

# Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu

---

Prišlin, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:040538>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Prišlin

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Prišlin

**EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ KOŽICE  
GROŽĐA RASPRŠENJEM MATICE UZORKA KROZ  
ČVRSTU FAZU**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:     Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger  
  Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević  
  Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić

Zagreb, rujan 2015.

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije te na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo, na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na pruženoj pomoći i trudu te poticanju na rad.*

*Zahvaljujem se Ivani Tomaz, dipl. ing. na pomoći tijekom izvedbe ovog rada te na korisnim i nesebičnim savjetima.*

*Isto tako zahvaljujem se tehničarkama sa Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći tijekom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.*

*Najviše od svega želim se zahvaliti svojim roditeljima Snježani i Željku Prišlin koji su bili cijelo vrijeme uz mene i pružili mi veliku potporu tijekom studiranja te mi omogućili školovanje.*

*Zahvaljujem se i svim svojim prijateljima te rodbini koji su mi bili velika podrška tijekom svih godina studiranja.*

## SAŽETAK

### **Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu**

Polifenoli predstavljaju skupinu spojeva biljnog podrijetla, čiju strukturu čini jedan ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Uobičajena su sastavnica ljudske prehrane te se u različitim količinama nalaze u voću, povrću, vinu, voćnim sokovima, čaju i kavi. Polifenoli se u crnom grožđu nalaze u kožici, sjemenki i mesu. Sastav i količina pojedinih polifenola ovisi o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, postupcima uzgoja vinove loze.

Cilj ovog rada je optimizacija uvjeta za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa metodom raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD). Cilj optimizacije metode je pronaći optimalne čimbenike za ekstrakciju, a to su udio organske faze, volumen ekstrakcijskog otapala, omjer mase sorbensa i mase uzorka, optimalni sorbens i ekstrakcijsko otapalo. Ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda i fluorescentnim detektorom.

Najbolji rezultat za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa dobiven je s fenilsilicijevim dioksidom kao MSPD sorbensom s 10 mL smjese otapala acetonitril:voda=50:50 kao ekstrakcijskim otapalom. Najbolji omjer mase uzorak/sorbens pokazao se omjer 125 mg uzorka/375 mg sorbensa.

#### **Ključne riječi:**

*polifenoli, kožica grožđa, ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*

## ABSTRACT

### **Extraction of polyphenolic compounds from grape skin by matrix solid-phase dispersion**

Polyphenols are organic compounds, which structure makes one or more aromatic rings with one or more hydroxyl groups. Polyphenols could be found in food especially fruits, vegetables, wine, fruit juices, tea and coffee. In red grapes we can find polyphenols in grape skin, seeds and pulp. The composition and quantity of particular polyphenols depends on grape cultivar, climatic conditions, methods of grapevine growing.

The aim of this work is optimization conditions for extraction of polyphenolic compounds from grape skin by matrix solid-phase dispersion (MSPD). Parameters which were optimized are percent of organic elution solvent, volume of elution solvent, ratio of mass sample/sorbent, sorbent and the elution solvent. The extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and fluorescence detector (HPLC-FLD).

The best results for extraction of polyphenolic compounds from grape skin are obtained with Phenyl as an MSPD sorbent with 10 mL of acetonitrile:water=50:50 as an elution solvent. The best ratio of mass sample/sorbent is 125 mg sample/375 mg sorbent.

#### **Key words:**

*Polyphenols, grape skin, matrix solid-phase dispersion (MSPD), high-performance liquid chromatography*

SADRŽAJ	str.
1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. VINOVA LOZA	4
2.1.1. Anatomska građa bobice grožđa	4
2.1.2. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa	6
2.1.3. Kemijski sastav bobice grožđa	7
2.1.4. Karakteristike sorte Regent	8
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	8
2.3. PRIPRAVA UZORKA ZA ANALIZU	11
2.3.1. Klasične metode pripreme uzorka	12
2.3.2. Moderne metode pripreme uzorka	13
2.3.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija	14
2.3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija	14
2.3.2.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidom	15
2.3.2.4. Tlačna ekstrakcija otapalom	17
2.3.2.5. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu	17
2.4. KROMATOLOGRAFIJA	20
2.4.1. Tekućinska kromatografija	21
2.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. MATERIJALI	26
3.1.1. Kožica grožđa	26
3.1.2. Kemikalije	26
3.1.3. Sorbensi	26
3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR	27
3.2.1. Analitička vaga	27
3.2.2. Tarionik s tučkom i SPE kolone	28
3.2.3. Aparatura za ekstrakciju	29
3.2.4. Uparivač (rotavapor)	29
3.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	30
3.3. METODE RADA	31
3.3.1. Priprava uzoraka grožđa	31
3.3.2. Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD)	31
3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	32
3.3.4. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza	33
4. REZULTATI I RASPRAV	34
4.1. OPTIMIZACIJA UVJETA ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLNIH SPOJEVA RASPRŠENJEM MATICE UZORKA KROZ ČVRSTU FAZU	35
4.1.1. Ekstrakcija antocijana raspršenjem matice kroz čvrstu fazu	44
4.1.2. Ekstrakcija flavonola raspršenjem matice kroz čvrstu fazu	49
4.1.3. Ekstrakcija flavan-3-ola raspršenjem matice kroz čvrstu fazu	54
4.2. POTVRDA MODELA	55
5. ZAKLJUČAK	60
6. LITERATURA	62
7. DODATAK	67
7.1. POPIS SLIKA	68
7.2. POPIS TABLICA	70
7.3. POPIS KRATICA I SIMBOLA	71
7.4. ŽIVOTOPIS	72



## ***1. UVOD***

Polifenoli predstavljaju skupinu spojeva biljnog podrijetla, čiju strukturu čini jedan ili više aromatskih prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Uobičajena su sastavnica ljudske prehrane te se u različitim količinama nalaze u voću, povrću, vinu, voćnim sokovima, čaju i kavi. Polifenoli se u crnom grožđu nalaze u kožici, sjemenkama i mesu. Sastav i količina pojedinih polifenola ovisi o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, postupcima uzgoja vinove loze.

Više je razloga za identifikaciju i određivanje polifenola u grožđu. Posljednjih desetak godina brojna istraživanja su pokazala da namirnice koje sadrže polifenole pozitivno utječu na zdravlje i to najvećim dijelom zbog antioksidacijskog učinka. Mnoga istraživanja pokazala su kako antioksidacijsko djelovanje tih supstancija u grožđu štiti od nastanka ateroskleroze i koronarnih bolesti. Osim toga dokazano je njihovo antikancerogeno, protuupalno i antimikrobno djelovanje.

Navedeni razlozi su veliki poticaj za ekstrakciju polifenola iz grožđa. U tu svrhu rabe se ekstrakcije poput mikrovalne ekstrakcije, ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE), ekstrakcija pregrijanom vodom, a ponaviše ekstrakcija čvrsto-tekuće (SLE).

U analizi polifenola koriste se brojne tehnike kao što su tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija uz prethodnu derivatizaciju, nuklearna magnetska rezonancija itd. Danas se najčešće primjenjuje tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom dioda, fluorescentnog detektora kao i elektrokemijskog detektora.

U ovom radu kao metoda ekstrakcije radila se ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), a analiza pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom dioda te fluorescentnim detektorom.

Na utvrđeni maseni udio polifenolnih spojeva grožđa značajno utječu postupci pripreve uzorka kao i metoda ekstrakcije, pa je stoga nužna njihova optimizacija radi točnosti i usporedivosti rezultata znanstvenih istraživanja te za bolju iskoristivost grožđa kao sirovine za dobivanje flavonoida u komercijalne svrhe.

Cilj ovog rada je optimirati metodu ekstrakcije raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu tako da se ekstrakti polifenola dobiju u što većem iskorištenju sa što manjim utjecajem matice. Isto tako cilj je pronaći optimalan sorbens (morski pijesak, fenilsilicijev dioksid, XAD-2), ekstrakcijsko otapalo, volumen otapala (4, 7, 10 mL) i prikladan omjer masa uzorak/sorbens kojima će se dobiti najveće iskorištenje polifenola iz kožice grožđa.

## ***2. OPĆI DIO***

## 2.1. VINOVA LOZA

Vinova loza (*lat. Vitis vinifera* L.) je višegodišnja biljka penjačica iz porodice *Vitaceae* koja potječe s područja Bliskog Istoka odakle se proširila po čitavom svijetu. Listovi su različitih oblika i različite nijanse zelene boje što ovisi o sorti vinove loze. Vinova loza cvate od lipnja do srpnja, a cvatnja traje samo 4 do 5 dana. Plod vinove loze (grožđe) je u obliku grozda, a vrijeme dozrijevanja ploda ovisi o sorti i podneblju gdje raste stoga u našem podneblju grožđe dozrijeva od srpnja do listopada. Vinova loza jedna je od najzastupljenijih poljoprivrednih kultura na svijetu, a procjenjuje se da godišnja proizvodnja grožđa iznosi oko 65 milijuna tona (FAO, 1998). Oko 80 % godišnjeg usjeva se koristi za proizvodnju vina, a ostatak se koristi za konzumaciju. Razlikujemo dvije velike skupine grožđa, europska i sjeverno-američka vrsta. Europsko grožđe pripada vrsti *Vitis vinifera* L. i čini oko 95 % proizvedenog grožđa dok sjeverno-američko grožđe pripada vrstama *Vitis labrusca* i *Vitis rotundifolia*. Europski tip grožđa karakterizira relativno debela pokožica koja prianja uz čvrstu i slatku pulpu. [1]

### 2.1.1. Anatomska građa bobice grožđa

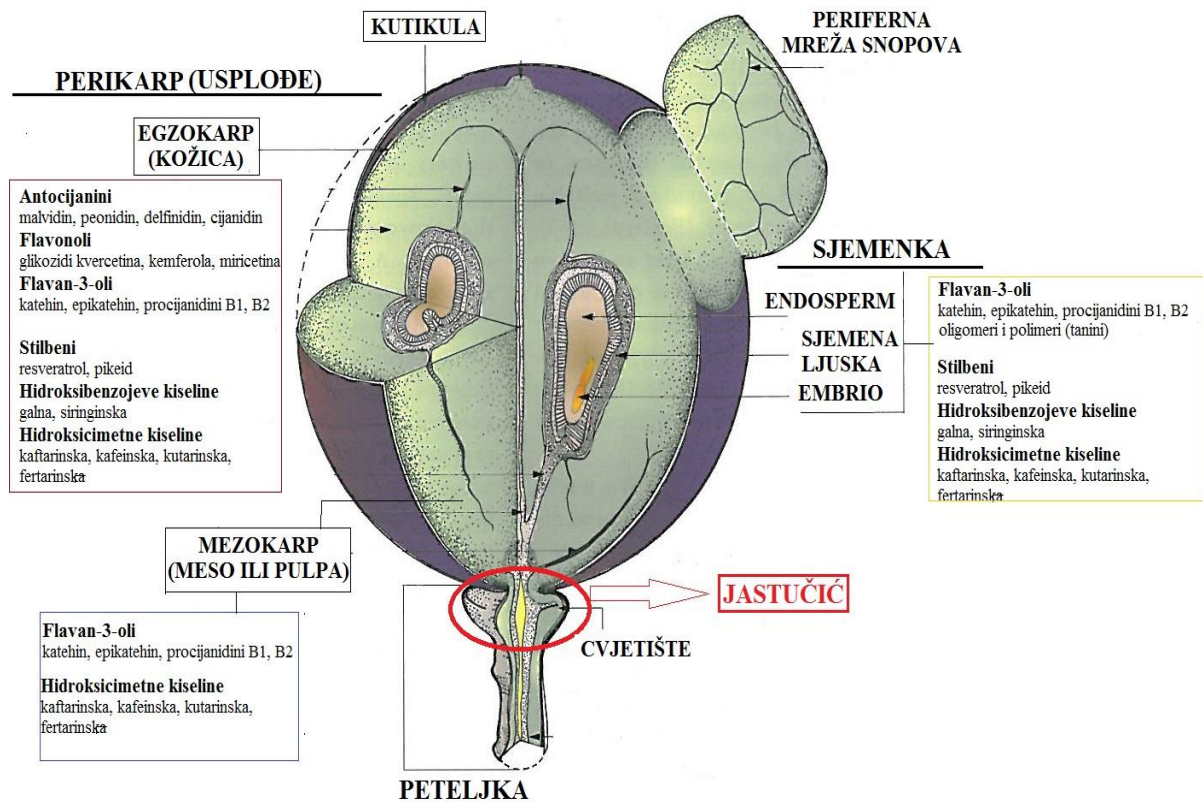
Tijekom razvoja bobice grožđa dolazi do transformacije plodnice u perikarp. Na Slici 1 je prikazana pojednostavljena građa bobice grožđa. Perikarp se sastoji od egzokarpa koji čini vanjski dio bobice grožđa (kožica), mezokarpa (središnji dio, meso ili pulpa) i endokarpa (unutarnji dio). Mezokarp i endokarp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

Tkivo perikarpa tvori više od 65 % volumena bobice. Kožica bobice grožđa (egzokarp) se sastoji od dvije anatomske različite regije. Vanjski dio kože čini epiderma, a unutarnji dio čini hipoderma. Epiderma sadrži jedan sloj spljoštenih stanica u obliku diska s nepravilno valovitim krajevima. To su ujedno i stanice u kojima se ne odvija fotosinteza već se u njihovim vakuolama nalaze kapljice ulja. Ovisno o vrsti, mogu razviti zadebljanu ili lignificiranu stjenku. Na epidermi se nalazi nekolicina puči koje s vremenom tj. zrenjem gube funkciju, postaju plutaste i u njima se akumuliraju polifenoli. Iznad epiderme se nalazi kutikula s debelim slojem voska. Na njoj se nalaze mikrofisure i mikropore preko kojih se odvija transpiracija. Hipoderma se sastoji od više slojeva usko nabijenih mezofilnih stanica, a njihov broj ovisi o vrsti grožđa. Stanice su spljoštene i imaju zadebljane kutove stjenke. U ranom stadiju razvoja, stanice imaju fotosintetsku ulogu, a nakon dozrijevanja plastidi gube

klorofil i škrob i počinju akumulirati kapljice ulja. Takvi modificirani plastidi postaju mjesto sinteze i skladištenja terpena i norizoprenoidea. Većina stanica hipoderme također akumulira flavonoide dok su antocijani, prisutni u vrstama crnog grožđa, akumulirani u njenim krajnjim slojevima. [1]

Kod mezokarpa bobice razlikujemo vanjski dio koji se nalazi između hipoderme i perifernih vaskularnih vlakana i unutarnji dio koji je ograničen perifernim i aksilarnim vaskularnim nitima. Većina stanica mezokarpa je okruglog, jajastog oblika i sadrže velike vakuole koje mogu pohraniti fenole, dok iste rijetko sudjeluju u fotosintezi. Sloj stanica koji predstavlja granicu između mesnatog dijela bobice i sjemene lože se često naziva unutarnja epiderma. Septum je središnji dio gdje se spajaju dva oplodna listića tučka. [1]

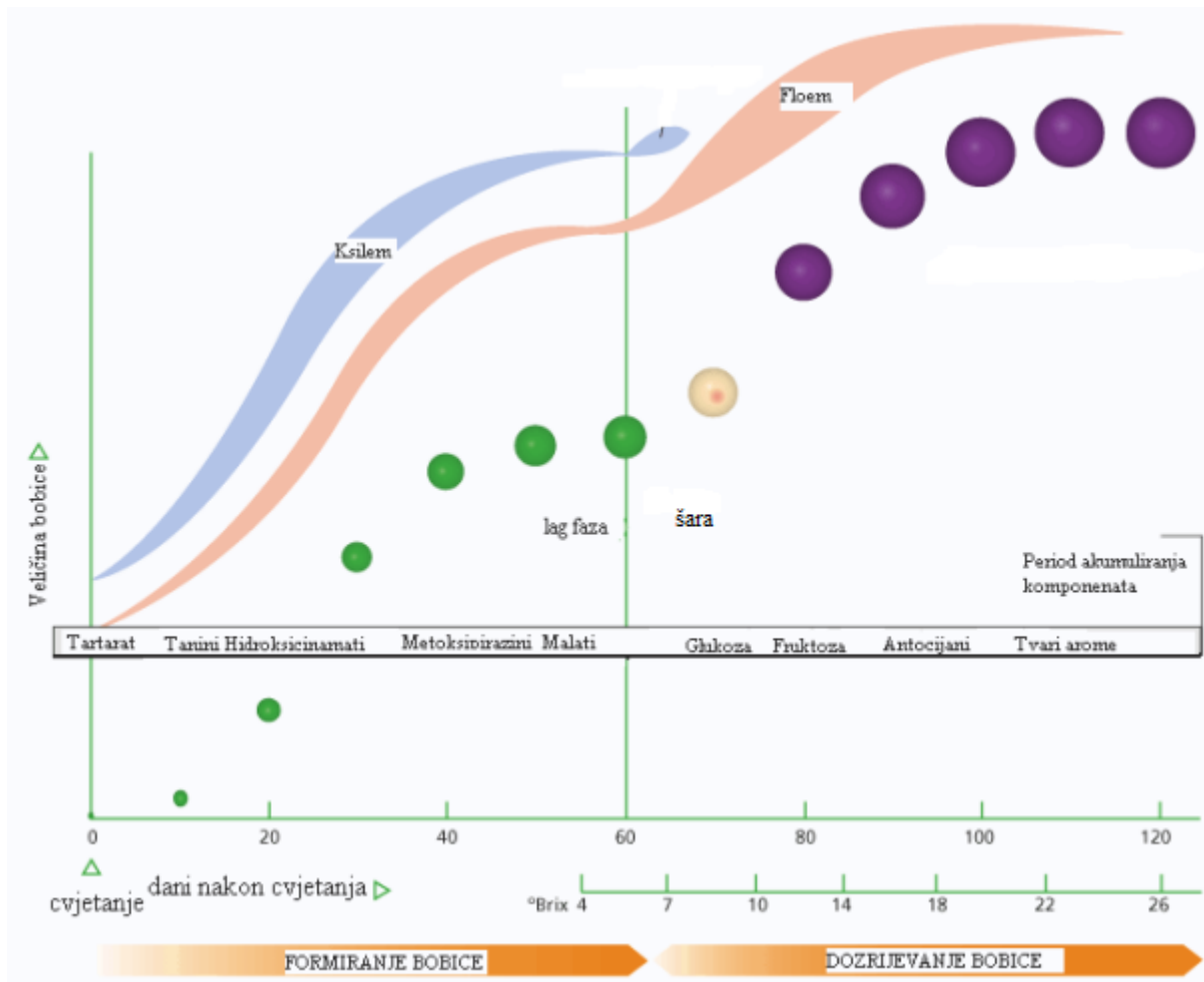
Razvoj sjemenki je povezan sa sintezom regulatora rasta koji su neophodni za razvoj voća, a broj sjemenki djelomično ovisi o veličini voća. Glavni dio sjemenke čini endosperm koji služi kao izvor hrane embriju jer sadrži ulje, škrob, bjelančevine te mineralne tvari. Endosperm je okružen parom integumenata od kojih se samo jedan značajnije razvija. Embrij zauzima najmanji dio volumena sjemenke. Građen od dva klicina listića (kotiledona), epikotila (gornji dio izdanka) i sjemenskog korjenčića na vrhu hipokotila (donji dio izdanka). [1]



Slika 1. Građa bobice grožđa

## 2.1.2. Razvoj bobice tijekom dozrijevanja grožđa

Razvoj bobice sastoji se od dvije faze rasta (Slika 2). Prva faza razvoja bobice traje otprilike 60 dana nakon cvatnje. Tijekom tog perioda formira se bobica i stvaraju se zametci sjemenki. Prvih nekoliko tjedana dolazi do brzog dijeljenja stanica i na kraju tog perioda unutar bobice uspostavlja se konačan broj stanica. Tijekom prve faze razvoja bobice dolazi do akumulacije spojeva kao što su minerali, [22] aminokiseline, [23] mikronutrijenti i spojevi arome (metoksipirazini). [24] Bobica se opskrbljuje hranjivim tvarima preko vaskularnog sistema koji se sastoji od ksilema i floema. Drugu fazu razvoja bobice ili dozrijevanja karakterizira pojava boje i omekšavanje bobice grožđa. Bobica grožđa predstavlja osnovno mjesto gdje se odvija biosinteza sekundarnih metabolita koji su od velike važnosti za kakvoću vina. [25]



Slika 2. Formiranje bobice i dozrijevanje grožđa [26]

### 2.1.3. Kemijski sastav bobice grožđa

Na kemijski sastav grožđa utječu brojni čimbenici, a neki od njih su zrelost, vrsta, područje u kojem raste te godina berbe. [27] Šećeri su kvantitativno najznačajniji organski sastojci u voću. Tijekom ranog razvoja bobice grožđa dio ugljikohidrata sudjeluje u fotosintezi pri čemu se dobiva energija koja je potrebna za daljnji razvoj bobice. Tijekom zrenja dolazi do akumulacije šećera i to najviše u vakuolama stanica pulpe. Tijekom zrenja još dolazi i do redukcije kiselosti. Vinska i jabučna kiselina čine 70- 90 % ukupnih kiselina bobice. U grožđu nalazimo uz već ranije spomenute još i neke organske kiseline (npr. limunska), fenolne kiseline, aminokiseline i masne kiseline.

Od prisutnih mineralnih tvari u bobici grožđa najznačajniji je kalij. Kalij utječe na sintezu i ionizaciju kiselina tijekom zrenja. Čimbenici koji utječu na akumulaciju kalija u bobici nisu dobro poznati. Njegova količina se povećava nakon dozrijevanja, pogotovo u kožici. Kožica zauzima 10 % mase bobice, a sadrži 30-40 % ukupnog masenog udjela kalija koji se ponaša kao regulator osmotskog potencijala stanice. Pektinske tvari se nalaze u staničnoj stjenici i daju čvrstoću stanicama. Tijekom zrenja dolazi do razgradnje pektina uslijed djelovanja enzima ili uslijed smanjenja koncentracije kalcija u staničnoj stjenici, a posljedica toga je mekšanje bobica.

Mekšanje dovodi do lakšeg izdvajanja soka iz pulpe te fenolnih spojeva i tvari arome iz kožice. Lipidi su prisutni u grožđu kao masne kiseline, kutin, fosfolipidi i glikolipidi membrane, kutikularni i epikutikularni vosak te kao ulja u sjemenkama. Tijekom zrenja u grožđu raste koncentracija u vodi topljivih proteina, a najčešće je to glutation. Od slobodnih aminokiselina najzastupljenije su prolin i arginin. [1]

#### **2.1.4. Karakteristike sorte Regent**

Pojedine sorte vinove loze sadrže vrlo visoke koncentracije pojedinih polifenola pa potencijalno mogu biti dobra sirovina za ekstrakciju polifenola u komercijalne svrhe. U ovu skupinu sorata mogu se ubrojiti i neke sorte nastale međuvrtnim križanjima vinove loze s drugim vrstama roda *Vitis* (posebice sorta Regent), te je u ovom radu i korištena.

Roditelji Regenta su dvije manje poznate sorte Diana i Chamburcine. Izbor tog roditeljskog para lako možemo razumjeti ako znamo njihovo podrijetlo. Naime, sorta Diana nastala je križanjem sorata Silvanac i Müller-Thurgau (nekima poznatiji kao Rizvanac) koje su među najvažnijim bijelim sortama u Njemačkoj. Sorta Chambourcin nastala je u Francuskoj početkom 20. st. međuvrtnim križanjem. U njezinom pedigreu uz europsku ima i dio američke „krvi“ te se zbog toga odlikuje i visokom otpornošću prema plamenjači i pepelnici. Tek 1994. godine, nakon dugotrajne selekcije i evaluacije, Regent (dotada poznat kao sjemenjak Gf. 67-198-3) priznat je kao nova sorta, a 1996. godine postaje preporučena sorta. Ova sorta ima otpornost prema gljivičnim bolestima pa se u njihovom uzgoju koristi znatno manje sredstava za zaštitu bilja, što njihovo grožđe čini vrlo vrijednom sirovinom za proizvodnju farmaceutskih i drugih pripravaka, a i njihov uzgoj je ekonomski isplativiji. [2]

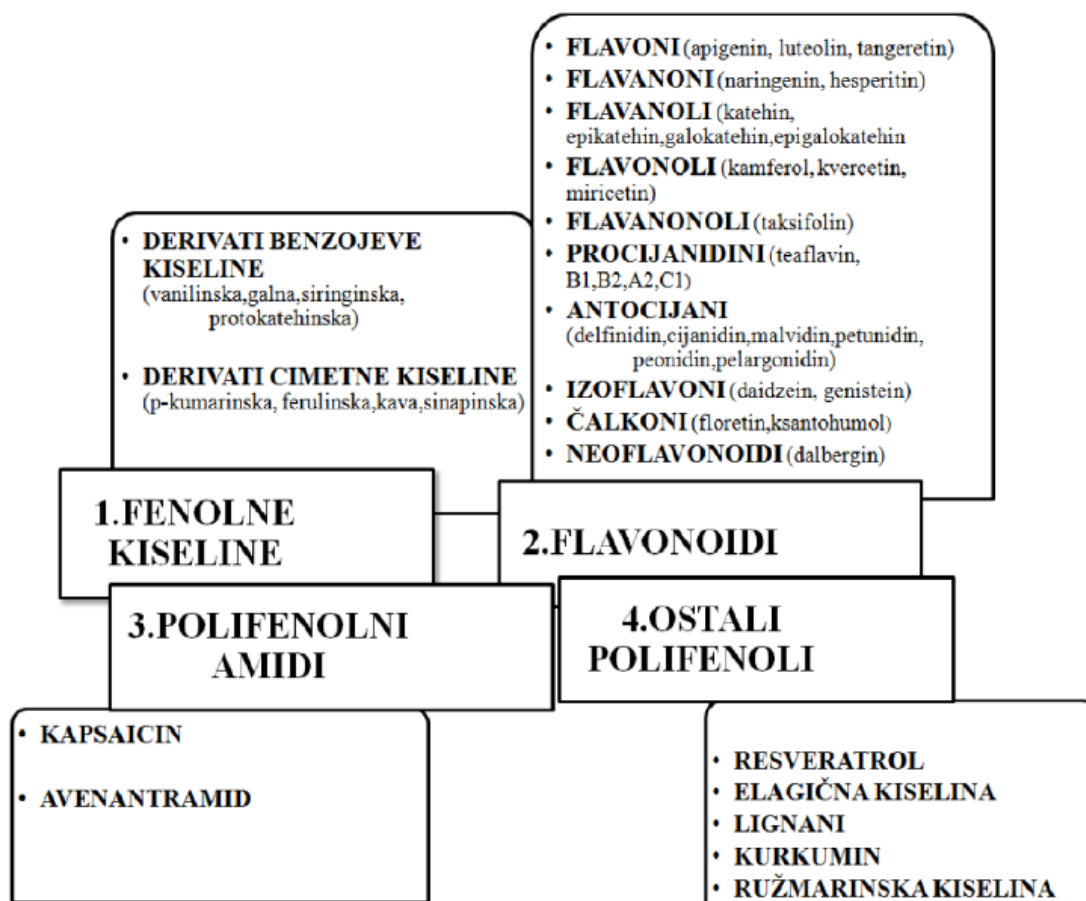
## **2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI**

Kada je hidroksilna skupina povezana s ugljikovim atomima benzena, govorimo o fenolima. Najjednostavniji član ove vrste je hidroksibenzen, naziva se fenolom. Fenoli su tekućine s visokim vrelištima ili krutine, a imaju jak karakterističan miris. [3]

Polifenoli su važni organski spojevi koji su prisutni u voću. Važnost polifenolnih spojeva je bila uglavnom vezana uz organoleptička svojstva (boja, trpkost, gorčina, okus), a posljednjih desetljeća je prepoznata njihova nutritivna vrijednost jer istraživanja pokazuju da imaju pozitivne učinke na zdravlje. Njihov blagotvoran učinak na organizam proizlazi iz sposobnosti vezanja slobodnih radikala (antioksidansi), kelatnog djelovanja (vezanje dvovalentnih kationa) te inaktivacije određenih enzima zbog čega im se pripisuju antikancerogena, antiteratogena, protuupalna, antimikrobna, antialergijska i mnoga druga



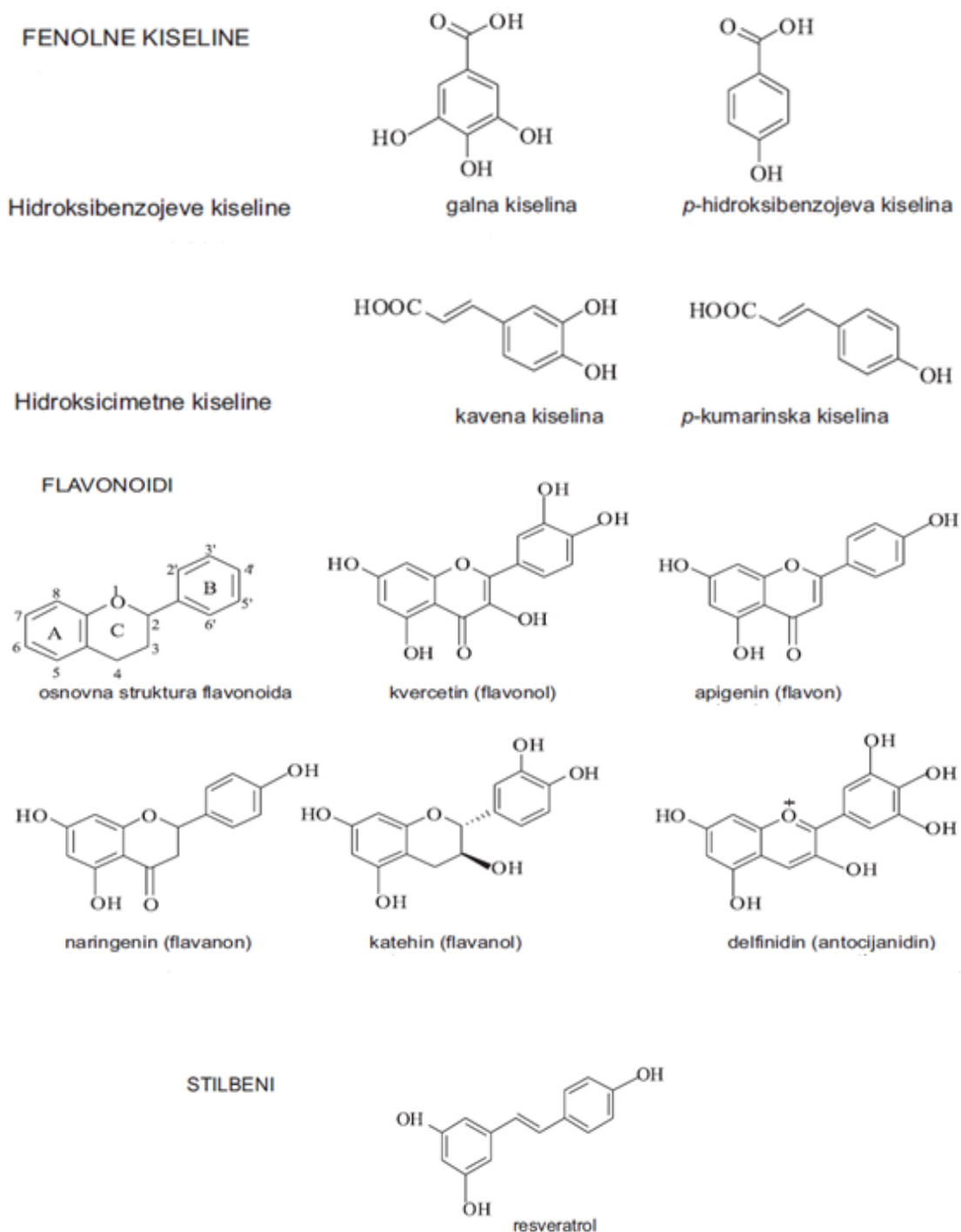
svojstva. [28] To je mnogobrojna skupina spojeva koja uključuje velik broj podgrupa spojeva, ali svima je zajedničko svojstvo da su topljivi u vodi i staničnom soku. One se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima. Na Slici 3 su prikazane skupine unutar polifenola i njihovi glavni predstavnici.



**Slika 3.** Podjela polifenola [29]

Polifenole grožđa sačinjavaju: fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni (Slika 4). Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida (flavonoidi bez vezanih molekula šećera) posjeduju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, odnosno sadrže petnaest atoma ugljika raspoređenih tako da su dvije benzenske jezgre (prsten A i prsten B) povezane s propanskim lancem, koji može ili ne mora formirati treći prsten (prsten C). [4] Flavonoidi mogu postojati kao slobodni ili kao polimeri vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili njihovom kombinacijom. Njihova primarna funkcija u biljkama je prva linija obrane protiv patogenih mikroorganizama, štetnih insekata i biljojeda. [1]

Najveće i najdetaljnije istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini) i njihovi polimeri proantocijanidini te antocijanidini. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu. Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji postoji u dva stereoizomerna oblika: *cis*-(Z) i *trans*-(E). [4]



**Slika 4.** Strukturne formule nekih polifenola [4]

Kod grožđa, izuzevši fenolne spojeve sjemenke, najveći udio fenolnih spojeva se nalazi u kožici bobice. [1] Polifenolni spojevi su vrlo važni u tehnologiji crnih vina jer utječu na boju vina i daju karakterističan okus. Pigmentacija crnih sorata je ograničena na epidermu i vanjske slojeve hipoderme kožice, [30] a potječe od antocijana. Bijelo grožđe sadrži manje ukupnih fenola od crnog grožđa i ne sadrži antocijane. Boja bijelog grožđa potječe od karotenoida, ksantofila i flavonola kao što je npr. kvercetin. Karotenoidi se akumuliraju u plastidima, a flavonoli u vakuolama. [1]

### **2.3. PRIPRAVA UZORKA ZA ANALIZU**

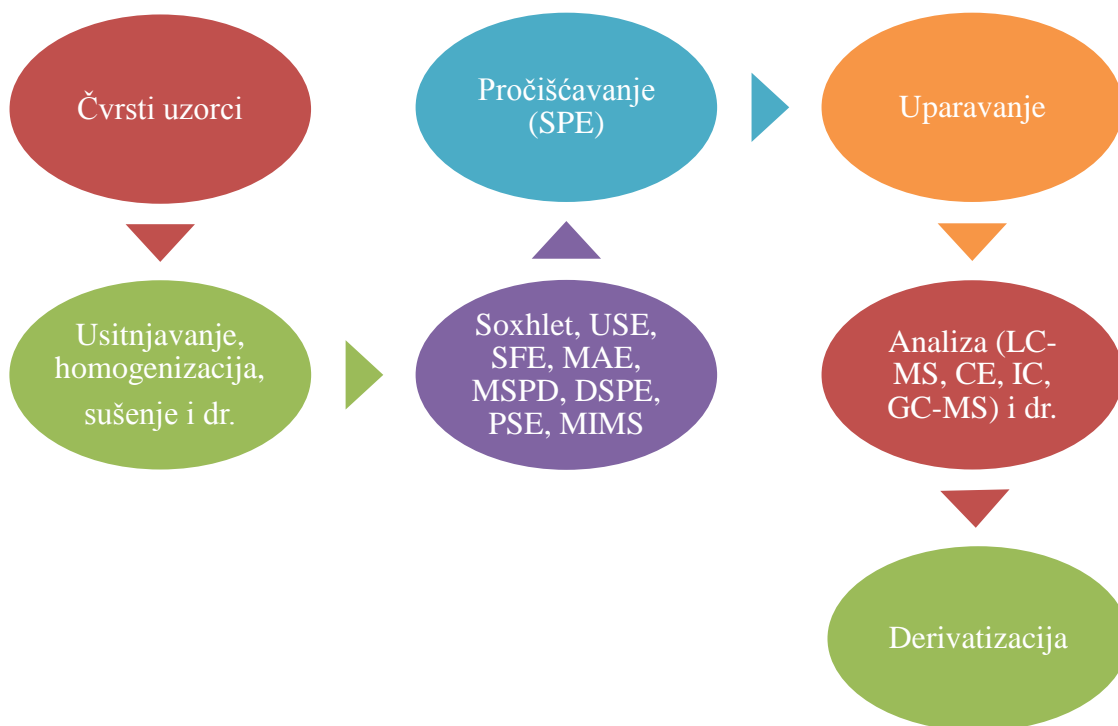
Priprava uzorka je vrlo bitan i osnovni korak u analizi uzoraka. [11]

Analiza uzorka (voda, tlo, sediment, biološki materijali, hrana) obuhvaća 5 osnovnih koraka:

- uzorkovanje,
- pripravu uzorka,
- odjeljivanje analita,
- detekciju i
- procjenu mjernih podataka kojom dobivamo informaciju o identifikaciji uzorka i njegovom kvantitativnom sastavu.

Osnovni princip pripreme uzorka je prevesti realni uzorak u uzorak pogodan za analizu, pri čemu su neizbježne interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita i matice uzorka pa mogu utjecati na primjenjivost, djelotvornost i ponovljivost postupaka pripreme uzorka. [12]

U ovom radu pripremani su čvrsti uzorci za analizu pa je stoga dan naglasak na pripravu čvrstih uzoraka. Mogući postupci pripreme čvrstih uzorka dani su na Slici 5.



**Slika 5.** Pregled mogućih postupaka pripreve uzorka u čvrstom stanju [5]

Čvrsti uzorci nisu homogeni što zahtjeva puno individualniji i složeniji pristup pripravi uzorka jer se oni prije otapanja moraju usitniti i homogenizirati. Ovisno o vrsti materijala za analizu, uzorak se nakon što je pregledan suši, prosijava i homogenizira. Da bi se mogla provesti pouzdana ekstrakcija, čvrsti uzorak treba usitniti, a ponekad i kemijski razoriti. Homogenizacija čvrstih i suhih uzoraka provodi se mljevenjem. [5]

### 2.3.1. Klasične metode pripreve uzorka

Ekstrakcija analita iz uzorka matice zahtjeva pravu kombinaciju otapala i tehnike. Klasične metode ekstrakcije dane su u Tablici 1 kao i njihov princip djelovanja. Većina ovih klasičnih metoda, poput Soxhlet ekstrakcije i ispiranja, postoji više od 100 godina i daju rezultate koji su prihvatljivi većini znanstvenika. Velika većina ovih metoda koristi organska otapala, često u obilatim količinama, ali posljednjih godina nastoji se prilagoditi sustave tako da se smanji upotreba velikih količina uzorka i otapala. [13]

**Tablica 1.** Klasične metode ekstrakcije čvrstih uzoraka i njihov princip djelovanja [13]

<b>METODA PRIPREME UZORKA</b>	<b>PRINCIP DJELOVANJA METODE</b>
<b>Ekstrakcija čvrsto-tekuće</b>	Uzorak je stavljen u začepljeni spremnik te je dodano otapalo koje otapa željeni analit; otopina je odvojena od uzorka filtriranjem.
<b>Soxhlet ekstrakcija</b>	Uzorak je stavljen u jednokratni porozni spremnik (cilindar); otapalo refluksira konstantnim protokom kroz cilindar i ispire analit koji se prikuplja u vruću tikvicu.
<b>Homogenizacija (mućkanje)</b>	Uzorak je stavljen u miješalicu, dodano je otapalo te je uzorak homogeniziran sve dok nije sitno usitnjen; otapalo je uklonjeno prije daljnje rada.
<b>Sonizacija ili ultrazvučna ekstrakcije</b>	Sitni usitnjeni uzorak je uronjen u ultrazvučnu kupelj s otapalom i izložen ultrazvučnom zračenju.

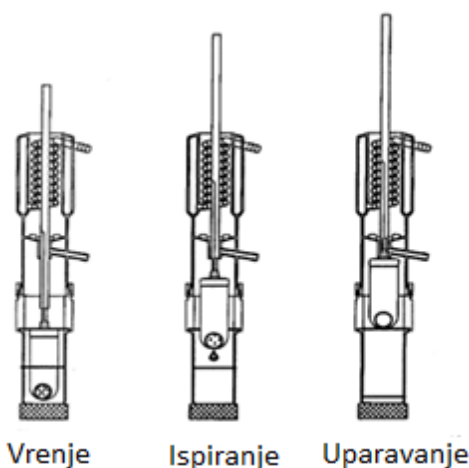
### **2.3.2. Moderne metode pripreme uzorka**

Moderne metode pripreme uzorka uglavnom se zasnivaju na ekstrakciji. Mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit te na one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugog otapala. Sve ekstrakcijske metode koriste se principom selektivnoga koncentriranja analita u jednoj fazi, a njihova selektivnost postiže se promjenom radnih uvjeta. Analit se pritom raspodjeljuje između dviju faza u skladu s konstantom raspodjele, temperaturom i relativnim obujmom faza. [5]

U radu uzorak se priprema metodom raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu, koja pripada modernim metodama pripreme uzorka pa je stoga naglasak dan na pripremu uzoraka modernim metodama.

### 2.3.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija

Klasična ekstrakcija iz čvrstih uzoraka ili Soxhlet ekstrakcija je prilično spora metoda pripreve uzorka koja je u primjeni bila do 1980-ih, kada su je postupno počele zamjenjivati moderne metode. Da bi se smanjili nedostaci metode, razvijen je automatizirani Soxhlet, poznat i kao Soxtec. Slika 6 prikazuje tri koraka Soxtec ekstrakcije: vrenje, ispiranje i uparavanje. Zbog boljeg kontakta između otapala i uzorka, ekstrakcija automatiziranim Soxhletom puno je brža jer je i prijenos mase mnogo bolji. Primjenom Soxteca vrijeme ekstrakcije je smanjeno na 2-3 sata, a obujam otapala s 250-500 mL na 40-50 mL po ekstrakciji. Moguća je i istovremena ekstrakcija više uzoraka. [5]



Slika 6. Tri koraka Soxtec ekstrakcije [6]

### 2.3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija (MAE) je metoda u kojoj se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo i uzorak, čime se pospešuje prijelaz ispitivanih spojeva iz uzorka u otapalo, kao i mikrovalnom razlaganju uzorka. Ekstrakcija se, kao i razlaganje, automatski kontrolira osjetilima za tlak i temperaturu. Temperatura ekstrakcije je 50-150 °C, a tlakovi 1-5 MPa. To je brza ekstrakcijska metoda (10-20 min) koja troši relativno malo otapala (10-30 mL), a u istom vremenu se može ekstrahirati više uzoraka odjednom. Djelotvornost ekstrakcije je relativno visoka i raste s temperaturom i vremenom. [5]

Priroda otapala ima veliku važnost u MAE. Otapalo bi trebalo biti selektivno i učinkovito otapati analite u uzorku i istovremeno bi trebalo moći apsorbirati mikrovalno zračenje da ne dođe do prevelikog grijanja čime se izbjegava razaranje spojeva analita. Uobičajena je praksa koristiti binarnu smjesu otapala, gdje samo jedno otapalo apsorbira mikrovalno zračenje. Drugi važni parametri koji utječu na proces ekstrakcije su primijenjena snaga, temperatura i vrijeme ekstrakcije. Osim toga, sadržaj vode u uzorku mora biti pažljivo kontroliran da se izbjegne prekomjerno zagrijavanje, omogućujući ponovljive rezultate. [7]

MAE može biti provedena na dva različita načina, jedan je metoda sa zatvorenom posudom, koja je pod kontrolom (povišenog) tlaka i temperature, a druga metoda je s otvorenom posudom koja se izvodi pod atmosferskim tlakom. Ove metode se zovu tlačna mikrovalna ekstrakcija, PMAE i usmjerena mikrovalna ekstrakcija, FMAE. [8]

Nedostatak mikrovalne ekstrakcije je u nemogućnosti uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima, što ovisi o dielektričnoj konstanti otapala (što je  $\epsilon$  veća, to je jača interakcija). Drugi nedostatak je manja selektivnost te metode u usporedbi sa SFE metodom. [5]

### **2.3.2.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidom**

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE) omogućuje određivanje organskih sastojaka u uzorcima vode, tla i sedimenta. Glavne su joj prednosti:

- superkritični fluidi imaju više difuzijske koeficijente i nižu viskoznost od tekućih otapala, što rezultira boljom topljivošću analita te brzom kinetikom reakcije,
- promjenom tlaka i temperature može se utjecati na jakost otapala što je posebno korisno za ekstrakciju složenih uzoraka,
- dotok svježeg fluida je kontinuiran, čime se omogućava kvantitativnost ekstrakcije.

Dodatne su prednosti smanjenje obujma opasnih otapala (5-10 mL), kraće trajanje (30-75 min), manja masa uzorka (2-20 g) te mogućnost povezivanja s tekućinskim i plinskim kromatografom, a dobivene ekstrakte ne treba dodatno pročišćavati ili filtrirati. [5]

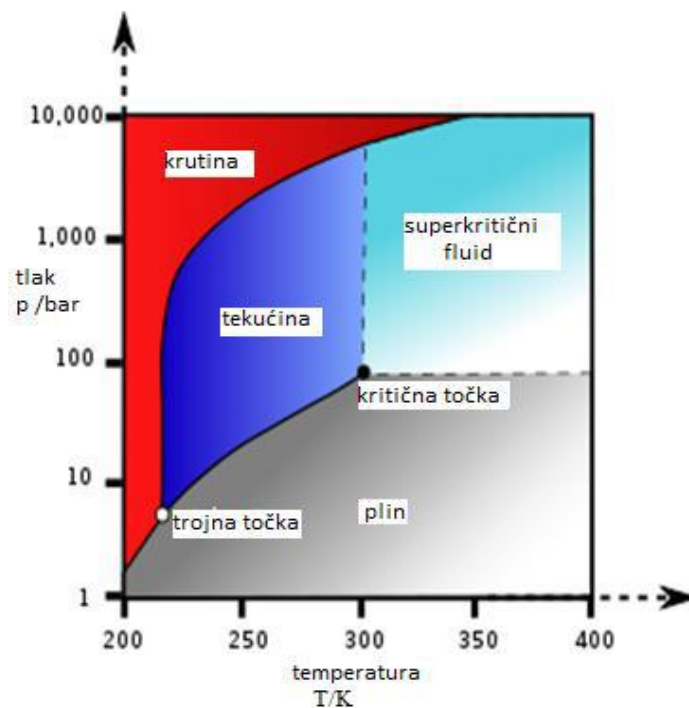
SFE postupak je odvajanje jedne komponente (ekstrakta) iz druge (matice) koristeći superkritični fluid kao otapalo za ekstrakciju. Superkritični fluidi su vrlo komprimirani

plinovi koji imaju kombinaciju svojstava plinova i tekućina, a mogu dovesti do reakcija, koje je teško ili čak nemoguće postići konvencionalnim otapalima. [9]

Trenutačno se najviše rabi CO<sub>2</sub> jer superkritične uvjete postiže jednostavno, nisko je toksičan, nezapaljiv, visoke je čistoće, a cijena mu je pristupačna. [5]

Fazni dijagram CO<sub>2</sub> dan je na Slici 7. Uvjeti ekstrakcije za superkritični CO<sub>2</sub> su iznad kritične temperature od 31 °C i kritični tlak od 74 bara. [9]

Glavni mu je nedostatak ograničena primjena za ekstrakciju nepolarnih i umjereno polarnih.



Slika 7. Fazni dijagram CO<sub>2</sub> [40]

Velika prednost postupka je u tome što je većina superkritičnih fluida pri sobnim uvjetima plinovita, pa analiti prelaze u otopinu jednostavnim sniženjem tlaka ili uvođenjem u male količine odgovarajućeg otapala. [5]



#### **2.3.2.4. Tlačna ekstrakcija otapalom**

Tlačna ekstrakcija otapalom (PSE) automatizirana je metoda koja se temelji na ekstrakciji otapalom pri povišenoj temperaturi, kada otapala pokazuju bolja ekstraktivna svojstva. Porastom temperature (do 200 °C) raste i tlak (do 20 MPa) čime se ostvaruje bolja djelotvornost ekstrakcije uz kraće vrijeme (12-18 min) i manju potrošnju otapala (15-40 mL). Metoda je razvijena pod utjecajem ekstrakcije fluidom u superkritičnim uvjetima. Povišena temperatura smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala, čime se omogućuje njegovo bolje prodiranje u uzorak. Tlačna ekstrakcija otapalom brža je i djelotvornija od ekstrakcije superkritičnim fluidima, jer je neovisna o matici uzorka i o dodatku modifikatora polarnosti. [5]

PSE koristi organska otapala, pri povišenom tlaku i temperaturi kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije. Povišena temperatura ubrzava kinetiku ekstrakcije, a povišeni tlak zadržava otapalo u tekućem stanju, što omogućava sigurnu i brzu ekstrakciju. Visoki tlak uzrokuje ulazak otapala u pore matice pa bi trebao olakšati ekstrakciju analita. Visoka temperatura smanjuje viskoznost tekućeg otapala, omogućujući bolju penetraciju matice i slabljenje interakcija otopljene tvari-matice. Također, povišena temperatura poboljšava difuznost otapala što rezultira povećanjem ekstrakcijske brzine. [10]

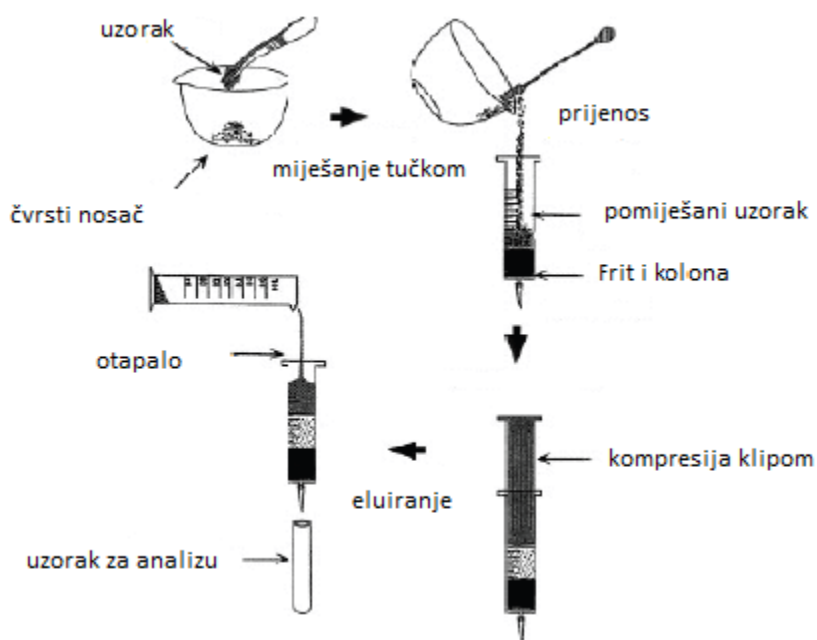
#### **2.3.2.5. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu**

Metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu, MSPD razvijena je 1989.-te, a tijekom posljednjih godina ova metoda je opet pronašla važno mjesto među pripremnim tehnikama koje se primjenjuju u analizi uzoraka biljaka i hrane (sa i bez sadržaja masti i različitim količinom vode). Ova metoda je pogodna za čvrste, polučvrste i viskozne matice koje često uzrokuju probleme u drugim zajedničkim tehnikama pripreme. [17]

MSPD razvijena je radi pojednostavljenja pripreme uzoraka s visokim udjelom masnoća. Postupak se temelji na miješanju male mase (oko 0,5 g) ispitivanoga uzorka s puno većom količinom čvrstog, praškastog sorbensa (najčešće 4 puta većom od mase uzorka). Tako dobivenim polusuhim praškastim uzorkom pune se kolonice (slične onima za ekstrakciju čvrstom fazom) iz kojih se željeni analiti eluiraju odgovarajućim otapalom. [5]

MSPD je tehnički vrlo slična SPE, ali je separacijski princip potpuno različit. [14]

Slika 8 prikazuje tipične korake u MSPD ekstrakciji.



**Slika 8.** Koraci u tipičnoj MSPD ekstrakciji [6]

Nekoliko čimbenika izdvojeno je ispitivanjem njihovih učinaka u MSPD ekstrakciji. To su:

- učinak prosječnog promjera čestica,
- karakter vezane faze,
- korištenje nederivatiziranog silicija ili drugih čvrstih potpornih materijala,
- najbolji omjer uzorka i sorbensa (najčešći omjer je 1:4),
- kemijska modifikacija matice ili smjese matice i sorbensa,
- optimalan izbor eluensa i redoslijed njegove primjene u koloni,
- ekstrakcijski volumen,
- učinak uzorka matice.

Glavne prednosti MSPD ekstrakcije su osim što zahtjeva vrlo male količine uzorka i otapala, brza je, jeftina i može se provoditi pod blagim ekstrakcijskim uvjetima (sobna temperatura i tlak) te daje prihvatljivo iskorištenje i selektivnost, a time je smanjeno onečišćenje okoliša i poboljšana je sigurnost radnika. [7]

Metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu primjenjuje se kao općeniti analitički postupak za pripremu, ekstrakciju i frakcioniranje čvrstih, polučvrstih i/ili vrlo viskoznih bioloških uzoraka. Koristi se za izolaciju širokog raspona lijekova, pesticida, prirodno dobivenih sastojaka i drugih spojeva iz širokog niza složenih biljnih i životinjskih uzoraka. [15]

U Tablici 2 dana je primjena MSPD metode.

**Tablica 2.** Primjena MSPD [16]

<b>Ciljani spojevi</b>	<b>Uzorak</b>	<b>Disperzni materijal</b>	<b>Omjer uzorak/sorbens</b>
<i><b>Životinjska tkiva i hrana životinjskoga podrijetla</b></i>			
<b>alkilfenol, bisfenol A</b>	mlijeko, jaja	C18	1:1
<b>sulfonamidi</b>	meso	Alumina N – S	1:4
<b>sulfonamidi</b>	životinjska tkiva	C18	1:2
<b>tetraciklini</b>	sir	kristobalit	< 1:4
<b>OCPs, piretroid pesticid</b>	masna hrana	celit	1:3
<b>OPPs</b>	goveđi mišići i jetra	C18	1:4
<i><b>Biljke i biljni produkti</b></i>			
<b>buprofezin, tetradifon</b>	propolis	silika	1:2
<b>karbadoks, olakindoks</b>	hrana	C18	1:2
<b>fungicidi</b>	jabuke, banane, grejp	C18	1:1
<b>fenolni spojevi</b>	vino	silika	1:2
<b>aflatoksin</b>	maslinovo ulje	C18	1:3
<b>pesticidi</b>	jabuka i krumpir	MWCNTs	10:3
<i><b>Uzorci okoliša</b></i>			
<b>OCPs</b>	mulj	aluminat + Cu	1:3
<b>PAHs</b>	kanalizacijski mulj	florisil + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2:10:5
<b>PAHs, pesticidi</b>	tlo	florisil	1:2; 1:1
<b>poboparaben, triklosan</b>	unutarnja prašina	C18	1:4

## 2.4. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika, što je čini primjenjivom u brojnim analitičkim postupcima. Koja se temelji na različitom afinitetu sastojaka smjese na nekom prikladnom sorbensu. Kromatografski sustav čine dvije faze, nepokretna i pokretna, te ispitivani spoj. Tijekom kromatografskog procesa on se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog njihovog se gibanja narušava ravnotežno stanje, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze. Nepokretna faza mora se odabrati tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. [17]

S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske se tehnike mogu podijeliti:

- a) Razdjelna kromatografija,
- b) Adsorpcijska kromatografija,
- c) Afinitetna kromatografija,
- d) Kromatografija isključenjem.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti i na temelju sastava pokretne faze. Tako je pri plinskoj kromatografiji pokretna faza inertni plin, pri tekućinskoj kromatografiji to je kapljevinna male viskoznosti, a pri fluidnoj kromatografiji u superkritičnim uvjetima pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Informacija o uspješnosti separacije sadržana je u kromatogramu, tj. u zapisku koncentracijskog ili masenog profila sastojka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja. Na temelju broja opaženih koncentracijskih profila može se zaključiti o složenosti ispitivanog uzorka. Položaj mrlje ili kromatografske krivulje na kromatogramu pomaže u dokazivanju kvalitativnog sastava uzorka, a na temelju površine kromatografske krivulje, odnosno njezine visine, može se dobiti kvantitativna procjena. [17]

### 2.4.1. Tekućinska kromatografija

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti različiti sorbensi. Pogodna je za odjeljivanje smjesa koje se zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti ne mogu analizirati plinskom kromatografijom. Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografskog stupca pri tekućinskoj kromatografiji ovisi o duljini stupca, promjeru čestica punjenja i velikih brzina protoka. Temperatura uvelike utječe na odjeljivanje pri tekućinskoj kromatografiji, posebice kada je riječ o otapalima male molekularne mase. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i reducira viskoznost pokretne faze, pa se time poboljšavaju kinetički parametri.

Tekućinska kromatografija može se podijeliti na:

- a) adsorpcijsku kromatografiju, pri kojoj je nepokretna faza adsorbens,
- b) razdjelnu kromatografiju, pri kojoj je kapljevina nepokretna faza nanescna na čvrsti inertni nosač.

Prema kromatografskom sustavu pri tekućinskoj je kromatografiji moguća uporaba tzv. normalnih i obrnutih faza. [17]

Kromatografija normalnih faza pretpostavlja da je nepokretna faza polarna, a pokretna nepolarna. Odjeljivanje smjese spojeva u tom slučaju ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom. Pri tome su homogeni ili izomerni spojevi s istom funkcionalnom skupinom i sličnim mehanizmom interakcije ne mogu razdvojiti. Kao nepokretna faza pri toj se kromatografiji upotrebljava uglavnom silikagel. Kao pokretna faza služi sustav organskih otapala, kojemu se prema potrebi dodaju voda ili elektrolit radi podešavanja polarnosti.

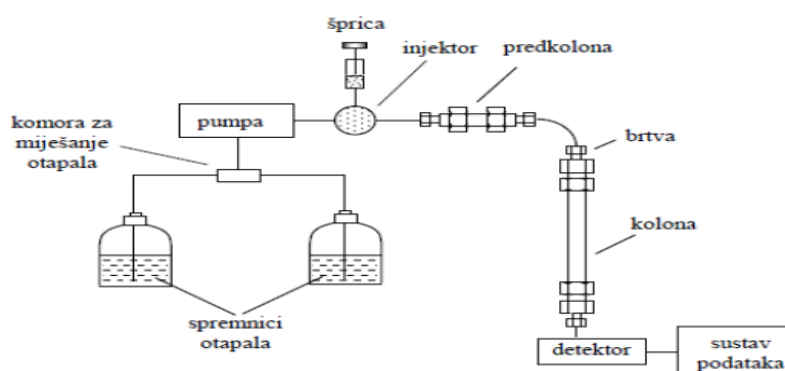
U kromatografiji obrnutih faza, pri kojoj je nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza polarna, mehanizam razdvajanja temelji se na hidrofobnosti analita. Stoga je ona našla primjenu u razdvajanju homogenih i izomernih spojeva slične polarnosti, ali i onih vrlo polarnih i ioniziranih spojeva koji se zbog vrlo čvrste veze s nepokretnom fazom ne mogu razdvajati kromatografijom normalnih faza. I ovdje je silikagel temeljna nepokretna faza, ali ga zbog smanjivanja njegove polarne moći treba modificirati. Stoga se na površinu silikagela vežu alkilne i arilne skupine, amino, nitro ili diolne skupine te kiralni dodatci.[17]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) uglavnom se koristi za neionske i teško hlapive spojeve. Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti kao detektori koriste se detektor s nizom dioda (DAD), fluorescentni detektor (FLD), UV-VID detektor te danas najviše detektori spektrometri masa (MS). Detektori spektrometra masa omogućavaju identifikaciju i detekciju, ali i određivanje analita u vrlo niskim koncentracijama u ppb, pa i manjim. Svi laboratoriji nemaju pristup tako sofisticiranim i vrlo skupim detektorima, već se uglavnom koriste detektori poput detektora s nizom dioda, pri čemu se mjeri apsorbancija analita. [18]

### 2.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) visoko je efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75 % primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. [19]

Sustav se sastoji od pumpe (s kontroliranim protokom pokretne faze), mjesta u koje se unosi uzorak (injektor), kolone, detektora (apsorpcijski, fluorescentni, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa), jedinice za obradu podataka i pisaa. [20] Shematski prikaz HPLC kromatografa dan je na Slici 9.

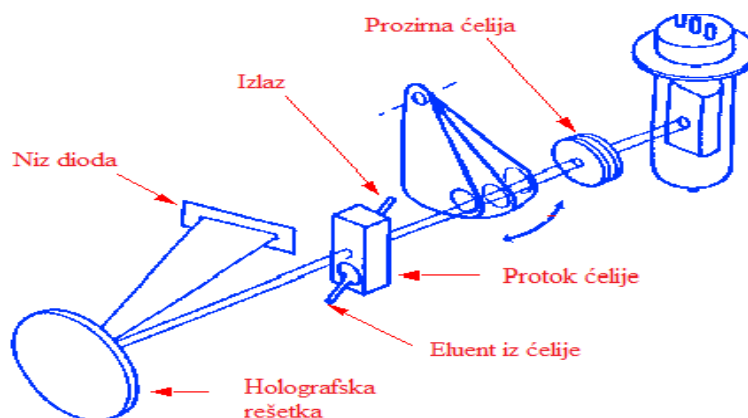


**Slika 9.** Shematski prikaz HPLC kromatografa [19]

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće (kromatografske, HPLC čistoće) i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtara pod vakuumom. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom ( $0,1-10 \text{ cm}^3\text{min}^{-1}$ ) u kolonu. Uzorak se unosi

automatskim uzorkivačem, ili ručno mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju [zapremnina 5 do 500 mm<sup>3</sup> (μl)] u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Analitička kolona je najčešće cijev izrađena iz nehrđajućeg čelika, duljine 250 ili 150 mm, a unutarnjeg dijametra 4,6 mm, punjena česticama veličine 3,5 ili 5 μm. Kao detektori važni su spektroskopski detektori, fluorescentni detektor, detektori indeksa loma i elektrokemijski detektori. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa je analit, odnosno otopljena tvar dokazan neizravno promjenom ovih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vid ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Vrlo su dobri detektori s diodnim nizom ("*photodiode array detector*") (HPLC-DAD ili HPLC-PDA sustav) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vid: apsorpcija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. [19]

Na Slici 10 prikazan je detektor s nizom dioda.

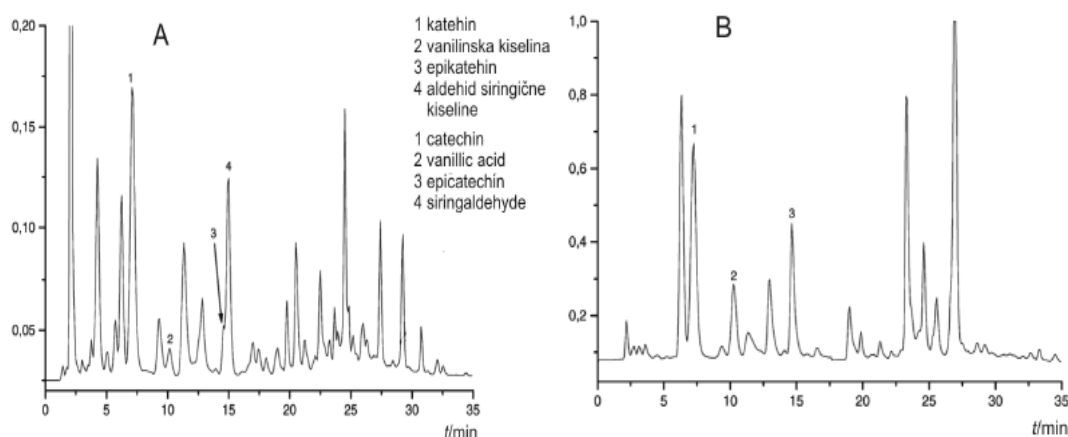


**Slika 10.** Detektor s nizom dioda [20]

Svjetlo iz deuterijeve lampe usmjereno je prozirnom lećom da cijeli snop svjetla može proći kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Tako je uzorak podvrgnut svjetlu svih valnih duljina koje dolaze iz lampe. Raspršeno svjetlo od rešetke je fokusirano na niz dioda. Niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je redovno odabran računalom i pohrani. Spektar otopljene tvari može se dobiti iz krivulje koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Jedini nedostatak ovog tipa detektora je da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu dioda. [21]

Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra, stoga se rutinska detekcija tih spojeva u analizi HPLC-om temelji na mjerenju apsorbancije ultraljubičastog i vidljivog (Vid) zračenja, pomoću UV/Vid detektora. Dokazivanje svih skupina polifenola nije moguće mjerenjem apsorbancije pri samo jednoj valnoj duljini, jer svaka skupina ima apsorpcijske maksimume u različitim područjima valnih duljina. Posebna vrsta UV/Vid detektora je detektor s nizom dioda (DAD) koji ima mogućnost snimanja cijelog UV spektra nekoliko puta tijekom formiranja kromatogramskog pika ispitivanog sastojka. Primjena DAD-a ima niz prednosti: mogućnost mjerenja apsorbancije analita na više valnih duljina te odabir najpogodnije valne duljine za analizu provjeru čistoće ispitivanog sastojka. [4]

Upotreba fluorescentnog detektora spojenog u seriju s apsorpcijskim UV/Vid detektorom omogućuje razlikovanje fluorescirajućih od nefluorescirajućih supstancija čiji su pikovi preklapljeni te njihovu kvantifikaciju. Na Slici 11 prikazani su kromatogrami ekstrakta uzorka crnog vina dobiveni uporabom apsorpcijskog UV detektora (Slika 11 A) i fluorescentnog detektora (Slika 11 B). Usporedbom prikazanih kromatograma može se vidjeti da se pikovi epikatehina i aldehida siringične kiseline preklapaju u kromatogramu dobivenom uz UV detekciju, dok je u kromatogramu dobivenom fluorescentnom detekcijom pik epikatehina dobro razlučen, a pik aldehida siringične kiseline nije vidljiv. Također se može primijetiti i veća osjetljivost fluorescentnog detektora za određivanja vanilinske kiseline. [4]



**Slika 11.** HPLC-kromatogrami ekstrakta crnog vina dobiveni uporabom UV detektora (A) i fluorescentnog detektora (B) [4]



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

### 3.1 MATERIJALI

#### 3.1.1. Kožica grožđa

Kao uzorak uzeta je kožica grožđa sorte Regent. Roditelji Regenta su dvije manje poznate sorte Diana i Chamburcine. Uzorak je dobiven iz Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo , Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Kemikalije

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

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	p.a.	Carlo Erba, Francuska
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	HPLC	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska.
Etanol, 96%-tni	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Fosforna kiselina 85%-tna	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC	Fluka, Buchs, Switzerland

#### 3.1.3. Sorbensi

Za ekstrakciju analita raspršenjem matice kroz čvrstu fazu, kao sorbensi koristili su se morski pijesak, XAD-2 i fenilsilicijev dioksid (fenil). Ovi sorbensi su različitih fizikalno-kemijskih karakteristika. Slika 12 prikazuje korištene sorbense u radu.



**Slika 12.** Korišteni sorbensi u eksperimentu

Pijesak je prirodni granularni materijal sačinjen od fino razdijeljenih čestica stijena i minerala. Ako se odnosi na termin u geologiji, to je materijal čiji je dijametar od 0,0625 mm do 0,004 mm. Pijesak je najvećim dijelom sačinjen od silicijevog dioksida  $\text{SiO}_2$ , najčešće u formi kvarca. Sastav pijeska je varijabilan i može sadržavati: muskovit, cirkon, rutil, apatit, granat, magnetit, turmalin, itd. Morski pijesak korišten u radu je pijesak za analize; Merck.

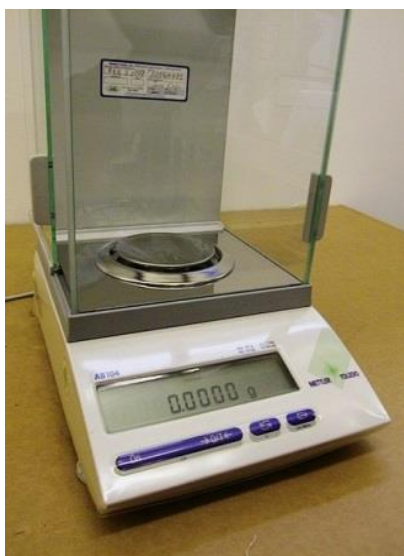
Amberlite® XAD®-2 je polimerni adsorbens za hidrofobne komponente koje imaju molarnu masu veću od 20 000 kao što su fenoli, surfaktanti, farmaceutici. XAD-2 je stiren-divinil benzen, 0,65 mL/g, prosječna veličina pore 90 Å, površine 300 m<sup>2</sup>/g

Sepra Phenyl s prosječnom veličinom čestica od 50 µm i prosječnom veličinom pora od 65 Å, proizvođača Phenomenex.

## 3.2 INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR

### 3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje kožice grožđa i sorbensa, u radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na Slici 13.



**Slika 13.** Analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska

### 3.2.2. Tarionik s tučkom i SPE kolone

Uzorak kože grožđa i sorbena miješa se u tarionika da se postigne homogenost uzorka. Uzorak u tarioniku prikazan je na Slici 14.



**Slika 14.** Tarionik s uzorkom kože grožđa

Homogenizirani uzorci nakon miješanja u tarioniku pakirani su u kolone. Korištene su polipropilenske SPE prazne kolone (3 mL) (Slika 15) i prikladni 20  $\mu\text{m}$  polietilenski fritovi koji dolaze na dno kolone i vrh uzorka. Korištene SPE kolone i fritovi su od Agilenta (Santa Clara, CA, USA).



**Slika 15.** SPE kolone

### 3.2.3. Aparatura za ekstrakciju

Ekstrakcija polifenola provedena je pomoću aparature za ekstrakciju, Visiprep™ 24, Supelco prikazanog na Slici 16, a protok je prilagođen na 1 mL/min.



Slika 16. Supelco Visiprep™24

### 3.2.4. Uparivač (rotavapor)

Za uparivanje ekstrakata korišten je uparivač Heidolph Rotavapor, prikazan na Slici 17. Uparivanje uzoraka provedeno je na 40 °C.



Slika 17. Rotavapor, Heidolph, Njemačka

### 3.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Dobiveni ekstrakti analizirani su kromatografom Agilent 1100 (Agilent Tehnologies, USA) koji je prikazan na Slici 18. Sastoji se od automatskog uzorkivača 1100, detektora s nizom dioda 1100, binarne pumpe 1100 i Agilent 1200 fluorescentnog detektora, boca za pokretnu fazu i računala preko kojeg se programom upravlja HPLC-om i gdje se nakon analize obrađuju dobiveni podatci. Za analizu je korištena kolona Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex, USA). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina zrnaca je 5  $\mu\text{m}$ , sa predkolonom Phenyl (4.0x3.0)



**Slika 18.** Kromatografski sustav Agilent 1100 (Agilent Tehnologies, USA)

### **3.3. METODE RADA**

#### **3.3.1. Priprava uzoraka grožđa**

Uzorci crne sorte grožđa Regent uzeti su 2013. godine iz vinograda na Pokušalištu Jazbina, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Grožđe je ubrano u fazi pune zrelosti te je neposredno nakon toga doneseno u Laboratorij za grožđe, mošt i vino, Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Bobice su odvojene od peteljkovine i potom podvrgnute postupku flotacije u svrhu dobivanja što homogenijeg uzorak sličnog stupnja zrelosti. U postupku flotacije korištene su otopine saharoze različitih gustoća. Za daljnju analizu korištene su bobice raspona gustoće između 1,088 i 1,099 g/m<sup>3</sup>. Homogene bobice pohranjene su u polietilenske vrećice i zamrznute na -20 °C u periodu od šest mjeseci. Nakon odmrzavanja bobica, kožice bobica grožđa ručno su odvojene od pulpe i sjemenke, te su sušene na zraku pri sobnoj temperaturi sedam dana. Suhe kožice su usitnjene, a dobiveni je prah pohranjen u staklenoj posudici na temperaturi od 2 °C u hladnjaku.

#### **3.3.2. Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD)**

Izvaže se 125 mg uzorka te odgovarajuća masa sorbensa (375, 500, 625 mg). Pomiješaju se u tarioniku da se dobije homogeni uzorak kojim se puni MSPD kolona. Na dno kolone i na vrh uzorka stavlja se polietilenski frit pažljivim tlačenjem pomoću klipa šprice.

Kolona s uzorkom priključuje se na aparaturu za ekstrakciju, a protok se prilagodi na 1 mL/min. Polifenolni spojevi se ekstrahiraju odabranim otapalom. Provodi se višestruka ekstrakcija da se poboljša iskoristivost ekstrakcije. Prvo se eluira s 2 mL otapala te se ostavi 5 minuta da se sloj natopi otapalom. Nakon toga se eluira još do volumena od 4, 7 ili 10 mL. Svi ekstrakti se zatim uparavaju na uparivaču na vodenoj kupelji dok se ne ukloni organska faza na temperaturi od 40 °C. Ostatak se prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuni do oznake sa 0,5 %-tnom vodenom otopinom fosforne kiseline. Tako pripremljeni ekstrakt se filtrira preko membranskog filtra i stavlja u vijalice za HPLC analizu.

### 3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Identifikacija i kvantifikacija polifenola u ekstraktima kože bobica grožđa provedena je primjenom metode HPLC. Separacija je provedena na obrnuto-faznoj koloni Luna Phenyl-Hexyl ( $4,6 \times 250$  mm;  $5 \mu\text{m}$  veličina čestica (Phoemenex, Torrance, USA)) termostatiranoj na  $50^\circ\text{C}$ . Kao pokretne faze korištene su smjesa vode i fosforne kiseline (99,5:0,5, v/v, pokretna faza A) te smjesa acetonitrila, vode i fosforne kiseline (50:49:0,5, v/v/v, pokretna faza B) uz protok od 0,9 mL/min. Volumen injektiranog uzorka bio je 20  $\mu\text{L}$ . Identifikacija kromatografskih krivulja temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka s vremenima zadržavanja kao i usporedbom s UV spektrima standarada, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe mase kože grožđa. Maseni udio određene skupine polifenola, koji su korišteni kao odzivi ( $Y$ , ovisne varijable) izraženi su kao zbroj masenog udjela pojedinačnih spojeva te skupine određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Kromatogrami su snimani na valnim duljinama prikazanim u Tablici 5. Iz snimljenih kromatograma očitavaju se mg/kg suhe mase kože grožđa.

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

Vrijeme / min	A / %	B / %
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

**Tablica 5.** Valne duljine i skupine spojeva

Valna duljina / nm	Skupina spojeva
360	Flavonoli i njihovi glikozidi
518	Antocijanini
225 (ex); 320 (em)	Flavan-3-oli



### 3.3.4. Eksperimentalni dizajn i statistička analiza

Raspon ekstrakcijskih čimbenika (volumen ekstrakcijskog otapala, omjer mase sorbensa i mase uzorka, udio organske faze i otapala) odabrani su na temelju rezultata prije provedenih istraživanja. Za proučavanje utjecaja navedenih čimbenika na konačni ukupni maseni udio antocijana, flavonola i flavan-3-ola u dobivenim ekstraktima korišten je Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn. Rezultati BBD-eksperimenata analizirani su nelinearnom višestrukom regresijom s povratnom eliminacijom da bi pristajali slijedećoj jednadžbi drugog-reda za  $Y$  ovisne varijable:

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

$\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  te  $\beta_{ij}$  koeficijenti su za linearne, kvadratne odnosno čimbenike međudjelovanja,  $x_i$  i  $x_j$  su razine neovisnih čimbenika za kodirane vrijednosti. U optimizaciji uvjeta ekstrakcije korištena je metodologija koja uzima u obzir više kriterija (Derringerova funkcija). Ova se metodologija primjenjuje kada je istovremeno potrebno uzeti u obzir više odziva te je potrebno naći optimalan kompromis između ukupnog broja razmotrenih odziva. [31] Analiza eksperimentalnog dizajna te izračun predviđenih vrijednosti provedeni su primjenom specijaliziranog računalnog programa Design Expert (Trial Version 9.0.3.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Koeficijenti su tumačeni pomoću  $F$ -testa. Da bi se odredili optimalni uvjeti za dobivanje maksimalnog masenog udjela antocijana, flavonola i flavan-3-ola korištene su analiza varijance (ANOVA), regresijska analiza kao i izrada grafičkog prikaza površina odziva.

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

#### 4.1. OPTIMIZACIJA UVJETA ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLNIH SPOJEVA RASPRŠENJEM MATICE UZORKA KROZ ČVRSTU FAZU

Cilj ovog rada je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa. U uvodu je spomenuto da postoje mnoge metode ekstrakcije. Za ovaj rad odabrana je metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu. Korištena su tri različita sorbensa, različitih fizikalno-kemijskih svojstava spomenutih u eksperimentalnom dijelu rada. Osim različitih otapala (acetonitril (ACN) i etanol (EtOH)), ispitivao se i utjecaj promjene volumena na iskorištenja ekstrakcije te promjene mase sorbensa. Za ekstrakciju polifenola iz kožica grožđa koriste se različita organska otapala kao što su metanol, etanol, acetonitrile i etil acetat. Udio navedenih organskih otapala u vodenoj otopini može biti u rasponu od 0 do 100 %. [33] Temeljem rezultata dobivenih primjenom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije za ekstrakciju polifenola iz kožice sorte Regent [34] te onih dobivenih prilikom optimizacije HPLC metode uz primjenu fenil-heksil nepokretne faze kao organske faze [35] u ekstrakcijskom otapalu odabrani su etanol i acetonitrile. U Tablici 6 prikazani su korišteni čimbenici i eksperimentalni podaci za 89 eksperimenata.

**Tablica 6.** Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu

	Udio organske faze (%)	Volumen ekstrakcijskog otapala (mL)	Omjer mase sorbensa i mase uzorka	Otapala	Sorbensi	Antocijani (mg/kg)	Flavonoli (mg/kg)	Flavan-3-oli (mg/kg)
1	50	10	3	ACN	Pijesak	12525,10	1436,67	142,97
2	50	4	5	EtOH	Fenil	10995,70	1407,11	137,95
3	50	4	3	ACN	Pijesak	12370,40	1483,61	146,46
4	20	7	5	EtOH	XAD	3010,78	945,60	77,21
5	50	10	3	EtOH	XAD	9478,70	1378,07	115,74
6	20	4	4	ACN	Pijesak	10230,40	1299,03	142,58
7	50	7	4	EtOH	Pijesak	11977,80	1456,48	158,28
8	80	7	5	EtOH	Fenil	11994,20	1491,98	145,36
9	50	7	4	ACN	Pijesak	11937,00	1467,18	142,45
10	80	7	5	ACN	Pijesak	11994,30	1441,96	147,85
11	50	4	3	ACN	XAD	6087,66	1033,92	42,69
12	80	10	4	EtOH	Fenil	10790,70	1358,30	134,54
13	50	4	5	ACN	XAD	1021,81	828,69	5,25

**Tablica 6.** Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožiće grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak I]

	Udio organske faze (%)	Volumen ekstrakcijskog otapala (mL)	Omjer mase sorbensa i mase uzorka	Otapala	Sorbensi	Antocijani (mg/kg)	Flavonoli (mg/kg)	Flavan-3-oli (mg/kg)
14	80	10	4	EtOH	Pijesak	12462,50	1545,72	139,46
15	50	4	5	EtOH	XAD	2874,56	1117,76	81,52
16	50	4	3	ACN	Fenil	10248,50	1402,08	181,66
17	20	4	4	ACN	XAD	3104,55	959,44	68,22
18	50	7	4	EtOH	XAD	7013,47	1339,25	95,46
19	20	10	4	EtOH	Fenil	10059,90	1158,88	130,42
20	20	7	5	EtOH	Pijesak	9281,65	1283,56	151,25
21	20	10	4	ACN	Pijesak	10387,10	1396,02	140,01
22	50	10	3	EtOH	Pijesak	11454,80	1410,22	143,41
23	20	7	5	ACN	Pijesak	10199,90	1286,97	136,33
24	20	7	5	ACN	XAD	1414,72	730,20	58,95
25	80	7	5	EtOH	XAD	3427,87	803,52	52,45
26	20	4	4	ACN	Fenil	9233,78	1256,25	134,27
27	50	4	5	ACN	Pijesak	10125,50	1402,14	159,27
28	50	10	5	ACN	Pijesak	11918,80	1504,52	154,62
29	80	4	4	ACN	Pijesak	6578,57	1105,31	116,81
30	20	7	5	ACN	Fenil	9957,14	1425,80	123,75
31	50	7	4	ACN	Pijesak	11757,10	1455,41	157,73
32	20	7	3	ACN	XAD	7347,67	948,67	77,46
33	20	10	4	EtOH	Pijesak	10021,90	1381,02	144,65
34	50	10	5	ACN	XAD	1807,76	1202,83	69,47
35	50	4	3	EtOH	Fenil	11929,20	1436,30	138,30
36	80	10	4	ACN	XAD	703,72	888,12	55,46

**Tablica 6.** Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak II]

	Udio organske faze (%)	Volumen ekstrakcijskog otapala (mL)	Omjer mase sorbensa i mase uzorka	Otapala	Sorbensi	Antocijani (mg/kg)	Flavonoli (mg/kg)	Flavan-3-oli (mg/kg)
37	20	7	3	ACN	Pijesak	11112,70	1419,32	145,65
38	50	4	3	EtOH	XAD	5076,46	1063,45	75,45
39	20	4	4	EtOH	Fenil	5847,68	484,35	130,95
40	20	7	5	EtOH	Fenil	8690,63	843,65	138,58
41	50	10	5	EtOH	Pijesak	10901,10	1466,89	144,36
42	50	7	4	EtOH	Pijesak	11350,30	1422,65	145,71
43	80	7	5	EtOH	Pijesak	11408,10	1451,76	145,60
44	50	10	3	ACN	Fenil	12062,00	1528,95	169,28
45	80	7	3	EtOH	Pijesak	10367,10	1344,52	138,13
46	20	7	3	EtOH	XAD	7589,57	1061,26	87,77
47	20	7	3	ACN	Fenil	10414,00	1411,58	127,51
48	50	10	5	ACN	Fenil	12527,20	1595,76	154,46
49	50	10	3	EtOH	Fenil	12753,30	1529,44	138,07
50	50	4	5	ACN	Fenil	11495,30	1482,79	149,38
51	80	4	4	EtOH	Pijesak	9600,67	1275,85	139,73
52	50	7	4	EtOH	Fenil	12738,80	1528,65	152,41
53	50	7	4	EtOH	Fenil	12287,90	1508,15	153,24
54	20	7	3	EtOH	Pijesak	9112,07	1301,92	144,77
55	20	4	4	EtOH	XAD	3232,68	728,49	56,54
56	50	7	4	ACN	XAD	2200,16	1145,83	80,70
57	50	7	4	ACN	Fenil	12169,70	1525,25	146,15
58	50	7	4	ACN	Pijesak	11180,40	1399,81	140,09
59	20	7	3	EtOH	Fenil	8825,45	969,84	143,77
60	50	7	4	ACN	Fenil	11806,30	1467,26	148,12
61	50	4	3	EtOH	Pijesak	11241,60	1373,27	153,84

**Tablica 6.** Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak III]

	Udio organske faze (%)	Volumen ekstrakcijskog otapala (mL)	Omjer mase sorbensa i mase uzorka	Otapala	Sorbensi	Antocijani (mg/kg)	Flavonoli (mg/kg)	Flavan-3-oli (mg/kg)
62	80	7	3	ACN	Fenil	10334,70	1416,75	144,55
63	20	4	4	EtOH	Pijesak	7755,08	1160,96	136,61
64	80	7	5	ACN	Fenil	10328,30	1433,93	145,05
65	80	7	3	EtOH	Fenil	11153,40	1398,05	144,51
66	50	7	4	EtOH	XAD	3925,98	1186,66	86,40
67	50	10	3	ACN	XAD	3600,44	1263,60	75,06
68	50	4	5	EtOH	Pijesak	11200,70	1499,20	157,47
69	50	7	4	ACN	XAD	2516,25	1226,51	85,11
70	50	7	4	ACN	XAD	2213,09	1095,75	69,56
71	80	4	4	EtOH	Fenil	10565,90	1346,05	141,04
72	20	10	4	ACN	XAD	4066,50	1228,93	87,96
73	80	4	4	EtOH	XAD	6383,50	956,53	67,27
74	80	10	4	ACN	Pijesak	10231,20	1480,03	138,21
75	50	7	4	EtOH	XAD	4693,47	1235,21	89,32
76	80	7	3	EtOH	XAD	8513,10	1271,59	110,49
77	80	7	3	ACN	XAD	1215,66	814,06	46,27
78	80	4	4	ACN	Fenil	9945,71	1348,12	145,59
79	50	7	4	ACN	Fenil	11985,40	1512,06	147,20
80	20	10	4	ACN	Fenil	10118,20	1405,30	131,01
81	80	7	3	ACN	Pijesak	10013,30	1414,56	147,54
82	80	10	4	EtOH	XAD	4829,68	1372,58	85,71
83	80	4	4	ACN	XAD	326,97	162,77	16,33
84	80	10	4	ACN	Fenil	11989,60	1501,81	155,31
85	80	7	5	ACN	XAD	462,21	361,27	31,71
86	50	7	4	EtOH	Fenil	12234,60	1473,87	153,04
87	50	7	4	EtOH	Pijesak	11394,10	1405,99	167,76
88	50	10	5	EtOH	XAD	2573,04	1290,86	91,87
89	20	10	4	EtOH	XAD	4306,64	1050,2	81,79

Prilagođavanje podataka različitim modelima pokazalo je da se ukupni maseni udio antocijana, flavonola i flavan-3-ola najbolje mogu opisati kvadratnom polinomnom jednadžbom (1). Analize varijance (ANOVA) za dobivene modele navedene su u Tablici 7. Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) bili su u rasponu od 0,84 do 0,94 dok su  $p$ -vrijednosti za modele bile  $<0,0001$  što ukazuje na visoku signifikantnost za sva tri slučaja. Najznačajniji koeficijenti kvadratnih jednadžbi na temelju kojih su izrađene površine odziva dobivenih modela prikazani su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene eksperimente

Odziv	Maseni udio antocijana	Maseni udio flavonola	Maseni udio flavan-3-ola
Odsječak	9354,85	1368,69	128,41
A: Udio organske faze	214,58	38,50	-1,31
B: Volumen ekstrakcijskog otapala	540,94	109,51	4,96
C: Omjer mase sorbensa i mase uzorka	-694,73	-27,46	-3,79
D: Otapala	376,98	4,60	3,95
E: Sorbensi	2237,67	130,11	25,43
AC	411,02		
AD	775,52	96,78	2,15
AE	70,09	-5,32	
BE	125,23	-45,65	-5,28
BD			-1,93
CE	613,00	37,01	5,92
DE	-482,74	-11,68	-2,20
$A^2$	-1223,06	-199,48	-10,92
$B^2$	-391,00		-4,44
$R^2$	0,9389	0,8392	0,9368
Prilagođeni $R^2$	0,9253	0,8035	0,9205
Preciznost	29,374	21,599	26,086
Model ( $p$ -vrijednost)	$<0,0001$	$<0,0001$	$<0,0001$
Neprikladnost modela ( $p$ -vrijednost)	0,0518	0,0524	0,0513

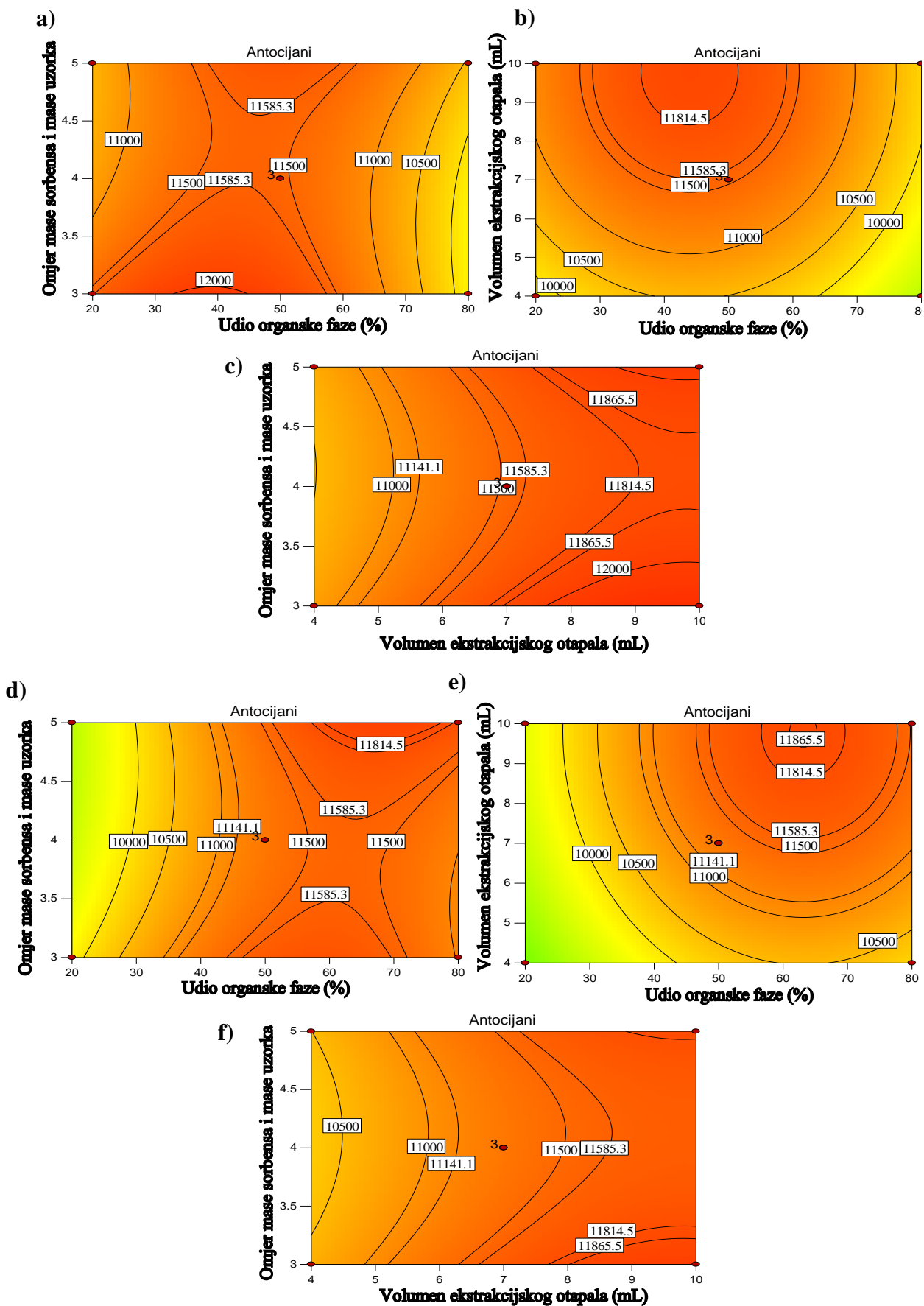
Najznačajniji čimbenik u svim ispitivanim slučajevima je bio sorbens. U ovom radu korištena su tri različita sorbena fenilsilicijev dioksid, morski pijesak i XAD-2 te su u eksperimentalnom djelu opisana njihova fizikalno-kemijska svojstva. U daljnjoj obradi rezultata dokazano je kako je fenilsilicijev dioksid najbolji sorbes za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa, zatim za njim slijedi pijesak dok je najlošiji XAD-2. Pijesak kao sorbens bi bio dobra alternativa za fenilsilicijev dioksid kao ekološki prihvatljiv sorbens, dok XAD-2 nije ni približno dobar kao ova dva sorbena. Već u samom tijeku rada ekstrakcije bilo je vidljivo prema boji ekstrakta koji od sorbena će dati bolje rezultate. Kod fenilsilicijevog dioksida i pijeska dobivali su se ekstrakti tamno crvene boje, a ekstrakti sa XAD-2-om su bili tamno zelene boje, što ukazuje da navedeni ekstrakti imaju pH-vrijednost višu od one u ekstraktima dobivenim fenilsilicijevim dioksidom i morskim pijeskom

Od ostalih čimbenika značajan je i volumen ekstrakcijskog otapala. Porastom volumena ekstrakcijskog otapala povećava se i količina ekstrahiranih antocijana, flavonola te flavan-3-ola kod sva tri sorbena neovisno o vrsti organske faze.

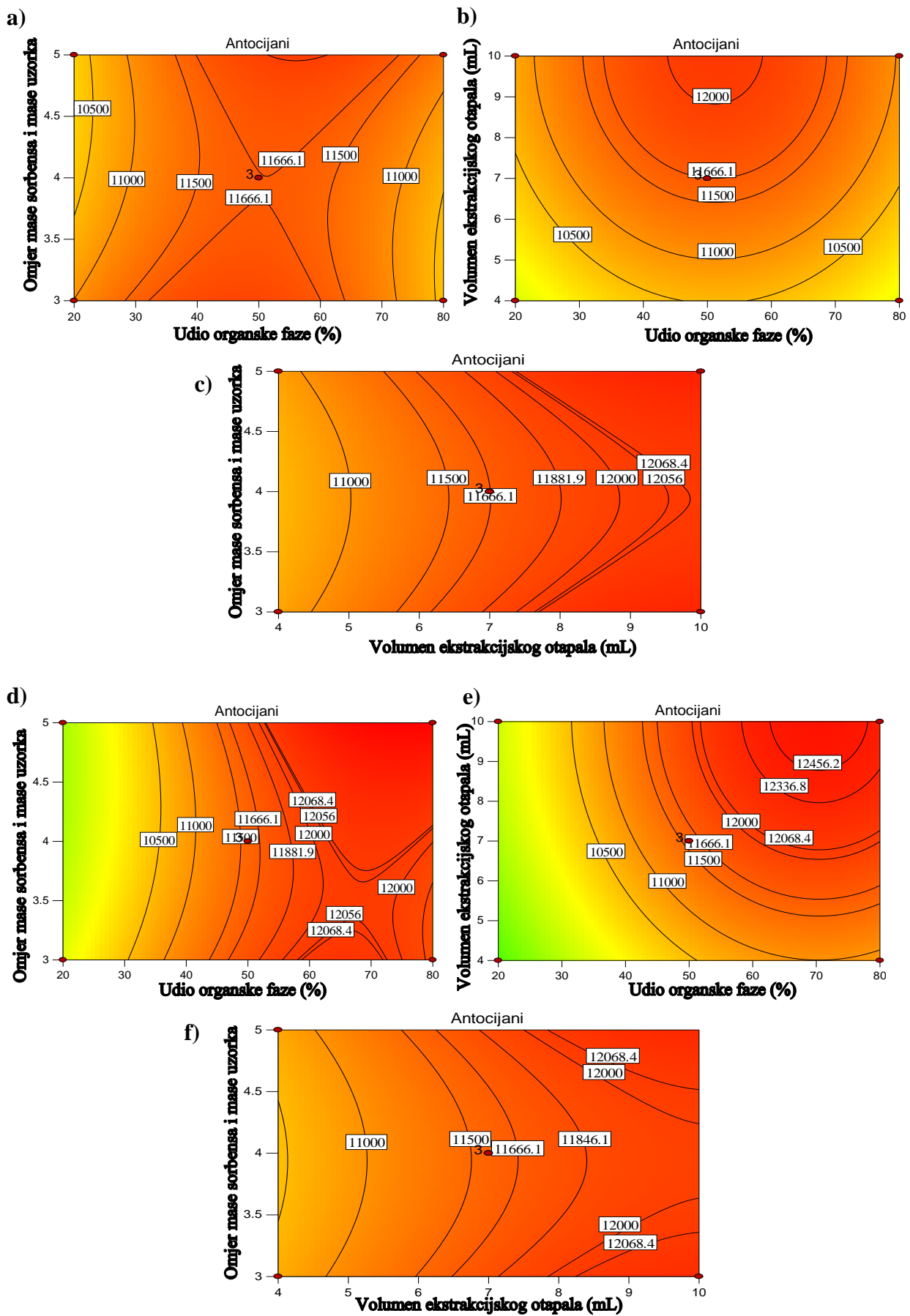
Međudjelovanje ekstrakcijskih čimbenika određeno je iz grafova kontura (engl. *Conotur plots*). Kružni oblik kontura znači da su međudjelovanja između odgovarajućih čimbenika zanemariva dok eliptični oblik kontura ukazuje na vrlo značajno međudjelovanje između odgovarajućih čimbenika. [32] Opaženo je da za sve ispitane skupine spojeva postoji značajno međudjelovanje između različitih ekstrakcijskih čimbenika (Slike 19-27).

Isto tako cilj ovog rada je bio odrediti optimalne uvjete za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kože grožđa metodom raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu. Slike 19-27 prikazuju učinke pet čimbenika međudjelovanja koji utječu na maseni udio antocijana, flavonola i flavan-3-ola. Iz grafova kontura može se lijepo iščitati da svih pet čimbenika, koji su bili ispitivani tijekom ekstrakcije, pokazuju značajan stupanj međudjelovanja. Ti čimbenici su udio organske faze, volumen ekstrakcijskog otapala, omjer mase sorbena i mase uzorka, otapalo i sorbensi. Ranije je spomenuto kako je najznačajniji čimbenik bio sorbens, a zatim volumen ekstrakcijskog otapala.

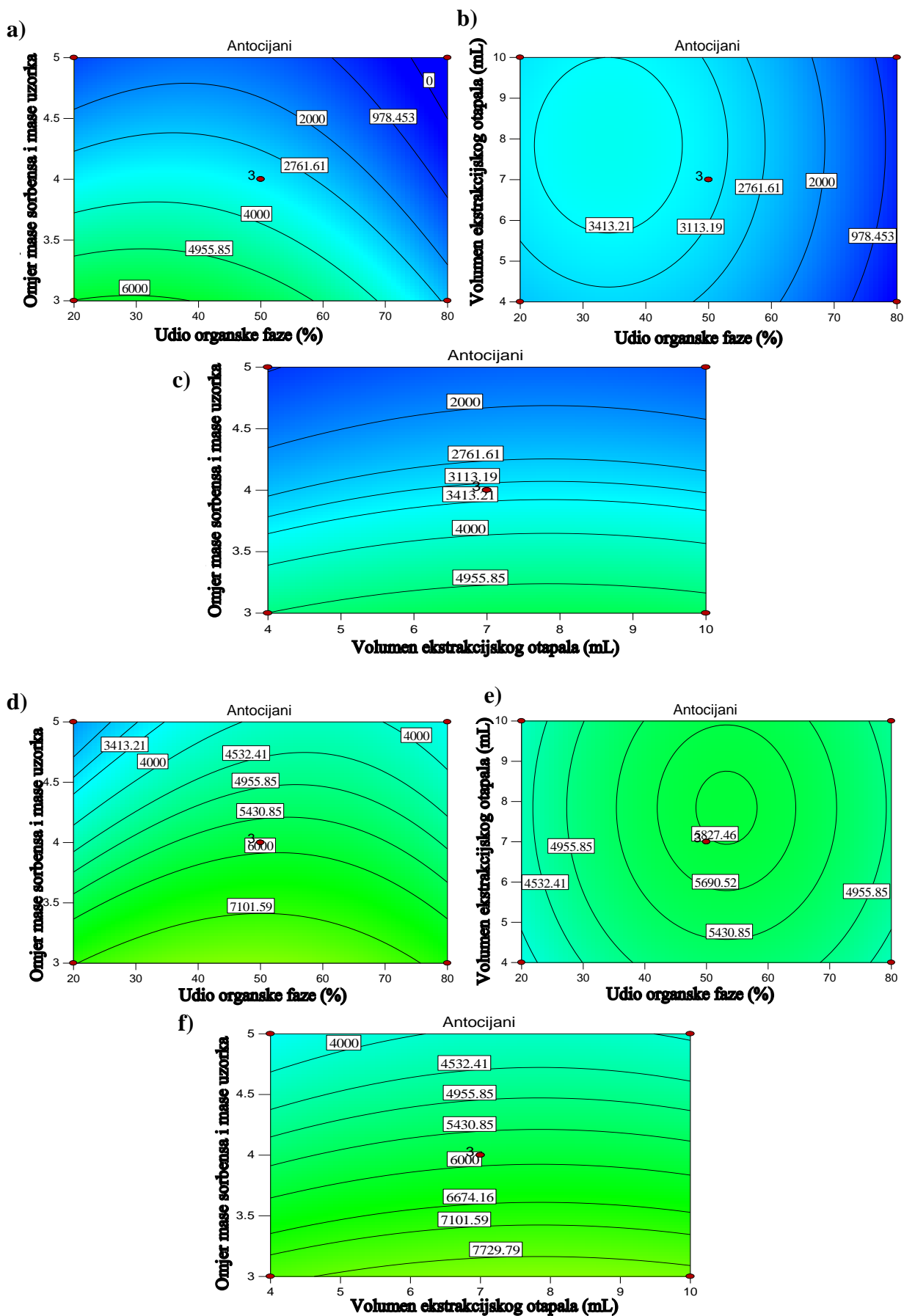




**Slika19.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 20. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 21. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH

#### 4.1.1. Ekstrakcija antocijana raspršenjem matice kroz čvrstu fazu

Na Slici 19 prikazana su međudjelovanja između pojedinih čimbenika kad se kao sorbens koristio morski pijesak. S obzirom da gotovo u svim slučajevima konture imaju oblik elipsi, međudjelovanje između ispitanih čimbenika je značajno. Povećanjem udjela acetonnitrila do 40 % te uz istovremeno povećanje omjera mase sorbensa i mase uzorka do 4 dolazi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije antocijana. Primjenom istog organskog otapala povećanjem obujma ekstrakcijskog otapala uz istovremeno povećanje omjera faza opaženo je značajno povećanje masenog udjela antocijana u dobivenim ekstraktima. Isti trend je opažen i u slučaju primjene etanola kao organske faze. Slična međudjelovanja između pojedinih čimbenika opažena su i u slučaju primjene fenilsilicijevog dioksida kao sorbensa (Slika 20). Interakcije između pojedinih čimbenika primjenom XAD-2 sorbensa nisu vrlo značajne (Slika 21). Prema Slici 21 (c i f) kod antocijana kada je sorbens XAD-2 osim povećanja volumena ekstrakcijskog otapala veliku ulogu ima i čimbenik omjer mase sorbensa i mase uzorka. Povećanjem volumena ekstrakcijskog otapala, ali kod što manjeg omjera mase sorbensa i mase uzorka povećava se količina ekstrahiranih antocijana.

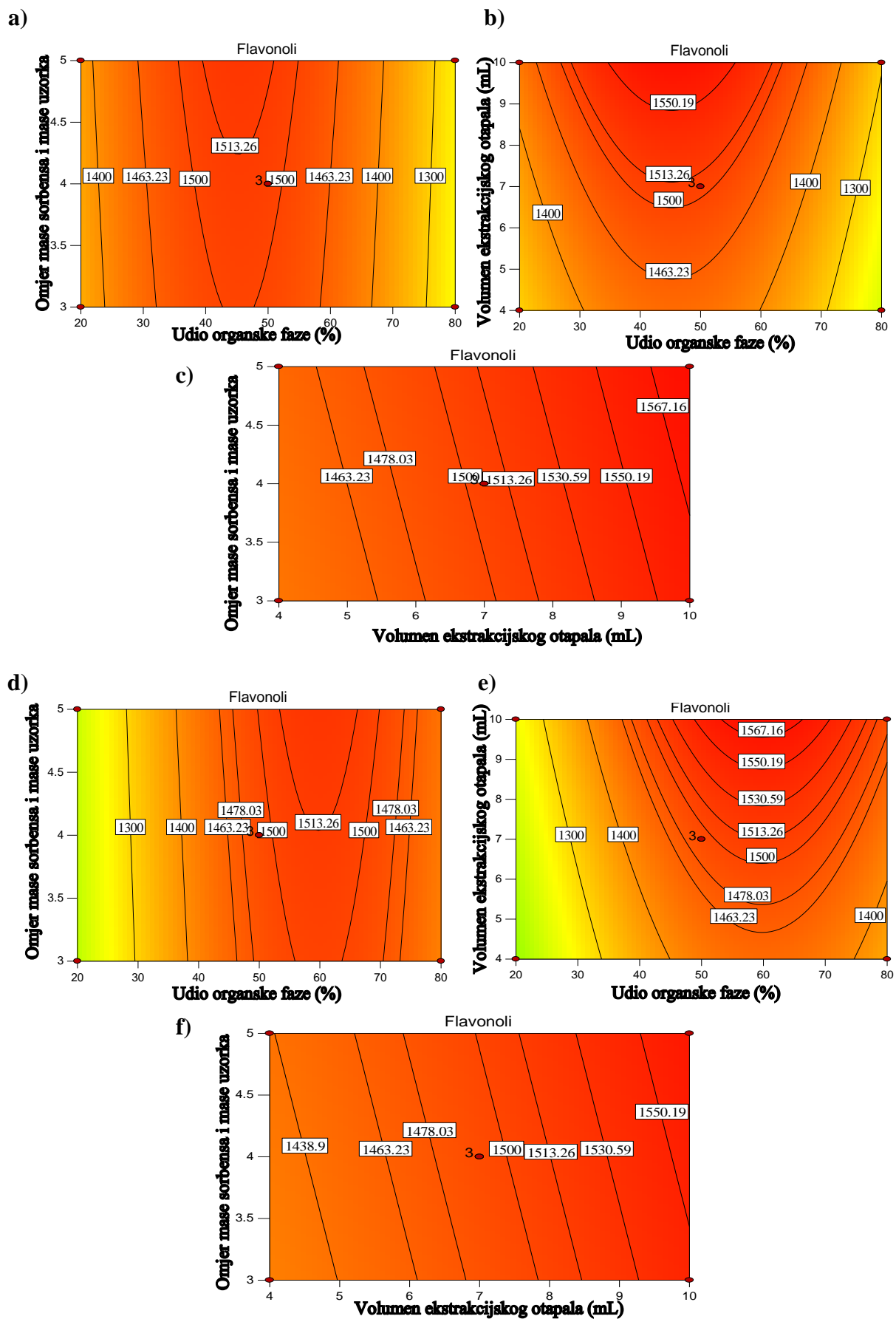
Primjenom dobivenih polinomnih jednadžbi drugog reda (Tablica 7) mogu se dobiti optimalni uvjeti ekstrakcije. Uporabom pijeska kao sorbensa i ACN-a kao organske faze u ekstrakcijskom otapalu optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 40 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL, a predviđena vrijednost masenog udjela antocijana je 12363 mg/kg suhe kože. Kada se kao otapalo koristio EtOH optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 70 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL te uz predviđenu vrijednost za maseni udio antocijana od 12294 mg/kg suhe kože.

Kao drugi sorbens za ekstrakciju koristio se je fenilsilicijev dioksid sa ekstrakcijskim otapalom ACN. Za ovaj slučaj optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 56 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL. Za navedene uvjete predviđena vrijednost masenog udjela antocijana je 12441 mg/kg suhe kože. Kada se kao otapalo koristio EtOH optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 80 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 9 mL uz predviđenu vrijednost masenog udjela antocijana od 13098 mg/kg suhe kože.

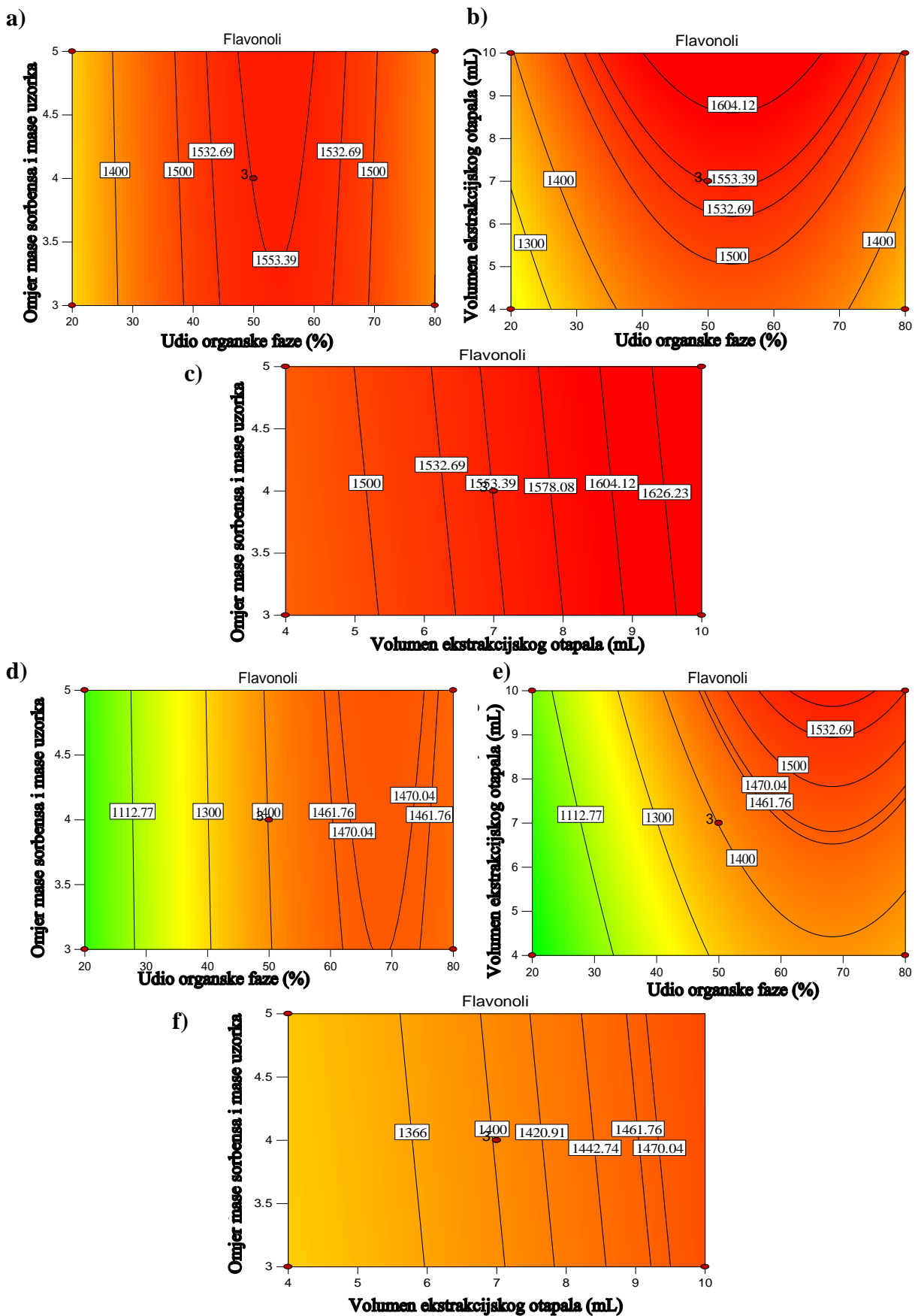
XAD-2 kao sorbens pokazao je vrlo loše rezultate, sa vrlo niskim vrijednostima polifenola te je ujedno i najlošiji sorbens za ekstrakciju polifenola ovom tehnikom. Prema polinomnim jednadžbama drugog-reda optimalna vrijednosti za ekstrakciju pomoću ovog sorbensa uz uporabu ACN-a kao otapala su udio organske faze oko 30 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 8 mL. Uz EtOH kao otapalo optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 50 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 8 mL. Predviđena vrijednost u slučaju primjene acetonitrila je 6153 mg/kg suhe kože, dok je za etanol ona 8151 mg/kg suhe kože

Uvjeti za postizanje najveće učinkovitosti ekstrakcije antocijana primjenom različitih sorbensa i organskih otapala u ekstrakcijskom otapalu značajno se razlikuju kao i predviđene vrijednosti za maseni udio antocijana. Takvo opažanje se može pripisati različitim fizikalno-kemijskim svojstvima sorbensa. Veliki volumeni ekstrakcijskog otapala te veliki omjeri mase sorbensa i uzorka mogu biti posljedica vrlo velikog masenog udjela ovih spojeva u kožicama grožđa. Zadržavanje analita na fenilsilicijevom dioksidu odvija se preko nekoliko mehanizama kao što su  $\pi$ - $\pi$  interakcije između delokaliziranih elektrona analita i fenilne skupine sorbensa te razdioba između ekstrakcijskog otapala i hidrofilne arilne faze. Acetonitril smanjuje  $\pi$ - $\pi$  interakcije između aromatskih analita i fenilne skupine sorbensa, dok etanol može pojačati navedene interakcije i time pospješiti zadržavanje analita. Navedena činjenica može objasniti opažanje da je etanol bolja organska faza za ekstrakciju antocijana primjenom fenilsilicijevog dioksida. Vrlo niske vrijednosti masenog udjela antocijana dobivene u acetonitrilnim ekstraktima primjenom XAD-2 sorbensa vjerojatno su posljedica povišene pH vrijednosti pri kojoj su antocijani izrazito nestabilni kao i značajno veće veličine čestica i pora ovog sorbensa u usporedbi s morskim pijeskom odnosno fenilsilicijevim dioksidom.

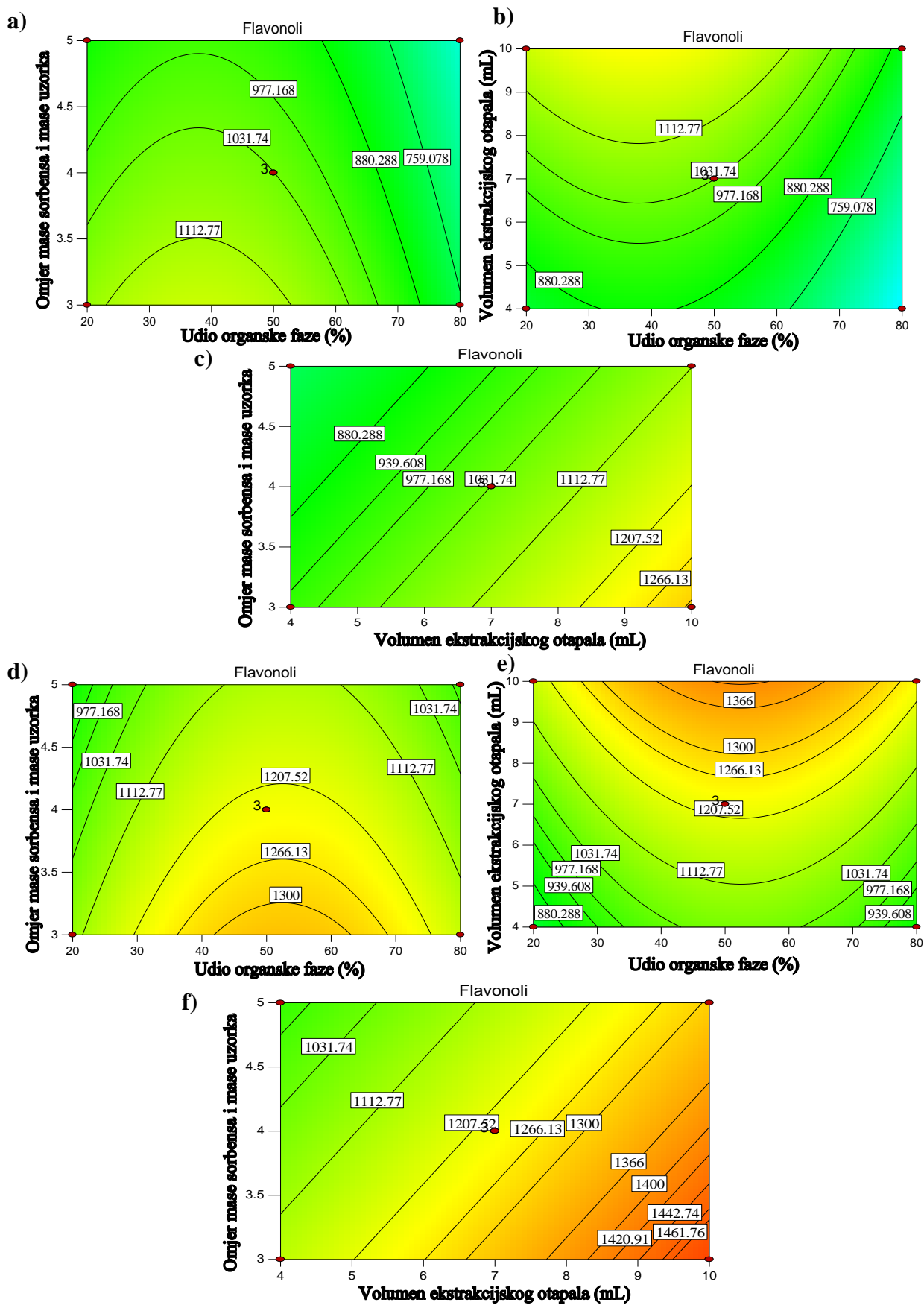
Analizom dobivenih podataka može se zaključiti da su za ekstrakciju antocijana optimalni slijedeći uvjeti: fenilsilicijev dioksid kao sorbens, etanol kao organska faza, volumen ekstrakcijskog otapala od 9 mL te omjer mase sorbensa i uzorka od 5.



Slika 22. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 23. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 24. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



#### 4.1.2. Ekstrakcija flavonola raspršenjem matice kroz čvrstu fazu

Interakcija između volumena ekstrakcijskog otapala i udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu najznačajniji je interakcijski učinak u ekstrakciji flavonola bez obzira na vrstu korištenog sorbensa i tip organske faze. Povećanjem udjela organskog otapala uz istovremeno povećanje volumena ekstrakcijskog otapala dolazi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije flavonola. Interakcija između volumena ekstrakcijskog otapala i omjera mase sorbensa i mase uzorka nije značajan interakcijski učinak. (Slike 22-24). Kada se kao sorbens koriste morski pijesak i fenilsilicijev dioksid povećanjem udjela organske faze u ekstrakcijskom otapalu uz istovremeno povećanje omjera mase sorbensa i mase uzorka dovodi do povećanja masenog udjela flavonola u dobivenim ekstraktima bez obzira na vrstu organske faze (Slike 22 a,d i 23 a, e). Suprotan je trend opažen za navedena dva čimbenika kada se kao sorbens koristio XAD-2 (Slika 24).

Primjenom polinomnih jednadžbi drugog reda za flavonole gdje se kao sorbens koristio pijesak, a kao otapalo ACN i etanol mogu se odrediti optimalni uvjeti ekstrakcije (Tablica 7). Kada se kao otapalo koristio ACN optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 50 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL, uz predviđenu vrijednost za maseni udio flavonola od 1632 mg/kg suhe kože. Ako se kao otapalo koristi EtOH optimalne vrijednosti za udio organske faze oko 60 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL, a predviđena vrijednost masenog udjela flavonola je 1586 mg/kg suhe kože.

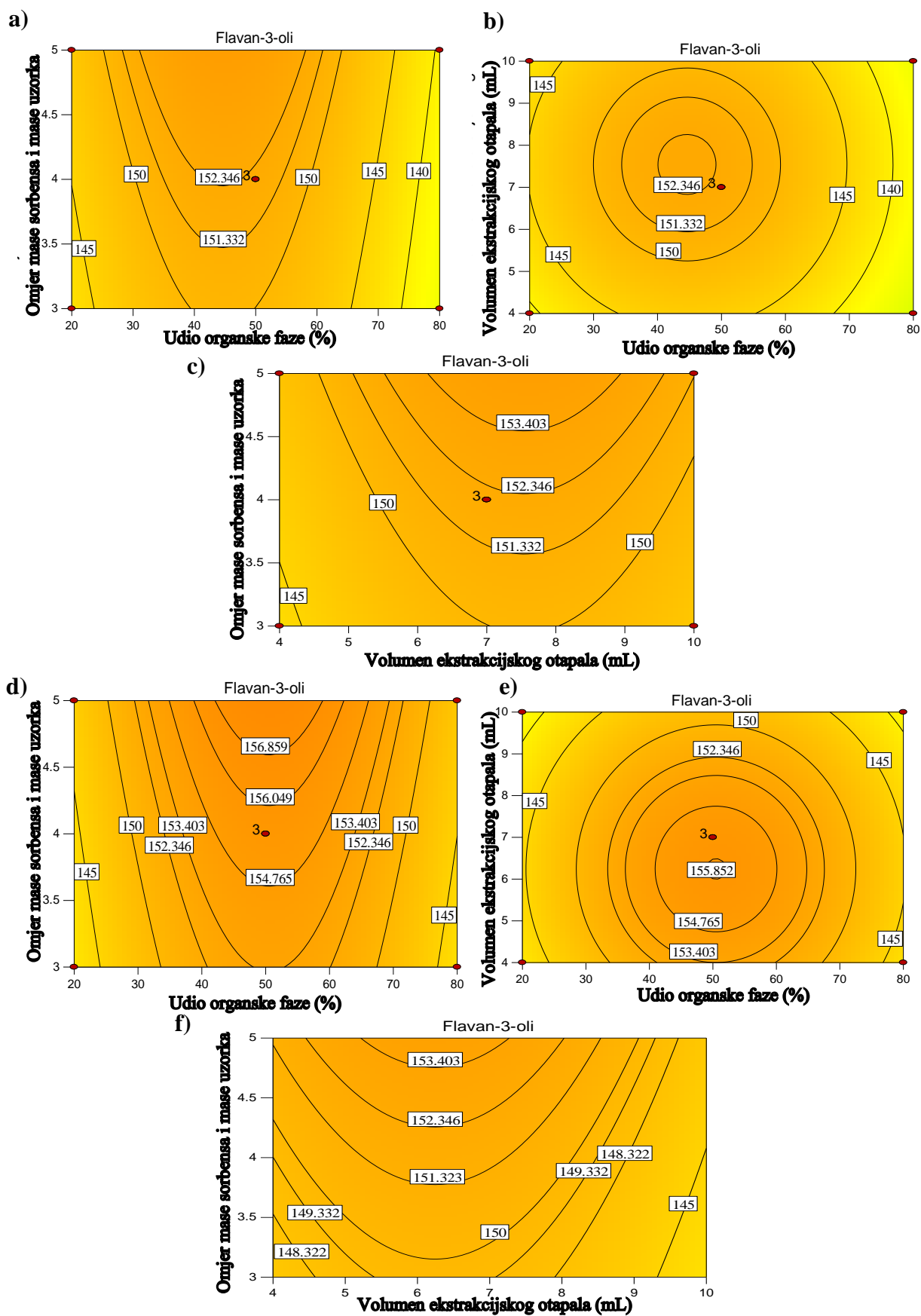
Kao drugi sorbens za ekstrakciju flavonola koristio se je fenilsilicijev dioksid sa ekstrakcijskim otapalima ACN i EtOH. Za slučaj gdje se kao otapalo koristio ACN optimalne vrijednosti za postizanje maksimalnog masenog udjela flavonola od 1596 mg/kg suhe kože su: udio organske faze su oko 60 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 9 mL. Kada se kao otapalo koristio EtOH predviđena maksimalna vrijednost masenog udjela flavonola je 1569 mg/kg suhe kože, a optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 70 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL.

XAD-2 kao sorbens pokazao je vrlo loše rezultate i kod flavonola te je ujedno i najlošiji sorbens za ekstrakciju flavonola raspršenjem matice uzoraka kroz čvrstu fazu. Prema dobivenim polinomnim jednadžbama drugog reda optimalna vrijednosti za ekstrakciju pomoću ovog sorbensa uz uporabu ACN-a kao otapala su udio organske faze oko 40 %, omjer

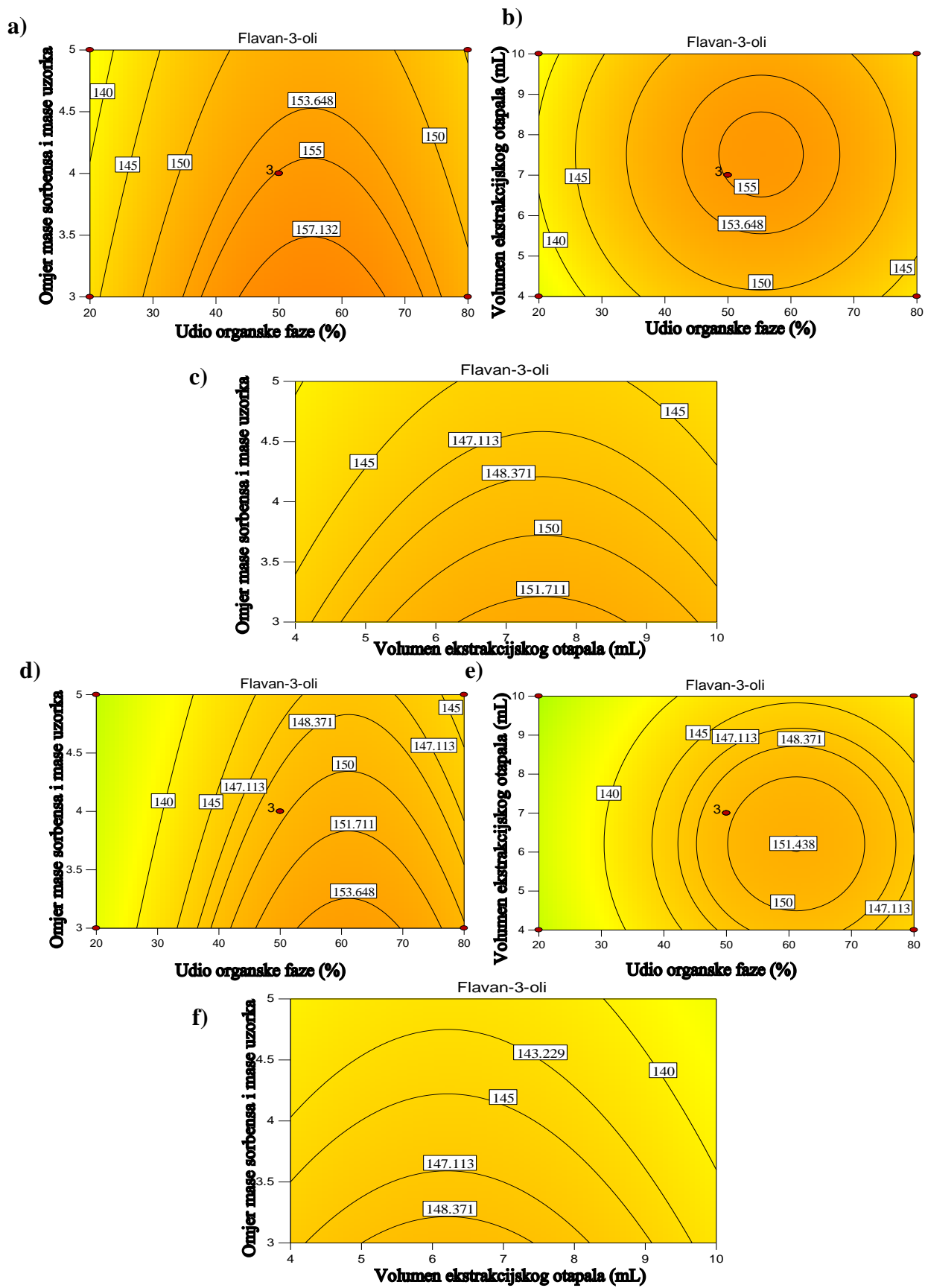
mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL uz predviđenu vrijednost masenog udjela flavonola od 1338 mg/kg suhe kože. Uz EtOH kao otapalo optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 50 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL da bi se postigao maseni udio flavonola u ekstraktu od 1501 mg/kg suhe kože .

Predviđene vrijednosti masenog udjela flavonola u slučaju primjene fenilsilicijevog dioksida i morskog pijeska bez obzira na uporabljenu organsku fazu značajno se ne razlikuju.

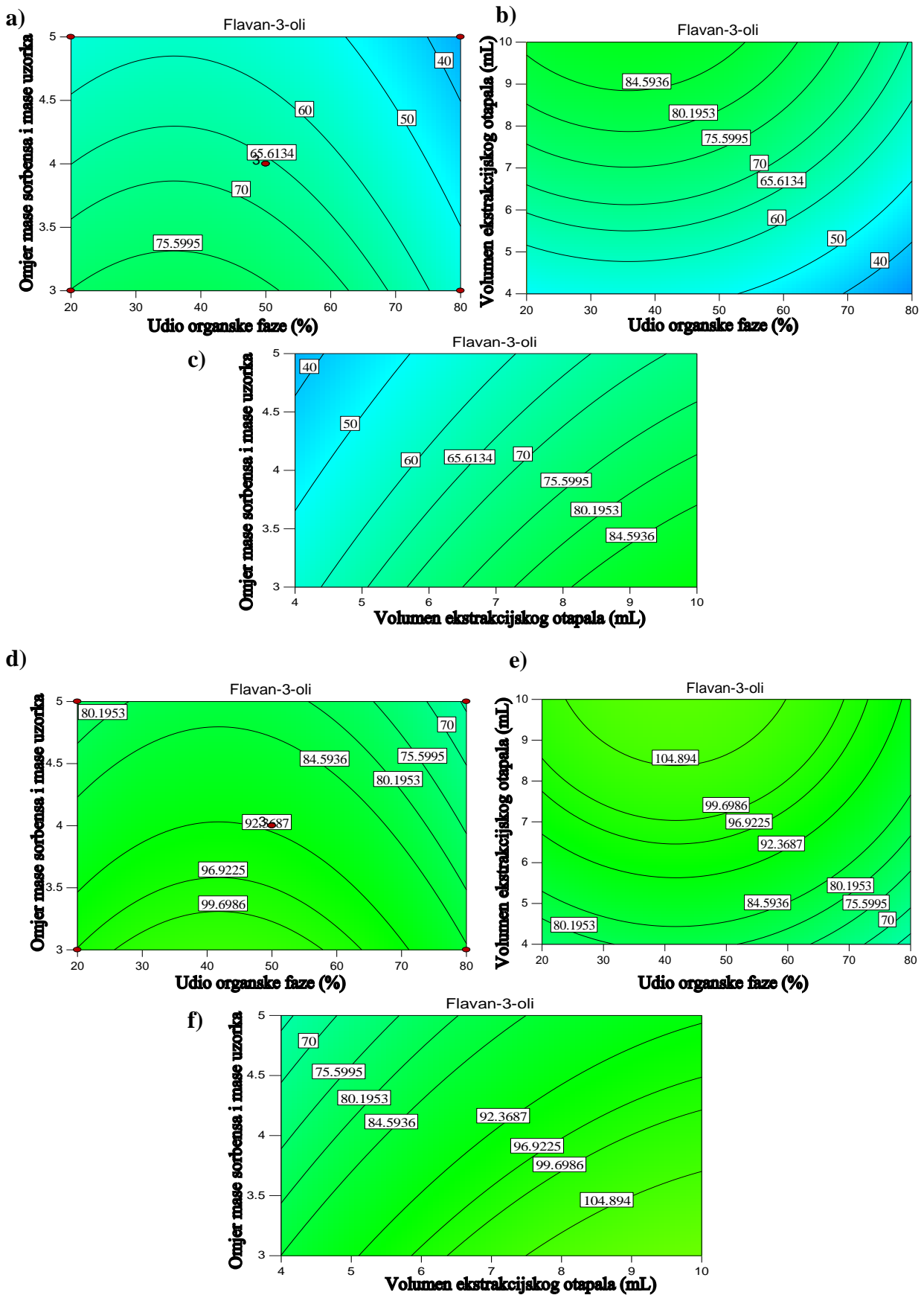
Prema dobivenim podacima najveći predviđeni maseni udio flavonola je 1632 mg/kg suhe kože uz fenilsilicijev dioksid kao sorbens i ACN kao otapalo.



Slika 25. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 26. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH



Slika 27. Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH

#### 4.1.3. Ekstrakcija flavan-3-ola raspršenjem matice kroz čvrstu fazu

Interakcija između udjela organske faze i omjera mase sorbensa i mase uzorka odnosno između volumena ekstrakcijskog otapala i omjera mase sorbensa i mase uzorka značajno utječe na ekstrakciju flavan-3-ola bez obzira na korišteni sorbens i vrstu organske faze (Slike 25-27). Kada se kao sorbens koristi morski pijesak uz uporabu acetonitrila odnosno etanola kao organske faze, povećanjem udjela organske faze do približno 50 % uz istovremeno povećanje omjera masa sorbensa i uzorka dolazi do značajnog povećanja učinkovitosti ekstrakcije flavan-3-ola (Slika 25 a i d). Sličan je trend opažen i prilikom primjene XAD-2 kao sorbensa (Slika 27 a i d). Kada se kao sorbens koristi fenilsilicijev dioksid povišenje udjela organske faze do 65 % uz minimalno povećanje omjera masa sorbensa i uzorka ima pozitivan učinak na ekstrakciju flavan-3-ola (Slika 26 a i d). Ovakva opažanja se mogu pripisati različitim mehanizmima djelovanja sorbensa morskog pijeska i XAD-2 u odnosu na onaj fenilsilicijevog dioksida. Slično je opaženo i u slučaju interakcije između volumena ekstrakcijskog otapala i omjera masa sorbensa i uzorka (Slike 25-27). U svim ispitanim slučajevima konture interakcijskih učinaka čimbenika udjela organske faze i volumena ekstrakcijskog otapala imaju oblik kružnica te se stoga smatraju beznačajnim.

U Tablici 7 navedeni su regresijski koeficijenti za polinomnu jednadžbu drugog reda za flavan-3-ole gdje se je kao sorbens koristio pijesak, a kao otapalo ACN i EtOH. Kada se kao otapalo koristio ACN optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 45 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 7,5 mL, a da bi se postigla maksimalna predviđena vrijednost od 155 mg/kg suhe kože. Ako se kao otapalo koristi EtOH da bi se postigla predviđena vrijednost masenog udjela flavan-3-ola od 158 mg/kg suhe kože vrijednosti pojedinih čimbenika su slijedeće: udio organske faze oko 50 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 5 te volumen ekstrakcijskog otapala 6 mL.

Kao drugi sorbens za ekstrakciju flavan-3-ola koristio se je fenilsilicijev dioksid sa ekstrakcijskim otapalima ACN i EtOH. Za slučaj gdje se kao otapalo koristio ACN optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 55 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 7,5 mL, uz predviđenu vrijednost za maseni udio flavan-3-ola od 159 mg/kg suhe kože. Kada se kao otapalo koristio EtOH optimalne vrijednosti za udio organske faze su oko 60 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen

ekstrakcijskog otapala 6 mL da bi se postigla predviđena vrijednost za maseni udio flavan-3-ola od 155 mg/kg suhe kože .

XAD-2 kao sorbens pokazao je vrlo loše rezultate i kod flavan-3-ola te je ujedno i najlošiji sorbens za ekstrakciju flavan-3-ola raspršenjem matice uzoraka kroz čvrstu fazu. Prema dobivenim polinomnim jednadžbama drugog reda optimalna vrijednosti za ekstrakciju pomoću ovog sorbensa uz uporabu ACN-a kao otapala su udio organske faze oko 35 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL uz predviđeni maseni udio flavan-3-ola od svega 92 mg/kg suhe kože. Kada se kao organska faza koristi EtOH predviđena vrijednost masenog udjela flavan-3-ola je nešto veća (112 mg/kg suhe kože ), a da bi se ona postigla potrebni su slijedeći uvjeti: udio organske faze oko 40 %, omjer mase sorbensa i mase uzorka je oko 3 te volumen ekstrakcijskog otapala 10 mL.

Najveći predviđeni maseni udio flavan-3-ola je 159 mg/kg suhe kože uz fenilsilicijev dioksid kao sorbens i ACN kao otapalo.

## **4.2. POTVRDA MODELA**

Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta provedena je za svaki pojedinačni odziv tj. za maseni udio antocijana, flavonola te flavan-3-ola kao i uzimajući u obzir sve tri skupine spojeva pri čemu je korištena Darringerova funkcija (Tablica 8). Optimalni uvjeti ekstrakcije za pojedine skupine spojeva razlikuju se u svim čimbenicima osim u vrsti sorbensa. Za sve skupine spojeva najbolji sorbens bio je fenilsilicijev dioksid. Za većinu skupina spojeva (antocijani i flavonoli) za postizanje veće učinkovitosti ekstrakcije potreban je maksimalan omjer masa sorbensa i uzorka, a takav je rezultat u skladu s činjenicom da su navedene skupine spojeva sadržane u velikim masnenim udjelima. Isto tako moguće je da te skupine spojeva tvore  $\pi$ - $\pi$  interakcije sa sorbensom. Tu mogućnost potvrđuje i potreba za velikim volumenom ekstrakcijskog otapala.

**Tablica 8.** Optimalni uvjeti za ekstrakciju

	Udio organske faze %	Organsko otapalo	Volumen ekstrakcijskog otapala mL	Omjer mase sorbensa i mase uzorka	Sorbens
<b>Antocijani</b>	80	EtOH	9	5	fenil
<b>Flavonoli</b>	50	ACN	10	5	fenil
<b>Flavan-3-oli</b>	50	ACN	7	3	fenil
<b>Svi skupa</b>	50	ACN	10	3	fenil

Prikladnost modela za optimalne vrijednosti odziva ispitana je primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije prikazanih u Tablici 8.

**Tablica 9.** Vrijednosti za potvrdu dizajna za antocijane. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kožice

Naziv	Antocijani1	Antocijani2	PROSJEK	SD	RSD	PREDVIDENO	DOBIVENO	ODSTUPANJE (%)
<b>Delfinidin-3,5-O-diglukozid</b>	6,20	8,06	7,13	0,00	0,00			
<b>Cijanidin-3,5-O-diglukozid</b>	126,27	126,16	126,22	0,08	0,06			
<b>Delfinidin-3-O-glukozid</b>	2814,96	2840,62	2827,79	18,14	0,64			
<b>Peonidin-3,5-O-diglukozid</b>	383,69	387,69	385,69	2,83	0,73			
<b>Malvidin-3,5-O-diglukozid</b>	4058,66	4106,92	4082,79	34,12	0,84			
<b>Cijanidin-3-O-glukozid</b>	1139,65	1149,75	1144,70	7,14	0,62			
<b>Peonidin-3-O-glukozid</b>	292,16	294,53	293,35	1,68	0,57			
<b>Malvidin-3-O-glukozid</b>	4205,59	4246,16	4225,88	28,69	0,68			
<b>UKUPNI ANTOCIJANI</b>	<b>13027,18</b>	<b>13159,89</b>	<b>13093,54</b>	<b>93,84</b>	<b>0,72</b>	<b>13098,00</b>	<b>13093,54</b>	<b>0,03</b>

Eksperimentalno dobivene vrijednosti masenog udjela antocijana vrlo su bliske predviđenoj vrijednosti. Razlika između određene i predviđene vrijednosti je svega 0,03 % što ukazuje na to da je model zadovoljavajući i pouzdan. Izračunata relativna standardno odstupanje optimizirane metode ekstrakcije antocijana iz kožica grožđa iznosi svega 0,72 %. Novo razvijena metoda ekstrakcije je precizna i točna (Tablica 9).



**Tablica 10.** Vrijednosti za potvrdu dizajna za flavonole. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kožice

Naziv	Flavonoli1	Flavonoli2	PROSJEK	SD	RSD	PREDVIĐENO	DOBIVENO	ODSTUPANJE (%)
Miricetin-3-O-glukozid	137,82	135,73	136,78	1,48	1,08			
Rutin	137,41	133,98	135,70	2,43	1,79			
Kvercetin-3-O-glukonorid	79,54	78,92	79,23	0,44	0,55			
Kvercetin-3-O-glukozid	1240,16	1244,10	1242,13	2,79	0,22			
Kemferol-3-O-glukonorid	49,45	49,64	49,55	0,13	0,27			
<b>UKUPNI FLAVONOLI</b>	<b>1644,38</b>	<b>1642,37</b>	<b>1643,38</b>	<b>1,42</b>	<b>0,09</b>	<b>1632,00</b>	<b>1643,38</b>	<b>0,69</b>

Određene su razlike između vrijednosti masenog udjela flavonola predviđenih dizajnom te onih eksperimentalno dobivenih. Te su razlike vrlo male i iznose 0,69 % što ukazuje da je dobiveni model adekvatan. Da bi se odredila preciznost i točnost novo optimizirane metode ekstrakcije flavonola iz kožica grožđa izračunata je relativna standardno odstupanje. Vrijednost relativne standardne devijacije je 0,09 % što ukazuje da je navedena metoda točna i precizna (Tablica 10).

**Tablica 11.** Vrijednosti za potvrdu dizajna za flavan-3-ole. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kožice

Naziv	Flavan-3-oli1	Flavan-3-oli2	PROSJEK	SD	RSD	PREDVIĐENO	DOBIVENO	ODSTUPANJE (%)
Galokatehin	10,98	9,96	10,47	0,72	6,89			
Procijanidin B1	58,56	56,44	57,50	1,50	2,61			
Epigalokatehin	11,30	10,56	10,93	0,52	4,79			
Katehin	2,09	3,66	2,88	1,11	38,61			
Procijanidin B2	39,89	39,91	39,90	0,01	0,04			
Epikatehin	30,50	29,04	29,77	1,03	3,47			
<b>UKUPNI FLAVANOLI</b>	<b>153,32</b>	<b>149,57</b>	<b>151,45</b>	<b>2,65</b>	<b>1,75</b>	<b>159,00</b>	<b>151,45</b>	<b>4,75</b>

U Tablici 11 prikazane su vrijednosti eksperimentalno dobivene za maseni udio flavan-3-ola u ekstraktima dobivenim primjenom optimalnih uvjeta ekstrakcije. Razlika između eksperimentalno dobivenih vrijednosti i onih predviđenih modelom je 4,75 % što ukazuje da je dobiveni model adekvatan za opisivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije flavan-3-ola iz kožica grožđa.

U praksi je vrlo često potrebno odrediti masene udjele svih flavonoida sadržanih u kožici grožđa. Zbog ekonomskih razloga najčešće se provodi jedna ekstrakcija za sve željene spojeve, stoga je potrebno odrediti optimalne uvjete ekstrakcije uzimajući u obzir sve tri skupine spojeva istovremeno. Prilikom optimizacije, s obzirom da se optimalni uvjeti ekstrakcije za pojedine skupine spojeva značajno razlikuju, potrebno je načiniti kompromis. Optimalni uvjeti ekstrakcije za sve tri skupine spojeva kompromis su između onih dobivenih za svaku skupinu spojeva pojedinačno (Tablica 8).

I u ovom slučaju ispitana je prikladnost modela, a predviđene i eksperimentalno dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 12. Za sve tri skupine spojeva te su vrijednosti vrlo bliske, a razlika između njih je manja od 5 % što potvrđuje da je dobiveni model zadovoljavajući i pouzdan.

**Tablica 12.** Vrijednosti za potvrdu dizajna za sve skupine spojeva. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože

Naziv	Svi skupa1	Svi skupa2	PROSJEK	SD	RSD	PREDVIĐENO	DOBIVENO	ODSTUPANJE (%)
Delfinidin-3,5-O-diglukozid	11,87	11,39	11,63	0,00	0,00			
Cijanidin-3,5-O-diglukozid	119,16	120,01	119,59	0,60	0,50			
Delfinidin-3-O-glukozid	2809,04	2814,24	2811,64	3,68	0,13			
Peonidin-3,5-O-diglukozid	379,87	308,73	344,30	50,30	14,61			
Malvidin-3,5-O-diglukozid	4000,08	4013,76	4006,92	9,67	0,24			
Cijanidin-3-O-glukozid	1131,85	1132,08	1131,97	0,16	0,01			
Peonidin-3-O-glukozid	284,16	284,82	284,49	0,47	0,16			
Malvidin-3-O-glukozid	4123,52	4124,77	4124,15	0,88	0,02			
<b>UKUPNI ANTOCIJANI</b>	<b>12859,60</b>	<b>12881,80</b>	<b>12870,70</b>	<b>15,70</b>	<b>0,12</b>	<b>12296,00</b>	<b>12870,70</b>	<b>4,47</b>
Miricetin-3-O-glukozid	123,32	124,05	123,69	0,52	0,42			
Rutin	123,93	125,24	124,59	0,93	0,74			
Kvercetin-3-O-glukonorid	75,99	74,54	75,27	1,03	1,36			
Kvercetin-3-O-glukozid	1205,82	1204,21	1205,02	1,14	0,09			
Kemferol-3-O-glukonorid	37,64	47,25	42,45	6,80	16,01			
<b>UKUPNI FLAVONOLI</b>	<b>1566,70</b>	<b>1575,29</b>	<b>1571,00</b>	<b>6,07</b>	<b>0,39</b>	<b>1615,00</b>	<b>1571,00</b>	<b>2,72</b>
Galokatehin	10,14	11,87	11,01	1,22	11,12			
Procijanidin B1	58,85	68,40	63,63	6,75	10,61			
Epigalokatehin	11,26	13,98	12,62	1,92	15,24			
Katehin	3,07	3,60	3,34	0,37	11,24			
Procijanidin B2	40,94	40,40	40,67	0,38	0,94			
Epikatehin	29,32	28,82	29,07	0,35	1,22			
<b>UKUPNI FLAVANOLI</b>	<b>153,58</b>	<b>167,07</b>	<b>160,33</b>	<b>9,54</b>	<b>5,95</b>	<b>157,00</b>	<b>160,33</b>	<b>2,07</b>

Izračunate vrijednosti relativnih standardnih odstupanja u rasponu su od svega 0,12 % za antocijane pa do 5,95 % za flavan-3-ole. Uzimajući u obzir ove RSD vrijednosti može se zaključiti da je novo razvijena i optimizirana MSPD metoda vrlo precizna i točna te se može koristiti u rutinskim analizama za ekstrakciju flavonoida iz kožica grožđa. Prednost ove metode je relativno mali utrošak organskih otapala te mogućnost uklanjanja eventualnih interferencija iz uzorka.

## ***5. ZAKLJUČAK***

Uporaba antioksidansa raste iz godine u godinu sve više. Zbog toga jer su brojna istraživanja posljednjih desetak godina pokazala da namirnice koje sadrže polifenole pozitivno utječu na zdravlje i to najvećim dijelom zbog antioksidacijskog učinka. Pokazalo se kako antioksidacijsko djelovanje polifenola u grožđu štiti od ateroskleroze i koronarnih bolesti. Osim toga dokazano je njihovo antikancerogeno, protuupalno i antimikrobno djelovanje. Iz tih razloga u ovom radu se optimirala metoda ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu kao metoda pripreme uzorka za HPLC analizu. Na temelju provedenih eksperimenata može se zaključiti:

- Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu pogodna je za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa.
- Najbolji rezultati dobiveni su s fenilsilicijevim dioksidom kao MSPD sorbensom s 10 mL acetonitril:voda=50:50 kao ekstrakcijsko otapalo s omjerom mase uzorka/sorbens=125 mg/375 mg.
- Malo lošiji rezultati dobiveni su i s morskim pijeskom kao MSPD sorbensom koji može biti odlična alternativa za fenilsilicijev dioksid kao ekološki prihvatljiv sorbens.
- XAD-2 kao MSPD sorbens je ispao vrlo loš, te nije upotrebljiv za ekstrakciju polifenola iz kože grožđa ovom metodom.
- Za antocijane kao najbolji rezultat dobiven je s fenilsilicijev dioksidom kao MSPD sorbensom s 7 mL etanol:voda=80:20 kao ekstrakcijsko otapalo s omjerom mase uzorka/sorbens=125 mg/625 mg.
- Za flavonole kao najbolji rezultat dobiven je sa fenilsilicijev dioksidom kao MSPD sorbensom s 10 mL acetonitril:voda=50:50 kao ekstrakcijsko otapalo s omjerom mase uzorka/sorbens=125 mg/625 mg.
- Za flavan-3-ole kao najbolji rezultat dobiven je sa fenilsilicijev dioksidom kao MSPD sorbensom s 7 mL etanol:voda=50:50 kao ekstrakcijsko otapalo s omjerom mase uzorka/sorbens=125 mg/375 mg.

## ***6. LITERATURA***

- [1] R. S. Jackson,  
Wine Science: Principles and Applications, Elsevier Academic Press  
Amsterdam/Boston, 3.izd., 2008.
- [2] J. Karoglan Kontić,  
*Regent sorta otporna na gljivične bolesti*, Gospodarski list, Vinogradarstvo,  
20.07.2010.  
<http://www.gospodarski.hr/Publication/2010/13-14/regent-sorta-vinove-loze-otporna-na-gljivine-bolesti/7371#.Va-bIfmqgko>
- [3] S. H. Pine,  
*Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994., str. 66-70.
- [4] V. Rastija, M. Medić-Šarić,  
*Kromatografske metode analize polifenola u vinima*, Kem. Ind. 58, 2009., str. 121–128.
- [5] D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger  
*Analitika okoliša, Kemijska analiza okoliša, Priprava uzorka za analizu*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012., str. 140.-165.
- [6] S. Anderson,  
*Soxtec: Its Principles and Applications*, 2.poglavlje  
[http://aevnmont.free.fr/SACH-BOOKS/Petrochemistry/Oil%20Extraction%20and%20Analysis/1893997782\\_CH02.PDF](http://aevnmont.free.fr/SACH-BOOKS/Petrochemistry/Oil%20Extraction%20and%20Analysis/1893997782_CH02.PDF)
- [7] G. H. Tan, M. K. Chai  
*Sample Preparation in the Analysis of Pesticides Residue in Food by Chromatographic Techniques*, Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis, str. 27-52.
- [8] A. Gupta, M. Naraniwal, V. Kothari,  
*Modern Extraction methods for Preparation of Bioactive Plant Extracts*, International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS) 1 2012., str. 8-26.
- [9] G. N. Sapkale, S. M. Patil, U. S. Surwasw, P. K. Bhatbhage,  
*Supercritical Fluid Extraction*, Int. J. Chem. Sci.: 8(2), 2010., str. 729-743.
- [10] B. Kaufmann, P. Christen,  
*Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction*, Phytochem. Anal. 13, 2002., str. 105–113.
- [11] D. M. Pavlović, S. Babić, A. J.M. Horvat, M. K. Macan,  
*Sample preparation in analysis of pharmaceuticals*, Trends in Analytical Chemistry, 26, 2007., str. 1062-1075.

- [12] S. C. Kim, K. Carlson,  
*LC-MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices*, Trends in Analytical Chemistry, 24 2005., str. 635-644.
- [13] F. A. Settle,  
*Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997., str 17-49.
- [14] G. Karasová, E. Brandšteterová, M. Lachová,  
*Matrix Solid Phase Dispersion as an Effective Preparation Method for Food Samples and Plants before HPLC Analysis*, Czech J.Food Sci., 21 2003., 219-234.
- [15] S. A. Barker, J. Biochem  
*Matrix solid phase dispersion (MSPD)*, ScienceDirect, Methods 70, 2007., str.151–162.
- [16] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà  
*Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction*, Journal of Chromatography A, 2010., str 2521–2532.
- [17] M. K. Macan,  
*Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003. str. 217-235.
- [18] I. Đurić,  
*Izbor nepokretne faze za određivanje veterinarskih farmaceutika HPLC-DAD metodom*, Rektorova nagrada, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 2010., str. 4-11.
- [19] S. Luterotti,  
*Uvod u kemijsku analizu*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 5. Izdanje, 2012. [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/)
- [20] S. Prašnički,  
*Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu*, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, rujan 2013.
- [21] R. P. W. Scott,  
*Tandem Techniques, UV and Visible Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1997. str. 53-54.
- [22] D. R. E. Possner, W. M. Kliewer,  
*The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries*, 24, 1985., str.229-240.



- [23] A. P. Stines, J. Grubb, H. Gockowiak, P. A. Henschke, P. B. Høj, van R. Heeswijck, *Proline and arginine accumulation in developing berries of Vitis vinifera L. U Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue*, **6**, 2000., str. 150-158.
- [24] M. S. Allen, M. J. Lacey, *Methoxypyrazines of grapes and wines*. U: Chemistry of Wine Flavor (A. L. Waterhouse, i S. E. Ebeler ured.) American Chemical Society, Washington DC, 1999., str. 31-38.
- [25] M. Gholami, Y. Hayasaka, B. G. Coombe, J. F. Jackson, S. P. Robinson, P. J. Williams, *Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries*, **1**, 1995., str. 19-24.
- [26] B. G. Coombe, M. G. McCarthy, *Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening*, **6**, 2000., str. 131-135.
- [27] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubordieu, B. Doneche, A. Lonvaud, Handbook of Enology, 2.izd, Chemical Nature, *Origins and Consequences of the Main Organoleptic Defects*, New York. 2000., str. 233-285.
- [28] J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Borrás, L. Arola, *Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol*, **1216**, 2009., str. 7143-7172.
- [29] R. Tsao, *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients*. **2**, 2010., str. 1231-1246.
- [30] A. R. Walker, E. Lee, S. P. Robinson, *Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. PlantMol. Biol.* **62**, 2006., str. 623–635.
- [31] M. Almeida Bezerra, R. Erthal Santelli, E. Padua Oliveira, L. Silveira Villar, L.A. Escaleira, *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta **76**, 2008., str. 965-977.
- [32] Y. Liu, S. Wei, M. Liao, *Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from Euryale ferox seed shells using response surface methodology*. Industrial Crops and Products **49**, 2013., str. 837-843.
- [33] B. Lorrain, I. Ky, L. Pechamat, P. L. Teissedre, *Evolution of Analysis of Polyhenols from Grapes, Wines, and Extracts Molecules* **18**:1076-1100 doi:DOI 10.3390/molecules18011076.

- [34] I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, D. Preiner, D. Ašperger, J. Karoglan Kontić, *Multi-response optimization of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology*, *Phytochemical Analysis*, 2015. in press, DOI 10.1002/pca.2582
- [35] I. Tomaz, L. Maslov, *Simultaneous determination of phenolic compounds in different matrices using phenyl-hexyl stationary phase*. *Food Anal Methods* 2015. in press DOI: 10.1007/s12161-015-0206-7

## ***7. DODATAK***

<b>7.1. POPIS SLIKA</b>		<b>str.</b>
<b>Slika 1.</b>	Građa bobice grožđa	5
<b>Slika 2.</b>	Formiranje bobice i dozrijevanje grožđa [26]	6
<b>Slika 3.</b>	Podjela polifenola [29]	9
<b>Slika 4.</b>	Strukturne formule nekih polifenola [4]	10
<b>Slika 5.</b>	Pregled mogućih postupaka pripreve uzorka u čvrstom stanju [5]	12
<b>Slika 6.</b>	Tri koraka Soxtec ekstrakcije [6]	14
<b>Slika 7.</b>	Fazni dijagram CO <sub>2</sub> [40]	16
<b>Slika 8.</b>	Koraci u tipičnoj MSPD ekstrakciji [6]	18
<b>Slika 9.</b>	Shematski prikaz HPLC kromatografa [19]	22
<b>Slika 10.</b>	Detektor s nizom dioda [20]	23
<b>Slika 11.</b>	HPLC-kromatogrami ekstrakta crnog vina dobiveni uporabom UV detektora (A) i fluorescencijskog detektora (B) [4]	24
<b>Slika 12.</b>	Korišteni sorbensi u eksperimentu	26
<b>Slika 13.</b>	Analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska	27
<b>Slika 14.</b>	Tarionik s uzorkom kože grožđa	28
<b>Slika 15.</b>	SPE kolone	28
<b>Slika 16.</b>	Supelco Visiprep <sup>TM</sup> 24	29
<b>Slika 17.</b>	Rotavapor, Heidolph	29
<b>Slika 18.</b>	Kromatografski sustav Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA)	30
<b>Slika 19.</b>	Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH	41
<b>Slika 20.</b>	Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH	42
<b>Slika 21.</b>	Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH	43
<b>Slika 22.</b>	Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH	46

- Slika 23.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH 47
- Slika 24.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH 48
- Slika 25.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens pijesak, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH 51
- Slika 26.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens fenilsilicijev dioksid, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH 52
- Slika 27.** Prikazi kontura koji pokazuju interakcijske učinke za pojedine čimbenike gdje je sorbens XAD, slike (a, b, c) prikazuju konture za otapalo ACN dok slike (d, e, f) za EtOH 53

## 7.2. POPIS TABLICA

str.

<b>Tablica 1.</b>	Klasične metode ekstrakcije čvrstih uzoraka i njihov princip djelovanja [13]	13
<b>Tablica 2.</b>	Primjena MSPD [16]	19
<b>Tablica 3.</b>	Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija	26
<b>Tablica 4.</b>	Gradijent pokretne faze korišten u analizama	32
<b>Tablica 5.</b>	Valne duljine i skupine spojeva	32
<b>Tablica 6.</b>	Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu	35
<b>Tablica 6.</b>	Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak I]	36
<b>Tablica 6.</b>	Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak II]	37
<b>Tablica 6.</b>	Eksperimenti provedeni u sklopu optimizacije Box-Behnkenovim dizajnom za ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu [nastavak III]	38
<b>Tablica 7.</b>	Polinomna jednadžba drugog reda i regresijski koeficijenti odziva te parametri analize varijance za dobivene eksperimente	39
<b>Tablica 8.</b>	Optimalni uvjeti za ekstrakciju	56
<b>Tablica 9.</b>	Vrijednosti za potvrdu dizajna za antocijane. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože	56
<b>Tablica 10.</b>	Vrijednosti za potvrdu dizajna za flavonole. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože	57
<b>Tablica 11.</b>	Vrijednosti za potvrdu dizajna za flavan-3-ole. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože	57
<b>Tablica 12.</b>	Vrijednosti za potvrdu dizajna za sve skupine spojeva. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe kože	59

### 7.3. POPIS KRATICA I SIMBOLA

MSPD – matrix solid-phase extraction (raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu)

HPLC-DAD – high-performance liquid chromatography with diode array detector (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-detektor s nizom diod)

SPE – solid-phase extraction (ekstrakcija kroz čvrstu fazu)

UAE – ultrasonic assisted extraction (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom)

EAE – enzimima potpomognuta ekstrakcija

MAE – microwave assisted extraction (mikrovalna ekstrakcija)

SFE – supercritical fluid extraction (ekstrakcija superkritičnim fluidom)

PSE – pressurized solvent extraction (visoko tlačna ekstrakcija)

FLD – fluorescentni detektor

UV/Vid – ultraljubičasto/vidljivo

MS – mass spectrometer (detektor spektrometra masa)

ANOVA- analysis of variance (analiza varijance)

#### 7.4. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. veljače 1990. godine u Zagrebu. U rodnom gradu završila sam osnovnu školu Kustošija te srednju školu Zdravstveno učilište. Maturirala sam 2009. i iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu kao redovna studentica na sveučilišnom preddiplomskom studiju Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila sam na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, Odjel za predmete opće uporabe i medicinske proizvode u Zagrebu. Preddiplomski studij završila sam 2013. čime sam stekla naziv prvostupnika primijenjene kemije i iste te godine upisala diplomski studij. Tijekom studija radila sam različite studentske poslove u kojima sam naučila važnost timskog rada i komunikacije. Sudjelovala sam na 10. Susretu mladih kemijskih inženjera (SMLKI 2014.) s posterskim izlaganje na temu: *Određivanje fizikalno kemijskih svojstava farmaceutika*, a ove godine na 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera s posterskim izlaganjem na temu: *Uklanjanje enrofloksacina iz otpadnih voda sorpcijom na kominu grožđa*. Od stranih jezika koristim engleski. Računalno sam pismena.