nije primjenjivan za analizu 2-aminoacetofenona u vinu. Ekstrakcija pomognuta ultrazvučnim valovima poznata je kao korisna i brza metoda u analizi aroma u vinu.¹⁷¹ S obzirom da su se mikroekstrakcija na čvrstoj fazi i ekstrakcija pomognuta ultrazvučnim valovima pokazale vrlo uspješnim metodama ekstrakcije, u ovom radu pokušalo se objediniti ove dvije vrste ekstrakcije.

4.5.1. Optimiranje uvjeta mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona iz vina na čvrstoj fazi

Svi pokusi optimiranja mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona iz vina provedeni su s bijelim vinom kultivara Rizling rajnski berbe 2008. u koji je dodana poznata koncentracija 2-AAP. Nakon mikroekstrakcije postupkom UA-HS-SPME ili DI-SPME provedena je plinskokromatografska analiza uz radne uvjete opisane u poglavlju 3.5. Tijekom plinskokromatografske analize, vlakno je bilo u injektoru.

Istražena je ovisnost djelotvornosti mikroekstrakcije 2-AAP iz vina o dodatku natrijevog klorida u uzorak vina, vremenu uravnotežavanja te vremenu i temperaturi ekstrakcije.

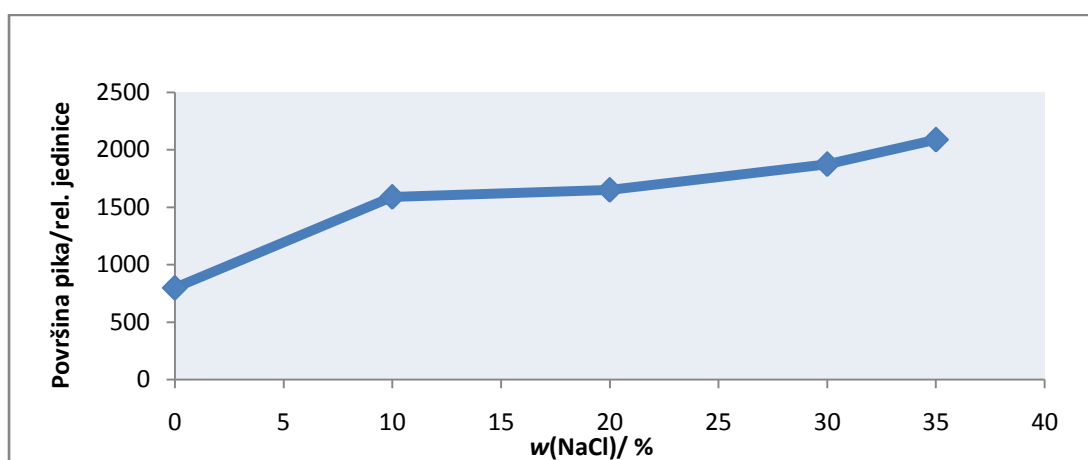
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognuta ultrazvukom

Dodatak soli značajno pospješuje učinkovitost ekstrakcije polarnih i hlapljivih spojeva. Stoga je u ovom radu ispitan dodatak NaCl u vinu u rasponu masenih udjela od 0 % do 35 %. U 10 mL vina kojem je prethodno dodan 2-AAP u masenoj koncentraciji $2 \mu\text{g L}^{-1}$ dodano je 1 g, 2 g i 3,5 g NaCl, što odgovara masenim udjelima od 10 %, 20 % i 35 % NaCl. Na slici 4.11 jasno se vidi da je najveći kromatografski signal (površina pika) postignut uz maseni udjel NaCl u vinu od 35 %.

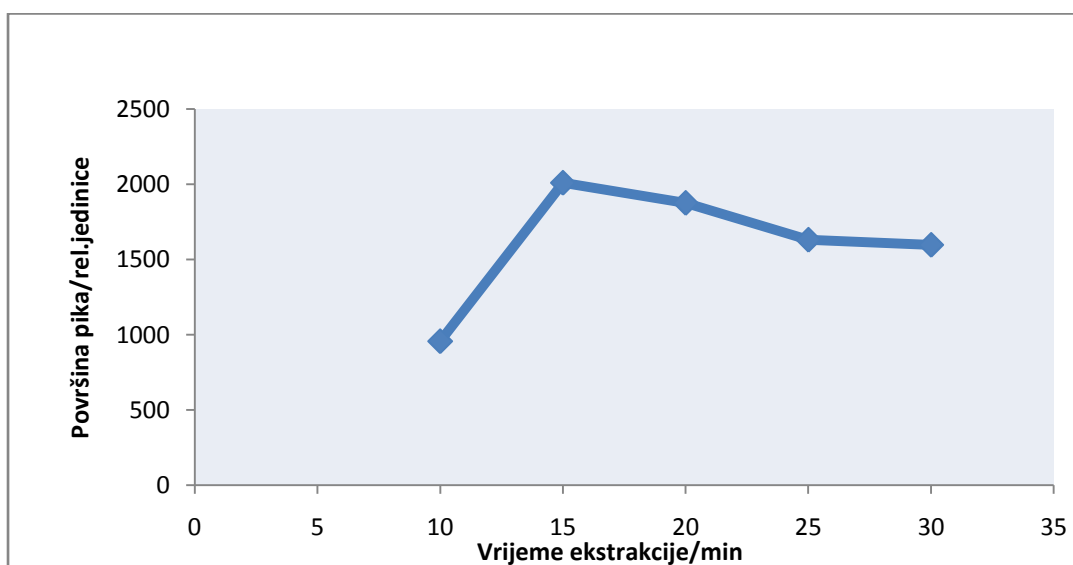
Utjecaj vremena ekstrakcije na njenu djelotvornost ispitan je izlaganjem SPME-vlakna parama iznad 10 mL uzorka vina u trajanju od 2 minute do 30 minuta. Uzorak vina sadržavao je $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP-a i NaCl u masenom udjelu od 35 %. Najveća površina kromatografskog pika postignuta je ekstrakcijom u trajanju od 15 minuta (slika 4.12).

Utjecaj temperature ekstrakcije na njenu djelotvornost ispitan je zagrijavanjem bočice s 10 mL uzorka vina koje je sadržavalo $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP i 3,5 g NaCl na 35 °C, 50 °C i 60 °C. Također je ispitana i djelotvornost ekstrakcije bez zagrijavanja. Iz slike 4.13 vidljivo je da su djelotvornosti ekstrakcije provedene bez zagrijavanja i uz zagrijavanje uzorka na 35 °C podjednake. Značajan porast površine kromatografskog pika zabilježen je na 50 °C te je ta temperatura odabrana za daljnja istraživanja.

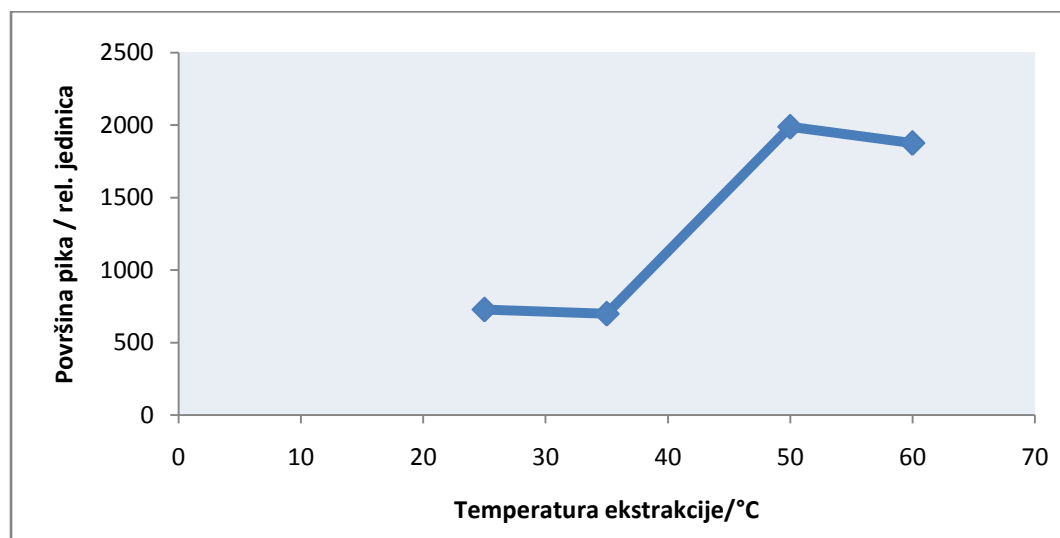
Nakon optimiranja uvjeta ekstrakcije, ispitana je linearnost odziva spektrometra masa kao detektora analizom standardnih otopina 2-AAP pripremljenih u sintetskom vinu (tablica 4.25). Granica detekcije koja je ujedno i granica određivanja bila je $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$. Analitički povrat ispitan je dodatkom $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ i $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP-a u uzorak vina. Za svaku su koncentraciju provedena po tri određivanja. Analitički povrati bili su ovisno o koncentracijama 2-AAP u rasponu od 59 % do 83 %. Najveći analitički povrat postignut je pri najvišoj masenoj koncentraciji 2-AAP u vinu dodatkom najveće masene koncentracije uz RSD od 11 % do 23 %.



Slika 4.11. Utjecaj dodatka soli na djelotvornost mikroekstrakcije 2-AAP-a na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognute ultrazvukom



Slika 4.12. Utjecaj vremena ekstrakcije na djelotvornost mikroekstrakcije 2-AAP-a na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognute ultrazvukom



Slika 4.13. Utjecaj temperature na djelotvornost mikroekstrakcije 2-AAP-a na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognute ultrazvukom

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem vlakna u uzorak

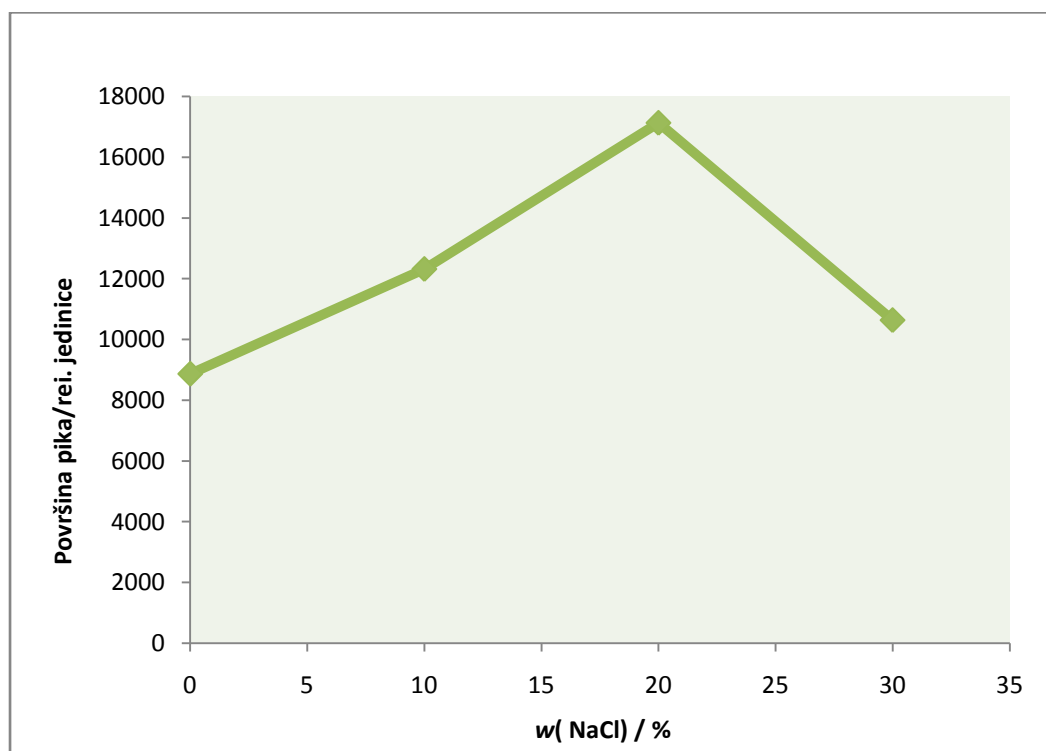
Utjecaj dodatka soli na djelotvornost ekstrakcije ispitan je analizom uzorka od 15 mL vina koje je sadržavalo $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP i različite masene udjele natrijeva klorida (0 %, 10 %, 20 % i 30 %). Prema rezultatima prikazanim na slici 4.14 najveća djelotvornost ekstrakcije postignuta je uz maseni udjel natrijeva klorida od 20 %.

pH uzorka može također utjecati na djelotvornost ekstrakcije analita. Uspoređena je djelotvornost ekstrakcije 2-AAP iz vina prirodnog pH i iz vina zaluženog s 1 mol L^{-1} NaOH do pH =7 i pH =8. Iz zaluženih vina talože se esteri. Razlike u djelotvornosti ekstrakcije pri prirodnom pH vina i iz zaluženih vina bile su neznčajne. Daljnje ekstrakcije 2-AAP iz vina provedene su pri prirodnom pH vina.

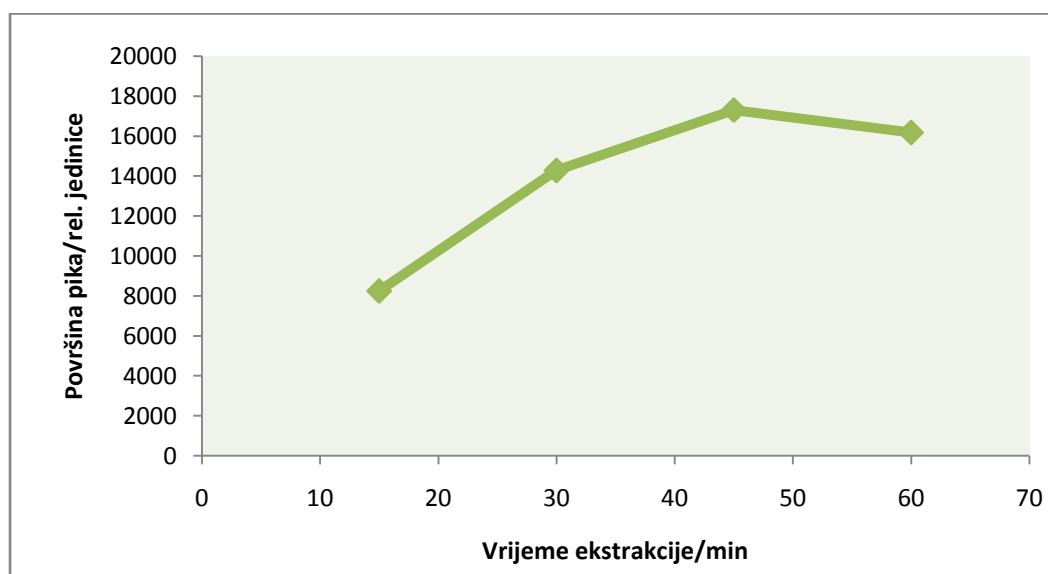
Optimalno vrijeme ekstrakcije određeno je uranjanjem DVB/CAR/PDMS-vlakna u vino kroz 15 min, 30 min, 45 min i 60 min. Optimalno vrijeme ekstrakcije bilo je 45 min (slika 4.15).

Utjecaj temperature ekstrakcije na djelotvornost ispitana je provođenjem ekstrakcije pri dvije temperature: 30 °C i 45 °C. Površina kromatografskog pika 2-AAP-a bila je veća pri 30 °C te su daljnje reakcije provedene na toj temperaturi.

Nakon optimizacije postupka ekstrakcije, ispitana je linearnost odziva spektrometra masa analizom standardnih otopina 2-AAP u sintetskom vinu postupkom opisanim u poglavlju 3.4.1. Odziv detektora bio je linearan u rasponu masenih koncentracija 2-aminoacetofenona od $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ do $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (tablica 4.25). Granica detekcija, a ujedno i granica određivanja bila je $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Analitički povrat ispitan je dodatkom $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ i $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-aminocetofenona u uzorak vina. Za svaku su koncentraciju provedena po tri određivanja. Analitički povrati bili su u rasponu od 39 % do 63 %, pri čemu su najviše vrijednosti postignute pri najvišoj masenoj koncentraciji. RSD je bio od 14 % do 26 %. Niži analitički povrati mogu se objasniti utjecajem matrice uzorka na djelotvornost ekstrakcije s obzirom na izravno uranjanje vlakna u uzorak. Iako je postupak UA-HS-SPME manje osjetljiv od DI-SPME, prednost mu je upravo izbjegavanje utjecaja matrice, što primjenom DI-SPME nije moguće. Na slici 4.16 prikazan je kromatogram ukupne struje iona (engl. *Total Ion Current*, TIC) vina Rizling rajnski u koji je dodano $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP-a te njegov pripadajući spektar masa 2-AAP (slika 4.17).



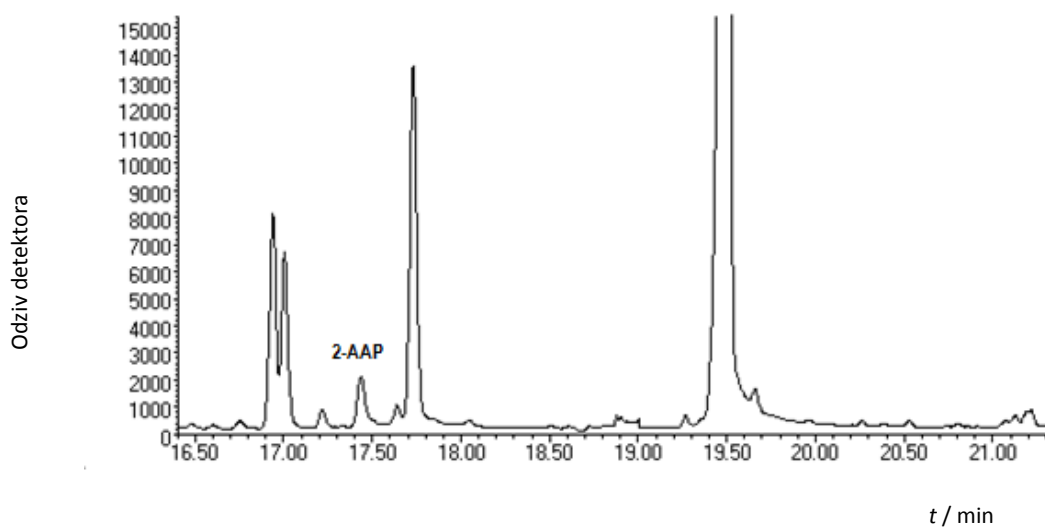
Slika 4.14. Utjecaj dodatka NaCl na djelotvornost mikroekstrakcije 2-AAP-a na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u vino



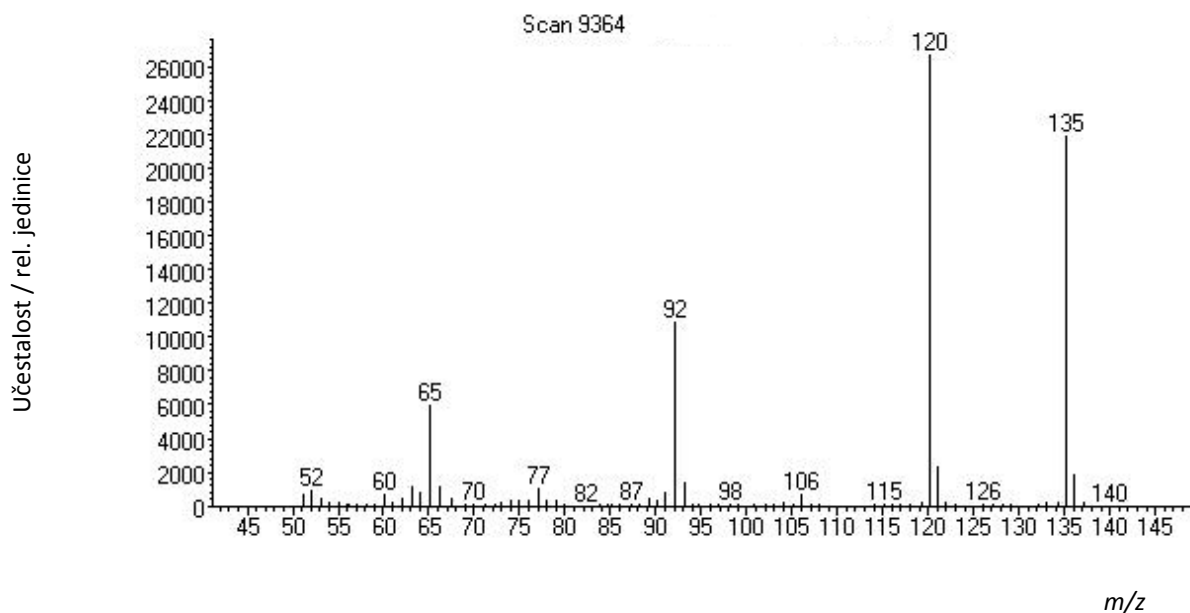
Slika 4.15. Utjecaj vremena ekstrakcije na djelotvornost mikroekstrakcije 2-AAP-a na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u vino

Tablica 4.25. Linearnost odziva detektora i granice detekcije 2-AAP pri analizi postupcima UA-HS-SPME i DI-SPME

Tehnika ekstrakcije	Raspon masenih koncentracija / $\mu\text{g L}^{-1}$	Koeficijent korelacije r	Granica detekcije/ $\mu\text{g L}^{-1}$
UA-HS-SPME	0,03 do 5	0,9947	0,03
DI-SPME	0,008 do 5	0,9932	0,01



Slika 4.16. Kromatogram ukupne struje iona uzorka vina Rizling rajnski u koje je dodano $2 \mu\text{g L}^{-1}$ 2-AAP-a



Slika 4.17. Spektar masa 2-AAP-a masene koncentracije $2 \mu\text{g L}^{-1}$ dodanog u vino Rizling rajnski

4.6. 2-Aminoacetofenon, polifenolni spojevi i indol-3-octena kiselina u vinima Rizlinga rajnskog

U okviru ovog rada, na znanstveno nastavnom pokušalištu Jazbina postavljen je pokus 2009. godine na vinu Rizling rajnski s različitim vrstama komercijalnih kvasaca. Rizling rajnski je stari kultivar porijeklom iz doline rijeke Rajne. Jedan je od najpoznatijih kultivara na svijetu. Najviše se uzgaja u Njemačkoj, i to u dolinama Rajne i Mosela. Ima vrlo visoku otpornost na niske zimske temperature, te je jedna od najotpornijih sorti. Grožđe je izrazito osjetljivo na sivu plijesan. Sorta je pogodna za dobivanje različitih tipova predikatnih vina.¹⁶⁰

U pokusu opisanom u poglavlju 3.2.2 sakupljena su iz osam različitih tretmana ponovljenih po tri puta (tablica 3.2) 24 uzorka vina Rizlinga rajnskog. U svim uzorcima određene su polifenolne sastavnice i indol-3-octena kiselina te antioksidacijska aktivnost vina pomoću radikala ABTS i DPPH (tablica 4.26 i 4.27). U uzorcima vina Rizlinga rajnskog masene koncentracije indol-3-octene kiseline bile su od 0,022 mg L⁻¹ do 0,035 mg L⁻¹. Najdominantniji spoj bila je kaftarna kiselina. Iz rezultata određivanja polifenola vidljivo je da je njihov sastav u uzorcima analiziranih vina ujednačen bez obzira na primijenjeni tretman s enološkim kvascima i dodatak hrane za kvasce.

U navedenim uzorcima organoleptički nije utvrđena UTA. U svim je uzorcima određivan 2-AAP pri čemu su primjenjena oba postupka mikroekstrakcije na čvrstoj fazi: UA-HS-SPME i DI-SPME. Iako je manje osjetljiv postupak UA-HS-SPME prikladan je jer je utjecaj matrice manji, te je SPME-vlakno dugotrajnije. Primjenom UA-HS-SPME 2-aminoacetofenon detektiran je u jednom uzorku vina tretiranog kvascem Anchor Exotics SPH (*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces paradoxus* hibrid), dok je primjenom DI-SPME detektiran u dva uzorka vina tretiranih kvascima Uvaferm CEG (*Saccharomyces cerevisiae*) i Anchor Exotics SPH (*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces paradoxus* hibrid) (tablica 4.28). Masene koncentracije 2-AAP bile su niže od mirisnog praga detekcije koji je oko 0,5 µg L⁻¹.

Simat i suradnici¹⁷² dokazali su da na nastajanje 2-AAP utječe temperatura skladištenja vina. Značajan porast koncentracije 2-AAP-a primjećen je u vinima skladištenim na temperaturi od 40 °C tijekom 72 h. Smatra se da visoke temperature, niska vlažnost i UV-

svjetlost utječu na povišenje koncentracije 2-AAP. Vina u ovom pokusu skladištena su na 15 °C što može biti jedno od objašnjenja zašto je izostala do sinteza 2-AAP-a.

Tablica 4.26. Masene koncentracije polifenolnih sastavnica i indol-3-octene kiseline u vinima kultivara Rizling rajnski tretiranog različitim enološkim kvascima i dodatkom amonijeva sulfata

Spoj	Masena koncentracija / mg L ⁻¹							
	RR A	RR B	RR C	RRD	RR E	RR F	RR G	RR H
Galna kiselina	3,41	1,13	1,21	1,30	2,11	1,98	1,11	1,24
Vanilinska kiselina	6,91	7,71	7,69	6,68	6,63	6,71	6,34	6,64
Siringinska kiselina	0,29	0,23	0,21	0,23	0,23	0,25	0,26	0,18
Epikatehin galat	0,22	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Procijanidin B1	0,74	0,63	0,71	0,70	0,54	0,61	0,67	0,63
Epigalokatehin	0,22	0,19	0,23	0,21	0,18	0,29	0,24	0,28
Katehin	1,23	1,34	1,47	1,53	1,73	1,66	1,34	1,42
Procijanidin B2	0,71	0,53	0,49	0,51	0,55	0,58	0,64	0,49
Epikatehin	0,43	0,61	0,51	0,55	0,57	0,60	0,66	0,67
Kaftarna kiselina	32,03	32,62	32,39	33,68	34,09	33,46	33,85	33,79
Kafeinska kiselina	1,23	1,15	1,14	0,99	1,10	1,12	1,20	1,14
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	3,01	2,79	2,67	2,89	2,97	2,96	2,88	2,94
Ferulinska kiselina	0,81	0,57	0,55	0,59	0,64	0,57	0,53	0,42
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,52	0,47	0,50	0,53	0,57	0,51	0,51	0,47
Miricetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin	1,58	1,51	1,61	1,58	1,71	1,69	1,78	1,71
Kemferol	0,34	0,29	0,31	0,30	0,31	0,29	0,32	0,30
Izoramnetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Indol-3-octena kiselina	0,029	0,032	0,035	0,031	0,032	0,030	0,026	0,022
<i>trans</i> -Resveratrol	0,16	0,18	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,20

n.d.= nije detektirano

Tablica 4.27. Antioksidacijske aktivnosti vina kultivara Rizling rajnski određene radikalima DPPH i ABTS izražene u ekvivalentima Troloxa

Uzorak	Antioksidacijska aktivnost c (TEAC) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	DPPH	ABTS
RR A	414,8	269,3
RR B	499,2	248,1
RR C	557,4	256,3
RR D	450,7	260,4
RR E	541,7	253,3
RR F	590,6	261,2
RR G	439,7	255,7
RR H	563,5	234,2

Tablica 4.28. Masene koncentracije 2-aminoacetofenona u vinima kultivara Rizling rajnski određene postupcima UA-HS-SPME i DI-SPME

Uzorak	Masena koncentracija / $\mu\text{g L}^{-1}$	
	UA-HS-SPME	DI-SPME
RR A2	n.d.	0,11
RR G1	0,07	0,24

n.d.-nije detektirano

Zaključci

5. Zaključci

1. Optimiran je i validiran postupak razdvajanja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom fotodioda i uz fluorescencijski detektor ukupno 32 sastavnica vina koje su obuhvaćale pojedinačne polifenole i indol-3-octenu kiselinu.
2. Za identifikaciju i kvantifikaciju flavan-3-ola analiziranih tekućinskom kromatografijom uz fluorescencijski detektor, kao optimalne valne duljine ekscitacije i emisije, odabrane su $\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 320 \text{ nm}$. Prema literaturnim podacima flavan-3-oli dosad nisu određivani na navedenim valnim duljinama.
3. Prilikom određivanja indol-3-octene kiseline, pri valnim duljinama ekscitacije i emisije $\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 365 \text{ nm}$, uočeno je da se na istim valnim duljinama mogu osjetljivo detektirati i hidroksibenzojeve kiseline. Na taj način su u analiziranim vinima dodatno potvrđene siringinska i vanilinska kiselina.
4. Razvijen je i optimiran postupak ekstrakcije 31 polifenola i indol-3-octene kiseline iz bijelih i crnih vina na čvrstoj fazi, tj. kopolimernom sorbensu *N*-vinilpirolidon-divinilbenzenu. Analitički povrati postignuti pri analizi vina bili su u rasponu od 65 % do 111 % uz RSD od 1 % do 13 %.
5. Po prvi su put određene masene koncentracije indol-3-octene kiseline u crnim vinima iz Hrvatske i bile su u rasponu od $0,076 \text{ mg L}^{-1}$ do $1,031 \text{ mg L}^{-1}$.
6. Razrađeni postupak određivanja polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline u vinu primijenjen je za analizu ovih spojeva u vinima, čije je grožđe u vinogradu bilo podvrgnuto tretmanu solarizacije te u vinima čije grožđe nije bilo podvrgnuto solarizaciji. Analize su pokazale da tehnika solarizacije nema nikakvog utjecaja na sastav i sadržaj polifenola i indol-3-octene kiseline u vinima proizvedenim tijekom prosječnih klimatoloških godina s prosječnim temperaturama zraka tijekom vegetacije i s prosječnim brojem sunčanih sati. U ispitivanim vinima nije pronađena korelacija između masenih koncentracija određivanih polifenolnih spojeva i indol-3-octene kiseline.

7. Za autohtone hrvatske sorte Teran i Plavac mali uočen je kemotaksonomijski uzorak antocijana. U Plavcu malom masene koncentracije antocijana snižavaju se sljedećim redoslijedom: malvidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > delphinidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid. Masene koncentracije kumarilnih glukozida bile su više u odnosu na acetilirane glukozide. U Teranu su masene koncentracije antocijana slijedile niz: malvidin-3-O-glukozid > delphinidin-3-O-glukozid > peonidin-3-O-glukozid > petunidin-3-O-glukozid > cijanidin-3-O-glukozid. Masene koncentracije acetiliranih glukozida bile su više nego kumarilnih glukozida.
8. Distribucija vina različitih kultivara u dvodimenzijском koordinatnom sustavu, definiranom analizom glavnih komponenti uputila je da se istraživana vina bitno razlikuju u sastavu i sadržaju polifenolnih spojeva, sadržaju indol-3-octene kiseline i antioksidacijskoj aktivnosti.
9. Uspoređene su i optimirane dvije tehnike mikroekstrakcije 2-aminoacetofenona iz vina: mikroekstrakcija na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u uzorak vina i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognuta ultrazvukom. Kvalitativna i kvantitativna analiza 2-aminoacetofenona provedena je plinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. Prema dostupnim literaturnim podacima u ovom je radu tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognuta ultrazvukom prvi put primijenjena za ekstrakciju 2-aminoacetofenona iz vina.
10. Istražen je mogući utjecaj četiriju komercijalnih kvasaca na nastajanje 2-aminoacetofenona u vinima Rizling rajnski. Istražen je i mogući utjecaj amonijevog sulfata koji se u vino dodaje kao hrana za kvasce. Niti u jednom uzorku vina Rizling rajnski nije organoleptički dokazana netipična aroma starenja. To je potvrđeno i GC-MS- analizom 2-aminoacetofenona u vinu.
11. Tehnikom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi izravnim uranjanjem SPME-vlakna u uzorak vina i GC-MS-analizom u dva uzorka tretirana kvascima Uvaferm CEG (*Saccharomyces cerevisiae*) i Anchor Exotics SPH (*Saccharomyces cerevisiae* x

Saccharomyces paradoxus hibrid), određen je 2-aminoacetofenon u masenim koncentracijama nižim od mirisnog praga detekcije. Masene koncentracije 2-aminoacetofenona bile su $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ odnosno $0,24 \mu\text{g L}^{-1}$. Tehnikom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi iz para iznad otopine pomognute ultrazvukom 2-aminoacetofenon je određen samo u uzorku tretiranom Anchor Exotics SPH (*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces paradoxus* hibrid) kvascom. Masena koncentracija 2-aminoacetofenona bila je $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. 2-Aminoacetofenon nije detektiran ni u jednom uzorku u koji je dodan amonijev sulfat kao hrana za kvasce.

12. U uzorcima vina Rizling rajnski sastav polifenola je ujednačen bez obzira na primijenjen tretman s različitim enološkim kvascima i dodatak amonijeva sulfata.

Literaturna vrela

1. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva, *Pravilnik o vinu*, Narodne novine **34**, 2003.
2. P. E. McGovern, *Ancient wine*, Princeton University Press, New Jersey, 2003.
3. V. Cheynier, *Flavonoids in wine*. U: O. M. Andersen, K. R. Markham (ur.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Francis and Taylor group, Boca Raton FL, 2006, 263-308.
4. R. S. Faustino, S. Sobrattee, A. L. Edel, G. N. Pierce, Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines, *Mol. Chem. Biochem.* **249** (2003) 11-19.
5. O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt, Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review, *Ann. Bot.* **91** (2003) 179-194.
6. K. Hoenicke, T. J. Simat, H. Steinhart, N. Christoph, M. Geßner, H. J. Kohler 'Untypical aging off-flavor' in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 29-37.
7. K. Hoenicke, N. Christoph, A. Schwab, T. J. Simat, The untypical aging off-flavor (UTA) in wine-formation and possible precautions. *Czech J. Food Sci.* **18** (2000) 52-54.
8. N. Terrier, C. Poncet-Legrand, V. Cheynier, *Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols*. U: M. V. Moreno-Arribas, M. C. Polo (ur.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York, 2009, 463-507.
9. M. Monagas, B. Bartolome, C. Gomez-Cordoves, Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine, *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* **45** (2005) 85-118.
10. J.A. Kennedy, Grape and wine phenolics: Observation and Recent findings, *Cien. Inv. Agr.* **35** (2008) 107-120.

11. B. Berente, M. Reichenbacher, K. Danzer, Improvement of the HPLC analysis of anthocyanins in red wines by use of recently developed columns, *Fresenius J Anal Chem.* **371** (2001) 68-72.
12. V. Nunez, M. Monagas, C. Gomez Cordoves, B. Bartolome, Vitis vinifera L. Cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile, *Postharvest Biol. Technol.* **31** (2004) 69-79.
13. C. Alcade-Eon, M. T. Escribano-Bailon, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo, Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing; A comprehensive study, *Anal. Chim. Acta* **563** (2006) 238-254.
14. Y. Hayasaka, R. E. Asenstorfer, Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 756-761.
15. V. Cheynier, M. Duenas-Paton, E. Salas, C. Maury, J. M. Souquet, P. Sarni-Manchado, H. Fulcrand, Structure and Properties of wine Pigments and Tannins, *Am. J. Enol. Vitic.* **57** (2006) 298-305.
16. H. Fulcrand, M. Duenas, E. Salas, V. Cheynier, Phenolic Reactions during winemaking and Ageing, *Am. J. Enol. Vitic.* **57** (2006) 289-297.
17. M. Monagas, C. Gomez-Cordoves, B. Bartolome, Evolution of polyphenols in red wines from Vitis Vinifera L. During ageing in the bottle, I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins, *Eur. Food Res. Technol.* **220** (2005) 607-614.
18. H. Liao, Y. Cai, E. Haslam, Polyphenol interactions: Anthocyanins: Co-pigmentation and colour changes in red wines, *J. Sci. Food. Agric.* **59** (1992), 299-305.
19. C. Saucier, How do wine polyphenols evolve wine ageing? *Cerevisia* **35** (2010) 11-15.

-
20. B. Brouillard, S. Chassaing, A. Fougereuse, Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine colour lasts so long?, *Phytochem.* **64** (2003) 1179-1186.
21. J. A. Kennedy, C. Saucier, Y. Glories, Grape and wine phenolics: History and Perspective, *Am. J. Enol. Vitic.* **57** (2006) 239-248.
22. M. Monagas, B. Bartolome, C. Gomez-Cordoves, Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis Vinifera* L. During ageing in bottle, II. Non anthocyanin phenolic compounds, *Eur. Food Res. Technol.* **220** (2005) 331-340.
23. M. Monagas, R. Suarez, C. Gomez-Cordoves, B. Bartolome, Simultaneous determination of non-anthocyanin phenolic compound in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitic.* **56** (2005) 139-147.
24. N. Castillo-Munoz, S. Gomez-Alonso, E. Garcia-Romero, I. Hermosin-Gutierrez, Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single –cultivar wines, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 992-1002.
25. E. Alonso, M. I. Estrilla, E. Revilla, HPLC separation of flavonol glycosides in wines, *Chromatographia* **22** (1986) 7-12.
26. D. O. Adams, Phenolics and ripening in grape berries, *Am. J. Enol. Vitic.* **57** (2006) 249-256.
27. V. Katalinić, High performance liquid chromatographic determination of flavan fingerprints in plant extracts, *J. Chromatogr. A* **775** (1997) 359-367.
28. M. Rentzsch, A. Wilkens, P. Winterhalter, *Non-flavonoid phenolic compounds*, U: M. V. Moreno-Arribas, M. C. Polo (ur.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York, 2009, 509-528.

29. O. Negishi, T. Ozawa, Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **756** (1996) 129-136.
30. F. A. Tomas-Barberan, M. N. Clifford, Dietary hydroxybenzoic acid derivatives- nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* **80** (2000) 1024-1032.
31. X. Vitrac, J. P. Monti, J. Vercauteren, G. Defieux, J. M. Merillon, Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanones in wines with absorbance and fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 103-110.
32. C. Naugler, J. L. McCallum, G. Klassen, J. Strommer, Concentration of *trans*-resveratrol and related stilbenes in Nova Scotia Wines, *Am. J. Enol. Vitic.* **58** (2007) 117-119.
33. B. Sun, A.M. Ribes, M. Leandro, A. P. Belchior, M. I. Spranger, Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation, *Anal. Chim. Acta* **563** (2006) 382-390.
34. P. Jeandet, A.C. Brenil, M. Adrian, L. A. Weston, S. Debord, P. Meunier, G. Maume, R. Bessis, HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry, *Anal. Chem.* **69** (1997) 5172-5177.
35. C. Bravaresco, M. Gatti, S. Pezzuto, M. Fregoni, F. Mattivi, Effect of leaf removal on grape yield, berry composition and stilbene concentration, *Am. J. Enol. Vitic.* **59** (2008) 292-298.
36. M. Adrian, P. Jeandet, A. C. Breuil, D. Levite, S. Debord, R. Bessis, Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography, *Am. J. Enol. Vitic.* **51** (2000) 37-41.
37. P. Jeandet, R. Bessis, M. Sbaghi, P. Meunier, P. Trollat, Resveratrol content of wines of different ages; relationship with fungal disease pressure in the vineyard, *Am. J. Enol. Vitic.* **46** (1995) 1-4.

-
38. E. H. Siemann, G. L. Creasy, Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine, *Am. J. Enol. Vitic.* **48** (1992) 49-52.
39. L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* **56** (1998) 317-333.
40. N. Mirošević, J. Karoglan Kontić, *Vinogradarstvo*, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 2008.
41. F. Di Profio, A. G. Reynolds, A. Kasimos, Canopy management and Enzyme impacts on Merlot, Cabernet Franc, and Cabernet Sauvignon. II. Wine Composition and Quality, *Am. J. Enol. Vitic.* **62** (2011) 152-164.
42. S. F. Price, P. J. Breen, M. Valladao, B. T. Watson, Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir grapes and Wine, *Am. J. Enol. Vitic.* **46** (1995) 187-193.
43. P. Dugo, O. Favoino, M. Lo Presti, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, Determination of anthocyanins and related components in red wines by micro- and capillary HPLC, *J. Sep. Sci.* **27** (2004) 1458-1466.
44. G. Mazza, L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, B. Ewart, Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot noir wines from British Columbia, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 4009-4017.
45. E. Revilla, E. García-Beneytez, F. Cabello, G. Marti-Ortega, J. M. Ryan, Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them, *J. Chromatogr. A* **915** (2001) 53-60.

-
46. C. Casavecchia, R. Magnisi, L. La Pena, R. Maisano, G. Dugo, Classification of Sicilian Red Wines from Autochthonous and Allochthonous Cultivars According to Anthocyanin pattern. *Am. J. Enol. Vitic.* **58** (2007) 286-290.
47. M. Monagas, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines, *Food Chem.* **104** (2007) 814-823.
48. I. Revilla, M. L. Gonzalez-San Jose, Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines, *Int. J. Food Sci. Technol.* **38** (2003) 28–36.
49. M. Mayen, J. Merida, M. Medina, Flavonoid and non flavonoid compounds during fermentations and post fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **46** (1995) 255-261.
50. R. Baron, M. Mayen, J. Merida, M. Medina, Changes in phenolic compounds and browning during biological aging of sherry-type wine, *J. Agric Food Chem.* **45** (1997) 1682-1685.
51. D. W. Jeffery, M. Parker, P. A. Smith, Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high performance liquid chromatography, *Aust. J. Grape Wine Res.* **14** (2008) 153-167.
52. I. Hermosin-Gutierrez, N. Castillo-Munoz, S. Gomez-Alonso, E. Garcia-Romero, *Flavonol profiles for grape and wine authentication*, U: S. Ebeler (ur.), *Progress in Authentication of Food and Wine*, ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington DC, 2011, 113-130.

53. I. Revilla, M. L. Gonzalez-San Jose, Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels, *Food Chem.* **80** (2003) 205-214.
54. F. De Souza Dias, M. P. Lovillo, C. G. Barroso, J. M. David, Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence, *Microchem. J.* **96** (2010) 17-20.
55. J. G. Ritchey, A. L. Waterhouse, A standard red wine: Monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines, *Am. J. Enol. Vitic.* **50** (1999) 91-100.
56. A. Pena-Neira, T. Hernandez, C. Garcia-Vallejo, I. Estrella, J. A. Suarez, A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin, *Eur. Food. Res. Technol.* **210** (2000) 445-448.
57. M. Monagas, R. Suarez, C. Gomez-Cordoves, B. Bartolome, Simultaneous Determination of Nonanthocyanin Phenolic Compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitic.* **56** (2005) 139-147.
58. M. S. Garcia-Falcon, C-Perez-Lamela, E. Martinez-Carballo, J. Simal-Gandara, Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution, *Food Chem.* **105** (2007) 248-259.
59. T. Hernández, I. Estrella, M. Pérez-Gordo, E. G. Alegría, C. Tenorio, F. Ruiz-Larrea, M. V. Moreno-Arribas, Contribution of Malolactic Fermentation by *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus Plantarum* to the Changes in the Nonanthocyanin Polyphenolic Composition of Red Wine, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 5260-5266.

-
60. I. Ginjom, B. D'Arcy, N. Caffin, M. Gidley, Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process, *Food Chem.* **125** (2011) 823-834.
61. M. I. Fernandez-Mar, R. Mateos, M. C. Garcia-Parilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review, *Food Chem.* **130** (2012) 797-813
62. R. Pezet, K. Gindro, O. Viret, J. L. Spring, Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65** (2004) 297-303.
63. N. Landrault, F. Larronde, J. C. Delaunay, C. Castagnino, J. Vercauteren, J. M. Merillon F. Gasc, G. Cros, P. L. Teissedre, Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 2046-2052.
64. D. M. Goldeberg, A. Karumanchiri, G. J. Soleas, E. Tsang, Concentrations of selected polyphenols in white commercial wines, *Am. J. Enol. Vitic.* **50** (1999) 185-193.
65. D. P. Makris, E. Psarra, S. Kallithraka, P. Kefalas, The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines, *Food Res. Int.* **36** (2003) 805-814.
66. P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Handbook of Enology*, Vol. 2, John Wiley and Sons Ltd., London, 2000.

-
67. D. Hernanz, A. F. Recamales, M. L. Gonzalez-Miret, M. J. Gomez-Miguez, I. M. Vicario, F. J. Heredia, Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale, *J. Food Eng.* **80** (2007) 327-335.
68. B. Baderschneider, P. Winterhalter, Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 2788-2798.
69. F. Mattivi, R. Guzzon, U. Vrhovšek, M. Stefanini, R. Velasco, Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins, *J. Agric. Food. Chem.* **54** (2006) 7692-7702.
70. M. Gerogiannaki-Christopoulou, P. Anthanasopoulos, N. Kyriakidis, I. A. Gerogiannaki, M. Spanos, *Trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties, *Food Cont.* **17** (2006) 700-706.
71. L. Mendoza, B. Matsuhira, M. J. Aguirre, M. Isaacs, G. Sotes, M. Cotoras, R. Melo, Characterization of phenolic acids profile from Chilean red wines by high-performance liquid chromatography, *J. Chil. Chem. Soc.* **56** (2011) 688-691.
72. J. Lee, P. A. Skinkis, Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanins enhancement by early leaf removal, *Food Chem.* **139** (2013) 893-901.
73. G. L. La Torre, M. Saitta, F. Vilasi, T. Pellicano, G. Dugo, Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection, *Food Chem.* **94** (2006) 640-650.

-
74. R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Duran, Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chem.* **82** (2003) 409-416.
75. N. Paixao, V. Pereira, J. C. Marques, J. S. Camara, Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC, *J. Sep. Sci.* **31** (2008) 2189-2198.
76. S. Perez-Magarino, M. L. Gonzalez-San Jose, Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade, *Food Chem.* **96** (2006) 197-208.
77. M. N. Mitić, M. V. Obradović, Z. B. Grahovac, A. N. Pavlović, Antioxidant capacities and phenolic levels of different Serbian white wines, *Molecules* **15** (2010) 2016-2027.
78. M. T. Ribeiro de Lima, P. Waffo-Teguo, P. L. Teissedre, Agnes Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. Merillon, Determination of Stilbenes (*trans*-Astrigin, *cis*- and *trans*- Piceid and *cis*- i *trans*- Resveratrol) in Portuguese Wines, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 2666-2670.
79. A. Arnous, D. P. Makris, P. Kefalas, Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 5736-5742.
80. S. Kallithraka, M. I. Salacha, I. Tzourou, Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage, *Food Chem.* **113** (2009) 500-505.

-
81. M. Sanz, B. Fernandez de Simon, E. Esteruelas, A. M. Munoz, E. Cadahia, M. T. Hernandez, I. Estrella, J. Martinez, Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoaccacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels, *Anal. Chim. Acta* **732** (2012) 83-90.
82. M. A. Silva, I. Ky, M. Jourdes, P. L. Teissedre, Rapid and simple method for the quantification of flavan-3-ols in wine, *Eur. Food Res. Technol.* **234** (2012) 361-365.
83. A.R-B. de Quiros, M. A. Lage-Yusty, J. Lopez-Hernandez, HPLC analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay, *Food Res. Int.* **42** (2009) 1018-1022.
84. D. P. M. Bonerz, M. S. Pour Nikafardjam, G .L. Creasy, A new RP-HPLC method for analysis of polyphenols and indole-3-acetic acid in wine, *Am. J. Enol. Vitic.* **59** (2008) 106-109.
85. L. Mark, M. S. Pour Nikfardjam, P. Avar, R. Ohmacht, A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines, *J. Chrom. Sci.* **43** (2005) 445-449.
86. M. P. Pour Nikfrardjam, L. Mark, P. Avar, M. Figler, R. Ohmacht, Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villany region, *Food Chem.* **98** (2006) 453-462.
87. V. Katalinić, I. Ljubenkov, I. Pezo, I. Generalić, O. Stričević, M. Miloš, D. Modun, M. Boban, Free resveratrol monomers in varietal red and white wines from Dalmatia (Croatia), *Period. Biol.* **110** (2008) 77-83.

-
88. V. Rastija, G. Srećnik, M. Medić-Šarić, Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins, *Food Chem.* **115** (2009) 54-60.
89. V. Katalinić, M. Miloš, D. Modun, M. Boban, Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, *Food Chem.* **86** (2004) 593-600.
90. T. Plavša, N. Jurinjak, D. Antunović, Đ. Peršurić, K. Ganić Kovačević, The influence of skin maceration time on the phenolic composition and antioxidant activity of red wine Teran (*Vitis vinifera* L.), *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2012) 152-158.
91. D. Komes, D. Ulrich, K. Kovačević Ganić, T. Lovrić, Study of phenols and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage, *Vitis* **46** (2007) 77-84.
92. I. Budić Leto, T. Lovrić, Identification of phenolic acids and changes in their content in white wines, *Food Technol. Biotechnol.* **40** (2002) 221-225.
93. V. L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1965) 144-158
94. J. Ribereau Gayon, E. Stonestreet, Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge, *Bull. Soc. Chim.* **9** (1965) 2649-2652.
95. C. Pompei, C. Peri, Determination of catechins in wines, *Vitis* **9** (1971) 312-316.
96. V. Ivanova, M. Stefova, F. Chinnici, Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods, *J. Serb. Chem. Soc.* **75** (2010) 45-49.

-
97. Z. Kerem, B. A. Bravdo, O. Shoseyov, Y. Tugenhaft, Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must, *J. Chromatogr. A* **1052** (2004) 211-215.
98. S. Gomez-Alonso, E. Garcia-Romero, I. Hermosin-Gutierrez, HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence, *J. Food Comp. Anal.* **20** (2007) 618-626.
99. R. M. Lamuela-Raventos, A.L. Waterhouse, A direct HPLC separation of wine phenolics, *Am. J. Enol. Vitic.* **45** (1994) 1-5.
100. B. Pekić, V. Kovac, E. Alonso, E. Revilla, Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds, *Food Chem.* **61** (1998) 201-206.
101. B. Sun, M. Spranger, R. J. da Silva, Extraction of grape seed proanthocyanidins using different organic solvents, U: F. Charbonnier, J-M. Delacotte, C. Rolando (ur.), *Polyphenols communications*, Groupe Polyphenols, Bordeaux, 1996, 169- 174.
102. V. Cheynier, H. Fulcrand, *Analysis of proanthocyanidins and complex polyphenols*, U: C. Santos Buelga, C. Williamson (ur.), *Methods in Polyphenol Analysis*, Royal Society of Chemistry, London, 2003, 282-301.
103. A. Degenhardt, H. Knapp, P. Winterhalter, Separation and purification of anthocyanins by high speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 338-343.
104. J. Oszmianski, T. Ramos, M. Bourzeix, Fractionation of phenolic compounds in red wine, *Am. J. Enol. Vitic.* **39** (1988) 259-262.

105. B. Sun, M. C. Leandro, V. De Freitas, M. I. Spranger, Fractionation of red wine polyphenols by solid phase extraction and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1128** (2006) 27-38.
106. M. Pinelo, V. F. Laurie, A. L. Waterhouse, A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid phase extraction, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 2839-2844.
107. C. Chilla, D. A. Guillen, C. G. Barroso, J. A. Perez-Bustamante, Automated on line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine, *J. Chromatogr. A* **750** (1996) 209-214.
108. R. Weiss, A. Molinelli, M. Jakusch, B. Mizaikoff, Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds, *Bioseparation* **10** (2002) 379-387.
109. A. Mollinelli, R. Weiss, B. Mizaikoff, Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 1804-1808.
110. C. Dominguez, D. A. Guillen, C. G. Barroso, Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine, *J. Chromatogr. A* **918** (2001) 303-310.
111. D. Matejiček, B. Klejdus, O. Mikeš, D. Šterbova, V. Kuban, Application of solid phase extraction for determination of phenolic compounds in barrique wines, *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 340-345.

-
112. J. A. B. Baptiste, J. F. da P. Tavares, R. C. B. Carvalho, Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland Azores Islands, *Food Res. Int.* **34** (2001) 345-355.
113. M. Del Almo, L. Casado, V. Hernandez, J. J. Jimenez, Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection, *J. Chromatogr. A* **1049** (2004) 97-105.
114. A. Zotou, E. Frangi, Development and validation of an SPE-LC method for the simultaneous determination of trans-resveratrol and selected flavonoids in wine, *Chromatographia* **67** (2008) 789-793.
115. S. Perez-Magarino, M. Ortega-Heras, E. Cano-Mozo, Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 11560-11570.
116. D. W. Jeffery, M. D. Mercurio, M. J. Herderich, Y. Hayasaka, P. A. Smith, Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid phase extraction, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 2571-2580.
117. M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati, Analysis of wine phenolics by high performance liquid chromatography using a monolithic type column, *J. Chromatogr. A* **973** (2002) 221-227.
118. A. Liazid, G.F. Berbero, M. Palma, J. Brigui, C. G. Barroso, Rapid determination of simple polyphenols in grapes by LC using a monolithic column. *Chromatographia* **72** (2010) 417-424.
119. C. Vergara, C. Mardones, I. Hermosin-Gutierrez, D. Von Bear, Comparison of high performance liquid chromatography separation of red wine anthocyanins on a mixed mode ion exchange reversed phase and on a reversed phase column, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 5710-5717.

-
120. D. C. Manns, A. K. Mansfield, A core shell column approach to a comprehensive high performance liquid chromatography phenolic analysis of *Vitis vinifera* L. And interspecific hybrid grape juices, wines, and other matrices following either solid phase extraction or direct injection, *J. Chromatogr. A* **1251** (2012) 111-121.
121. J. A. Kennedy, A .L. Waterhouse, Analysis of pigmented high molecular mass grape phenolics using ion-pair, normal phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **866** (2000) 25-34.
122. H. M. Merken, G. R. Beecher, Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 577-599.
123. E. Porgali, E. Buyuktuncel, Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spcetrophotometric methods, *Food Res. Int.* **45** (2012) 145-154.
124. M. A. Rodriguez Delgado, S. Malovana, J. P. Perez, T. Borges, F. J. Garcia Montelongo, Separation of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 249-257.
125. R. Flamini, Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I. *Mass Spectrom. Rev.* **22** (2003) 218-250.
126. B. Lorrain, I. Ky, L. Pechamat, P-L. Teissedre, Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts, *Molecules* **18** (2013) 1076-1100.
127. V. Rastija, M. Medić-Šarić, Kromatografske metode analize polifenola u vinima, *Kem. Ind.* **58** (2009) 121-128.

128. M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina, *Plošna kromatografija*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006.
129. P. Vinas, N. Campillo, N. Martinez-Castillo, M. Hernandez-Cordoba, Solid phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography –mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 1279-1284.
130. K. Hoenicke, T. J. Simat, H. Steinhart, N. Christoph, M. Gessner, H. J. Kohler, Untypical aging off flavor in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 29-37.
131. A. Rapp, G. Versini, H. Ullemeyer, 2-Aminoacetophenone: Verursachende Komponente der Untypischen Alterungsnote (Naphtalinton, Hybridton) bei Wein, *Vitis* **32** (1993) 61-62.
132. D. Dubravec, I. Regula, *Udžbenik fiziologija bilja*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
133. N. Christoph, M. Gessner, T. J. Simat, K. Hoenicke, Off-flavor compounds in wine and other food products formed by enzymatical, physical and chemical degradation of tryptophan and its metabolites, *Adv. Exp. Med. Biol.* **467** (1999) 659-669.
134. K. Hoenicke, O. Borchert, K. Gruning, T. J. Simat, Untypical Aging Off Flavor in wine: Synthesis of potential degradation compounds of indole-3-acetic acid and kynurenine and their evaluation as precursors of 2-aminoacetophenone, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 4303-4309
135. K. Hoenicke, T. J. Simat, H. Steinhart, H. J. Kohler, A. Schwab, Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan, and tryptophan metabolites in grape, must and wine, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 494-501.

136. A. Linsenmeier, D. Rauhut, H. Kurbel, O. Lohnertz, S. Schubert, Untypical ageing off-flavor and masking effects due to long term nitrogen fertilization, *Vitis* **46** (2007) 33-38.
137. F. Mattivi, U. Vrhovšek, G. Versini, Determination of indole-3-acetic acids, tryptophan and other indoles in must and wine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **855** (1999) 227-235.
138. D. P. M. Bonerz, M. S. Pour Nikfardjam, G. L. Creasy, A new RP-HPLC method for analysis of polyphenols, anthocyanins and indole-3-acetic acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **59** (2008) 106-109.
139. M. Gessner, H. J. Kohler, N. Christoph, Die untypische Alterungsnote im Wein, Teil VIII: Auswirkung von Inhaltsstoffen und Antioxidantien auf die Bildung von o-aminoacetophenon, *Rebe Wein* **52** (1999) 264-267.
140. B. Dollmann, E. Richling, M. Herderich, H. Köhler, A. Schwab, A. Schmitt, P. Schreier, High performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS) for the quantification of L-kynurenine and indole-3-acetic acid in grape must by isotope dilution assay, *Vitis* **36** (1997) 97-101.
141. H-G. Schmarr, S. Ganss, W. Sang, T. Potouridis, Analysis of 2-aminoacetophenone in wine using a stable isotope dilution assay and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1150** (2007) 78-84.
142. T. Košmerl, E. Zlatić, Determination of 2-aminoacetophenone in wines using the stir bar sorptive extraction method coupled with GC-MS and GC-NPD, *Mitt. Klosterneuburg* **59** (2009) 121-126.
143. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L. A. Fernandez, N. Extebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2642-2666.

-
144. S. Risticvic, V. H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Recent developments in solid phase microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 781-795.
145. H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn, Application of solid phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A* **880** (2000) 35-62.
146. W. Fan, I-M. Tsai, M. C. Qian, Analysis of 2-aminoacetophenone by direct-immersion solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and its sensory impact in Chardonnay and Pinot gris wines, *Food Chem.* **105** (2007) 1144-1150.
147. C. Milo, I. Bank, *Quantification of impact odorants in food by isotope dillution assay: Strenght and limitations*, U: C.J. Mussian, M. J. Morello (ur.), *Flavor analysis: Developments in Isolation and Characterization*, American Chemical Society, Washington DC, (1998) 250-259.
148. J. M. Guilford, J. M. Pezzuto, Wine and Health: A Review, *Am. J. Enol. Vitic.* **64** (2011) 471-486.
149. S. Renaud, R. Guegen, The French paradox and wine drinking, *Novartis Found. Symp.* **216** (1998) 208-217.
150. O. T. Njajou, A. M. Kanaya, P. Holvoet, S. Connelly, E.S. Strotmeyer, T.B. Harris, W.C. Hsueh, Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in population-based cohort, the health, aging and body compostion study, *Diabet. Metab. Res. Rev.* **25** (2009) 733-739.
151. D. Modun, I. Music, J. Vukovic, I. Brizic, V. Katalinic, A. Obad, I. Palada, Z. Dujic, M. Boban, The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols, *Atherosclerosis* **197** (2008) 250-256.
152. J. C. Ruf, Overview of epidemiological studies on wine, health and mortality, *Drugs Exp. Clin. Res.* **29** (2003)173-179.

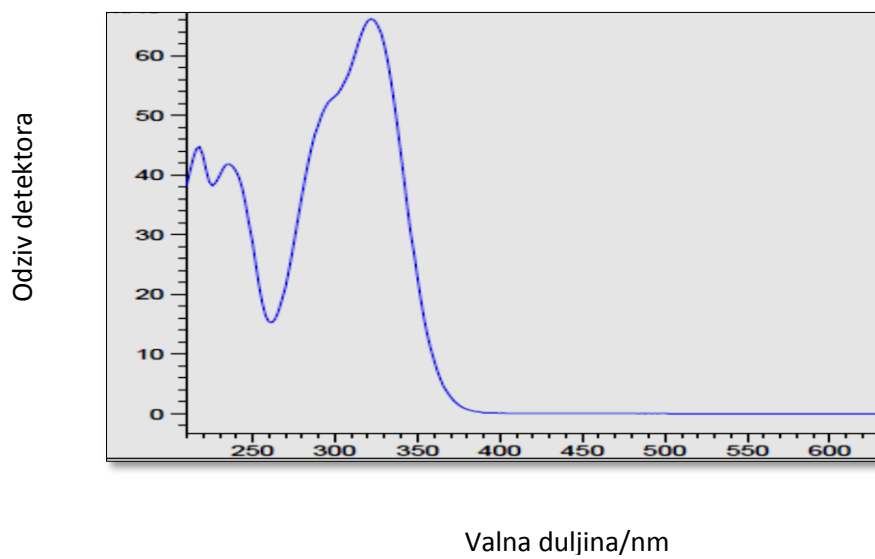
-
153. A. Cano, O. Alcaraz, M. B. Arnao, Free radical scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media, *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003) 33-37.
154. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4290-4302.
155. V. Bohm, K. Schlesier, *Methods to evaluate the antioxidant activity*. U: R. Dris, S. M. Jain (ur.), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*, vol. 3. Quality Handling and Evaluation, Kluwer Academic Publishers, 2004, 55-71.
156. N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates, *Clin. Sci.* **84** (1993) 407-412.
157. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Tech.* **28** (1995) 25-30.
158. D. Bandoniene, M. Murkovic, On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.), *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 2482-2487.
159. R. Schuster, H. Schulenberg-Schell, *A new approach to lower limits of detection and easy spectral analysis*, Agilent Technologies, Njemačka, 2000.
160. P. Cindrić, N. Korać, V. Kovač, Sorte vinove loze: Metode i rezultati ispitivanja, Prometej, Novi Sad, 2000.
161. N. Mirošević, Z. Turković, *Ampelografski atlas*, Golden marketing -Tehnička knjiga Zagreb, Zagreb, 2003.
162. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, *Pravilnik o nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze*, Narodne novine br. 159, 2004.

-
163. E. Maletić, I. Pejić, J. Karoglan Kontić, *Plavac mali-hrvatska sorta za velika vina*, Grozd Plavac Mali, Zagreb, 2009.
164. A. Arnous, A. S. Meyer, Grape skins (*Vitis vinifera* L.) catalyze the in vitro enzymatic hydroxylation of *p*-coumaric acid to caffeic acid, *Biotechnol. Lett.* **31** (2009) 1953-1960.
165. J. Han, M. Kamber, *Data mining: Concepts and Techniques*, Academic Press, San Diego, 2001.
166. D. Livingstone, *A Practical Guide to Scientific Data Analysis*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009.
167. S. Haykin, *Neural networks: A comprehensive foundation*, Prentice Hall International, New Jersey, 1999.
168. J. Piljac-Žegarac, S. Martinez, L. Valek, T. Stipčević, K. Ganić Kovačević, Correlation between the phenolic content and DPPH radical scavenging activity of selected Croatian wines, *A. Aliment.* **36** (2007) 185-193.
169. M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chem.* **124** (2011) 1208-1216.
170. I. Vinković Vrček, M. Bojić, I. Žuntar, G. Mendaš, M. Medić Šarić, Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes, *Food Chem.* **124** (2011) 354-361.
171. T. J. Mason, L. Paniwyrnk, J. P. Lorimer, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrason. Sonochem.* **3** (1996) 253-260
172. T. J. Simat, K. Hoenicke, M. Gessner, N. Christoph, Metabolism of tryptophan and indole-3-acetic acid formation during vinification and its influence on the formation of 2-aminoacetophenone, *Mitt. Klosterneuburg* **54** (2004) 43-55.

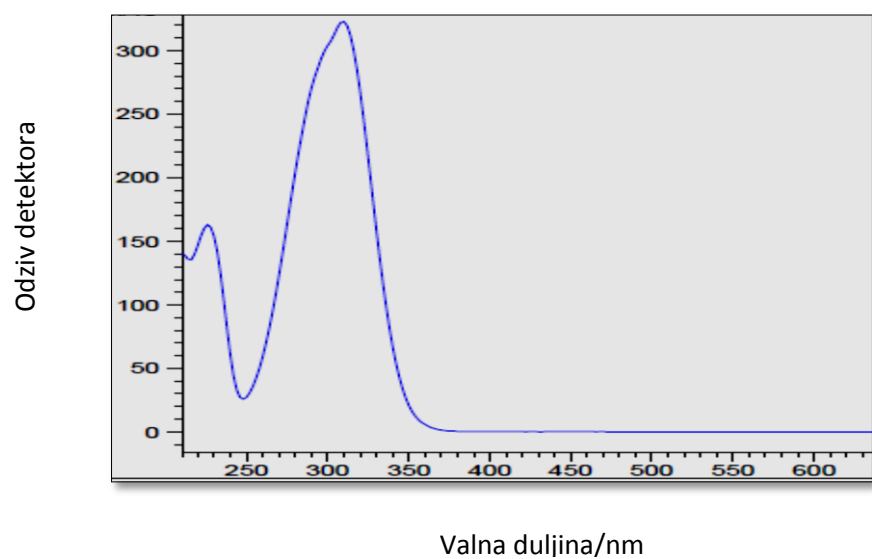
7. Dodatak

UV-Vis spektri standardnih supstancija hidroksicimetnih kiselina

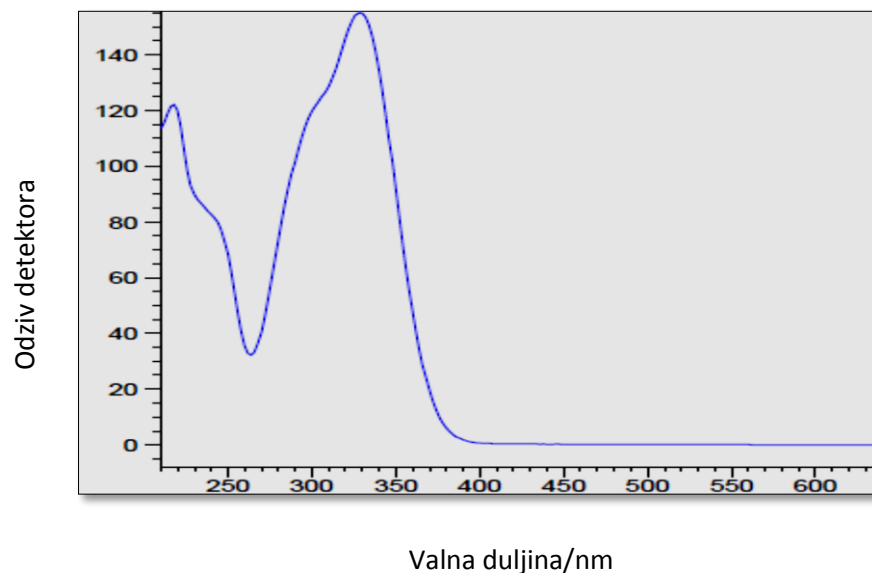
a)



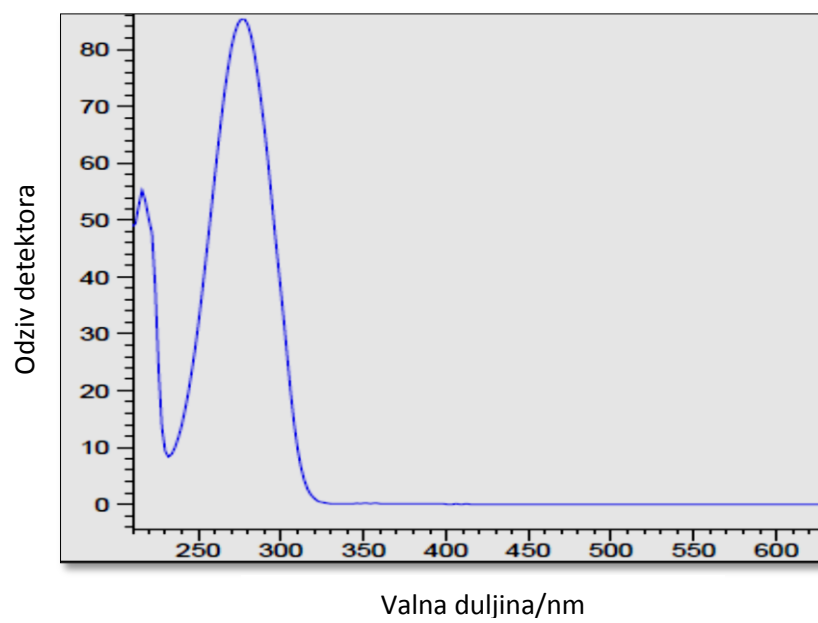
b)



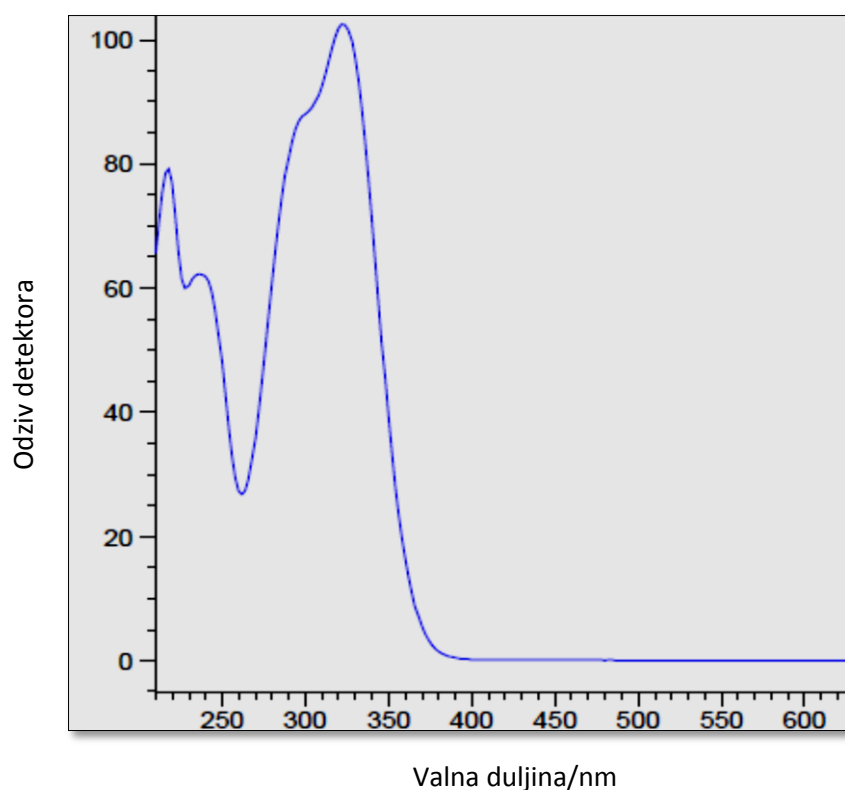
c)



d)



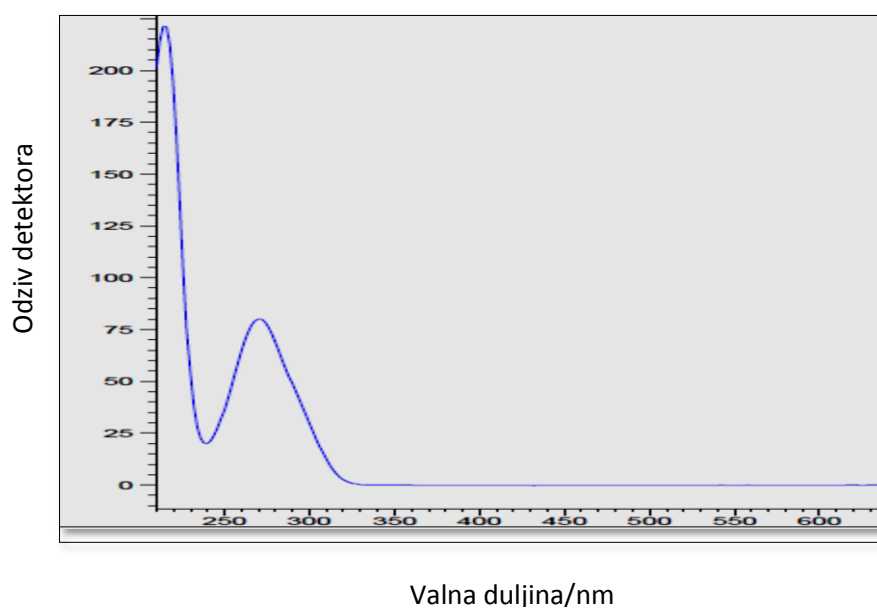
e)



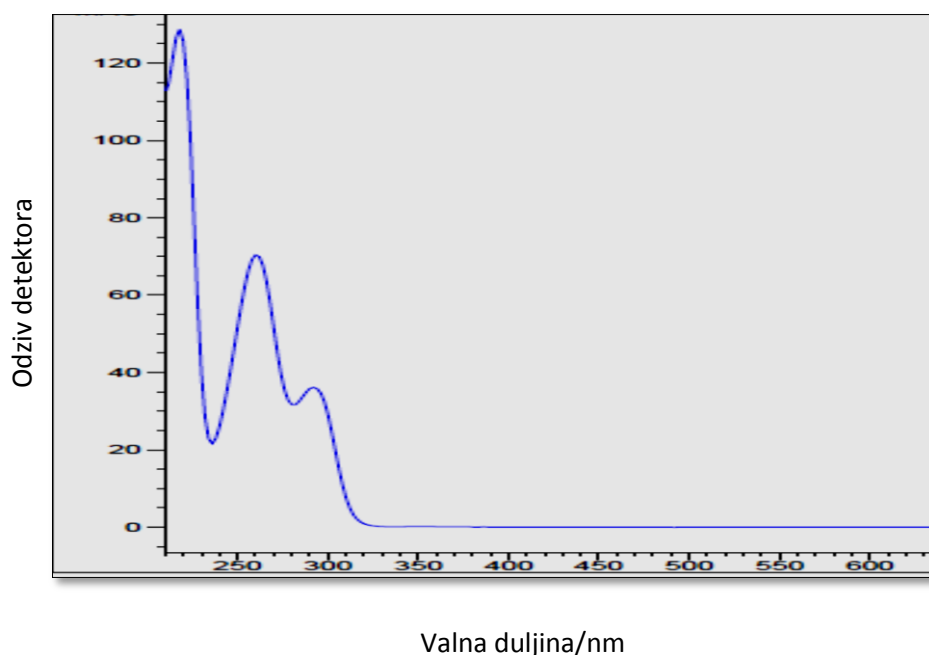
Slika 7.1. UV-Vis spektri standardnih supstancija hidroksicimetnih kiselina: a) ferulinska kiselina, b) *p*-kumarinska kiselina, c) kaftarna kiselina, d) *trans*-cimetna kiselina, e) kafeinska kiselina

UV-Vis spektri standardnih supstancija hidroksibenzojevih kiselin

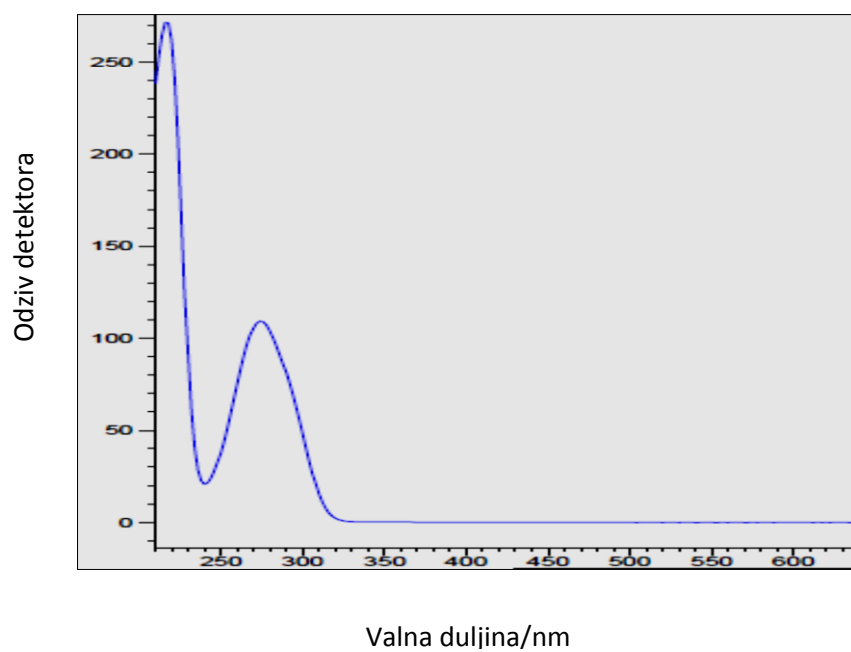
a)



b)



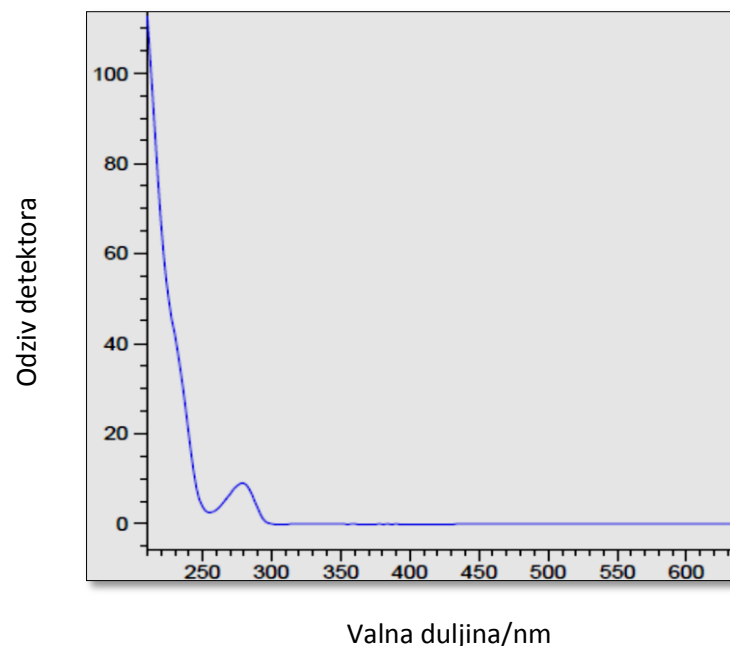
c)



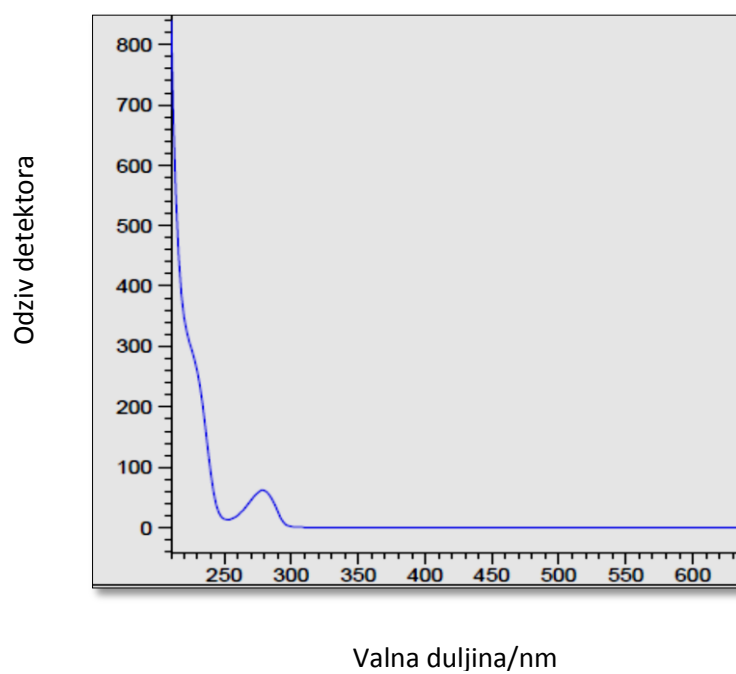
Slika 7.2. UV-Vis spektri standardnih supstancija hidroksibenzojevih kiselina: a) galna kiselina, b) vanilinska kiselina, c) siringinska kiselina

UV-Vis spektri standardnih supstancija flavan-3-ola

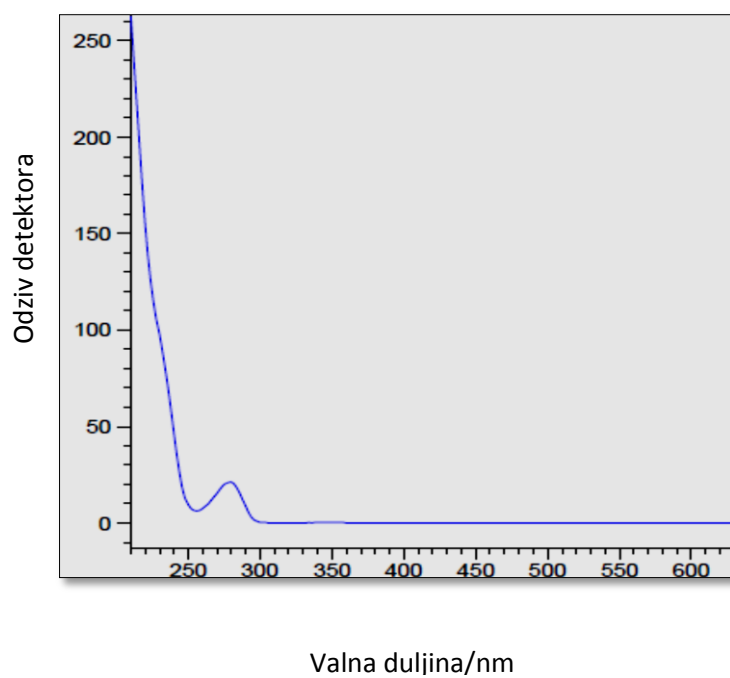
a)



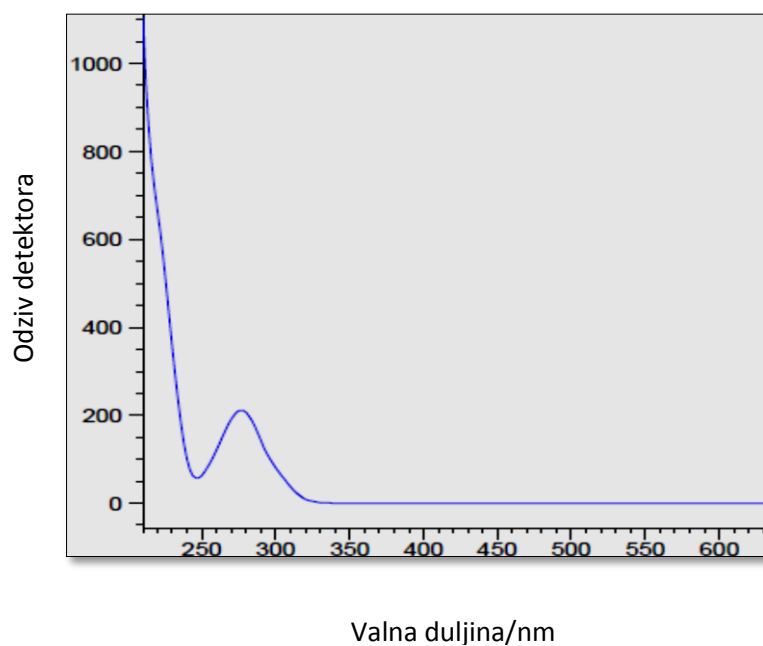
b)



c)



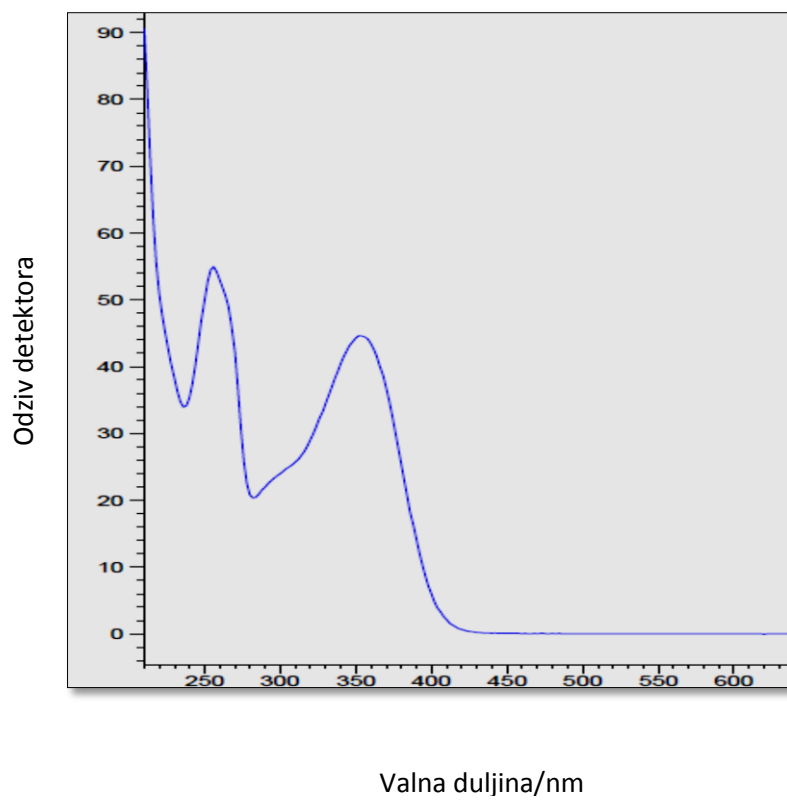
d)



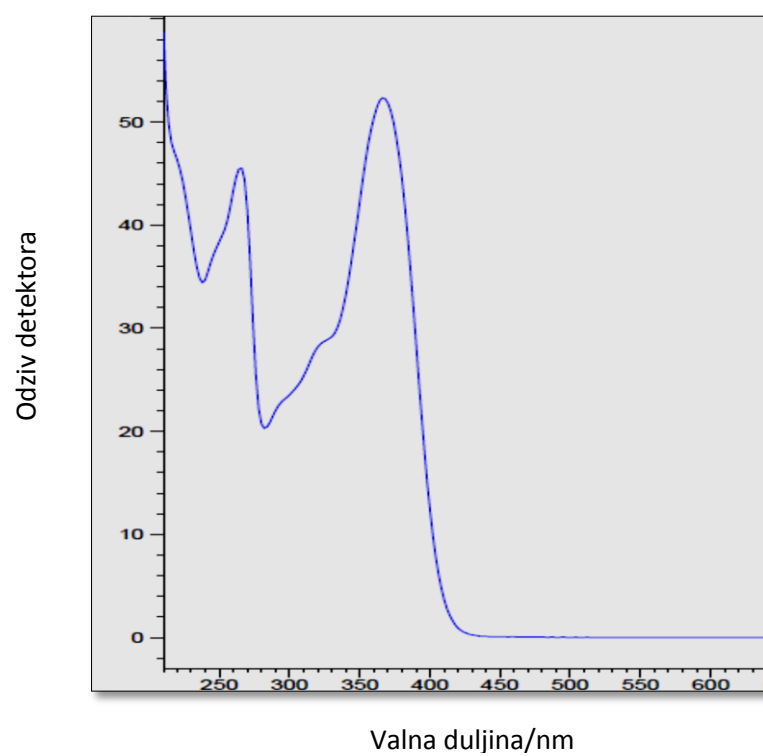
Slika 7.3. UV-Vis spektri standardnih supstancija flavan-3-ola: a) procijanidin B1, b) katehin, c) epigalokatehin, d) epikatehin galat

UV-Vis spektri standardnih supstancija flavonola

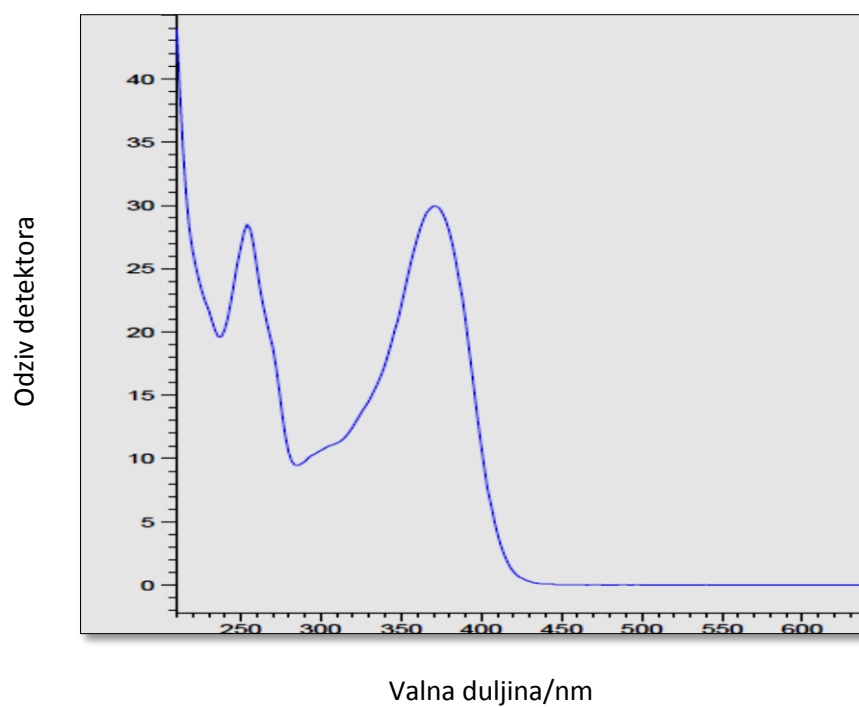
a)



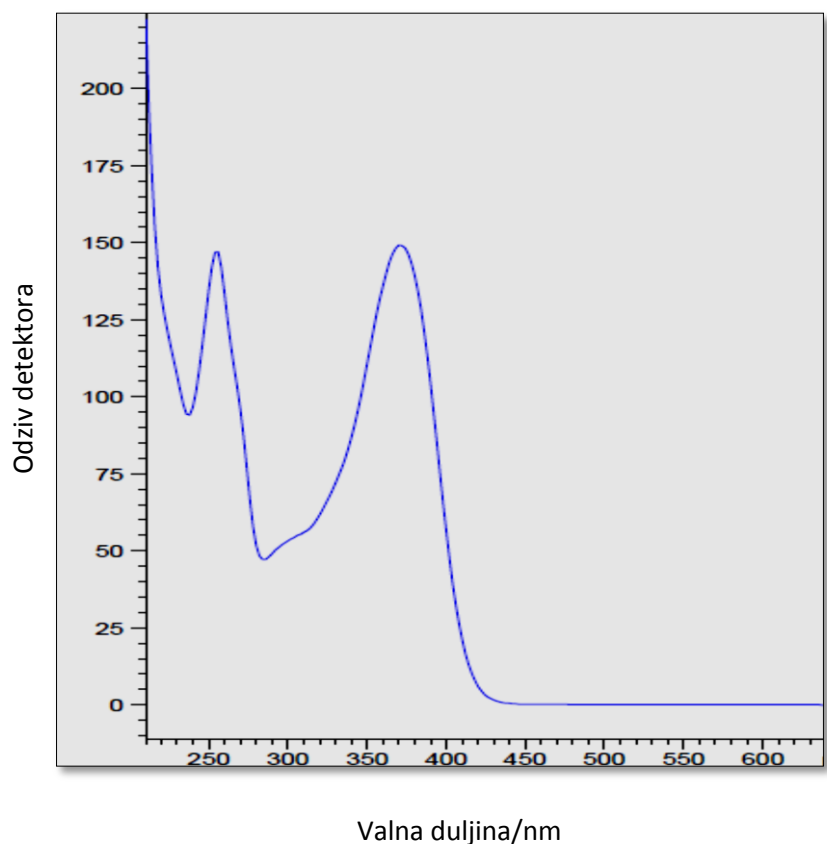
b)



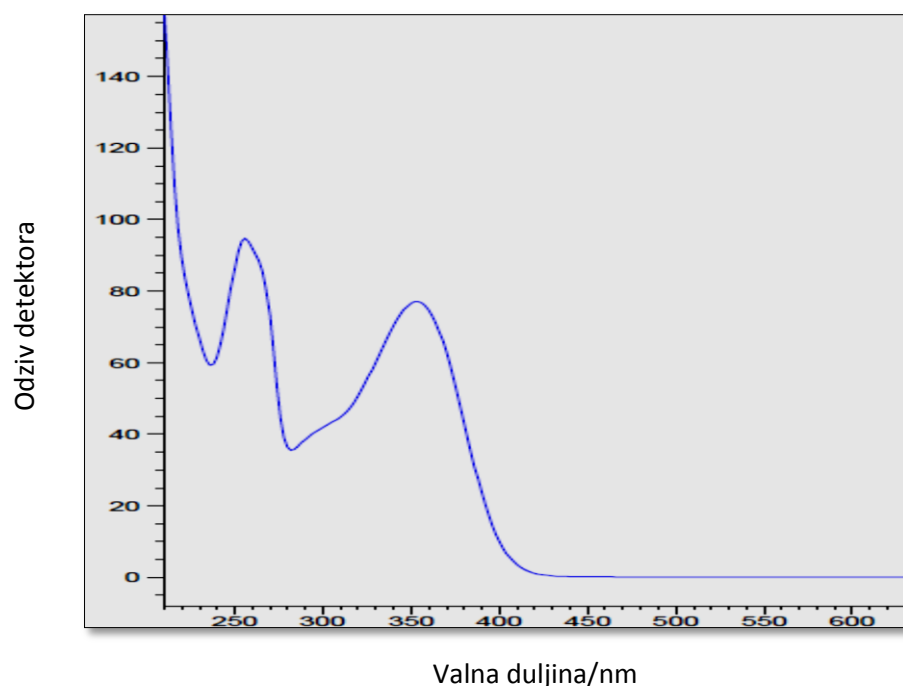
c)



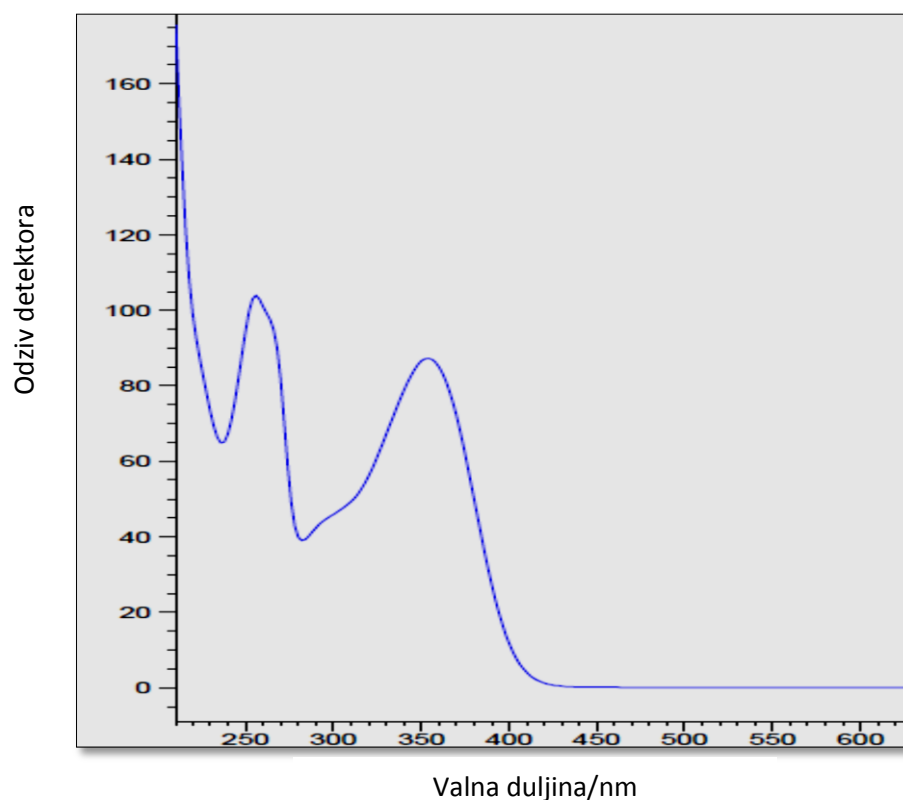
d)



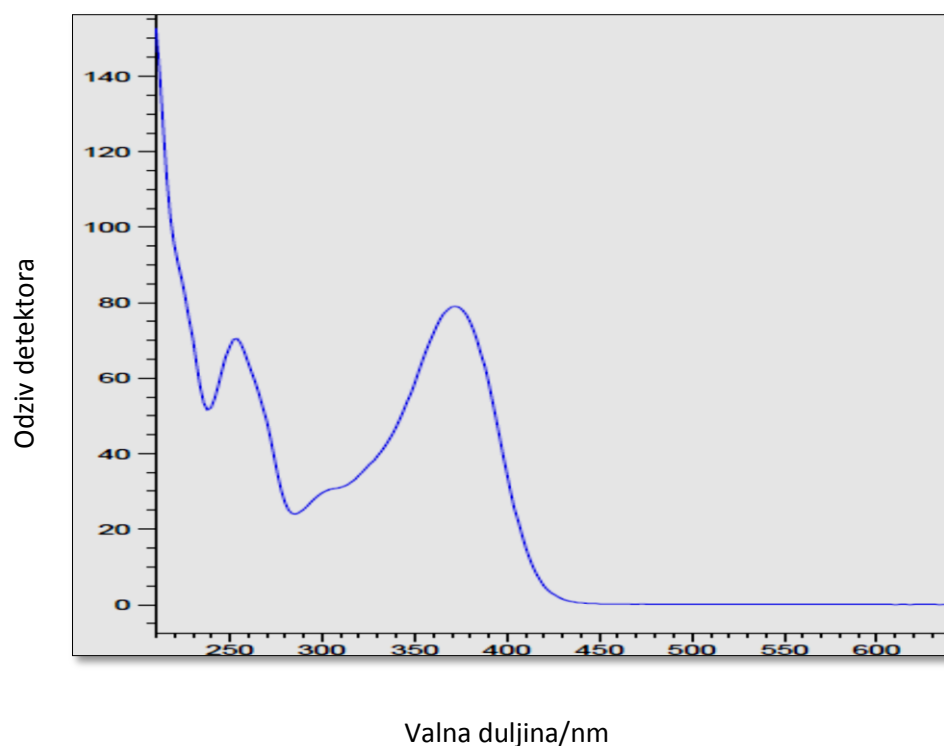
e)



f)



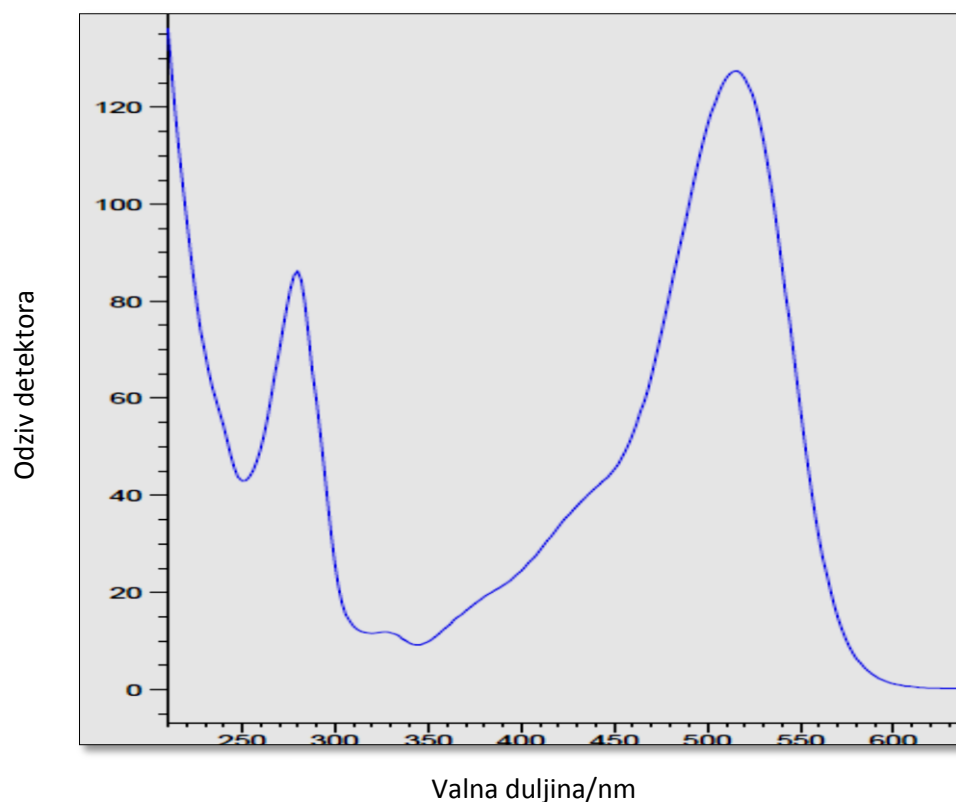
g)



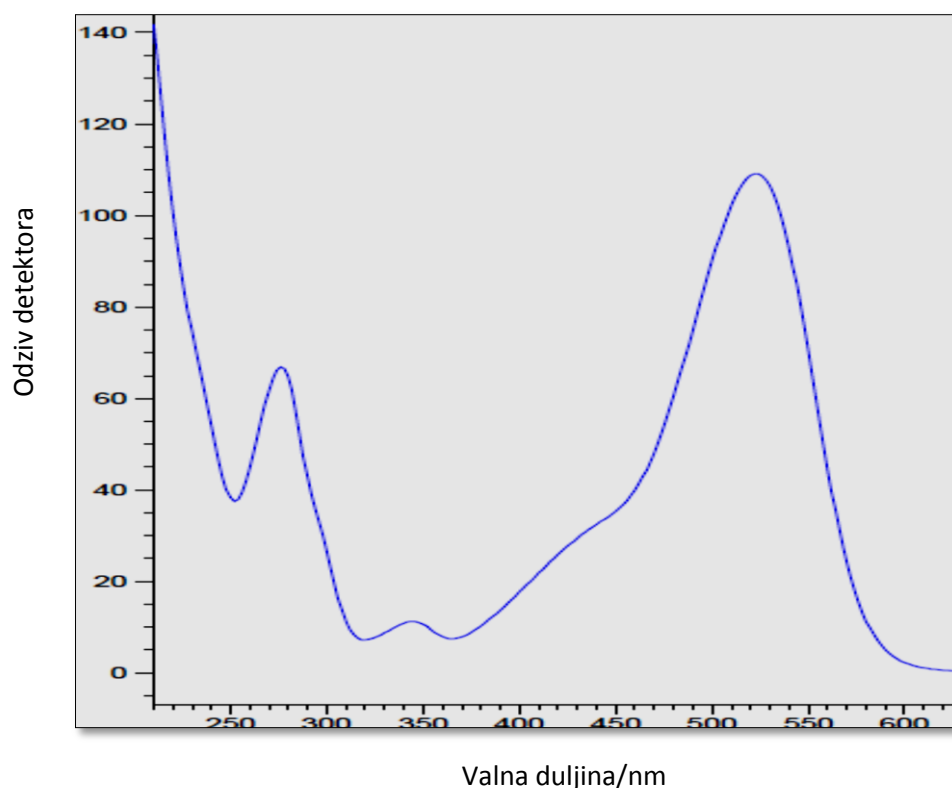
Slika 7.4. UV-Vis spektri standardnih supstancija flavonola: a) kvercetin-3-*O*-galaktozid, b) kemferol, c) izoramnetin, d) kvercetin, e) kvercetin-3-*O*-glukozid, f) kvercetin-3-*O*-rutinozid, g) miricetin

UV-Vis spektri standardnih supstancija antocijana

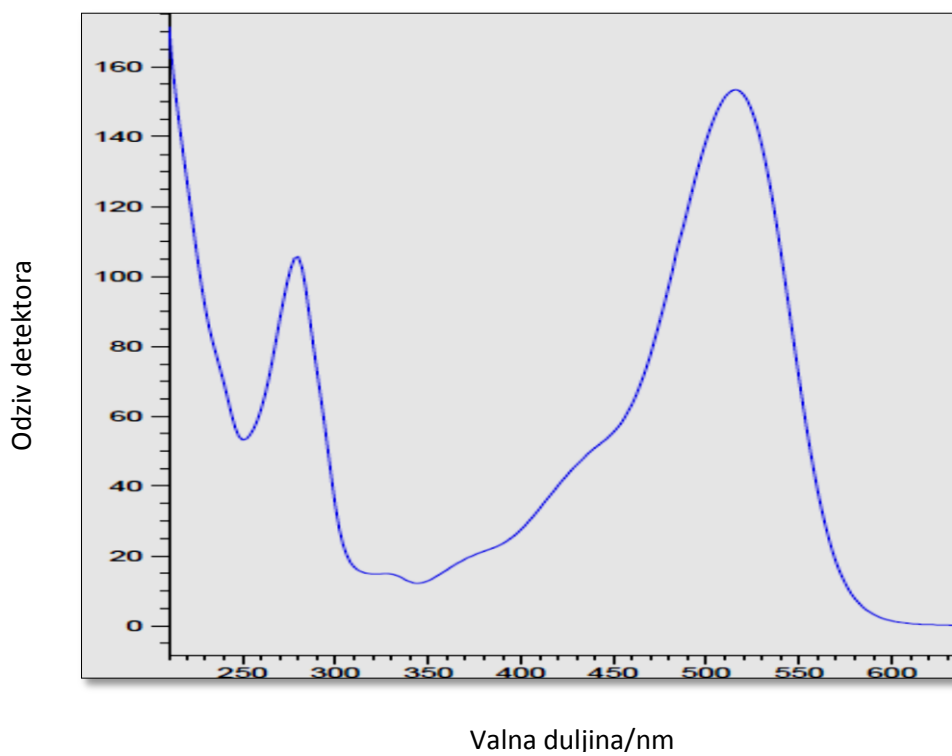
a)



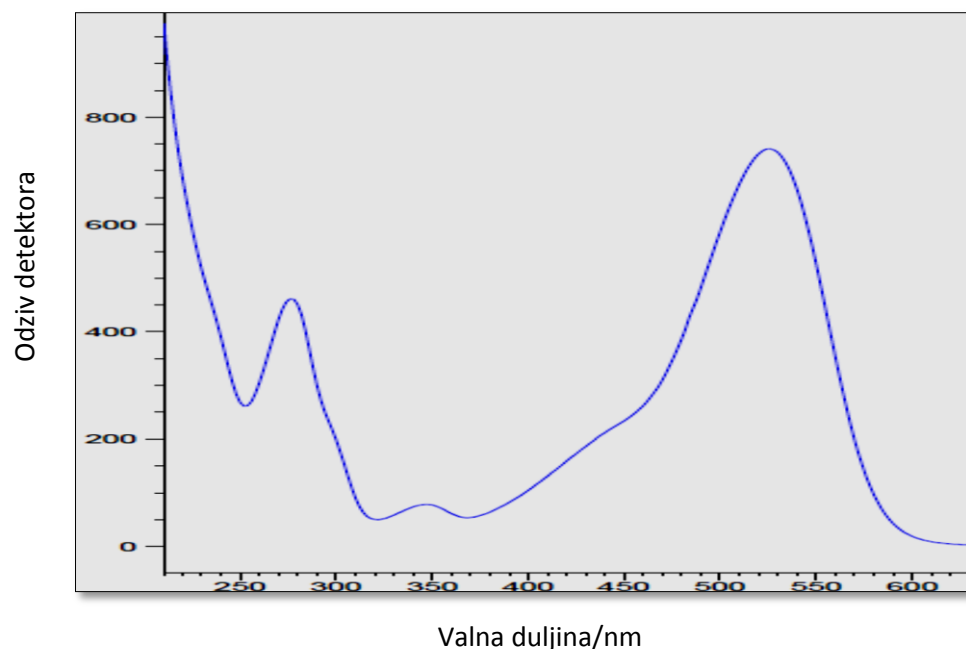
b)



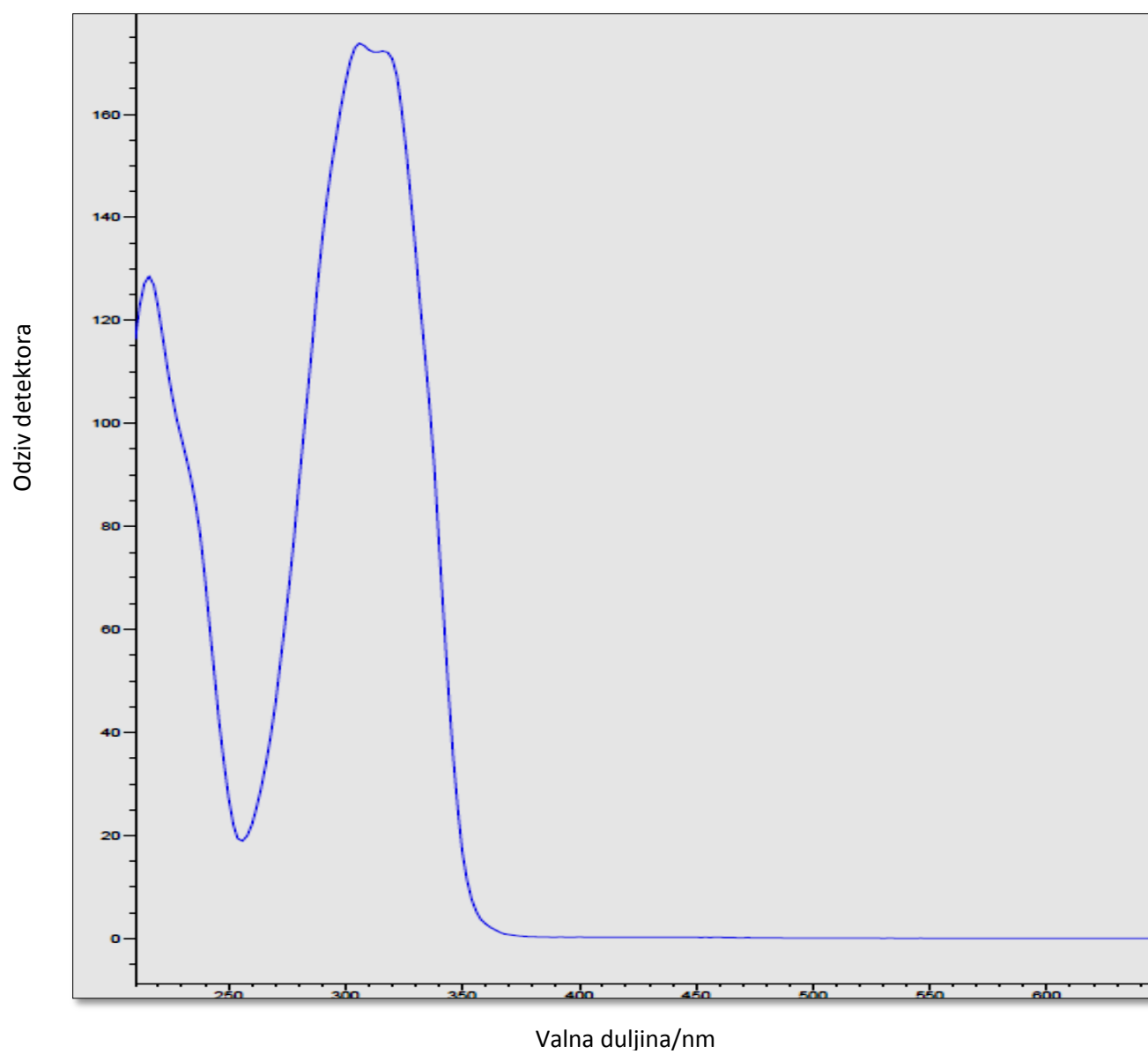
c)



d)



Slika 7.5. UV-Vis spektri standardnih supstancija antocijana: a) cijanidin-3-*O*-glukozid, b) delfinidin-3-*O*-glukozid, c) peonidin-3-*O*-glukozid, d) malvidin-3-*O*-glukozid



Slika 7.6. UV-Vis spektar standardne supstancije *trans*-resveratrola

ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS

Luna Maslov rođena je 29. lipnja 1979. godine u Zagrebu. Nakon završetka prirodoslovno-matematičke gimnazije u Zagrebu, 1997. upisuje studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Studij završava 2004. godine obranom diplomskog rada pod naslovom „Određivanje poliklorbifenila u masti morskih kornjača *Caretta caretta*”.

Od 01. siječnja 2006. zaposlena je u Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu kao stručni suradnik u sustav znanosti i visokog obrazovanja.

Godine 2007. upisala je poslijediplomski studij prirodnih znanosti, polje kemija, smjer analitička kemija, na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Godine 2007. pohađala je međunarodnu ljetnu školu *Center for applied spectroscopy, International summer schools 2007, GC and UV-VIS Spectroscopy Application*, u Skopju, Makedonija.

Godine 2010. boravi u INRA, L'Unité Mixte de Recherches Sciences Pour l'Œnologie (UMR SPO), Plateforme polyphénols u Montpeilleru, kao stipendistica francuske Vlade.

Rezultate svog dosadašnjeg znanstvenog rada objavila je u 8 znanstvenih radova, od koji je 4 objavljeno u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents. Autor/koautor je pet priopćenja na znanstvenim skupovima, a aktivno je sudjelovala na njih četiri.

Znanstveni radovi u CC časopisima

1. B. Lazar, L. Maslov, S. Herceg Romanić, R. Gračan, B. Krauthacker, D. Holcer, N. Tvrtković, Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere* **82** (2011) 121-129.
2. L. Maslov, A. Jeromel, S. Herjavec, A. Jagatić Korenika, M. Mihaljević, T. Plavša, Indole-3-acetic acid and tryptophan in Istrian Malvasia grapes and wine, *J. Food Agric. Environ.* **9** (2011) 29-33.
3. G. Kozlović, A. Jeromel, L. Maslov, A. Pollnitz, S. Orlić, Use of acacia barrique barrels – Influence on the quality of Malvazija from Istria wines, *Food Chem.* **120** (2010) 698-

4. B. Kozina, M. Karoglan, A. Jeromel, L. Maslov, Effect of grapevine solarization on the anthocyanin composition of Pinot Noir wines, *Cereal Res. Commun.* **36** (2008) 47-50.

Rad u postupku objavljivanja:

1. M. Karoglan, M. Osrečak, L. Maslov, B. Kozina, Effect of cluster and berry thinning on Merlot and Cabernet Sauvignon wine composition, *Czech J. Food Sci.*, 598/2013-CJFS.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. S. Herjavec, A. Jeromel, L. Maslov, A. Jagatić Korenika, M. Mihaljević, T. Prusina, Influence of Different Maceration Times on the Anthocyanin Composition and Sensory Properties of Blatina Wines, *Agric. Conspec. Sci.* **77** (2012) 41-44.

2. M. Karoglan, B. Kozina, L. Maslov, M. Osrečak, T. Dominko, M. Plichta, Utjecaj prorjeđivanja grozdova na kakvoću grožđa sorte Pinot crni (*Vitis vinifera* L.), *J. Cent. Eur. Agric.* **12** (2011) 477-485.

3. M. Karoglan, L. Maslov, I. Matić, A. Brodski, A. Jeromel, B. Kozina, A. Mijić, Sastav ukupnog i asimilacijskog dušika u grožđu triju sorata vinove loze pod utjecajem dušične gnojidbe vinograda, *J. Cent. Eur. Agric.* **12** (2011) 267-275

4. M. Karoglan, M. Mihaljević, L. Maslov, M. Osrečak, A. Jeromel, B. Kozina, R. Petrić, Utjecaj dušične gnojidbe na kemijski sastav grožđa kultivara Chardonnay, Graševina i Rizling rajnski, *Poljoprivreda* **16** (2010) 8-12.

Priopćenja na znanstvenim skupovima

1. L. Maslov, I. Tomaz, M. Medić Šarić, Determination of polyphenols and indole-3-acetic acid in wines by HPLC-DAD-FLD, *19th International Symposium on Separation Sciences "New Achievement in Chromatography"*, Book of Abstracts Ukić, Šime ; Bolanča, Tomislav (ur.). Zagreb : Croatian Society of Chemical Engineers, 2013. (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

2. M. Mihaljević Žulj, A. Jagatić Korenika, I. Puhelek, L. Maslov, I. Tomaz, A. Jeromel, Influence of different yeast strain on metabolism of tryptophan and indol-3-acetic acid as the precursors of Untypical aging off-flavour (UTA) in wine, Book of abstracts, *International*

Symposium for Agriculture and Food, Skoplje, 2012. 55-55 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. B. Kozina, M. Karoglan, M. Osrečak, L. Maslov, Autochthonous cultivars on the new vineyard sites, *Third International Congress on Mountain Steep Slope Viticulture*, Castiglione di Sicilia (Ct) - Sicilija - Italija – ABSTRACT 2010. 181-182 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. L. Maslov, A. Jeromel, S. Herjavec, M. Karoglan, B. Kozina., Determination of indole-3-acetic acid in Malvasia from Istria grape and wine, *4th International Symposium on Recent advances in food analysis*, Jana Hajšlova, Michel Nielen (ur.). Prague, 2009. 138 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. L. Maslov, M. Karoglan, B. Kozina, Effect of Grapevine Solarization Technique on the Anthocyanin Content of Autochthonous Croatian Red Wine Teran (*Vitis vinifera* L.), *14th International Symposium on Separation Science, New Achievements in Chromatography*, Primošten, 2008 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).