

Spektrofotometrijske metode i metode spektrometrije masa u određivanju razlika između dva proizvodna procesa vina

Ožbolt, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:367162>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-13**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Eva Ožbolt

*Spektrofotometrijske metode i metode spektrometrije masa u određivanju
razlika između dva proizvodna procesa vina*

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Eva Ožbolt

*Spektrofotometrijske metode i metode spektrometrije masa u određivanju
razlika između dva proizvodna procesa vina*

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

Mentor: dr. sc. Christian Reynolds

Komentor: dr. sc. Lara Saftić Martinović

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
Biotechnology in Medicine

Eva Ožbolt

*Spectrophotometric and mass spectrometry based methods for determination
of the differences between the two wine production processes*

Master Thesis

Rijeka, 2022.

Diplomski rad obranjen je dana 20. srpnja 2022. godine pred povjerenstvom:

1. dr. sc. Marta Žuvić (predsjednica povjerenstva)
2. dr. sc. Dean Marković (član)
3. dr. sc. Christian Reynolds (član/mentor)
4. dr. sc. Lara Saftić Martinović (članica/komentorica)

Rad ima 72 stranice, 19 slika, 9 tablica i 47 literaturnih navoda.

Zahvala

Veliko hvala mentoru dr. sc. Christian Reynolds i komentorici dr. sc. Lara Saftić Martinović na pruženoj prilici i znanju te uloženom vremenu i strpljenju prilikom izrade ovoga diplomskog rada.

Hvala Bogu, obitelji, prijateljima i Iveku na pruženoj podršci i ljubavi.

Pristup dijelu opreme korištene za izradu ovog diplomskog rada omogućen je projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na kampusu Sveučilišta u Rijeci“ koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

Sažetak

Vino je alkoholno piće u čijem se kemijskom sastavu ističu fenolni spojevi sa svojim organoleptičkim, antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. Tehnološki proces proizvodnje vina uvelike utječe na sastav fenolnih komponenti istih, stoga su inovativne tehnologije od velike važnosti pri isticanju proizvoda na konkurentnom tržištu. Dozrijevanje vina u morskim vruljama tehnološki je proces proizvodnje vina kojim se, uz atraktivan izgled butelje, potencijalno postiže promjena kemijskog sastava istih. Butelje vina odležane u vruljama nerijetko dosežu visoke cijene na tržištu, stoga je cilj ovoga rada ispitati postoji li razlika u antioksidativnom potencijalu i kvalitativnom i kvantitativnom sastavu fenolnih komponenti između uzoraka vina odležanih u vrulji i podrumu. Spektrofotometrijskim metodama i metodama spektrometrije masa analizirano je i uspoređeno trideset uzoraka bijelih vina sorte Malvazija, od kojih je petnaest uzoraka dozrijevano u podrumu i petnaest uzoraka u morskoj vrulji u periodu od godinu dana. Provedene spektrofotometrijske metode bile su metode redukcije kationskih radikala za mjerenje antioksidativnog potencijala, Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola i metoda određivanja ukupnih flavonoida, dok su metode spektrometrije masa činile LC-QQQ metoda (s provedenom LC-MS/MS kvalitativnom analizom i MS scan analizom) i MALDI-TOF fingerprint analiza. Rezultati provedenih analiza uspoređeni su statističkim testovima s ciljem ispitivanja značajnosti razlika podataka. Spektrofotometrijskim metodama pokazalo se kako se antioksidativni potencijal i razina ukupnih fenola i flavonoida značajno ne razlikuju između dviju ispitanih skupina. Nadalje, rezultati dobiveni LC-MS/MS analizom pokazali su da se vina dozrijevana u vrulji i podrumu značajno razlikuju po razini šest flavonoidnih spojeva, no ukupan se zbroj fenolnih spojeva značajno ne razlikuje između dviju ispitanih skupina. Međutim, razlika je postojana te je kao takva poticajna za buduće analize uzoraka i optimizaciju tehnike dozrijevanja vina u morskoj vrulji. Ovaj diplomski rad prvi je koji opisuje proces dozrijevanja vina u morskoj vrulji te analizira i uspoređuje uzorke vina iz vrulje i podruma.

Ključne riječi: Malvazija, fenoli, vrulja, antioksidativni potencijal, LC-QQQ, MALDI-TOF

Summary

Wine is a popular alcoholic beverage and phenolic compounds stand out among the various chemical compounds in wine with organoleptic, antioxidant and anti-inflammatory properties. The technological process of wine production affects the composition of their phenolic components, so innovative technologies that can influence the phenolic compounds in wine are of great importance in this competitive market. The maturation of wine in sea springs is a novel technological process that, in addition to adding an attractive appearance to the wine bottle, potentially influences the wine's final chemical composition. Furthermore, bottles of wine aged in sea springs often reach higher market prices. Therefore, the aim of this thesis is to determine the antioxidant potential and phenolic composition of wine samples aged either in sea springs or traditional cellars. Thirty samples of Malvasia white wines were analyzed using spectrophotometric and mass spectrometry methods, of which fifteen samples were matured in traditional cellars and fifteen samples were matured in a Northern Adriatic sea spring. All wines were aged for over one year prior to analysis. Spectrophotometric analysis of antioxidant potential and total phenols and flavonoids in the wine samples was performed using the cation radical reduction and Folin-Ciocalteu methods, respectively. Using a LC-QQQ mass spectrometry method, phenols in the wine were analyzed by quantitative LC-MS/MS analysis, qualitative MS scan analysis and MALDI-TOF fingerprint. The results were analyzed with statistical tests to determine significance differences between the two maturation processes. The antioxidant potential and total phenol and flavonoid levels did not differ significantly between the two maturation processes. However, LC-MS/MS analysis showed that wines matured in the sea spring differ significantly from cellar-matured wines in the concentration of six flavonoid compounds, but the total sum of phenolic compounds did not differ significantly between the two groups. This is encouraging for future optimization of wine maturation techniques in sea springs. This thesis is the first to describe the process of wine maturation in a sea spring and to analyze and compare wine samples matured in sea springs and cellars.

Key words: Malvasia, phenols, sea spring, antioxidant potential, LC-QQQ, MALDI-TOF

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Vino	1
1.1.1. Proizvodnja vina – općenito.....	2
1.1.2. Vino sorte Malvazija istarska	4
1.1.3. Tehnološki proces proizvodnje vina	4
1.1.4. Ekonomski aspekt proizvodnje vina u podrumu i proizvodnje vina u vrulji	7
1.2. Bioaktivne komponente u vinima	9
1.2.1. Flavonoidi	11
1.2.2. Neflavonoidni spojevi	12
1.3. Metode analize fenolnih komponenti u vinu	13
1.3.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti.....	13
1.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i ukupnih flavonoida	16
1.3.3. Visokoprotočne metode za analizu fenolnih spojeva.....	17
2. Ciljevi i hipoteze	21
3. Materijali i metode	23
3.1. Kemikalije i reagensi	23
3.2. Uzorci vina.....	23
3.2.1. Način proizvodnje vina	24
3.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti	25
3.3.1. ABTS metoda	25
3.3.2. DPPH metoda	26
3.4. Metoda određivanja ukupnih fenola	26
3.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida	27
3.6. LC-QQQ analiza	27

3.6.1.	Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ)	28
3.7.	MALDI-TOF MS analiza	33
3.8.	Prikaz, analiza i statistička obrada podataka	33
4.	Rezultati	34
4.1.	Antioksidativna aktivnost ispitana ABTS i DPPH metodama	34
4.2.	Određivanje ukupnih fenola i ukupnih flavonoida	36
4.3.	LC-QQQ kvantitativna analiza fenolnih komponenti u uzorcima vina	38
4.3.1.	MS scan analiza provedena HPLC-MS uređajem	43
4.4.	MALDI-TOF MS analiza fenolnih komponenti u uzorcima vina	45
4.5.	Statistička obrada podataka dobivenih spektrofotometrijskim analizama i analizama spektrometrije masa	46
4.5.1.	Analiza glavnih komponenti (PCA)	46
4.5.2.	Testiranje značajnosti razlike podataka (t-test za nezavisne uzorke, Mann-Whitney U-test)	50
5.	Rasprava	54
6.	Zaključak	60
7.	Literatura	61
8.	Privitci	67
9.	Životopis	71

1. Uvod

1.1. Vino

Vino je alkoholno piće koje se proizvodi fermentacijom mošta, iscijeđenog soka grožđa. Alkoholnom fermentacijom kvasci u anaerobnim uvjetima pretvaraju šećer u alkohol etanol i ugljični dioksid, bez dodavanja šećera, enzima, kiselina ili drugih hranjivih tvari. Riječ vino potječe od latinske riječi *vinum*, što u prijevodu znači „loza“. Vinova loza (lat. *Vitis Vinifera*) biljka je od čijeg se ploda (grožđa) proizvodi vino (1). Znanje o vinu i grožđu staro je koliko i kulturna povijest ljudske populacije. Najraniji dokazi o proizvodnji vina od uzgojene vinove loze datiraju između 5400. i 5000. godine prije Krista u Iranu (2). Danas je vino sastavna komponenta kulture mnogih zemalja diljem svijeta. Velikim je dijelom sredstvo zabave, ali i područje interesa širokog kruga znanstvenika, posebice zagovornika njegovih zdravstvenih dobiti u koje ubrajamo zaštitu od kardiovaskularnih bolesti te antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva (2,3).

Svaka pojedina vrsta grožđa, poznatija kao "sorta", sadrži jedinstven kemijski sastav koji ujedno određuje boju, miris i aromu vina te djelovanje istog na ljudski organizam. Uz zemljopisnu regiju, tlo i klimatske čimbenike koji uvjetuju rast pojedine sorte, tehnologija koja se koristi u proizvodnom procesu uvelike utječe na završni proizvod (2). Postoji oko 15 000 sorti vinove loze za koje sustav klasifikacije nije postojan. Također, podaci o podrijetlu velike većine sorti ne postoji (4). Hrvatska broji 60 autohtonih sorti vina, od kojih među glavnima ubrajamo Malvaziju, Graševinu i Pošip od bijelih sorti vina te Plavac mali, Merlot i Teran od crnih sorti vina (5).

U vinu je do sada prepoznato više od 500 spojeva. No, unatoč naizgled velikom broju spojeva, točan kemijski sastav grožđa i vina još uvijek je nepoznat (4). Vino se sastoji od 80% vode, 10-14% alkohola te 6-10% čine spojevi koji utječu na njegov miris i okus te određuju njegovu kvalitetu. Uz vodu i alkohol, glavne kemijske komponente prisutne u vinu jesu

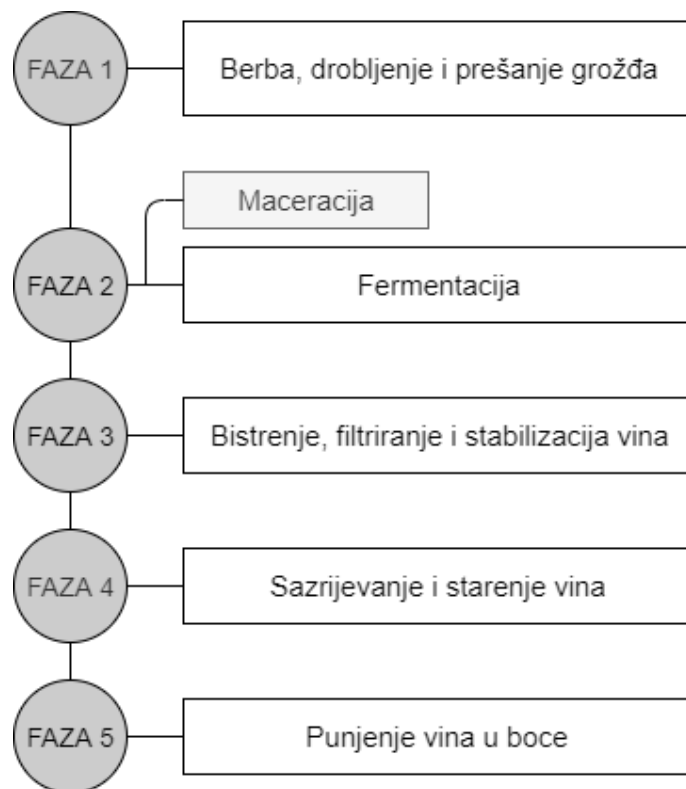
šećeri, organske kiseline, minerali, fenolni spojevi, pigmenti, dušične tvari, pektini, hlapljivi i aromatični spojevi, vitamini, soli i sumporov dioksid (2,6).

Povezivanjem istraživanja koja obuhvaćaju znanost o uzgoju grožđa, proizvodnji i skladištenju vina te analitičkoj, fizikalnoj i organskoj analizi vina moguće je djelomično razumjeti sastav, okus i miris vina (1). Stoga je, s obzirom na konstantan razvoj inovativnih metoda proizvodnje i skladištenja vina te skladno tomu postojanih varijacija u cijeni na tržištu istih, potrebno kontinuirano razvijati i provoditi kemijske analize vina.

1.1.1. Proizvodnja vina – općenito

Proizvodnja vina dijeli se u pet faza te se u svakoj pojedinoj primjenjuju različite prakse i postupci među vinarima s ciljem proizvodnje jedinstvene boce vina. Prva faza započinje berbom grožđa u vinogradu nastojeći pritom dobiti maksimalni urod s najvišom kvalitetom. Nakon berbe, slijedi drobljenje i prešanje grožđa. Druga faza proizvodnje vina jest fermentacija koja je ujedno i ključna faza proizvodnje vina jer u najvećoj mjeri pripisuje konačni okus i miris vinu (7). Fermentaciji često prethodi korak maceracije kojim stanice grožđa oslobađaju i solubiliziraju spojeve vezane u stanicama kože, mesa i sjemenki grožđa (4). Fermentaciju provode kvasci sojeva *Saccharomyces cerevisiae*, a vrijeme obrade ovisi o temperaturi tijekom fermentacije koja utječe na funkciju enzima i propusnost stanične membrane grožđa (4,7). U bijelim se vinima vrenje odvija između 12-18°C i provodi se nekoliko tjedana. U crnim vinima vrenje se odvija na višim temperaturama pri 18-30°C i fermentacija je završena u roku od tjedan dana. Treća faza proizvodnje obuhvaća bistrenje, filtriranje i stabilizaciju vina kojima se uklanjaju netopivi i čvrsti materijali. Slijedi sazrijevanje i starenje vina što ujedno čini i četvrtu fazu proizvodnje vina. Sazrijevanje može potrajati i nekoliko mjeseci te je nužno i značajno za promjene u kemijskom sastavu vina. Petu i posljednju fazu proizvodnje vina čini punjenje vina u boce te

označavanje i pakiranje istih (7). Pregled procesa proizvodnje vina u pet faza prikazan je na Slici 1.



Slika 1 Proces proizvodnje vina u pet faza.

1.1.2. Vino sorte Malvazija istarska

Vino sorte Malvazija istarska dobiveno je od grožđa „*Malvasia Istriana*“ koje se uglavnom proizvodi u vinogorju Istre na sjeveru Jadranskog mora standardnom tehnologijom proizvodnje bijelog vina (8). Malvazija istarska se desetljećima smatrala dijelom porodice mediteranskih malvazija, no nedavnim je genetičkim istraživanjima dokazano kako nije u srodstvu s istima, čime se potvrđuje autohtonost sorte (9). Klima je na području Istre pretežno mediteranska s umjerenim zimama i vrućim ljetima. Malvazija istarska je u pravilu suha te su primarne arome voćno-cvjetnog fermentacijskog profila s uvijek prisutnim mineralnim notama (8). Kako bi zaštitila kvalitetu i stil vina, Udruga istarskih vinara oznakom “IQ” (Istrian Quality) obilježila je vlastita vina čime kupcima garantira ujednačenost bazne linije (9).

1.1.3. Tehnološki proces proizvodnje vina

Unatoč kompleksnom procesu proizvodnje vina, smatra se da vino postiže najznačajnije kemijske promjene i optimalna svojstva nakon određenog vremena odležavanja u boci. Vino se čuva u staklenim bocama i zatvara se najčešće plutenim čepovima. Glavni rezultat skladištenja vina u boci jesu smanjenje gorčine i trpkosti vina, poboljšanje arome te svjetlija i postojanija boja istog. Složene kemijske reakcije koje se odvijaju u vinima tijekom skladištenja posljedica su minimiziranog i kontroliranog prolaska kisika u bocu kroz pluteni čep te mnoštva ekoloških parametara kao što su pH vrijednost, temperatura, vlažnost te svjetlosno zračenje odnosno izloženost istomu (10,11). Prolaskom kisika iz okoliša u vino induciraju se oksidativne reakcije čiji će intenzitet utjecaja ovisiti o fenolnom sastavu vina (10). Također, pokazalo se da razvoj primarnih i sekundarnih aroma vina tijekom dvije godine starenja uglavnom ovisi o temperaturi skladištenja (12).

1.1.3.1. Dozrijevanje vina u podrumu

Vino se najčešće skladišti u podrumu, gdje se temperaturni interval između 15-17°C smatra optimalnim za čuvanje vina. Nadalje, svjetlost (posebice UV zračenje) inducira stvaranje reaktivnih oksidativnih vrsta, stoga se minimiziranje izlaganja svjetlu, kao i korištenje zatamnjenih staklenih boca, smatra uvjetom za pravilno skladištenje vina. U konačnici, vlažnost ima tendenciju smanjenja propusnosti plutenih čepova za kisik, zbog čega je 70% relativne vlažnosti prihvaćeno kao optimalno za skladištenje vinskih boca. Prethodno navedeni parametri za formiranje optimalnog okruženja skladištenja vina razlog su zašto se većina podruma gradi pod zemljom (10).

1.1.3.2. Dozrijevanje vina u vrulji

Odležavanje vina stoljećima se poboljšavalo. Pojava novih tehnologija posljednjih desetljeća skraćuje vrijeme odležavanja i povećanje kvalitete vina (10). Jedna od novijih tehnologija jest skladištenje boca vina u morskim vruljama. Morske vrulje mjesta su u moru iz kojih izvire slatka voda pod utjecajem cirkulacije podzemnih voda i hidrostatskog tlaka istih (13). Vrulje se najčešće javljaju u podnožju velikih planina, pa se tako u Jadranskom moru pojavljuju ispod Učke, Velebita, Biokova i u Konavlima (14). Vrulje u podnožju Učke posebno su značajne, jer se u njima nalaze podvodni podrumi za skladištenje vina. Početkom kolovoza svake godine u organizaciji udruge Ikarski barkajoli održava se manifestacija „Vino i vrulja“ u kojoj ronici polažu kaveze sa 2000-5000 butelja vina u morsku vrulju na dubinu od 23 m te ujedno vade kaveze koji su prethodnu godinu odležali u istoj. Na Slici 2 prikazane su butelje vina u podvodnom podrumu Ikarskog zaljeva, a Slika 3 prikazuje vađenje butelja iz mora nakon godinu dana dozrijevanja. Svjetlost minimalno dopire na dubinu veću od 20 m te su temperatura i tlak mora stalni, točnije 7-13°C, odnosno 2,3 bara. Navedeni uvjeti skladištenja vina konkuriraju uvjetima u podrumu, stoga se skladištenje u vrulji nerijetko predstavlja kao potencijalno boljom tehnologijom skladištenja (15–17).



Slika 2 Podvodni podrum za skladištenje vina u morskoj vrulji Ikarskog zaljeva.



Slika 3 Vađenje butelja vina iz morske vrulje Ikarskog zaljeva nakon godinu dana dozrijevanja u kolovozu 2020. godine.

Bez obzira na tehnologiju skladištenja, neoptimalni uvjeti ili prekovremeno vrijeme skladištenja vina mogu rezultirati razvojem nepoželjnih kemikalija te vino učiniti neprikladnim za konzumaciju (10).

1.1.4. Ekonomski aspekt proizvodnje vina u podrumu i proizvodnje vina u vrulji

Vino je jedna od prvih roba ranih civilizacija koje su se bavile međunarodnom trgovinom te je do danas ostala konkurentan proizvod na svjetskom tržištu. Vino je jedinstvena roba jer, osim intrinzičnog osjetilnog aspekta okusa i arome, prodaje i ekstrinzične čimbenike kao što su dizajn boce, etiketa, zanimljivosti i uočeni talenti vinara (18). Tako je, na primjer, butelja vina skladištena u vrulji zanimljiva kupcu samim time što se, uz potencijalno promijenjen kemijski sastav vina, na takvoj butelji nalaze alge koje prenose priču okruženja u kojemu se boca nalazila u periodu od godinu dana. Na Slici 4 prikazan je primjer prethodno opisanog izgleda boca. Međutim, jedna butelja vina od 750 mL sorte Malvazija istarska ima cijenu od 50 do 80 kuna, dok cijena iste butelje odležane u morskoj vrulji u periodu od godinu dana doseže i do 5 puta veću cijenu (17). S ciljem ispitivanja opravdanosti velike cjenovne razlike, važno je provoditi kemijske analize vina i usporedbe istih.



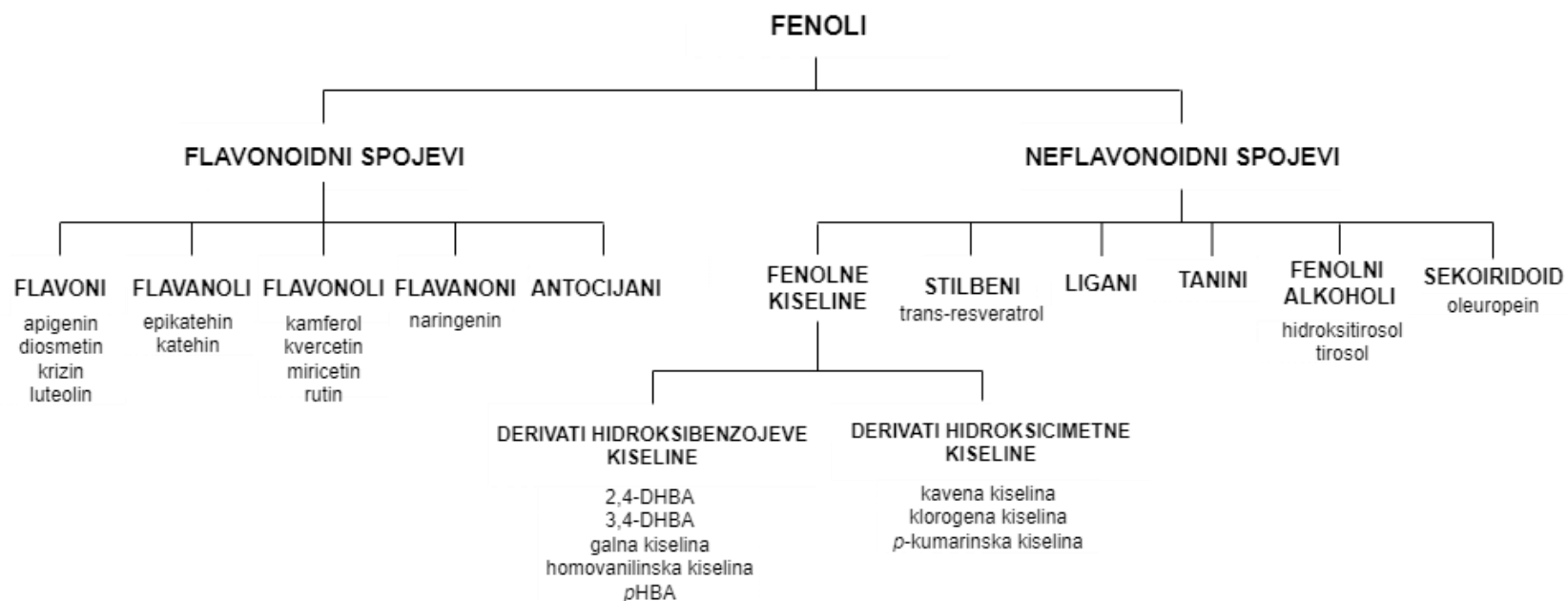
Slika 4 Butelje vina nakon dozrijevanja u vrulji u periodu od godinu dana.

1.2. Bioaktivne komponente u vinima

Najveća pozornost među bioaktivnim komponentama vina posvećena je fenolima koji su, u sinergiji s alkoholom, odgovorni za antioksidativna i protuupalna svojstva istih (1,19,20). Fenoli su sekundarni metaboliti koje biljke proizvode u obrani od nepovoljnog okoliša: u prisutnosti patogena i pod nepovoljnim klimatskim uvjetima (21,22). Signalizacija i regulacija gena te prevencija od stečenih ili zaraznih bolesti neke su od bitnih staničnih i fizioloških funkcija koje fenoli provode vlastitim bioaktivnim svojstvima (21).

Fenolni spojevi mogu potjecati iz kože, sjemenki i stabljike vinove loze (4). Faktori koji utječu na fenolni sastav vina jesu sorta grožđa, tehnika proizvodnje vina, vrijeme provođenja maceracije i fermentacije, temperatura skladištenja, tlo rasta vinove loze, zemljopisni položaj i vremenski uvjeti te starenje vina u boci (20). Osim na antioksidativna i protuupalna svojstva, fenolni spojevi utječu na okus, izgled i miris vina (4).

Do sada je identificirano više od 8000 fenolnih molekula (20,22). Kemijski, fenolni spojevi spadaju u skupinu fenilpropanoida, organskih spojeva sintetiziranih iz aminokiselina fenilalanina i tirozina. Kao takvi, fenoli moraju sadržavati najmanje jednu aromatsku skupinu koja posjeduje jednu ili više hidroksilnih skupina izravno povezanih sa strukturom prstena (4,20). Nastavno, jedna ili više udruženih fenolnih skupina gradi strukturu polifenola. Fenoli su klasificirani na flavonoidne i neflavonoidne spojeve. Flavonoidni spojevi dijele se na flavone, flavanole, flavonole, flavanone i antocijane, dok se neflavonoidni spojevi dijele na fenolne kiseline, fenolne alkohole, sekoiridoide stilbene, ligane i tanine (20–22). Na Slici 5 prikazana je klasifikacija fenola.



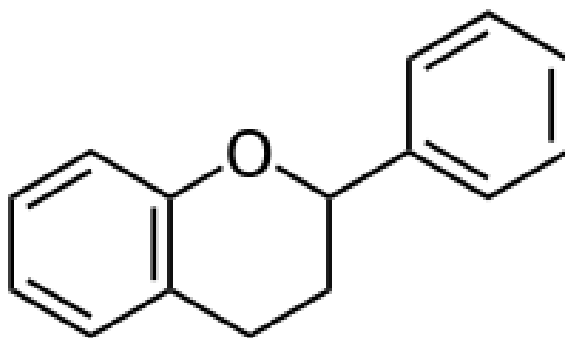
Slika 5 Osnovna klasifikacija fenola i primjeri predstavnika svake skupine spojeva koje pronalazimo u bijelim vinima.

Bioraspoloživost fenola u organizmu uvjetovana je promjenom u kemijskoj strukturi nakon digestije. Većina fenola nije u mogućnosti apsorbirati se u prirodnom obliku, stoga je biološka aktivnost fenolnih spojeva posredovana njihovim metabolitima. Oskudno znanje o bioraspoloživosti fenola otežava specificirati koja je molekula zaslužna za određeni biološki učinak kada su istovremeno prisutni različiti spojevi i oblici fenola (19,22).

1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljenija skupina fenola prisutna u ljudskoj prehrani. Mogu ih sintetizirati samo biljke te se nalaze prvenstveno u voću (jabuke, grožđe, agrumi), povrću (luk), čaju, vinu i maslinovom ulju (19,23). Najveći flavonoidi pronađeni u hrani konjugirani su sa šećerima, kiselinama ili alkoholom (22). U bijelim vinima, flavonoidi sadrže manje od 20% ukupnog sadržaja fenola (4).

Flavonoidi su strukturno okarakterizirani kao molekule koje posjeduju dvije fenolne strukture spojene piranskim ugljikovim prstenom koji sadrži kisik (4,22). Na Slici 6 prikazana je osnovna C₆-C₃-C₆ struktura flavonoida. Klasifikacija flavonoida (Slika 5) temelji se na prirodi flavonoidnih monomera, odnosno funkcionalnim svojstvima istih te vezanju i esterifikaciji s drugim spojevima (4).



Slika 6 Osnovna struktura flavonoida.

Najznačajniji flavonoidni spojevi prisutni u bijelom vinu jesu epikatehin, katehin, miricetin i naringenin. Epikatehin i katehin su flavanoli koji, za razliku od drugih klasa flavonoida, nisu glikozolirani u hrani. Kao takvi, epikatehin i katehin djeluju neuroprotektivno inhibirajući pritom agregaciju i fibrilizaciju amiloida prepoznatljivih kod Alzheimerove bolesti. Nadalje, miricetin jest flavonol čiji su citotoksični učinci uzrokovani inhibicijom enzima topoizomeraze I. Naringenin, najznačajniji flavanon, inhibitor je upalnih odgovora u različitim tipovima stanicama (23,24).

Posljednjih nekoliko desetljeća, epidemiološka su istraživanja otkrila kako su izričito flavonoidi u ishrani bili obrnuto povezani sa smrtnošću od ishemijske bolesti srca (IHD), čime je velika pozornost usmjerena na iste (19). Djeluju kao snažni antioksidansi i kelatori metala. Konjugirana aromatska struktura flavonoida također djeluje i kao moćni zaslon protiv UV svjetla. Općenito, flavonoidi ometaju rast, razvoj, prehranu i reprodukciju virusa, bakterija, gljivica i životinja (4).

1.2.2. Neflavonoidni spojevi

Uz flavonoidne, neflavonoidni spojevi primarne su fenolne skupine koje se javljaju u grožđu i vinu. Polimerizacijom flavonoida nastaju neflavonoidi koji, kao takvi, pripadaju skupini acilnih derivata. Neflavonoidni spojevi klasificirani su temeljem prirode flavonoidnih monomera, vezanja i esterifikacije s drugim spojevima te funkcionalnim svojstvima istih (4).

Primarna klasa neflavonoida u vinima jesu fenolne kiseline, koje se, zahvaljujući jednostavnosti strukture, lako ekstrahiraju iz stanica grožđa tokom procesa drobljenja istih. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline (4). U bijelim vinima, galna kiselina jedna je od predstavnika derivata hidroksibenzojeve kiseline. Djeluje antioksidativno, protuupalno i antimikrobno te, formirajući netopive komplekse s proteinima, djeluje neuroprotektivno i antialergijski (24,25).

Nadalje, značajan predstavnik derivata hidroksicimetne kiseline u bijelim vinima jest kavena kiselina koja, zahvaljujući anti-apoptotičkom djelovanju, ima važno mjesto u liječenju širokog spektra bolesti (26). Klasa neflavonoidnih spojeva zastupljenih u bijelim vinima također su i fenolni alkoholi, čiji su predstavnici tirozol i hidroksitirozol (21).

1.3. Metode analize fenolnih komponenti u vinu

1.3.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) slobodni su radikali koji nastaju metabolizmom kisika koji je uravnotežen brzinom stvaranja oksidansa i eliminacije istih. Neuravnoteženost stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i obrambenog sustava antioksidansa rezultira oksidativnim stresom, uzrokom početka velikog broja bolesti. Antioksidansi su stabilne molekule koje inhibiraju pokretanje i širenje oksidacijskih lančanih reakcija kroz nekoliko različitih mehanizama uključujući doniranje vodika i uklanjanje radikala (27,28).

Fenolni spojevi sadržani u vinu odgovorni su za mnoštvo bioloških učinaka, uključujući snažno antioksidativno djelovanje (29). Antioksidativna aktivnost fenolnih spojeva temelji se na dva mehanizma: kelaciji slobodnih atoma metala čime se sprječava stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta te uklanjanju slobodnih radikala antioksidansima kao učinkovitim donorima vodika. Nadalje, modulacija enzima i staničnih signalnih puteva također je dio širokog spektra bioloških djelovanja fenolnih spojeva zaslužnih za antioksidativno djelovanje istih (29,30).

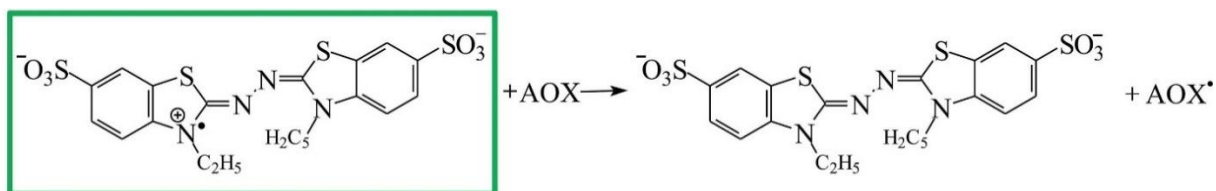
Temeljne metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti najčešće su spektrofotometrijske metode mehanizmom prijenosa atoma vodika (HAT, engl. *hydrogen atom transfer*) ili prijenosom jednog elektrona (SET, engl. *single electron transfer*). Spektrofotometrijski testovi uključuju ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) i DPPH (2,2-

difenilpikrilhidrazil radikal) aktivnost uklanjanja radikala, analizu kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC, engl. *oxygen radical absorption capacity*) i analizu antioksidativnog potencijala redukcije željeza (FRAP, engl. *ferric reducing antioxidant power*) (28). Navedene metode su jednostavne, brze i jeftine što objašnjava raširenu upotrebu istih u antioksidativnom probiru (31).

1.3.1.1. ABTS metoda

ABTS metoda temelji se na istoimenom kationskom radikalu plavo-zelene boje koji se reducira u prisutnosti antioksidansa. Redukcija ABTS radikala provodi se mehanizmom prijenosa atoma vodika uz posljedičnu dekolorizaciju radikala čime otopina postaje bezbojna (Slika 7). Preostali plavo-zeleni ABTS radikal mjeri se UV-Vis spektrofotometrom pri valnoj duljini približno 730-734 nm s ciljem određivanja antioksidativne aktivnosti. Rezultati mjerenja izražavaju se vrijednošću IC_{50} (engl. *half maximal inhibitory concentration*) koja predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnih za uklanjanje 50% slobodnih radikala (32,33).

Osim što je ABTS metoda jednostavna i brza, moguće ju je primijeniti od čistih spojeva sa antioksidativnim djelovanjem do složenih matriksa kao što je hrana. Međutim, nedostatak opisane metode jest da u različitim pH vrijednostima otopine i u različitim otapalima (metanol, etanol ili propanol) dolazi do promjene maksimalne apsorpcije ABTS radikala, što u konačnici utječe na rezultat provedenog testa (32). Nadalje, izmjereni antioksidativni kapacitet može biti rezultat kombinirane aktivnosti reagensa sa širokim spektrom spojeva prisutnih u uzorku, uključujući fenole, organske kiseline i minerale (34).



ABTS radical (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))

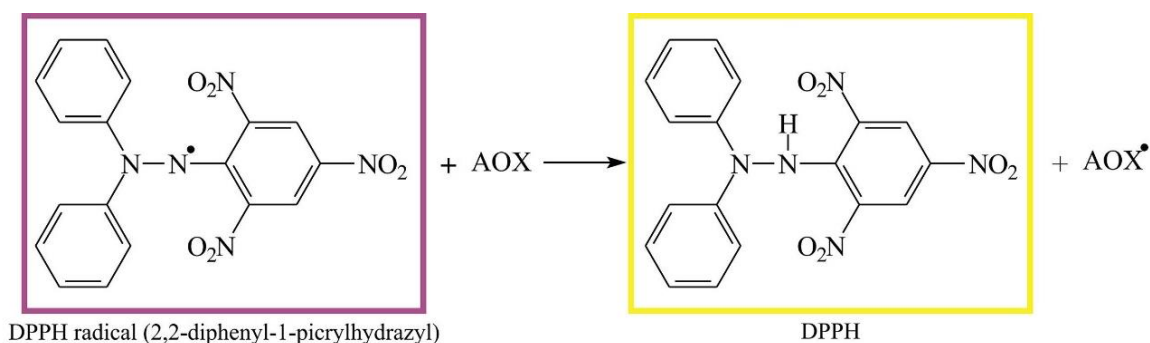
ABTS

Slika 7 Kemijska reakcija neutralizacije zelenog ABTS radikala antioksidansom (AOX) pri kojoj nastaje bezbojna ABTS molekula i radikal antioksidansa (slika je preuzeta iz rada *Becker i sur.*(31))

1.3.1.2. DPPH metoda

DPPH test temelji se na interakciji između potencijalnog antioksidansa i ljubičastog DPPH radikala. Kemijskom reakcijom neutralizacije, DPPH radikal veže atom vodika doniran od antioksidansa čime se mijenja prethodno obojenje radikala u blijedožutu boju (Slika 8). Maksimum apsorpcije DPPH radikala jest na valnim duljinama između 515-520 nm te se smanjenjem istoga očituje antioksidativna aktivnost. Rezultati mjerenja se, kao i za ABTS test, izražavaju IC_{50} vrijednošću predstavljajući pritom koncentraciju antioksidansa potrebnih za uklanjanje 50% slobodnih radikala (28,31).

Budući da su DPPH radikalni reagens i potencijalni antioksidans srž opisane metode, metoda je jednostavna i kao takva zahtjeva svježu pripremu reagensa te skladištenje istog na niskim temperaturama u tami (28). Međutim, kao kod ABTS metode, nedostatak opisanog testa jest potencijalna reakcija DPPH reagensa sa različitim kationima prisutnim u uzorku, što može utjecati na izmjerene vrijednosti antioksidativne aktivnosti (34).



Slika 8 Kemijska reakcija neutralizacije ljubičastog DPPH radikala antioksidansom (AOX) pri kojoj nastaje DPPH molekula blijedožute boje i radikal antioksidansa (slika je preuzeta iz rada *Becker i sur.* (31)).

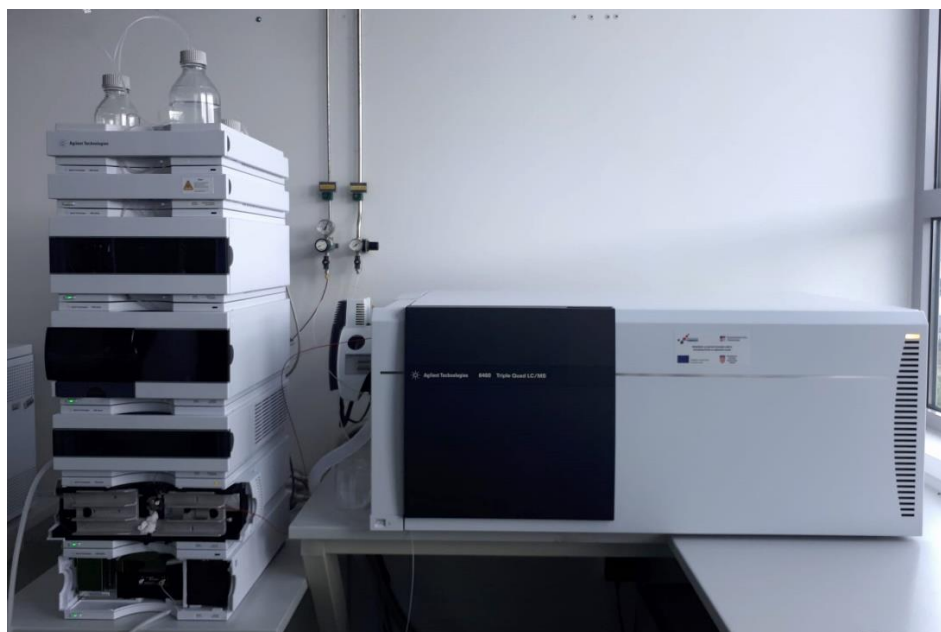
1.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u različitim uzorcima moguće je procijeniti korištenjem spektrofotometrijskih metoda. Za određivanje ukupnog sadržaja fenola poglavito se koristi Folin-Ciocalteu metoda. Temelj navedene metode jest redukcija Folin-Ciocalteu reagensa fenolnim spojevima mehanizmom prijenosa elektrona. Tijekom redukcije, boja otopine zadobiva plavu boju. Promjena u boji otopine proporcionalna je koncentraciji ukupnih fenola u uzorku, što se u konačnici mjeri spektrofotometrijom. Unatoč jednostavnosti, potencijalni problem provedenog testa jest nedostatak specifičnosti uzrokovan reakcijom reagensa s drugim prisutnim ometajućim tvarima. Sukladno prethodno opisanoj metodi, određivanje ukupnih flavonoida provodi se metodom u čijoj je ulozi reagensa aluminijev klorid (AlCl_3). Produkt reakcije jesu crveni aluminijski flavonoidni kelati čija se apsorpcija svjetla također mjeri spektrofotometrijom te kao takva predstavlja rezultat analize. Intenzitet nastale crvene boje ovisi o broju hidroksilnih skupina u molekuli flavonoida (35).

1.3.3. Visokoprotlačne metode za analizu fenolnih spojeva

1.3.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

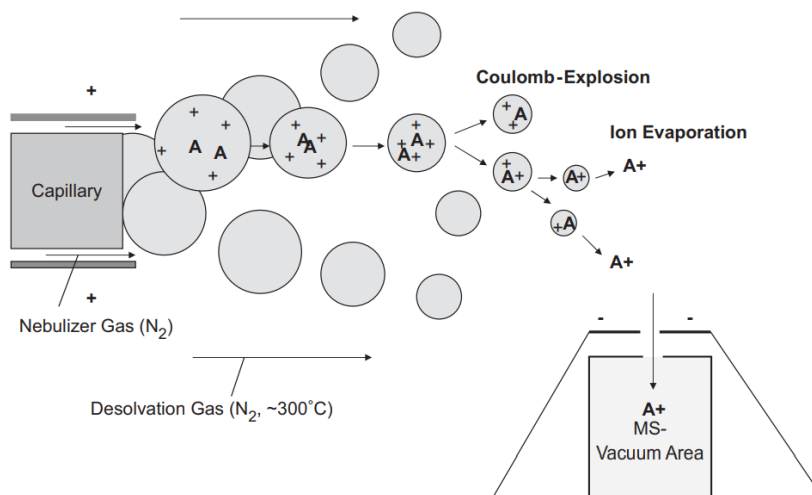
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) jest analitička metoda kojom se provodi odvajanje kemijskih spojeva. Kromatografsko odvajanje zaslužno je za smanjenje složenosti uzoraka prije provođenja analize spektrometrije masa. Spektrometrijom masa moguće je identificirati, karakterizirati i kvantificirati kemijske spojeve kao ciljane analite temeljem molekularnih masa analita i stabilnih fragmenata istih. Različiti kromatografski uređaji u kombinaciji s različitim sustavima masene spektrometrije rezultiraju prilagođenim instrumenata za provođenje analiza širokog spektra uzoraka (36). Primjer HPLC-MS uređaja prikazan je na Slici 9.



Slika 9 HPLC-MS uređaj sa trostrukim kvadrupolnim analizatorom mase.

Tri ključna dijela masenog spektrometra jesu izvor iona, analizator mase i detektor. Izvor iona mjesto je stvaranja iona analita. Najčešće korištena tehnika ionizacije jest ionizacija elektroraspršenjem (ESI, engl. *electrospray ionization*), uz kemijsku ionizaciju atmosferskog tlaka (APCI, engl.

atmospheric-pressure chemical ionization) i ionizaciju brzim atomima (FAB, engl. *fast atom bombardment*). Ionizacija elektroraspršenjem nastaje u trenutku kada analit u tekućoj fazi ulazi u električno polje između kraja kapilare iz koje analit izlazi i ulaza u vakuumski sustav masenog spektrometra (Slika 10). Polaritet nastalih iona kontroliran je polaritetom primijenjenog potencijala sustava (36).



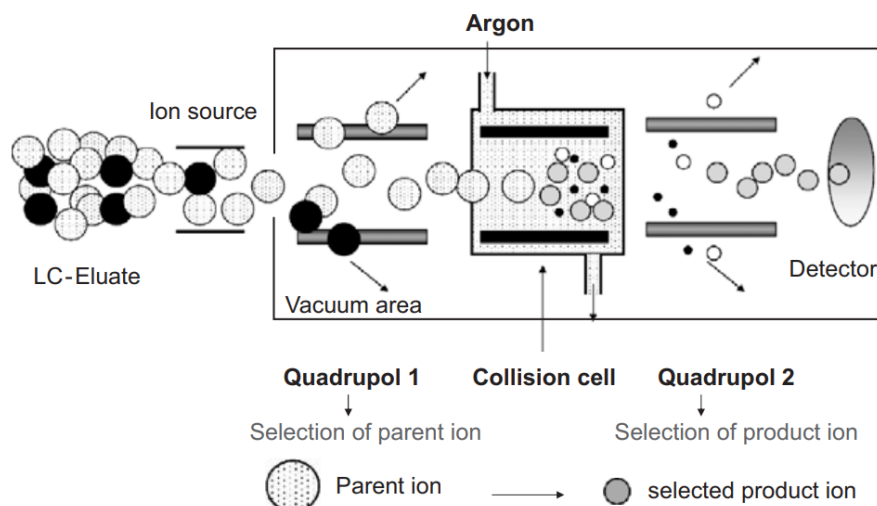
Slika 10 Shematski prikaz ionizacije analita (A) elektroraspršenjem (ESI) (slika je preuzeta iz rada *Vogeser i Parhofer* (36)).

Nakon ionizacije i fragmentacije uzorka, slijedi analizator mase čija je uloga odvajanje iona prema omjeru mase i naboja iona (m/z). Jedan od češće korištenih analizatora mase jest kvadrupolni maseni filtar koji se sastoji od četiri paralelno postavljene metalne šipke u čijem se središtu nalazi električno polje koje provodi ionsku zraku. Ioni izraženog omjera molekularne mase i naboja (m/z) zadržavaju stabilnu putanju te uspješno prolaze kroz kvadrupol dok je ostatak molekula neutraliziran i izbačen iz istog (36).

Uz kvadrupol, široko korištena tehnika analize mase uzorka jest detektor vremena preleta iona (TOF, engl. *time-of-flight*), nerijetko u kombinaciji sa MALDI tehnikom ionizacije. Princip TOF-masene spektrometrije jest ubrzavanje smjese iona u zračnu cijev pri čemu, primjenom električnog potencijala, ioni manje molekularne mase putuju brže od iona veće mase (36).

1.3.3.2. Tekućinska kromatografija suspregnuta sa tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS)

Prethodno opisane tehnike analize smatraju se "tradicionalnima" i napredak istih javlja se kao inovativna tandem masena spektrometrija (LC-MS/MS) koja se pretežito očituje u optimizaciji analizatora mase. Primjer optimiziranog analizatora mase LC-MS/MS sustava jest trostruki kvadrupol (QQQ) sastavljen od dva kvadrupolna filtera mase (Q1 i Q2) i jednog kvadrupola u ulozi kolizijske ćelije. Ioni prolaskom kroz Q1 filtriraju prekursorske ione od ostatka molekula te kao takvi ulaze u kolizijsku ćeliju u kojoj se, u interakciji s kolizijskim plinom (argon ili dušik), fragmentiraju u produkt ione. Produkt ioni zatim ulaze u Q2 u kojemu slijedi filtracija i selekcija samo odabranih ionskih fragmenata (Slika 11). Na Slici 9 prikazan je HPLC-MS uređaj sa trostrukim kvadrupolnim analizatorom mase. Uz lakoću korištenja, prednost LC-MS/MS sustava jest primjenjivost na veći broj analita te je znatno povećana selektivnost i osjetljivost sustava (36).



Slika 11 Shematski prikaz trostrukog kvadrupola LC-MS/MS sustava (slika preuzeta iz rada *Vogeser i Parhofer* (36)).

U konačnici, detekcija iona provodi se na samom kraju analizatora mase, unutar područja visokog vakuuma masenog spektrometra. Pojedinačni ioni ulaskom u detektor induciraju električni signal u različitim vremenskim intervalima što rezultira spektralnim informacijama (36).

1.3.3.3. MALDI-TOF masena spektrometrija

Jedna od važnih tehnika ionizacije ujedno je i matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI, engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) kojom je moguće detektirati male i velike, nehlapljive i termolabilne molekule. Prvi korak navedene tehnike jest imobilizacija uzorka sušenjem na metalnoj ploči u krutoj ili tekućoj MALDI matrici. Slijedi usmjeravanje UV laserske zrake na uzorak čime dolazi do interakcije fotona i matrice koja apsorbira svjetlost te se postiže ionizacija analita. Energija lasera imobiliziranu smjesu pretvara u plinovitu fazu ne fragmentirajući pritom prisutne molekule. U konačnici, slijedi isporuka ioniziranih bioloških molekula u TOF analizator mase i detekcija istih (36,37). MALDI-TOF tehnikom moguće je provesti tzv. fingerprint analizu kojom se kao rezultat dobiva otisak ukupnih molekularnih vrsta ispitanih uzoraka, što koristi karakterizaciji i usporedbi istih (37).

2. Ciljevi i hipoteze

Glavni cilj ovog diplomskog rada jest spektrofotometrijskim metodama i metodama spektrometrije masa ispitati postoji li razlika između dva proizvodna procesa bijelih vina sorte Malvazija.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada jesu:

- optimizacija ABTS i DPPH metode za analizu antioksidativne aktivnosti bijelih vina,
- analiza i usporedba antioksidativnog potencijala bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- optimizacija Folin-Ciocalteu metode i metode određivanja ukupnih flavonoida za analizu ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u bijelim vinima,
- analiza i usporedba sadržaja ukupnih fenola i flavonoida bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- LC-MS/MS kvalitativna i kvantitativna analiza najzastupljenijih fenolnih spojeva u bijelim vinima sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- MALDI-TOF fingerprint analiza bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- obrađena izmjerena podataka analizom glavnih komponenti (PCA) s ciljem određivanja razlike između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- t-testom za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U-testom ispitati postoji li statistički značajna razlika u pojedinačno provedenim spektrofotometrijskim testovima i u razini izmjerenog fenolnog sastava između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu.

Hipoteze ovog diplomskog rada jesu:

- ABTS i DPPH metodom izmjeren antioksidativni potencijal se ne razlikuje između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- sadržaj ukupnih fenola i flavonoida izmjeren Folin-Ciocalteu metodom i metodom određivanja ukupnih flavonoida se ne razlikuje između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu,
- kvalitativan sadržaj najzastupljenijih fenolnih spojeva izmjeren LC-MS/MS metodom se ne razlikuje između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu, dok se kvantitativan sadržaj istih razlikuje,
- ne postoji statistički značajna razlika između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije i reagensi

Standardi katehina, epikatehina, 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (2,5-DHBA), 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (3,4-DHBA), apigenina, kavene kiseline, klorogene kiseline, krizina, diosmetina, galne kiseline, homovanilinske kiseline, hidroksitirozola, kamferola, luteolina, miricetina, naringenina, oleuropeina, *p*-kumarinske kiseline, *p*-hidroksibenzojeve kiseline (*p*HBA-a), kvercetina, rutina, trans-resveratrola, tirosola, galne kiseline i kvercetina nabavljeni su od Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, SAD).

Etanol (LC-MS čistoće) nabavljen je od Sigm Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD), metanol (LC-MS čistoće) i acetonitril (ACN) (LC-MS čistoće) nabavljeni su od VWR Chemicals BDH (Pennsylvania, SAD). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) su nabavljeni od Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, SAD). Folin-Ciocalteu reagens, (±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilna kiselina (troloks) i α-cijano-4-hidroksicinaminska kiselina (CHCA) nabavljeni su od Sigm Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Aluminijev klorid 6-hidrat nabavljen je od Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska).

Milli-Q voda je dobivena pomoću povezanih sustava za Ultračistu vodu (GenPure UV-TOC/UF x CAD plus) i Milli-Q sustava za pročišćavanje vode (<0,055 μS/cm, Milli-Q model Pacific TII 12, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD).

3.2. Uzorci vina

Prikupljeno je trideset uzoraka vina s područja Istre i Kvarnera Republike Hrvatske. Podaci o sorti vina, godini berbe, načinu skladištenja i vremenskom periodu skladištenja nalaze se u Tablici 1.

Tablica 1 Popis prikupljenih uzoraka vina s oznakom uzorka, sortom vina, godinom berbe i vremenom skladištenja.

Oznaka (vrulja)*	Oznaka (podrum)*	Sorta vina	Godina berbe	Vrijeme skladištenja
1V	1P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
2V	2P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
3V	3P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
4V	4P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
5V	5P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
6V	6P	Malvazija	2018.	2019.-2021.
7V	7P	Malvazija	2017.	2019.-2021.
8V	8P	Malvazija	2016.	2019.-2021.
9V	9P	Malvazija	2019.	2020.-2021.
10V	10P	Malvazija	2016.	2020.-2021.
11V	11P	Malvazija	2019.	2020.-2021.
12V	12P	Malvazija	2019.	2020.-2021.
13V	13P	Malvazija	2019.	2020.-2021.
14V	14P	Malvazija	2019.	2020.-2021.
15V	15P	Cuvée**	2019.	2020.-2021.

* Vina iste sorte, godine berbe i vremena skladištenja različito su skladištena (u vrulji i podrumu).

** Mješavina vina različitih sorti među kojima je i Malvazija.

3.2.1. Način proizvodnje vina

Svi uzorci bijelih vina sorte Malvazija provedeni su kroz klasičnu fermentaciju uzrokovanu različitim vrstama kvasca. Fermentaciji je, za većinu uzoraka, prethodila maceracija u trajanju od jednog do devet dana. Nadalje, većina je uzoraka bistrena bentonitom i filtrirana pred punjenje u bocu. Uzorci vina kategorizirani su na vrhunska ili kvalitetna vina te udio alkohola u uzorcima varira između 12,5 i 16,0 vol.%. Detaljan opis načina proizvodnje svakog pojedinog uzorka prikazan je u Tablicama S1 i S2.

3.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

3.3.1. ABTS metoda

ABTS test korišten je za ispitivanje antioksidativne aktivnosti vina. Proveden je prema opisanoj metodi rada *Sousa i sur.* (34), uz dodatne prilagodbe na uzorcima vina. ABTS je kationski radikal koji nastaje reakcijom 7 mM otopine ABTS-a i 2,4 mM otopine kalijevog persulfata u vodi, nakon što smjesa odstoji 14 sati u mraku na sobnoj temperaturi.

Uzorci vina pripremljeni su razrjeđivanjem etanolom u omjeru 1:14 (v/v). Otopina troloksa u etanolu korištena je za konstrukciju kalibracijske krivulje u rasponu koncentracija 0,03 mM, 0,06 mM, 0,09 mM, 0,12 mM, 0,15 mM, 0,18 mM i 0,21 mM. 40 µL otopine troloksa ili otopine uzorka nanese se na mikrotitarsku pločicu PS ravno dno s 96 rupa (Deltalab, Barcelona, Španjolska) te je dodano 160 µL ABTS otopine prethodno razrijeđene u etanolu do apsorbancije 0,7. Vrijednosti apsorbancije očitane su pri valnoj duljini od 734 nm na monokromatskom uređaju Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) u nultoj i petnaestoj minuti. Za slijepu probu korišten je etanol (40 µL). Svi uzorci nanese se u triplicatu. Antioksidativna aktivnost očitava se smanjenjem apsorbancije, a postotak inhibicije računa se prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100$$

Gdje je A_A = apsorbancija uzorka na kraju reakcije ($t = 15$ min); A_B = apsorbancija slijepe probe na početku reakcije ($t = 0$ min).

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalent troloksa/1 L vina.

3.3.2. DPPH metoda

Uzorci vina pripremljeni su razrjeđivanjem etanolom u omjeru 1:4 (v/v). Otopina troloksa u etanolu korištena je za kalibracijsku krivulju u rasponu koncentracija 0,03 mM, 0,06 mM, 0,09 mM, 0,12 mM, 0,15 mM, 0,18 mM i 0,21 mM. 40 µL otopine troloksa ili otopine uzorka nanoseno je na mikrotitarsku pločicu te je dodano 160 µL DPPH otopine prethodno pripremljene otapanjem u etanolu u koncentraciji 0,1 mM. Vrijednosti apsorbancije očitane su pri valnoj duljini od 517 nm na monokromatskom uređaju u nultoj i šezdesetoj minuti. Za slijepu probu korišten je etanol (40 µL). Svi uzorci nanoseni su u triplicatu. Postotak inhibicije računa se prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100$$

Gdje je A_A = apsorbancija uzorka na kraju reakcije ($t = 60$ min), A_B = apsorbancija slijepe probe na početku reakcije ($t = 0$ min).

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalent troloksa/1 L vina.

3.4. Metoda određivanja ukupnih fenola

Metoda određivanja ukupnih fenola naziva se Folin-Ciocalteu esej prema glavnom, Folin-Ciocalteu reagensu koji se u metodi koristi. Test je proveden i modificiran prema opisanoj metodi *Alvarez-Suarez i sur.* (38), uz dodatne prilagodbe na uzorcima vina. Za izradu kalibracijske krivulje korištena je otopina galne kiseline u Milli-Q vodi u rasponu koncentracija 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm i 200 ppm. Uzorci vina pripremljeni su razrjeđivanjem Milli-Q vodom u omjeru 1:4 (v/v). Otopina uzorka vina (50 µL) pomiješana je s Folin-Ciocalteu reagensom (50 µL) i Milli-Q vodom (450 µL) te je ostavljena 5 minuta u tami. Zatim je u smjesu dodana otopina natrijevog karbonata (7,5%) u Milli-Q vodi (400 µL). Nakon inkubacije u mraku 20 minuta na sobnoj temperaturi, 200 µL otopine galne kiseline ili otopine uzorka nakapano je u triplicatu na mikrotitarsku ploču. Milli-Q voda korištena je za slijepu

probu. Vrijednosti apsorbancije očitane su pri valnoj duljini od 760 nm na monokromatskom uređaju.

Dobiveni rezultati prikazani su kao mg ekvivalent galne kiseline/1 L vina.

3.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida

Metoda određivanja ukupnih flavonoida provedena je prema radu *Sousa i sur.* (34), uz dodatne prilagodbe na uzorcima vina. Za izradu kalibracijske krivulje korištena je otopina kvercetina u 80%-tnom metanolu u rasponu koncentracija 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm i 200 ppm. Uzorci vina pomiješani su s metanolnom otopinom aluminijevog klorida (2 g/100 mL) u omjeru 1:1 (v/v). Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, 200 µL otopine kvercetina ili otopine uzorka nakapano je u triplikatu na mikrototarsku ploču. Za slijepu probu korišten je 80%-tni metanol pomiješan sa otopinom aluminijevog klorida (2 g/100 mL) u omjeru 1:1 (v/v). Vrijednosti apsorbancije očitane su pri valnoj duljini 415 nm na monokromatskom uređaju.

Dobiveni rezultati prikazani su kao mg ekvivalent kvercetina/1 L vina.

3.6. LC-QQQ analiza

LC-QQQ analiza provedena je prema radu *Saftić i sur.* (39), uz dodatne prilagodbe na uzorcima vina. Uzorci vina pripremljeni su razrjeđivanjem s 10%-tnim etanolom u omjeru 1:4 (v/v) i filtrirani pomoću 0,45 µm PTFE filtera (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) s ciljem odvajanja nečistoća koje potencijalno ometaju analizu. Za kvantitativnu i kvalitativnu analizu fenolnih komponenti je korišten HPLC Agilent 1260 sustav opremljen spremnicima mobilne faze, otplinjačem, automatskim injektorom, binarnom pumpom, kolonom i kolonskom pećnicom spojenom na Agilent 6460 trostruki kvadrupolni (QQQ) maseni spektrometar s elektrosprej raspršivačem (AJS ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kromatografske analize su se provodile na koloni Purospher STAR RP-18 Hibar HR (50 mm x 2,1 mm,

1,7 um, Merck, Darmstadt, Njemačka). Mobilna faza A sastojala se od 0,1% (v/v) mravlje kiseline u Milli-Q vodi, a mobilna faza B od 0,1% mravlje kiseline (v/v) u acetonitrilu. Temperatura kolone postavljena je na 30°C, a brzina protoka na 0,33 mL/min. Za svaku je analizu injektirano 2,5 µL uzorka. U Tablici 2 je prikazan gradijent elucije. Vrijeme ekvilibracije (engl. *posttime*) je iznosilo 2 minute. Sljedeći parametri podešeni su za analizu masenim spektrometrom: temperatura ionskog izvora 300°C, negativni način rada, napon mlaznice 500 V i kapilarni napon od 3500 V. Kao inertni plin korišten je dušik pod tlakom 45 psi i protokom plina 5 L/min u kolizijskoj ćeliji. Kolizijske su energije, ovisno o analiziranoj fenolnoj komponenti, iznosile 10 V do 40 V. Protok plina za sušenje iznosio je 11 L/min, a temperatura 250°C. Svaki je uzorak injektiran u triplicatu. Parametri optimizacije standarda za kvantitativnu analizu fenolnih komponenti nalaze se u Tablici 3.

Uz kvalitativnu i kvantitativnu LC-QQQ analizu fenolnih komponenti uzoraka, provedena je i MS scan metoda s istim parametrima prethodno opisanog sustava.

3.6.1. Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ)

Granica detekcije (LOD, engl. *limit of detection*) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće detektirati, a granica kvantifikacije (LOQ, engl. *limit of quantification*) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće kvantificirati. Obje su vrijednosti izračunate pomoću jednadžbe pravca kalibracijske krivulje, smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH – International Conference of Harmonisation) (40) korištenjem sljedećih jednadžbi:

$$LOD = 3,3 \cdot \frac{R}{S}$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{R}{S}$$

gdje je R odsječak na y osi, a S nagib kalibracijskog pravca.

Tablica 2 Parametri gradijenta u kromatografskom dijelu LC-QQQ analize. U tablici su prikazani omjeri (%) mobilne faze A i mobilne faze B.

Vrijeme/min	A (%) *	B (%) **	Protok (mL/min)
0,00	99,0	1,0	0,330
0,90	90,0	10,0	
3,00	80,0	20,0	
4,50	75,0	25,0	
6,00	70,0	30,0	
7,50	70,0	30,0	
9,00	10,0	90,0	
9,30	10,0	90,0	
9,60	90,0	10,0	
12,00	99,0	1,0	
15,00	99,0	1,0	

* Mobilna faza A: 0,1% mravlja kiselina + Mili-Q

** Mobilna faza B: 0,1% mravlja kiselina + acetonitril

Tablica 3 U tablici su dani parametri MS analize. Za svaki optimizirani standard fenola u tablici su navedeni način snimanja (mod), *m/z* prekursor, fragmentor, *m/z* produkt ioni, kolizijska energija, vrijeme retencije (R_T), nagib (a) i odsječak na x osi pravca (b), R^2 , raspon linearnosti, granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ).

Standard	Način snimanja	<i>m/z</i> prekursor	Fragmentor/V	<i>m/z</i> produkt ioni	Kolizijska energija/V	R_T /min	y = ax + b		R^2	Raspon linearnosti (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
							a	b				
2,4-DHBA	-	152.8	100	<u>107.8</u>	20	5,2	16112,78	33,09446	0,9975	0,001-5,000	0,0068	0,0205
				52.9	20							
3,4-DHBA	-	152.8	90	<u>108.8</u>	10	4,3	19790,83	-0,49628	0,9956	0,01-5,00	-0,0001	-0,0003
				90.6	26							
				80.8	20							
apigenin	-	268.7	160	224.5	20	10,8	4394,021	14,83388	0,9970	0,001-2,5	0,0111	0,0338
				148.5	24							
				<u>116.6</u>	38							
diosmetin	-	298.8	190	<u>283.7</u>	18	10,9	105216,7	161,6806	0,9932	0,001-1,00	0,0051	0,0154
				254.8	36							
epikatehin	-	288.8	180	<u>244.5</u>	10	6,1	9639,441	16,16332	0,9935	0,01-5,00	0,0055	0,0168
				202.5	14							
galna kiselina	-	168.8	100	<u>124.7</u>	10	2,2	17216,68	29,03747	0,9960	0,01-5,00	0,0056	0,0169
				78.6	22							
hidroksitirozol	-	152.9	90	<u>122.7</u>	10	4,4	11692,45	55,22146	0,9960	0,001-2,500	0,0156	0,0472
				92.6	10							
homovanilinska kiselina	-	180.9	80	<u>136.9</u>	0	5,9	471,4606	282,0942	0,9947	1,00-5,00	1,9745	5,9834
				109.1	12							

Standard	Način snimanja	m/z prekursor	Fragmentor/V	m/z produkt ioni	Kolizijska energija/V	R _T /min	y = ax + b		R ²	Raspon linearnosti (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
							a	b				
kamferol	-	284.7	190	<u>238.5</u>	28	10,9	1664,102	4,899808	0,9913	0,01-2,5	0,0097	0,0294
				184.4	28							
				170.5	28							
katehin	-	288.8	160	<u>244.5</u>	10	5,6	28051,62	47,09513	0,9975	0,001-1,000	0,0055	0,0168
				202.7	16							
				108.7	24							
kavena kiselina	-	178.8	80	137.7	12	5,9	104,6832	-2,33913	0,9929	0,1-5,0	-0,0737	-0,2234
				<u>106.4</u>	24							
klorogena kiselina	-	352.9	80	<u>190.7</u>	10	5,6	37806,88	59,30449	0,9942	0,001-2,5	0,0052	0,0157
				84.7	46							
krizin	-	252.7	180	<u>142.7</u>	26	11,5	8669,409	13,10192	0,9907	0,001-2,5	0,0050	0,0151
				118.6	30							
				106.5	24							
kvercetin	-	300.8	170	178.5	14	9,7	14070,79	26,67753	0,9949	0,001-1	0,0063	0,0190
				<u>150.6</u>	20							
luteolin	-	284.7	200	242.8	20	9,6	32236,79	46,75192	0,9981	0,001-2,5	0,0048	0,0145
				198.8	24							
				150.7	24							
				<u>132.7</u>	36							
miricetin	-	316.7	160	270.7	26	8,3	22583,27	-4,65829	0,9974	0,001-1,000	-0,0007	-0,0021
				<u>150.7</u>	24							
				136.7	24							

Standard	Način snimanja	m/z prekursor	Fragmentor/V	m/z produkt ioni	Kolizijska energija/V	R _T /min	y = ax + b		R ²	Raspon linearnosti (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
							a	b				
naringenin	-	270.8	120	150.6 <u>118.8</u>	14 26	10,7	20462,49	21,31304	0,9964	0,001-2,5	0,0034	0,0104
oleuropein	-	538.9	200	376.7 306.8 <u>275.1</u>	12 18 18	8,3	18837,31	7,755136	0,9968	0,001-2,500	0,0014	0,0041
p-kumarinska kiselina	-	162.9	90	<u>118.8</u> 92.6 65.7	10 34 44	6,7	29736,23	98,86806	0,9991	0,01-2,5	0,0110	0,0332
pHBA	-	136.8	80	<u>92.7</u> 64.8 64.8	12 34 34	5,2	5736,425	1,441448	0,9960	0,01-2,5	0,0008	0,0025
rutin	-	608.8	200	<u>299.7</u> 254.7	38 60	7	29415,17	4,118783	0,9967	0,001-5,00	0,0005	0,0014
tirosol	-	136.8	80	122.7 119 107 105.9 93 <u>92.6</u>	14 10 10 10 14 14	5,2	3944,225	3,165508	0,9924	0,05-2,5	0,0026	0,0080
trans-resveratrol	-	226.8	130	184.4 <u>142.6</u>	14 22	8,8	304,5617	-10,4787	0,9967	0,05-5	-0,1135	-0,3441

Podcrtane vrijednosti odnose se na kvantifikacijske tranzicije.

3.7. MALDI-TOF MS analiza

MALDI-MS spektri dobiveni su pomoću Bruker Ultraflex extreme TOF masenog spektrometra (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka) opremljenog 355-nm smartbeam II laserom (Nd:YAG laser) prema metodi koju su opisali *Rešetar i sur.* (37). Matrica CHCA otopljen je u 1:1 ACN/0,1% TFA (v/v) do konačne koncentracije od 10 µL/mL. Konačna otopina pripremljena je miješanjem otopine CHCA i otopine uzorka u omjerima 1:1 (v/v). Kap pripremljene smjese nanosena je na MALDI brušenu čeličnu ploču. Sljedeći parametri usvojeni su u načinu pozitivne refleksije (engl. *positive ion scan*) pri rasponu mase od 100-4000 Da za spektralnu akviziciju: ionski izvor 1. napon 20,00 kV, ionski izvor 2 napon 17,80 kV, napon leće 7,25 kV, pulsna ekstrakcija iona 120 ns, reflektor 1 21,10 kV i reflektor 2 10,70 kV. Akumulirano je 3000 uzastopnih laserskih snimaka za svaki analizirani uzorak. ProteoMass™ Peptide MALDI-MS kalibracijski komplet (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) korišten je za vanjsku i unutarnju kalibraciju instrumenta. Nakon toga, spektri su oduzeti od osnovne linije (engl. *baseline-subtracting*), izgladeni (engl. *smoothing*) i analizirani korištenjem programa Flex-Analysis (verzija 3.4 Bruker Daltonics).

3.8. Prikaz, analiza i statistička obrada podataka

Rezultati određivanja ukupnih fenola i flavonoida te ABTS i DPPH analize prikazani su kao aritmetička sredina triju provedenih mjerenja za svaki uzorak ± standardna devijacija (SD). Analiza rezultata provedena je u programu Excel verzija 2112 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD).

Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka LC-QQQ analize provedena je u programu MassHunter Qualitative analysis B.07.00 (Agilent technologies, Santa Clara, SAD) i u programu Microsoft Excel verzija 16.48 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD).

Statistička obrada podataka dobivenih spektrofotometrijskim, LC-QQQ i MALDI-TOF MS analizama provedena je analizom glavnih komponenti (PCA,

od engl. *principal components analysis*) te testiranjem značajnosti razlike dviju skupina nezavisnih uzoraka Mann-Whitney U-testom i t-testom u programu Minitab21 verzija 21.1.1.0 (Pennsylvania, SAD).

4. Rezultati

4.1. Antioksidativna aktivnost ispitana ABTS i DPPH metodama

Kod ABTS antioksidacijske analize vidljivo je kako uzorci vina skladišteni u vrulji imaju veću antioksidativnu aktivnost od uzoraka vina skladištenih u podrumu. Vrijednosti dobivene ABTS analizom prikazane su u Tablici 4. Na primjer, kod uzorka 1V izmjerena je ABTS aktivnost od 0,4195 mg ekv. troloksa/1L vina, dok je kod uzorka 1P izmjerena vrijednost 0,3974 mg ekv. troloksa/1L vina. Nadalje, kod DPPH antioksidacijske analize također je vidljivo kako uzorci vina skladišteni u vrulji imaju veću antioksidativnu aktivnost od uzoraka skladištenih u podrumu. Vrijednosti dobivene DPPH analizom su prikazane u Tablici 4. Na primjer, za uzorak 6V izmjerena je DPPH aktivnost vrijednosti 0,0909 mg ekv. troloksa/1L vina, dok je za uzorak 6P izmjerena vrijednost 0,0828 mg ekv. troloksa/1L vina. Međutim, kod nekih je uzoraka za obje analize izmjerena veća antioksidativna aktivnost za uzorke oznake P. Izmjerena vrijednost uzorka 12P za ABTS aktivnost iznosi 0,3994 mg ekv. troloksa/1L vina te za DPPH aktivnost 0,0873 mg ekv. troloksa/1L vina, dok uzorak 12V ima izmjerene vrijednosti 0,3668 mg ekv. troloksa/1L vina, odnosno 0,0688 mg ekv. troloksa/1L vina.

Tablica 4 Antioksidativna aktivnost uzoraka vina mjerena ABTS i DPPH metodama. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalent troloksa/1 L vina.

Uzorci	ABTS	DPPH
1V	0,4195 ± 0,0249	0,0757 ± 0,0146
2V	0,4637 ± 0,0260	0,1296 ± 0,0112
3V	0,4791 ± 0,0352	0,1137 ± 0,0035
4V	0,2763 ± 0,0047	0,0868 ± 0,0021
5V	0,3853 ± 0,0188	0,0733 ± 0,0029
6V	0,4174 ± 0,0117	0,0909 ± 0,0085
7V	0,5048 ± 0,0547	0,1269 ± 0,0061
8V	0,4610 ± 0,0144	0,0813 ± 0,0015
9V	0,2395 ± 0,0095	0,0673 ± 0,0094
10V	0,5065 ± 0,0235	0,1231 ± 0,0166
11V	0,4536 ± 0,0074	0,1321 ± 0,0143
12V	0,3668 ± 0,0533	0,0688 ± 0,0062
13V	0,4890 ± 0,0099	0,0930 ± 0,0070
14V	0,4185 ± 0,0347	0,1142 ± 0,0084
15V	0,3523 ± 0,0050	0,1014 ± 0,0029
1P	0,3974 ± 0,0130	0,0861 ± 0,0136
2P	0,4573 ± 0,0280	0,1347 ± 0,0126
3P	0,4308 ± 0,0237	0,1150 ± 0,0063
4P	0,3568 ± 0,0066	0,1029 ± 0,0166
5P	0,3325 ± 0,0040	0,0723 ± 0,0039
6P	0,4053 ± 0,0294	0,0828 ± 0,0088
7P	0,4588 ± 0,0092	0,1255 ± 0,0114
8P	0,4363 ± 0,0420	0,0723 ± 0,0094
9P	0,2941 ± 0,0329	0,0846 ± 0,0093
10P	0,4994 ± 0,0275	0,1026 ± 0,0100
11P	0,4727 ± 0,0164	0,1229 ± 0,0036
12P	0,3994 ± 0,0239	0,0873 ± 0,0110
13P	0,5038 ± 0,0165	0,0919 ± 0,0063
14P	0,3907 ± 0,0673	0,0883 ± 0,0131
15P	0,3281 ± 0,0340	0,0974 ± 0,0165

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

4.2. Određivanje ukupnih fenola i ukupnih flavonoida

Kod Folin-Ciocalteu analize ukupnih fenola vidljivo je kako uzorci vina skladišteni u vrulji sadrže više ukupnih fenola od uzoraka skladištenih u podrumu. Vrijednosti dobivene određivanjem ukupnih fenola nalaze se u Tablici 5. Na primjer, za uzorak 3V analizom je izmjerena vrijednost 366,24 mg ekv. galne kiseline/1 L vina, dok je za uzorak 3P izmjerena vrijednost 315,86 mg ekv. galne kiseline/1 L vina. Međutim, u manjoj je mjeri za uzorke oznake P očitana veća vrijednost no što je očitana kod uzoraka oznake V. Tako je za uzorak 15P očitana vrijednost 271,90 mg ekv. galne kiseline/1 L vina, dok je za uzorak 15V očitana niža vrijednost od 241,86 mg ekv. galne kiseline/1 L vina. Nastavno, kod analize ukupnih flavonoida pokazano je kako uzorci vina skladištenih u podrumu uglavnom sadrže više ukupnih flavonoida no što je očitano kod uzoraka skladištenih u vrulji. Vrijednosti dobivene određivanjem ukupnih flavonoida nalaze se u Tablici 5. Na primjer, za uzorak 6P izmjerena je vrijednost 6,76 mg ekv. kvercetina/1 L vina, dok je za uzorak 6V izmjerena vrijednost 5,83 mg ekv. kvercetina/1 L vina. Unatoč tomu, u ponekim je slučajevima vidljivo kako uzorci vina oznake V sadrže vrijednosti veće od uzoraka oznake P. Na primjer, za uzorak oznake 2V očitana je vrijednost 9,58 mg ekv. kvercetina/1 L vina, a za uzorak 2P iznosi 8,84 mg ekv. kvercetina/1 L vina.

Tablica 5 Rezultati određivanja ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u uzorcima vina izraženih kao mg ekvivalent galne kiseline/1 L vina, odnosno mg ekvivalent kvercetina/1 L vina.

Uzorci	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi
1V	301,71 ± 2,89	8,06 ± 0,20
2V	309,19 ± 7,22	9,58 ± 0,32
3V	366,24 ± 0,70	13,22 ± 0,33
4V	245,81 ± 6,72	7,75 ± 0,12
5V	257,48 ± 9,01	6,49 ± 0,46
6V	267,81 ± 8,76	5,83 ± 0,20
7V	303,90 ± 3,24	6,41 ± 0,22
8V	356,86 ± 3,71	10,40 ± 0,11
9V	195,00 ± 0,20	6,68 ± 0,29
10V	339,33 ± 4,04	18,63 ± 1,01
11V	270,24 ± 4,43	5,35 ± 0,11
12V	233,14 ± 3,33	5,68 ± 0,27
13V	287,38 ± 7,40	6,63 ± 0,03
14V	318,38 ± 9,12	5,18 ± 0,39
15V	242,86 ± 7,07	5,28 ± 0,39
1P	305,71 ± 3,84	9,06 ± 0,12
2P	306,29 ± 8,89	8,84 ± 0,09
3P	315,86 ± 9,69	12,74 ± 0,85
4P	246,76 ± 1,59	7,08 ± 0,51
5P	249,52 ± 2,29	7,30 ± 0,79
6P	260,24 ± 0,08	6,76 ± 0,15
7P	278,81 ± 8,17	6,53 ± 0,09
8P	344,71 ± 2,22	10,57 ± 0,59
9P	222,76 ± 2,52	9,83 ± 0,33
10P	342,24 ± 7,16	19,43 ± 0,83
11P	264,67 ± 5,47	5,68 ± 0,49
12P	300,05 ± 7,46	6,65 ± 0,29
13P	273,93 ± 8,59	7,29 ± 0,21
14P	266,38 ± 3,88	5,08 ± 0,14
15P	271,90 ± 5,10	5,18 ± 0,11

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

4.3. LC-QQQ kvantitativna analiza fenolnih komponenti u uzorcima vina

Rezultati LC-QQQ kvantitativne analize fenolnih komponenti u trideset uzoraka vina prikazani su u Tablicama 6, 7, 8 i 9. Najzastupljenija fenolna komponenta uzoraka 1, 4, 5, 10, 12, 14 i 15 iz obje skupine različito skladištenih vina jest kavena kiselina. Nadalje, najzastupljenija fenolna komponenta uzoraka 2, 3, 6, 7, 8 i 11 za obje skupine različito skladištenih vina jest galna kiselina. Međutim, uzorak 9V kao najzastupljeniju fenolnu komponentu ima kavenu kiselinu i iznosi 6,5537 mg/L, dok je za uzorak 9P najzastupljenija galna kiselina i iznosi 15,5681 mg/L. Također, u uzorku 13V najzastupljenija fenolna komponenta jest kavena kiselina izmjerene vrijednosti 12,3883 mg/L, dok je za uzorak 13P najzastupljenija galna kiselina vrijednosti 10,3164 mg/L. Ukupna količina fenolnih komponenti izračunata je zbrajanjem rezultata dobivenih analiziranjem fenolnih komponenti za svaki uzorak vina. Ukoliko uspoređujemo vina skladištena u vrulji sa vinima skladištenima u podrumu, vina skladištena u podrumu sadrže veću ukupnu količinu fenolnih komponenti od vina skladištenih vrulji. Na primjer, od petnaest uzoraka vina skladištenih u podrumu, uzorak 8P ima najveću vrijednost ukupne količine fenolnih komponenti jednaku 39,8988 mg/L, dok uzorak 8V ima ukupnu vrijednost jednaku 34,5052 mg/L. Međutim, od petnaest uzoraka vina skladištenih u vrulji, uzorak 15V ima najveću vrijednost ukupne količine fenola jednaku 43,2085 mg/L, dok uzorak 15P ima manju vrijednost jednaku 34,4304 mg/L.

Tablica 6 Rezultati LC-QQQ kvantitativne analize za osam uzoraka vina dozrijevanih u vrulji u periodu od 2019. do 2020. godine (1V - 8V). Rezultati su prikazani u mg/L.

Naziv fenola	1V	2V	3V	4V	5V	6V	7V	8V
2,5-DHBA	1,1120 ± 0,0107	1,7628 ± 0,0412	1,5638 ± 0,0643	1,1365 ± 0,9168	1,3036 ± 0,0070	0,8643 ± 0,0226	0,8759 ± 0,0186	1,4472 ± 0,0427
3,4-DHBA	2,0758 ± 0,0060	1,9601 ± 0,0562	5,7592 ± 0,0604	4,6468 ± 2,6702	3,8105 ± 0,0343	2,7712 ± 0,0289	1,9552 ± 0,0374	2,5872 ± 0,0444
apigenin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
diosmetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0009 ± 0,0007	<LOQ
epikatehin	1,4311 ± 0,0120	1,5220 ± 0,0378	1,2457 ± 0,0576	1,1976 ± 1,3282	1,9244 ± 0,0460	2,0763 ± 0,0459	2,0026 ± 0,0190	1,7639 ± 0,0517
galna kiselina	4,1656 ± 0,0156	20,8020 ± 0,3697	12,0010 ± 0,3366	4,3971 ± 2,6483	3,7962 ± 0,0510	10,0480 ± 0,2585	17,1531 ± 0,0959	11,9624 ± 0,0823
hidroksitirozol	1,0035 ± 0,0570	0,6204 ± 0,0101	1,0758 ± 0,0519	0,4876 ± 0,7252	1,0308 ± 0,0051	0,5512 ± 0,0249	0,5369 ± 0,0106	1,0752 ± 0,0343
homovanilinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0
kamferol	0	0	0	0	0	0	0	0
katehin	1,0602 ± 0,0168	1,4158 ± 0,0958	1,2354 ± 0,0210	1,3605 ± 0,9957	1,4086 ± 0,0004	1,5107 ± 0,0416	1,4279 ± 0,0187	1,3614 ± 0,0072
kavena kiselina	12,8135 ± 1,0260	9,4174 ± 1,4293	9,5776 ± 2,4531	8,3207 ± 5,1802	8,0838 ± 0,7579	8,4374 ± 0,8871	8,1962 ± 1,7250	11,0150 ± 1,1047
klorogena kiselina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
krizin	0	0	0	0	0	0	0	0
kvercetin	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0	0	<LOQ	<LOQ
luteolin	0	0	0	0	0	0	0	0
miricetin	0,0076 ± 0,0015	0,0099 ± 0,0007	0,0117 ± 0,0057	0,0339 ± 0,0068	0,0106 ± 0,0010	0,0110 ± 0,0010	0,0091 ± 0,0031	0,0103 ± 0,0017
naringenin	0,0566 ± 0,0057	0,0794 ± 0,0054	0,0790 ± 0,0042	0,0576 ± 0,0512	0,0803 ± 0,0080	0,0765 ± 0,0037	0,0948 ± 0,0203	0,0859 ± 0,0090
oleuropein	0	0	0	0	0	0	0	0
p-kumarinska kiselina	1,7265 ± 0,0501	1,5597 ± 0,1157	1,3542 ± 0,0154	1,6654 ± 1,3084	1,8833 ± 0,0329	1,8155 ± 0,0324	1,6273 ± 0,0103	1,5696 ± 0,0846
pHBA	0,5445 ± 0,0500	0,7379 ± 0,0336	1,4649 ± 0,0602	0,8622 ± 0,8694	1,3228 ± 0,0933	1,0009 ± 0,1769	0,6443 ± 0,0408	0,8795 ± 0,0465
rutin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
tirozol	0,5014 ± 0,0379	0,6133 ± 0,0190	1,0734 ± 0,0676	0,7121 ± 0,7189	1,0801 ± 0,0634	0,7998 ± 0,0358	0,5258 ± 0,0287	0,7478 ± 0,0516
trans-resveratrol	0	0	0	0	0	0	0	0
UKUPNO	26,4983	40,5007	36,4416	24,8782	25,7351	29,9626	35,0498	34,5052

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 7 Rezultati LC-QQQ kvantitativne analize za sedam uzoraka vina dozrijevanih u vrulji u periodu od 2020. do 2021. godine (9V - 15V). Rezultati su prikazani u mg/L.

Naziv fenola	9V	10V	11V	12V	13V	14V	15V
2,5-DHBA	1,3277 ± 0,0088	1,8350 ± 0,0277	0,9197 ± 0,0276	1,0640 ± 0,0409	0,8438 ± 0,0073	0,8017 ± 0,0374	0,7048 ± 0,0087
3,4-DHBA	3,6693 ± 0,0856	3,6513 ± 0,0742	2,5984 ± 0,0463	3,4658 ± 0,0539	3,2175 ± 0,0304	2,5475 ± 0,0490	2,0267 ± 0,0561
apigenin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
diosmetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
epikatehin	1,6522 ± 0,0488	1,4625 ± 0,0604	2,3794 ± 0,1025	2,1640 ± 0,0082	1,8531 ± 0,0086	1,8888 ± 0,0467	1,9023 ± 0,0891
galna kiselina	5,8086 ± 0,1457	6,5365 ± 0,1681	16,7368 ± 0,2347	7,7369 ± 0,1199	10,1179 ± 0,0716	8,8273 ± 0,0792	9,4933 ± 0,1960
hidroksitirozol	0,8497 ± 0,0179	2,3529 ± 0,0620	0,5009 ± 0,0354	0,7894 ± 0,0419	0,6837 ± 0,0419	1,3235 ± 0,0611	0,8715 ± 0,0230
homovanilinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0
kamferol	0	0	0	0	0	0	0
katehin	1,5514 ± 0,0356	1,3099 ± 0,0287	1,4383 ± 0,0370	1,2319 ± 0,0517	1,2521 ± 0,0257	1,3954 ± 0,0330	1,3904 ± 0,0233
kavena kiselina	6,5537 ± 1,6810	11,9624 ± 1,3277	7,5979 ± 0,4415	8,1594 ± 1,3134	12,3883 ± 0,2280	15,1592 ± 0,8541	22,7950 ± 1,3481
klorogena kiselina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
krizin	0	0	0	0	0	0	0
kvercetin	<LOQ	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
luteolin	0	0	0	0	0	0	0
miricetin	0,0111 ± 0,0025	0,0148 ± 0,0005	0,0119 ± 0,0005	0,0092 ± 0,0012	0,0152 ± 0,0036	0,0097 ± 0,0032	0,0102 ± 0,0016
naringenin	0,0730 ± 0,0054	0,0728 ± 0,0055	0,1046 ± 0,0065	0,0943 ± 0,0183	0,1079 ± 0,0121	0,1026 ± 0,0096	0,0959 ± 0,0019
oleuropein	0	0	0	0	0	0	0
p-kumarinska kiselina	1,5354 ± 0,0771	2,1290 ± 0,0446	1,5849 ± 0,0672	1,3546 ± 0,0174	1,4687 ± 0,0423	2,3334 ± 0,0854	2,7812 ± 0,0927
pHBA	1,4611 ± 0,2078	1,0787 ± 0,0982	0,9266 ± 0,1286	1,1041 ± 0,0402	1,0297 ± 0,0629	0,6860 ± 0,0717	0,6281 ± 0,0354
rutin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
tirozol	1,2328 ± 0,0129	0,8413 ± 0,0632	0,6897 ± 0,0903	0,9379 ± 0,0375	0,8088 ± 0,1172	0,5711 ± 0,0737	0,5092 ± 0,0228
trans-resveratrol	0	0	0	0	0	0	0
UKUPNO	25,7260	33,2470	35,4892	28,1115	33,7868	35,6462	43,2085

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 8 Rezultati LC-QQQ kvantitativne analize za osam uzoraka vina dozrijevanih u podrumu u periodu od 2019. do 2020. godine (1P - 8P). Rezultati su prikazani u mg/L.

Naziv fenola	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P
2,5-DHBA	0,3788 ± 0,0095	1,3779 ± 0,0914	1,3824 ± 0,0140	1,2133 ± 0,0438	1,2227 ± 0,0143	0,8707 ± 0,0214	0,8633 ± 0,0299	1,3721 ± 0,0372
3,4-DHBA	1,0960 ± 0,0134	2,0541 ± 0,0358	5,6617 ± 0,0305	4,9404 ± 0,0620	3,7519 ± 0,0747	3,2172 ± 0,0244	2,3463 ± 0,0404	3,1823 ± 0,0476
apigenin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
diosmetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0014 ± 0,0012	<LOQ
epikatehin	0,2877 ± 0,0144	0,7845 ± 0,0590	0,7610 ± 0,0621	0,8464 ± 0,0438	1,0606 ± 0,0115	1,4026 ± 0,0974	1,5640 ± 0,1137	2,1987 ± 0,0797
galna kiselina	1,5244 ± 0,0304	19,1440 ± 0,6592	10,7413 ± 0,0241	6,1883 ± 0,0763	3,9268 ± 0,1211	11,0937 ± 0,1252	18,3838 ± 0,5860	16,1481 ± 0,2450
hidroksitirozol	1,0064 ± 0,0715	0,6146 ± 0,0505	1,1493 ± 0,0276	0,7498 ± 0,0117	0,9432 ± 0,0137	0,5476 ± 0,0528	0,7795 ± 0,0719	1,3828 ± 0,0474
homovanilinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0	0
kamferol	0	0	0	0	0	0	0	0
katehin	0,1028 ± 0,0107	0,5020 ± 0,0269	0,5662 ± 0,0232	0,7924 ± 0,0460	0,9074 ± 0,0344	1,1623 ± 0,0084	1,1749 ± 0,0470	1,3093 ± 0,0752
kavena kiselina	2,2869 ± 0,3749	4,8956 ± 1,2330	4,9518 ± 0,8906	8,1583 ± 1,5234	9,5645 ± 1,2244	8,5827 ± 0,4342	9,7968 ± 1,3357	10,8900 ± 1,2890
klorogena kiselina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
krizin	0	0	0	0	0	0	0	0
kvercetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
luteolin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
miricetin	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0029 ± 0,0029	0,0055 ± 0,0015	0,0060 ± 0,0021	0,0061 ± 0,0015	0,0062 ± 0,0022	0,0066 ± 0,0022
naringenin	0,0065 ± 0,0016	0,0072 ± 0,0050	0,0077 ± 0,0013	0,0069 ± 0,0030	0,0069 ± 0,0019	0,0108 ± 0,0019	0,0267 ± 0,0090	0,0270 ± 0,0035
oleuropein	0	0	0	0	0	0	0	0
p-kumarinska kiselina	0,3024 ± 0,0184	0,9138 ± 0,0304	0,9181 ± 0,0589	1,3170 ± 0,0429	1,7876 ± 0,1313	1,8589 ± 0,1285	1,4752 ± 0,0831	1,3782 ± 0,0164
pHBA	0,3823 ± 0,0126	0,7870 ± 0,0921	1,7285 ± 0,1011	1,5571 ± 0,0709	1,2977 ± 0,0762	1,0757 ± 0,1307	0,7938 ± 0,0239	1,1007 ± 0,0224
rutin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
tirozol	1,2322 ± 0,0594	0,7942 ± 0,0479	1,4582 ± 0,1234	1,3616 ± 0,1213	1,2273 ± 0,0281	0,8825 ± 0,0505	0,7926 ± 0,0048	0,9030 ± 0,1482
trans-resveratrol	0	0	0	0	0	0	0	0
UKUPNO	8,6064	31,8748	29,3290	27,1370	25,7027	30,7107	38,0045	39,8988

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

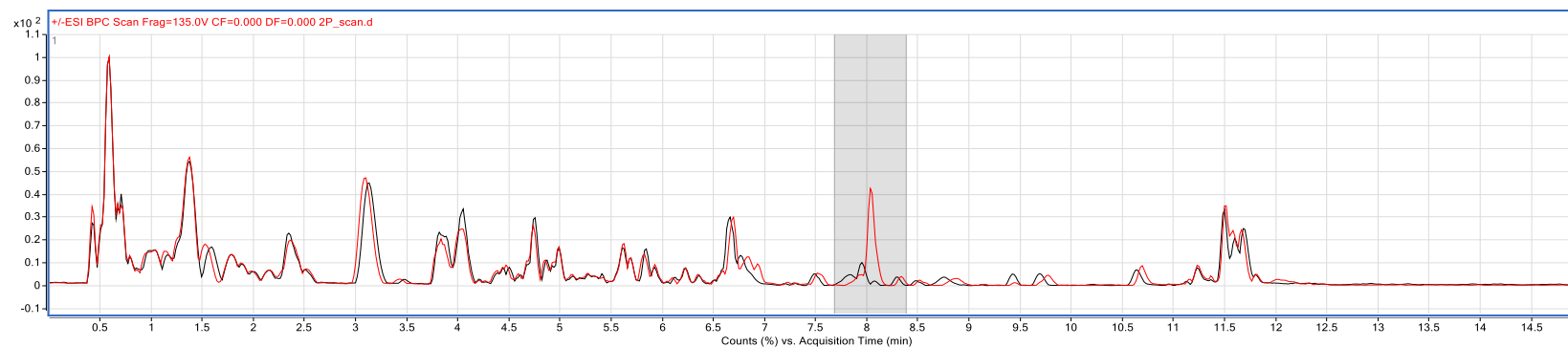
Tablica 9 Rezultati LC-QQQ kvantitativne analize za sedam uzoraka vina dozrijevanih u podrumu u periodu od 2020. do 2021. godine (9P - 15P). Rezultati su prikazani u mg/L.

Naziv fenola	9P	10P	11P	12P	13P	14P	15P
2,5-DHBA	1,0717 ± 0,0189	1,5361 ± 0,0579	0,8979 ± 0,0202	1,4356 ± 0,0192	0,8987 ± 0,0446	0,6702 ± 0,0363	0,8735 ± 0,0251
3,4-DHBA	2,2480 ± 0,0277	3,3691 ± 0,0896	2,3380 ± 0,0406	3,6766 ± 0,0146	3,4436 ± 0,0610	2,7656 ± 0,0617	2,4320 ± 0,0143
apigenin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
diosmetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
epikatehin	1,2715 ± 0,0276	1,2376 ± 0,0472	1,5073 ± 0,0265	2,5735 ± 0,0237	3,1269 ± 0,0327	2,4155 ± 0,0738	1,4502 ± 0,0320
galna kiselina	15,5681 ± 0,1170	10,6194 ± 0,0161	16,8704 ± 0,3105	8,0828 ± 0,0833	10,3164 ± 0,0793	9,7923 ± 0,1690	7,3643 ± 0,1208
hidroksitirozol	2,2699 ± 0,0623	2,3393 ± 0,0336	0,9239 ± 0,0260	1,1679 ± 0,0384	0,8085 ± 0,0432	0,7652 ± 0,0543	0,9182 ± 0,0079
homovanilinska kiselina	0	0	0	0	0	0	0
kamferol	0	0	0	0	0	0	0
katehin	0,9732 ± 0,0341	1,0037 ± 0,0206	1,0534 ± 0,0320	1,4948 ± 0,0284	1,7828 ± 0,0340	1,5610 ± 0,0120	1,2588 ± 0,0403
kavena kiselina	12,3600 ± 0,6556	12,6363 ± 1,2208	15,5884 ± 1,4821	8,5459 ± 1,1854	10,1854 ± 0,8079	11,0501 ± 1,6433	16,5286 ± 1,0141
klorogena kiselina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
krizin	0	0	0	0	0	0	0
kvercetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
luteolin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
miricetin	0,0039 ± 0,0020	0,0049 ± 0,0015	0,0057 ± 0,0017	0,0060 ± 0,0004	0,0066 ± 0,0013	0,0106 ± 0,0042	0,0078 ± 0,0028
naringenin	0,0224 ± 0,0004	0,0232 ± 0,0027	0,0307 ± 0,0045	0,0434 ± 0,0057	0,0351 ± 0,0070	0,0348 ± 0,0072	0,0627 ± 0,0064
oleuropein	0	0	0	0	0	0	0
p-kumarinska kiselina	1,5449 ± 0,0511	1,7792 ± 0,0599	1,6435 ± 0,0362	1,8912 ± 0,0821	1,5710 ± 0,0864	1,5934 ± 0,0813	2,1645 ± 0,0712
pHBA	0,7511 ± 0,0505	1,0618 ± 0,1023	0,6987 ± 0,0555	1,4591 ± 0,0646	1,1374 ± 0,0593	0,8282 ± 0,0858	0,7413 ± 0,0628
rutin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
tirozol	0,6256 ± 0,1178	0,9473 ± 0,1453	0,6489 ± 0,0532	1,4719 ± 0,0613	1,0099 ± 0,0295	0,6619 ± 0,0425	0,6286 ± 0,0366
trans-resveratrol	0	0	0	0	0	0	0
UKUPNO	38,7102	36,5580	42,2068	31,8488	34,3223	32,1487	34,4304

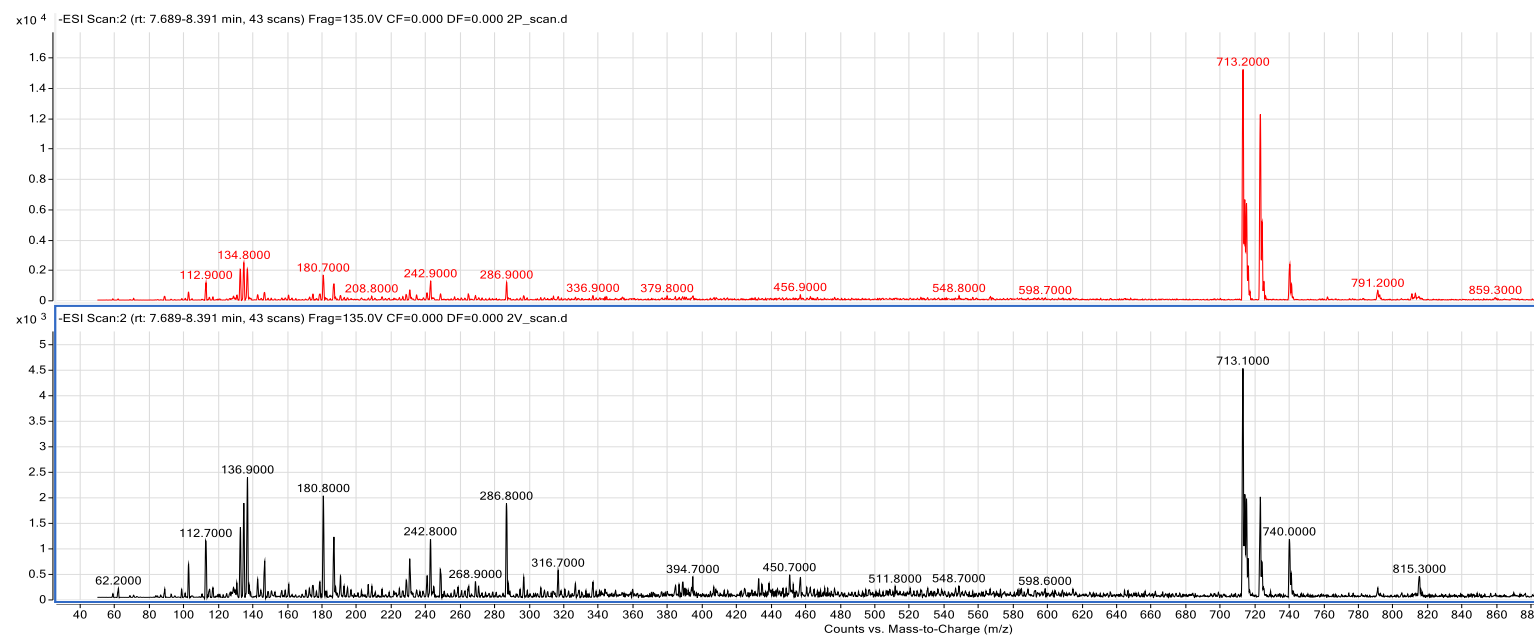
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

4.3.1. MS scan analiza provedena HPLC-MS uređajem

Nakon provedene MS scan analize svih uzoraka, najveća razlika u ukupnom sastavu između uzoraka vina skladištenih u podrumu i vrulji zamijećena je kod uzoraka 2V i 2P. Slika 12 prikazuje preklopljene spektre MS scan analize ukupne količine iona uzoraka 2V i 2P. Unatoč većinskom preklapanju snimljenih spektara, uočena je razlika uzoraka 2V i 2P na mjestu raspona retencijskog vremena od 7,680-8,383 minute. Negativan način snimanja spektra omogućuje pregledan prikaz uočenih razlika dvaju spektara uzoraka te je prikazan na Slici 13. Detektirani ion 713,2 u negativnom načinu snimanja uzorka 2P ima otprilike tri puta veći intenzitet no što ima kod uzorka 2V.



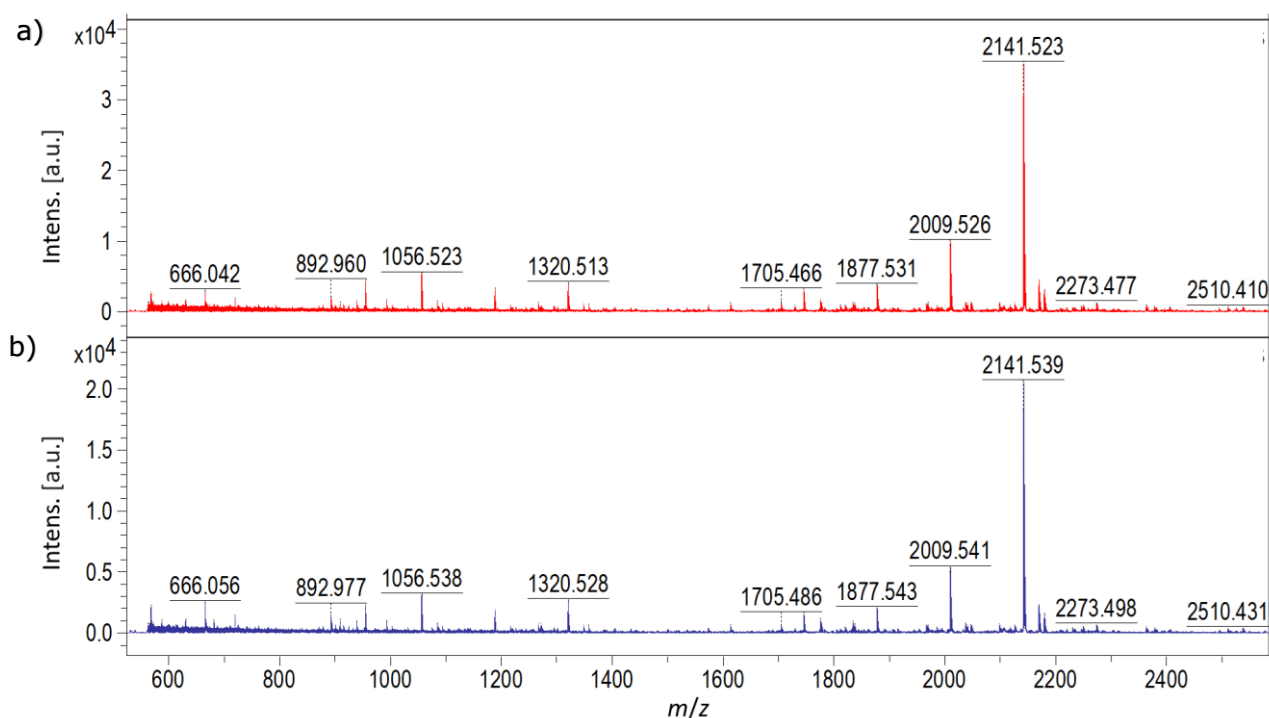
Slika 12 MS scan ukupne količine iona uzoraka 2P i 2V s označenom razlikom spektara istih.



Slika 13 MS scan u negativnom načinu snimanja iona uzoraka 2P (a) i 2V (b) na mjestu raspona retencijskog vremena od 7,680-8,383 minute.

4.4. MALDI-TOF MS analiza fenolnih komponenti u uzorcima vina

Nakon selektivne analize polifenola LC-QQQ metodom, provedeno je ukupno profiliranje uzoraka neselektivnom kvalitativnom MALDI-TOF metodom. Prema radu *Rešetar i sur.* (37), snimanje u načinu pozitivne refleksije informativnije je od negativnog načina snimanja, stoga je u ovom diplomskom radu provedena fingerprint analiza vina u pozitivnom načinu snimanja. Na Slici 14 prikazani su spektri otiska ukupnih molekularnih vrsta uzoraka 1P i 1V provedene MALDI-TOF analize u pozitivnom načinu snimanja na mjestu raspona iona od 600-2500 m/z . Detektirani ioni uzoraka 1P i 1V istih su m/z vrijednosti u rasponu mase između 600-2500 m/z te je veći intenzitet istih prisutan u uzorku 1P.



Slika 14 MALDI-TOF fingerprint analiza u pozitivnom načinu snimanja za uzorke 1P (a) i 1V (b) na mjestu raspona mase iona od 600-2500 m/z .

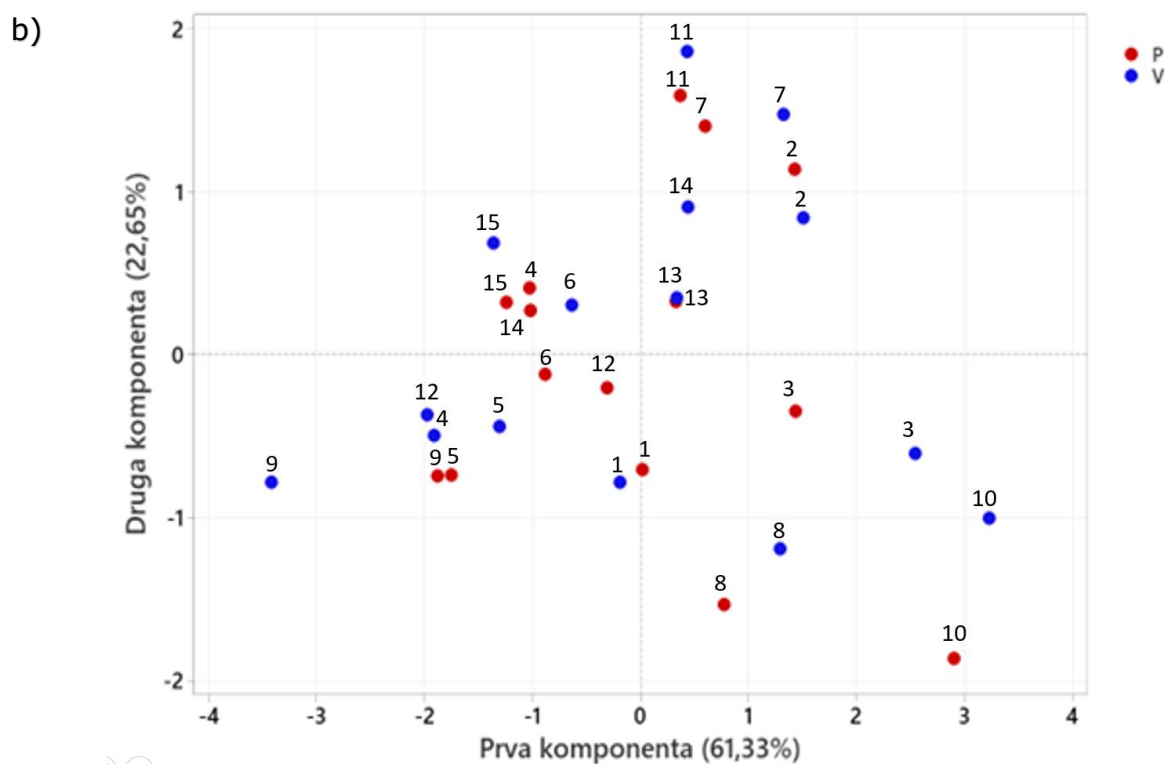
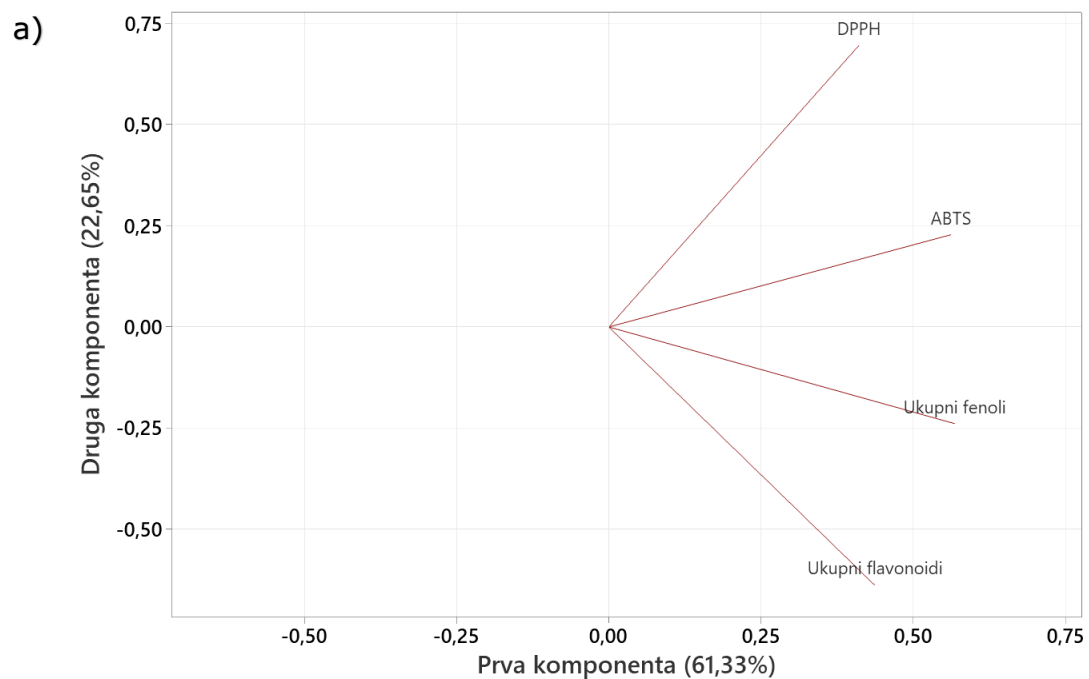
4.5. Statistička obrada podataka dobivenih spektrofotometrijskim analizama i analizama spektrometrije masa

4.5.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

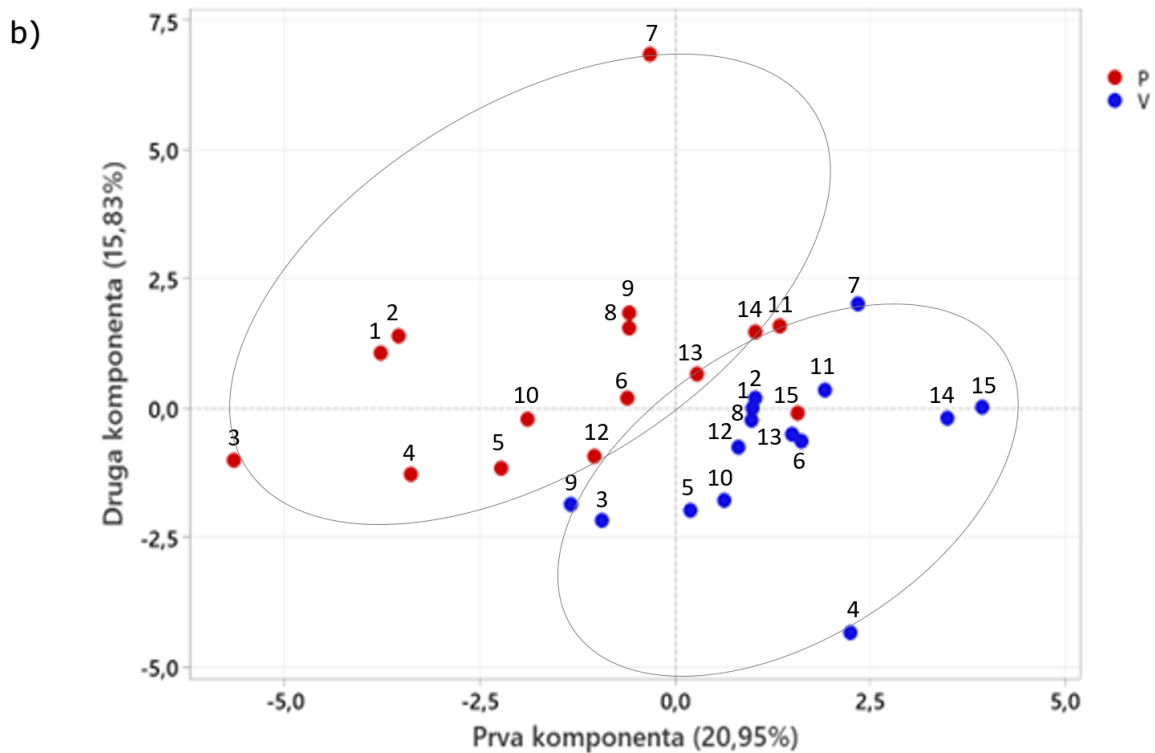
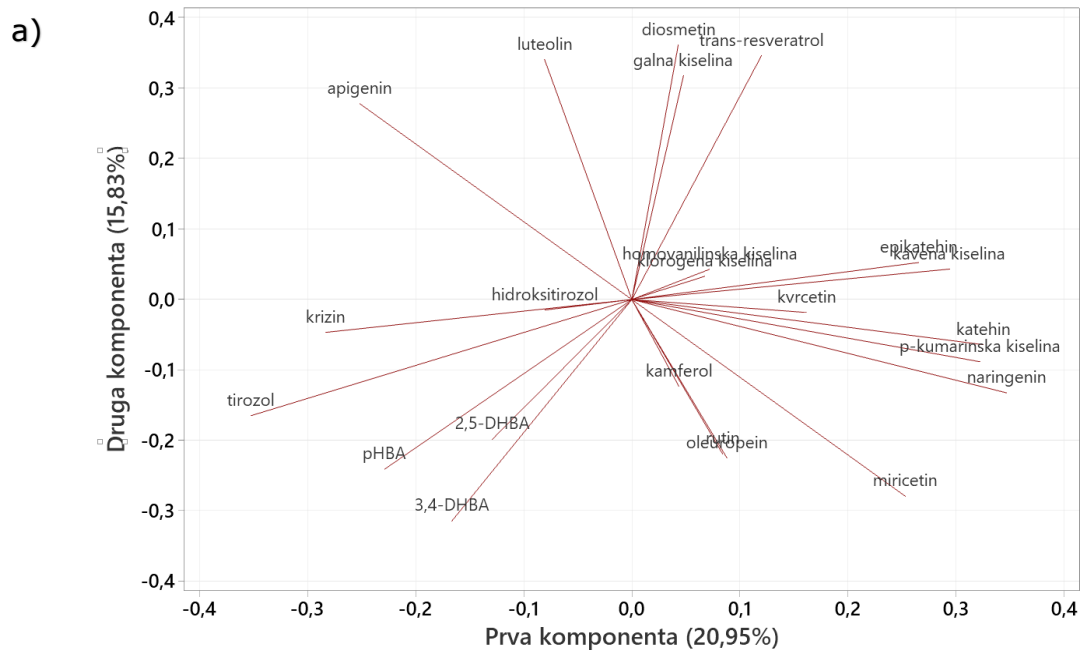
Za analizu razlika između uzoraka vina skladištenih u vrulji i vina skladištenih u podrumu provedeno je PCA grupiranje. Nakon provedenih spektrofotometrijskih analiza, glavne varijable PCA grupiranja bili su pojedinačno provedeni testovi koji uključuju metode određivanja ukupnih fenola i flavonoida te ABTS i DPPH metode. Na Slici 15 prikazana je PCA projekcija analiziranih uzoraka vina te grupiranje istih u prostoru glavnih komponenti. Glavne komponente analize (PC1 i PC2) opisuju 83,98% ukupne varijabilnosti.

Nadalje, nakon LC-QQQ analize uzoraka provedeno je PCA grupiranje gdje su glavne varijable bile fenolne komponente. Slika 16 prikazuje PCA projekciju svih analiziranih uzoraka vina i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponenti. Prve dvije glavne komponente u analizi (PC1 i PC2) opisuju 36,78% ukupne varijabilnosti.

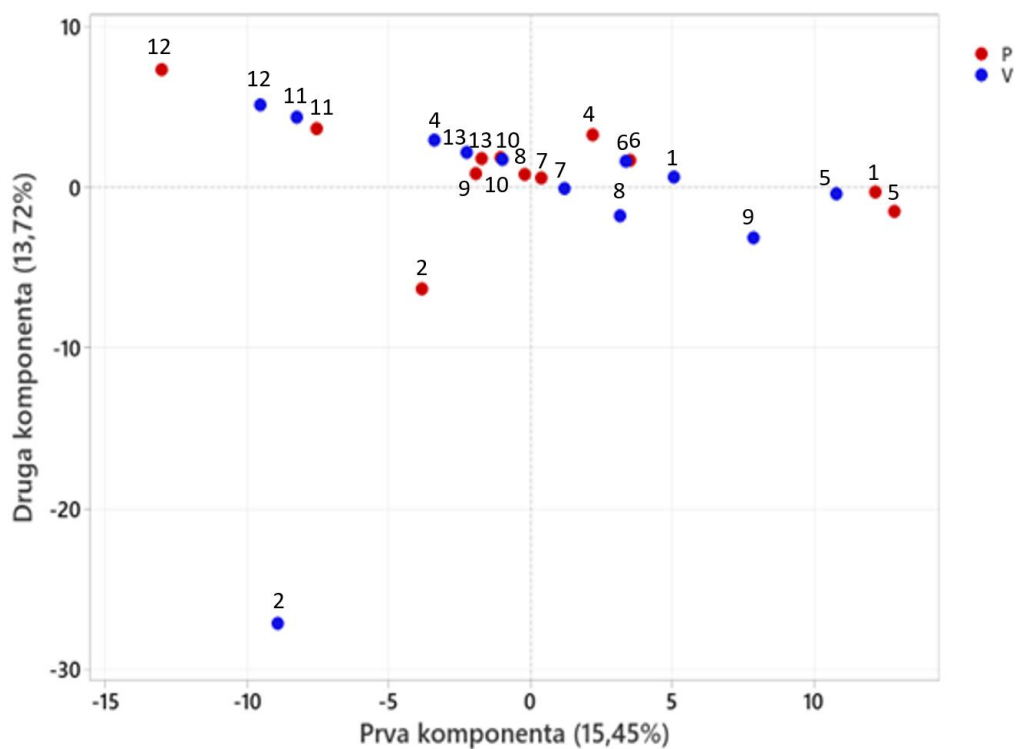
U konačnici, nakon provedene neselektivne kvalitativne MALDI-TOF analize, glavne varijable PCA grupiranja bile su m/z vrijednosti. PCA analiza na ukupnom spektru uzoraka te potencijalno grupiranje istih u prostoru glavnih komponenti prikazana je na Slici 17. Glavne komponente analize (PC1 i PC2) opisuju 29,17% ukupne varijabilnosti za snimanje u načinu pozitivne refleksije.



Slika 15 PCA projekcija spektrofotometrijskih testova i svih analiziranih uzoraka vina: projekcija varijabli (a) i uzoraka vina (b) dozrijevanih u podrumu (crveno) i vrulji (plavo) te grupiranje istih u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2).



Slika 16 PCA projekcija fenolnih komponenti i svih analiziranih uzoraka vina nakon provedene LC-QQQ analize: projekcija varijabli (a) i uzoraka vina (b) dozrijevanih u podrumu (crveno) i vrulji (plavo) te grupiranje istih u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2).



Slika 17 PCA projekcija svih analiziranih uzoraka vina nakon provedene MALDI-TOF analize (snimanje u načinu pozitivne refleksije): projekcija uzoraka vina dozrijevanih u podrumu (crveno) i vrulji (plavo) i grupiranje istih u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2).

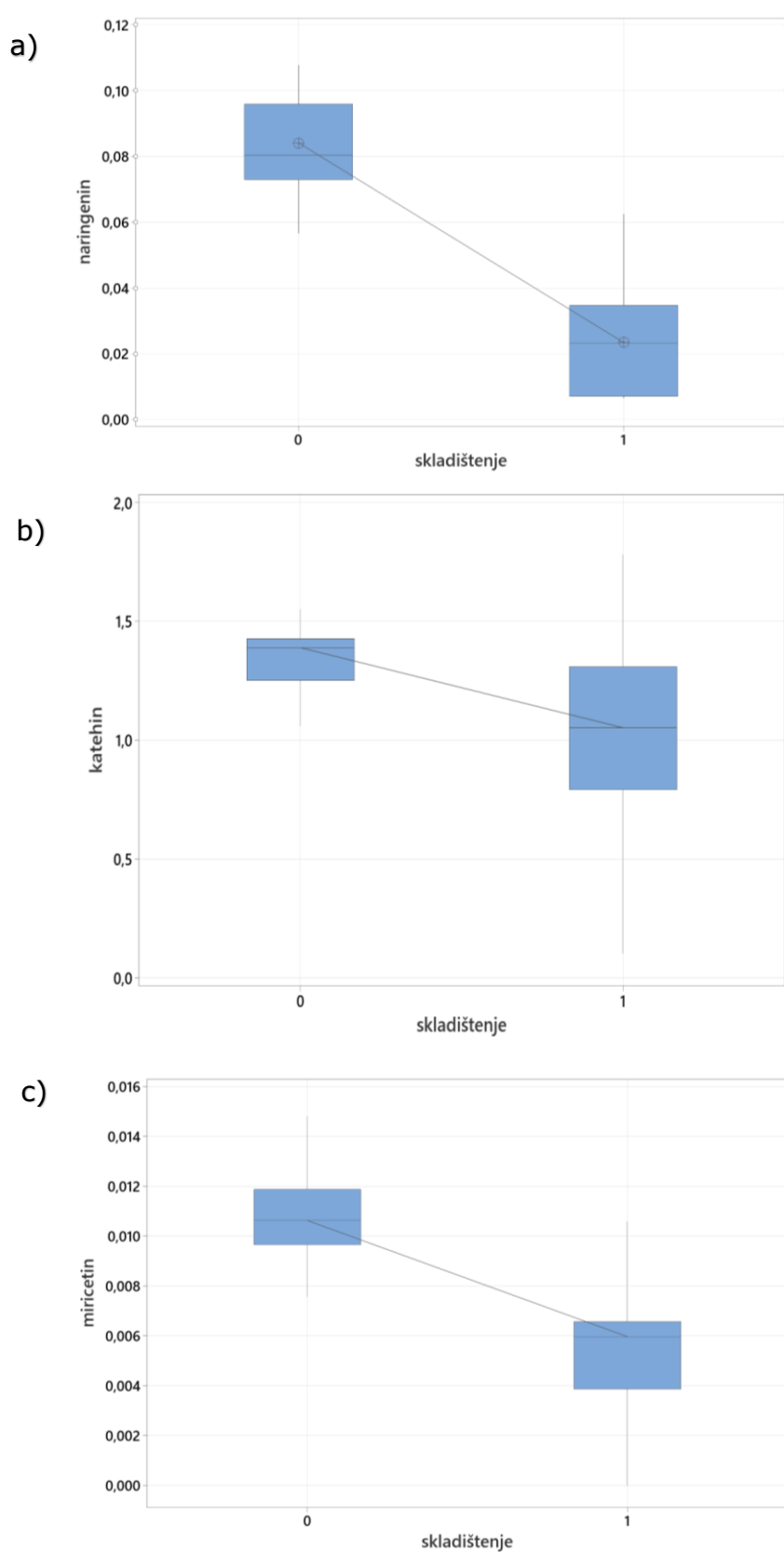
4.5.2. Testiranje značajnosti razlike podataka (t-test za nezavisne uzorke, Mann-Whitney U-test)

Testiranje značajnosti razlike podataka provedeno je na podacima dobivenim spektrofotometrijskim metodama i LC-QQQ analizom. Rezultati analize uzoraka vina iz podruma i vrulje su numerički te međusobno nezavisni. S ciljem odabira testa za provedbu testiranja značajnosti razlike podataka, proveden je Kolmogorov-Smirnov test normalnosti raspodjele podataka. Nakon provedenih spektrofotometrijskih analiza, izmjereni podaci metode određivanja ukupnih fenola te DPPH i ABTS metode su normalno distribuirani te je za iste proveden t-test za nezavisne uzorke. Dobiveni podaci metode određivanja ukupnih flavonoida nisu dobro prilagođeni normalnoj raspodjeli, čemu slijedi provedba Mann-Whitney U-testa. Kriterij statističke značajnosti testa (α) iznosi 0,05 (5%). p-vrijednosti izračunate provedenim testovima veće su od kriterija statističke značajnosti te ne postoji statistički značajna razlika između vina skladištenih u vrulji i onih skladištenih u podrumu unutar provedenih pojedinačnih spektrofotometrijskih metoda. Testovima izračunate p-vrijednosti prikazane su u Tablici S3.

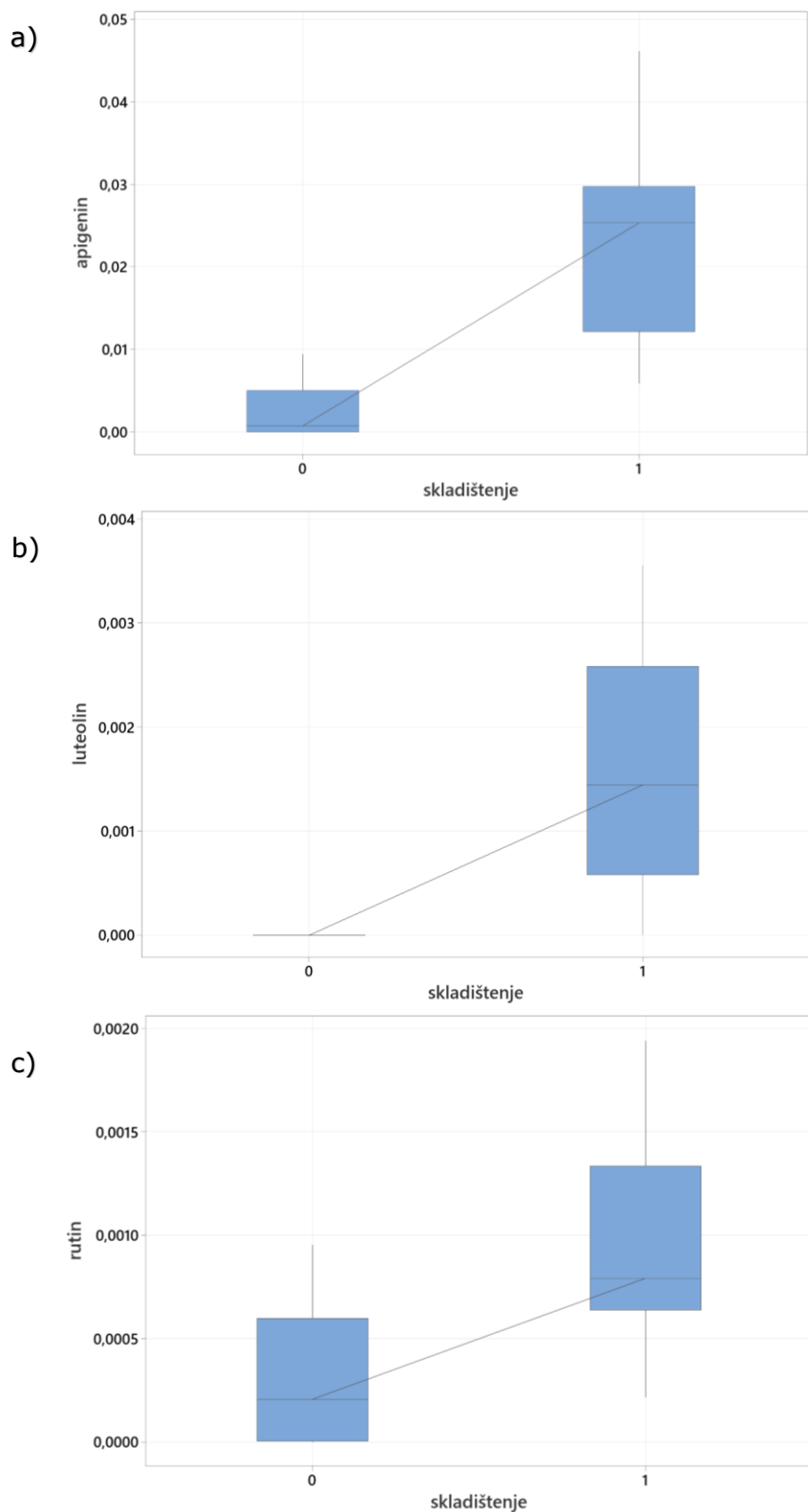
Nadalje, nakon provedene LC-QQQ analize, fenolni spojevi kod kojih su izmjereni podaci dobro prilagođeni normalnoj raspodjeli jesu 2,5-DHBA, 3,4-DHBA, epikatehin, kavena kiselina, galna kiselina, naringenin, *p*-kumarinska kiselina, *p*HBA i tirozol te je za iste proveden t-test za nezavisne uzorke. Fenolni spojevi kod kojih postoji značajno odstupanje od normalne raspodjele jesu katehin, apigenin, klorogena kiselina, krizin, diosmetin, homovanilinska kiselina, hidroksitirozol, kamferol, luteolin, miricetin, oleuropein, kvercetin, rutin, trans-resveratrol te je za iste proveden Mann-Whitney U-test. Testom izmjerene p-vrijednost naringenina, katehina, apigenina, luteolina, miricetina i rutina manje su od kriterija statističke značajnosti te za iste postoji statistički značajna razlika između uzoraka vina skladištenih u vrulji i onih u podrumu. Izmjerene razine naringenina, katehina i miricetina povišene su u uzorcima vina skladištenim u vrulji, dok su razine apigenina, luteolina i rutina povišene u uzorcima skladištenim u podrumu. Na Slici 18 prikazani su kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) naringenina, katehina i miricetina te su isti za

apigenin, luteolin i rutin prikazani na Slici 19 uz vidljive statistički značajne razlike. Nadalje, za ostale analizirane kemijske spojeve p-vrijednost iznosi vrijednost veću od kriterija statistički značajnosti, stoga za iste nije postojana statistički značajna razlika kod dviju nezavisnih skupina uzoraka vina. U Tablici S4 prikazane su izračunate p-vrijednosti fenolnih spojeva.

U konačnici, testiranje značajnosti razlike podataka provedeno je za ukupan zbroj fenolnih komponenti prisutnih u uzorcima. Podaci ukupne razine fenola dobro su prilagođeni normalnoj raspodjeli, stoga su isti testirani t-testom za nezavisne uzorke. p-vrijednost provedenog testa iznosi 0,845 te je kao takva manja od kriterija statističke značajnosti. Sukladno tomu, postojana razlika u ukupnom zbroju fenolnih spojeva nije značajna između uzoraka skladištenih u vrulji i podrumu.



Slika 18 Kutijasti dijagram izmjerene koncentracije naringenina (a), katehina (b) i miricetina (c) u uzorcima vina skladištenih u vrulji (0) i podrumu (1).



Slika 19 Kutijasti dijagram izmjerene koncentracije apigenina (a), luteolina (b) i rutina (c) u uzorcima vina skladištenih u vrulji (0) i podrumu (1).

5. Rasprava

Vino je alkoholno piće čiji se učinak na zdravlje stavlja u centar znanstvenih istraživanja još od rane povijesti. U raznolikom kemijskom sastavu posebno se ističu fenolni spojevi koji su zaslužni za antioksidativna i protuupalna svojstva vina (2). Zahvaljujući spomenutim učincima fenolnih spojeva, vino uživa veliku pažnju kupaca čiji se interes, uz osjećaj zadovoljstva potaknutog aromama i mirisima, sve češće nalazi u zdravstvenim pogodnostima koje ima na organizam. Tijekom proizvodnje i starenja vina odvija se niz kemijskih i enzimskih reakcija koje rezultiraju polimerizacijom i kondenzacijom fenolnih spojeva te samim time utječu na antioksidativni potencijal vina (2,41). Velika konkurencija na tržištu iziskuje inovativne proizvodne procese vina s ciljem optimizacije i isticanja proizvoda. Dozrijevanje butelja vina u morskim vruljama jedinstven je i atraktivan proizvodni proces koji potencijalno donosi promjenu kemijskog sastava vina. Nastavno, takova inovacija rezultira višim cijenama na tržištu čiju je opravdanost potrebno ispitati kemijskim analizama sastava vina te usporedbom istih sa vinima dozrijevanim u podrumu.

S obzirom na prethodno opisanu problematiku, uzorci bijelih vina sorte Malvazija dozrijevani u podrumu i morskoj vrulji analizirani su spektrofotometrijskim metodama i metodama spektrometrije masa te uspoređeni statističkim testovima s ciljem ispitivanja značajnosti razlika analizom dobivenih podataka dviju ispitanih skupina. Ovaj diplomski rad prvi je koji opisuje proces dozrijevanja vina u morskoj vrulji te analizira i uspoređuje uzorke vina iz vrulje i podruma, stoga se rezultati dobiveni provedenim analizama mogu usporediti samo sa uzorcima drugih radova dozrijevanim u podrumu.

Spektrofotometrijskim metodama ispitana je antioksidativna aktivnost te ukupni sadržaj fenola i flavonoida u uzorcima bijelih vina sorte Malvazija. ABTS i DPPH analizama pokazalo se kako većina analiziranih uzoraka vina dozrijevanih u vrulji ima veću izmjerenu antioksidativnu aktivnost od onih dozrijevanih u podrumu. Posebno se ističe uzorak 11V čiji antioksidativni potencijal doseže $0,1321 \pm 0,0143$ mg ekv. troloksa/1L vina izmjeren DPPH metodom te uzorak 10V sa izmjerenih $0,5065 \pm 0,0235$ mg ekv. troloksa/1L

vina ABTS metodom. Ipak, kod obje se metode može primijetiti kako se kod dijela uzoraka vina skladištenih u podrumu ističe veća antioksidativna aktivnost od onih skladištenih u vrulji, čime zaključujemo kako razlika između uzoraka vina dozrijevanih ovim proizvodnim procesima nije postojana u pogledu antioksidativnog potencijala.

ABTS i DPPH metodom pokazalo se kako uzorci bijelih vina sorte Malvazija djeluju antioksidativno te se antioksidativni potencijal razlikuje između različito dozrijevanih uzoraka. S obzirom da su fenolni spojevi nerijetko uzrok antioksidativne aktivnosti vina (42), provedene su metode određivanja ukupnog sadržaja fenola i flavonoida istih. Folin-Ciocalteu metodom analiziran je ukupan sadržaj fenola te se, sukladno ABTS i DPPH metodi, može primijetiti kako je za većinu uzoraka vina dozrijevanih u vrulji analiziran veći sadržaj ukupnih fenola od onih dozrijevanih u podrumu. Suprotno navedenom, ukupan sadržaj flavonoida je u većoj mjeri očitao kod vina dozrijevanih u podrumu nego u vrulji.

Raspon ukupnih fenola vina dozrijevanih u vrulji iznosi 195-366 mg ekv. galne kiseline/1 L vina, dok za vina dozrijevana u podrumu iznosi 223-345 mg ekv. galne kiseline/1 L vina. Usporedno, *Visioli i sur.* (43) su pregledom reprezentativnog seta studija predstavili sadržaj ukupnih fenola u bijelim vinima te se raspon istih (izražen u medijanima minimalne i maksimalne razine prikupljenih rezultata) kreće se između 210 i 402 mg ekv. galne kiseline/1 L vina. Izmjerene vrijednosti ukupnih fenola uzoraka vina dozrijevanih u vrulji nalaze se unutar prosječnog raspona ukupnih fenola u bijelim vinima. Izuzetak je uzorak 9V čija se vrijednost nalazi ispod prosjeka te ista čini donju granicu raspona vina dozrijevanih u vrulji. Nadalje, izmjerene vrijednosti uzoraka vina iz podruma ne odstupaju od prosjeka.

S ciljem analize sličnosti vina dozrijevanih u vrulji i podrumu, uslijedilo je PCA grupiranje uzoraka u prostoru glavnih varijabli, odnosno pojedinačno provedenih spektrofotometrijskih metoda. Na Slici 15 jasno je vidljivo kako su uzorci vina skladišteni u vrulji isprepleteni sa uzorcima iz podruma te da se različito skladišteni uzorci istoga vina nalaze u neposrednoj blizini, na istom

dijelu PCA grafa. Na primjer, na PCA projekciji uzoraka (Slika 15) vidljivo je kako se položaj uzorka 13P (opisan koordinatama $PC1=0,32425$ i $PC2=0,32669$) djelomično preklapa sa položajem uzorka 13V ($PC1=0,33181$; $PC2=0,35138$). S obzirom da se ispitane skupine uzoraka ne grupiraju odvojeno u prostoru glavnih komponenti PCA projekcije, zaključujemo kako razlike iščitane iz rezultata analize jesu postojane, no dodatnim je testovima potrebno utvrditi jesu li razlike značajne.

Uslijedilo je testiranje značajnosti razlike podataka t-testom za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U-testom kojima je utvrđeno da postojane razlike između dviju kategorija ispitanih uzoraka nisu značajne. Postavljene se hipoteze ovoga rada prihvaćaju te se istima potvrđuje kako nema razlike u razini antioksidativnog potencijala i sadržaju ukupnih fenola i flavonoida između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu. Međutim, postojanost razlike između dviju ispitanih skupina uzoraka upućuje na potrebu za složenijim analitičkim metodama kojima je moguće detaljno kvalificirati, kvantificirati i usporediti fenolni sastav ispitanih uzoraka vina.

Shodno tome, uslijedilo je kvalificiranje i kvantificiranje najzastupljenijih fenolnih spojeva u bijelim vinima sorte Malvazija provedeno LC-MS/MS metodom. Kvalitativnom analizom uzoraka ističu se kavena i galna kiselina kao najzastupljeniji fenolni spojevi u ispitanim uzorcima. Na primjer, za uzorak 15V kvantificirano je ukupno 43,2085 mg/L fenolnih spojeva, od kojih galna kiselina iznosi $9,4933 \pm 0,1960$ mg/L te kavena kiselina $22,7950 \pm 1,3481$ mg/L. *Kallithraka i sur.* (44) opisuju provedenu analizu fenolnih spojeva u bijelim vinima različitih sorti kojom su, između ostalog, identificirali sljedeće fenolne spojeve: kavena, *p*-kumarinska i galna kiselina te epikatehin i katehin. Daljnjom su analizom utvrdili kako se sadržaj većine fenola s vremenom skladištenja smanjuje, uz izuzetak kavene i *p*-kumarinske kiseline čija je koncentracija s vremenom porasla. Na početku analize uzoraka vina, izmjerena koncentracija kavene kiseline iznosila je $0,55 \pm 0,05$ mg/L te galne kiseline $1,77 \pm 0,19$ mg/L, dok je nakon 9 mjeseci skladištenja iznosila $1,50 \pm 0,10$ mg/L, odnosno $0,05 \pm 0,20$ mg/L. Izmjerena povišena koncentracija kavene kiseline rada *Kallithraka i sur.* u skladu je sa rezultatom dobivenim

LC-MS/MS analizom, no razina galne kiseline se ne podudara s rezultatima istog. Uzrok navedene razlike vjerojatno se nalazi u analiziranju različitih sorti bijelog vina.

Nadalje, vina dozrijevana u vrulji sadrže veću ukupnu količinu fenolnih komponenti od vina dozrijevanih u podrumu. Međutim, različito skladišteni uzorci istih vina u sastavu sadrže različite razine pojedinačno analiziranih fenolnih spojeva, što upućuje na potrebu za grupiranjem uzoraka pomoću PCA. Glavne varijable bili su fenolni spojevi koji su, zajedno sa uzorcima, grupirani u prostoru glavnih komponenti. PCA grupiranje na Slici 16 jasno prikazuje kako su uzorci vina skladišteni u vrulji grupirani odvojeno od uzoraka skladištenih u podrumu. Na primjer, položaj uzorka 8P opisan koordinatama $PC1=-0,59059$ i $PC2=1,54226$ razlikuje se od položaja uzorka 8V čije su koordinate $PC1=0,97621$ i $PC2=-0,22671$. Takvom se projekcijom analiziranih uzoraka može zaključiti kako postoji razlika u fenolnom sastavu između dviju ispitanih skupina.

Razlika prikazana PCA projekcijom dodatno je analizirana primjenom t-testa za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U-testa s ciljem testiranja statističke značajnosti razlike podataka. Navedenim testovima pokazalo se kako su razlike izmjerenih razina naringenina, katehina, apigenina, luteolina, miricetina i rutina statistički značajne između dviju ispitanih skupina. Istaknuti spojevi pripadaju skupini flavonoidnih spojeva (flavanonima (naringenin), flavonolima (miricetin i rutin), flavanolima (katehin) te flavonima (apigenin i luteolin)). Razine naringenina, katehina i miricetina u većoj su koncentraciji izmjerene kod uzoraka vina dozrijevanih u vrulji, dok su razine apigenina, luteolina i rutina kod istih snižene u odnosu na uzorke vina dozrijevanih u podrumu. Srednja vrijednost naringenina, katehina i miricetina u uzorcima vina dozrijevanim u vrulji iznosi $0,0841 \pm 0,0159$ mg/L, $1,3567 \pm 0,1235$ mg/L te $0,0124 \pm 0,0063$ mg/L, dok srednja vrijednost istih u uzorcima dozrijevanim u podrumu iznosi $0,0235 \pm 0,0164$ mg/L, $1,0430 \pm 0,4359$ mg/L te $0,0053 \pm 0,0027$ mg/L. Sve veći broj epidemioloških studija dokazuju povezanost većeg unosa flavonoida (s naglaskom na flavanole, flavanole i flavone) s nižim rizikom od kardiovaskularnih bolesti i bolesti raka

(23). Kao jednom od najvažnijih prirodnih flavonoida, naringeninu je pripisano mnoštvo bioloških aktivnosti među kojima se ističu antioksidativno, antitumorsko, antivirusno, antibakterijsko, protuupalno i kardioprotektivno djelovanje (45). Katehin je vlastitim molekularnim mehanizmima odgovoran za prevenciju i terapiju kroničnih bolesti, uključujući pritom metaboličke sindrome te kardiovaskularne, neurodegenerativne i maligne bolesti (46). Sukladno, terapijski učinak miricetina ističe se djelovanjem istog na aterosklerozu, trombozu, cerebralnu ishemiju, dijabetes te Alzheimerovu bolest (47). Vodeći se istaknutim dobrobitima naringenina, katehina i miricetina stoga zaključujemo kako povišene razine istih među uzorcima vina dozrijevanim u vrulji potencijalno mogu biti od važnosti te je za iste potrebno provesti dodatne analize. Nadalje, ukoliko testiramo značajnost razlike u razinama ukupne količine fenolnih komponenti između dviju ispitanih skupina, ista nije postojana.

Temeljem rezultata dobivenih LC-MS/MS analizom, postavljene se hipoteze ovoga rada prihvaćaju. Kvalitativan se sadržaj najzastupljenijih fenolnih spojeva ne razlikuje između bijelih vina sorte Malvazija odležanih u vrulji i podrumu, dok se kvantitativan sadržaj istih razlikuje. Uočena razlika statistički je značajna tek za šest od dvadeset i tri ispitana fenolna spoja, dok razlika ukupnog zbroja fenolnih spojeva u uzorcima nije statistički značajna.

U konačnici, provedeno je ukupno profiliranje uzoraka neselektivnom kvalitativnom MALDI-TOF analizom. Rezultati snimanja u načinu pozitivne refleksije provedenom prema radu *Rešetar i sur.* (37) analizirani su grupiranjem pomoću PCA. Uzorci bijelih vina dozrijevani na različite načine grupirani su na istim dijelovima PCA grafa, čime se može zaključiti kako među istima nema varijabilnosti. Fingerprint analizom stoga je utvrđeno kako se ne razlikuje otisak ukupnih molekularnih vrsta među ispitanim uzorcima bijelih vina sorte Malvazija dozrijevanih u vrulji i podrumu. Očekivani ishod MALDI-TOF analize, kao i LC-MS/MS analize, jest ostvaren te je istim potvrđeno da različitim tehnologijama dozrijevanja istih uzoraka vina ne dolazi do kvalitativne, već kvantitativne promjene u fenolnom sastavu.

Temeljem rezultata dobivenih spektrofotometrijskim analizama i analizama spektrometrije masa, zaključak ovoga rada jest kako ne postoji razlika između uzoraka bijelih vina sorte Malvazija proizvedenih različitim proizvodnim procesa, odnosno identificirane razlike nisu statistički značajne. Također se zaključuje kako visoke tržišne cijene butelja vina dozrijevanih u vrulji ne mogu biti opravdane promjenom kemijskog sastava istih, već se isključivo mogu opravdati atraktivnim izgledom butelja koje su obogaćene morskom florom i kao takve prenose priču morskoga okruženja u kojemu su boravile.

Morske vrulje su inovativan tehnološki proces proizvodnje vina kojima je moguće očuvati kvalitetu istih uz minimalnu promjenu kemijskog sastava. Za šest od dvadeset i tri fenolna spoja postojana je statistički značajna razlika između vina dozrijevanih u vrulji i podrumu te je ista poticajna za optimizaciju novoga proizvodnog procesa vina. Razlike u izmjeranim razinama ostalih fenolnih komponenti te zbroj istih nisu statistički značajne među različito skladištenim uzorcima. Nadalje, s obzirom da su uzorci odležani u vruljama u periodu od godinu dana pokazali postojanost razlike u kvantitativnom sastavu fenolnih komponenti (posebice flavonoidnih spojeva), pretpostavljamo da bi dulji period skladištenja pokazao veću i potencijalno značajniju razliku u količini istih. Također, kavezi polegnuti u morskim vruljama sadrže i butelje crnih vina koja uživaju veći udio fenolnih komponenti u kemijskom sastavu od bijelih vina. Svi procesi proizvodnje crnih vina provode se sa netaknutom kožicom grožđa, što posljedično omogućuje oslobađanje tanina i fenolnih spojeva antocijana odgovornih za crvenu boju i antioksidativni potencijal vina. Zahvaljujući navedenom, crna vina sadrže više fenolnih spojeva od bijelih vina (43). Stoga se pretpostavlja kako bi se primjena provedenih analitičkih metoda ovoga rada na crnim vinima razlikovala od rezultata dobivenih na bijelim vinima te bi iste pokazale veću razliku u količini fenolnih spojeva između uzoraka crnih vina dozrijevanih u vrulji i podrumu.

6. Zaključak

Dozrijevanje vina u morskim vruljama inovativan je tehnološki proces proizvodnje vina kojim butelje vina zaprimaju upečatljiv izgled obogaćen morskim algama te kao takve nerijetko dosežu visoke cijene na tržištu. Spektrofotometrijskim metodama pokazalo se kako se antioksidativni potencijal te razina ukupnih fenola i flavonoida značajno ne razlikuju između uzoraka bijelih vina sorte Malvazija dozrijevanih u vrulji i podrumu. Nadalje, rezultati dobiveni LC-MS/MS analizom pokazali su statistički značajnu razliku u razinama šest flavonoidnih spojeva između dviju ispitanih skupina uzoraka. U uzorcima vina skladištenim u vrulji izmjerene su povišene razine naringenina, katehina i miricetina, dok su razine apigenina, luteolina i rutina povišene u uzorcima skladištenim u podrumu. Ukupan zbroj fenolnih spojeva značajno se ne razlikuje između uzoraka vina dozrijevanih u vrulji i podrumu. Stoga, temeljem rezultata dobivenih spektrofotometrijskim analizama i analizama spektrometrije masa, zaključak ovoga rada jest kako ne postoji razlika između uzoraka bijelih vina sorte Malvazija proizvedenih različitim proizvodnim procesa, odnosno identificirane razlike nisu statistički značajne. Usprkos nedostatku značajne razlike u kemijskom sastavu, kvantitativna razlika je postojana i kao takva poticajna za primjenu novih analitičkih metoda na uzorcima te za optimizaciju navedenog proizvodnog procesa.

S obzirom da je ovaj diplomski rad prvi koji opisuje proces dozrijevanja vina u morskoj vrulji te analizira i uspoređuje uzorke vina iz vrulje i podruma, budućim je istraživačkim radovima otvoren put za daljnje analize i usporedbe istih. Vino kao alkoholno piće donosi brojna zadovoljstva okusa i mirisa konzumentima istog i kao takvo utječe na zdravlje vlastitim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. Shodno tome, u budućnosti je važno ulagati u jedinstvene proizvodne procese vina te provoditi analize istih s ciljem optimizacije i unapređivanja vinske tradicije koja uživa veliku pažnju te je od iznimne važnosti za različite kulture svijeta.

7. Literatura

1. Haseeb S, Alexander B, Santi RL, Liprandi AS, Baranchuk A. What's in wine? A clinician's perspective. Trends Cardiovasc Med [Internet]. 2019;29(2):97–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.06.010>
2. Barbalho SM, Bueno Ottoboni AMM, Fiorini AMR, Guiguer ÉL, Nicolau CCT, Goulart R de A, i sur,. Grape juice or wine: which is the best option? Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(22):3876–89.
3. Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SE, Walker MA, Lapsley JT. The economics of wine production. Nature2. 2002;418(August):696–9.
4. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. J Clin Lab Anal. 1997;11:287–313.
5. Sorte - vinacroatia.hr [Internet]. [cited 2022 Mar 31]. Available from: <https://vinacroatia.hr/hrvatska-vina/sorte/>
6. Pianet I. A toast to wine analysis. Anal Bioanal Chem. 2011;401(5):1461.
7. Eliodório KP, Cunha GC de G e., Müller C, Lucaroni AC, Giudici R, Walker GM, i sur. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. Adv Appl Microbiol. 2019 Jan 1;109:61–119.
8. Baša Česnik H, Velikonja Bolta Š, Bavčar D, Radeka S, Lisjak K. Plant protection product residues in white grapes and wines of "Malvasia Istriana" produced in Istria. Food Addit Contam Part B Surveill. 2016;9(4):256–60.
9. Malvazija istarska - vinacroatia.hr [Internet]. [cited 2022 Mar 31]. Available from: <https://vinacroatia.hr/hrvatska-vina/sorte/malvazija-istarska/>
10. Echave J, Barral M, Fraga-Corral M, Prieto MA, Simal-Gandara J, Del Alamo-Sanza M, i sur. molecules Bottle Aging and Storage of Wines: A

Review. 2021 [cited 2022 Mar 31]; Available from:
<https://doi.org/10.3390/molecules26030713>

11. Cassino C, Tsolakis C, Bonello F, Gianotti V, Osella D. Wine evolution during bottle aging, studied by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Res Int* [Internet]. 2019;116:566–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.075>
12. Tarasov A, Garzelli F, Schuessler C, Fritsch S, Loisel C, Pons A, i sur. molecules Wine Storage at Cellar vs. Room Conditions: Changes in the Aroma Composition of Riesling Wine. 2021 [cited 2022 Mar 31]; Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules26206256>
13. Obrade R. Naručitelj: ŽUPANIJSKA LUČKA UPRAVA OPATIJA-LOVRAN-MOŠČENIČKA DRAGA DOGRADNJA LUKE IKA ELABORAT ZA OCJENU O POTREBI PROCJENE UTJECAJA ZAHVATA NA OKOLIŠ.
14. Vrulje - izvori slatke vode u moru - Priroda Hrvatske [Internet]. [cited 2022 Apr 1]. Available from: <https://priodahrvatske.com/vrulje/>
15. Kraški fenomeni Vrulje & potok Banina - Webcams Opatija [Internet]. [cited 2022 Apr 1]. Available from: <https://webcamsopatija.com/kraski-fenomeni-vrulje-potok-banina/>
16. Vino i vruja, Ika - Opatija - Potopljena vina Iločkih podrumaIločki podrumi [Internet]. [cited 2022 Apr 1]. Available from: <https://www.ilocki-podrumi.hr/vino-vruja-ilocki-podrumi/>
17. ENOteca.hr | FUHTAR Malvazija Vruja [Internet]. [cited 2022 Apr 1]. Available from: https://www.enoteca.hr/vina/fuhtar/malvazija_vruja
18. Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SE, Walker MA, Lapsley JT. The present and future of the international wine industry. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):696–9.
19. Haseeb S, Alexander B, Baranchuk A. Wine and Cardiovascular Health. *Circulation*. 2017 Oct 10;136(15):1434–48.
20. Ditano-Vázquez P, David Torres-Peña J, Galeano-Valle F, Pérez-Caballero

AI, Demelo-Rodríguez P, Lopez-Miranda J, i sur. The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. 2019; Available from: www.mdpi.com/journal/nutrients

21. Latruffe N, Rifler J-P. Special Issue: Wine and Vine Components and Health. Diseases [Internet]. 2019;7:30. Available from: www.mdpi.com/journal/diseases
22. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*. 2021 Jan 1;13(1):1–30.
23. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*. 2010 Aug;69(3):273–8.
24. Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, De Freitas V, Santos-Buelga C, i sur. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Mol* 2017, Vol 22, Page 292 [Internet]. 2017 Feb 14 [cited 2022 May 12];22(2):292. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/292/htm>
25. Lim KS, Park J-K, Jeong MH, Bae IH, Park DS, Shim JW, i sur. Anti-Inflammatory Effect of Gallic Acid-Eluting Stent in a Porcine Coronary Restenosis Model.
26. Mirzaei S, Gholami MH, Zabolian A, Saleki H, Farahani MV, Hamzehlou S, i sur. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer. *Pharmacol Res*. 2021 Sep 1;171:105759.
27. Sinha N, Dabla P. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr Hypertens Rev* [Internet]. 2015 Aug 5 [cited 2022 May 16];11(2):132–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26022210/>
28. Irvibulkovit KS, Ouanthavong SN, Ameenoi YS. Sirivibulkovit K i sur.

2018. Anal Siences. 2018;34(July):795–800.

29. Boban M, Modun D. Uric Acid and Antioxidant Effects of Wine. [cited 2022 May 17]; Available from: www.cmj.hr
30. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clin Chim Acta. 2011 Feb 20;412(5–6):410–24.
31. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS, Catanante G, Marty JL. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. J Braz Chem Soc [Internet]. 2019 Apr 8 [cited 2022 May 18];30(5):1108–14. Available from: <http://www.scielo.br/j/jbchs/a/7LdScHNVBDpSBVNJQs8wPyL/?lang=en>
32. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. [cited 2022 May 19]; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
33. Stämpfli R, Brühwiler P, Mourad S, Verdejo R, Shaffer M. Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. EMPA Act. 2007;26(2007):51.
34. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2021 Nov 26]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0963996916300886?token=1D490838FE04A90D91489C2F62A15BF32AA5853BD07F542202D3C0C429BE694DE9F31A4D49C9B34ECC070DC726F18110&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211126150221>
35. Matić P, Sabljčić M, Jakobek L. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. J AOAC Int [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 May 20];100(6):1795–803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28730980/>
36. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass

spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007 Oct;115(9):559–70.

37. Rešetar D, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G, Katalinić JP, Kraljević Pavelić S. Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry linear time-of-flight method for white wine fingerprinting and classification. *Food Control*. 2016 Jun 1;64:157–64.
38. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M. Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Curr Anal Chem*. 2009;5:293–302.
39. Saftić L, Peršurić Ž, Fornal E, Pavlešić T, Pavelić SK. PT. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.061>
40. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH).
41. Aleixandre-Tudo JL, Buica A, Nieuwoudt H, Aleixandre JL, Du Toit W. Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *J Agric Food Chem*. 2017 May 24;65(20):4009–26.
42. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem*. 2007;105(1):204–14.
43. Visioli F, Panaite S-A, Tomé-Carneiro J. Wine's Phenolic Compounds and Health: A Pythagorean View. [cited 2022 Jun 17]; Available from: www.mdpi.com/journal/molecules
44. Kallithraka S, Salacha MI, Tzourou I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem*. 2009 Mar 15;113(2):500–5.
45. Salehi B, Valere P, Fokou T, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, i sur. The

Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. 2019
[cited 2022 Jun 25]; Available from:
www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals

46. Shirakami Y, Sakai H, Kochi T, Seishima M, Shimizu M. Catechins and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;929:67–90.
47. Song X, Tan L, Wang M, Ren C, Guo C, Yang B, i sur. Myricetin: A review of the most recent research. *Biomed Pharmacother.* 2021 Feb 1;134.

8. Privitci

Tablica S1 Način proizvodnje uzoraka vina dozrijevanih u vrulji i podrumu u periodu od 2019. do 2020. godine.

Oznaka (vrulja)*	Oznaka (podrum)*	Sorta vina	Godina berbe	Standardna fermentacija ili maceracija	Sur Lie**	Kvasac	Bistrenje bentonitom ***	Alkohol (vol.%)****	kategorija vina	Napomena
1V	1P	Malvazija	2018.	maceracija 20 sati, iza klasična fermentacija	6 mjeseci	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	12,5	vrhunsko vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
2V	2P	Malvazija	2018.	klasična fermentacija	/	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	12,5	/	pločasta filtracija pred punjenje u boce
3V	3P	Malvazija	2018.	hladna maceracija 3-4 dana, iza klasična fermentacija	/	autohtoni kvasci	Ne	12,5	/	bez filtracije
4V	4P	Malvazija	2018.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	/	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> i <i>Saccharomyces uvarum</i>	Da	13,0	vrhunsko vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
5V	5P	Malvazija	2018.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	2 mjeseca	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	13,0	kvalitetno vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
6V	6P	Malvazija	2018.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	2 mjeseca	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	12,5	kvalitetno vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
7V	7P	Malvazija	2017.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	/	/	Da	13,0	vrhunsko vino	pločasta filtracija + mikrofilter pred punjenje
8V	8P	Malvazija	2016.	hladna maceracija 3-4 dana, iza klasična fermentacija	7-8 mjeseci	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	13,0	vrhunsko vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce

* Vina iste sorte, godine berbe i vremena skladištenja različito su skladištena (u vrulji i podrumu).

** Sur Lie jest načina starenja vina u kojemu se vino drži u kontaktu sa vlastitim talogom preostalim od procesa fermentacije.

*** Bistrenje bentonitom jest postupak smanjenja mutnoće vina pomoću natrijeva bentonita.

**** Metoda određivanja alkohola jest FTIR prema OIV 390/2010.

Tablica S2 Način proizvodnje uzoraka vina dozrijevanih u vrulji i podrumu u periodu od 2020. do 2021. godine.

Oznaka (vrulja)*	Oznaka (podrum)*	Sorta vina	Godina berbe	Standardna fermentacija ili maceracija	Sur Lie **	Kvasac	Bistrenje bentonitom ***	Alkohol (vol.%)****	kategorija vina	Napomena
9V	9P	Malvazija	2019.	maceracija 24-36 sati, iza klasična fermentacija	/	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	13,0	kvalitetno vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
10V	10P	Malvazija	2016.	maceracija 9 dana, otočena, kraj fermentacije u drvu	10 mjeseci	autohtoni kvasci i <i>Saccharomyces bayanus</i>	Ne	16,0	kvalitetno vino	punjeno bez filtracije
11V	11P	Malvazija	2019.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	/	/	Da	13,0	vrhunsko vino	pločasta filtracija + mikrofilter pred punjenje
12V	12P	Malvazija	2019.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	/	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	13,0	vrhunsko vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
13V	13P	Malvazija	2019.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	2 mjeseca	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	13,0	kvalitetno vino	pločasta filtracija pred punjenje u boce
14V	14P	Malvazija	2019.	maceracija 2 sata, iza klasična fermentacija	3 mjeseca	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da	12,0	/	pločasta filtracija pred punjenje u boce
15V	15P	Cuvee	2019.	maceracija 24 sata, iza klasična fermentacija	kupaža Malvazija i Žlahtina 50:50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> i <i>Saccharomyces bayanus</i>	Da	12,5	/	pločasta filtracija pred punjenje u boce

* Vina iste sorte, godine berbe i vremena skladištenja različito su skladištena (u vrulji i podrumu).

** Sur Lie jest načina starenja vina u kojemu se vino drži u kontaktu sa vlastitim talogom preostalim od procesa fermentacije.

*** Bistrenje bentonitom jest postupak smanjenja mutnoće vina pomoću natrijeva bentonita.

**** Metoda određivanja alkohola jest FTIR prema OIV 390/2010.

Tablica S3 p-vrijednosti provedenih spektrofotometrijskih metoda izračunate t-testom za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U-testom.

Naziv fenola	p-vrijednost
Ukupni fenoli	0,845
Ukupni flavonoidi	0,468
ABTS	0,861
DPPH	0,922

Tablica S4 p-vrijednosti fenolnih spojeva izračunate t-testom za nezavisne uzorke i Mann-Whitney U-testom.

Naziv fenola	p-vrijednost
2,4-DHBA	0,431
3,4-DHBA	0,972
apigenin	0,000
diosmetin	0,362
epikatehin	0,240
galna kiselina	0,573
hidroksitirosol	0,320
homovanilinska kiselina	0,655
kamferol	0,644
katehin	0,014
kavena kiselina	0,512
klorogena kiselina	0,655
krizin	0,125
luteolin	0,000
miricetin	0,000
naringenin	0,000
oleuropein	0,921
p-kumarinska kiselina	0,083
pHBA	0,577
rutin	0,001
tirosol	0,051
trans-resveratrol	0,619
Ukupni fenoli	0,849

9. Životopis

Eva Ožbolt

Cvjetna 10, 51000 Rijeka (Croatia)

(+385) 91 3784477

Eva.ozbolt@live.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Magistra biotehnologije u medicini

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [10/2020 – Trenutačno]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [10/2017 – 09/2020]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

Učenica

*Salezijanska klasična gimnazija s pravom javnosti, opći smjer za sportaše
[09/2013 – 06/2017]*

Adresa: Vukovarska ulica 62, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

Izrada diplomskog rada

*Laboratorij za visokoprotodne analize, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište
u Rijeci [10/2021 – 12/2021]*

Tema: Spektrofotometrijske metode i metode spektrometrije masa u
određivanju razlika između dva proizvodna procesa vina

Mentor: dr. sc. Christian Reynolds

Stručna praksa

JADRAN GALENSKI LABORATORIJ d.d. (JGL d.d.) [07/2019 – 09/2019]

Adresa: Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Ostali jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
njemački	B2	B1	B1	B1	B1

*Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike*

DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Microsoft PowerPoint, Microsoft Word, Microsoft Excel)

Internet (Internet, Društvene mreže (različite platforme), Informacije i komunikacija (pretraživanje interneta))

Ostalo (Timski rad, Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer), Windows, Rad na računalu)