

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Milica M. Sredojević

**HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
GROŽĐA I SORTNIH VINA IZ
RAZLIČITIH VINOGRJA U SRBIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Milica M. Sredojević

**CHEMICAL CHARACTERIZATION OF
GRAPE AND MONOVARIETAL WINE
FROM DIFFERENT VINEYARD IN
SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor:

dr **Maja Natić**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr **Živoslav Tešić**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Slavica Todić**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr **Dragana Dabić Zagorac**, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Inovacioni centar
Hemijskog fakulteta

Datum odbrane:

U Beogradu, _____2018.

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Maje Natić, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta u Beogradu.

Prvenstveno, izuzetnu i najveću zahvalnost, dugujem mentorki, dr Maji Natić, na pruženoj prilici, strpljenju, poverenju i razumevanju, na svestranoj pomoći i podršci u svim fazama izrade doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Živoslavu Tešiću i dr Slavici Todić na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske teze.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Dragani Dabić Zagorac na pomoći, savetima i aktivnom učešću u svakoj fazi izrade ove disertacije.

Veliko hvala dragim kolegama i prijateljima sa Katedre za analitičku hemiju koji su bili uz mene sve ovo vreme. Zahvaljujem im na nesebičnoj podršci i pomoći, lepoj saradnji i divnom druženju tokom svih ovih godina.

Najzad, beskrajnu zahvalnost dugujem mojim najmilijim, tati Miodragu, mami Radenki, bratu Milošu i mom Đorđu. Hvala na bezuslovnoj podršci, razumevanju i ljubavi!

Hemijska karakterizacija grožđa i sortnih vina iz različitih vinogorja u Srbiji

Hemijska karakterizacija različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera* L.) iz različitih vinogorja u Srbiji predstavlja osnovni cilj ove disertacije. Istraživanjem je obuhvaćeno 29 sorti, u kojima je određen polifenolni profil, antioksidativni potencijal, kao i elementalni sastav.

Polifenolni profil internacionalnih i autohtonih sorti vinove loze utvrđen je u celim bobicama u različitim fazama sazrevanja, ali i u pojedinačnim delovima, u pokožici, semenkama i mezokarpu. Pored ovih ispitivanja, istraživanje je obuhvatilo mlada sortna crvena i bela vina dobijena u postupku mikrovinifikacije, kao i hemijsku karakterizaciju listova vinove loze.

U cilju poređenja polifenolnog profila ispitanih sorti vinove loze, određen je sastav pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj ukupnih antocijana, kao i antioksidativna aktivnost. Za određivanje antioksidativne aktivnosti, sadržaja ukupnih polifenola i ukupnih antocijana, upotrebljene su spektrofotometrijske metode, dok je za kvantifikaciju pojedinačnih polifenolnih jedinjenja primenjena tečna hromatografija sa masenom detekcijom (*UHPLC-DAD MS/MS*). Kvantifikacija je izvršena na osnovu dostupnih standarda i određen je sadržaj ukupno 35 različitih polifenola, a prisustvo određenih polifenolnih jedinjenja po prvi put je zabeleženo u sortama vinove loze *V. Vinifera*. Tankoslojna hromatografija primenjena je za određivanje „otiska prsta“ flavanola semenki, pokožice i mezokarpa različitih autohtonih sorti i odgovarajućih sortnih vina. Identifikacija antocijana prisutnih u pokožici crnih sorti i crvenom vinu, postignuta je primenom ultra-efikasne tečne hromatografije sa masenim detektorom visoke rezolucije (*UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*). U ispitivanim uzorcima grožđa i vina identifikovano je ukupno 20 derivata malvidina, delfinidina, petunidina, cijanidina i peonidina.

Elementalni sastav grožđa, vina i lišća određen je primenom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (*ICP-OES*). Kvantifikovano je ukupno 22 elementa, uključujući i toksične elemente, kao potencijalne pokazatelje zagađenja životne sredine.

Pirsonovi korelacioni koeficijenti upotrebljeni su za konstrukciju korelacionih matriksa i definisanje mogućih interakcija između polifenola, elemenata i antioksidativne aktivnosti.

Konačno, statističkom obradom dobijenih rezultata i primenom analize glavnih komponenata definisani su najznačajniji parametri odgovorni za klasifikaciju uzoraka grožđa, lišća i vina prema geografskom poreklu i sortnim specifičnostima. Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazali su mogućnost grupisanja sorti vinove loze iz različitih krajeva Srbije, ali i mogućnost razdvajanja na osnovu sortnih specifičnosti.

Ključne reči: grožđe, mlada sortna vina, lišće, geografsko poreklo, sortna specifičnost, polifenolni profil, antocijani, flavan-3-oli, elementalni profil, antioksidativna aktivnost, LC/MS, PCA, ICP-OES, TLC.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Chemical characterization of grape and monovarietal wine from different vineyard in Serbia

The aim of this study was to define chemical composition of diverse *Vitis vinifera* L. grapevine species from different vineyards located in Serbia. Phenolics content, radical scavenging activity and elemental composition of 29 grapevine varieties was determined using different analytical techniques.

Phenolic profile of selected international and diverse autochthonous grapevine varieties was assessed, with respect to whole grape berries at different ripening stages, as well different parts of berries, skin, seed and pulp. Research also included young monovarietal white and red wines obtained in the microvinification process. Grapevine leaves were also investigated.

In order to compare the phenolic profile of investigated grape varieties, total phenolic content (TPC), total anthocyanin content (TAC), radical-scavenging activity (RSA), and the content of individual polyphenols were determined. TPC, RSA and TAC results were obtained using standard spectrophotometric methods, while quantification of the polyphenols was done using ultra-high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and a triple-quadrupole mass spectrometer (UHPLC-DAD MS/MS). A total of 35 phenolic compounds were detected using available standards, and the presence of some of them for the first time was reported in *V. vinifera* species. Thin layer chromatography (TLC) was used to establish flavanols fingerprints of diverse autochthonous grape varieties and corresponding wines. Characterization of anthocyanins in the berry skins and wines obtained from red grape varieties was achieved by UHPLC coupled with Linear Trap Quadrupole and OrbiTrap mass analyzer, and revealed a total of twenty derivatives of malvidin, delphinidin, petunidin, cyanidin, and peonidin.

Composition of 22 elements in grapevine varieties and wines was established by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), including toxic elements as potential markers of environmental pollution.

Pearson's correlation coefficient was used to produce correlation matrixes and to establish possible interactions among determined chemical traits, ie. quantified polyphenols and elements, and radical scavenging activity.

Finally, multivariate statistical procedure, Principal Component Analysis (PCA), was used to explore relations of grapevine origin and its chemical composition. Results obtained in this thesis indicated clustering of grapevine varieties belonging to different Serbian regions, but also discrimination based on varietal origin was achieved.

Keywords: grape, young monovarietal wines, leaves, geographical origin, varietal origin, phenolic profile, anthocyanins, flavan-3-ols, minerals, antioxidant activity, LC/MS, PCA, ICP-OES, TLC.

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Vinova loza	3
2.2. Polifenoli u grožđu, lišću i vinu	6
2.3. Potencijalna biološka aktivnost polifenolnih jedinjenja karakterističnih za <i>V. vinifera L.</i>	16
2.4. Ekstrakcija i izolovanje polifenolnih jedinjenja	18
2.5. Metode za karakterizaciju polifenolnih jedinjenja	19
2.5.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih antocijana i antioksidativnog potencijala ...	20
2.5.2. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja	23
2.6. Elementalna analiza grožđa, lišća i vina	27
2.7. Različiti pristupi procene autentičnosti proizvoda biljnog porekla	30
3. EKSPERIMENTALNI DEO	34
3.1. Hemikalije, reagensi i standardi	34
3.2. Uzorci grožđa, lišća i vina	35
3.3. Proces mikroviniifikacije	36
3.4. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz grožđa i lišća vinove loze	37
3.5. Frakcionisanje ekstrakta (čvrsto-tečna ekstrakcija)	37
3.6. Spektrofotometrijska ispitivanja grožđa, lišća i vina	38
3.6.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	38
3.6.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti	39
3.6.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana	40
3.7. Analiza grožđa, lišća i vina primenom masene spektrometrije	40
3.7.1. Kvantifikacija polifenolnih jedinjenja primenom UHPLC-DAD MS/MS	40
3.7.2. Identifikacija antocijana primenom UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS	41
3.8. Ispitivanje profila flavan-3-ola primenom TLC	42
3.9. Elementalna analiza grožđa, lišća i vina primenom ICP-OES	44
3.10. Statistička obrada rezultata	44

4. NAŠI RADOVI	46
4.1. <i>Hemijska karakterizacija grožđa i mladih sortnih vina</i>	47
4.1.1. <i>Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost semenki, pokožice i mezokarpa</i>	47
4.1.2. <i>Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina</i>	50
4.1.3. <i>Polifenolni profil semenki, pokožice i mezokarpa</i>	52
4.1.4. <i>Polifenolni profil vina</i>	60
4.1.5. <i>Rezultati analize glavnih komponenata</i>	65
4.1.6. <i>Profil antocijana grožđa i vina</i>	68
4.1.7. <i>Elementalni sastav grožđa i vina</i>	74
4.2. <i>Uticaj različitih faza razvoja grožđa klonova sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' na polifenolni profil</i>	78
4.2.1. <i>Sadržaj ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost grožđa</i>	79
4.2.2. <i>Sadržaj ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost vina</i>	82
4.2.3. <i>Polifenolna jedinjenja u grožđu</i>	83
4.2.4. <i>Polifenolna jedinjenja u vinu</i>	87
4.2.5. <i>Korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih jedinjenja</i>	89
4.2.6. <i>Rezultati analize glavnih komponenata</i>	90
4.3. <i>Polifenolni profil, antioksidativna aktivnost i elementalni sastav lišća različitih sorti vinove loze</i>	92
4.3.1. <i>Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost lišća</i>	92
4.3.2. <i>Polifenolni profil lišća</i>	95
4.3.3. <i>Elementalna analiza lišća</i>	100
4.3.4. <i>Rezultati analize glavnih komponenata</i>	106
4.4. <i>Elementalni sastav grožđa u proceni geografskog porekla</i>	108
4.5. <i>Hemijska karakterizacija autohtonih sorti</i>	111
5. ZAKLJUČAK	118
6. LITERATURA	121
7. BIOGRAFIJA	148

1. UVOD

U proteklih nekoliko decenija raste broj istraživanja u oblasti hemije hrane, a naročito hrane biljnog porekla. Publikovana su brojna istraživanja koja za cilj imaju ispitivanje hemijskog sastava vinove loze. Identifikacijom i kvantifikacijom jedinjenja prisutnih u različitim delovima vinove loze i u vinu, može se doći do višestruko korisnih informacija o sortnim karakteristikama i geografskom poreklu, kao i za unapređenje tehnologije gajenja vinove loze i proizvodnje vina.

U vinogradima sa područja Srbije dominiraju internacionalne sorte vinove loze od kojih se proizvode kvalitetna, u svetu prepoznatljiva vina. Budući da taksonomski srodne biljne vrste sintetišu slična polifenolna jedinjenja, smatra se da je poznavanje hemijskog sastava grožđa različitih sorti vinove loze od izuzetnog značaja, kako bi se formirala baza podataka koja bi omogućila jednostavniju hemijsku identifikaciju vina. Pored internacionalnih sorti, sve više se pridaje pažnje očuvanju i uzgoju autohtonih sorti koje su prilagođene prirodnim uslovima karakterističnim za Srbiju. Autohtone sorte vinove loze predstavljaju važno nasleđe, a njihovom preradom mogu se dobiti vina jedinstvenog ukusa. Razvoj metoda za određivanje različitih parametara u grožđu i vinu u velikoj meri olakšava dobijanje željenih ciljeva u selekciji klonova, kako internacionalnih, tako i autohtonih sorti.

Za istraživanja u ovoj oblasti, analitičke metode imaju posebno mesto. Uprkos stalnom usavršavanju analitičkih postupaka koji se koriste za ispitivanja, zbog složenosti i raznovrsnosti hemijskih komponenti, kao i procesa njihove ekstrakcije, identifikacije i kvantifikacije, istraživanja u ovoj oblasti i dalje predstavljaju izazov. Različite hromatografske i spektroskopske metode koje se koriste za određivanje sadržaja polifenola, elemenata u tragovima, isparljivih komponenti i odnosa izotopa pružaju dragocene informacije. U prethodnoj deceniji urađena su brojna ispitivanja vezana za polifenolni profil i elementalni sastav grožđa i vina. Za određivanje polifenolnog profila grožđa i vina najčešće se primenjuje tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom. Takođe, zbog brzine i jednostavnosti, tankoslojna hromatografija nalazi čestu primenu. Sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijana, kao i antioksidativni potencijal biljnog materijala uobičajeno se određuje primenom spektrofotometrijskih metoda. Elementalni sastav grožđa i vina često se

određuje primenom metoda indukovano spregnute plazme. Pomenute tehnike predstavljaju klasičan analitički pristup proceni autentičnosti grožđa i vina. Zbog kompleksnosti dobijenih rezultata u procesu tumačenja neizostavne su hemometrijske metode. Jedna od najviše korišćenih je analiza glavnih komponenata.

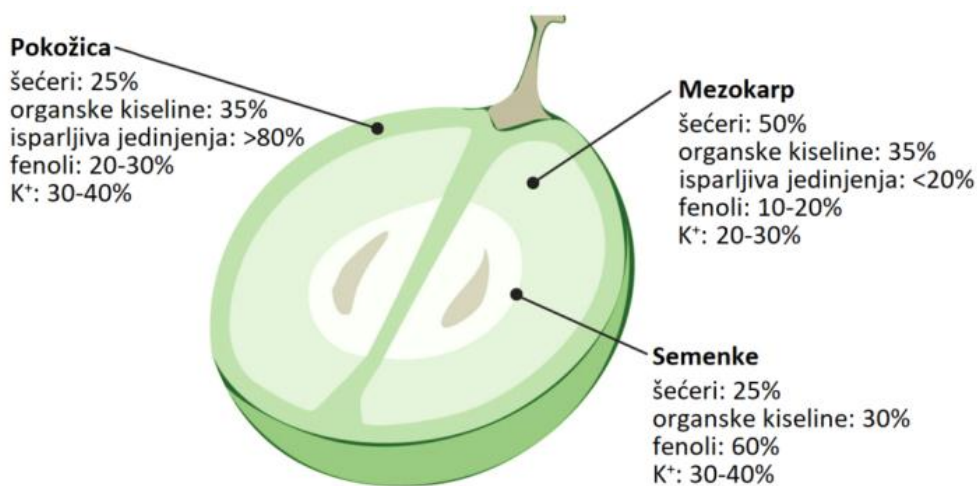
U okviru izrade ove doktorske disertacije nekoliko zadataka je postavljeno, a sve u cilju hemijske karakterizacije najzastupljenijih internacionalnih i autohtonih sorti vinove loze sa različitih lokaliteta u Srbiji. Optimizacijom analitičkih postupaka omogućena je karakterizacija ploda vinove loze i mladih sortnih vina dobijenih postupkom mikroviniifikacije. Kvantifikacijom polifenola definisan je profil lišća, grožđa i vina, kao i polifenolni profil izdvojenih klonova u procesu selekcije klonova. Takođe, utvrđena je zastupljenost polifenolnih jedinjenja u pojedinačnim delovima bobice, u pokožici, semenkama i mezokarpu, kao i u celim bobicama u različitim fazama razvoja. Mineralni sastav lišća, grožđa i vina određen je u cilju pronalaženja veze između elemenatalnog sastava i geografske pripadnosti. Statističkim metodama potvrđena je veza između prisutnih komponenti i geografske pripadnosti i sortnih specifičnosti, kako internacionalnih tako i autohtonih sorti.

2. OPŠTI DEO

2.1. Vinova loza

Vinova loza je višegodišnja listopadna biljka koja pripada rodu *Vitis* L., familiji *Vitacea* L. i jedna je od najčešće uzgajanih biljanih kultura u svetu (Fortes i Pais, 2016). Rod *Vitis* sadrži više od 70 vrsta koje uspevaju na različitim geografskim područjima (Owens, 2008). Uzgaja se pre svega zbog ukusnih i hranljivih plodova od kojih se prave vina, sokovi i džemovi, kao i sušeno grožđe, koji čine važnu robu na tržištu celog sveta.

Bobica, koja predstavlja plod vinove loze, sastoji se od pokožice, mezokarpa i semenke (Slika 1). Udeo pojedinih delova bobice u celokupnoj masi varira i zavisi pre svega od sorte, ali i od spoljašnjih faktora. Najveći deo zrelog ploda (75 do 90%) čini mezokarp, zatim pokožica (9 do 20%), dok najmanji zauzimaju semenke (2 do 6%) (Vujović, 2013).



Slika 1. Građa bobice (vrednosti označavaju procenat svake grupe jedinjenja u datom delu bobice, u odnosu na celu bobicu).

Svaka bobica sadrži 1-4 semenke, mada postoje i besemene sorte koje su, pre svega, namenjene za sušenje ili konzumiranje u svežem stanju. Pored vode, semenke sadrže značajnu količinu ugljenih hidrata (pre svega celuloze), eteričnih ulja (koja se koriste u proizvodnji kozmetičkih preparata), polifenola (u najvećoj meri tanine), minerala, vitamina (tokoferol) i masnih kiselina. Pokožica je spoljni omotač bobice koji

u najvećoj meri sadrži vodu, pektine, proteine i polifenole. Takođe, pokožica je bogata aromatičnim jedinjenjima koja sortama daju izražen i karakterističan miris, koji se naziva primarna sortna aroma. Ovo je obično jedini deo bobice u kojem se nalaze pigmenti (pre svega antocijani), mada mogu biti prisutni i u mezokarpu pojedinih crnih sorti vinove loze. Kod belih sorti, mezokarp je žuto-zelene do zlatno-žute boje (Conde i sar., 2007).

Prva faza razvoja bobice predstavlja brzo rastenje bobice i odvija se odmah nakon zametanja. U tom periodu u bobicama se akumuliraju organske kiseline. Drugu fazu odlikuje usporeno rastenje bobice i razvoj embriona ploda, a bobice ostaju čvrste i počinju da gube hlorofil. Početak treće faze, zvane šarak (*véraison*), odgovara početku sazrevanja bobica. U toku ovog perioda razvoja ploda, dolazi do različitih biohemijskih i fizioloških promena, kao što su omekšavanje, promena boje, promena veličine i hemijskog sastava bobice (Fillion i sar., 1999). Početak sazrevanja grožđa karakteriše i početak značajnih promena u metabolizmu, što uključuje akumulaciju šećera i sintezu antocijana i aromatičnih jedinjenja. Zbog neujednačenog sazrevanja bobica, u periodu berbe postoje razlike u sastavu svake pojedinačne bobice (Robinson i Davies, 2000).

Na hemijski sastav vinove loze u znatnoj meri utiču sorta, stepen sazrevanja, klimatski uslovi, kao i lokacija na kojoj se biljka uzgaja (Taware i sar., 2010; Teixeira i sar., 2013; Krol i sar., 2014). Svaku sortu vinove loze karakterišu specifičan ukus, boja, veličina bobice, polifenolni profil, kao i količinski odnos kiselina i šećera. Od sorte, zavise i oblik i boja (nijansa zelene boje) lišća vinove loze (Goldammer, 2015).

Brojna istraživanja ukazuju na potencijalna bioaktivna i lekovita svojstva koja se pripisuju svim delovima biljke, ne samo plodu, već i izdancima i lišću, koji se koriste kao dijetetski suplementi (Dani i sar., 2010; Schoedl i sar., 2012; Handoussa i sar., 2013). Pored toga, listovi vinove loze imaju prijatan ukus i miris, pa se koriste i kao sveža hrana ili za kuvanje. Iako se plodovi borovnice, brusnice, maline, kupine i drugog sitnog voća koriste kao prirodna boja za prehrambene proizvode, samo je upotreba grožđa u te svrhe sertifikovana (Giusti i Jing, 2007).

Evropska vinova loza (*Vitis vinifera* L.) se najviše uzgaja i čini oko 95% od ukupnih površina pod vinovom lozom u svetu (Jackson, 2008). U okviru ove vrste postoje različite sorte koje se gaje u celom svetu zbog kvalitetnih plodova. Kako su *V. vinifera* sorte osetljive na filokseru (*Dactylosphaera vitifoliae*), lisnu vaš koja nanosi

štetu korenu vinovoj lozi), za evropsko vingaradarstvo značajne su i američke vrste (*V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris* i *V. labrusca*) čiji koren je otporan na ovu štetočinu, pa su našle svoje mesto u proizvodnji loznih podloga na koje se kaleme sorte *V. vinifera* (Arrigo i Arnold, 2007). U zavisnosti od svojih morfoloških i proizvodnih karakteristika, grožđe ima različitu primenu, pa je izvršena podela na stone i vinske sorte, kao i sorte koje su pogodne za sušenje.

Zahvaljujući geografskom položaju, klimatskim uslovima i veoma pogodnim i raznolikim tipovima zemljišta, Srbija ima dugu tradiciju proizvodnje grožđa i vina (Radovanović, 1986). Na području Srbije nalaze se tri vinogradarska regiona: Centralna Srbija, Vojvodina i region Kosovo i Metohija. U okviru ova tri regiona nalaze se 22 rejona sa 77 vinogorja. Prema podacima iz 2012. godine, na području Centralne Srbije i Vojvodine vinova loza se uzgaja na 22150 hektara. Na ovom prostoru registrovane su 364 komercijalne vinarije, ali postoji i veliki broj malih porodičnih vinarija (Jakšić i sar., 2012).

Razlozi za proučavanje genetičkih resursa vinskih sorti i njihovo održavanje su etički i istorijski. Teritorija Balkana ne predstavlja uniformni ekosistem, te kad su u pitanju vinske sorte, velike razlike postoje između severnih delova koji su izloženi kontinentalnoj klimi i južnih delova, koji su pod uticajem mediteranske klime. U svakom od ovih krajeva postoje autohtone sorte koje su formirane pod uticajem specifičnih ekoloških faktora, ali i pod kontrolom ljudi koji žive na tim područjima.

Uzgoj vinove loze u tradiciji je srpskog naroda kao simbol života i produžetka potomstva („loze“). U vinogradima na području Srbije dominiraju internacionalne sorte vinove loze čijom preradom se dobijaju kvalitetna, u svetu poznata i prepoznatljiva vina. Pored njih, sve značajnije mesto u srpskim vinogradima zauzimaju i autohtone srpske sorte. Autohtone sorte podrazumevaju one sorte koje se od davnina uzgajaju na određenom području i koje su prilagođene prirodnim uslovima karakterističnim za tu regiju. Zbog jedinstvenih karakteristika i autentičnosti koju pružaju dobijenim vinima, autohtone sorte se sve više cene kao tipični predstavnici regiona na kojima se uzgajaju (Bešlić i sar., 2012). Blisko su povezane sa teritorijom na kojoj se uzgajaju, tako da imaju jake istorijske i simboličke veze sa mestom porekla. Stoga, smatra se da bi svaka zemlja trebalo da radi na očuvanju genetičkih resursa vinove loze. Značaj uzgajanja autohtonih sorti vinove loze prepoznat je i od strane radne grupe Evropskog

kooperativnog programa za mreže biljnih genetičkih resursa (*European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources, ECPGR*), koji ulaže napore u očuvanje diverziteta među vinskim sortama (Maul i sar., 2008).

Autohtone sorte su predmet proučavanja velikog broja radova, a uglavnom su to grožđa i vina iz zemalja sa dugom tradicijom uzgajanja vinskih sorti, pre svih Italija i Španija. U radu koji su nedavno publikovali Restuccia i saradnici (2017), predmet ispitivanja bile su crne autohtone sorte vinove loze, 'Arvino', 'Gaglioppo', 'Greco Nero', 'Magliocco Canino', 'Magliocco Dolce' i 'Nocera' iz Kalabrije, koju karakteriše 176 različitih sorti, od kojih je čak 76 jedinstveno za ovu regiju. Slična istraživanja objavljena su za španska vina 'Tempranillo' i 'Graciano' (García-Marino i sar., 2011) kao i za vina iz Grčke (Makris i sar., 2006). Takođe, Intrigliolo i saradnici (2014) ispitivali su 'Mandó', gotovo isčezlu sortu iz jugoistočne Španije koja se koristi u svega nekoliko vinarija za izradu vrhunskih vina. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da ispitivanja hemijskog sastava autohtonih sorti imaju poseban značaj, naročito u cilju njihovog očuvanja i pružanja korisnih informacija za unapređenje tehnologije gajenja ovih sorti, kao i za iznalaženje odgovarajućeg tehnološkog postupka prerade grožđa u vino (Intrigliolo i sar., 2014; Restuccia i sar., 2017). Takođe, od velikog značaja su ispitivanja mladih sortnih vina dobijenih, kako od autohtonih, tako i od internacionalnih sorti vinove loze (Kallithraka i sar., 2006; Sagratini i sar., 2012; González-Neves i sar., 2013; Ma T.-T. i sar., 2014; Alvarez-Casas i sar., 2016).

2.2. Polifenoli u grožđu, lišću i vinu

Vinova loza se smatra jednim od najbogatijih prirodnih izvora polifenolnih jedinjenja (Xia i sar., 2014). Polifenoli su sekundarni metaboliti koje biljke sintetišu u svim svojim delovima tokom normalnog rasta i razvoja, ali i kao odgovor na stresne spoljašnje uticaje (infekcije, oštećenja, UV zračenja, itd.). Ovo je velika i strukturno raznolika grupa biološki aktivnih jedinjenja koja imaju brojne funkcije u biljkama. Štite biljke od UV zračenja, različitih patogena i fizioloških oštećenja (Tomás-Barberán i Espín, 2001; Treutter, 2006). Osim toga, imaju uticaj na rastenje, razvoj i reprodukciju. Zaslužni su i za senzorna svojstva voća, povrća i cveća (miris, ukus i boju), što ima poseban značaj za razmnožavanje biljaka (De Lourdes Reis Giada, 2013). Zbog

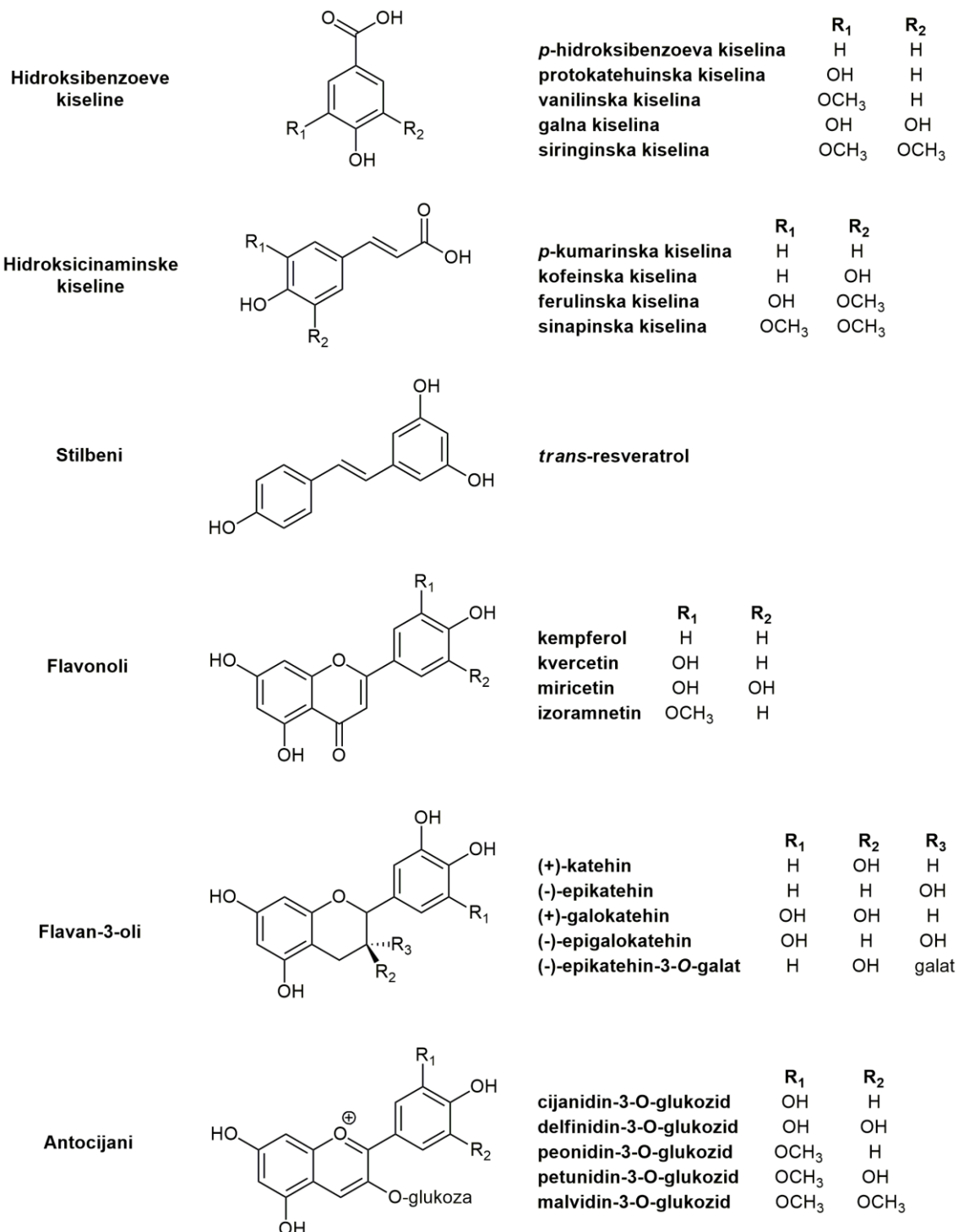
pozitivnog uticaja na zdravlje ljudi (antioksidativno, antimikrobno, antitumorsko, antiinflamatorno i antivirusno dejstvo), polifenolna jedinjenja privlače sve veću pažnju naučnika širom sveta (Ignat i sar., 2011; Watson i sar., 2014), a posebnu pažnju privlače polifenoli prisutni u grožđu i vinu (Burns i sar., 2000; Nassiri-Asl i Hosseinzadeh, 2009; Arranz i sar., 2012; Rathi i Rajput, 2014).

Zbog velike raznovrsnosti (od prostih molekula do kompleksnih polimera) i brojnosti polifenolnih jedinjenja (poznato više od 8000 različitih jedinjenja), postoji više načina njihove podele. Klasifikacija se može izvršiti prema hemijskoj strukturi, rastvorljivosti, biološkoj funkciji, poreklu i lokaciji u biljkama (Tsao, 2010; De Lourdes Reis Giada, 2013). Osnovnu strukturu čine jedan ili više aromatičnih prstenova supstituisanih hidroksilnim grupama ili nekim drugim supstituentima. Na osnovu broja i načina na koji su povezani aromatični prstenovi, polifenoli se mogu podeliti na neflavonoide i flavonoide (Burns, 2000, Teixeira i sar., 2013). Ne-flavonoidi imaju jednostavan C_6 skelet i u ovu grupu spadaju hidroksibenzoeve kiseline, hidroksicinaminske kiseline i stilbeni. Flavonoidi su izgrađeni od $C_6-C_3-C_6$ skeleta (Slika 2) i obuhvataju flavone, flavonole, flavanone, flavan-3-ole, antocijane i tanine (Castellarin i sar., 2012). Najjednostavnija polifenolna jedinjenja su fenolne kiseline, dok su tanini najsloženiji. Upravo zbog razlike u složenosti strukture ovih jedinjenja, u literaturi su podjednako zastupljeni nazivi fenol i polifenol. U ovom radu, radi jednostavnosti, za sva jedinjenja koja pripadaju ovoj klasi koristićemo termin polifenol.

Grožđe i vino odlikuju se visokim sadržajem polifenola i ponašaju se kao prirodni antioksidansi, stoga je njihovo ispitivanje od velikog interesa (Lingua i sar., 2016; Gioxari i sar., 2016). Veliki broj polifenolnih jedinjenja nalazi se u pokožici, mezokarpu, semenkama, lišću i lastarima (Xia i sar., 2014). Prisustvo fenolonih kiselina, flavan-3-ola, flavonola, stilbena, tanina i antocijana u grožđu, ali i drugim namirnicama biljnog porekla koje se koriste u ljudskoj ishrani, analizirano je prethodnih godina (Stalikas, 2007; Garrido i Borges, 2013; Cacciola i sar., 2017).

Polifenolni sastav grožđa u najvećoj meri zavisi od sorte, mada značajan uticaj imaju i spoljašnji faktori: klimatski uslovi, primenjene agrotehničke mere u toku uzgajanja vinove loze, sastav zemljišta, stepen zrelosti grožđa i dr. (Rodríguez-Montealegre i sar., 2006; Flamini, 2008; Rusjan i sar., 2012; De Pascali i sar., 2014; Bešlić i sar., 2015; Cheng i sar., 2015). Zapravo, agroekološki faktori koji utiču na

sadržaj polifenolnih jedinjenja u grožđu mogu se podeliti na četiri osnovne grupe: *i*) sorta, *ii*) godina berbe (meteorološki uslovi se razlikuju iz godine u godinu), *iii*) lokacija vinograda (uticaj geografskog porekla na svojstva grožđa, hemija zemljišta, kao i đubrenje) i *iv*) stepen zrelosti (Revilla i sar., 1997; Hernández-Jiménez i sar., 2009).



Slika 2. Strukture važnijih monomernih polifenola u grožđu i vinu.

Količina polifenola u pojedinačnim delovima bobice znatno varira. Najviše polifenolnih jedinjenja akumulira se u semenkama (60-70%), zatim u pokožici (28-35%), dok se u mezokarpu nalazi svega nekoliko procenata od ukupne količine (do 10%) (Gođevac i sar., 2010). Semenke predstavljaju bogat izvor flavonoida, a najzastupljeniji su derivati flavan-3-ola. Pokožica je bogata antocijanima, taninima, stilbenima, a u manjim količinama mogu se naći flavan-3-oli i flavonoli (Braidot i sar. 2008). Mezokarp uglavnom sadrži fenolne kiseline, monomerne flavanole i flavonole (Watson i sar., 2014).

Za procenu enološkog potencijala grožđa veliki značaj ima identifikacija prisutnih polifenolnih jedinjenja (Pajović i sar., 2014). Preduslovi za proizvodnju kvalitetnih vina su uravnotežen nivo polifenola i odgovarajući sadržaj šećera i kiselina u grožđu. Tokom ekstrakcije i fermentacije polifenolne komponente prelaze iz različitih delova bobice u širu, a zatim u vino. Iz mezokarpa u vino dospevaju fenolne kiseline, njihovi estri i aldehidi. Znatne količine fenolnih kiselina i njihovih estara ekstrahuju se i iz pokožice, zajedno sa antocijanima, proantocijanidinima i flavonolima, dok iz semenki potiču tanini, galna kiselina i flavan-3-oli (Flamini, 2003). U toku procesa proizvodnje i starenja vina dolazi i do formiranja novih polifenola, usled reakcija oksidacije, kondenzacije i polimerizacije u koje mogu da stupe ova jedinjenja. Ukoliko se vino čuva u drvenim bačvama može doći i do ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz drveta. Sve pomenute reakcije mogu da dovedu do promene boje, mirisa i ukusa vina (Paixao i sar., 2008).

Odnos između polifenolnog profila zrelog grožđa i samog vina izučavan je u okviru radova koje su publikovali Castillo-Muñoz i saradnici (2007) i Mattivi i saradnici (2002). Pokazalo se da su u crnim sortama i crvenim vinima najviše zastupljeni katehini (flavan-3-oli), proantocijanidini i antocijani, kao i produkti dobijeni njihovim oksidacijama (Mattivi i sar., 2002). Antocijani i proantocijanidini u velikoj meri doprinose kvalitetu crvenog vina, utičući na boju, gorčinu, oporost i druge važne karakteristike (Mattivi i sar., 2002; Liang i sar., 2014). U toku proizvodnje vina, više od 70% polifenolnih jedinjenja prisutnih u grožđu ostaje u komini, koja takođe postaje dragocen izvor fitohemikalija (Ratnasooriya i Rupasinghe, 2012). Iz ovog taloga moguće je izdvojiti semenke koje dalje mogu da se koriste za proizvodnju ulja ili suplemenata (Chamorro i sar., 2012).

Crvena vina su zbog visokog sadržaja polifenola povezana sa takozvanim „francuskim paradoksom” (Han i sar., 2007). Istraživanja koja su urađena 1992. godine (Renaud i de Lorgeril, 1992), pokazala su da je smrtnost uzrokovana srčanim oboljenjima u Francuskoj znatno niža nego što bi se moglo očekivati obzirom na ishranu bogatu zasićenim masnim kiselinama. Smatra se da su flavonoidi koji su prisutni u crvenom vinu, fitohemikalije koje su najviše zaslužne za ovaj fenomen (Formica i Regelson, 1995).

Polifenoli imaju brojne namene. Taninska kiselina i katehin, polifenoli koji su prisutni u semenkama, koriste se kao prirodni organski koagulansi (Jeon i sar., 2009). Resveratrol, jedinjenje izolovano iz pokožice crnih sorti koristi se u medicini, kao dijetetski suplement, ali i u kozmetičkoj industriji (Stuart i Robb, 2013). Osim toga, polifenolna jedinjenja pokazala su se i kao dobri konzervansi hrane (Martillanes i sar., 2017). Poseban značaj imaju u taksonomskim istraživanjima. Poznato je da su neke klase flavonoida, kao što su antocijani, pod strogom genetičkom kontrolom, pa njihova raspodela značajno varira između različitih sorti vinove loze, a količine mogu da variraju između različitih godina pod uticajem spoljašnjih i agronomskih faktora (Flamini i sar., 2013).

Neflavonoide koji su zastupljeni u vinovoj lozi, grožđu i vinu, moguće je podeliti u dve grupe: fenolne kiseline (C_6-C_1 i C_6-C_3 skelet) i stilbeni ($C_6-C_2-C_6$ skelet) (Vauzour, 2012).

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog prstena za koji je vezan bočni niz. U zavisnosti od strukture bočnog niza mogu se podeliti u dve grupe, hidroksicinaminske (bočni niz sadrži tri ugljenikova atom C_6-C_3) i hidrosibenzojeve (bočni niz sadrži jedan ugljenikov atom C_6-C_1) kiseline, odnosno na derivate cimetine i benzojeve kiseline.

Hidroksicinaminske kiseline su, posle antocijana i proantocijanidina, treća po zastupljenosti grupa rastvornih polifenolnih jedinjenja u grožđu (Cheynier i sar., 2010; de Lourdes Reis Giada, 2013). Ova jedinjenja u najvećoj meri se akumuliraju u pokožici i mezokarpu crnih i belih sorti (Singleton i sar., 1986; Teixeira i sar., 2013). Sinteza hidrosicinamata uglavnom se odvija do fenološke faze šarak, dok se tokom sazrevanja njihova količina u bobicama smanjuje, usled povećanja veličine bobica i sadržaja vode u njima (Teixeira i sar., 2013). U grožđu su pronađene najveće količine *trans* izomera *p*-kumarinske, kofeinske i ferulinske kiseline, kao i njihovi estri sa glukozom i vinskom

kiselinom. Estri kofeinske i ferulinske kiselina sa vinskom kiselinom uglavnom se mogu pronaći u mezokarpu, odakle se lako ekstrahuju u vino. Tartarati *cis* i *trans* *p*-kumarinske kiseline najčešće su lokalizovani u pokožici, pa je njihova ekstrakcija otežana. Smatra se da ova jedinjenja posebno doprinose oporom ukusu grožđa i vina (Garrido i Borges, 2013). U literaturi se tartarati *p*-kumarinske i kofeinske kiseline navode kao potencijalni taksonomski markeri grožđa i vina, obzirom da je na osnovu njihovog sadržaja moguće razlikovati sorte roda *Vitis* (Somers i sar., 1987). U vinima, hidroksicinaminske kiseline obično se nalaze u obliku estara koje grade sa vinskom kiselinom, dok su hidroksibenzoeve kiseline najčešće prisutne u slobodnoj formi (Ali i sar., 2010). Hidroksicinaminske kiseline, kao i njihovi derivati, predstavljaju dominantna polifenolna jedinjenja pronađena u belim vinima, dok su u crvenim vinima glavna klasa neflavonoidnih jedinjenja (Vanzo i sar., 2007). U velikoj meri doprinose boji vina belih vina (Kennedy i sar., 2006), a takođe imaju važnu ulogu kao prekursori u sintezi isparljivih polifenolnih jedinjenja (Kallithraka i sar., 2009).

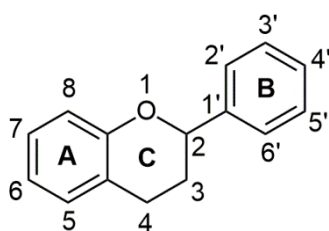
U poređenju sa hidroksicinaminskim kiselinama, količine hidroksibenzoevih kiselina i njihovih derivata u grožđu i vinima obično su niže. Od hidroksibenzoevih kiselina u grožđu je najviše zastupljena galna kiselina, zatim gentisinska, salicilna i *p*-hidroksibenzoeva kiselina, i to uglavnom u slobodnom obliku (Pozo-Bayón i sar., 2003; Ali i sar., 2010). Gentisinska i salicilna kiselina imaju ulogu signalnih molekula u biljkama i obično su prisutne u niskim količinama (Castellarin i sar., 2012). Galna kiselina često gradi estre sa hininskom kiselinom ili katehinima, a takođe se može javiti i u obliku polimernih rastvornih tanina (Herrmann, 1989). Količine hidroksibenzoevih kiselina u vinima uglavnom zavise od sorte vinove loze od kojeg je vino spravljeno, a manje od spoljašnjih faktora (Gambelli i Santaroni, 2004).

Stilbeni takođe pripadaju grupi neflavonoidnih jedinjenja čiju strukturu čine dva aromatična prstena povezana etenskim mostom. Ova jedinjenja u prirodi su prisutna u nekolicini jestivih biljaka (Teixeira i sar., 2013). Stilbeni predstavljaju glavne fitoaleksine u grožđu sa snažnim antimikotičkim i antimikrobnim dejstvom (Zhu i sar., 2012; Flamini i sar., 2013). Akumuliraju se pretežno u pokožici, a u većoj količini mogu se naći i u vinovoj lozi i lišću (Garrido i Borges, 2013). Sadržaj stilbena u grožđu u velikoj meri zavisi od sorte (Gatto i sar., 2008). Stilbeni koji se mogu naći u grožđu su resveratrol, piceid (glukozid resveratrola), piceatanol i viniferin (oligomer) (Flamini i

sar., 2013). Resveratrol je u grožđu pronađen samo u *trans* obliku, dok se u vinu javlja i *cis* izomer. Osim u pokožici, resveratrol je, u manjoj količini, pronađen i u semenkama (Cheynier, 2010). Pomenuti stilben je jedno od najviše proučavanih polifenolnih jedinjenja, tako da postoje brojne studije koje svedoče o njegovoj biološkoj aktivnosti (Jang i sar., 1997; Hung i sar., 2000; Rodríguez-Delgado i sar., 2002; Bavaresco i sar., 2012; Stuart i Robb, 2013).

Flavonoidi predstavljaju najrasprostranjeniju grupu polifenola (de Lourdes Reis Giada, 2013). Ovoj klasi polifenola pripada preko 6000 jedinjenja (Hichri i sar., 2011). To su bezbojne, ili supstance žute boje (latinski: *flavus*-žut), sa izuzetkom antocijana koji mogu biti crvene ili plave boje.

Flavonoidi su jedinjenja male molekulske mase čiju osnovnu strukturu čini flavan koji se sastoji od 15 C-atoma. Ugljenikovi atomi su raspoređeni u tri prstena, obeležena kao A, B i C (Slika 3) (Stalikas, 2007). Velika raznovrsnost flavonoida potiče od razlika u stepenu zasićenosti C-prstena, zatim supstitucije u položaju 3, kao i hidroksilacije prstena (Vauzour, 2012). Najznačajniji flavonoidi su: izoflavoni, flavonoli, flavoni, antocijani, flavan-3-oli, flavanoni i tanini. Supstitucije, u vidu oksidacije, alkilovanja, glikozilovanja, acilovanja i sulfonovanja, na prstenovima A i B dovode do povećanja broja jedinjenja unutar svake grupe (Balasundram i sar., 2006).

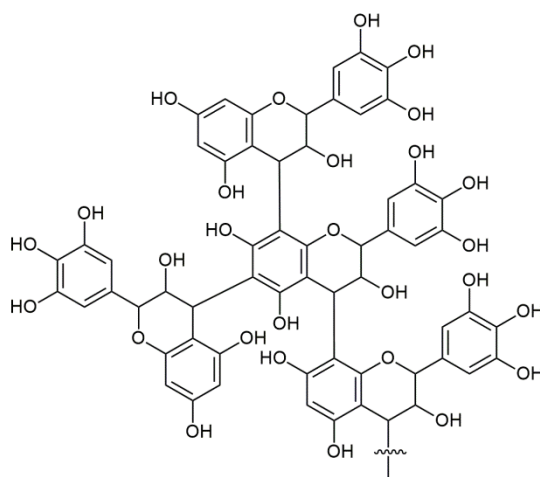


Slika 3. Osnovna struktura flavonoida.

Flavonoidi predstavljaju glavnu grupu rastvornih polifenola prisutnih u vinovoj lozi. Sa anatomskog stanovišta, flavonoidi su lokalizovani uglavnom u pokožici i semenkama. U semenkama i lastarima vinove loze naročito su prisutni flavan-3-oli i njihovi polimeri, proantocijanidini (Xia i sar., 2010).

Flavan-3-oli se u grožđu sintetišu kao monomeri, oligomeri i polimeri. Najzastupljeniji monomeri u *V. vinifera* su (+)-katehin i (-)-epikatehin, kao i epikatehin-3-galat (Cheynier, 2010). Semenke predstavljaju glavni izvor flavan-3-ola, dok su u

pokožici prisutni u manjoj količini (Cantos i sar., 2002; Prodanov i sar., 2013). Niske količine ovih jedinjenja mogu se naći i u mezokarpu (Cheynier, 2010). U belim sortama, flavan-3-oli čine od 46% do 56% od ukupnog sadržaja polifenola, dok je u crnim sortama taj procenta između 13% i 30% (Cantos i sar., 2002). Polimeri flavan-3-ola, proantocijanidini (Slika 4), zastupljeni su u lišću, kao i u svim delovima bobice, s tim da ih najviše ima u semenkama (Bogs i sar., 2005; Manach i sar., 2005). U zavisnosti u kom delu bobice se nalaze, njihove strukturne karakteristike se razlikuju, pa je tako dokazano da proantocijanidini koji se sintetišu u pokožici imaju veći stepen polimerizacije u odnosu na proantocijanidine iz semenki (Hernández-Jiménez i sar., 2009). U toku vinifikacije proantocijanidini prelaze u vino i imaju značajan uticaj na njegove senzorne karakteristike (Peleg i sar., 1999; Vivar-Quintana i sar., 2002). U ustima dolazi do formiranja kompleksa između tanina i proteina pljuvačke što dovodi do oporog ukusa vina (Vidal i sar., 2003). Podaci o sadržaju tanina u grožđu mogu biti od velike koristi u procesu proizvodnje vina kako bi se predvidelo ponašanje vina u toku starenja (Hanlin i Downey, 2009). Takođe, ovi podaci mogu pomoći i u rešavanju problema vezanih za stabilnost boje vina, naročito u slučaju crvenih vina za koja proces starenja traje duže nego za bela vina (Castillo-Muñoz i sar., 2007).



Slika 4. Opšta struktura proantocijanidina: monomeri flavan-3-ola međusobno su povezani na mestima C4-C8 ili C4-C6.

Antocijani (grčki: *anthos*-cvet, *kyanos*-plavo) su prirodni pigmenti od kojih potiču razne nijanse crvene, narandžaste, ljubičaste i plave boje velikog broja biljaka

(voća, povrća, cveća itd.) (Esteban i sar., 2001; He i sar., 2012b). Značajni su za opstanak biljaka, pošto svojom atraktivnom bojom privlače insekte i životinje, čime se omogućava oprašivanje i raznošenje semena (Flamini i sar., 2013). Osim toga, štite biljku od UV zračenja, patogena i štetnog dejstva slobodnih radikala (Gould i sar., 2009; Flamini i sar., 2013). U prirodi su antocijani najčešće zastupljeni u obliku glikozida polihidroksi i polimetoksi derivata flavonijum katjona (2-fenilbenzopirilijum). Osnovu strukture antocijana čini aglikon (antocijanidin) za koji je vezana jedna ili više šećernih komponenti (najčešće glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza i fruktoza). Vezivanjem za šećere povećava se stabilnost antocijanidina, kao i njihova rastvorljivost u vodi (Welch i sar., 2008). Takođe, antocijanidini se mogu pronaći i u obliku acilglikozida, a retko i kao slobodni aglikoni (u svežim biljkama). Tokom proteklih godina, u grožđu i proizvodima dobijenim njegovom preradom, pre svega vinu, pronađeno je šest klasa antocijanidina: pelargonidin, peonidin, cijanidin, malvidin, petunidin i delfinidin. U crnim sortama *V. vinifera* najviše je zastupljen malvidin. Prisustvo antocijana je karakteristično za pokožicu crnih sorti, međutim ovi pigmenti mogu se pronaći i u mezokarpu nekih belih sorti (Cantos i sar., 2002; He i sar., 2010). Njihova akumulacija počinje u fenološkoj fazi poznatoj pod nazivom *šarak*, a maksimalan sadržaj dostižu u fazi pune zrelosti grožđa (Vian i sar., 2006; Zhu i sar., 2012). Antocijani se takođe akumuliraju u lišću vinove loze tokom starenja, pa dovode do promene boje lista (Garrido i Borges, 2013). Brojni faktori utiču na sadržaj i sastav antocijana u grožđu, kao što su poreklo i sorta vinove loze, stepen zrelosti, vremenski uslovi (naročito temperatura i intenzitet svetlosti), sastav zemljišta, đubrenje, navodnjavanje (Mazza, 1995; Pena-Neira i sar., 2007; Quiroga i sar., 2009; Ferrandino i Guidoni, 2010). Pored pomenutih faktora, i pH vrednost sredine značajno utiče na strukturu antocijana, što uzrokuje i velike promene u boji molekula (Welch i sar., 2008).

Profil antocijana može da posluži kao parameter za hemotaksonomsku klasifikaciju crnih *V. vinifera* sorti, imajući u vidu da svaka sorta ima relativno stabilan i jedinstven sastav antocijana. Samo količine ovih jedinjenja variraju sa godinama, zbog drugačijih ekoloških i agronomskih faktora (Gil-Muñoz i sar., 2010; Zhu i sar., 2012). Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (*International Organization of Vine and Wine, OIV*) predložila je podelu grožđa na osnovu boje pokožica u sedam grupa:

zeleno-žute, roze, crvene, crveno-sive, crveno-ljubičaste, plavo-crne i crveno-crne (The International Organization of Vine and Wine, 1983).

U toku proizvodnje crvenih vina dolazi do ekstrakcije antocijana iz pokožice. Međutim, samo određena količina antocijana (oko 2%) pređe iz pokožice u vino (Capanoglu i sar., 2013). Monomerni antocijani daju najveći doprinos boji mladih crvenih vina, dok u toku starenja vina dolazi do raznih inter- i intramolekulskih interakcija, između samih antocijana ili sa drugim organskim molekulima (naročito drugim polifenolnim jedinjenjima). Ove promene doprinose stabilnosti boje crvenih vina, jer se stvaraju stabilnija polimerna jedinjenja kao što su piranoantocijanidini (vitisin A i vitisin B) (Sun i Spranger, 2005). U toku starenja i sazrevanja može doći i do značajnih promena boje, ukusa i mirisa vina (He i sar., 2012a).

Ispitivanje antocijanskog profila pokazalo se kao pogodan način za klasifikaciju vina. Tako su Arozarena i saradnici (2000) na osnovu sastava antocijana, pre svega acilovanih derivata malvidin-3-glukozida, uspeli da izvrše klasifikaciju vina na osnovu sorte i geografskog porekla. Takođe, antocijani su se pokazali kao pouzdani pokazatelji sorte pripadnosti crvenih vina sa područja Nemačke (Berente i sar., 2000).

Flavonoli po zastupljenosti u grožđu predstavljaju drugu klasu jedinjenja iz grupe flavonoida. Njihova struktura zasnovana je na 3-hidroksiflavonu, a međusobno se razlikuju po broju i vrsti supstituenata na B prstenu. U grožđu su najviše zastupljeni kempferol, kvercetin i mircetin, i to obično u obliku glukozida, galaktozida, ramnozida i glukuronida (šećerna komponenta je vezana u položaju C3 skeleta flavonoida) (Mattivi i sar., 2006). Sinteza flavonola prvenstveno se odigrava u toku rane fenofaze razvoja grožđa, a završava se tokom faze šarak (Downey i sar., 2003). Njihov sadržaj je veći u crnim, u odnosu na bele sorte. Osim toga, i profil flavonola u velikoj meri zavisi od vrste grožđa. Kempferol, kvercetin i izoramnetin, kao i njihovi derivati, pronađeni su i u belim i u crnim sortama, dok je mircetin karakterističan samo za crne sorte (Cantos i sar., 2002; Mattivi i sar., 2002; Zhu i sar., 2012). Flavonoli su uglavnom lokalizovani u pokožici, gde po zastupljenosti, predstavljaju treću klasu polifenola. Pokožicu karakterišu pre svega glikozidi flavonola, dok se u vinu i sokovima mogu pronaći aglikoni nastali kiselom hidrolizom u toku procesa prerade i skladištenja (Castillo-Muñoz i sar., 2007). Vina proizvedena od sorti sa debljom pokožicom (npr. 'Cabernet Sauvignon'), kao i od grožđa koje se uzgaja u krajevima koji su izloženi sunčevoj

svetlosti, sadrže veće količine flavonola (Flamini i sar., 2013). Flavonoli su zastupljeni i u lišću, što je očekivano imajući u vidu da ova jedinjenja imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od UV-zračenja (Cheynier i sar., 2010; Flamini i sar., 2013). Pored zaštite od prekomernog zračenja, uloga kvercetina u kopigmentaciji sa antocijanima dokumentovana je u literaturi (Braidot i sar., 2008). Pokazalo se da od svih faktora, najveći uticaj na količinu flavonola u biljkama, upravo ima izloženost sunčevim zracima (Price i sar., 1995).

2.3. Potencijalna biološka aktivnosti polifenolnih jedinjenja karakterističnih za *V. vinifera*

Polifenolna jedinjenja u najvećoj meri doprinose biološkoj aktivnosti grožđa i proizvoda dobijenih preradom ovog voća (Conde i sar., 2007; Oroian i Escriche, 2015). Antioksidativni potencijal ovih jedinjenja zavisi od njihove strukture, pre svega broja i rasporeda hidroksilnih grupa. Aktivnost se pripisuje hidroksilnim grupama prstena B, kao i hidroksilnoj grupi u položaju 3 prstena C i položaju 5 prstena A (Slika 3). Ove grupe učestvuju u delokalizaciji elektrona, što doprinosi stabilnosti nastalog radikala (de Lourdes Reis Giada, 2013). Dokazano je da se antioksidativna sposobnost polifenolnih jedinjenja povećava sa porastom broja hidroksilnih grupa, a smanjuje sa glikozilacijom aromatičnog prstena (Cotelle i sar., 1996; Fukumoto i Mazza, 2000; Antolovich i sar., 2002). Sposobnost jednostavnijih polifenola da deluju kao antioksidansi zavisi od stepena konjugacije, broja i rasporeda supstituenata, kao i od molekulske mase, dok antioksidativna sposobnost oligomernih flavonoida pre svega zavisi od stepena polimerizacije (Handique, 2011).

Rezultati brojnih istraživanja ukazali su na korisne efekte *V. vinifera* i njenih aktivnih sastojaka (polifenola) u lečenju metaboličkih poremećaja, koji uključuju dislipidemiju, dijabetes, gojaznost i hipertenziju (Akaberi i Hosseinzadeh, 2016). U preglednom radu Newshehri i saradnika (2015) navode se trenutna znanja o bioaktivnim svojstvima semenki izolovanih iz grožđa. Kako je navedeno, semenke su pokazale veliki potencijal kao antioksidativna, hepatoprotektivna, neuroprotektivna, antimikrobna i antiinflamatorna sredstva, kao i potencijalna dejstva u sprečavanju dijabetesa, tumora, kardiovaskularnih i kožnih oboljenja. Pomenuta blagotvorna dejstva semenki

pružaju mogućnost korišćenja njihovih ekstrakata u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Polifenolna jedinjenja su od davnina korišćena kao tradicionalni lekovi i prirodne boje. Predstavljaju važnu komponentu tradicionalne medicine u mnogim zemljama Azije, Evrope, Afrike i Severne Amerike. Iako mnogi polifenoli pokazuju biološku aktivnost, do sada je samo nekolicina plasirana na tržištu lekova za potrebe humane medicine, za lečenje tumora, nebakterijskih (virusnih i protozoalnih) infekcija, astme i oboljenja centralnog nervnog sistema. Epidemiološka ispitivanja pokazuju da konzumacija namirnica koje su bogate polifenolnim jedinjenjima, pre svega voća i povrća, kao i vina i čajeva, može sprečiti pojavu tumora, moždanih udara i srčanih oboljenja (Saikia, 2011). Takođe, dokumentovan je uticaj na smanjenje rizika od razvoja demencije i poboljšanje kognitivnih funkcija (Vauzour, 2012). Polifenoli, kao redukciona sredstva štite tkiva od oksidativnog stresa, a samim tim i od bolesti. Takođe, polifenolna jedinjenja stupaju u interakcije sa proteinima i polisaharidima, što i omogućava njihovo delovanje kao lekova (Haslam, 1996). Stepent pozitivnog dejstva polifenolnih jedinjenja na zdravlje ljudi zapravo zavisi od različitih faktora, kao što su količina dnevnog unosa ovih fitohemikalija, biodostupnosti, kao i *in vivo* antioksidativne aktivnosti.

U literaturi su prisutni i radovi u kojima su ispitana blagotvorna dejstva pojedinačnih klasa polifenola. Utvrđeno je da raznolikost hemijskih struktura flavonoida doprinosi širokom spektru njihovog fiziološkog i biološkog dejstva. Kako je biološka aktivnost flavonoida u snažnoj sprezi sa stepenom glikozilacije, vrstom šećernog ostatka i acil-esterifikacijom, pruža se mogućnost odabira različitih sorti sa jedinstvenim sastavom flavonoida koji samim tim imaju različite zdravstvene efekte na ljudski organizam (Cho i sar., 2004). Flavonoidi mogu da grade komplekse sa metalima, ograničavajući biodostupnost metala i samim tim sprečavaju trovanja izazvana metalima, a istraživanja koja su sprovedli Malešev i Kuntić (2007) pokazuju da su metalni kompleksi flavonoida efikasniji hvatači radikala od slobodnih flavonoida.

Tanini se koriste kao aktivni sastojci u medicinskim proizvodima za lečenje poremećaja u cirkulaciji (Flamini, 2003). Takođe, mogu imati veliku antioksidativnu aktivnost u gastrointestinalnom traktu, štiteći proteine, lipide i ugljovodonike od oksidativnih oštećenja tokom digestije, a na taj način štite crevnu sluznicu od

oksidativnog stresa i delovanja karcinogena (Manach i sar., 2005). Proantocijanidini izolovani iz semenki grožđa pokazali su efikasna dejstva u sprečavanju kardiovaskularnih oboljenja, ateroskleroze, dislipidemije, moždanih udara, pojave i rasta tumora (Agarwal i sar., 2000; Bagchi i sar., 2000; Moreno i sar., 2003; Zhang i sar., 2005; Curin i sar., 2006; Pfeiffer i sar., 2006; Charradi i sar., 2012). Pokazalo se da antioksidativna aktivnost tanina zavisi od stepena polimerizacije i da može biti od 15-30 puta veća nego kod prostih fenola (de Lourdes Reis Giada, 2013).

Fenolne kiseline i njihovi estri imaju veliki antioksidativni potencijal, koji je, kao i kod drugih polifenolnih jedinjenja, uglavnom povezan sa brojem hidroksilnih grupa u molekulu. Istraživanja su pokazala da su hidroksilovane cinaminske kiseline efikasniji antioksidansi od benzoevih kiselina (Cheynier, 2010; de Lourdes Reis Giada, 2013).

2.4. Ekstrakcija i izolovanje polifenolnih jedinjenja

Ekstrakcija i izolovanje predstavljaju prve važne korake u procesu odvajanja, karakterizacije i kvantifikacije polifenola prisutnih u biljkama. Ekstrakciji najčešće prethodi usitnjavanje i homogenizacija biljnog materijala (Merken i Beecher, 2000). U literaturi su dostupni brojni radovi u kojima su opisane različite metode ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz materijala biljnog porekla, uključujući voće, povrće, vino, kafu, čajeve, začinsko bilje, žitarice i mahunarke (Balasundram i sar., 2006; Luthria i Pastor-Corrales, 2006; Naczki i Shahidi, 2006).

Postoje različite ekstrakcione metode, ali se za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz biljnih materijala najčešće koriste tečno-tečna i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Polifenoli se mogu ekstrahovati iz svežeg, zaleđenog ili suvog biljnog materijala. Voda prisutna u svežim biljkama podstiče rad enzima koji vrše razgradnju polifenolnih jedinjenja. Kako bi se to sprečilo, pre ekstrakcije biljni materijal se često zamrzava, suši ili liofilizuje (Stalikas, 2007). Na efikasnost ekstrakcije značajan uticaj imaju izbor rastvarača, temperatura, kao i mešanje. Međutim visoke temperature i izloženost jakoj svetlosti mogu narušiti polifenolni profil. Takođe, zbog raznovrsnosti i kompleksnosti polifenolnih jedinjenja, izbor adekvatnog ekstrakcionog sredstva nije tako jednostavan. Iako su polifenoli često bolje rastvorna u organskim rastvaračima nego u vodi, utvrđeno

je da se efikasnost ekstrakcije povećava ukoliko se u organske rastvarače doda određena količina vode, pa je smeša metanola i vode u različitim odnosima najčešći izbor (Murphy i sar., 1999; Galanakis i sar., 2013;) Pomenuta smeša predstavlja efikasno ekstrakciono sredstvo, ima visoku tačku ključanja, a pored toga je i ekononmična, iako se zbog toksičnosti metanola, često preporučuje upotreba etanolnih rastvora, koji se dalje mogu koristiti i u industriji hrane. Takođe, primenjuju se aceton i etilacetat, kao i njihove smeše sa vodom. Imajući u vidu da pH-vrednost rastvora utiče na efikasnost, kao i da su polifenolna jedinjenja stabilnija na nižim pH, ekstrakcija polifenola najčešće se izvodi u kiseloj sredini.

S obzirom da se mnoga polifenolna jedinjenja javljaju kao glikozidi ili estri, priprema uzorka može uključiti alkalnu, kiselu ili enzimsku hidrolizu kako bi se oslobodili vezani polifenoli. Postupkom hidrolize nastaju aglikoni, koji su prikladniji za dalju hromatografsku analizu, a standardi aglikona su dostupniji na tržištu. Stoga su najčešće u upotrebi metode u kojima se kao ekstrakciona sredstva koriste zakiseljeni metanol ili etanol (Chandrasekhar i sar., 2012).

Polifenoli mogu biti ekstrahovani iz cele bobice (Alonso Borbalán i sar., 2003; Rusjan i sar., 2012), ili zasebno iz pokožice, semenke i mezokarpa (Harbertson i sar., 2003; Rodríguez-Montealegre i sar., 2006; Chira i sar., 2009; Delcambre i Saucier, 2012). U toku ekstrakcije, osim polifenola dolazi do izdvajanja i drugih jedinjenja koja ne pripadaju ovoj klasi, kao što su šećeri, organske kiseline i proteini. Stoga, često je neophodno naknadno prečišćavanje ekstrakta, za šta se najčešće koristi tehnika čvrsto-tečne ekstrakcije (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Na uzorke vina je takođe neophodno primeniti čvrsto-tečnu ekstrakciju pre razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije prisutnih polifenola. Pojedini autori smatraju da uzorcima vina nije potrebna dodatna priprema, već da se kao takvi mogu direktno analizirati, dok drugi ističu korist od uklanjanja alkohola uparavanjem na vakuum uparivaču pre hromatografskih razdvajanja (Stalikas, 2007; Lorrain i sar., 2013).

2.5. Metode za karakterizaciju polifenolnih jedinjenja

Obzirom na brojnost i kompleksnost polifenolnih jedinjenja, identifikacija polifenola prisutnih u matriksu biljnog porekla predstavlja izuzetno komplikovan

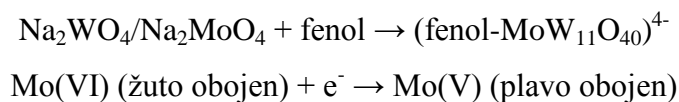
zadatak koji iziskuje primenu sofisticiranih analitičkih metoda. Analiza polifenolnih komponenti obuhvata dva osnovna koraka. Prvi neophodan korak je ekstrakcija polifenola, a drugi predstavlja njihovo određivanje. Uobičajena su dva pristupa prilikom ispitivanja i kvantifikacije polifenolnog sastava u voću i proizvodima dobijenim njihovom preradom. Jedan podrazumeva određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja upotrebom spektrofotometrijskih metoda, dok drugi obuhvata razdvajanje i identifikaciju pojedinačnih polifenola.

2.5.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih antocijana i antioksidativnog potencijala

Spektrofotometrijske metode koriste se za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana, kao i za određivanje antioksidativne aktivnosti biljnog materijala. Iako se zbog brzine izvođenja i relativno jednostavnog postupka, uobičajeno koriste u ovakvim istraživanjima, treba imati na umu da ove metode nisu specifične samo za polifenolna jedinjenja, već i druga jedinjenja koja ne spadaju u ovu klasu mogu na isti način da reaguju, dovodeći do pogrešnih rezultata (Everette i sar., 2010).

Za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u biljnom materijalu razvijene su brojne spektrofotometrijske metode, a najčešću primenu ima kolorimetrijska metoda po *Folin-Ciocalteu*. *Folin-Ciocalteu* metoda se zapravo opisuje kao metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta, koja se zasniva na reakcijama prenosa elektrona između istoimenog reagensa i polifenolnih jedinjenja (Everette i sar., 2010). Stoga, ne čudi prisustvo brojnih publikacija u kojima je utvrđena snažna linearna korelacije između rezultata dobijenih za sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativnog potencijala (Karadag i sar., 2009). Hemijska struktura *Folin-Ciocalteu* reagensa žute boje nije do kraja razjašnjena, ali se smatra da njegovu osnovu čine soli fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline (Sánchez-Rangel i sar., 2013). Reakcija između polifenolnih jedinjenja i *Folin-Ciocalteu* reagensa odigrava se kada je pH vrednost rastvora oko 10, što se postiže dodatkom natrijum-karbonata. Pri ovim uslovima dolazi do disocijacije protona sa fenola, uz formiranje fenolatnog jona koji je dalje sposoban da redukuje

Folin-Ciocalteu reagens. Redukcijom reagensa nastaje smeša volfram-oksida i molibden-oksida, koja je plave boje, što je prikazano u jednačinama:



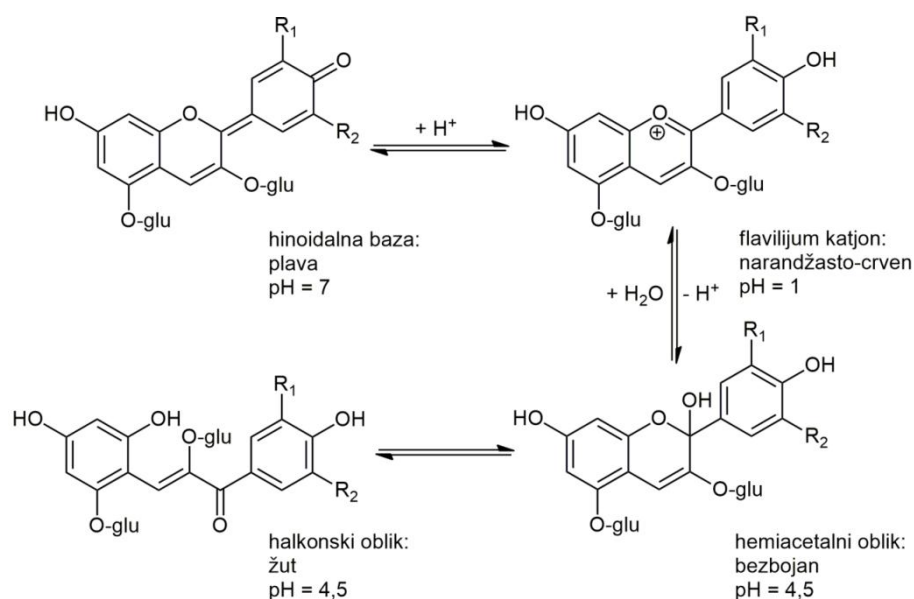
Intenzitet boje srazmeran je količini polifenolnih jedinjenja i određuje se spektrofotometrijski, merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 765 nm (Singleton i sar., 1999; Sánchez-Rangel i sar., 2013). Za konstruisane kalibracione krive zavisnosti apsorpcije od koncentracije najčešće se primenjuje standard galne kiseline, a rezultati za ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline.

Folin-Ciocalteu metoda je veoma pogodna, jednostavna za izvođenje i ne zahteva specifičnu opremu (Singleton i sar., 1999). Nedostatak metode je nespecifičnost i osetljivost na druge nefenolne redukujuće molekule, što u velikoj meri otežava određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u kompleksnoj materiji, kao što je biljni materijal (Rover i Brown, 2013). Američki naučnici uradili su temeljnu studiju koja je za cilj imala testiranje reaktivnosti *Folin-Ciocalteu* reagensa prema različitim klasama jedinjenja (Everette i sar., 2010). Istraživanje koje je obuhvatilo preko osamdeset jedinjenja pokazalo je da u reakcije sa pomenutim reagensom, osim polifenola mogu stupiti i proteini, tioli, vitamini, joni metala itd. Međutim, kako u većini biljaka polifenolna jedinjenja predstavljaju najviše zastupljene antioksidanse, Everette i saradnici (2010) ističu da *Folin-Ciocalteu* metoda omogućava grubu aproksimaciju ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja u biljnom materijalu.

Za određivanje sadržaja monomernih antocijana najčešće se koristi brza i jednostavna pH-diferencijalna metoda (Giusti i Wrolstad, 2001). U kiseljoj sredini postoji ravnoteža između dva oblika antocijana (Slika 5), obojenog i neobojenog koji imaju različite apsorpcione spekre. Položaj ove ravnoteže zavisi od pH vrednosti rastvora. Narandžasto-crveni oksonijum jon (flavilijum katjon) preovladava na pH = 1, a bezbojni hemiketalni oblik na pH = 4,5.

pH-diferencijalna metoda zasniva se upravo na ovoj reakciji i omogućava brzo i tačno određivanje sadržaja ukupnih antocijana, čak i u prisustvu polimerizovanih pigmenata i drugih ometajućih jedinjenja. Apsorbancija rastvora meri se na dve talasne

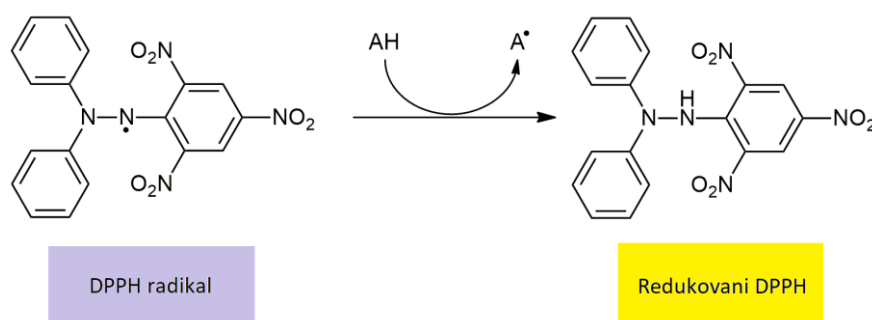
dužine, na 520 nm i na 700 nm. Dobijeni rezultati preračunavaju se na sadržaj dominantnog antocijana u ispitivanom matriksu. Pošto je poznato da u grožđu i vinu preovlađuje malvidin-3-glukozid, rezultati za sadržaj ukupnih antocijana izražavaju se kao ekvivalenti malvidin-3-glukozida. Sa daljim povećanjem pH vrednosti sredine, flavonijum katjon može preći u purpurno plavo obojenu bazu hinonoidalne strukture (Welch i sar., 2008).



Slika 5. Zavisnost strukture antocijana od pH vrednosti sredine.

Sve metode koje se koriste za određivanje antioksidativnog potencijala zasnivaju se na reakcijama reaktivnih vrsta kiseonika sa određenim reagensom, a novonastali kompleksi detektuju se spektrofotometrijski. Antioksidativni potencijal materijala biljnog porekla najčešće se određuje primenom metoda kao što su *ABTS* (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical assay*), *FRAP* (*ferric-reducing antioxidant power assay*), *ORAC* (*oxygen radical absorbance capacity assay*) i *DPPH* (*2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl radical assay*) (Karadag i sar., 2009; de Lourdes Reis Giada, 2013; Watson i sar., 2014). Metoda koja se zasniva na upotrebi *DPPH* reagensa je brza i laka za izvođenje, pa se najčešće primenjuje. *DPPH* je organsko jedinjenje, tamnoljubičaste boje. Zahvaljujući delokalizaciji nesparenog elektrona preko celog molekula, *DPPH* ne podleže dimerizaciji, pa se karakteriše kao stabilan slobodni radikal (Kedare i Singh, 2011). Alkoholni rastvor reagensa maksimum apsorbancije ima na

talasnoj dužini od oko 520 nm. U prisustvu jedinjenja koja pokazuju antioksidativna svojstva ovaj reagens se redukuje, pri čemu dolazi do promene boje iz ljubičaste (boja alkoholnog rastvora *DPPH*) u žutu (boja nastalog hidrazina) (Slika 6). Sposobnost jedinjenja da redukuje *DPPH* može se odrediti praćenjem smanjenja apsorbancije u opsegu talasnih dužina od 515 do 528 nm (Karadag i sar., 2009). Dobijeni rezultati mogu se prikazati na više načina, a jedan od njih podrazumeva definisanje koncentracije supstrata koja dovodi do redukcije 50% *DPPH* (*efficient concentration, EC50*). Smatra se da što je niža *EC50* vrednost, antioksidativna aktivnost je veća (Kedare i Singh, 2011). Još jedan od načina prikazivanja rezultata, koji je primenjen i u ovom radu, je poređenje sa vrednošću dobijenom primenom standardnog rastvora troloksa, pa se rezultati izražavaju kao ekvivalenti troloksa.



Slika 6. Princip određivanja antioksidativne aktivnosti upotrebom *DPPH* radikala.

2.5.2. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja

U cilju identifikacije i kvantifikacije pojedinačnih jedinjenja, poželjno je da se polifenoli najpre razdvoje. Za njihovo razdvajanje primenjuju se različite hromatografske tehnike, kao što su tankoslojna hromatografija (*Thin Layer Chromatography, TLC*), tečna hromatografija (*Liquid Chromatography, LC*) i gasno-tečna hromatografija (*Gas Liquid Chromatography, GLC*). Razdvajanje je takođe moguće postići korišćenjem kapilarne elektroforeze (*Capillary Electrophoresis, CE*) (Donno i sar., 2015). Kao stacionarna faza pri razdvajanju fenolnih jedinjenja uobičajeno se koristi oktadecil-modifikovani silika gel (*RP-C18*) (Motilva, 2013).

Za kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja najširu primenu ima tečna hromatografija (Tsao i Deng, 2004; Stalikas, 2007 i 2010; Ignat i sar., 2011). Poslednjih

godina, najčešće se koristi tečna hromatografija visokih performansi (*High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*), kao i ultra-efikasna tečna hromatografija (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC*). *HPLC* je separaciona metoda koja, u kombinaciji sa odgovarajućim detektorom, pruža mogućnost za identifikaciju i kvantifikaciju širokog spektra hemijskih jedinjenja u rastvoru. Podaci dostupni u literaturi ukazuju da se *UV-VIS* i fluorescentni detektori, kao i masena spektrometrija, najčešće koriste za analizu hemijskog sastava grožđa i vina (analiza polifenola, organskih kiselina, ugljenih hidrata, aminokiselina i mikotoksina) (Lamuela-Raventos i Waterhouse, 1994; Castellari i sar., 2000; Gomez-Alonso i sar., 2007). *HPLC-UV* kvantifikacija polifenolnih jedinjenja moguća je isključivo uz korišćenje komercijalnih standarda, a zasniva se na poređenju retencionih vremena uzoraka sa retencionim vremenima standarda (Haminiuk, 2012). Spajanjem tečne hromatografije i masene spektrometrije (*Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS*) moguće je postići selektivniju i pouzdaniju identifikaciju komponenti. Jonski izvor je obično baziran na elektron-sprej jonizaciji (*ElectroSpray Ionization, ESI*), najčešće u negativnom modu, pri čemu se dobijaju deprotonovani molekulski joni (Lucci, 2017). Elektron-sprej jonizacije u pozitivnom režimu imaju primenu u analizi derivata antocijanina, koji poseduju pozitivno naelektrisan flavinijum-jon. Maseni analizatori na bazi kvadrupola najčešće se koriste kao detektori za polifenolna jedinjenja. Poslednjih godina, maseni detektori visoke rezolucije, kao što su *TOF (Time Of Flight)* i *OrbiTrap* maseni analizatori, nalaze sve širu primenu pri analizi polifenola (Capriotti, 2015).

Postoji veliki broj publikacija u kojima su opisane osnovne klase polifenolnih jedinjenja prisutnih u vinovoj lozi, grožđu i vinu (Flamini i sar., 2013; Garrido i Borges, 2013). Takođe, teme radova bile su i promene u polifenolnom profilu do kojih dolazi u toku rasta i razvoja vinove loze, kao i transformacije do kojih dolazi usled uticaja različitih spoljašnjih faktora (Taware i sar., 2010; Schoedl i sar., 2012; Ma i sar., 2014; Bešlić i sar., 2015). Na ovaj način dolazi se do informacija o osnovnim karakteristikama vina, što dalje može da se upotrebi za klasifikaciju vina na osnovu sorte vinove loze, geografskog porekla i godine berbe.

U svom istraživanju, Bešlić i saradnici (2015) koristili su *UHPLC-DAD MS/MS* sistem za određivanje polifenolnog profila grožđa i pokazali da sastav polifenolnih

jedinjenja može da posluži kao parameter za praćenje uticaja načina obrade zemljišta u vinogradima, kao i klimatskih faktora na kvalitet grožđa.

Di Stefano i saradnici (2012) u preglednom radu navode da se za utvrđivanje hemijskog profila i određivanje specifičnih sastojaka u vinu najčešće koristi masena spektrometrija, kuplovana sa hromatografskim metodama. Dok se *GC-MS* obično koristi za proučavanje isparljivih jedinjenja koja doprinose mirisu, *HPLC-MS* nalazi primenu u proučavanju neisparljivih komponenti vina. Za kompleksniju i detaljniju analizu polifenolnih jedinjenja primenjuje se *HPLC-MS/MS*. Ova metoda pri analizi glikozida flavonoida omogućava identifikaciju i aglikonskog dela molekula, ali i šećerne komponente. Takođe, polifenoli kompleksne strukture, kao što su tanini, mogu se analizirati primenom ove metode.

HPLC-MS metode imaju čestu primenu za otkrivanje ilegalnih postupaka i loše prakse pri proizvodnji vina, koje podrazumevaju falsifikovanje porekla, ilegalno mešanje različitih sorti vina, bojenje ili dodavanje aroma, kao i dodavanje vode i šećera (u zemljama severne Evrope dodavanje šećera je dozvoljeno, dok je u mediteranskim zemljama zabranjeno) (Zhang i sar., 2011; Flamini, 2003).

Agatonovic-Kustrin i saradnici (2017) pokazali su da *HPTLC* metoda u kombinaciji sa hemometrijskim tehnikama predstavlja jednostavan i efikasan način za razlikovanje vina prema sortama vinove loze. Ispitujući 40 uzoraka vina (38 crvenih vina i 2 bela vina), došli su do rezultata koji ukazuju na potencijanu upotrebu rutina i resveratrola kao markera sortne pripadnosti vina. Takođe, rezultati dobijeni statističkom obradom *HPTLC* podataka omogućavaju diferencijaciju belih vina u smislu sortnih specifičnosti, godine berbe i lokacije vinograda. Ovo su utvrdili Hosu i Cimpoiu (2016) proučavanjem belih vina sa različitih lokacija u Rumuniji.

Istraživanje koje su sproveli Schoedl i saradnici (2011) imalo je za cilj razvoj i optimizaciju LC MS/MS metoda kvantifikacije polifenola prisutnih u lišću *V. vinifera* L. Sledeće godine isti autori (Schoedl i sar., 2012) objavili su rezultate identifikacije ovih fitohemikalija u lišću vinove loze u različitim fazama sazrevanja, koji su od velikog značaja za definisanje optimalnog perioda i položaja za prikupljanje uzoraka lišća sa najvećim sadržajem polifenola. Takođe, postoje i istraživanja o promenama u polifenolnom profilu i antioksidativnoj aktivnosti lišća, grožđa i vina *V. vinifera* u

zavisnosti od sorte, vremena berbe i infekcija (Katalinić i sar., 2009; Taware i sar., 2010; Katalinić i sar., 2013; Krol i sar., 2014).

Garrido i Borges u revijalnom radu objavljenom 2013. godine naveli su osnovne klase polifenolnih jedinjenja koji ulaze u sastav grožđa i vina. Ističu da na kvalitativne i kvantitativne promene u polifenolnom sastavu grožđa utiče faza razvoja bobice, kao i spoljašnji faktori, kao što su temperatura i izloženost sunčevim zracima. Autori u svom radu skreću pažnju na moguće hemijske procese do kojih dolazi u toku proizvodnje vina, a koje mogu da dovedu do smanjenja ili povećanja kvaliteta vina u pogledu nutritivnih vrednosti i boje vina. Uvid u takve hemijske reakcije mogao bi da omogući bolju kontrolu kvaliteta finalnog proizvoda, vina. Utvrđeno je da kondenzovani tanini doprinose oporom i gorkom ukusu vina, pa ispitivanje ovih jedinjenja može da omogući enolozima i vinogradarima praćenje i optimizaciju akumulacije poželjnih tanina u vinovoj lozi (Ma i sar., 2014).

Kombinacija instrumentalnih tehnika hromatografske analize i multivarijantnih metoda za statističku obradu omogućava klasifikaciju grožđa i vina na osnovu vrste, sorte, geografskog porekla, ali i pruža određene podatke o samom postupku proizvodnje vina. Obzirom na kompleksnost hemijskog sastava grožđa i vina, multivarijantne statističke metode imaju važnu ulogu u njihovom proučavanju i klasifikaciji (González i Peña-Méndez, 2000; Bertacchini i sar., 2013; Donno i sar., 2015; Donno i sar., 2016). Dobijeni odnos između uzoraka i varijabli može da ukaže na to koje varijable doprinose razlikovanju uzoraka, a koje ne, pa stoga mogu da se zanemare. Osim toga, podaci o međusobnom odnosu samih varijabli mogu biti od značaja prilikom tumačenja rezultata.

Hemometrijske metode se koriste za tumačenje rezultata u primenjenoj hemiji još od šezdesetih godina prošlog veka, dok se u analizi hrane hemometrija praktično koristi u prethodnih dvadesetak godina (Granato i sar., 2018). Sofisticirane analitičke tehnike u kombinaciji sa statističkim metodama analize postale su nezaobilazne u analizi hrane, a pre svega u cilju rešavanja problema koji se tiču procene autentičnosti i sprečavanja upotrebe nelegalnih praksi u prehrambenoj industriji (Granato i sar., 2018). Karakterizacijom različitih klasa bioaktivnih sastojaka grožđa i vina, i primenom multivarijantne analize, potvrđena je očekivana veza između sadržaja polifenola i sortne pripadnosti (Saurina, 2010; Vaclavik i sar., 2011). Takođe, autori ističu neophodnost poznavanja hemijskih i fizičkih karakteristika, kako grožđa, tako i svakog vina, a

posebno sortnih vina, obzirom da sorta ima veliki uticaj na sastav vina. Tumačenje dobijenih rezultata značajno olakšava upotreba hemometrijskih metoda, a najčešću primenu u ispitivanju autentičnosti hrane, imaju analiza glavnih komponenata (*Principal Component Analysis, PCA*) i klastera analiza (*Cluster Analysis, CA*). Primena *PCA* metode pruža mogućnost grupisanja ispitivanih uzoraka prema sličnosti, a linearnom kombinacijom osnovnih varijabli dolazi do formiranja glavnih komponenata. Takođe, *PCA* olakšava uočavanje i definisanje uzoraka koji se po hemijskim karakteristikama razlikuju od ostalih. Pomenuti uzorci predstavljaju spoljne vrednosti i kao takvi, obično se odstranjuju iz seta podataka. Zapravo, primenom *PCA* metode multidimenzionalni sistem koji je sačinjen od velikog broja varijabli svodi se na dve ili tri dimenzije, što značajno olakšava tumačenje rezultata.

2.6. Elementalna analiza grožđa, lišća i vina

Za analizu elementalnog sastava grožđa i vina koriste se brojne analitičke metode. U poglavlju knjige, Cozzolino (2015) sumirao je najčešće korišćene tehnike: jonska hromatografija (*Ion Chromatography, IC*), striping potenciometrija, indukovano kuplovana plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES*), indukovano kuplovana plazma sa masenom spektrometrijom (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS*), plamena atomska spektrometrija (*Flame Atomic Spectroscopy, FAS*), kao i atomska apsorpciona spektrometrija sa grafitnom peći (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, GFAAS*). Dodatno, Versari i saradnici (2014) navode da su za određivanje sadržaja elemenata prisutnih u tragovima u vinima pouzdane i atomska apsorpciona spektroskopija (*AAS*), kao i indukovano kuplovana plazma sa atomskom emisionom spektrometrijom (*ICP-AES*).

Korišćenje *ICP* metoda kako u kvalitativnoj, tako i u kvantitativnoj analizi, ima brojne prednosti u odnosu na ostale tehnike. Pored mogućnosti određivanja velikog broja elemenata, jedna od možda najvažnijih prednosti je sposobnost simultane multielementne analize za relativno kratko vreme. *ICP* metode su osjetljive, imaju širok opseg linearnosti, a postupak pripreme uzoraka za analizu je prilično jednostavan. Kako

su na raspolaganju talasne dužine različitih osetljivosti, pruža se mogućnost detekcije širokog opsega koncentracija (Boss i Fredeen, 2004).

Na akumulaciju elemenata utiču mnogi faktori, a najvažniji su genetske osobine biljke, kao i okruženje u kojem biljka raste (osobine zemljišta, klimatski faktori, itd.) (Szefer i Nriagu, 2007). Elementi prisutni u vinu mogu se podeliti na endogene i egzogene. Endogeni elementi su najviše zastupljeni, a njihov sadržaj zavisi od tipa zemljišta u vinogradu, sorte i stepena zrelosti grožđa koje se koristi za vinifikaciju, kao i klimatskih faktora. Poreklo egzogenih elemenata u vinu povezano je sa spoljašnjim nečistoćama, koje se najčešće prenose iz grožđa u vino, ali nečistoće mogu dospeti u vino i u toku procesa proizvodnje. Shodno tome, razlike u sadržaju K, Ca i Cu mogu poticati od upotrebe đubriva u vinogradima. Pored toga, upotreba pesticida, fungicida i đubriva u toku rasta i razvoja grožđa može da dovede do povećanih sadržaja elemenata kao što su Cd, Cu, Mn, Pb i Zn u dobijenom vinu. Povećanje sadržaja Na, Ca ili Al može biti posledica dodavanja različitih bentonita, čija je svrha uklanjanje organskih jedinjenja iz vina i bistrenje vina. Zagađenja koja potiču iz životne sredine takođe mogu povećati količine nekih elemenata (Grindlay i sar., 2011).

Analiza elemenata ili minerala prisutnih u vinu, uz upotrebu različitih analitičkih postupaka, ima brojne namene. Joni metala imaju značajnu ulogu u oksido-redukcionim procesima od kojih u velikoj meri zavisi kvalitet vina. Neki metali, prisutni u vinima, imaju blagotvorna dejstva na zdravlje ljudi. Osim toga, konzumiranje vina u umerenim količinama može doprineti zahtevima ljudskog organizma za esencijalnim elementima, ali može imati i toksično dejstvo ukoliko su količine elemenata iznad dozvoljenih. Takođe, elementalni sastav može biti od velike koristi za potrebe procene autentičnosti, ali i kao indikacija potencijalnih promena u boji vina. Upravo iz pomenutih razloga stroga kontrola elementalnog sastava grožđa i vina je neophodna (Arvantoyannis i sar., 1999; Kelly i sar., 2005; Suhaj i Korenovska, 2005; Van Leeuwen i Seguin, 2006; Serapinas i sar., 2008; Grembecka i sar., 2009; Buglass, 2011; Grindlay i sar., 2011; Tariba, 2011; de Villiers i sar., 2012; Santos i sar., 2013).

Elementi kao što su Pb, Cd i As poznati su kao potencijalni toksini (Galani-Nikolakaki i sar., 2002). Ispitivanja migracije toksičnih elemenata u sistemu zemljište-vinova loza-grožđe iz zagađenih regiona pokazuju da većina toksičnih elemenata u vinovoj lozi uglavnom potiče iz aerosola koji pada iz atmosfere (Angelova i sar., 1999).

S druge strane, Mackenzie i Christy (2005) i Orescanin i saradnici (2003) su određivanjem elementalnog sastava zemljišta, grožđa i vina, zaključili da hemija zemljišta utiče na elementalni sastav grožđa, tačnije da je glavni izvor teških metala u grožđu, zapravo zemljište.

Ispitivanje mineralnog profila vina je metoda koja dobija sve veći značaj za klasifikaciju vina na osnovu geografskog porekla (Arvantoyannis i sar., 1999; Van Leeuwen i Seguin, 2006; Martin i sar., 2012; Đurdjić i sar., 2017), ali i sortnih karakteristika (Kruzlicova i sar., 2013). Kontrolisanje elementalnog sastava neophodno je obavljati u svim fazama proizvodnje vina, počevši od grožđa, zatim u toku procesa fermentacije, sazrevanja i starenja vina. U procesu vinifikacije značajne uloge imaju pojedini elementi u tragovima. Cink je neophodan za pravilan tok alkoholne fermentacije, dok Cu, Fe i Mn imaju uticaj na organoleptičke osobine vina, kao što su mutnoća i ukus (Galani-Nikolakaki i sar., 2002). Dakle, još jedan značajan doprinos koji pruža određivanje sadržaja različitih komponenti vina u svim fazama proizvodnje, jeste omogućavanje vinogradarima da kontrolišu proces dobijanja visoko kvalitetnih vina.

Naučnici iz Kine odredili su elementalni sastav 54 uzorka koji su obuhvatili zemljište, grožđe i vino sa sedam različitih vinogradarskih područja ove zemlje i ustanovili su postojanje korelacije između rezultata dobijenih za zemljište i grožđe, odnosno za grožđe i vino (Zou i sar., 2012). Sa druge strane, nije pronađena korelacija za rezultate dobijene za zemljište i vino. Do sličnih rezultata došli su i Geana i saradnici (2013) ispitujući uzorke sa prostora Rumunije. Tokom istraživanja koje je trajalo tri godine, u kome su učestvovali hemičari, enolozi i tehnolozi sa područja Italije proučavan je sastav elemenata u vinu sorte 'Moscato' i zemljištu na kojem je grožđe uzgajano (Aceto i sar., 2013). Stavljajući akcenat na lantanoide kao hemijske markere, došli su do rezultata koji jasno pokazuju da profil lantanoida praktično ostaje nepromenjen pri prolasku iz zemlje u grožđe, a zatim u vino. Međutim, do značajnih promena dolazi ukoliko se u vina doda bentonit.

Elementalni profil predstavlja jedan od kriterijuma za procenu autentičnosti vina. Elementi prisutni u tragovima u vinu potiču uglavnom iz zemljišta i lokalnog okruženja (životne sredine), a njihov sastav je jedinstven za određeni geografski položaj, tako da je elementalni profil grožđa usko povezan sa geološkim karakteristikama područja na kojem je grožđe uzgajano (Arvantoyannis, 2010). Sadržaj većine elemenata ne menja se

u toku proizvodnje, transporta i skladištenja. Upravo iz pomenutog razloga, tehnike koje su zasnovane na određivanju elementalnog sastava u kombinaciji sa hemometrijskim metodama mogu biti upotrebljene za klasifikaciju vina na osnovu vrste, sorte i geografskog porekla (Martin i sar., 2012).

Zbog velikog broja faktora koji utiču na sadržaj elemenata u vinovoj lozi (Kabata-Pendias, 2011; Ibrahim i sar., 2012; Likar i sar., 2015), kao i njihovih mogućih međusobnih uticaja i složenih hemijskih interakcija do kojih može doći između elemenata i drugih sastojaka biljke, tumačenje dobijenih rezultata je otežano. Metode multivarijantne hemometrijske analize značajno doprinose rešavanju ovog problema. Rezultati do kojih je došao Cugnetto sa saradnicima (2014) pokazali su da je multivarijantna statistička analiza mineralnog sastava grožđa, lišća i vina korisna metoda za klasifikaciju uzoraka na osnovu geografskog porekla, čak i kada je geološka podloga slična.

2.7. Različiti pristupi procene autentičnosti proizvoda biljnog porekla

Prema definiciji, procena autentičnosti podrazumeva analitički postupak kojim se potvrđuje da je hemijski sastav prehrambenih proizvoda u saglasnosti sa deklaracijom. Ispitivanja mogu da se odnose na poreklo (geografsko, botaničko ili genetičko), postupak proizvodnje ili tehnologiju prerade. Razvoj i primena postupaka za procenu autentičnosti od posebnog je značaja ne samo za potrošače, već i za proizvođače i izvoznike (Danezis i sar., 2016; Georgiou i Danezis, 2017). Osim ekonomskih, ispitivanje autentičnosti prirodnih proizvoda ima i bezbedonosni značaj, imajući u vidu da ilegalne prakse u prehrambenoj industriji mogu imati ozbiljne posledice na zdravlje ljudi (Cubero-Leon i sar., 2014). Kompleksan sastav namirnica, ali i stalni napredak ilegalnih postupaka, otežavaju njihovu analizu.

Tehnike koje se koriste za karakterizaciju, a opšte su prihvaćene u oblasti istraživanja autentičnosti proizvoda, pre svega geografskog i botaničkog porekla, obuhvataju nekoliko pristupa: *i*) klasičan *target* pristup, *ii*) određivanje profila (*food profiling*), *iii*) određivanje „otiska prsta“ (*food fingerprinting*), i *iv*) sveobuhvatni *foodomics* pristup, koji se zasniva na primeni brojnih tehnika iz oblasti hemije hrane i biologije (Esslinger i sar., 2014).

Princip klasičnog *target* pristupa je da se selektivnom pripremom uzorka izvrši analiza pojedinačne komponente ili grupe jedinjenja i da se kvalitativno i/ili kvantitativno okarakteriše uzorak. Ovakav pristup ne zahteva složeniju statističku obradu, te se za obradu rezultata primenjuju univarijantne statističke metode.

Princip određivanja profila (*food profiling*) može biti *target* analiza grupe jedinjenja ili *non-target* analiza sa naknadnom identifikacijom jedinjenja. Pri tom, priprema uzorka može biti kako selektivna tako i neselektivna, a rezultati kvalitativne i/ili kvantitativne analize obrađuju se primenom multivarijantnih statističkih metoda.

Određivanje „otiska prsta“ (*food fingerprinting*) je *non-target* analiza koja sledi nakon neselektivne pripreme uzorka, a rezultati su kvalitativni i/ili semikvantitativni i dalje se analiziraju primenom multivarijantnih statističkih metoda.

Kako se prilikom određivanja profila ispituje određena, prethodno definisana grupa metabolita, u ove svrhe najčešće se koriste *target* metode, koje su veoma osetljive i precizne, ali je priprema uzoraka često zahtevna i komplikovana. Takođe, za identifikaciju jedinjenja i za procenu autentičnosti uzoraka neophodno je postojanje odgovarajućih baza podataka (Antignac i sar., 2011; Cevallos-Cevallos i sar., 2009; Koek i sar., 2011).

Nasuprot tome, tehnike za određivanje „otiska prsta“ prirodnih proizvoda ne zasnivaju se na identifikaciji svih metabolita, već na prepoznavanju karakterističnog obrasca za dati matriks. Ovaj pristup, pri proceni autentičnosti namirnica takođe zahteva postojanje baze podataka uzoraka kako bi se izvršila autentifikacija, ali je priprema uzoraka jednostavna. Omogućava dobijanja višestrukih informacija, na primer, detekciju neočekivanih aditiva, kao i moguća odstupanja u hemijskom sastavu namirnica, uz upotrebu samo jedne analitičke metode, što je očigledna prednost u odnosu na *target* analitičke pristupe.

Na „otisak prsta“ prehrambenih proizvoda osim genetike, u znatnoj meri utiču i različiti spoljašnji faktori. Višestruki uticaj na sastav prehrambenih proizvoda predstavlja dodatni izazov u istraživanjima ovog tipa (Esslinger i sar., 2014). U slučaju vina, upravo zbog različitih uslova uzgoja i proizvodnje (u zavisnosti od lokacije vinograda, klime i primenjenih enoloških postupaka), krajnji proizvod iako dobijen od iste sorte vinove loze, može imati različit hemijski sastav.

Analitičke tehnike koje se koriste za procenu autentičnosti proizvoda, njegovog botaničkog porekla i geografske pripadnosti, obuhvataju različite hromatografske metode, zatim metode zasnovane na određivanju odnosa stabilnih izotopa, spektroskopske metode, *NMR*, tehnike masene spektrometrije, imunološke metode, kao i senzorsku i elementalnu analizu (Danezis i sar., 2016).

Metode koje se najčešće koriste za određivanje „otiska prsta“ hrane zasnovane su na spektroskopskim podacima dobijenim primenom nuklearne magnetne rezonancije, bliske infracrvene (*Near-infrared, NIR*) spektroskopije ili infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (*Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR*). Ove tehnike pružaju mogućnost analiziranja relativno malih količina uzoraka, čak i bez prethodne pripreme, na lagan, brz i nedestruktivan način. Mogućnost istovremenog određivanja velikog broja jedinjenja, čini ih metodama pogodnim za karakterizaciju kompleksnih bioloških sistema, kao što su prirodni proizvodi koje se koriste u ishrani. Pored pomenutih metoda, a u cilju povećanja osetljivosti, često se koristi masena spektrometrija (*Mass Spectrometry, MS*) kuplovana sa hromatografskim metodama, *GC* ili *HPLC*.

Najveću primenu u ispitivanju autentičnosti vina ima klasična *target* analiza. Prema podacima koje su objavili Drivelos i Georgiou (2012), procena geografskog porekla vina najčešće se postiže statističkom obradom rezultata dobijenih masenom spektrometrijom odnosa stabilnih izotopa ugljenika, vodonika, kiseonika i azota (*Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS*), kao i određivanjem profila elemenata u tragovima (primenom *AAS* i *ICP-AES*). Do ovih saznanja, pomenuti naučnici došli su detaljnim ispitivanjem primena metoda za određivanje geografskog porekla hrane i pića sa prostora Evropske unije od 2008. do početka 2012. godine. Pored pomenute primene, *IRMS* i metode elementalne analize, zajedno sa metodama za određivanje isparljivih komponenti, pružaju korisne informacije za otkrivanje ilegalnih postupaka i loše prakse pri proizvodnji vina (Christoph i sar., 2003; Lees, 2003). Kao potencijalne analitičke parametre za određivanje botaničkog porekla vina Chabreyrie i saradnici (2008) navode koncentraciju šikiminske kiseline i sadržaj proteina, dok von Baer i saradnici (2007) osim šikiminske kiseline, navode i sadržaj antocijana kao parametar za određivanje botaničkog porekla crvenih vina sa područja Čilea. Polifenolni otisak prsta može se upotrebiti za analizu sortnih karakteristika grožđa, dok se pojedini primarni metaboliti,

kao na primer amino kiseline i biogeni amini, smatraju pogodnim markerima tehnologije proizvodnje vina (Saurina, 2010). Publikovani radovi ukazuju i na mogućnost primene tankoslojne hromatografije za procenu sortne pripadnosti (Agatonovic-Kustrin i sar., 2017; Hosu i Cimpoiu, 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije, reagensi i standardi

U radu su korišćeni standardi fenolnih kiselina (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, gentisinska, elaginska, hlorogena, kofeinska, *p*-kumarinska, vanilinska, siringinska, rozmarinska, i ferulinska kiselina) i flavonoida (eskulin, galokatehin, epigalokatehin, katehin, epikatehin, galokatehin galat, katehin galat, epigalokatehin galat, morin, kempferol, kvercetin, rutin, miricetin, naringin, naringenin, florizin, arbutin, hesperetin, apigenin, luteolin, hiperozid, cinarozid i resveratrol), kao i troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) i *p*-dimetilaminocinamaldehyd (DMACA reagens), nabavljeni od firme *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka). Od iste firme nabavljeni su i HNO₃ i H₂O₂. Za pripremu standardnih rastvora, uzoraka, polaznih rastvora i razblaženja korišćena je ultračista voda (sistem za prečišćavanje vode (*ThermoFisher TKA MicroPure*), 0,055 μS/cm). Metanol i acetonitril (oba *HPLC* stepena čistoće), mravlja kiselina, sirćetna kiselina, etil-acetat i *Folin-Ciocalteu* reagens su proizvodi kompanije *Merck* (Darmstadt, Nemačka), a di (fenil)-(2,4,6-trinitrofenil) iminoazanijum, (*DPPH*[·]) firme *Fluka AG* (Buh, Švajcarska). Svi rastvarači i standardne supstance korišćeni u toku eksperimentalnog rada bili su p.a. čistoće. Filteri za prečišćavanje uzoraka (13 mm, *PTFE* membrane 0,45 μm) kupljeni su od firme *Supelko* (Belfont, Pensilvanija), a kolone *Strata C18-E* (500 mg, 3 mL) za čvrsto-tečnu ekstrakciju (*Solid Phase Extraction, SPE*) od *Phenomenex* (Torans, Kalifornija). Dva multielementna standarda, *SS-Low Level Elements ICV Stock* i *ILM 05.2 ICS Stock 1* nabavljena su od firme *VHG Labs (Inc-Part of LGC Standards, Manchester, NH 03103 USA)*, dok je za *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure*[®] proizvođač *Alfa Aesar GmbH & Co KG* (Nemačka). *TLC* ispitivanja su izvedena na komercijalno dostupnim pločama dimenzija 10 × 10 cm. Korišćene su dve vrste stacionarnih faza: celuloza (*Cellulose, Merck*, Nemačka) i silika-gel (*Silica gel 60 F₂₅₄, Merck*, Nemačka). Toluen, n-propanol i aceton nabavljeni su od firme *Zorka* (Šabac, Srbija).

3.2. Uzorci grožđa, lišća i vina

Ispitivanje je obuhvatilo uzorke grožđa, lišća i vina prikupljenih sa različitih vinogorja u Srbiji u periodu od 2012. do 2014. godine. Analizirane su internacionalne i autohtone, bele i crne sorte vinove loze (Tabela 1).

Tabela 1. Spisak ispitanih sorti vinove loze prikupljenih u periodu 2012. - 2014. godine, sa različitih lokacija u Srbiji.

Sorta	opis/vinogorje
Cabernet Sauvignon	crna, internacionalna/
Merlot	Gročansko, Mlava, Prokupačko
Cabernet Franc	
Shiraz	
Sangiovese	
Pinot Noir	
Vranac	
Muscat Hamburg	
Gamay	
Riesling	bela, internacionalna/
Chardonnay	Gročansko, Mlava, Prokupačko
Sauvignon Blanc	
Welschriesling	
Pinot Gris	
Župljanka	
Chasselas musque	
Pinot Blanc	
Petra	
Prokupac	crna, autohtona/
Crna Tamjanika	Gročansko, Prokupačko, Sremsko
Beogradska besemena	bela, autohtona/
Smederevka	Gročansko, Prokupačko, Trsteničko, Vršачko, Mlava,
Plovdina	
Bela Tamjanika	
Kreaca	

Svi uzorci grožđa čuvani su u zamrzivaču (na -20 °C). Uzorci u kojima je analiziran hemijski sastav pojedinačnih delova bobice ručno su razdvojeni na pokožicu, mezokarp i semenke. Svi delovi isprani su destilovanom vodom i prosušeni ubrusom. Pokožice i mezokarpi vraćeni su u zamrzivač do dalje pripreme. Semenke su sušene na vazduhu tokom dvadeset dana bez prisustva svetlosti, na sobnoj temperaturi, a zatim su samlevene u avanu. Uzorci lišća vinove loze pripremljeni su na isti način kao i semenke.

3.3. Proces mikroviniifikacije

Odmah po obavljenoj berbi, grožđe je transportovano u vinariju.

Proizvodnja crvenog vina. Proces proizvodnje crvenog vina započet je odvajanjem bobica od peteljki i muljanjem grožđa. Po završetku muljanja grožđa dodat je kalijum meta bisulfit (20 g/kg). Zatim je šira sa kominom prenetu u *inox* tankove gde se odvijao proces maceracije (za to vreme se odvija ekstrakcija aromatičnih materija i polifenola, prvenstveno iz pokožice). Dodat je i pektolitički enzim i izvršena inokulacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (20 mg/L), čiji je komercijalni naziv BdX (*Uvaferm Lallemand*). Maceracija je trajala pet dana na sobnoj temperaturi (24-26 °C), a zatim je obavljeno presovanje u hidrauličnoj presi - odvajanje šire od komine (čvrstih delova bobice). Nakon toga šira je prebačena u fermentatore od nerđajućeg čelika zapremine 50 L. Fermentacija je trajala 9 dana na temperaturi od 14 °C.

Proizvodnja belog vina. Odmah nakon odvajanja peteljki i muljanja dodat je pektolitički enzim i obavljeno je presovanje. Zatim je dodat kalijum metabisulfit u količini od 20 g na 100 kg grožđa. Šira je nakon toga prebačena u *inox* tankove. Posle 24-48 h odležavanja na talogu, šira je skinuta sa taloga i prebačena u fermentatore od nerđajućeg čelika zapremine 50 L. Dodati su selekcionisani kvasci *Saccharomyces cerevisiae* (20 mg/L), čiji je komercijalni naziv Qa23 (*Uvaferm Lallemand*). Fermentacija se odvijala na temperature od 14 °C i trajala je 14 dana.

Posle pretakanja, vina su čuvana u staklenim balonima, pod kontrolisanim uslovima. Hemijske analize uzoraka obavljene su četiri meseca nakon proizvodnje vina. Pre svake analize uzorci vina su profiltrirani kroz 0,45 µm *PTFE* membranske filtere.

3.4. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz grožđa i lišća vinove loze

Postupak ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, prikazan u radu Pavlović i saradnici (2013), je optimizovan i uz izvesne modifikacije primenjen za dobijanje ekstrakata polifenola iz grožđa, celog ploda i njegovih delova, kao i iz lišća vinove loze.

Zaleđeni uzorci celih bobica, pokožice i mezokarpa (približno oko 5 g) ekstrahovani su sa po 50 mL MeOH zakišelnog sa 0,1 % HCl na magnetnoj mešalici (na sobnoj temperaturi, u mraku), u periodu od sat vremena. Nakon filtriranja, postupak ekstrakcije je ponovljen još dva puta, nakon čega su dobijene frakcije spojene i uparene do suva na vakuum uparivaču, na temperaturi od 40 °C. Ostatak nakon uparavanja razblažen je u odmernom sudu zapremine 50 mL smešom MeOH/H₂O (60:40, v/v).

Procedura za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz semenki i lišća modifikovana je i prilagođena ekstrakciji suvih uzoraka. Kao ekstrakciono sredstvo upotrebljen je rastvor metanol/voda (70:30, v/v), zakišelnog sa 0,1% HCl. Odmereno je približno 1 g usitnjenog suvog uzorka i dodato 10 mL rastvarača. Ekstrakcije na magnetnoj mešalici, u trajanju od jednog sata, ponovljene su tri puta. Sve tri frakcije istog uzorka su sjedinjene i uparene na vakuum uparivaču (40 °C) do suva. Ostaci nakon uparavanja razblaženi su u odmernom sudu zapremine 25 mL smešom MeOH/H₂O (60:40, v/v).

Svi pripremljeni ekstrakti čuvani su u zamrzivaču (na -20 °C) do analiziranja. Pre svake analize ekstrakti su profiltrirani kroz 0,45 µm *PTFE* membranske filtere. Ovako pripremljeni ekstrakti dalje su korišćeni za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, sadržaja ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti. Ovi ekstrakti su takođe korišćeni za identifikaciju i određivanje sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja primenom tečne hromatografije sa masenom detekcijom. Ekstrakti koji su korišćeni za ispitivanje prisustva i količine pojedinačnih antocijana su pre analize dodatno frakcionisani čvrsto-tečnom ekstrakcijom.

3.5. Frakcionisanje ekstrakta (čvrsto-tečna ekstrakcija)

Koristeći tehniku čvrsto-tečne ekstrakcije (*Solid Phase Extraction, SPE*) izvršeno je odvajanje antocijana od neantocijanske frakcije u ekstraktima pokožica crnih sorti vinove loze i crvenim vinima.

Pre nanošenja ekstrakata i vina na *SPE* kolone izvršeno je kondicioniranje propuštanjem po 10 mL etil-acetata, metanola i HCl ($c = 0,01$ mol/L). Nakon pripreme naneto je 0,5 mL ekstrakata i vina, a zatim su kolone isprane sa 10 mL HCl ($c = 0,01$ mol/L) radi uklanjanja šećera, kiselina i drugih, u vodi rastvornih, supstanci. *SPE* kolone su potom sušene 5 minuta, propuštanjem struje azota, a zatim je na osušene sorbente naneto 5 mL etil-acetata u cilju dobijanja neantocijanske frakcije. Na kraju, adsorbovani antocijani su eluirani sa 1 mL zakišljenog metanola (0,01 mol/L HCl). Prikupljene frakcije su korišćene za dalju analizu polifenola (antocijana i neantocijana) tečnom hromatografijom sa masenom detekcijom.

3.6. Spektrofotometrijska ispitivanja grožđa, lišća i vina

Sva ispitivanja koja se zasnivaju na merenju apsorpcionih spektara (određivanje sadržaja ukupnih polifenola (*Total Phenolic Content, TPC*), određivanje sadržaja ukupnih antocijana (*Total Anthocyanin Content, TAC*) i određivanje antioksidativne aktivnosti (*Radical-Scavenging Activity, RSA*)) urađena su na *UV-VIS* spektrofotometru (*GBC UV-Visible Cintra 6*). Uzorci (ekstrakti i vina) pre merenja su profiltrirani korišćenjem filtera za prečišćavanje uzoraka (13 mm, *PTFE* membrane 0,45 μm), a zatim razblaženi ultračistom vodom. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima utvrđen je *Folin-Ciocalteu* metodom. Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je upotrebom *DPPH* reagensa, dok je za određivanje sadržaja ukupnih antocijana upotrebljena pH-diferencijalna metoda.

3.6.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Folin-Ciocalteu metoda je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na oksido-redukcionim reakcijama između reagensa i polifenolnih jedinjenja. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,5 mL ekstrakta, 0,5 mL destilovane vode i 2,5 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa (10%), u koju je nakon 5 minuta dodato 2 mL Na_2CO_3 (7,5%). Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata (u mraku, na sobnoj temperaturi), apsorbcija smeše merena je na talasnoj dužini od 765 nm. Slepa proba je umesto uzorka sadržavala

0,5 mL destilovane vode. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su rastvori galne kiseline u rasponu koncentracija od 20 do 100 mg/L (20, 40, 60, 80 i 100 mg/L). Dobijeni rezultati za ukupan sadržaj polifenola u ispitivanim uzorcima izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline (EGK) po g suvog uzorka (suva masa semenki i lišća vinove loze), mg ekvivalenta galne kiseline (EGK) po g zaleđenog uzorka (zaleđena masa pokožice, mezokarpa, kao i cele bobice), ili kao mg ekvivalenta galne kiseline (EGK) po 1L vina.

3.6.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je upotrebom $DPPH^{\cdot}$ reagensa. Metoda se zasniva na praćenju smanjenja apsorpcionog maksimuma $DPPH$ radikala, koje nastaje kao posledica oksido-redukcionih reakcija između ovog radikala i polifenola prisutnih u uzorku.

Procedura podrazumeva mešanje 0,1 mL ekstrakta (adekvatno razblaženog) i 4 mL metanolnog rastvora $DPPH^{\cdot}$ ($71 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), zatim se reakciona smeša snažno promućka i ostavi da stoji 1 h u mraku na sobnoj temperaturi. Kontrolni rastvor se priprema tako što se umesto uzorka, rastvor metanola (0,1 mL) pomeša sa rastvorom $DPPH^{\cdot}$. Redukcija $DPPH$ radikala se meri snimanjem apsorbcancije na talasnoj dužini od 515 nm. Relativna antioksidativna aktivnost (RAA) izračunava se kao procenat izreagovalog $DPPH^{\cdot}$, koristeći formulu:

$$RAA (\%) = \frac{(A_{DPPH} - A_{uzorak})}{A_{DPPH}} \times 100$$

gde je A_{DPPH} apsorbcancija samog rastvora $DPPH^{\cdot}$ (kontrolni rastvor), dok je A_{uzorak} apsorbcancija smeše koja sadrži rastvor $DPPH^{\cdot}$ i uzorak.

Metanolni rastvor troloksa u koncentracijama od 100 do 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ poslužio je za konstrukciju kalibracione krive koja je predstavljena kao grafik zavisnosti RAA (%) od koncentracije troloksa. Rezultati su prikazani kao mmol ekvivalenta troloksa (ET) po kg suvog uzorka (suva masa semenki i lišća vinove loze, mmol ekvivalenta troloksa

(ET) po kg zaleđenog uzorka (zaleđena masa pokožice, mezokarpa, kao i cele bobice), ili kao mmol ekvivalenta troloksa (ET) po 1L vina.

3.6.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana određen je u ekstraktima pokožica i celih bobica crnih sorti vinove loze, kao i u uzorcima crvenih vina.

Za određivanje ukupnog sadržaja antocijana korišćena je pH-diferencijalna metoda. Ispitivani rastvori su pripremljeni razblaživanjem ekstrakata i vina u rastvorima pufera pH 1,0 (HCl/KCl, 0,025 mol/L) i pH 4,5 (CH₃COOH/CH₃COONa, 0,4 mol/L). Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerene su apsorbancije oba rastvora na dve talasne dužine, na 520 nm i na 700 nm. Ultračista voda je korišćena kao slepa proba. Sadržaj ukupnih antocijana određen je preko formule:

$$\text{TAC (mg/L)} = (A \cdot M \cdot \text{DF} \cdot 1000) / (\epsilon \cdot l)$$

u kojoj je:

$$A = [(A_{520} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH4,5}}]$$

M - molekulska masa (M = 493,2 g/mol za malvidin-3-glukozid)

DF- faktor razblaženja (*Dilution Factor*)

ε- molarna apsorptivnost (ε = 28000 l/mol·cm za malvidin-3-glukozid)

l - dužina optičkog puta kivete (1 cm).

Sadržaj ukupnih antocijana predstavljen je kao g ekvivalenta malvidin 3-glukozida po kg zaleđenog uzorka pokožice ili bobice, ili kao g ekvivalenta malvidin 3-glukozida po 1L uzorka vina.

3.7. Analiza grožđa, lišća i vina primenom masene spektrometrije

3.7.1. Kvantifikacija polifenolnih jedinjenja primenom UHPLC-DAD MS/MS

Osnovni standardni rastvor koji je korišćen za identifikaciju polifenola pripremljen je kao smeša pojedinačnih standarda polifenolnih jedinjenja. Početni rastvor

koncentracije 1000 mg/L (koncentracija svakog pojedinačnog polifenola) napravljen je rastvaranjem standarda u metanolu. Daljim razblaživanjem ovog rastvora dobijena je serija od sedam standardnih rastvora sledećih koncentracija: 0,01, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 i 1,00 mg/L. Svi pripremljeni rastvori čuvani su u mraku na temperaturi od -20 °C. Kalibracione krive su konstruisane kao zavisnost površine pikova od koncentracije standarda (za svaki standard pojedinačno).

Sadržaj polifenolnih jedinjenja (neantocijanske frakcije) utvrđen je primenom *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistema sa *UV* detektorom (*Diode Array Detector, DAD*) i *TSQ Quantum Access Max* masenim spektrometrom koji se sastoji od detektora sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (*Triple quadrupol, QQQ*).

Polifenolna jedinjenja su razdvojena na C18 koloni (*Synchronis, ThermoFisher Scientific*), dimenzija 100 × 2,1 mm, 1,7 μm (na 40 °C). Upotrebljena je mobilna faza voda + 0,1% sirćetna kiselina (A) i acetonitril (B) u sledećem gradijentu koncentracija: 0,0-2,0 min 5% B; 2,0-12,0 min 5-95% B; 12,0-12,2 min 95-5% B; i 5% B do 15 min. Injekciona zapremina bila je 5 μL, protok 0,3 mL/min, a snimanje je vršeno na talasnim dužinama 254 nm i 280 nm. Za potrebe kvantifikacije polifenolnih jedinjenja korišćena je elektrosprej jonizacija u negativnom jonizacionom modu, na 200 °C, pri naponu spreja 5 kV i temperaturi kapilare od 300 °C. Jonizacija je obuhvatala opseg od 100 do 1000 *m/z*.

Za svaki standard snimljeni su molekularni jon i dva najintenzivnija fragmenta iz MS² spektra. Za kontrolu rada instrumenta korišćen je *Xcalibur* softver (verzija 2.2). Polifenoli su identifikovani direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Ukupan sadržaj svakog jedinjenja izračunat je integracijom površina pikova i izražen je kao mg/kg suvog uzorka (suva masa semenki i lišća vinove loze), ili kao mg/kg zaleđenog uzorka (zaleđena masa pokožice, mezokarpa, i cele bobice), odnosno kao mg/L vina.

3.7.2. Identifikacija antocijana primenom UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS

Za analizu antocijana, njihovo razdvajanje i identifikaciju, korišćen je sistem za ultra-efikasnu tečnu hromatografiju sa kvaternarnom pumpom (*Accela 600*) i autosemplerom (*Accela, ThermoFisher Scientific*), povezanim sa hibridnim masenim

spektrometrom visoke rezolucije (*UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*) sa elektrosprej jonizacijom (*Electro Spray Ionization, ESI*).

U cilju identifikacije antocijana, maseni spektrometar je bio podešen za rad u pozitivnom jonizacionom modu, a parametri jonskog izvora su bili podešeni na sledeći način: napon jonskog izvora 5 kV, napon kapilara 40 V, napon cevi -125 V, temperature kapilare 275 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N₂) 30 i 8 proizvodnih jedinica. Antocijani su analizirani na koloni *Hypersil gold C18* (100 × 2,1 mm, 1,9 μm, *Thermo Fisher Scientific*). Primenjen je program linearnog gradijentnog eluiranja sa mobilnom fazom ((A) voda + 1% mravlja kiselina i (B) acetonitril) u sledećem gradijentu koncentracija: 0,0-2,0 min 5% B; 2,0-12,0 min od 5% do 95% (B); 12,0-12,2 min od 95% do 5% (B); zatim 5% (B) u naredna 3 minuta. Injektovane su zapremine od 5 μl, a protok je podešen na 0,3 mL/min.

Za kontrolu rada instrumenta, prikupljanje i analizu podataka, korišćen je *Xcalibur* softver (verzija 2.1, *ThermoFisher*, Bremen, Nemačka). Antocijani u pokožici crnih sorti vinove loze i crvenim vinima su identifikovani na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika (maseni spektar, tačna masa, karakteristična fragmentacija i karakteristično retenciono vreme). MS spektri su snimani u opsegu od 100 do 1000 *m/z*. Podaci o molekulskim formulama nepoznatih jedinjenja dobijeni su snimanjem tačnih masa molekulskih jona ([M-H]⁻), a u cilju definisanja struktura nepoznatih jedinjenja upotrebljena je MS² fragmentacija.

3.8. Ispitivanje profila flavan-3-ola primenom TLC

Za ispitivanje profila flavan-3-ola u vinima i ekstraktima pokožice, mezokarpa i semenki, primenjena je tehnika uzlazne tankoslojne hromatografije. Uslovi hromatografskog odvajanja optimizovani su u cilju dobijanja profila flavan-3-ola. Primenjeni hromatografski sistemi su prikazani u Tabeli 2. *TLC* ispitivanja su izvedena na komercijalno dostupnim pločama dimenzija 10 × 10 cm. Korišćene su dve vrste stacionarnih faza: celuloza (*Merck*, Nemačka) i silika-gel 60 F₂₅₄ (*Merck*, Nemačka). Trokomponentna smeša rastvarača 1-propanol/voda/sirćetna kiselina je korišćena kao mobilna faza na celulozi. Prilikom ispitivanja na silika-gelu kao mobilna faza korišćena je smeša toluen/acetone/mravlja kiselina.

Uzorci (vina i ekstrakti pokožice, mezokarpa i semenki) i standardni rastvor (+)-katehina su naneti u vidu traka dužine 6 mm, 10 mm od dna pločice i 15 mm od levog kraja pločice pomoću automatskog aplikatora (Linomat 5, *Camag*).

Ploče su razvijane u vertikalnoj kadi, nakon što je atmosfera u kadi zasićena parama rastvarača tokom 15 minuta. Vreme razvijanja bilo je oko 20 minuta (pređeni put mobilne faze oko 8 cm). Sva ispitivanja su izvršena na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Nakon razvijanja pločice su sušene fenom 3 minuta.

Tabela 2. Karakteristike hromatografskih sistema korišćenih pri razdvajanju flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima.

Sistem	Stacionarna faza	Mobilna Faza	Zapremina uzoraka/standarda
I	celuloza	propanol-voda-sirćetna kiselina (4:2:1, v/v/v)	uzorci: 10 µL; standard: 3 µL
II	celuloza	propanol-voda-sirćetna kiselina (4:2:1, v/v/v)	uzorci 1-5: 5 µL; uzorci 6-10: 3 µL; standard: 3 µL
III	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)	uzorci 1-5: 5 µL; uzorci 6-10: 3 µL; standard: 3 µL
IV	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)	uzorci: 5 µL; standard: 5 µL
V	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)	uzorci: 5 µL; standard: 3 µL
VI	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)	uzorci: 10 µL; standard: 3 µL
VII	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)	uzorci: 20 µL; standard: 3 µL
VIII	silika-gel	toluen-aceton-mravlja kiselina (6:3:1, v/v/v)	uzorci: 20 µL; standard: 3 µL

Vizuelizacija zona flavanola izvršena je potapanjem pločica u rastvor p-dimetilaminocinamaldehyd (*DMACA* reagens) na nekoliko sekundi. *DMACA* reagens sa flavanolima gradi plavo obojena jedinjenja i omogućava njihovu identifikaciju. Pločice su potom sušene fenom tokom 3 minuta i fotografisane. Za pripremu rastvora za vizuelizaciju pomešano je 80 mg *DMACA* reagens sa 150 mL apsolutnog etanola i

16,25 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline. Rastvor je kvantitativno prenet u odmerni sud od 250 mL i dopunjen apsolutnim etanolom do crte. Žuti rastvor je čuvan zaštićen od svetlosti, u frižideru, sve do promene boje u narandžastu.

3.9. Elementalna analiza grožđa, lišća i vina primenom ICP-OES

Sastav elemenata u uzorcima grožđa, lišća i vina, određen je primenom indukovano spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES*) na instrumentu *Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (ThermoFisher Scientific, Cambridge, Velika Britanija)*. Uzorci vina pripremljeni su na sledeći način: odmereno je približno 100 g vina, koje je zatim upareno (na vakuum uparivaču) do polovine mase. Od ostatka nakon uparavanja, oko 10 g je odmereno u teflonske kivete, a zatim dodato 5 mL HNO₃ (65%) i 1 mL H₂O₂ (30%). U kivete u kojima su se nalazili odmereni uzorci grožđa (oko 2 g) i lišća (oko 0,75 g) dodato je po 8 mL HNO₃ 65% i po 1 mL H₂O₂ 30%.

Dalja priprema za elementalnu analizu podrazumevala je mikrotalasnu digestiju na 200 °C u trajanju od 20 minuta uz upotrebu *Ethos 1 (Milestone, Italija)* mikrotalasnog digestora, koji je opremljen rotorom *HPR-1000/10S*. Nakon digestije, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu, prebačeni u odmerni sud zapremine 25 mL i dopunjeni ultračistom vodom do crte. Na isti način je pripremljena i slepa proba. Tako pripremljeni uzorci direktno su mereni.

Za pravljenje standardnih rastvora za kalibraciju instrumenta korišćena su tri multielementna standarda, i to: *SS-Low Level Elements ICV Stock, ILM 05.2 ICS Stock 1* i *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®*.

Dobijeni rezultati su prikazani kao masa elementa po kg zaleđenog uzorka grožđa, kao masa elementa po kg suvog uzorka lišća vinove loze, odnosno kao masa elementa po 1L vina.

3.10. Statistička obrada rezultata

Analiza glavnih komponentata (*Principal Components Analysis, PCA*) urađena je primenom *PLS Toolbox* statističkog paketa (*Eigenvector Research, Inc. v. 7.12.0*) u

okviru *MATLAB* verzije 7.4.0.287 (R2007a) (*MathWorks, Inc.*, Natick, Masačusets, SAD). Pre izvodjenja analize glavnih komponenata svi podaci su autoskalirani.

Analiza varijansi (*Analysis of Variance, ANOVA*) je iskorišćena za utvrđivanje statistički značajne razlike između srednjih vrednosti grupa merenja. Za *ANOVA* analizu korišćen je *MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional)*. Dodatno, za definisanje statistički značajne razlike između pojedinačnih uzoraka primenjen je *Tukey test (NCSS softverski paket, www.ncss.com)*. U svim slučajevima kada je vrednost za nivo poverenja (*P*) bila manja od 0,05 dokazana je statistička značajnost.

4. NAŠI RADOVI

Izrada ove doktorske disertacije obuhvatila je nekoliko segmenata:

- Hemijska karakterizacija ploda vinove loze (*V. vinifera*) i mladih vina dobijenih u postupku mikroviniifikacije, sa jednog lokaliteta u Srbiji. Polifenolni profil (neantocijanska frakcija) određen je u pojedinačnim delovima bobice (pokožica, mezokarp i semenke), kao i u sortnim vinima. Definisana je profil antocijana u pokožicama crnih sorti i odgovarajućim crvenim vinima. Osim toga, određen je elementalni sastav grožđa i vina.
- Analiza polifenolnih jedinjenja u ekstraktima grožđa klonova sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc', u različitim fazama sazrevanja bobice. Određen je sastav pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj ukupnih antocijana, kao i antioksidativna aktivnost grožđa u tri različite faze razvoja, u periodima formiranja bobice, šarka i potpuno zrelog grožđa.
- Određivanje polifenolnog profila, antioksidativne aktivnosti i elementalnog sastava lišća različitih sorti vinove loze koje su uzgajane na dva lokaliteta u Srbiji. Takođe, određen je elementalni sastav uzoraka grožđa.
- Hemijska karakterizacija autohtonih sorti koje su uzgajane na različitim vinogorjima u Srbiji i mladih sortnih vina dobijenih u postupku mikroviniifikacije. U pojedinačnim delovima bobice (pokožica, semenke i mezokarp) i vinu određen je sadržaj ukupnih polifenola, antioksidativna aktivnost, kao i sadržaj ukupnih antocijana. Takođe, ispitan je profil flavan-3-ola pojedinačnih delova bobice i vina.

4.1. Hemijska karakterizacija grožđa i mladih sortnih vina

U okviru ovog dela istraživanja ispitan je polifenolni profil i elementalni sastav različitih crnih i belih vinskih sorti u fazi pune zrelosti, kao i mladih sortnih vina dobijenih od ispitivanog grožđa u postupku mikroviniifikacije. Analizirano je sedam crnih sorti ('Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Cabernet Franc', 'Shiraz', 'Sangiovese', 'Pinot Noir' i 'Prokupac') i šest belih sorti vinove loze ('Riesling', 'Chardonnay', 'Sauvignon Blanc', 'Welschriesling', 'Pinot Gris' i 'Petra'). Sve sorte su uzgajane na istoj lokaciji, u Beogradu, na oglednom dobru Poljoprivrednog fakulteta. U ispitivanim uzorcima grožđa i vina određen je sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost, a uz pomoć dostupnih standarda polifenolih jedinjenja i *UHPLC-DAD MS/MS* sistema određen je sadržaj pojedinačnih polifenola. Upotrebom *UHPLC-MS/MS Orbitrap* tehnike, identifikovani su antocijani prisutni u ekstraktima pokožica crnih sorti vinove loze i uzorcima crvenih vina. Dodatno, određen je elementalni sastav u svim uzorcima grožđa i vina pomoću *ICP-OES* sistema.

4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost semenki, pokožice i mezokarpa

Koristeći spektroskopske metode, određen je sadržaj ukupnih polifenola, kao i antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka. Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 3 može se zaključiti da su polifenoli uglavnom zastupljeni u semenkama i u pokožici, dok su veoma male količine pronađene u mezokarpu, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Garrido i Borges, 2013).

Srednja vrednost za *TPC* u semenkama crnih sorti iznosila je 69,59 g EGK/kg. 'Cabernet Franc' pokazao je najmanju vrednost za *TPC* (38,02 g EGK/kg), dok su najveće vrednosti pronađene u semenkama sorti 'Pinot noir' (102,98 g EGK/kg) i 'Prokupac' (101,25 g EGK/kg). Što se tiče semenki belih sorti, *TPC* se kretao u opsegu od 47,55 do 98,89 g EGK/kg. Antioksidativna aktivnost semenki je takođe veća od vrednosti koje su dobijene za pokožicu i mezokarp. Najveća *RSA* vrednost u semenkama crnih sorti pronađena je u uzorku 'Prokupac' (967,90 mmol ET/kg), a najmanja u uzorku 'Sangiovese' (406,59 mmol ET/kg). Od semenki belih sorti, najveći

antioksidativni potencijal pokazao je uzorak 'Pinot gris' (1039,92 mmol ET/kg), a najmanji hibridna sorta 'Petra' (586,11 mmol ET/kg). Srednja vrednost RSA u slučaju semenki crnih sorti iznosila je 657,92 mmol ET/kg, dok je u slučaju semenki belih sorti ta vrednost bila veća, 816,55 mmol ET/kg.

Pokožice crnih sorti imale su veći sadržaj ukupnih polifenola (od 7,21 g EGK/kg u uzorku 'Pinot noir', do 12,32 g EGK/kg u sorti 'Prokupac') u odnosu na pokožice belih sorti (od 0,39 g EGK/kg u 'Welschriesling', do 3,71 g EGK/kg u 'Pinot gris'). Najveće vrednosti za sadržaj polifenola, kao i antioksidativnu aktivnost, pronađene su u pokožici crne sorte 'Prokupac' ($TPC = 12,32$ g EGK/kg, $RSA = 132,59$ mmol ET/kg), a najmanje u uzorku bele sorte 'Welschriesling' ($TPC = 0,39$ g EGK/kg, $RSA = 26,25$ mmol ET/kg).

U svim ispitivanim sortama, sadržaj ukupnih polifenola bio je najmanji u mezokarpu i veoma malo se razlikovao među sortama, pri čemu je opseg iznosio 0,07-0,20 g EGK/kg. U ovom delu bobice pronađene su i najmanje vrednosti za antioksidativnu aktivnost, koje su takođe ujednačene među sortama.

Rezultati dobijeni za sadržaj ukupnih polifenola u pokožici i semenkama dobijeni u okviru ovog istraživanja su u saglasnosti sa već objavljenim rezultatima (Ky i sar., 2014), dok su vrednosti antioksidativnog potencijala značajno veće u odnosu na literaturne podatke (Rockenbach i sar., 2011).

Analiza varijanse (*Analysis of Variance, ANOVA*) nije ukazala na statistički značajnu razliku između sadržaja ukupnih polifenola ($P < -1$; $F = 0,035$; $F_{krit} = 4,844$) i antioksidativne aktivnosti ($P < -1$; $F = 2,239$; $F_{krit} = 4,844$) između semenki crnih i belih sorti vinove loze. Značajna razlika između crnih i belih sorti nije pronađena ni poredeći TPC ($P < -1$; $F_{krit} = 4,844$; $F = 0,197$) i RSA ($P < -1$; $F_{krit} = 4,844$; $F = 0,829$) mezokarpa. Nasuprot tome, značajne razlike između sorti pronađene su poređenjem ukupnih polifenola u ekstraktima ispitivanih pokožica ($P < -1$; $F_{krit} = 4,844$; $F = 76,748$) i antioksidativne aktivnosti pokožica ($P < -1$; $F_{krit} = 4,844$; $F = 50,480$). Dodatno poređenje rezultata postignuto je primenom *Tukey* testa kojim je ispitana značajnost razlike ($P \leq 0,05$) među pojedinačnim uzorcima (Tabela 3).

Tabela 3. Sadržaj ukupnih polifenola (*TPC*) i antioksidativna aktivnost (*RSA*) u semenkama, pokožici i mezokarpu ispitivanih sorti vinove loze.

Uzorak	<i>TPC</i> (g EGK/kg)			<i>RSA</i> (mmol ET/kg)		
	semenke	pokožica	mezokarp	semenke	pokožica	mezokarp
Crne sorte						
Cabernet Sauvignon	69,57±2,67 ^e	9,10±0,18 ^d	0,09±0,00 ^f	670,86±14,34 ^d	97,26±0,71 ^c	14,71±0,07 ^{cdef}
Merlot	77,38±0,97 ^d	8,26±0,18 ^e	0,12±0,01 ^{de}	481,69±10,89 ^f	92,31±1,41 ^d	12,13±0,03 ^f
Cabernet Franc	38,02±0,46 ⁱ	7,43±0,08 ^f	0,09±0,00 ^f	577,62±10,86 ^e	78,54±4,23 ^e	16,42±0,07 ^{bc}
Sangiovese	47,38±1,55 ^h	10,69±0,02 ^b	0,11±0,00 ^e	406,59±10,94 ^g	100,57±0,70 ^{bc}	18,15±0,92 ^b
Shiraz	50,54±0,19 ^{gh}	10,13±0,25 ^c	0,17±0,01 ^b	637,53±25,48 ^e	103,96±4,94 ^b	14,92±0,24 ^{cde}
Pinot Noir	102,98±0,58 ^a	7,21±0,10 ^f	0,20±0,01 ^a	863,29±10,91 ^b	95,10±3,53 ^{cd}	16,55±0,10 ^{bc}
Prokupac	101,25±5,23 ^a	12,32±0,19 ^a	0,07±0,00 ^g	967,90±3,64 ^b	132,59±4,24 ^a	16,33±0,64 ^{bc}
Bele sorte						
Riesling	84,42±0,19 ^c	0,57±0,00 ^j	0,12±0,00 ^{de}	830,26±10,95 ^c	30,26±0,70 ^{hi}	12,59±0,11 ^{ef}
Petra	47,55±0,46 ^h	1,06±0,01 ⁱ	0,12±0,00 ^d	586,11±25,26 ^e	30,57±0,35 ^{hi}	13,53±0,00 ^{def}
Sauvignon Blanc	54,26±1,16 ^g	0,51±0,00 ^j	0,09±0,00 ^f	624,37±25,87 ^e	33,65±1,40 ^h	15,96±0,27 ^{bcd}
Welschriesling	86,66±1,93 ^c	0,39±0,03 ^j	0,12±0,00 ^{de}	945,02±10,91 ^b	26,25±4,23 ⁱ	17,73±0,85 ^b
Chardonnay	62,34±0,19 ^f	2,04±0,05 ^h	0,07±0,00 ^g	873,62±0,00 ^b	46,86±2,40 ^g	14,35±0,03 ^{def}
Pinot Gris	96,89±2,51 ^b	3,71±0,09 ^g	0,15±0,00 ^c	1039,92±0,00 ^a	64,07±1,75 ^f	13,68±0,20 ^a

Različita slova u istoj koloni označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

Pored toga, vrednosti antioksidativne aktivnosti dobijene za semenke, pokožicu i mezokarp upoređeni su sa sadržajem ukupnih polifenola. Rezultati su ukazali na postojanje statistički značajne korelacije između *RSA* i *TPC* vrednosti u semenkama ($r = 0,76$) i pokožici ($r = 0,98$). Međutim, nije utvrđena korelacija između *RSA* i *TPC* vrednosti dobijenih za ekstrakte mezokarpa.

4.1.2. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina

Vrednosti dobijene za ukupne polifenole i antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka vina prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Sadržaj ukupnih polifenola (*TPC*) i antioksidativna aktivnost (*RSA*) mladih sorti vina.

Uzorak	<i>TPC</i> (g EGK/L)	<i>RSA</i> (mmol ET/L)
Crvena vina		
Cabernet Sauvignon	1,10 ± 0,01 ^b	8,04 ± 0,08 ^b
Merlot	0,89 ± 0,01 ^e	6,46 ± 0,32 ^d
Cabernet Franc	0,96 ± 0,00 ^d	6,57 ± 0,27 ^d
Sangiovese	1,00 ± 0,00 ^c	7,45 ± 0,05 ^c
Shiraz	0,67 ± 0,02 ^f	4,29 ± 0,11 ^f
Pinot Noir	0,95 ± 0,01 ^d	5,72 ± 0,24 ^e
Prokupac	2,60 ± 0,03 ^a	15,06 ± 0,43 ^a
Bela vina		
Riesling	0,20 ± 0,00 ^h	1,16 ± 0,09 ^{gh}
Petra	0,19 ± 0,00 ^{hi}	1,18 ± 0,07 ^g
Sauvignon Blanc	0,17 ± 0,00 ⁱ	1,07 ± 0,04 ^j
Welschriesling	0,22 ± 0,00 ^{gh}	1,15 ± 0,13 ^h
Chardonnay	0,19 ± 0,02 ^{hi}	1,14 ± 0,07 ^h
Pinot Gris	0,14 ± 0,01 ^j	1,10 ± 0,08 ⁱ

Različita slova u istoj koloni označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim crvenim vinima kretao se u opsegu od 0,67 g EGK/L ('Shiraz') do 2,60 g EGK/L ('Prokupac'). Očekivano, ove vrednosti su i do šest puta veće u odnosu na količine polifenola u belim vinima koje se kreću od 0,14 g EGK/L u vinu 'Pinot Gris', do 0,22 g EGK/L u vinu 'Welschriesling'.

Razlike u sadržaju polifenola u belim i crvenim vinima uglavnom potiču od razlika u polifenolnom sastavu između različitih sorti od kojih su vina napravljena, ali i usled različitih postupaka vinifikacije koji se koriste za proizvodnju crvenog i belog vina. Najveći deo polifenolnih jedinjenja u vinu potiče iz bobice, pre svega semenki i pokožice. S obzirom da u toku proizvodnje belih vina pokožica i semenke ne ulaze u proces fermentacije, kao i da je period kontakta između ovih čvrstih delova bobice i šire kratak, razlika između *TPC* vrednosti u belim i crvenim vinima je očekivana.

U literaturi se mogu pronaći brojni radovi u kojima su zabeležene različite vrednosti za sadržaj polifenola u crvenim vinima (Burns i sar., 2000; Stratil i sar., 2008; Kallithraka i sar., 2006; González-Neves i sar., 2013). Kao faktori koji utiču na sadržaj polifenola u crvenim vinima navode se sortne razlike, zrelost grožđa, klimatski uslovi, različite tehnike vinifikacije koje se koriste u proizvodnji crvenih vina, uslovi skladištenja, kao i proces starenja vina, što ukazuje na to da nije jednostavno poređenje vina sa različitih prostora u pogledu polifenolnog sadržaja i tumačenje. Ipak, poredeći naše rezultate sa podacima iz literature, primećen je sličan sadržaj ukupnih polifenola u vinu sa područja Češke (Stratil i sar., 2008) u slučaju crvenih vina (opseg *TPC* za crvena Češka vina iznosio je 0,85-1,97 g EGK/L), dok su vrednosti za bela vina niže u poređenju sa našim rezultatima. U crvenim vinima sa područja Grčke koje su ispitivali Kallithraka i saradnici (2006) opseg sadržaja polifenola *TPC* (0,62-3,20 g EGK/L) bio je nešto veći u poređenju sa našim rezultatima.

Od analiziranih crvenih vina najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je 'Prokupac' (15,06 mmol ET/L), a najmanju vino 'Shiraz' (4,29 mmol ET/L). Ove vrednosti su i do osam puta više u odnosu na rezultate dobijene za *RSA* u belim vinima (od 1,07 mmol ET/L u 'Sauvignon Blanc' do 1,18 mmol ET/L u uzorku 'Petra'). Primenom linearne regresione analize utvrđena je statistički značajna zavisnost ($r = 0,99$) između *TPC* i *RSA* vrednosti određenih za ispitivana vina, što ukazuje na to da antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka uglavnom potiče od prisutnih polifenola.

4.1.3. Polifenolni profil semenki, pokožice i mezokarpa

U ispitivanim ekstraktima semenki kvantifikovana su 22 polifenolna jedinjenja (Tabela 5). Ukupno pet hidroksibenzoevih kiselina (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, gentisinska i elaginska) kvantifikovano je u svim ekstraktima semenki, a dobijeni rezultati su ukazali na razlike između ispitivanih sorti vinove loze. Sadržaj galne kiseline u semenkama crnih sorti kretao se između 78,10 mg/kg ('Merlot') i 289,13 mg/kg ('Prokupac'), dok je u semenkama belih sorti taj opseg iznosio od 54,66 mg/kg ('Welschriesling') do 91,13 mg/kg ('Petra'). Ovi podaci su u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Gođevaci i saradnici (2010). Najveće količine elaginske kiseline kvantifikovane su u semenkama crnih sorti 'Sangiovese' (62,19 mg/kg) i 'Prokupac' (77,17 mg/kg). Dobijeni rezultati, zajedno sa podacima iz radova koje su objavili Gođevac sa saradnicima (2010) i Prodanov sa saradnicima (2013), u kojima se takođe navodi prisustvo elaginske kiseline u semenkama sorti 'Prokupac', 'Muscat Hamburg' i 'Malvar', koje pripadaju rodu *V. vinifera*, donekle su u suprotnosti sa rasprostranjenim mišljenjem da je prisustvo elaginske kiseline jedinstveno za plod roda *Vitis rotundifolia* (Sandhu i Gu, 2010). Količine protokatehuinske kiseline koja je pronađena u opsegu od 2,72 do 8,26 mg/kg i *p*-hidroksibenzoeve kiseline (opseg 7,50-13,71 mg/kg) u saglasnosti su sa podacima iz literature (Gođevac i saradnici, 2010).

Od hidroksicinaminskih kiselina, u semenkama su pronađene hlorogena, kofeinska i ferulinska kiselina. Hlorogena i kofeinska kiselina prisutne su u svim ispitivanim uzorcima, a najveće količine obe kiseline pronađene su u semenkama sorte 'Riesling' (hlorogena: 4,18 mg/kg, kofeinska: 1,58 mg/kg). Ferulinska kiselina nije identifikovana u semenkama dve sorte, 'Welschriesling' i 'Chardonnay'.

U literaturi se mogu pronaći podaci koji ukazuju na to da su u semenkama izolovanim iz grožđa, od svih polifenolnih jedinjenja najviše zastupljeni flavan-3-oli, kao i da postoje značajne razlike među sortama u pogledu njihovog sadržaja (González-Manzano i sar., 2004; Di Lecce i sar., 2014). Naša istraživanja polifenolnog profila semenki nedvosmisleno potvrđuju pomenute literaturne podatke. Jedinjenja iz grupe flavan-3-ola su detektovana u semenkama svih ispitivanih sorti, sa izuzetkom epigalokatehin galata koji nije identifikovan u dva uzorka ('Merlot' i 'Sangiovese').

Tabela 5. Sadržaj pojedinačnih polifenola u semenkama ispitivanog grožđa (rezultati su izraženi kao mg/kg suvog uzorka).

Polifenolna jedinjenja	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
Hidroksibenzoeve kiseline													
1 Galna kiselina	98,33 ^d	78,10 ^f	127,33 ^c	147,38 ^b	88,79 ^e	136,74 ^{bc}	289,13 ^a	80,55 ^f	91,13 ^{de}	80,58 ^f	54,66 ⁱ	65,75 ^h	71,09 ^g
2 Protokatehuinska kiselina	1,02 ^d	2,34 ^b	0,82 ^d	0,95 ^d	0,98 ^d	0,83 ^d	1,43 ^c	3,80 ^a	0,97 ^d	3,50 ^a	1,88 ^{bc}	2,22 ^b	0,92 ^d
3 <i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	12,79 ^{ab}	13,65 ^a	13,71 ^a	7,71 ^d	8,98 ^c	10,88 ^b	9,60 ^c	11,89 ^b	6,27 ^e	7,53 ^d	7,81 ^d	7,50 ^d	9,72 ^c
4 Gentisinska kiselina	15,03 ^{ef}	23,38 ^a	18,41 ^{bcd}	17,40 ^{bcd}	17,39 ^{bcd}	16,07 ^{def}	16,83 ^{cdef}	20,01 ^b	13,67 ^f	18,59 ^{bcd}	20,00 ^b	14,38 ^{ef}	19,20 ^{bc}
5 Elaginska kiselina	14,34 ^e	8,92 ^h	15,31 ^d	62,19 ^b	11,99 ^f	10,74 ^g	77,17 ^a	9,23 ^b	10,18 ^g	14,84 ^e	14,54 ^e	12,26 ^f	33,37 ^c
Hidroksicinaminske kiseline													
6 Hlorogena kiselina	2,27 ^c	3,58 ^b	2,92 ^c	2,98 ^c	2,94 ^c	2,89 ^c	2,90 ^c	4,18 ^a	2,91 ^c	2,88 ^c	2,90 ^c	2,89 ^c	2,90 ^c
7 Kofeinska kiselina	1,23 ^{ab}	1,21 ^{ab}	0,97 ^b	1,43 ^{ab}	1,20 ^{ab}	1,06 ^{ab}	0,96 ^b	1,58 ^a	1,24 ^{ab}	0,90 ^b	0,96 ^b	0,89 ^b	0,91 ^b
8 Ferulinska kiselina	1,09 ^e	0,65 ^g	0,41 ^h	0,78 ^f	0,44 ^h	2,17 ^c	1,75 ^d	2,66 ^b	0,75 ^f	1,65 ^d	–	–	3,24 ^a
Kumarini													
9 Eskulin	2,04 ^a	1,87 ^b	1,71 ^b	2,02 ^b	1,82 ^b	1,81 ^b	1,70 ^b	1,90 ^b	1,67 ^b	1,58 ^b	1,76 ^b	1,61 ^b	1,78 ^b
Flavan-3-oli													
10 Epigalokatehin	16,93 ^{bc}	3,73 ^c	4,23 ^c	4,31 ^c	3,84 ^c	39,29 ^a	12,28 ^{bc}	44,71 ^a	9,91 ^{bc}	40,36 ^a	21,77 ^b	13,47 ^{bc}	39,26 ^a
11 Katehin	691,13 ^b	29,24 ^{hi}	66,10 ^{gh}	133,77 ^{ef}	13,69 ⁱ	270,26 ^c	1111,66 ^a	77,91 ^h	180,00 ^d	44,94 ^{hi}	122,78 ^f	100,06 ^{fg}	163,02 ^{de}
12 Epikatehin	511,54 ^a	13,88 ⁱ	32,26 ^g	19,41 ^h	10,26 ⁱ	223,08 ^b	124,10 ^c	57,95 ^f	97,07 ^d	35,28 ^g	73,12 ^e	50,48 ^f	86,64 ^d

13	Galokatehin galat	625,11 ^{bc}	37,64 ^{ef}	21,72 ^f	196,06 ^{de}	28,27 ^{ef}	1454,60 ^a	788,80 ^b	337,11 ^{cd}	349,29 ^{cd}	480,93 ^c	485,46 ^c	266,43 ^d	481,71 ^c
14	Katehin galat	391,03 ^a	31,66 ^{ef}	89,26 ^{cdef}	40,40 ^{def}	21,19 ^f	253,11 ^b	296,07 ^b	133,19 ^{cd}	134,81 ^c	111,04 ^{cdef}	111,48 ^{cdef}	122,36 ^{cde}	139,53 ^c
15	Epigalokatehin galat	4,13 ^b	–	3,96 ^b	–	3,87 ^b	4,21 ^b	5,08 ^a	4,05 ^b	3,96 ^b	4,32 ^b	3,99 ^b	4,74 ^a	3,71 ^b
Flavonoli														
16	Kempferol	1,26 ^b	1,59 ^a	–	1,28 ^b	–	–	–	1,74 ^a	–	–	1,16 ^b	–	–
17	Kvercetin	29,89 ^a	1,15 ^{fg}	0,40 ^g	7,61 ^{def}	0,22 ^g	11,72 ^{cd}	10,30 ^{cde}	21,13 ^b	3,90 ^{efg}	6,04 ^{defg}	15,65 ^{bc}	14,75 ^{bc}	6,68 ^{defg}
18	Rutin	2,14 ^{abcd}	2,12 ^{bcd}	1,95 ^{bcde}	1,48 ^{de}	1,31 ^e	2,33 ^{abc}	2,09 ^{bcde}	3,00 ^a	3,09 ^a	1,90 ^{bcde}	2,60 ^{ab}	2,11 ^{bcd}	1,76 ^{cde}
19	Miricetin	2,56 ^a	2,22 ^{bc}	2,28 ^c	2,32 ^c	2,27 ^c	2,42 ^{bc}	2,32 ^{bc}	2,50 ^{ab}	2,48 ^{ab}	2,30 ^c	2,42 ^{bc}	2,30 ^c	2,34 ^{bc}
Flavanoni														
20	Naringin	1,55 ^{ab}	1,43 ^b	1,55 ^{ab}	1,64 ^{ab}	1,51 ^b	1,80 ^{ab}	2,09 ^a	1,63 ^{ab}	1,62 ^{ab}	1,78 ^{ab}	1,63 ^{ab}	1,54 ^{ab}	1,86 ^{ab}
21	Hesperetin	0,97 ^a	–	0,70 ^b	–	–	0,71 ^b	–	–	0,57 ^c	–	0,91 ^a	0,78 ^b	–
Flavoni														
22	Apigenin	1,22 ^a	0,79 ^{bcd}	0,48 ^{ef}	0,93 ^{bc}	0,47 ^f	0,93 ^{bc}	0,82 ^{bcd}	1,27 ^d	0,94 ^b	0,71 ^{bcde}	0,70 ^{cdef}	0,59 ^{def}	0,76 ^{bcd}

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$. Brojevi ispred jedinjenja u Tabeli 5 odgovaraju oznakama na Slici 7; 2A.

Galokatehin galat je dominantan flavan-3-ol u skoro svim semenkama, osim u semenkama sorti 'Cabernet Sauvignon', 'Cabernet Franc' i 'Prokupac'. U semenkama 'Cabernet Sauvignon' i 'Prokupac' preovlađuje katehin, čije količine redom iznose 691,13 mg/kg i 1111,66 mg/kg, dok u uzorku 'Cabernet Franc' najviše ima katehin galata (89,26 mg/kg). Najmanji sadržaj ukupnih flavan-3-ola u semenkama crnih sorti vinove loze pronađen je u uzorku 'Shiraz' (81,12 mg/kg). Nasuprot tome, ekstrakt semenki autohtone sorte 'Prokupac' pokazao je najveći ukupni sadržaj ispitivanih flavan-3-ola, sa najviše katehina i galokatehin-galata (81% od ukupnih flavan-3-ola, a skoro 50% od ove vrednosti pripada katehinu). U semenkama 'Pinot noir' sadržaj flavan-3-ola je takođe visok (ukupno 2244,56 mg/kg, sa najvećim udelom galokatehin-galata od oko 65%). Slični rezultati objavljeni su u istraživanju Ferreira i saradnika (2016) gde je ispitivan sadržaj polifenolnih jedinjenja u grožđu 'Pinot noir', 'Pinot gris' i 'Pinot blanco'. Najveći sadržaj epikatehina (i do 50 puta veći nego u drugim uzorcima) pronađen je u semenkama sorte 'Cabernet Sauvignon' (511,54 mg/kg). Što se tiče belih sorti, najmanji sadržaj ukupnih flavan-3-ola pronađen je u semenkama 'Chardonnay' (557,536 mg/kg), a najveći u semenkama uzorka 'Petra' (775,04 mg/kg). Iz ove grupe polifenolih jedinjenja u svim semenkama belih sorti najviše je zastupljen galokatehin galat.

Od flavonola, kvercetin, rutin i miricetin kvantifikovani su u svim analiziranim uzorcima semenki, dok je kempferol pronađen samo u pet uzoraka ('Cabernet Sauvignon', 'Riesling', 'Merlot', 'Sangiovese' i 'Welschriesling').

Naša istraživanja su pokazala da su u ispitivanim pokožicama u najvećim količinama prisutni polifenoli iz gupe flavonola (Tabela 6), što je u saglasnosti sa rezultatima iz literature (Mattivi i sar., 2006; Di Lecce i sar., 2014). U svim ispitivanim uzorcima pokožica pronađeni su kvercetin, i to u opsegu od 0,57 mg/kg ('Chardonnay') do 121,94 mg/kg ('Shiraz'), i rutin koji je detektovan u opsegu od 0,88 mg/kg u ekstraktu pokožice 'Pinot Noir' do 38,97 mg/kg u ekstraktu pokožice 'Sangiovese'. U pokožicama crnih sorti vinove loze dominantan flavonol je kvercetin, osim u pokožicama sorti 'Pinot Noir' i 'Cabernet Franc' u kojima je najviše pronađeno miricetina. Rutin se nalazi na trećem mestu po zastupljenosti u pokožicama crnih sorti vinove loze. U pokožicama belih sorti kvercetin je najviše zastupljen, sa izuzetkom uzoraka 'Chardonnay' i 'Pinot Gris', u kojima preovlađuje rutin.

Tabela 6. Sadržaj pojedinačnih polifenola u pokožicama ispitivanog grožđa (rezultati su izraženi kao mg/kg zaleđenog uzorka).

Polifenolna jedinjenja	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
Hidroksibenzojeve kiseline													
1 Galna kiselina	3,66 ^e	3,66 ^e	8,76 ^a	4,80 ^c	5,85 ^b	2,42 ^g	3,90 ^{de}	2,44 ^g	3,71 ^e	4,25 ^{cd}	4,57 ^c	2,78 ^f	2,34 ^g
2 Protokatehuinska kiselina	0,44 ^c	0,48 ^b	0,43 ^c	0,44 ^c	0,44 ^c	0,40 ^d	0,52 ^a	0,35 ^e	0,40 ^d	0,55 ^a	0,44 ^c	0,49 ^b	0,54 ^a
3 <i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	1,60 ^d	–	0,44 ^d	0,30 ^e	0,77 ^c	1,42 ^b	–	–	–	–	–	–	–
4 Gentisinska kiselina	6,74 ^d	–	–	10,16 ^a	8,74 ^b	5,64 ^e	7,15 ^d	–	7,98 ^c	1,47 ^f	–	5,87 ^e	5,90 ^e
5 Elaginska kiselina	1,06 ^d	0,64 ^g	3,85 ^b	1,59 ^c	0,96 ^d	0,73 ^f	0,73 ^f	0,44 ⁱ	105,46 ^a	0,55 ^h	0,92 ^e	0,17 ^j	0,42 ⁱ
Hidroksicinaminske kiseline													
6 Hlorogena kiselina	2,68 ^b	2,55 ^b	2,63 ^b	3,06 ^a	2,74 ^b	2,01 ^c	2,09 ^e	1,61 ^e	1,72 ^d	1,46 ^f	1,62 ^e	1,72 ^d	1,75 ^d
7 Kofeinska kiselina	0,59 ^e	0,53 ^f	0,50 ^g	0,84 ^a	0,67 ^c	0,54 ^f	0,73 ^b	0,65 ^{cd}	0,75 ^b	0,49 ^g	0,63 ^d	0,58 ^e	0,51 ^g
8 <i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,14 ^c	–	–	5,59 ^a	4,39 ^b	–	0,11 ^f	–	–	–	0,22 ^e	0,72 ^d	0,14 ^f
9 Ferulinska kiselina	1,59 ^g	2,20 ^f	10,33 ^c	6,62 ^e	6,98 ^e	2,12 ^f	2,46 ^f	11,83 ^b	8,92 ^d	10,94 ^c	8,95 ^d	13,95 ^a	13,33 ^a
Kumarini													
10 Eskulin	1,26 ^{bc}	1,08 ^d	0,90 ^e	1,13 ^d	1,30 ^b	0,91 ^e	1,31 ^b	1,43 ^{ab}	1,75 ^a	0,80 ^f	1,18 ^c	1,20 ^c	1,15 ^c
Flavan-3-oli													
11 Galokatehin	4,13 ^b	4,62 ^a	3,81 ^c	3,08 ^d	–	2,91 ^e	–	–	2,65 ^f	–	–	–	3,09 ^d
12 Epigalokatehin	1,95 ^d	2,24 ^b	2,19 ^{bc}	2,03 ^c	1,90 ^e	2,42 ^a	1,98 ^c	2,01 ^c	–	1,98 ^c	1,98 ^c	2,25 ^b	2,09 ^c

13	Katehin	5,90 ^c	7,47 ^a	–	3,93 ^d	5,42 ^c	–	–	–	3,27 ^e	–	6,60 ^b	–	–
14	Epikatehin	3,01 ^b	–	–	–	3,02 ^b	–	–	–	3,56 ^a	–	–	2,95 ^c	–
15	Galokatehin galat	9,04 ^b	8,62 ^c	9,02 ^b	–	–	–	–	9,06 ^b	9,01 ^b	–	8,94 ^b	11,60 ^a	8,93 ^b
16	Katehin galat	0,75 ^c	0,74 ^c	0,70 ^d	0,76 ^c	0,80 ^b	–	–	–	0,74 ^c	–	0,84 ^a	0,76 ^c	0,81 ^b
17	Epigalokatehin galat	–	–	–	–	–	–	–	2,13 ^b	2,15 ^b	1,95 ^c	2,10 ^{bc}	2,51 ^a	2,07 ^c
Flavonoli														
18	Morin	–	–	–	0,77 ^c	1,73 ^a	–	0,90 ^b	0,09 ^e	–	0,06 ^c	0,41 ^d	–	–
19	Kempferol	3,60 ^d	1,01 ^e	0,60 ^g	8,18 ^b	8,93 ^a	–	5,34 ^c	8,58 ^a	0,80 ^f	3,69 ^d	8,44 ^{ab}	0,60 ^g	0,92 ^e
20	Kvercetin	41,25 ^c	14,36 ^e	9,72 ^f	65,77 ^b	121,94 ^a	2,61 ^h	44,72 ^c	15,51 ^e	4,88 ^g	14,69 ^e	34,56 ^d	0,57 ⁱ	1,66 ⁱ
21	Rutin	15,82 ^c	10,91 ^d	2,26 ^g	38,97 ^a	14,99 ^c	0,88 ^b	1,30 ^h	4,39 ^e	3,23 ^f	2,06 ^g	22,61 ^b	11,67 ^d	21,98 ^b
22	Miricetin	17,77 ^c	14,29 ^d	11,55 ^e	46,64 ^a	35,14 ^b	12,40 ^e	7,70 ^f	1,17 ^g	1,18 ^g	1,34 ^g	1,28 ^g	–	1,21 ^g
Flavanoni														
23	Naringin	0,70 ^c	0,70 ^c	–	–	0,77 ^b	–	–	–	–	–	0,89 ^a	0,84 ^a	0,90 ^a
24	Hesperetin	–	0,44 ^f	0,40 ^g	1,21 ^c	3,09 ^a	–	–	0,52 ^{de}	–	0,56 ^d	2,30 ^b	0,48 ^e	0,50 ^e
Flavoni														
25	Apigenin	0,27 ^a	0,26 ^a	–	0,25 ^b	0,27 ^a	–	0,24 ^b	0,23 ^b	–	–	0,26 ^a	–	–
Stilbeni														
26	Resveratrol	9,61 ^b	5,80 ^d	–	–	–	5,64 ^d	13,42 ^a	–	9,80 ^b	6,53 ^c	10,10 ^b	–	–

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$. Brojevi ispred jedinjenja u Tabeli 6 odgovaraju oznakama na Slici 7; 2B.

Miricetin je u pokožicama crnih sorti pronađen u količinama od 7,70 mg/kg do 46,64 mg/kg, što je značajno veće u odnosu na rezultate dobijene za sadržaj pomenutog flavonola u pokožicama belih sorti vinove loze. U ekstraktu pokožice bele sorte 'Chardonnay' miricetin nije detektovan, dok je u ostalim pokožicama belih sorti kvantifikovan u opsegu od 1,17 mg/kg do 1,34 mg/kg. Ovi rezultati su u saglasnosti sa već publikovanim radovima, u kojima je miricetin predstavljen kao polifenol koji je karakterističan za pokožicu crnih sorti vinove loze i crvena vina (Castillo-Muñoz i sar., 2007).

Sadržaj flavan-3-ola u pokožicama ispitivanih crnih i belih sorti vinove loze prilično je ujednačen, što je u skladu sa podacima koji se mogu pronaći u literaturi (Rodríguez-Montealegre i sar., 2006; Pena-Neira i sar., 2007). Posmatrajući rezultate prikazane u Tabeli 6 može se primetiti da je epigalokatehin galat prisutan samo u pokožicama belih sorti.

Od ukupno pet kvantifikovanih hidroksibenzoevih kiselina, galna, protokatehuinska i elaginska kiselina pronađene su u svim ispitivanim ekstraktima pokožica. Sadržaj elaginske kiseline je naročito visok u uzorku 'Petra', hibridnoj sorti stvorenoj u Srbiji, i iznosi 105,46 mg/kg. Sa izuzetkom pokožice ove sorte, u drugim uzorcima sadržaj elaginske kiseline je veoma nizak i iznosi od 0,17 mg/kg do 3,85 mg/kg. Elaginska kiselina je prisutna u vinskim sortama roda *Vitis amurensis* L. i njenim hibridima (Zhao i sar., 2011), pa se može pretpostaviti da je visok sadržaj elaginske kiseline u hibridnoj sorti 'Petra' rezultat prisustva *V. amurensis* L. u njenom poreklu.

Resveratrol je identifikovan u ekstraktima sedam pokožica ispitivanih sorti. Uzorak sa najvećim sadržajem resveratrola u pokožici je 'Prokupac' (13,42 mg/kg). U ekstraktima pokožica sorti 'Riesling', 'Cabernet Franc', 'Sangiovese', 'Shiraz', 'Pinot Gris' i 'Chardonnay' resveratrol nije pronađen.

Broj kvantifikovanih polifenola i njihova količina u mezokarpu znatno su manji u poređenju sa brojem i količinom koja je određena u semenkama i pokožici ploda (Tabela 7).

Od svih hidroksibenzoevih kiselina, najviše je zastupljena gentisinska kiselina, čiji sadržaj nije mnogo varirao među uzorcima (od 1,10 mg/kg u sorti 'Sauvignon Blanc' do 1,61 mg/kg u sorti 'Pinot Gris').

Tabela 7. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u mezokarpu ispitivanih sorti (rezultati su izraženi kao mg/kg zaleđenog uzorka).

Polifenolna jedinjenja/uzorci	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Rhine Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
Hidroksibenzojeve kiseline													
1 Galna kiselina	0,38 ^f	0,41 ^e	0,63 ^b	0,42 ^e	0,63 ^b	0,74 ^a	0,39 ^f	0,44 ^e	0,41 ^e	0,40 ^f	0,49 ^d	0,59 ^c	0,43 ^e
2 Protokatehuinska kiselina	0,10 ^{bc}	0,13 ^a	0,12 ^{ab}	0,09 ^c	0,10 ^b	0,10 ^b	0,09 ^c	0,09 ^{bc}	0,09 ^c	0,08 ^e	0,09 ^c	0,10 ^{bc}	0,08 ^e
3 <i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	0,18 ^b	0,05 ^d	0,02 ^e	0,04 ^e	0,16 ^b	0,07 ^c	–	–	0,05 ^d	–	–	0,43 ^a	0,06 ^d
4 Gentisinska kiselina	1,17 ^f	1,33 ^c	1,32 ^c	1,24 ^e	1,30 ^d	1,37 ^c	1,19 ^f	1,33 ^c	1,16 ^f	1,10 ^g	1,38 ^c	1,46 ^b	1,61 ^a
5 Elaginska kiselina	0,08 ^b	–	0,06 ^c	0,03 ^d	0,03 ^d	0,02 ^d	–	–	0,11 ^a	0,02 ^d	–	0,02 ^d	0,03 ^d
Hidroksicinaminske kiseline													
6 Hlorogena kiselina	0,29 ^b	0,30 ^b	0,31 ^b	0,29 ^b	0,30 ^b	0,32 ^a	0,30 ^b	0,33 ^a	0,32 ^a	0,30 ^b	0,32 ^a	0,31 ^a	0,30 ^b
7 Kofeinska kiselina	0,15 ^{fg}	0,30 ^d	0,19 ^f	0,16 ^f	0,41 ^c	0,27 ^e	0,16 ^f	0,50 ^b	2,72 ^a	0,13 ^g	0,50 ^b	0,32 ^d	0,15 ^f
8 Ferulinska kiselina	0,63 ^g	0,96 ^f	3,09 ^{bc}	0,23 ^h	3,36 ^b	0,25 ^h	1,04 ^f	3,65 ^a	2,96 ^c	3,21 ^b	2,99 ^c	2,28 ^d	1,47 ^e
Kumarini													
9 Eskulin	0,25 ^d	0,29 ^c	0,25 ^d	0,18 ^g	0,31 ^c	0,34 ^b	0,23 ^e	0,38 ^a	0,30 ^c	0,17 ^g	0,41 ^a	0,26 ^d	0,20 ^f
Flavan-3-oli													
10 Epigalokatehin	0,37 ^c	–	0,39 ^c	0,42 ^b	–	–	0,42 ^b	–	0,46 ^a	0,42 ^b	0,39 ^c	0,42 ^b	0,38 ^c
11 Galokatehin galat	1,70 ^c	1,89 ^b	1,95 ^{ab}	–	–	1,71 ^c	1,77 ^c	1,69 ^c	1,92 ^{ab}	–	1,68 ^c	1,74 ^c	2,04 ^a
12 Epigalokatehin galat	0,43 ^b	0,41 ^c	0,44 ^b	0,39 ^d	0,41 ^c	0,39 ^{cd}	0,42 ^{bc}	0,42 ^{bc}	0,41 ^c	0,41 ^c	0,42 ^{bc}	0,44 ^b	0,49 ^a
Flanonoli													
13 Rutin	0,12 ^b	0,12 ^b	0,12 ^b	0,11 ^b	0,13 ^a	0,13 ^a	–	0,12 ^b	0,12 ^b	0,11 ^b	0,13 ^a	0,12 ^a	0,12 ^b
Flavanoni													
14 Hesperetin	–	0,07 ^c	–	0,08 ^b	0,07 ^b	–	–	0,07 ^b	0,08 ^{ab}	0,05 ^c	–	0,09 ^a	0,06 ^c

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$. Brojevi ispred jedinjenja u Tabeli 7 odgovaraju oznakama na Slici 7 (2C).

Tri hidroksicinaminske kiseline (ferulinska, hlorogena i kofeinska kiselina) identifikovane su u svim ispitivanim ekstraktima mezokarpa. Ferulinska kiselina imala je najveći sadržaj u jedanaest uzoraka, dok je u svega dva uzorka ('Sangiovese' i 'Pinot Noir') dominirala hlorogena kiselina.

Epigalokatehin galat je jedini flavan-3-ol pronađen u svim uzorcima mezokarpa u opsegu od 0,39 mg/kg ('Sangiovese' i 'Pinot Noir') do 0,49 mg/kg ('Pinot Gris'). Rutin, jedini kvantifikovani flavonol, pronađen je u mezokarpu svih ispitivanih sorti, osim u uzorku 'Prokupac'.

4.1.4. Polifenolni profil vina

Sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida u ispitivanim sortnim vinima prikazani su u Tabeli 8. Od svih ispitivanih polifenolnih jedinjenja u crvenim vinima najviše je zastupljena galna kiselina, u rasponu od 14,34 mg/L ('Shiraz') do 34,23 mg/L ('Prokupac'). U preglednom radu koji su objavili Arribas i saradnici (2012) navedeno je da se količine galne kiseline u crvenim vinima kreću u intervalu od 2 do 500 mg/L. U vinu autohtone sorte 'Prokupac' pronađen je i najveći sadržaj elaginske kiseline (2,62 mg/L) u poređenju sa ostalim ispitivanim vinima. Količine preostalih hidroksibenzoevih kiselina (ferulinske i siringinske) u analiziranim vinima u skladu su sa vrednostima koje se mogu pronaći u literaturi (Cheynier i Teissedre, 1998), ili niže u odnosu na literaturne podatke (Rodríguez-Delgado i sar., 2000).

U ispitivanim uzorcima vina najveći sadržaj protokatehuinske kiseline pronađen je u sortama 'Sangiovese' (2,79 mg/L) i 'Shiraz' (2,45 mg/L), a vanilinske kiseline u uzorku 'Pinot Noir' (1,84 mg/L). Soleas i saradnici (1997) su takođe u vinu sorte 'Pinot Noir' utvrdili veći sadržaj vanilinske kiseline (3,70 mg/L) u odnosu na druga analizirana vina ('Cabernet Sauvignon', 'Cabernet Franc' i 'Merlot'). Osim iz grožđa, vanilinska kiselina u vino može da se ekstrahuje i iz drvenih buradi u kojima se vina skladište, kao i iz plutanih čepova (Varea i sar., 2001). Ipak, kako su analizirana mlada vina koja nisu starila u buradima, pretpostavka je da vanilinska kiselina u uzorcima ispitanim u ovom radu potiče iz grožđa.

Tabela 8. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u vinima (rezultati su predstavljani kao mg/L).

	Polifenolna jedinjanja	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
Hidroksibenzojeve kiseline														
1	Galna kiselina	15,58 ^d	15,62 ^d	17,97 ^c	19,54 ^b	14,34 ^e	15,23 ^d	34,23 ^a	0,39 ^f	0,38 ^f	0,20 ^g	0,19 ^g	0,11 ^h	0,37 ^f
2	Elaginska kiselina	0,33 ^d	0,25 ^e	0,32 ^d	1,39 ^b	0,15 ^{gh}	0,37 ^c	2,61 ^a	0,07 ⁱ	0,24 ^e	0,12 ^h	0,19 ^f	0,19 ^f	0,17 ^g
3	Protokatehuinska kiselina	0,62 ^g	0,74 ^e	0,82 ^d	2,79 ^a	2,45 ^b	0,68 ^f	1,10 ^c	0,16 ^j	0,09 ^j	0,53 ^h	0,23 ⁱ	0,21 ⁱ	0,14 ^k
4	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	0,15 ^e	0,30 ^c	0,35 ^b	0,09 ^g	0,28 ^c	0,46 ^a	0,20 ^d	0,07 ^h	0,03 ⁱ	0,09 ^g	0,08 ^g	0,11 ^f	0,09 ^g
5	Vanilinska kiselina	0,30 ^e	0,45 ^d	0,48 ^d	0,65 ^c	1,20 ^b	1,84 ^a	0,64 ^c	-	0,04 ⁱ	0,12 ^f	0,08 ^h	0,10 ^g	0,08 ^h
6	Siringinska kiselina	0,78 ^e	1,19 ^d	1,73 ^c	0,52 ^f	1,97 ^b	3,13 ^a	1,86 ^{bc}	0,02 ^k	0,03 ^j	0,07 ^h	0,04 ⁱ	0,13 ^g	0,07 ^h
Hidroksicinaminske kiseline														
7	Kofeinska kiselina	0,49 ^g	0,44 ^h	0,59 ^f	0,52 ^{fg}	0,74 ^{de}	0,71 ^e	1,56 ^a	1,06 ^b	0,57 ^f	0,31 ⁱ	0,77 ^d	0,28 ^j	0,82 ^c
8	Hlorogena kiselina	0,01 ^f	0,01 ^f	0,01 ^f	-	-	0,04 ^b	0,08 ^a	0,02 ^d	0,02 ^d	0,02 ^d	0,03 ^c	0,02 ^e	0,02 ^d
9	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,45 ^g	0,58 ^f	1,01 ^c	0,62 ^f	1,49 ^b	0,79 ^d	1,64 ^a	0,48 ^g	0,20 ^j	0,37 ^h	0,72 ^e	0,32 ⁱ	0,69 ^e
10	Ferulinska kiselina	0,02 ⁱ	0,05 ^h	0,10 ^f	0,10 ^f	0,08 ^g	0,18 ^d	0,31 ^a	0,21 ^c	0,09 ^{fg}	0,09 ^g	0,33 ^a	0,12 ^e	0,24 ^b
Flavan-3-oli														
11	Katehin	0,10 ^g	-	0,14 ^{fg}	1,56 ^b	-	0,23 ^e	6,04 ^a	0,01 ⁱ	0,91 ^c	0,19 ^f	0,05 ^h	-	0,33 ^d
12	Epikatehin	0,15 ^d	-	0,15 ^d	2,94 ^b	-	0,28 ^c	6,54 ^a	-	-	-	-	-	-

Flavonoli														
13	Hiperozid	0,01 ^d	0,05 ^b	0,03 ^c	0,05 ^b	0,05 ^b	-	0,45 ^a	-	-	-	-	-	-
14	Miricetin	0,58 ^b	-	-	0,80 ^c	-	-	1,13 ^a	-	-	-	-	-	-
Flavanoni														
15	Naringin	-	-	-	0,10 ^b	0,02 ^{de}	0,02 ^d	0,16 ^a	-	-	0,01 ^e	0,01 ^e	0,03 ^c	0,02 ^d
16	Naringenin	-	-	-	-	-	-	0,03 ^a	-	0,01 ^c	0,02 ^b	0,01 ^c	0,01 ^c	0,01 ^c
Flavoni														
17	Cinarozid	0,23 ^g	0,27 ^f	0,31 ^c	0,23 ^g	0,24 ^g	0,28 ^f	0,61 ^b	0,50 ^d	0,11 ^h	0,32 ^e	0,26 ^f	0,67 ^a	0,55 ^c
18	Apigenin	-	-	-	-	-	-	0,02 ^a	-	-	0,01 ^b	0,01 ^b	0,01 ^b	0,01 ^b
19	Resveratrol	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-
20	Florizin	0,04 ^h	0,03 ⁱ	0,05 ^g	0,11 ^b	0,08 ^e	0,03 ⁱ	0,14 ^a	0,03 ⁱ	0,03 ⁱ	0,05 ^g	0,10 ^b	0,05 ^g	0,07 ^f
21	Arbutin	-	1,02 ^f	1,50 ^c	-	1,44 ^d	1,58 ^b	2,30 ^a	1,03 ^f	1,04 ^f	1,42 ^d	1,34 ^e	1,57 ^b	-
22	Eskulin	-	0,25 ^d	0,29 ^a	0,08 ⁱ	-	0,15 ^f	0,21 ^c	0,12 ^g	0,09 ⁱ	0,10 ^h	0,18 ^d	0,09 ^{ij}	0,16 ^e

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $p < 0,05$. Brojevi ispred jedinjenja u Tabeli 8 odgovaraju oznakama na Slici 8A.

Posmatrajući rezultate dobijene kvantifikacijom hidroksibenzoevih kiselina u svim uzorcima vina, može se primetiti da samo vanilinska kiselina nije pronađena u jednom uzorku ('Riesling'), dok su ostale kiseline (galna, elaginska, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva i siringinska) prisutne u svim ispitivanim uzorcima. Sadržaj ovih kiselina je značajno manji u belim vinima u odnosu na crvena vina ($P < 0,0001$; $F = 50,02$; $F_{krit} = 4,84$). Galna kiselina je dominantna hidroksibenzoeva kiselina u tri uzorka belih vina ('Riesling' (0,39 mg/L), 'Petra' (0,38 mg/L) i 'Pinot Gris' (0,37 mg/L)), dok je u uzorcima 'Sauvignon Blanc', 'Welschriesling' i 'Chardonnay' najviše zastupljena protokatehuinska kiselina.

Hidroksicinaminske kiseline (kofeinska, hlorogena, *p*-kumarinska i ferulinska) pronađene su u svim belim vinima i prepoznate su kao dominantna klasa polifenolnih jedinjenja u ovim uzorcima. Najveći ukupan sadržaj svih kiselina određen je u vinu 'Welschriesling' (1,85 mg/L), što je u skladu sa podacima iz literature (Garrido i Borges, 2013). Hidroksicinaminske kiseline su takođe karakteristika većine crvenih vina, osim hlorogene kiseline koja nije identifikovana u uzorcima 'Sangiovese' i 'Shiraz' (Tabela 8). Od crvenih vina, u vinu autohtone sorte 'Prokupac' pronađena je najveća količina hidroksicinaminskih kiselina (u zbiru 3,59 mg/L). Pojedinačno, u svim ispitivanim vinima (crvenim i belim) najviše su zastupljene *p*-kumarinska i kofeinska kiselina.

Iz grupe flavan-3-ola, katehin je identifikovan u većini ispitivanih vina, dok je epikatehin pronađen u samo pet uzoraka. U vinu 'Sangiovese' sadržaj katehina (2,94 mg/L) je skoro duplo veći u odnosu na sadržaj epikatehina (1,56 mg/L), dok su u ostala četiri uzorka njihove količine slične. Katehin i epikatehin su kvantifikovani u najvećoj količini u uzorku 'Prokupac' (6,04 mg katehina/L i 6,54 mg epikatehina/L). U ispitivanim uzorcima grožđa sve bele sorte imale su male količine flavan-3-ola, što bi moglo da objasni njihov nizak sadržaj i u belim vinima.

U sortama 'Prokupac' i 'Pinot Noir', katehin i epikatehin kvantifikovani su samo u semenkama. Njihovo odsustvo u pokožici i smanjena mogućnost ekstrakcije iz semenki mogući su razlozi zbog kojih je u mladom vinu sorte 'Pinot Noir' pronađen nizak sadržaj ova dva jedinjenja, manji u poređenju sa rezultatima do kojih su došli drugi naučnici (Burns i sar. 2000; Goldberg i sar. 1998). Goldberg i saradnici (1998) analizirali su preko 800 uzoraka crvenih vina iz 14 vinskih regiona širom sveta (različitih sorti, sa različitim procesima vinifikacije, uslovima starenja i starosti vina) i

istakli 'Pinot Noir' kao vino sa najvećim sadržajem katehina i epikatehina u poređenju sa ostalim ispitivanim sortama. U ovom radu se takođe navodi da hladniji regioni sa većim sadržajem vlage mogu da doprinesu većim količinama flavan-3-ola, naročito u vinu 'Pinot Noir'. Katehin i epikatehin nisu identifikovani u vinima 'Merlot' i 'Shiraz', a semenke ove dve sorte imale su najniže količine ovih jedinjenja. U belim vinima katehin je kvantifikovan u niskim količinama (od 0,01 mg/L u 'Riesling' do 0,91 mg/L u 'Petra'), dok prisustvo epikatehina nije zabeleženo ni u jednom uzorku. U vinu 'Chardonnay' ni katehin ni epikatehin nisu detektovani.

Od ispitivanih flavonola, vino 'Prokupac' imalo je najveći sadržaj hiperozida (0,45 mg/L) i miricetina (1,13 mg/L) u poređenju sa ostalim uzorcima. Pomenuta jedinjenja nisu detektovana u vinu 'Pinot Noir'. Miricetin nije kvantifikovan ni u vinima 'Merlot', 'Cabernet Franc' i 'Shiraz', dok su količine hiperozida u ovim sortama bile niske. Pored toga, miricetin nije kvantifikovan u uzorcima belog vina, što je u saglasnosti sa podacima dostupnim u literaturi, gde se ovaj flavonol navodi kao jedinjenje prisutno isključivo u pokožici i vinima crnih sorti vinove loze (Castillo-Muñoz i saradnici, 2007).

Nizak sadržaj naringina i naringenina određen je u pojedinim uzorcima vina. Oba flavanona pronađena su u četiri bela vina ('Welschriesling', 'Sauvignon Blanc', 'Chardonnay' i 'Pinot Gris'), a od crvenih vina samo u uzorku 'Prokupac', u kojem su pronađene i njihove najveće količine (0,16 mg naringina/L i 0,03 mg naringenina/L).

Cinarozid je pronađen u svim ispitivanim vinima u količinama od 0,11 mg/L ('Petra') do 0,67 mg/L ('Chardonnay'). Apigenin je kvantifikovan u manjoj količini (od 0,01 mg/L do 0,02 mg/L) u odnosu na cinarozid i to samo u četiri uzorka belog vina ('Welschriesling', 'Sauvignon Blanc', 'Chardonnay' i 'Pinot Gris') i jednom crvenom vinu ('Prokupac').

Florizin je pronađen u svim uzorcima, a najveći sadržaj je bio u vinu 'Prokupac' (0,14 mg/L). Arbutin nije detektovan u vinima 'Cabernet Sauvignon', 'Sangiovese' i 'Pinot Gris', a u ostalim uzorcima njegov sadržaj je bio u opsegu od 1,02 mg/L (u vinu 'Merlot') do 2,30 mg/L (u vinu 'Prokupac'). Prisustvo florizina i arbutina u vinima sa prostora Hrvatske potvrdili su u svom radu Budić-Leto i saradnici (2017). Arbutin je jedinjenje koje se često koristi kao dodatak kozmetičkim preparatima koji se koriste za izbeljivanje kože (Migas i Krauze-Baranowska, 2015). Kumarin eskulin kvantifikovan

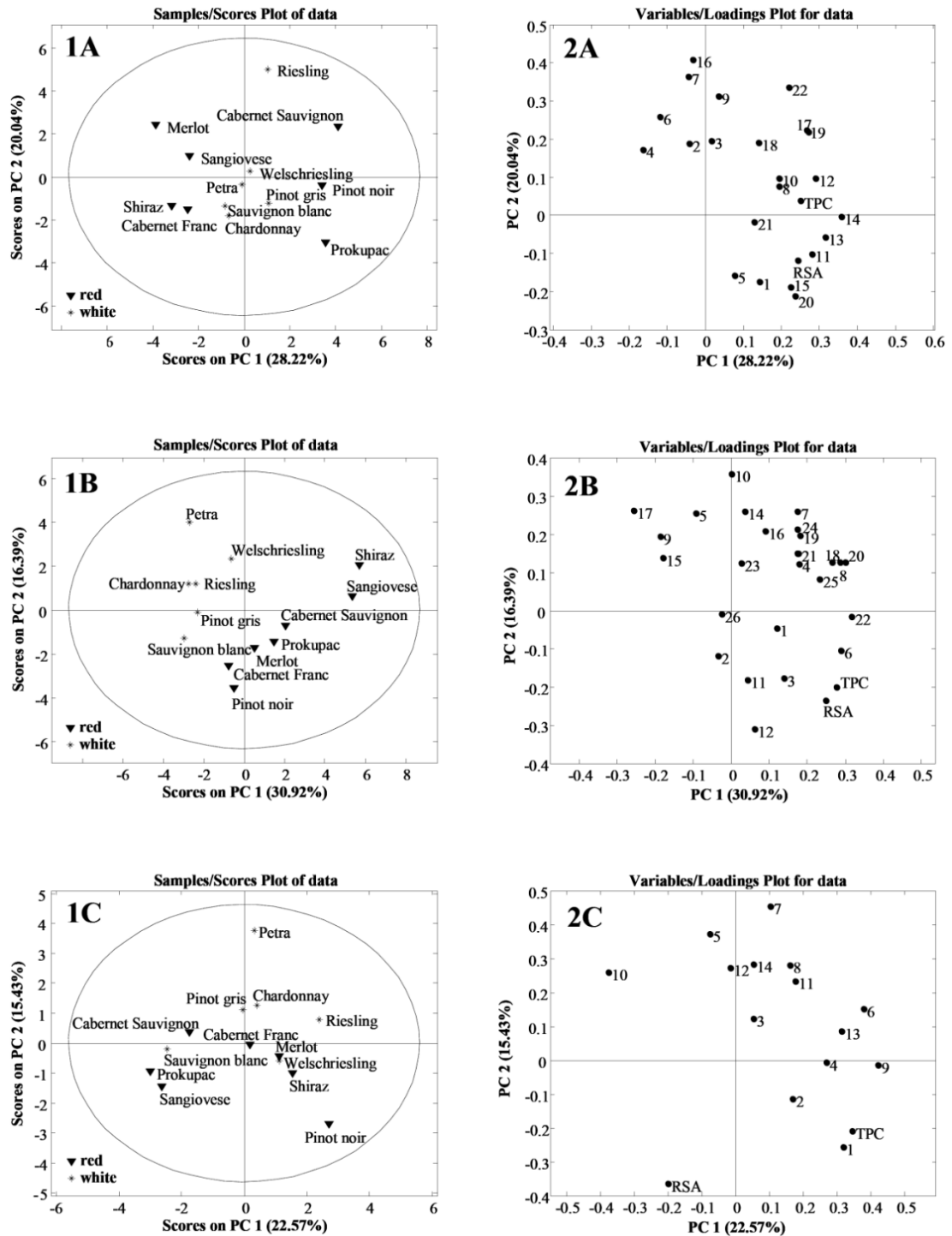
je u jedanaest uzoraka, dok je resveratrol pronađen samo u autohtonom vinu 'Prokupac' u količini od 0,06 mg/L.

4.1.5. Rezultati analize glavnih komponenata

U cilju dalje analize dobijenih rezultata, a radi utvrđivanja kriterijuma za klasifikaciju i diferencijaciju analiziranih uzoraka grožđa i vina, primenjena je analiza glavnih komponenata. Sadržaj ukupnih polifenola, antioksidativna aktivnost i sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja korišćeni su kao nezavisno promenljive u analizi glavnih komponenata.

Analiza glavnih komponenata semenki, pokožice i mezokarpa. PCA je primenjena posebno na podatke dobijene za pokožicu, mezokarp i semenke (Slika 7). Dimenzije početnih matrica bile su: 13 (broj uzoraka semenki) × 24 (broj varijabli), 13 (broj uzoraka pokožica) × 28 (broj varijabli) i 13 (broj uzoraka mezokarpa) × 16 (broj varijabli). Za obradu podataka korišćena je matrica kovarijansi sa autoskaliranjem.

Grafici skorova i varijabli semenki ispitivanih sorti prikazani su na Slici 7 (1A i 1B). Osam glavnih komponenata opisuje 94,90% od ukupne varijabilnosti. Prva komponenta prikazuje 28,22%, druga 20,04%, a treća 15,14% od ukupne varijabilnosti. Kao što se može videti sa grafika skorova, potpuno razdvajanje semenki nije moguće, mada postoje izvesna grupisanja. Semenke crnih sorti podeljene su u dva klastera. Za ovakvo razdvajanje zaslužne su uglavnom razlike u sadržaju flavan-3-ola. Uzorci 'Merlot', 'Sangiovese', 'Shiraz' i 'Cabernet Franc' imaju manje količine flavan-3-ola u poređenju sa ostalim uzorcima i grupisani su u jedan klaster. Sa druge strane, uzorci 'Cabernet Sauvignon', 'Pinot noir' i 'Prokupac' izdvojili su se po visokom sadržaju ovih jedinjenja. U okviru ovog klastera posebno se izdvojio uzorak semenki autohtone sorte 'Prokupac' zahvaljujući većem sadržaju galne kiseline, elaginske kiseline, epigalokatehin galata, katehina i naringina. Iz grupe belih sorti, semenke 'Riesling' izdvojile su se zahvaljujući pre svega velikim količinama kempferola, apigenina i kofeinske kiseline.



Slika 7. PCA: grafici skorova za semenke (1A), pokožicu (1B) i mezokarp (1C) ispitivanih sorti vinove loze; grafici varijabli za semenke (2A), pokožicu (2B) i mezokarp (2C) ispitivanih sorti. Brojevi na slici 2A odgovaraju oznakama u Tabeli 5, brojevi na slici 2B odgovaraju oznakama u Tabeli 6, a brojevi na slici 2C odgovaraju oznakama u Tabeli 7.

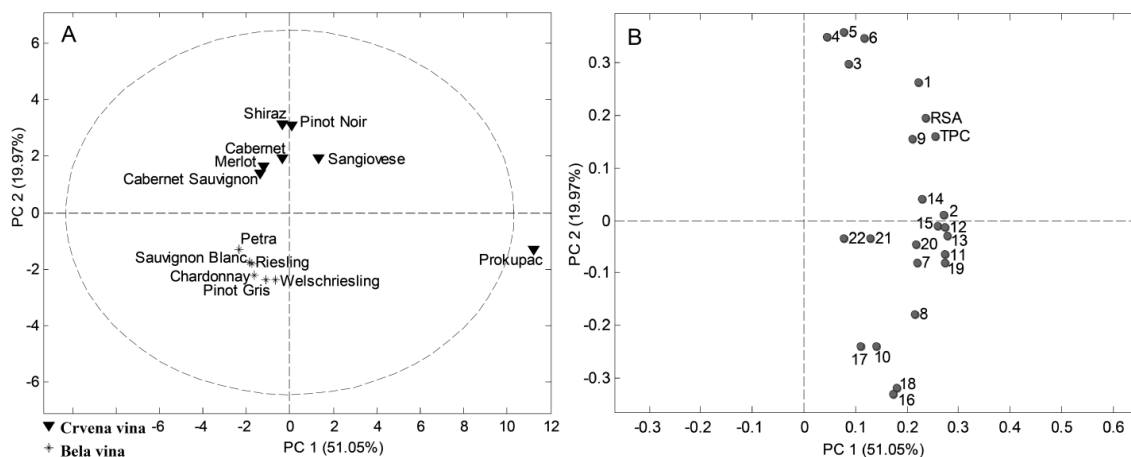
PCA u slučaju pokožice ispitivanih sorti rezultirala je modelom u kojem prvih osam komponenata opisuje 94,35% od ukupne varijabilnosti, pri čemu prva komponenta opisuje 30,92%, druga 16,39%, a treća 13,05% od ukupne varijabilnosti. Na dobijenom grafiku skorova (Slika 7, 2A) može se uočiti jasna podela pokožica na osnovu boje ispitivanog grožđa (sorte sa belom i obojenom pokožicom). Razdvajanje je uslovljeno većim sadržajem hlorogene kiseline i miricetina u pokožicama crnih sorti, ali i prisustvom *p*-hidroksibenzove kiseline koja nije detektovana u pokožici belih sorti (Slika 7, 2B). Dodatno, pokožice belih sorti su se izdvojile po prisustvu epigalokatehina, jedinjenja koje nije identifikovano u crnim sortama. Od belih sorti posebno se istakla pokožica sorte 'Riesling' usled znatno većeg sadržaja elaginske kiseline u odnosu na sve druge ispitivane uzorke.

Multivarijantna analiza mezokarpa ispitivanih sorti ukazala je na nemogućnost razlikovanja sorti vinove loze na osnovu polifenolnog profila ovog dela bobice (Slika 7, 3A i 3B). Na grafiku skorova (Slika 7, 3A) jedino su primetna izdvajanja mezokarpa hibridne bele sorte 'Petra', zahvaljujući znatno većim sadržajem kofeinske i elaginske kiseline u odnosu na ostale uzorke, kao i crne sorte 'Pinot noir' gde je veći sadržaj ukupnih polifenola i galne kiseline u odnosu na preostale uzorke napravio razliku.

Analiza glavnih komponenata vina. Dimenzije početne matrice bile su 13 (broj uzoraka vina) \times 24 (broj promenljivih). Kao nezavisno promenljive upotrebljene su količine pojedinačnih polifenolnih jedinjenja (neantocijanske frakcije), *TPC* i *RSA*. Rezultat *PCA* je petokomponentni model kojim je opisano 91,04% ukupnog varijabiliteta. *PC1* opisuje 51,05%, a *PC2* 19,97% od ukupnog varijabiliteta. Visok procenat varijabiliteta opisan je sa prve dve komponente, što ukazuje na mogućnost korišćenja polifenolnih jedinjenja kao pokazatelja sortnih specifičnosti različitih uzoraka vina. *PCA* korelacioni matriks (Slika 8A) ukazuje na razdvajanje vina na dve grupe (crvena i bela vina).

Na grupisanje crvenih vina najviše su uticale veće količine pet hidroksibenzoevih kiselina (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska i siringinska kiselina), jedne hidroksicinaminske kiseline (*p*-kumarinska kiselina), kao i veći sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u ovim vinima u odnosu na

bela (Slika 8B). Sa druge strane, grupisanje belih vina najviše je povezano sa većim sadržajem hlorogene i ferulinske kiseline, kao i naringenina, cinarozida i apigenina.



Slika 8. PCA: grafik skorova (A); grafik varijabli (B) odgovornih za grupisanje crvenih i belih uzoraka vina. Brojevi na slici B odgovaraju oznakama u Tabeli 8.

Posmatrajući PCA grafik skorova (Slika 8A), može se primetiti da se 'Prokupac' nalazi van *HotellingT2* elipse, pa predstavlja spoljnu vrednost. Ova srpska autohtona sorta izdvojila se zahvaljujući i do nekoliko puta većim sadržajem elaginske kiseline, kofeinske kiseline, katehina, epikatehina, hiperozida, miricetina, naringina i resveratrola u poređenju sa drugim analiziranim vinima.

4.1.6. Profil antocijana grožđa i vina

Antocijani u ekstraktima pokožica crnih sorti i crvenim vinima identifikovani su korišćenjem *UHPLC-MS/MS Orbitrap* tehnike. Identifikacija je izvršena na osnovu monoizotopske mase i poređenjem masenih fragmenata sa postojećim podacima o *MS* fragmentaciji (Xing i sar., 2015). Podaci o identifikovanim jedinjenjima: naziv jedinjenja, srednja retencionna vremena (t_R), molekulske formule, izračunate mase, molekulske joni, odstupanja od tačne mase (mDa), kao i *MS/MS* fragmenti prikazani su u Tabeli 9. Ovakav pristup omogućava da se dobiju semikvantitativni podaci na osnovu kojih je moguće izvesti određene zaključke o prisustvu i količini pojedinih jedinjenja. Takođe, bilo je moguće izvršiti uporednu analizu antocijanskog profila grožđa i sortnog vina.

Tabela 9. Karakterizacija antocijana u pokožici ispitivanog grožđa upotrebom UHPLC-MS/MS Orbitrap.

Naziv jedinjenja	t_R , min	Molekulska formula, M^+	Izračunata masa jona, M^+	Molekulski jon, M^+	Δ mDa	MS/MS Fragmentacija, %
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 1	5,54	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	465,10007	2,68	[465]: 303 (100)
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 1	5,73	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	449,10498	2,86	[449]: 287 (100)
Petunidin 3-O-heksozid izomer 1	5,83	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479,11840	479,11540	3,00	[479]: 317 (100)
Malvidin 3,5-O-diheksozid	5,95	$C_{29}H_{35}O_{17}^+$	655,18688	655,18280	4,08	[655]: 493 (100), 331 (80)
Peonidin 3-O-heksozid	6,04	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463,12349	463,12073	2,76	[463]: 301 (100)
Malvidin 3-O-heksozid	6,1	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	493,13405	493,13080	3,25	[493]: 331 (100)
Petunidin 3-O-acetilheksozid	6,4	$C_{24}H_{25}O_{13}^+$	521,12897	521,12598	2,99	[521]: 317 (100)
Malvidin 3-O-acetilheksozid izomer 1	6,46	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	535,14462	535,14111	3,51	[535]: 331 (100)
Peonidin 3-O-acetilheksozid	6,66	$C_{24}H_{25}O_{12}^+$	505,13405	505,13104	3,01	[505]: 301 (100)
Delfinidin 3-O-p-kumaroilheksozid	6,67	$C_{30}H_{27}O_{14}^+$	611,13953	611,13586	3,67	[611]: 465 (5), 303 (100)
Malvidin 3-O-acetilheksozid izomer 2	6,72	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	535,14462	535,14117	3,45	[535]: 331 (100)
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 2	6,77	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	465,09991	2,84	[465]: 303 (100)
Delfinidin 3-O-heksuronid	6,79	$C_{21}H_{19}O_{13}^+$	479,08202	479,07883	3,19	[479]: 303 (100)
Malvidin 3-O-kafeoilheksozid	6,86	$C_{32}H_{31}O_{15}^+$	655,16575	655,16182	3,93	[655]: 331 (100)
Cijanidin 3-O-p-kumaroilheksozid	6,88	$C_{30}H_{27}O_{13}^+$	595,14462	595,14087	3,75	[595]: 287 (100)
Petunidin 3-O-p-kumaroilheksozid	6,93	$C_{31}H_{29}O_{14}^+$	625,15518	625,15122	3,96	[625]: 317 (100), 302 (5)
Peonidin 3-O-p-kumaroilheksozid	7,13	$C_{31}H_{29}O_{13}^+$	609,16027	609,15668	3,59	[609]: 301 (100), 286 (10)
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 2	7,15	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	449,10509	2,75	[449]: 287 (100)
Malvidin 3-O-p-kumaroilheksozid	7,16	$C_{32}H_{31}O_{14}^+$	639,17083	639,16693	3,90	[639]: 331 (100)
Petunidin 3-O-heksozid izomer 2	7,21	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479,11840	479,11578	2,62	[479]: 317 (100)

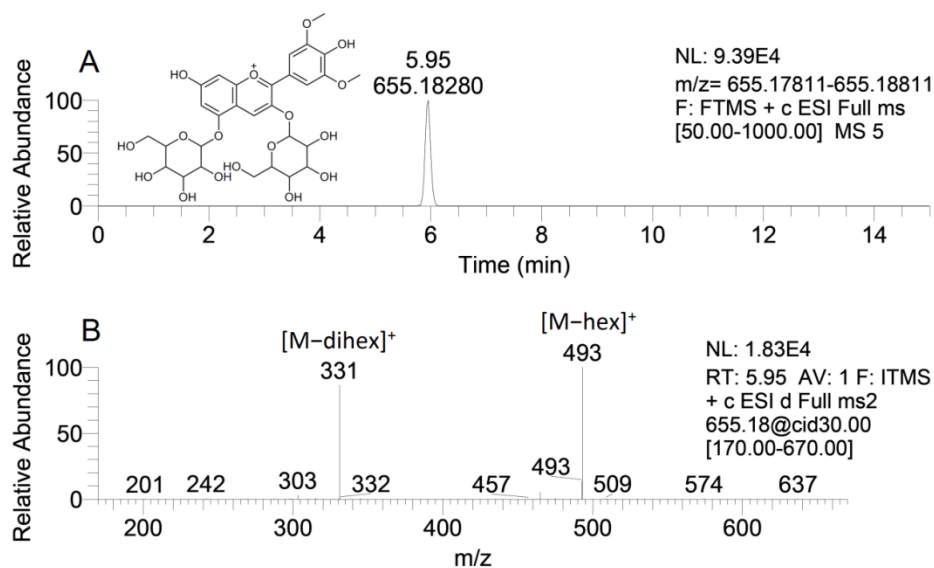
Antocijani u pokožici crnih sorti vinove loze. U okviru karakterizacije antocijana u ispitivanim uzorcima grožđa identifikovano je 20 derivata malvidina, delphinidina, petunidina, cijanidina i peonidina. Površine pikova za sve identifikovane antocijane prikazane su u Tabeli 10.

Kao što je već navedeno u literaturi (Wang i sar., 2003), u *V. vinifera* sortama dominantni su 3-*O*-monoglukozidi antocijana, pre svega malvidin 3-*O*-glukozid i njegovi acetyl- i kumaroil-derivati. Naša ispitivanja pokazala su da je malvidin 3-*O*-heksozid najzastupljeniji 3-*O*-monoheksozid u ispitivanim uzorcima, zatim slede peonidin 3-*O*-heksozid i delphinidin 3-*O*-heksozid (Tabela 10). Kumaroil derivati antocijana pronađeni su u svim ispitivanim pokožicama, a malvidin 3-*O*-kumaroil heksozid je najviše zastupljen. U radu Ferreira i saradnika (2016) navedeno je prisustvo petunidin-3-*O*-*p*-kumaroil glukozida, peonidin 3-*O*-*p*-kumaroil glukozida i malvidin 3-*O*-*p*-kumaroil glukozida u pokožici sorte 'Pinot Noir'. U okviru našeg istraživanja dokazano je prisustvo još nekih kumaroil derivata u pokožici sorte 'Pinot Noir', i to delphinidin 3-*O*-*p*-kumaroil heksozid i cijanidin 3-*O*-*p*-kumaroil heksozid.

Suprotno tvrdnjama da su 3,5-*O*-diglukozidi antocijana karakteristični samo za sorte vinove loze koje ne pripadaju rodu *V. vinifera* (González-Neves i sar., 2004; Liang i sar., 2008), Xing i saradnici (2015) dokazali su prisustvo diglukozida delphinidina, malvidina i peonidina u sorti 'Cabernet Sauvignon' koja pripada rodu *V. vinifera*, a Boselli i saradnici (2008) pronašli su diglukozide malvidina i peonidina u vinu koje je dobijeno od grožđa lokalne sorte koja takođe pripada rodu *V. vinifera*. I naša istraživanja su ukazala na prisustvo malvidin 3,5-*O*-diheksozida, u tragovima, u svim ispitivanim pokožicama. Stoga, ovo bi mogao biti prvo istraživanje u kome je potvrđeno prisustvo diglukozidnih formi antocijana u pokožicama sorti 'Merlot', 'Cabernet Franc', 'Shiraz', 'Sangiovese', 'Pinot Noir' i 'Prokupac'. Potvrda ovakvih tvrdnji je zasnovana na podacima dobijenim na osnovu masene spektrometrije visoke rezolucije, kao i MS/MS fragmentacije. Jonski hromatogram u pozitivnom jonizacionom modu i struktura molekula malvidin 3,5-*O*-diheksozida prikazani su na Slici 9A. Molekulski jon malvidin 3,5-*O*-diheksozid eluiran je na 5,95 min sa MS/MS osnovnim pikom m/z 493 [M-heksozil]⁺ i sekundarnim MS/MS pikom m/z 331 [M-diheksozil]⁺ (Slika 9B).

Tabela 10. Površine pikova za antocijane identifikovane u ekstraktima pokožica ispitanih sorti.

Naziv jedinjenja	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot noir	Prokupac
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 1	53,33	90,07	67,19	32,46	6,50	112,17	6,64
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 1	15,14	14,66	20,53	55,15	2,60	15,34	1,91
Petunidin 3-O-heksozid izomer 1	63,39	75,62	98,73	37,90	12,65	136,13	13,52
Malvidin 3,5-O-diheksozid	0,68	0,19	1,47	0,08	0,92	2,24	0,88
Peonidin 3-O-heksozid	95,84	70,29	164,69	33,98	60,86	78,55	30,31
Malvidin 3-O-heksozid	401,58	393,04	462,74	60,27	126,98	569,47	159,35
Petunidin 3-O-acetil heksozid	0,30	0,36	0,34	–	0,30	–	0,08
Malvidin 3-O-acetil heksozid izomer 1	1,73	1,91	2,18	–	0,99	–	0,13
Peonidin 3-O-acetil heksozid	0,63	0,32	0,57	–	0,11	–	0,08
Delfinidin 3-O-p-kumaroil heksozid	2,00	2,22	13,61	0,21	0,30	19,60	0,57
Malvidin 3-O-acetil heksozid izomer 2	9,00	5,45	4,36	–	2,53	–	0,92
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 2	24,79	12,50	57,05	14,39	0,26	16,12	3,38
Delfinidin 3-O-heksuronid	5,87	3,00	4,84	2,55	0,35	5,19	0,88
Malvidin 3-O-kafeoil heksozid	2,26	1,77	3,97	–	–	13,10	0,78
Cijanidin 3-O-p-kumaroil heksozid	0,80	0,65	8,52	0,92	0,13	3,16	0,21
Petunidin 3-O-p-kumaroil heksozid	4,20	4,32	31,38	0,25	0,41	33,06	1,47
Peonidin 3-O-p-kumaroil heksozid	18,88	12,84	97,55	0,40	0,94	29,62	6,42
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 2	3,02	1,06	4,48	0,60	–	2,37	0,77
Malvidin 3-O-p-kumaroil heksozid	101,59	84,48	239,93	0,83	3,31	270,49	44,42
Petunidin 3-O-heksozid izomer 2	7,37	1,65	25,02	0,13	0,14	2,48	2,40



Slika 9. (A) Izolovani jonski hromatogram (m/z 655) u pozitivnom modu i molekulska formula malvidin 3,5-*O*-diheksozida; (B) MS/MS spektar malvidin 3,5-*O*-diheksozida.

Antocijani u crvenim mladim sortnim vinima. Antocijani identifikovani u uzorcima crvenih vina prikazani su u Tabeli 11. Opšti zaključak o sastavu pojedinačnih antocijana, koji se može izvesti na osnovu LC MS analize, je da monoglukozidni antocijani imaju najveći udeo u antocijanskom profilu mladih crvenih vina. Vina najbogatija antocijanima su 'Prokupac' i 'Cabernet Sauvignon'. Heksozidi malvidina, delfinidina i petunidina identifikovani su u svim ispitivanim uzorcima crvenih vina, kao i delfinidin 3-*O*-heksuronid.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na različit antocijanski profil vina u odnosu na sastav antocijana u pokožicama odgovarajućih sorti vinove loze. Što je i očekivano, imajući u vidu da procesi koji se odvijaju prilikom proizvodnje i skladištenja vina imaju značajan uticaj na profil antocijana. Antocijanski profil vina se menja u toku stajanja, uglavnom kao posledica složenih inter- i intramolekulskih interakcija, usled čega dolazi do spontanog formiranja novih polimernih pigmenta u vinu koji nisu postojali u grožđu (Brouillard i sar., 1997; He i sar., 2012b). Postoje i brojni drugi faktori koji imaju direktan uticaj na količinu i oblik antocijana u vinu, kao što su temperatura, pH, vreme trajanja maceracije, vrste upotrebljenog kvasca i sorte vinove loze, kao i koncentracija sumpor (IV)-oksida u toku fermentacije (Garrido i Borges, 2013). Takođe, u toku procesa proizvodnje vina antocijani se samo delimično ekstrahuju iz pokožice u vino.

Tabela 11. Prisustvo antocijana u uzorcima crvenih vina.

Naziv jedinjenja	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot noir	Prokupac
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 1	+	-	+	-	+	+	+
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 1	+	-	+	-	-	-	+
Petunidin 3-O-heksozid izomer 1	+	+	+	-	+	+	+
Malvidin 3,5-O-diheksozid	+	-	-	-	-	-	+
Peonidin 3-O-heksozid	+	-	+	+	+	-	+
Malvidin 3-O-heksozid	+	+	+	+	+	+	+
Petunidin 3-O-acetil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Malvidin 3-O-acetil heksozid izomer 1	-	-	-	-	-	-	-
Peonidin 3-O-acetil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Definidin 3-O-p-kumaroil heksozid	-	-	-	-	-	-	+
Malvidin 3-O-acetil heksozid izomer 2	+	+	+	-	+	+	+
Delfinidin 3-O-heksozid izomer 2	+	+	+	+	+	+	+
Delfinidin 3-O-heksuronid	+	+	+	+	+	+	+
Malvidin 3-O-kafeoil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Cijanidin 3-O-p-kumaroil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Petunidin 3-O-p-kumaroil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Peonidin 3-O-p-kumaroil heksozid	+	-	-	-	-	-	+
Cijanidin 3-O-heksozid izomer 2	+	+	+	+	-	+	+
Malvidin 3-O-p-kumaroil heksozid	+	-	+	-	+	-	+
Petunidin 3-O-heksozid izomer 2	+	+	+	+	+	+	+

Kao što je već pomenuto, za *V. Vinifera* sorte karakteristični su 3-*O*-monoglukozidi antocijana, pre svega malvidin 3-*O*-glukozid i njegovi acetil- i kumaroil-derivati. Suprotno tome, analizom mladih sortnih vina utvrđeno je da acilovani derivati nisu karakteristika antocijanskog profila. Ovakvi rezultati su saglasni sa podacima koji se navode u literaturi. Naime, u revijalnom radu koji su objavili He i saradnici (2012a i b) navodi se da sadržaj monomernih antocijana u crvenim vinima neprekidno opada u toku procesa maceracije i starenja vina, te da se to naročito odnosi na acilovane antocijane. Stoga se može reći da su naši rezultati u saglasnosti sa pomenutim tvrdnjama, obzirom da su u ispitivanim vinima pronađeni uglavnom heksozidi antocijana (Tabela 11). Malvidin 3-*O*-acetil heksozid izomer 1, jedinjenje koje je bilo pronađeno u skoro svim uzorcima pokožica od kojih su potom napravljena ispitivana vina, nije detektovan ni u jednom uzorku vina. Prisutnost drugih acilovanih derivata u uzorcima je oskudna, osim u slučaju vina autohtone sorte 'Prokupac' gde su pronađeni svi ispitivani derivati. Ovaj uzorak je imao i najveću vrednost za antioksidativnu aktivnost, što bi moglo predstavljati potvrdu zaključka do kojeg je došao Welch sa saradnicima (2008) o postojanju pozitivne korelacije između antioksidativne aktivnosti i acilovanja šećernih ostataka sa aromatičnim kiselinama.

4.1.7. Elementalni sastav grožđa i vina

U uzorcima grožđa (cele bobice) i vina određen je sastav makro- i mikroelemenata. Uzorci su ispitani na prisustvo 22 elementa, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabelama 12 i 13. Posmatrajući obe tabele, može se primetiti da je kalijum element koji je najviše zastupljen u uzorcima grožđa, kao i u uzorcima ispitivanih vina. Količina As u svim analiziranim uzorcima grožđa i vina bila je ispod granice detekcije.

U uzorcima grožđa (Tabela 12), K je kvantifikovan u količinama od 1,08 g/kg u sorti 'Welschriesling', do 2,07 g/kg u uzorku 'Riesling'. Ovako visok sadržaj kalijuma je očekivan, imajući u vidu da je ovaj metal esencijalni makroelement, neophodan za normalan rast i razvoj biljaka (Wang i Wu, 2017). Pored toga, grožđe se uzgaja na alkalnom krečnom zemljištu, gde je sadržaj K povećan (Szefer i Nriagu, 2007).

Tabela 12. Sadržaj makro- i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima grožđa.

Elementi		Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
1	K	1,23 ^h	1,98 ^b	1,66 ^{cd}	1,65 ^{de}	1,61 ^e	1,49 ^f	1,40 ^g	2,07 ^a	1,93 ^b	1,16 ⁱ	1,08 ^j	1,68 ^c	1,69 ^c
2	P	0,31 ^f	0,31 ^f	0,36 ^d	0,36 ^d	0,37 ^d	0,55 ^a	0,36 ^d	0,41 ^c	0,40 ^c	0,34 ^e	0,39 ^{cd}	0,41 ^c	0,46 ^b
3	Ca	0,29 ^{de}	0,28 ^e	0,33 ^c	0,31 ^d	0,21 ^f	0,28 ^e	0,19 ^f	0,28 ^e	0,27 ^e	0,19 ^f	0,48 ^b	0,29 ^{de}	0,54 ^a
4	Mg	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,21 ^b	0,19 ^c	0,14 ^e	0,18 ^c	0,13 ^e	0,23 ^a	0,14 ^e	0,24 ^a
5	S	0,16 ^e	0,11 ^g	0,13 ^f	0,15 ^e	0,18 ^d	0,23 ^b	0,15 ^e	0,12 ^{fg}	0,11 ^g	0,10 ^h	0,16 ^e	0,20 ^c	0,27 ^a
6	Fe	4,07 ^g	5,30 ^c	5,57 ^b	5,63 ^b	5,34 ^c	5,19 ^d	4,50 ^f	3,82 ^h	4,65 ^e	3,82 ^h	4,78 ^e	4,48 ^f	7,19 ^a
7	Al	1,32 ^d	2,02 ^c	0,78 ⁱ	1,12 ^f	2,04 ^c	0,70 ^j	8,53 ^a	0,40 ^k	1,21 ^e	1,04 ^g	0,80 ⁱ	0,88 ^h	3,79 ^b
8	Cu	0,75 ⁱ	0,86 ^h	1,25 ^f	1,35 ^e	1,61 ^b	1,72 ^a	1,09 ^g	1,43 ^d	1,50 ^c	1,09 ^g	1,08 ^g	1,51 ^c	1,70 ^a
9	Na	0,85 ^j	1,96 ^d	0,94 ⁱ	0,84 ^j	2,24 ^b	1,36 ^g	14,53 ^a	1,10 ^h	1,76 ^e	2,08 ^c	1,75 ^e	0,77 ^k	1,64 ^f
10	Mn	1,31 ^b	1,06 ^f	1,05 ^f	0,83 ^h	0,64 ⁱ	1,47 ^a	0,91 ^g	1,20 ^d	1,13 ^e	0,74 ⁱ	1,25 ^c	0,83 ^h	1,48 ^a
11	Zn	1,28 ^c	0,69 ^h	0,96 ^f	1,16 ^d	3,67 ^a	1,11 ^e	0,66 ⁱ	0,87 ^g	0,70 ^h	0,94 ^f	1,68 ^b	0,65 ⁱ	1,18 ^d
12	Co	0,93 ^{cd}	0,99 ^a	0,92 ^d	1,00 ^a	0,93 ^{cd}	0,96 ^b	0,94 ^c	0,96 ^b	0,96 ^b	0,96 ^b	0,92 ^d	0,92 ^d	0,99 ^a
13	Cr	11,57 ^h	19,41 ^b	10,15 ⁱ	9,44 ^j	15,24 ^e	8,16 ^k	28,96 ^a	14,13 ^f	16,79 ^d	11,06 ^h	13,59 ^g	5,67 ^l	17,17 ^c
14	Li	4,29 ^g	6,58 ^e	3,63 ^h	2,60 ^k	7,95 ^d	5,34 ^f	21,32 ^b	3,28 ⁱ	4,25 ^g	5,04 ^f	26,46 ^a	2,70 ^j	15,71 ^c
15	Mo	0,93 ^e	0,99 ^c	2,77 ^b	1,00 ^c	0,93 ^c	0,96 ^d	4,36 ^a	0,96 ^d	0,96 ^d	0,96 ^d	0,92 ^e	0,92 ^e	0,99 ^c
16	Ni	24,82 ^f	23,83 ^g	31,17 ^d	21,85 ^h	45,61 ^b	9,37 ^l	12,05 ⁱ	52,82 ^a	19,24 ⁱ	30,84 ^d	25,03 ^e	11,28 ^k	33,06 ^c
17	Pb	71,38 ^e	161,04 ^b	94,85 ^c	35,95 ⁱ	62,72 ^f	34,76 ^j	48,87 ^h	13,17 ^l	53,48 ^g	16,85 ^k	16,97 ^k	239,67 ^a	86,12 ^d
18	Sb	26,79 ^h	33,11 ^f	51,08 ^a	43,38 ^b	21,47 ⁱ	20,58 ^l	35,57 ^e	39,49 ^c	3,39 ^j	32,75 ^f	28,29 ^g	37,44 ^d	11,57 ^k
19	Se	24,92 ^h	25,13 ^h	21,02 ⁱ	27,28 ^g	31,03 ^{de}	33,92 ^b	36,18 ^a	32,23 ^c	29,92 ^f	18,54 ^j	31,90 ^{cd}	34,20 ^b	30,94 ^e
20	Cd	2,51 ^c	1,99 ^e	1,16 ⁱ	1,70 ^g	4,17 ^b	1,88 ^f	1,47 ^h	2,23 ^d	1,15 ⁱ	1,51 ^h	4,64 ^a	0,92 ^j	0,03 ^k
21	V	4,00 ^g	7,41 ^b	3,18 ⁱ	2,90 ^j	3,11 ^{ij}	4,51 ^f	5,95 ^c	1,57 ^l	2,18 ^k	5,52 ^d	3,56 ^h	5,03 ^e	10,79 ^a

Rezultati za elemente 1-5 prikazani su kao g/kg; Rezultati za elemente 6-11 prikazani su kao mg/kg; Rezultati za elemente 12-21 prikazani su kao µg/kg. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

Sledeći element po zastupljenosti je fosfor. Sa opsegom od 0,31 do 0,55 g/kg, ovaj element u ispitivanim uzorcima grožđa ima i do šest puta manji sadržaj u odnosu na K. Takođe, kvantifikovane su i značajne količine Ca, Mg i S. Svi navedeni elementi u ispitanim uzorcima zastupljeni su u količinama većim od 100 mg/kg. Posmatrajući Tabelu 12 može se primetiti da su u autohtonij sorti 'Prokupac' prisutne značajno veće količine Al, Na, Cr i Mo, u odnosu na uzorke preostalih sorti vinove loze.

Rezultati dobijeni za ispitivana vina, ukazuju na to da su u ovim uzorcima u najvećim količinama zastupljeni K, P i S, zatim slede Mg, Ca, Na i Fe. Sadržaj kalijuma u analiziranim vinima (Tabela 13) kretala se u opsegu od 110,21 mg/kg, koliko je kvantifikovano u vinu 'Riesling', do 503,78 mg/kg u uzorku 'Prokupac'. U literaturi je dostupan podatak da K čini i do 75% od ukupnog sadržaja katjona prisutnih u vinima (Szefer i Nriagu, 2007). U uzorcima koji su ispitani u okviru ovog istraživanja, K je prisutan od 26 do 58%. Ovako veliki procenat K u vinima ne čudi, obzirom da je ovaj element dominantan i u ispitanim uzorcima grožđa. Takođe, K je neophodan za rast i fermentaciju kvasaca koji se dodaju u toku proizvodnje vina (Szefer i Nriagu, 2007).

Može se primetiti da je sadržaj kalijuma veći u crvenim nego u belim vinima, što je u skladu sa podacima dostupnim u literaturi (Szefer i Nriagu, 2007). Daljim poređenjem uočava se veća količina P, S i Mg u uzorcima crvenih vina, što je zabeleženo i u radu koji su objavili Martin i saradnici (2012). Nasuprot tome, sadržaj Na, Al i V veći je u belim nego u crvenim vinima. Navedene razlike mogu se pripisati različitim tehnologijama koje se koriste u proizvodnji crvenih i belih vina. Naročito, dužem vremenskom periodu koji crvena vina provode u kontaktu sa pokožicom. Takođe, dokazano je da proces filtracije kroz koji obično prolaze bela vina utiče na sadržaj elemenata (Martin i sar., 2012).

Tabela 13. Sadržaj makro- i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima vina.

Elementi		Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Franc	Sangiovese	Shiraz	Pinot Noir	Prokupac	Riesling	Petra	Sauvignon Blanc	Welschriesling	Chardonnay	Pinot Gris
1	K	312,19 ^d	317,32 ^c	347,83 ^b	201,21 ^f	183,69 ^h	211,29 ^e	503,78 ^a	110,21 ^k	187,74 ^g	149,86 ⁱ	149,84 ⁱ	198,21 ^f	136,73 ^j
2	P	171,81 ^a	162,74 ^b	145,81 ^c	94,71 ^f	86,85 ^g	102,53 ^c	132,27 ^d	35,10 ^m	66,40 ⁱ	45,93 ^k	78,88 ^h	75,69 ^j	38,63 ^l
3	S	101,81 ^c	94,82 ^d	78,22 ^f	115,14 ^b	66,96 ^h	65,34 ^h	129,76 ^a	37,14 ^j	91,55 ^d	59,87 ⁱ	70,17 ^g	85,91 ^e	64,89 ^h
4	Mg	72,19 ^a	72,38 ^a	52,22 ^b	38,71 ^f	34,51 ^h	36,23 ^g	53,66 ^b	24,92 ^j	40,59 ^e	32,53 ⁱ	46,86 ^c	44,80 ^d	34,98 ^h
5	Ca	29,45 ^{de}	39,69 ^a	27,82 ^f	30,34 ^d	17,75 ⁱ	26,61 ^g	27,89 ^f	28,70 ^e	28,94 ^e	23,85 ^h	36,08 ^b	27,17 ^{fg}	31,73 ^c
6	Na	1,55 ^g	2,53 ^f	1,08 ⁱ	1,42 ^g	0,85 ^j	1,04 ⁱ	1,21 ^h	3,16 ^e	12,47 ^b	9,15 ^c	4,05 ^d	14,08 ^a	9,08 ^c
7	Fe	1,02 ^c	0,81 ^d	0,60 ^h	2,09 ^a	0,82 ^d	0,49 ⁱ	0,66 ^g	1,03 ^c	0,75 ^f	0,78 ^e	1,30 ^b	0,77 ^{ef}	0,34 ^j
8	Mn	0,52 ^b	0,60 ^a	0,38 ^d	0,21 ^g	0,18 ^h	0,31 ^e	0,24 ^f	0,31 ^e	0,17 ^h	0,18 ^h	0,43 ^c	0,25 ^f	0,17 ^h
9	Zn	0,35 ^g	0,62 ^a	0,30 ⁱ	0,35 ^g	0,42 ^e	0,37 ^f	0,30 ⁱ	0,15 ^j	0,46 ^d	0,33 ^h	0,37 ^f	0,56 ^b	0,49 ^c
10	Al	0,13 ^f	0,13 ^f	0,08 ^g	0,07 ^h	0,05 ^j	0,05 ^j	0,06 ⁱ	0,46 ^a	0,49 ^a	0,14 ^e	0,31 ^c	0,38 ^b	0,17 ^d
11	Cu	0,04 ^g	0,05 ^f	0,01 ⁱ	0,02 ^h	0,23 ^c	0,18 ^e	0,04 ^g	0,02 ^h	0,30 ^b	0,21 ^d	0,22 ^{cd}	0,18 ^e	0,48 ^a
12	Ni	11,42 ^{fg}	11,60 ^f	10,62 ^h	6,90 ^k	29,21 ^a	13,75 ^e	8,70 ^j	7,33 ^j	19,11 ^b	16,24 ^d	11,01 ^{sh}	17,38 ^c	16,15 ^d
13	Pb	17,44 ^g	14,75 ⁱ	8,00 ^j	8,87 ^k	36,13 ^b	21,63 ^e	9,43 ^j	16,39 ^h	29,57 ^c	20,47 ^f	29,17 ^c	26,06 ^d	43,97 ^a
14	Cr	4,27 ^c	5,97 ^a	2,59 ^g	3,96 ^d	2,35 ^h	2,12 ^j	1,90 ^j	2,74 ^f	5,07 ^b	2,66 ^g	3,67 ^d	2,71 ^f	3,22 ^e
15	Li	3,19 ^a	2,42 ^d	1,87 ^f	0,82 ^j	1,60 ^h	1,46 ⁱ	2,15 ^d	1,74 ^g	2,70 ^b	1,75 ^g	3,25 ^a	1,94 ^e	2,60 ^c
16	Co	1,20 ^b	1,22 ^b	0,12 ^j	0,48 ^g	0,47 ^g	0,62 ^e	0,37 ^h	0,37 ^h	0,54 ^f	0,24 ⁱ	0,93 ^d	1,27 ^a	1,17 ^c
17	Sb	0,26 ^j	1,53 ^b	0,79 ^e	1,22 ^d	0,34 ⁱ	1,35 ^c	0,72 ^f	0,46 ^h	1,62 ^a	0,31 ⁱ	0,60 ^g	0,78 ^e	1,65 ^a
18	Se	0,39 ^c	0,08 ^d	0,05 ^f	0,03 ^g	0,02 ^h	0,03 ^g	0,06 ^e	0,03 ^g	0,06 ^e	2,30 ^a	0,99 ^b	0,06 ^e	0,05 ^f
19	V	0,28 ^g	0,34 ^f	0,16 ⁱ	0,26 ^g	0,20 ^h	0,12 ^j	0,21 ^h	1,49 ^c	2,20 ^a	1,26 ^d	1,07 ^e	1,70 ^b	1,08 ^e
20	As	0,08 ^a	0,08 ^a	0,05 ^c	0,03 ^e	0,02 ^f	0,03 ^e	0,06 ^b	0,03 ^e	0,06 ^b	0,04 ^d	0,06 ^b	0,06 ^b	0,05 ^c
21	Cd	0,12 ^e	0,09 ^f	0,27 ^a	0,09 ^f	0,12 ^e	0,27 ^a	–	0,17 ^d	0,21 ^c	0,24 ^b	0,27 ^a	0,23 ^b	0,21 ^c
22	Mo	0,08 ^a	0,08 ^a	0,05 ^c	0,03 ^e	0,02 ^f	0,03 ^e	0,06 ^b	0,03	0,06 ^b	0,04 ^d	0,06 ^b	0,06 ^b	0,05 ^c

Rezultati za elemente 1-11 prikazani su kao mg/kg; Rezultati za elemente 12-22 prikazani su kao µg/kg. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema Tukey testu, $P < 0,05$.

Poredeći dobijene rezultate za grožđe (Tabela 12) i vina (Tabela 13), može se uočiti da je sadržaj svih elemenata u proseku 10 puta veći u uzorcima grožđa nego u vinima. Primećuje se da se sadržaji Sb i Mo najviše razlikuju. U proseku je količina ovih elemenata u uzorcima grožđa i do 40 puta veća nego u uzorcima vina. Interesantno, sadržaj kalijuma najveći je u uzorku 'Riesling', a najmanji u vinu proizvedenom od pomenute sorte. Količine toksičnih elemenata (As, Cd i Pb) su ispod dozvoljenih vrednosti (0,2 mg/kg za Pb i As, a 0,01 mg/kg za Cd) u svim ispitivanim vinima (*Commission regulation (ec) no. 466/2001, Off J Eur Communities 2001; L77/9*). Cu i Zn su takođe prisutni u dozvoljenim količinama (*International Office of Vine and Wine (OIV)*), Cu ispod 1 mg/kg, a Zn ispod 5 mg/kg.

4.2. Uticaj različitih faza razvoja grožđa klonova sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' na polifenolni profil

Selekcija klonova predstavlja osnovnu tehniku pomoću koje je moguće modifikovati sorte, bez značajnih promena sortnih karakteristika i uz zadržavanje naziva sorte. Najočiglednije modifikacije su one koje dovode do promena u morfologiji vinove loze ili u pigmentaciji grožđa. Međutim, većina mutacija dovodi do efekata koji nisu tako lako uočljivi, a utiču na različita svojstva biljaka (od aromatičnih karakteristika do osetljivosti na klimatske uslove). U selekciji klonova akcenat se uvek stavlja na kvalitet. Imajući u vidu da još uvek ne postoje opšteprihvaćene norme za kvalitet grožđa i vina, razvoj metoda za kvantifikaciju različitih parametara u grožđu i vinu u velikoj meri bi olakšala selekciju klonova i poređenje podataka dobijenih od različitih proizvođača (Jackson, 2008).

U okviru ovog rada, uzorci sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' okarakterisani su određivanjem polifenolnog profila, ukupnog sadržaja polifenola i antocijana, kao i antioksidativne aktivnosti u tri faze sazrevanja. Cilj je bio da se ispituju novorazvijeni klonovi pomenutih sorti i da se uporede sa standardom. Takođe, praćene su promene u sadržaju polifenolnih jedinjenja u toku sazrevanja grožđa, u tri faze zrelosti bobica. Dalje istraživanje obuhvatilo je analizu sortnih vina dobijenih u postupku mikroviniifikacije iz potpuno zrelih uzoraka grožđa standardnih sorti i klonova. Vrednosti za *TPC*, *TAC* i *RSA* određene su upotrebom spektrofotometrijskih metoda,

dok je polifenolni profil grožđa i vina dobijen upotrebom *UHPLC-DAD MS/MS* sistema.

4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost grožđa

Naša istraživanja ukazala su na statistički značajne razlike između standarda i odgovarajućih klonova sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativne aktivnosti, u sve tri faze razvoja bobice (Tabela 14). U zavisnosti od faze sazrevanja i klona, *TPC* u uzorku 'Merlot' kretao se u intervalu od 3,71 g EGK/kg (treća faza razvoja) do 29,79 g EGK/kg (prva faza razvoja), dok je u sorti 'Cabernet Sauvignon' taj interval od 2,76 g EGK/kg (treća faza razvoja) do 48,82 g EGK/kg (prva faza razvoja). U prvoj fazi rasta, značajno veće *TPC* vrednosti pronađene su u uzorcima grožđa 'Merlot' standard (28,30 g EGK/kg) i klonu 022 (29,79 g EGK/kg).

Svi klonovi su pokazali različitu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa odgovarajućim standardima. Posmatrajući uzorke sorte 'Merlot' u prvoj fazi razvoja (Tabela 14), može se primetiti da najveću antioksidativnu aktivnost ima standard (181,03 mmol ET/kg), a najmanju klon 025 (129,27 mmol ET/kg). U istoj fazi razvoja sorte 'Cabernet Franc' najveće vrednosti za *TPC* i *RSA* određene su u klonu 012 (42,82 g EGK/kg, odnosno 191,73 mmol ET/kg), a najmanje u standardu (13,41 g EGK/kg, odnosno 119,06 mmol ET/kg).

U drugoj fazi razvoja 'Merlot' standard je pokazao najveće *TPC* (12,33 g EGK/kg) i *RSA* (304,33 mmol ET/kg) vrednosti, dok su za sve klonove 'Cabernet Franc' određene veće vrednosti oba parametra u odnosu na standard.

Posmatrajući rezultate dobijene pri ispitivanju zrelog grožđa (treća faza razvoja) obe sorte, može se zaključiti da su se 'Merlot' 025 i 'Cabernet Franc' 010 istakli sa najvećim sadržajem ukupnih polifenola. U klonu 025 sorte 'Merlot' vrednost za *TPC* iznosila je 7,32 g EGK/kg, dok je u klonu 'Cabernet Franc' 010 ta vrednost bila 10,89 g EGK/kg. U ekstraktima pomenuta dva klona dobijene su i najveće vrednosti antioksidativne aktivnosti: 79,74 mmol ET/kg uzorka 'Merlot' 025, odnosno 80,48 mmol ET/kg uzorka 'Cabernet Franc' 010.

Tabela 14. Sadržaj ukupnih polifenola (g EGK/kg), ukupnih antocijana (g mal 3-glu/kg) i antioksidativna aktivnost (mmol ET/kg) grožđa 'Merlot' i 'Cabernet Franc'.

Uzorak	I faza razvoja (jun)			II faza razvoja (avgust)			III faza razvoja (oktobart)		
	<i>TPC</i>	<i>TAC</i>	<i>RSA</i>	<i>TPC</i>	<i>TAC</i>	<i>RSA</i>	<i>TPC</i>	<i>TAC</i>	<i>RSA</i>
Merlot									
standard	28,30±0,14 ^a	/	181,03±2,56 ^a	12,33±0,21 ^a	304,33±0,89 ^a	80,91±2,85 ^a	3,71±0,03 ^c	698,38±0,15 ^b	28,87±0,25 ^d
No 022	29,79±0,46 ^a	/	173,29±3,66 ^b	11,73±10 ^{ab}	176,64±1,98 ^c	72,24±1,48 ^c	4,38±0,01 ^b	721,19±1,02 ^a	46,21±2,96 ^b
No 025	25,72±0,11 ^b	/	129,27±1,14 ^d	11,18±0,37 ^b	135,36±1,10 ^d	75,46±0,00 ^b	7,32±0,11 ^a	386,82±1,14 ^c	79,74±1,32 ^a
No 029	23,70±0,50 ^b	/	136,33±2,82 ^c	8,97±0,05 ^c	233,73±1,43 ^b	78,67±2,47 ^a	3,81±0,03 ^c	359,00±0,68 ^d	41,37±1,49 ^c
Cabernet Franc									
standard	13,41±0,04 ^d	/	119,06±2,54 ^d	9,32±0,07 ^b	238,70±2,67 ^a	57,53±7,82 ^b	2,76±0,04 ^c	416,72±0,96 ^d	26,81±3,38 ^d
No 02	16,83±0,06 ^c	/	141,61±0,25 ^c	10,63±0,01 ^b	52,98±0,50 ^d	77,84±3,20 ^a	7,40±0,06 ^b	488,07±2,53 ^c	56,81±1,16 ^b
No 010	25,17±0,17 ^b	/	163,11±2,43 ^b	11,81±0,01 ^a	63,03±0,75 ^c	77,21±2,82 ^a	10,89±0,35 ^a	1668,18±1,87 ^a	80,48±0,26 ^a
No 012	42,82±0,07 ^a	/	191,73±3,02 ^a	12,16±0,14 ^a	138,27±3,01 ^b	77,65±0,78 ^a	6,97±0,04 ^b	1075,07±0,99 ^b	50,16±2,08 ^c

Različita slova u istoj koloni za 'Merlot' odnosno 'Cabernet Franc' označavaju značajnu razliku između uzoraka prema Tukey testu, $P < 0,05$.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je zrelo grožđe ova dva klona bogatiji izvor prirodnih antioksidanasa u odnosu na odgovarajuće standarde i ostale analizirane klonove. Primetne razlike u sadržajima ukupnih polifenola između standarda i klonova obe sorte ukazuju na to da i male genetske promene mogu značajno uticati na sadržaj polifenolnih jedinjenja u grožđu. Varijabilnost u sadržaju sekundarnih metabolita (pre svega polifenolnih jedinjenja) između klonova potvrđena je i u radu Van Leeuwen i saradnici (2013). Naši rezultati su takođe u saglasnosti sa istraživanjem koje je sproveo Hogan sa saradnicima (2009) i ustanovio značajnu razliku u *TPC* i *RSA* vrednostima između dva klona 'Cabernet Franc'. *TPC* vrednosti dobijene za klonove i standard sorte 'Merlot', kao i klonove 'Cabernet Franc', veće su u poređenju sa rezultatima za sadržaj ukupnih polifenola u ove dve sorte koji su dostupni u literaturi (Mitić i sar., 2012; Yang i sar., 2009).

Očekivano, u uzorcima obe sorte primećeno je smanjenje *TPC* i *RSA* vrednosti u toku sazrevanja, što je u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Lorrain i saradnici (2011). Ovi parametri bili su najveći u fazi formiranja bobice, a najmanji u fazi kada su bobice dostigle punu zrelost. U grožđu, već u prvoj fazi rasta i razvoja akumuliraju se polifenolna jedinjenja. Međutim, tokom sazrevanja grožđa, od faze *véraison* pa do dostizanja potpune zrelosti, bobice postaju skoro dvostruko veće, pa se usled povećanja zapremine bobice koncentracija polifenola smanjuje. Takođe, moguća je degradacija rastvorljivih polifenolnih jedinjenja koji dalje imaju ulogu prekursora u biosintezi drugih jedinjenja (Adams i sar., 2006). Između *TPC* i *RSA* vrednosti bobica u početnoj fazi formiranja i fazi potpuno zrelog grožđa pronađen je visok stepen korelacije, što ukazuje na to da antioksidativna aktivnost grožđa u ovim fazama razvoja uglavnom potiče od polifenolnih jedinjenja.

U toku faze *véraison* u crnim sortama dolazi do akumulacije antocijana (Downey i sar., 2006; Robinson i Davies, 2000). Veliki uticaj na sadržaj ovih polifenola u grožđu imaju geni i faza razvoja u kojoj se nalazi bobica (Wu Dai i sar., 2011). Naša istraživanja, očekivano, nisu pokazala prisustvo antocijana u bobicama u prvoj fazi razvoja, dok se njihov sadržaj značajno povećao od početka zrenja do potpunog sazrevanja grožđa (Tabela 14). U drugoj fazi razvoja obe sorte, fazi šarka, najveća količina antocijana pronađena je u standardima, a najmanja u klonovima 'Merlot' 025 i 'Cabernet Franc' 02. Ova početna faza sinteze antocijana povezana je sa akumulacijom

šećera, dok je u periodu pune zrelosti sinteza šećera završena i tada klimatski faktori imaju najveći uticaj na akumulaciju antocijana (Wu Dai i sar., 2011). U zreloom grožđu sorte 'Merlot' (Tabela 14), najveći sadržaj antocijana pronađen je u klonu 022 (721,19 mg mal 3-glu/kg), a dvostruko manji u klonu 029 (359,00 mg mal 3-glu/kg). Rezultati dobijeni za 'Merlot' standard i klon 022 u saglasnosti su sa podacima do kojih su dosli Du i saradnici (2012). Sadržaj antocijana u uzorcima sorte 'Cabernet Franc' kretao se u opsegu od 416,72 mg mal 3-glu/kg (standardu) do 1668,18 mg mal 3-glu/kg (klon 010). Uzorci sorte 'Cabernet Franc' analizirani u okviru ovog istraživanja imali su veće količine antocijana u odnosu na rezultate koje su publikovali drugi autori (Du i sar., 2012; Yang i sar., 2009).

4.2.2. Sadržaj ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost vina

Kao što se može videti iz Tabele 15, sadržaj ukupnih polifenola i antocijana u vinima obe sorte ukazuje na značajnu razliku između klonova. Vrednosti za *TPC* u vinima sorte 'Cabernet Franc' imale su opseg od 1,11 do 1,58 g EGK/L, a u 'Merlot' vinima od 1,10 do 1,46 g EGK/L. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazala su vina klonova 'Merlot' 025 (11,01 mmol ET/L) i 'Cabernet Franc' 010 (11,02 mmol ET/L). Vrednosti dobijene za sadržaj polifenola u vinima obe sorte slični su rezultatima do kojih su došli drugi autori (Zhu i sar., 2012).

Sva ispitivana vina sorte 'Cabernet Franc' imaju veći sadržaj antocijana u odnosu na 'Merlot' vina. Poznato je da su antocijani nestabilna jedinjenja, lako podložna degradaciji, a jedan od faktora koji bitno utiče na njihovu stabilnost je pH-vrednost sredine. U vinima su uglavnom zastupljeni u obliku flavilijum katjona, a sa povećanjem pH-vrednosti vina dolazi do naglog opadanja njihovih količina (He i sar., 2012b). U vinima sorte 'Cabernet Franc' izmerene su niže vrednosti za pH (pH = 3,09-3,32), nego u 'Merlot' vinima (pH = 3,46-3,47), čime bi se mogla objasniti pronađena razlika u sadržaju antocijana između ove dve sorte.

Tabela 15. Sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijana i antioksidativna aktivnost vina sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc'.

Uzorak	TPC (g EGK/L)	TAC (mg mal 3-glu/L)	RSA (mmol ET/L)
Merlot			
Standard	1,28±0,01 ^b	28,54±0,12 ^c	9,68±0,40 ^b
No 022	1,10±0,01 ^d	24,31±0,87 ^d	8,46±0,03 ^c
No 025	1,46±0,00 ^a	40,51±0,22 ^a	11,01±0,19 ^a
No 029	1,16±0,00 ^c	35,58±0,00 ^b	8,69±0,24 ^c
Cabernet Franc			
Standard	1,12±0,00 ^b	86,66±0,14 ^b	7,58±0,03 ^b
No 02	1,11±0,01 ^b	62,71±0,23 ^d	7,15±0,15 ^b
No 010	1,41±0,02 ^a	210,31±1,01 ^a	11,02±1,01 ^a
No 012	1,58±0,01 ^a	74,33±0,15 ^c	10,61±0,48 ^a

Različita slova u istoj koloni za 'Merlot'/'Cabernet Franc' označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

4.2.3. Polifenolna jedinjenja u grožđu

U ispitivanim uzorcima grožđa kvantifikovano je 19 polifenolnih jedinjenja (Tabele 16 i 17). U svim analiziranim uzorcima 'Merlot' kvantifikovane su fenolne kiseline (galna, *p*-hidroksibenzoeva, hlorogena, kofeinska, ferulinska i ruzmarinska), katehin galat, rutin i morin (Tabela 16), dok su u svim uzorcima 'Cabernet Franc' identifikovana sledeća jedinjenja: galna kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, kofeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, eskulin, katehin galat, rutin i morin (Tabela 17).

Sastav grožđa je veoma složen i varira između genotipova u određenim uslovima gajenja (Wu Dai i sar., 2011), kao i u zavisnosti od faze razvoja bobice. Sadržaj pojedinačnih polifenola razlikovao se u zavisnosti od razvojnog stupnja bobice ispitivanih uzoraka. Sadržaj većine polifenolnih jedinjenja se smanjivao sa sazrevanjem grožđa. Najveće količine katehina i epikatehina izmerene su u drugoj fazi razvoja bobica (faza šarka), dok je u fazi potpunog zrenja (treća faza razvoja) njihov sadržaj znatno manji, što je zabeleženo i u literaturi (Kennedy i sar., 2000). Ove dve faze u sazrevanju grožđa mogle bi se podeliti na period akumulacije i period smanjivanja sadržaja flavan-3-ola.

Tabela 16. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u uzorcima sorte 'Merlot' u tri faze razvoja (rezultati su izraženi kao mg/kg zaleđene mase uzorka).

Naziv jedinjenja	I faza razvoja (jun)				II faza razvoja (avgust)				III faza razvoja (oktobart)				
	standard	klon 022	klon 025	klon 029	standard	klon 022	klon 025	klon 029	standard	klon 022	klon 025	klon 029	
Hidroksibenzoewe kiseline													
1 Galna kiselina	30,29	3,9	2,74	2,18	2,94	2,46	3,71	2,88	5,94	3,48	2,68	1,78	
2 Protokatehuinska kiselina	0,09	0,25	-	0,02	0,06	0,09	0,01	0,2	-	-	-	0,01	
3 <i>p</i> -Hidroksibenzoewa kiselina	11,93	12,41	13,69	7,45	4,65	1,84	4,55	4,05	2,11	0,06	2,67	1,14	
Hidroksicinaminske kiseline													
4 Hlorogena kiselina	0,76	0,6	0,48	0,64	0,39	0,43	1,67	0,41	0,55	0,49	2,43	0,39	
5 Kofeinska kiselina	3,64	1,04	0,19	0,47	0,13	0,11	0,26	0,49	0,17	0,09	0,29	0,11	
6 Ferulinska kiselina	4,65	4,48	1,27	1,41	-	1,04	1,2	1,6	-	1,01	1,2	1,11	
7 Rozmarinska kiselina	0,27	0,17	0,14	0,14	0,12	0,11	0,57	0,14	0,16	0,17	0,91	0,12	
8 <i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,16	-	0,25	-	0,14	0,03	0,07	0,29	0,32	0,13	0,1	0,07	
Kumarini													
9 Eskulin	2	2,14	0,25	1,09	0,41	0,44	0,38	0,39	0,46	0,27	-	0,4	
Flavan-3-oli													
10 Epigalokatehin	1,11	1,39	-	1,29	1,26	1,21	1,18	-	-	-	1,26	-	
11 Katehin	52,15	78,71	17,46	82,59	119,88	123,64	66,41	11,17	-	24,19	52,2	11,14	
12 Epikatehin	1,56	1,32	0,67	1,35	28,15	27	20,42	3,96	-	9,19	13,5	7,31	
13 Galokatehin galat	5,01	10,8	-	7,99	-	4,1	3,81	6,56	-	4,16	3,69	-	
14 Katehin galat	5,6	11,35	4,97	15,52	25,05	29,35	20,01	5,84	0,34	4,62	6,84	2,99	
15 Epigalokatehin galat	1,55	2,58	-	0,36	-	-	0,71	-	-	0,4	0,61	-	
Flanonoli													
16 Rutin	24,12	28,6	0,6	18,7	7,61	11,71	9,94	5,07	1,99	5,05	2,49	2,81	
17 Morin	10,34	3,51	0,45	0,69	3,52	6,65	4,99	13,33	0,65	0,53	0,46	1,15	
Flavanoni													
18 Naringin	0,3	0,23	-	-	-	0,28	0,22	0,22	-	-	-	-	
Flavoni													
19 Apigenin	0,34	0,25	0,22	0,22	0,23	0,22	0,24	0,24	-	-	-	-	

Tabela 17. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u uzorcima sorte 'Cabernet Franc' u tri faze razvoja (rezultati su izraženi kao mg/kg zaleđene mase uzorka).

Naziv jedinjenja	I faza razvoja (jun)				II faza razvoja (avgust)				III faza razvoja (oktobart)			
	standard	klon 02	klon 010	klon 012	Standard	klon 02	klon 010	klon 012	standard	klon 02	klon 010	klon 012
Hidroksibenzoeve kiseline												
1 Galna kiselina	2,84	7,96	5,79	7,65	4,17	4,40	3,47	4,03	0,85	5,36	4,56	2,75
2 Protokatehuinska kiselina	0,02	0,22	-	-	-	-	0,02	0,08	0,07	0,01	-	0,10
3 <i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	17,84	10,58	14,06	6,28	4,36	7,18	6,85	4,42	2,32	3,46	2,13	0,91
Hidroksicinaminske kiseline												
4 Hlorogena kiselina	1,10	0,66	0,61	0,73	0,37	0,39	0,39	-	0,98	0,35	0,51	0,39
5 Kofeinska kiselina	0,27	0,56	0,78	1,48	0,13	0,12	0,08	0,08	0,23	0,16	0,14	0,10
6 Ferulinska kiselina	1,61	2,18	6,12	4,64	1,08	1,08	1,17	1,35	1,06	-	1,10	1,10
7 Rozmarinska kiselina	0,34	0,23	0,20	0,26	0,12	0,12	-	-	0,38	0,12	0,15	-
8 <i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,24	0,89	0,26	0,13	0,32	0,06	0,12	0,44	0,23	0,12	0,11	0,10
Kumarini												
9 Eskulin	0,26	0,26	0,82	1,78	0,38	0,27	0,32	0,37	0,31	0,39	0,42	0,33
Flavan-3-oli												
10 Epigalokatehin	-	1,37	1,69	1,34	1,04	1,38	1,51	1,42	-	-	1,33	1,04
11 Katehin	10,68	24,72	80,10	81,95	20,23	111,19	88,83	115,85	-	10,79	39,83	17,63
12 Epikatehin	3,81	1,66	2,37	1,70	4,83	30,03	25,30	31,15	-	4,36	10,77	7,16
13 Galokatehin galat	3,73	4,63	17,44	10,31	5,09	4,84	4,06	4,42	-	-	3,96	-
14 Katehin galat	2,11	10,90	28,78	10,57	11,52	38,05	29,14	26,67	0,50	7,98	9,06	3,65
15 Epigalokatehin galat	0,41	0,49	3,15	1,48	0,31	-	-	-	0,32	-	-	-
Flavonoli												
16 Rutin	0,45	1,65	18,93	23,09	12,92	9,82	6,71	4,11	1,29	1,33	5,05	2,04
17 Morin	0,34	1,06	1,35	4,78	4,82	1,96	1,34	1,48	0,48	0,77	1,61	0,78
Flavanoni												
18 Naringin	0,24	0,21	0,23	0,23	0,21	-	-	-	-	-	-	-
Flavoni												
19 Apigenin	-	0,24	0,23	0,3	0,22	0,22	-	0,24	-	0,22	0,22	-

Što se tiče polifenolnog profila zrelih uzoraka obe sorte, u njima dominiraju galna kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, ferulinska kiselina, epigalokatehin, katehin, epikatehin, galokatehin galat, katehin galat i rutin. Posmatrajući rezultate prikazane u Tabeli 16 može se primetiti da je sadržaj galne kiseline manji u klonovima sorte 'Merlot' u poređenju sa standardom. Međutim, količine estara galne kiseline (galokatehin galat, katehin galat i epigalokatehin galat) veće su u klonovima nego u standardu. U zreloom grožđu 'Merlot' standard, iz grupe flavan-3-ola identifikovan je samo katehin galat, dok su u klonovima pored katehin galata, kvantifikovani katehin i epikatehin. Katehin i epikatehin su najviše zastupljeni polifenoli, a klon 025 se izdvojio kao klon sa najvećim sadržajem ova dva jedinjenja (52,20 mg katehina/kg i 13,50 mg epikatehina/kg). Osim toga, klon 025 je imao i najveći sadržaj *p*-hidroksibenzoeve, hlorogene, kofeinske, ferulinske i ruzmarinske kiseline, kao i epigalokatehina, katehin galata i epigalokatehin galata. Takođe, klon 025 se razlikuje od standarda i od preostala dva klona po prisustvu epigalokatehina (1,26 mg/kg) u zreloom grožđu. Katehin i epikatehin su kvantifikovani u grožđu ispitivanih klonova 'Merlot', ali ne i u standardu. Katehin galat je pronađen u zreloom grožđu sva četiri uzorka 'Merlot', dok su galokatehin galat i epigalokatehin galat bili prisutni samo u uzorcima 'Merlot' 022 i 'Merlot' 025. Suprotno našim rezultatima, Mattivi sa saradnicima (2009) nije kvantifikovao katehin galat, galokatehin galat i epigalokatehin galat u odgovarajućim ekstraktima grožđa zvaničnog 'Merlot' klona (INRA 184) uzgajanog na tri vinograda u Italiji.

Polifenolni profil zrelog grožđa 'Cabernet Franc' karakteriše veći sadržaj ispitivanih polifenolnih jedinjenja (osim hlorogene, kofeinske, ruzmarinske i *p*-kumarinske kiseline) u klonovima u poređenju sa standardom (Tabela 17). Katehin i epikatehin su prisutni u svim klonovima ali ne i u standardu. 'Cabernet Franc' 010 se istakao u odnosu na druge klonove i standard po većem sadržaju eskulina, epigalokatehina, katehina, epikatehina, galokatehin galata, katehin galata, rutina i morina. Klonovi 'Merlot' 025 i 'Cabernet Franc' 010 pokazali su nešto veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale uzorke, što je verovatno posledica povećanog sadržaja nekih polifenola u grožđu ova dva klona.

4.2.4. Polifenolna jedinjenja u vinu

Očekivano, na osnovu rezultata dostupnih u literaturi (Puértolas i sar., 2011), razlike u sadržaju i strukturi flavonola prisutnih u analiziranom grožđu uslovile su i razlike u karakteristikama vina. U svim analiziranim uzorcima vina, galna kiselina se izdvaja po svom sadržaju u odnosu na ostale fenolne kiseline (Tabela 18). O dominantnom sadržaju galne kiseline u vinima govore i podaci dostupni u literaturi (Hogan i sar., 2009). Sadržaj ove kiseline u uzorcima vina 'Merlot' kreće se u opsegu od 20,03 mg/L (klon 025) do 28,89 mg/L (standard), a u vinima 'Cabernet Franc' od 78,40 mg/L (klon 010) do 27,03 mg/L (standard). Visok sadržaj galne kiseline mogao bi se objasniti time što ona uglavnom nastaje kiselom hidrolizom estara flavonoid galata, a ovoj reakciji veoma pogoduju niske pH-vrednosti u vinima (Gris i sar., 2013). Utvrđeno je da galna kiselina značajno doprinosi antioksidativnoj aktivnosti crvenih vina (Van Leeuw i sar., 2014). Znatno manje zastupljena je protokatehuinska kiselina, dok su, saglasno sa literaturom (Vrhovšlek i sar., 1998), od hidroksicinaminskih kiselina u najvećim količinama pronađene kofeinska i *p*-kumarinska kiselina. *p*-Hidroksibenzoeva kiselina nije pronađena jedino u uzorku vina 'Cabernet Franc' 010. Eskulin, jedinjenje iz grupe kumarina, u većoj količini je kvantifikovan u uzorcima 'Merlot' (0,07-0,10 mg/L) u poređenju sa vinima 'Cabernet Franc' (0,03-0,07 mg/L). U analiziranim vinima sorte 'Merlot', najveće količine katehina (4,31 mg/L) i epikatehina (1,59 mg/L) određene su u klonu 029, dok je galokatehin galat najviše zastupljen u klonu 025 (1,94 mg/L). U vinima sorte 'Cabernet Franc', od flavan-3-ola, dominiraju katehin (8,09 mg/L) i galokatehin galat (1,51 mg/L) u klonu 012, a epikatehin (2,34 mg/L) u klonu 010. Sadržaj katehina dobijen u okviru ovog istraživanja je u skladu sa rezultatima koji su objavljeni u radu Auger i sar. (2005).

Polifenolni profil uzoraka vina 'Merlot' i 'Cabernet Franc' razlikovao se od polifenolnog profila odgovarajućeg grožđa u pogledu sastava i sadržaja pojedinačnih polifenola, što je verovatno rezultat njihovih različitih količina u bobicama, efikasnosti ekstrakcije tokom maceracije, zrelosti grožđa, kao i brojnih reakcija do kojih dolazi u toku fermentacije (Puértolas i sar., 2011).

Tabela 18. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u vinima 'Merlot' i 'Cabernet Franc' (rezultati su izraženi kao mg/L).

Naziv jedinjenja	'Merlot'				'Cabernet Franc'			
	standard	klon 022	klon 025	klon 029	Standard	klon 02	klon 010	klon 012
Hidroksibenzoeve kiseline								
Galna kiselina	28,89	20,79	20,03	26,68	27,03	20,58	18,40	25,66
Protokatehuinska kiselina	1,03	1,47	0,78	0,77	0,96	0,59	0,30	0,63
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,22	0,40	0,55	0,11	0,11	0,13	-	0,58
Hidroksicinaminske kiseline								
Hlorogena kiselina	0,14	0,19	0,10	0,11	0,04	0,12	0,10	0,19
Kofeinska kiselina	2,44	1,53	1,29	1,34	0,45	1,11	0,85	1,24
Ferulinska kiselina	0,37	0,19	0,27	0,34	0,16	0,15	0,27	0,28
Rozmarinska kiselina	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,02	0,03	0,03
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,12	0,95	0,87	1,16	2,12	0,80	0,75	0,96
Kumarini								
Eskulin	0,07	0,07	0,10	0,07	0,03	0,06	0,06	0,07
Flavan-3-oli								
Epigalokatehin	0,20	0,16	0,16	0,28	0,22	0,15	0,42	0,38
Katehin	4,24	2,00	1,56	4,31	4,13	2,53	7,38	8,09
Epikatehin	1,38	0,58	1,57	1,59	1,61	0,49	2,34	1,23
Galokatehin galat	1,66	1,71	1,94	1,82	0,50	0,65	1,20	1,51
Katehin galat	0,05	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04
Epigalokatehin galat	0,08	0,06	0,06	0,08	0,17	0,05	0,06	0,04
Flavonoli								
Rutin	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03
Morin	0,04	0,06	0,06	0,08	0,04	0,04	0,03	0,06
Flavanoni								
Naringin	0,04	0,04	0,04	0,04	0,09	0,04	0,03	0,04
Flavoni								
Apigenin	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
Luteolin	-	0,04	0,04	0,04	-	0,04	0,04	-

4.2.5. Korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih jedinjenja

Za ispitivanje korelacija između sadržaja polifenola (ukupnih i pojedinačnih) i antioksidativne aktivnosti upotrebljena je linearna regresiona analiza (Tabela 19).

Tabela 19. Korelacioni koeficijenti dobijeni ispitivanjem odnosa između *RSA* i sadržaja polifenola (*TPC* i pojedinačna polifenolna jedinjenja) u grožđu u tri faze razvoja.

	Grožđe			vino
	I faza razvoja (jun)	II faza razvoja (avgust)	III faza razvoja (oktobart)	
<i>TPC</i>	0,83***	0,48	0,90*	0,90*
Galna kiselina	0,52	-0,29	0,18	-0,22
Protokatehuinska kiselina	0,17	0,36	-0,34	-0,37
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	-0,49	0,26	0,26	0,41
Hlorogena kiselina	-0,21	0,01	0,43	0,22
Kofeinska kiselina	0,71***	0,18	0,21	0,20
Ferulinska kiselina	0,84**	-0,14	0,31	0,60
Rozmarinska kiselina	0,06	-0,02	0,39	0,54
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	-0,28	-0,22	-0,63	-0,46
Eskulin	0,86**	-0,16	-0,45	0,59
Epigalokatehin	0,66	0,01	0,81***	0,55
Katehin	0,68	0,48	0,92*	0,45
Epikatehin	-0,27	0,55	0,86**	0,60
Galokatehin galat	0,54	-0,31	0,68	0,60
Katehin galat	0,25	0,37	0,91*	0,20
Epigalokatehin galat	0,69	-0,36	0,22	-0,45
Rutin	0,84**	-0,71	0,43	-0,01
Morin	0,76***	-0,03	0,41	0,04
Naringin	0,55	-0,50	/	-0,47
Apigenin	0,77***	-0,08	0,52	-0,09
Luteolin	/	/	/	-0,02

P vrednosti: * $P \leq 0,005$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,05$

Linearna zavisnost između *TPC* i *RSA*, dobijena za uzorke grožđa u prvoj fazi razvoja (formiranje zelene bobice) i za potpuno zrele uzorke, u trećoj fazi sazrevanja (*r*

= 0,83, $P < 0,05$ i $r = 0,86$, $P < 0,005$) ukazuje na značajan doprinos polifenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti grožđa u pomenutim fazama razvoja. Takođe, značajna korelacija između ovih vrednosti dobijena je i za analizirana vina ($r = 0,90$, $P < 0,005$), ali ne i za uzorke u drugoj fazi razvoja (*véraison*). Ispitan je i uticaj pojedinačnih polifenola na antioksidativnu aktivnost uzoraka (Tabela 19), a na osnovu dobijenih korelacija bilo je moguće identifikovati jedinjenja koja su potencijalno odgovorna za antioksidativni kapacitet uzoraka. U ekstraktima zelenih bobica neka polifenolna jedinjenja pokazala su snažnu pozitivnu korelaciju sa RSA, i to ferulinska kiselina ($r = 0,84$, $P < 0,01$), eskulin ($r = 0,86$, $P < 0,01$) i rutin ($r = 0,84$, $P < 0,01$). Slično, neki flavan-3-oli imali su jake pozitivne korelacije sa RSA u zreloom grožđu (katehin ($r = 0,92$, $P < 0,005$), epikatehin ($r = 0,86$, $P < 0,01$), epigalokatehin ($r = 0,81$, $P < 0,05$) i katehin galat ($r = 0,91$, $P < 0,005$)). Nasuprot tome, u uzorcima grožđa iz faze *véraison* i u ispitivanom vinu korelacije između sadržaja pojedinačnih polifenola i antioksidativne aktivnosti nisu potvrđene (Tabela 19).

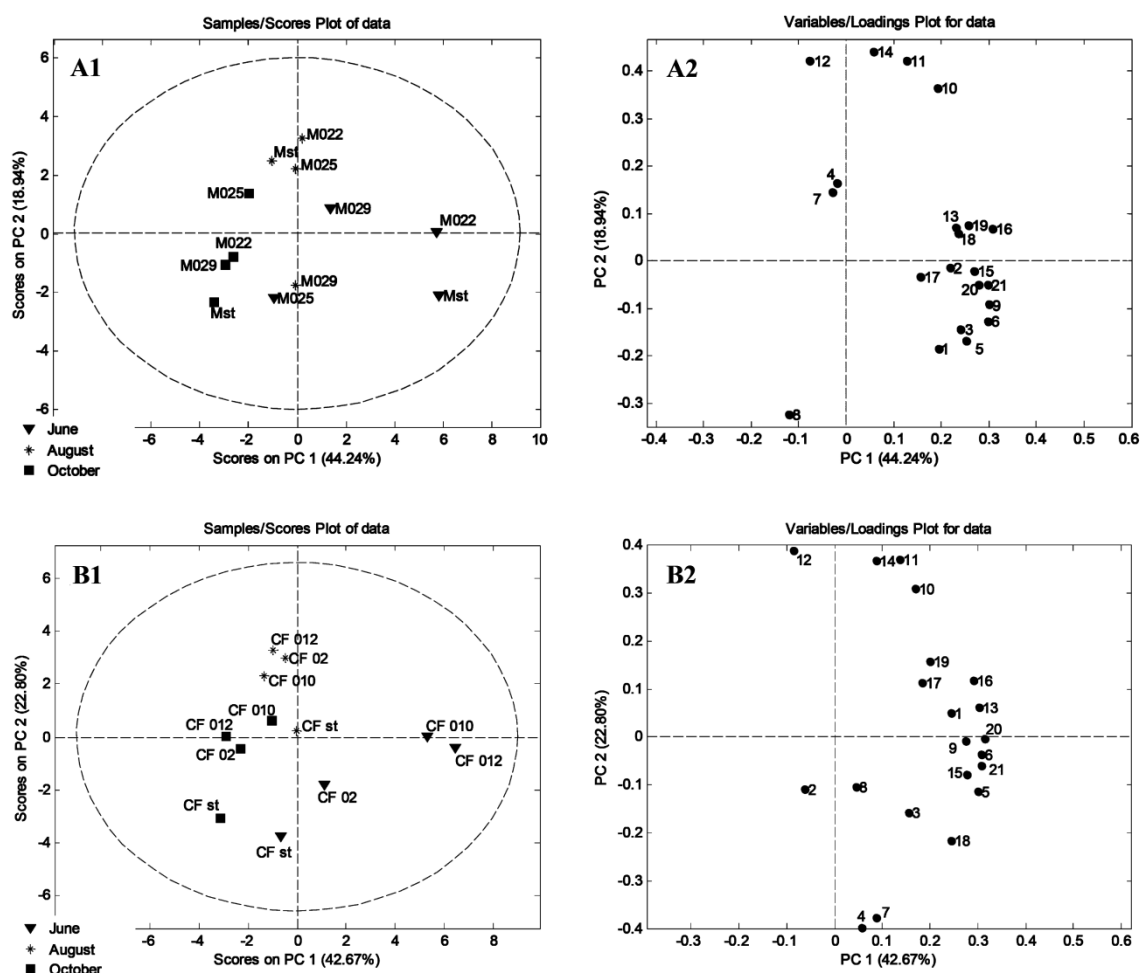
4.2.6. Rezultati analize glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata primenjena je posebno na uzorke sorte 'Merlot' (M) i 'Cabernet Franc' (CF), Slika 10. Set podataka (12 x 21) koji se sastoji od 12 uzoraka grožđa i 21 varijable (pojedinačni polifenoli, TPC i RSA) obrađen je pomoću matriksa kovarijansi sa autoskaliranjem.

Za sortu 'Merlot' dobijen je model u kojem prvih pet komponentata opisuje 91,09% od ukupnog varijabiliteta. Prva komponenta objašnjava 44,24%, druga 18,94%, a treća 11,90% od ukupnog varijabiliteta. Na grafiku skorova (Slika 10, A1) može se primetiti grupisanje uzoraka grožđa 'Merlot' na osnovu različitih faza razvoja bobice (jun, avgust i oktobar). Uzorci grožđa u drugoj fazi razvoja (avgust), sa izuzetkom klona 'Merlot' 029, izdvojili su se u odnosu na uzorke iz druge dve faze razvoja (Slika 10, A2) na osnovu većeg sadržaja flavan-3-ola (epigalokatehin, katehin, epikatehin i katehin galat). U klasteru uzoraka zrelog grožđa izdvojio se klon 'Merlot' 025 po većim sadržajima hlorogene i ruzmarinske kiseline.

PCA primenjena na uzorke grožđa 'Cabernet Franc' rezultovala je šestokomponentnim modelom koji opisuje 93,39% od ukupnog varijabiliteta. Prva

komponenta objašnjava 42,67%, druga 22,80%, a treća 11,37% od ukupnog varijabiliteta. Na grafiku skorova se može uočiti grupisanje 'Cabernet Franc' uzoraka na osnovu faza razvoja bobica (Slika 10, B1). Iz klastera koji su formirali uzorci potpuno zrelog grožđa (oktobar), izdvojio se standard 'Cabernet Franc' pre svega zahvaljujući većem sadržaju hlorogene i ruzmarinske kiseline (Slika 10, B2). Među uzorcima u prvoj fazi razvoja (jun), takođe se istakao uzorak 'Cabernet Franc' standard na osnovu većih količina pomenute dve kiseline. Klonovi grožđa (02, 010 i 012) u drugoj fazi razvoja (avgust) izdvojili su se u odnosu ostale uzorke na osnovu većeg sadržaja katehina, epikatehina i katehin galata (Slika 10, B2).



Slika 10. PCA: grafici skorova za uzorke grožđa 'Merlot' (A1) i 'Cabernet Franc' (B1); grafici varijabli za uzorke grožđa 'Merlot' (A2) i 'Cabernet Franc' (B2). Brojevi na slici A2 odgovaraju oznakama u Tabeli 16, a brojevi na slici B2 odgovaraju oznakama u Tabeli 17.

4.3. Polifenolni profil, antioksidativna aktivnost i elementalni sastav lišća različitih sorti vinove loze

Hemijska karakterizacija lišća vinove loze obuhvatila je karakterizaciju i kvantifikaciju najviše zastupljenih polifenolnih jedinjenja upotrebom *UHPLC-DAD MS/MS* sistema, kao i određivanje sadržaja ukupnih polifenola i ispitivanje antioksidativne aktivnosti spektrofotometrijskim metodama. *ICP-OES* sistem upotrebljen je za određivanje sastava makro- i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima grožđa. U tu svrhu, prikupljeno je lišće sa dva različita vinogradarska područja, iz centralne Srbije (područje Beograda) i iz istočne Srbije (područje Mlave).

4.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost lišća

Posmatrajući Tabelu 20 može se zaključiti da ne postoji značajna razlika u sadržaju ukupnih polifenola, kao ni u vrednostima dobijenim za antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka lišća. Dakle, na osnovu ovih parametara nije moguća klasifikacija lišća u zavisnosti od sorte i geografske pripadnosti. Najveći sadržaj polifenola određen je u ekstraktu lišća 'Cabernet Franc' (75,96 g EGK/kg). Isti uzorak pokazao je i najveću antioksidativnu aktivnost koja iznosi 0,87 mmol ET/kg. Najniže vrednosti za *TPC* (27,51 g EGK/kg) i *RSA* (0,43 mmol ET/kg) dobijene su za uzorak 'Pinot Gris'. Primenom linearne regresiona analize utvrđena je statistički značajna linearna zavisnost ($r = 0,93$, $P < 0,0001$) između *TPC* i *RSA*. Vrednosti dobijene za sadržaj ukupnih polifenola u listovima sorti 'Merlot', 'Shiraz' i 'Vranac' su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Katalinić i sar., 2013).

Tabela 20. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja (mg/kg suve mase uzorka), saržaj ukupnih polifenola (g EGK/kg) i antioksidativna aktivnost (mmol ET/kg) u uzorcima lišća vinove loze sa područja Beograda i Mlave.

Naziv jedinjenja	Beograd										Mlava											
	CSa	Mer	CFr	San	Shi	PNo	Pro	Gam	Rie	Pet	SBI	Wel	PGr	Cha	PBI	Vra	MHa	Plo	Žup	Cmu	Bbe	Sme
Hidroksibenzojeve kiseline																						
Galna kiselina (1)	4,49 ^o	4,61 ^l	4,72 ⁱ	3,99 ^m	3,58 ⁿ	4,38 ^k	4,67 ^{ij}	6,44 ^e	4,13 ^l	7,34 ^c	5,35 ^h	4,12 ^l	4,40 ^t	4,69 ^{ij}	5,34 ^h	4,78 ⁱ	6,81 ^d	5,74 ^s	5,94 ^f	7,80 ^a	7,05 ^d	7,61 ^b
Protokatehuinska kiselina (2)	3,47 ^k	1,25 ^q	1,78 ^p	3,08 ^m	2,55 ^o	3,24 ^l	4,95 ^s	5,11 ^f	2,74 ⁿ	10,50 ^a	4,05 ^j	3,08 ^m	3,35 ^l	5,90 ^c	4,64 ^h	3,11 ^m	4,49 ^j	5,24 ^e	5,05 ^{fg}	6,07 ^b	5,36 ^d	5,42 ^d
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina (3)	72,24 ^s	29,56 ^k	33,89 ^j	56,68 ⁱ	-	57,61 ⁱ	15,82 ^l	126,40 ^c	54,55 ⁱ	127,26 ^c	110,09 ^e	35,88 ^l	63,20 ^h	31,09 ^k	128,53 ^c	93,37 ^f	151,02 ^a	115,15 ^e	132,01 ^{bc}	138,98 ^b	97,80 ^e	121,73 ^d
Gentisinska kiselina (4)	3,76 ^f	2,71 ^h	2,75 ^h	3,85 ^f	4,07 ^e	4,38 ^d	2,75 ^h	0,74 ^l	0,60 ^m	8,85 ^a	2,75 ^h	2,73 ^h	2,80 ^h	2,70 ^h	7,83 ^b	0,99 ^k	1,21 ^j	2,27 ⁱ	3,22 ^g	3,16 ^g	4,39 ^d	6,47 ^c
Elaginska kiselina (5)	324,52 ^l	277,19 ^h	248,26 ⁱ	89,10 ⁿ	57,44 ^o	424,3 ^d	143,19 ^l	770,44 ^a	670,83 ^b	387,61 ^e	215,68 ^l	145,05 ^l	135,84 ^m	160,39 ^t	309,65 ^s	421,30 ^d	311,16 ^s	270,90 ⁱ	269,06 ⁱ	419,17 ^d	398,36 ^e	498,06 ^c
Hidroksicinaminske kiseline																						
Hlorogena kiselina (6)	11,48 ^a	9,04 ^b	8,63 ^c	-	0,29 ^o	-	3,27 ^s	2,65 ⁱ	5,57 ^d	-	8,55 ^c	5,04 ^e	1,00 ^m	3,03 ^h	0,25 ^o	2,42 ^j	2,61 ⁱ	2,13 ^k	3,52 ^f	1,83 ^l	0,48 ⁿ	0,15 ^p
Kofeinska kiselina (7)	5,21 ^j	2,72 ^q	5,36 ⁱ	8,95 ^b	4,96 ^k	5,28 ^{ij}	5,64 ^h	6,19 ^f	4,18 ⁿ	19,64 ^a	4,10 ^o	3,20 ^p	4,80 ^l	5,03 ^k	4,74 ^l	4,58 ^m	5,98 ^g	7,17 ^d	5,69 ^h	6,62 ^e	7,19 ^d	8,26 ^c
<i>p</i> -Kumarinska kiselina (8)	0,77 ^o	2,84 ^s	4,69 ^b	1,15 ^m	1,91 ⁱ	1,44 ^k	3,43 ^l	3,59 ^e	1,29 ^j	8,17 ^a	1,10 ^{mm}	3,94 ^c	4,85 ^b	3,96 ^c	1,80 ^j	0,54 ^p	0,58 ^p	2,52 ^h	1,83 ^{ij}	1,04 ⁿ	2,85 ^g	2,89 ^g
Ferulinska kiselina (9)	22,44 ^m	18,32 ⁿ	38,98 ⁱ	21,46 ^m	18,16 ⁿ	32,91 ^l	28,70 ^k	42,66 ^h	19,11 ⁿ	89,83 ^a	25,50 ^l	7,10 ^o	28,25 ^k	27,01 ^k	45,45 ^s	64,23 ^d	59,46 ^e	71,05 ^b	55,46 ^f	70,63 ^b	67,00 ^c	56,63 ^f
Flavonoli																						
Kvercetin (10)	17,90 ^s	11,68 ^l	47,14 ^b	10,68 ^j	15,96 ⁱ	16,88 ^h	21,15 ^f	5,65 ⁿ	31,85 ^c	48,17 ^b	7,40 ^l	16,72 ^h	6,10 ^m	18,64 ^s	7,93 ^k	16,02 ⁱ	17,52 ^{gh}	21,46 ^f	26,79 ^d	24,35 ^e	52,04 ^a	20,80 ^f
Kempferol (11)	4,01 ^g	2,54 ^j	6,15 ^c	3,99 ^g	1,13 ^m	1,89 ^j	2,81 ^{ij}	1,18 ^m	6,77 ^b	19,40 ^a	2,50 ^j	3,43 ^h	-	3,49 ^h	2,39 ^k	-	2,41 ^k	4,40 ^f	4,80 ^e	6,03 ^c	5,07 ^d	2,74 ⁱ
Rutin (12)	177,48 ^s	140,16 ⁱ	219,12 ^d	138,85 ⁱ	74,77 ^l	177,69 ^s	159,23 ^h	178,54 ^s	392,03 ^c	450,37 ^a	190,13 ^l	195,90 ^e	139,14 ⁱ	114,66 ^t	227,62 ^c	124,48 ^j	0,68 ^o	219,73 ^d	434,24 ^{bc}	196,28 ^e	218,3 ^d	69,52 ^m
Flavan-3-oli																						
Katehin (13)	30,45 ^e	60,50 ^a	46,96 ^c	16,55 ^h	44,77 ^d	29,08 ^e	28,49 ^e	10,66 ⁱ	29,51 ^e	16,67 ^h	2,60 ⁿ	24,83 ^l	23,10 ^g	51,16 ^b	4,94 ^k	8,18 ^j	1,25 ^p	1,83 ^o	3,32 ^m	4,45 ^l	1,93 ^o	4,33 ^l
Epikatehin (14)	1,54 ^k	1,49 ^k	9,87 ^a	7,55 ^c	5,20 ^d	3,58 ^e	2,92 ^s	8,06 ^b	2,49 ^j	2,48 ⁱ	3,15 ^f	2,90 ^g	2,70 ^h	3,64 ^e	5,19 ^d	1,77 ^j	0,53 ^l	-	2,67 ^h	2,42 ⁱ	3,04 ^g	3,78 ^e
Galokatehin galat (15)	27,26 ^h	64,32 ^b	78,68 ^a	38,34 ^e	20,47 ^j	26,09 ^h	53,78 ^c	33,66 ^g	36,73 ^{df}	54,69 ^c	26,85 ^h	81,23 ^a	20,05 ^j	45,82 ^d	33,43 ^g	35,84 ^f	26,79 ^h	38,17 ^e	52,44 ^c	52,90 ^c	20,90 ^j	22,25 ⁱ

Epigalokatehin galat (16)	18,58 ⁱ	3,96 ^f	4,68 ^f	30,98 ^e	43,79 ^b	-	3,51 ^m	22,12 ^h	28,77 ^e	40,78 ^c	29,70 ^e	-	-	4,14 ^k	39,72 ^c	28,54 ^e	24,37 ^g	40,79 ^c	26,24 ^f	33,09 ^d	21,82 ^h	48,17 ^a
Galokatehin (17)	102,16 ^a	33,44 ^h	74,69 ^c	42,34 ^g	71,97 ^d	63,73 ^e	17,92 ^{ij}	-	82,37 ^b	6,03 ^m	4,85 ⁿ	14,54 ⁱ	54,75 ^f	15,79 ^j	-	12,32 ^k	-	-	6,68 ^l	4,84 ⁿ	6,47 ⁱ	-
Epigalokatehin (18)	15,20 ^{ef}	8,02 ^j	13,10 ^g	66,25 ^a	39,32 ^b	8,41 ⁱ	16,30 ^e	1,67 ^p	24,78 ^c	8,60 ⁱ	2,70 ^{mm}	12,57 ^h	7,35 ^t	14,76 ^f	3,79 ^j	17,60 ^d	1,88 ^o	1,48 ^q	2,18 ⁿ	2,32 ⁿ	1,79 ^o	3,53 ^f
Stilben																						
Resveratrol (19)	16,17 ^e	-	17,07 ^d	-	13,65 ^f	6,87 ⁱ	-	-	84,36 ^b	117,49 ^a	-	-	-	-	2,10 ^k	0,49 ^j	8,16 ^h	11,82 ^g	22,88 ^c	4,54 ⁱ	-	-
Kumarin																						
Eskulin (20)	31,66 ^f	43,58 ^b	42,10 ^c	50,66 ^a	24,99 ^j	32,71 ^e	27,40 ^{ij}	28,85 ^h	32,00 ^{ef}	29,55 ^{sh}	27,45 ⁱ	36,64 ^d	27,10 ⁱ	43,77 ^b	29,09 ^h	26,77 ^j	25,73 ^k	29,07 ^h	24,56 ^m	27,02 ⁱ	30,65 ^g	27,22 ⁱ
TPC (21)	39,53 ^j	53,12 ^c	75,96 ^a	50,28 ^d	47,24 ^f	37,59 ^k	48,34 ^e	42,26 ⁱ	45,25 ^g	47,38 ^f	41,76 ⁱ	41,79 ⁱ	27,51 ^m	57,83 ^b	40,26 ⁱ	35,22 ^j	43,23 ^h	45,14 ^g	54,18 ^c	47,22 ^f	43,95 ^g	47,03 ^f
RSA (22)	0,52 ^f	0,61 ^d	0,87 ^a	0,62 ^d	0,51 ^f	0,51 ^f	0,59 ^{de}	0,54 ^f	0,54 ^f	0,46 ^g	0,52 ^f	0,54 ^f	0,43 ^h	0,71 ^b	0,52 ^f	0,47 ^g	0,57 ^e	0,57 ^e	0,65 ^c	0,61 ^d	0,59 ^{de}	0,61 ^d

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$. Brojevi u zagradama u Tabeli 20 odgovaraju oznakama na Slici 11 i 13B.

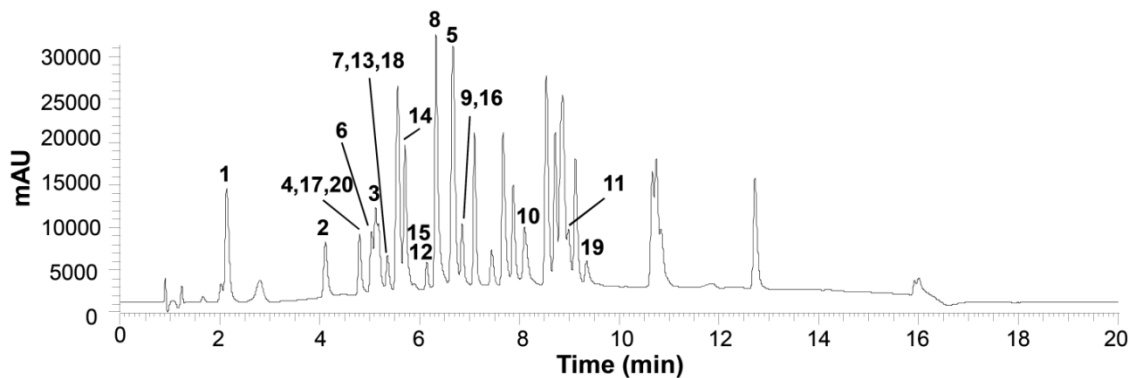
Oznake u tabeli: 'Cabernet Sauvignon' (CSa), 'Merlot' (Mer), 'Cabernet Franc' (CFr), 'Sangiovese' (San), 'Shiraz' (Shi), 'Pinot Noir' (PNo), 'Gamay' (Gam), 'Riesling' (Rie), 'Sauvignon Blanc' (SBI), 'Welschriesling' (Wel), 'Pinot Gris' (PGr), 'Chardonnay' (Cha), 'Pinot Blanc' (PBI), 'Vranac' (Vra), 'Muscat Hamburg' (MHa), 'Župljanka' (Žup), 'Chasselas musque' (Cmu), 'Beogradska besemena' (Bbe), 'Prokupac' (Pro), 'Plovdina' (Plo), 'Smederevka' (Sme), 'Petra' (Pet).

4.3.2. Polifenolni profil lišća

Ukupno 20 polifenolnih jedinjenja kvantifikovano je (fenolne kiseline, flavan-3-oli i flavonoli) koristeći dostupne standarde (Tabela 20). Spisak kvantifikovanih jedinjenja, zajedno sa podacima masene spektrometrije, granicama detekcije (*limit of detection*, *LOD*) i kvantifikacije (*limit of quantification*, *LOQ*) dat je u Tabeli 21. UV hromatogram ispitivanih standarda na 280 nm prikazan je na Slici 11.

Tabela 21. Validacija metode za kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja: zadata masa, produkt-joni sa kolizionom energijom, srednje retenciono vreme (t_R), koeficijent determinacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) i efikasnost metode na dva koncentraciona nivoa.

t_R , min	Polifenolna jedinjenja	Zadata masa, m/z	Produkt joni, m/z (koliziona energija, eV)	R^2	LOD, mg/L	LOQ, mg/L	Efikasnost (%)	
							Nivo 1	Nivo 2
1,98	Galna kiselina	169,032	79,11(31); 125,04(16)	0,9911	0,16	0,55	29,21	36,99
3,87	Galokatehin	305,120	125,22(27); 179,19(17)	0,9996	0,03	0,10	91,73	105,84
3,98	Protokatehuinska kiselina	153,013	108,09(23); 109,10(14)	0,9980	0,10	0,34	102,83	67,59
4,89	Eskulin	339,080	133,09(44); 177,06(25)	0,9999	0,01	0,05	90,18	74,76
5,07	Epigalokatehin	305,110	125,22(27); 179,19(17)	0,9999	0,01	0,02	96,03	112,28
5,08	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	137,057	93,19(19); 108,33(22)	0,9934	0,14	0,48	99,55	101,07
5,18	Gentisinska kiselina	153,003	108,07(5); 109,10(15)	0,9998	0,02	0,06	51,49	58,66
5,23	Hlorogena kiselina	353,103	191,28(25)	0,9980	0,08	0,27	115,57	109,31
5,25	Katehin	289,094	203,00(23); 245,03(31)	0,9953	0,14	0,45	111,28	104,88
5,51	Kofeinska kiselina	179,004	134,00(13); 135,00(16)	0,9951	0,11	0,38	111,37	110,56
5,82	Galokatehin galat	457,146	161,08(25); 359,23(16)	0,9930	0,07	0,22	84,53	66,80
5,75	Epikatehin	289,084	203,00(23); 245,03(31)	0,9991	0,06	0,19	84,26	88,94
6,04	Rutin	609,197	299,98(42); 301,20(32)	0,9976	0,09	0,31	87,85	75,27
6,07	Elaginska kiselina	300,980	284,00(32); 300,04(30)	0,9938	0,11	0,37	60,10	58,61
6,15	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	163,031	93,12(39); 119,09(16)	0,9947	0,12	0,41	110,67	116,87
6,55	Ferulinska kiselina	193,057	134,00(18); 178,00(15)	0,9933	0,15	0,50	101,12	95,11
6,81	Epigalokatehin galat	457,156	161,08(25); 359,23(16)	0,9928	0,15	0,51	70,29	73,37
7,45	Resveratrol	227,060	143,18 (22); 185,04 (22)	0,9902	0,14	0,47	80,96	126,62
7,58	Kvercetin	301,026	151,01(22); 179,00(20)	0,9978	0,08	0,27	110,98	97,91
8,19	Kempferol	285,074	211,00(32); 227,00(32)	0,9961	0,04	0,13	95,26	85,53



Slika 11. Hromatogram ispitivanih standarda na talasnoj dužini od 280 nm. Brojevi pikova odgovaraju brojevima datim u Tabeli 20.

Naše istraživanje pokazalo je da listovi vinove loze akumuliraju velike količine fenolnih kiselina, sa posebno velikim sadržajem elaginske kiseline (u količinama do 770,44 mg/kg). Elaginska kiselina privlači posebnu pažnju jer se smatra bioaktivnim jedinjenjem koje ima širok spektar potencijalno korisnih efekata na ljudsko zdravlje (Brewer, 2016). Najveći sadržaj elaginske kiseline pronađen je u lišću 'Gamay' (770,44 mg/kg), zatim 'Riesling' (670,83 mg/kg), dok je najmanja količina bila u lišću 'Shiraz' (57,44 mg/kg). U pojedinim uzorcima pronađen je visok sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline (do 151,02 mg/kg u 'Muscat Hamburg'), dok su ostale hidroksibenzoeve kiseline (galna, protokatehuinska i gentsinska) kvantifikovane u manjim količinama. Od hidrokicinaminskih kiselina, najviše je zastupljena ferulinska kiselina (od 7,10 mg/kg u uzorku 'Welschriesling' do 89,83 mg/kg u uzorku 'Petra'). Uzorci svih sorti su bogati rutinom, što je u saglasnosti sa podacima do sada objavljenim u literaturi (Farhadi i sar., 2016; Katalinić i sar., 2009). Sadržaj kvercetina nalazi se u opsegu od 5,65 mg/kg ('Gamay') do 52,04 mg/kg ('Beogradska besemena'). Kempferol nije detektovan u dva uzorka, dok je njegov sadržaj u drugim uzorcima bio do 19,40 mg/kg ('Petra').

Posmatrajući Tabelu 20, mogu se приметiti razlike u profilu flavan-3-ola ekstrahovanih iz lišća. Ovo je naročito uočljivo kod katehina, galokatehina i epigalokatehina, čije su količine: 1,25-60,50 mg/kg (katehin), 0,00-102,16 mg/kg (galokatehin) i 1,48-66,25 mg/kg (epigalokatehin).

U odnosu na ostale uzorke, ekstrakt lišća domaće hibridne sorte 'Petra' izdvaja se po većem sadržaju fenolnih kiselina: protokatehuinske (10,50 mg/kg), gentsinske (8,85

mg/kg), kofeinske (19,64 mg/kg), *p*-kumarinske (8,17 mg/kg) i ferulinske (89,83 mg/kg), kao i flavonola: kempferola (19,40 mg/kg) i rutina (450,37 mg/kg). U ovom uzorku je pronađen i najveći sadržaj resveratrola (117,49 mg/kg), a razlog za to bi mogla biti smanjena osetljivost sorte 'Petra' na bolesti koje izazivaju *Botrytis cinerea* P. i *Plasmopara viticola* (Cindrić i sar., 2000).

Prema do sada objavljenim rezultatima (Schoedl i sar., 2011), lišće sorte 'Rizling' ima veći sadržaj polifenola nego lišće sorte 'Pinot Noir', što su pokazali i naši rezultati, kada su u pitanju kvercetin, katehin, kamferol i resveratrol. Nasuprot rezultatima istog autora (Schoedl i sar., 2012), u našem istraživanju je zabeleženo prisustvo kofeinske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, ferulinske kiseline i resveratrola u lišću 'Pinot Noir'.

U cilju proučavanja odnosa između pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, *TPC* i *RSA* vrednosti, odvojeno za područje Beograda i područje Mlave, konstruisana su dva korelaciona matriksa. Rezultati korelacione analize prikazani su u Tabelama 22 i 23.

U Tabeli 22 prikazani su korelacioni koeficijenti dobijeni za uzorke lišća sa područja Beograda. Može se primetiti da su sve fenolne kiseline, osim elaginske i hlorogene, pokazale neke statistički značajne veze za koje je $r > 0,64$ i $P < 0,01$. Od flavonoida, statistički značajne korelacije ($r > 0,67$, $P < 0,01$) pokazali su kempferol, rutin i resveratrol, kako međusobno, tako i sa pojedinim polifenolnim jedinjenjima. Očekivano, odnos *RSA* i *TPC* u uzorcima lišća sa područja Beograda okarakterisan je visokim stepenom korelacije ($r = 0,93$, $P < 0,00001$). Eskulin je jedino fenolno jedinjenje koje je pokazalo statistički značajnu korelaciju sa *RSA* ($r = 0,66$, $P < 0,01$).

Na osnovu visokih vrednosti koeficijenata korelacije (Tabela 23) između *RSA* i protokatehuinske kiseline ($r > 0,83$, $P < 0,05$), kao i između *RSA* i kempferola ($r > 0,78$, $P < 0,05$), može se pretpostaviti da ova dva jedinjenja najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka lišća sa područja Mlave.

Značajne pozitivne korelacije za koje je $P < 0,01$, utvrđene su između kempferola i protokatehuinske kiseline ($r = 0,90$), epigalokatehina i katehina ($r = 0,89$) i rutina i resveratrola ($r = 0,88$). Osim toga, primećeno je prisustvo i nekoliko značajnih korelacija ($P < 0,05$) sa negativnim vrednostima za koeficijente korelacije. Dobijene vrednosti za sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima lišća sa područja Mlave u snažnoj su korelaciji sa vrednostima za *RSA* ($r = 0,97$, $P < 0,0005$).

Tabela 22. Vrednosti koeficijenta korelacije između pojedinačnih polifenolnih jedinjenja (1-20), sadržaja ukupnih polifenola (21) i antioksidativne aktivnosti (22) u uzorcima lišća sa područja Beograda.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0,79	0,79	0,42	0,47	-0,17	0,68	0,59	0,87	0,26	0,60	0,56	-0,45	0,06	0,08	0,30	-0,60	-0,52	0,44	-0,26	-0,01	-0,17
	2	0,55	0,57	0,17	-0,41	0,82	0,62	0,82	0,32	0,70	0,53	-0,40	-0,16	-0,03	0,34	-0,54	-0,24	0,55	-0,28	-0,12	-0,29
		3	0,42	0,52	-0,14	0,44	0,14	0,64	-0,09	0,32	0,49	-0,79	0,07	-0,29	0,48	-0,46	-0,41	0,28	-0,33	-0,37	-0,41
			4	-0,22	-0,43	0,64	0,32	0,68	0,25	0,54	0,33	-0,27	-0,10	-0,04	0,46	-0,25	-0,05	0,35	-0,15	-0,10	-0,27
				5	0,07	0,10	-0,02	0,31	0,13	0,19	0,54	-0,24	0,07	-0,12	0,14	-0,01	-0,37	0,41	-0,22	-0,13	-0,17
					6	-0,41	-0,24	-0,35	0,11	-0,08	-0,02	0,30	-0,20	0,31	-0,28	0,31	-0,27	-0,11	0,16	0,30	0,35
						7	0,63	0,85	0,55	0,87	0,61	-0,28	0,03	0,06	0,44	-0,23	0,11	0,71	-0,05	0,06	-0,19
							8	0,67	0,54	0,62	0,40	0,08	0,02	0,47	-0,13	-0,36	-0,32	0,44	-0,04	0,21	0,06
								9	0,51	0,75	0,62	-0,32	0,12	0,03	0,37	-0,35	-0,31	0,61	-0,23	0,07	-0,13
									10	0,80	0,67	0,27	0,11	0,51	0,06	0,24	0,00	0,74	0,11	0,59	0,39
										11	0,83	-0,09	-0,12	0,34	0,36	-0,11	-0,02	0,88	0,04	0,26	-0,02
											12	-0,31	-0,17	0,20	0,35	-0,07	-0,21	0,91*	-0,17	0,02	-0,18
												13	-0,10	0,36	-0,44	0,44	0,12	-0,08	0,43	0,55	0,51
													14	0,13	0,15	-0,04	0,28	-0,23	0,28	0,51	0,56
														15	-0,40	-0,21	-0,11	0,08	0,49	0,64	0,60
															16	-0,10	0,31	0,45	-0,29	-0,09	-0,32
																17	0,34	0,12	0,06	0,08	0,10
																	18	0,00	0,45	0,19	0,15
																		19	-0,18	0,07	-0,21
																			20	0,58	0,66
																				21	0,93*
																					22

P vrednosti: $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$, $*p < 0,00001$

Tabela 23. Vrednosti koeficijenta korelacije između pojedinačnih fenolnih jedinjenja (1-20), sadržaja ukupnih polifenola (21) i antioksidativne aktivnosti (22) u uzorcima lišća sa područja Mlave.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0,80	0,48	0,65	0,43	-0,58	0,71	0,30	-0,01	0,30	0,56	-0,22	-0,39	0,47	-0,17	0,22	-0,52	-0,65	-0,29	0,15	0,42	0,63
	2	0,40	0,62	0,04	-0,38	0,75	0,54	0,22	0,39	0,90	0,19	-0,54	0,30	0,17	0,31	-0,54	-0,84	0,12	0,26	0,71	0,83
		3	-0,08	-0,31	0,36	0,08	-0,33	-0,28	-0,37	0,31	0,20	-0,45	-0,20	0,32	0,02	-0,58	-0,57	0,45	-0,61	0,53	0,55
			4	0,55	-0,75	0,82	0,79	-0,26	0,41	0,36	-0,14	-0,13	0,80	-0,31	0,51	-0,31	-0,41	-0,24	0,27	0,47	0,61
				5	-0,75	0,32	0,12	-0,03	0,05	-0,25	-0,73	0,54	0,68	-0,39	0,36	0,16	0,34	-0,84	0,22	-0,34	-0,16
					6	-0,77	-0,63	-0,16	-0,44	-0,09	0,64	0,05	-0,53	0,68	-0,42	0,25	0,15	0,78	-0,69	0,16	-0,06
						7	0,81	0,07	0,32	0,46	-0,28	-0,49	0,33	-0,41	0,62	-0,71	-0,66	-0,25	0,50	0,38	0,54
							8	0,00	0,56	0,42	0,05	-0,39	0,40	-0,37	0,44	-0,37	-0,49	-0,05	0,59	0,41	0,47
								9	0,21	0,34	-0,16	-0,03	-0,39	0,16	0,01	0,07	-0,01	-0,29	0,66	-0,34	-0,30
									10	0,55	0,27	-0,38	0,42	-0,27	-0,42	0,16	-0,37	-0,16	0,65	0,19	0,29
										11	0,52	-0,57	0,17	0,39	-0,04	-0,28	-0,80	0,34	0,25	0,72	0,78
											12	-0,31	-0,04	0,62	-0,45	0,19	-0,35	0,88	-0,32	0,68	0,52
												13	0,29	0,22	0,13	0,72	0,89	-0,34	-0,24	-0,48	-0,53
													14	-0,12	0,12	0,25	0,00	-0,29	0,02	0,31	0,41
														15	-0,07	0,28	-0,01	0,63	-0,50	0,43	0,28
															16	-0,51	-0,09	-0,17	0,08	0,13	0,16
																17	0,74	-0,11	-0,07	-0,37	-0,46
																	18	-0,37	-0,14	-0,75	-0,83
																		19	-0,54	0,69	0,49
																			20	-0,31	-0,18
																				21	0,97
																					22

P vrednosti: $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,0005$

4.3.3. Elementalna analiza lišća

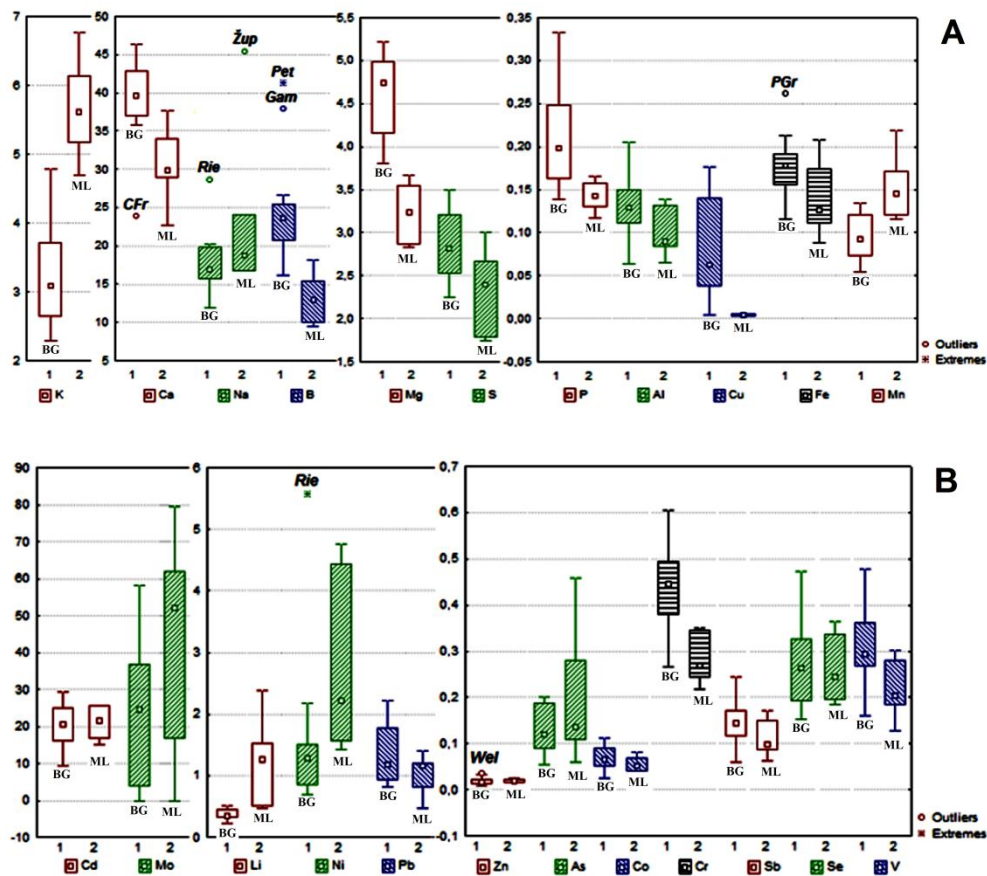
U uzorcima lišća sa područja Beograda i Mlave ispitano je prisustvo 23 elementa, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 24.

U svim ispitanim uzorcima kalijum je najviše zastupljen element, sa količinama od 2,30 g/kg u lišću 'Welschriesling' do 6,77 g/kg u uzorku 'Muscat Hamburg'. U ispitivanim uzorcima lišća pronađene su i veće količine B, Na, Ca, Mg i S. Toksični elementi (As, Cd i Pb) zastupljeni su u niskim količinama: arsen je prisutan u opsegu od 0,06 do 0,46 µg/kg, sadržaj kadmijuma je iznosio od 9,40 do 29,43 µg/kg, dok je količina olova bila od 0,46 do 2,23 µg/kg. Kada je o olovu reč, smatra se da značajna količina ovog elementa u biljkama može poticati iz atmosfere, kao i iz zemljišta (Kabata-Pendias, 2011; Musielińska i sar., 2016). Iako se najveći deo zagađenja olovom može ukloniti sa površine listova pranjem uz pomoć deterdženta, primetna količina ostaje u samoj biljci usled njegove translokacije u biljna tkiva.

Grafičko prikazivanje raspodele podataka koji odgovaraju sadržaju elemenata u ispitivanim uzorcima lišća izvršeno je primenom grafika „kutije i brkova” (*box and whiskers plot*) (Slika 12).

Duž ose promenljive, u ovom slučaju ordinate, prikazana je kutija koja je definisana interkvartilnim odstupanjem (IQR), tj. razmakom u kojem se oko medijane nalazi polovina svih vrednosti, sa gornjom (Q3) i donjom (Q1) kvartilnom vrednošću koje definiraju vrh i dno kutije. Gornja i donja vrednost „brkova“ nalaze se na nivou koji odgovara trećem kvartilu uvećanom za 1,5 IQR, odnosno prvom kvartilu umanjenom za 1,5 IQR, redom. Vrednosti koje se nalaze van gornje i donje vrednosti „brkova“ smatraju se grubim greškama (spoljašnjim rezultatima), odnosno vrednosti koje su izvan granica $Q3 + 3 IQR$ i $Q1 - 3 IQR$ smatraju se ekstremnim rezultatima.

Izgled grafika „kutije i brkova“ ukazuju na veliki stepen rasipanja i asimetričnosti rezultata dobijenih za većinu elemenata (Mo, Ni, As, Se, V, K, Mg, S, P, Cu). Poredeći medijane sadržaja elemenata u analiziranim ekstraktima, uočava se da je lišće sa područja Beograda bogatije u sadržaju Ca, B, Mg, S, P, Al, Cu, Fe, Cr, Pb i V, dok uzorci prikupljeni na području Mlave imaju veće količine K, Na, Mn, Mo, Li i Ni (Tabela 24).



Slika 12. Sadržaj elemenata u uzorcima lišća sa područja Beograda (BG) i Mlave (ML) ($n = 22$). (A) Rezultati su izraženi kao mg/kg (osim K (g/kg)); (B) Rezultati su izraženi kao $\mu\text{g/kg}$.

Medijane koje predstavljaju centralnu vrednost sadržaja Cd, Zn, As, Co, Sb i Se u obe grupe uzoraka su slične. Takođe, medijane pojedinih elemenata (K, Ca, B, Mg, Cu, Mn, Mo, Li, Ni i Cr) razlikuju se u većoj meri u ekstraktima sa različitih područja. Na grafiku se može uočiti i prisustvo rezultata koji su posledica grubih grešaka. Spoljašnje vrednosti se javljaju u uzorcima lišća sa područja Beograda kod elemenata Ca, Na, B, Fe, Ni i Zn, dok je jedna vrednost koja se nalazi van granica brkova u uzorku iz Mlave uočena samo kod Na.

U cilju dalje analize rezultata mineralnog sastava lišća, konstruisani su Pirsonovi korelacioni matriksi za uzorke lišća sa područja Beograda (Tabela 25) i Mlave (Tabela 25). Statistički značajne korelacije naglašene su u Tabelama 25 i 26. U slučaju Al, Fe, V i Cr dobijene su značajne pozitivne korelacije u uzorcima sa oba lokaliteta. Ovi elementi su često u međusobnoj korelaciji u uzorcima zemljišta, te dobijeni rezultati ukazuju na

vezu između prisutnosti pomenutih elemenata u zemljištu i njihovoj zastupljenosti u listovima. S tim u vezi, smatra se da količina Cr u biljkama uglavnom zavisi od njegove količine koja se nalazi rastvorena u zemljištu (Kabata-Pendias, 2011).

Prosečna vrednost bora u lišću sa područja Beograda iznosi oko 25 mg/kg, dok se u uzorcima lišća sa područja Mlave ta vrednost kreće oko 13 mg/kg. Bor ima važnu ulogu u translokaciji šećera, a adekvatno snabdevanje biljke borom je neophodno za sintezu šećera (Kabata-Pendias, 2011). Posmatrajući rezultate korelacione analize (Tabela 26) može se primetiti da je u uzorcima lišća sa područja Mlave sadržaj B u pozitivnoj korelaciji sa Al, Fe, As, Cr i V. Nasuprot tome, količina bora u lišću sa područja Beograda nije imala značajnih pozitivnih korelacija sa drugim elementima (Tabela 25).

U lišću sa područja Mlave za korelaciju molibdena sa određenim elementima (P, S, Cu, Fe i As) dobijeni su negativni korelacioni koeficijenti (Tabela 26). Za takve korelacije moguće je dati objašnjenja koja se oslanjaju na metaboličke procese u biljkama i ulogu molibdena u tim procesima. Tako na primer, antagonizam između Mo i Cu u biljkama u velikoj meri je povezan sa metabolizmom azota, a pre svega zavisi od biljne vrste, kao i od toga u kom obliku se nalazi azot koji biljka koristi u ishrani. Takođe, poznato je da zemljišta bogata gvožđem imaju nizak sadržaj molibdena. Značajne su i interakcije između Mo i P, koje su veoma složene i pod uticajem različitih faktora, koji potiču iz zemljišta i metaboličkih procesa u biljkama. Fosfor povećava dostupnost Mo u kiselim zemljištima, a utiče i na njegovu veću pokretljivost unutar biljnih tkiva (Kabata-Pendias, 2011). Sam molibden je veoma važan element jer obavlja funkciju redukcije nitrata, koja je veoma značajna za rast i razvoj biljaka (Kaiser i sar., 2005).

Tabela 25. Korelacioni koeficijenti između elemenata (23-45) u uzorcima lišća sa područja Beograda.

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
23	0,15	0,50	0,00	-0,21	0,29	-0,05	-0,21	-0,46	0,08	0,16	-0,27	-0,02	0,38	0,08	-0,07	0,13	0,08	0,68	0,18	-0,03	0,30	-0,20
	24	0,65	0,30	0,33	0,42	0,19	0,29	0,27	0,33	0,58	0,09	-0,29	0,39	0,30	0,35	0,27	0,38	0,44	0,04	-0,09	0,23	0,25
		25	-0,02	-0,09	0,42	-0,05	0,21	0,01	0,26	0,41	0,20	-0,37	0,43	-0,04	0,23	0,27	0,08	0,70	0,00	-0,09	0,21	0,15
			26	0,39	0,17	0,08	-0,15	0,46	-0,06	0,22	0,14	0,17	0,06	0,09	-0,11	0,33	0,24	-0,02	0,05	0,02	-0,13	-0,08
				27	0,27	-0,16	0,38	0,44	0,37	0,05	0,54	0,09	0,25	0,56	0,41	0,37	0,04	-0,25	0,10	0,21	0,11	0,32
					28	0,12	0,04	0,32	0,12	0,67	0,38	-0,12	0,81	0,41	0,10	0,52	0,27	0,55	-0,52	0,49	0,42	-0,06
						29	-0,34	0,00	-0,44	0,65	-0,53	0,14	0,01	-0,30	-0,31	0,20	0,58	-0,11	-0,10	0,11	0,05	-0,36
							30	0,13	0,87	-0,10	0,45	-0,08	0,34	0,51	0,96**	0,39	-0,22	-0,06	0,42	0,21	0,19	0,84
								31	-0,06	0,26	0,57	-0,07	0,25	0,01	0,06	0,24	0,32	-0,28	-0,29	0,19	-0,07	-0,01
									32	-0,16	0,25	0,04	0,37	0,68	0,92*	0,39	-0,20	0,18	0,39	0,23	0,43	0,86
										33	-0,05	-0,03	0,49	0,12	-0,02	0,42	0,56	0,38	-0,23	0,31	0,19	-0,05
											34	-0,20	0,39	0,23	0,34	0,29	-0,22	-0,06	-0,18	0,24	-0,07	0,26
												35	0,09	0,08	0,00	0,01	-0,19	-0,11	0,28	0,70	0,05	0,14
													36	0,52	0,44	0,43	0,02	0,46	-0,01	0,59	0,27	0,20
														37	0,65	0,26	-0,08	0,16	0,18	0,35	0,29	0,60
															38	0,36	-0,22	0,00	0,50	0,25	0,20	0,90*
																39	0,46	0,22	-0,12	0,39	0,59	0,24
																	40	0,08	-0,33	-0,10	0,52	-0,30
																		41	-0,24	0,17	0,46	-0,01
																			42	-0,10	-0,33	0,46
																				43	0,31	0,25
																					44	0,15
																						45

P vrednosti: $P < 0,01$, $P < 0,001$, $P < 0,0001$, $*P < 0,00001$, $**P < 0,000001$

Tabela 26. Korelacioni koeficijenti između elemenata (23-45) u uzorcima lišća sa područja Mlave.

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
23	-0,16	-0,54	-0,20	0,61	0,19	0,21	-0,05	0,36	0,09	0,48	0,41	0,01	0,80	-0,13	0,21	-0,24	-0,49	0,55	-0,16	-0,38	0,41	-0,02
	24	-0,32	0,48	-0,42	0,88	0,74	0,61	0,50	0,72	-0,66	-0,61	0,53	-0,40	-0,44	0,63	-0,60	-0,58	0,03	0,62	0,21	0,14	0,72
		25	0,19	-0,54	-0,72	-0,44	0,01	-0,48	-0,22	-0,20	-0,20	-0,22	-0,34	-0,26	-0,17	0,82	0,62	-0,13	-0,10	-0,08	-0,43	-0,09
			26	-0,13	0,28	0,72	0,78	0,50	0,88	-0,21	-0,27	0,83	0,06	-0,62	0,82	-0,02	-0,52	0,08	0,24	0,52	0,22	0,87
				27	-0,05	0,02	-0,35	0,02	-0,11	0,66	0,48	0,05	0,73	0,19	-0,13	-0,05	-0,24	0,42	-0,18	0,28	0,70	-0,25
					28	0,80	0,50	0,67	0,68	-0,32	-0,27	0,55	-0,06	-0,18	0,60	-0,87	-0,79	0,03	0,42	0,13	0,26	0,61
						29	0,79	0,82	0,88	-0,27	-0,27	0,75	0,14	-0,49	0,83	-0,63	-0,85	0,18	0,41	0,38	0,29	0,87
							30	0,93	0,88	-0,27	-0,19	0,78	0,04	-0,48	0,95	-0,39	-0,67	-0,13	0,16	0,20	-0,14	0,96
								31	0,87	-0,02	0,06	0,89	0,31	-0,20	0,90	-0,73	-0,82	-0,05	0,07	0,10	-0,03	0,87
									32	-0,17	-0,17	0,92	0,17	-0,53	0,96	-0,46	-0,86	0,05	0,22	0,27	0,21	0,96
										33	0,84	0,12	0,80	0,52	-0,12	0,05	-0,16	-0,17	-0,86	-0,26	0,09	-0,32
											34	0,10	0,37	0,65	-0,11	-0,08	-0,15	-0,38	-0,83	-0,38	-0,16	-0,30
												35	0,30	-0,26	0,85	-0,40	-0,82	-0,15	-0,05	0,32	0,24	0,82
													36	0,06	0,26	-0,06	-0,50	0,25	-0,55	-0,20	0,36	0,03
														37	-0,55	-0,25	0,26	-0,70	-0,64	-0,19	-0,40	-0,57
															38	-0,43	-0,85	0,07	0,15	0,14	0,11	0,95
																39	0,69	0,26	-0,09	0,00	0,02	-0,42
																	40	-0,11	-0,03	-0,06	-0,35	-0,74
																		41	0,56	0,16	0,75	0,02
																			42	0,49	0,41	0,31
																				43	0,47	0,31
																					44	0,07
																						45

P vrednosti: $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$

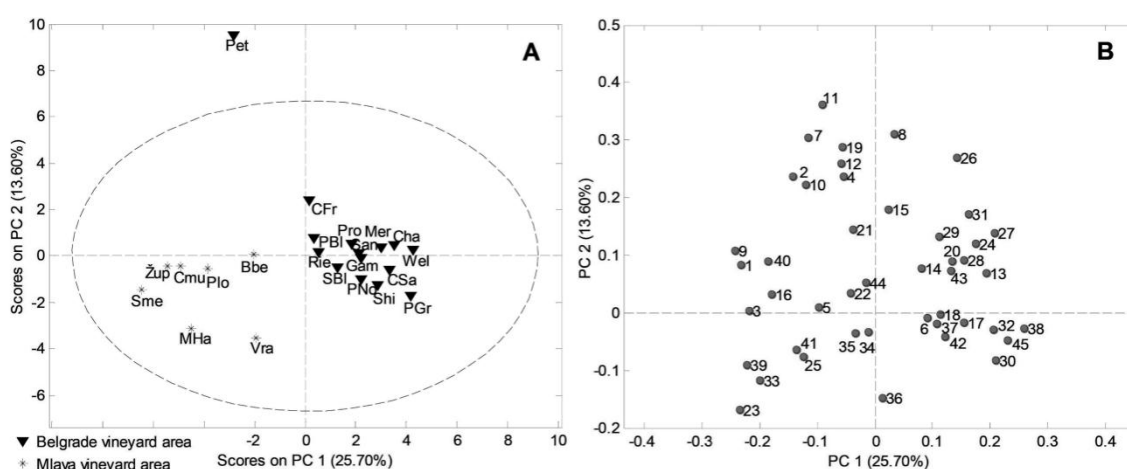
Iako su srednje vrednosti dobijene za sadržaj Cd u analiziranom lišću slične (Tabela 24), ovaj metal je pokazao pozitivne korelacije sa K i Mn samo u uzorcima sa područja Mlave (Tabela 26). Prosečne količine K i Mn veće su u uzorcima sa područja Mlave ($P < 0,000001$; $F = 64,64$; $F_{krit} = 4,35$), u poređenju sa uzorcima iz Beogradskog regiona ($P < 0,001$; $F = 19,97$; $F_{krit} = 4,35$). U ispitivanim uzorcima lišća sa područja Mlave primećuju se negativne vrednosti za koeficijente korelacije olova sa manganom ($r = -0,86$, $P < 0,01$), kao i sa cinkom ($r = -0,83$, $P < 0,05$). Negativna korelacija između Pb i Zn je bila za očekivati, obzirom da su Musielińska i saradnici (2016) u svom radu potvrdili anatanonizam između ova dva elementa. Oni su takođe naglasili da stepen antagonizma u velikoj meri zavisi od biljne vrste.

4.3.4. Rezultati analize glavnih komponenata

Multivarijantna analiza podataka do kojih se došlo u ovom delu istraživanja upotrebljena je u cilju daljeg ispitivanja veze između hemijskog sastava, sortne specifičnosti i geografskog porekla uzoraka. Rezultati koji se mogu pronaći u literaturi ukazuju na uticaj sadržaja mineralnih materija na određivanje geografskog porekla biljnog materijala. Tako su recimo, Fernández-Cáceres i saradnici (2001) u svom radu prikazali metale kao značajne hemijske deskriptore za procenu geografskog porekla različitih uzoraka čaja. Versari i saradnici (2014) u preglednom radu ističu značaj hemometrijskih metoda za unapređenje ispitivanja grožđa i vina u smislu autentičnosti, tipizacije i sledljivosti. U istom radu, metali se pominju kao hemijski markeri za određivanje geografskog porekla vina, a polifenoli kao markeri geografskog porekla, ali i sortnih specifičnosti. Takođe, Garrido i Borges (2013) navode da se polifenolni profil vina može upotrebiti za procenu geografskog porekla i sortne pripadnosti vina, kao i godine berbe.

Lišće različitih sorti bele i crne vinove loze uzorkovano je sa dva, po udaljenosti relativno bliska, vinogradarska područja. PCA je urađena sa ciljem da se proveriti da li je moguće napraviti razliku među ispitivanim uzorcima i dobiti razdvajanje uzoraka po različitoj geografskoj pripadnosti, a na osnovu sadržaja polifenolna, makro- i mikroelemenata. Pored toga, očekivano je bilo da postoji izvesna različitost u pogledu sortnih specifičnosti.

Početni matiks ima je dimenzije 22 (broj uzoraka lišća) \times 45 (broj nezavisno promenljivih: kvantifikovana polifenolna jedinjenja, minerali, *TPC* i *RSA* vrednosti), a podaci su obrađeni korišćenjem matrice kovarijansi sa autoskaliranjem. Na osnovu dobijenih vrednosti može se uočiti da osam glavnih komponenata opisuje 81,53% od ukupne varijabilnosti informacija (Slika 13A). Prva komponenta opisuje 25,70% ukupne varijanse, dok druga i treća opisuju 13,60%, odnosno 13,32% od ukupne varijanse. Varijable koje najviše utiču na grupisanje uzoraka identifikovane su na osnovu grafika varijabli, prikazanog na Slici 13B.



Slika 13. PCA: grafik skorova (A) i varijabli (B) za uzorke lišća vinove loze. Brojevi na slici B odgovaraju oznakama u Tabelama 20 i 24.

Na osnovu PCA grafika (Slika 13A) može se primetiti razdvajanje uzoraka na dva klastera duž PC1 ose koje se zasniva na geografskom poreklu ispitivanih uzoraka. Uzorci su grupisani prema karakterističnim hemijskim profilima, koji su uglavnom bazirani na mineralnom sastavu ali i na određenim flavonoidima i fenolnim kiselinama. Lišće koje potiče iz Beogradskog regiona pokazalo je veći sadržaj Cr, V, Fe, Al, Mg i katehina. Na odvajanje uzoraka sa područja Mlave najveći uticaj su imale fenolne kiseline (galna, *p*-hidroksibenzoeva i ferulinska kiselina), kao i pojedini elementi (K, Mn i Li). Na osnovu grafika skorova može se zaključiti da uzorak 'Petra' predstavlja spoljnu vrednost, jer se nalazi van *Hotelling T2 elipse*. U odnosu na ostale ispitivane uzorke, ova domaća hibridna sorta izdvojila se na osnovu većeg sadržaja kempferola i tri hidrosicinaminske kiseline (kofeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline). Takođe, uzorak 'Petra' se izdvaja i prema nešto većem sadržaju resveratrola.

Na kraju, ova ispitivanja i rezultati do kojih se došlo, ukazuju na izvesnu vezu između sadržaja polifenola i prisustva metala. Analizom rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka lišća sa područja Mlave (Tabele 20 i 24), kao i *PCA* grafika (Slika 13), može se primetiti veza između kadmijuma i povećanog sadržaja određenih polifenola. Naime, na grafiku varijabli (Slika 13B) Cd se nalazi u blizini galne kiseline i epigalokatehin galata na osnovu čega se može pretpostaviti postojanje veze između Cd i pomenitih polifenola. Slična razmatranja su publikovana u radu Márquez-García i saradnika (2012) gde se navodi da kadmijum utiče na povećanje sadržaja polifenolnih jedinjenja, ali i na antioksidativnu aktivnost lišća. Pre svega, naši rezultati idu u prilog tvrdnjama da se polifenoli mogu smatrati potencijalnim biomarkerima zagađenja okoline (Białońska i sar., 2007). Pretpostavlja se da biljke akumulaciju teških metala doživljavaju kao stres. Stoga, povećana sinteza polifenolnih jedinjenja javlja se kao odgovor same biljke na štetne uticaje iz spoljašnje sredine.

4.4. Elementalni sastav grožđa u proceni geografskog porekla

U Tabeli 27 prikazani su rezultati dobijeni određivanjem elementalnog sastava uzoraka grožđa sa područja Mlave. Kao i u grožđu sa područja Beograda (Tabela 27), i u ovim uzorcima K je element koji je najviše zastupljen, u količinama od 1,28 g/kg do 2,73 g/kg. Sledeći po zastupljenosti su P, Ca, Mg i S. Količine ovih elemenata su i do 20 puta manje u odnosu na sadržaj kalijuma. Sadržaj As u svim analiziranim uzorcima je ispod granice detekcije.

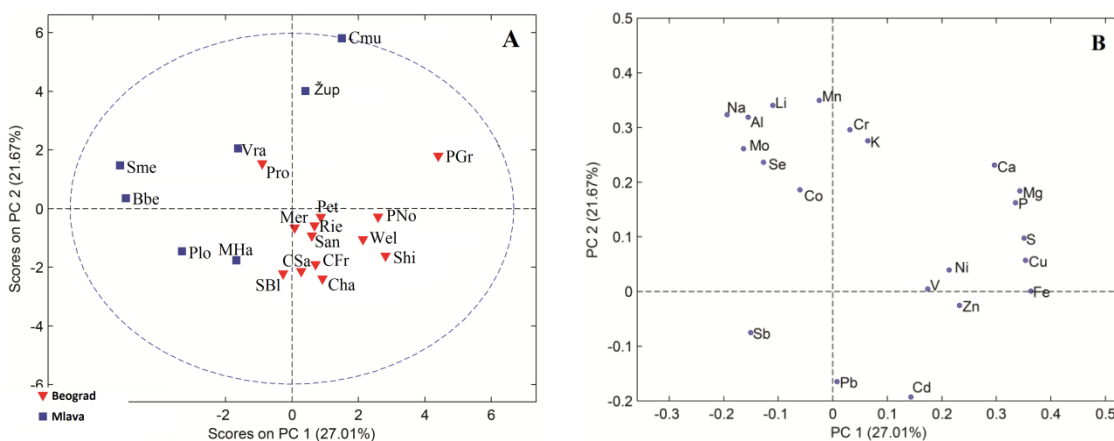
Tabela 27. Sadržaj makro- i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima grožđa sa područja Beograda i Mlave.

elementi/uzorci		Beograd										Mlava									
		CSa	Mer	CFr	San	Shi	PNo	Pro	Rie	Pet	SBl	Wel	Cha	PGr	Vra	Mha	Plo	Žup	Cmu	Bbe	Sme
1	K	1,23 ^m	1,98 ^{de}	1,66 ^h	1,65 ^h	1,61 ⁱ	1,49 ^j	1,40 ^k	2,07 ^d	1,93 ^e	1,16 ⁿ	1,08 ^o	1,68 ^g	1,69 ^g	2,33 ^c	1,74 ^f	1,74 ^f	2,73 ^a	2,42 ^b	1,28 ^e	1,26 ^e
2	P	0,31 ^h	0,31 ^h	0,36 ^f	0,36 ^f	0,37 ^f	0,55 ^a	0,36 ^f	0,41 ^d	0,40 ^{de}	0,34 ^g	0,39 ^e	0,41 ^d	0,46 ^c	0,35 ^g	0,32 ^h	0,25 ⁱ	0,46 ^c	0,51 ^b	0,23 ^j	0,20 ^k
3	Ca	0,29 ^g	0,28 ^{gh}	0,33 ^e	0,31 ^{ef}	0,21 ^j	0,28 ^{gh}	0,19 ^k	0,28 ^{gh}	0,27 ^h	0,19 ^k	0,48 ^c	0,29 ^g	0,54 ^b	0,25 ⁱ	0,16 ^l	0,14 ^m	0,45 ^d	0,60 ^a	0,08 ^o	0,11 ⁿ
4	Mg	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,16 ^d	0,21 ^b	0,19 ^c	0,14 ^e	0,18 ^c	0,13 ^f	0,23 ^a	0,14 ^f	0,24 ^a	0,16 ^d	0,11 ^g	0,11 ^g	0,22 ^b	0,22 ^b	0,07 ^h	0,07 ^h
5	S	0,16 ^e	0,11 ⁱ	0,13 ^g	0,15 ^f	0,18 ^d	0,23 ^b	0,15 ^f	0,12 ^h	0,11 ⁱ	0,10 ^j	0,16 ^e	0,20 ^c	0,27 ^a	0,11 ⁱ	0,09 ^k	0,07 ^l	0,18 ^d	0,18 ^d	0,07 ^l	0,05 ^m
6	Fe	4,07 ^h	5,30 ^c	5,57 ^b	5,63 ^b	5,34 ^c	5,19 ^d	4,50 ^f	3,82 ⁱ	4,65 ^e	3,82 ⁱ	4,78 ^e	4,48 ^f	7,19 ^a	3,29 ^j	2,16 ^k	1,78 ^m	4,22 ^g	4,20 ^g	2,03 ^l	1,80 ^m
7	Al	1,32 ^g	2,02 ^f	0,78 ^k	1,12 ^h	2,04 ^f	0,70 ^l	8,53 ^b	0,40 ^p	1,21 ^h	1,04 ⁱ	0,80 ^k	0,88 ^j	3,79 ^e	0,61 ^m	0,36 ^o	0,54 ⁿ	8,48 ^b	6,94 ^d	7,55 ^c	10,27 ^a
8	Cu	0,75 ^k	0,86 ^j	1,25 ^f	1,35 ^e	1,61 ^b	1,72 ^a	1,09 ^g	1,43 ^d	1,50 ^c	1,09 ^g	1,08 ^g	1,51 ^c	1,70 ^a	1,04 ^h	0,96 ⁱ	0,57 ^l	1,09 ^g	1,63 ^b	0,58 ^l	0,44 ^m
9	Na	0,85 ⁿ	1,96 ^h	0,94 ^m	0,84 ⁿ	2,24 ^f	1,36 ^k	14,53 ^e	1,10 ^l	1,76 ⁱ	2,08 ^g	1,75 ⁱ	0,77 ^o	1,64 ^j	1,37 ^k	2,32 ^f	1,72 ⁱ	18,48 ^b	15,97 ^c	15,07 ^d	21,23 ^a
10	Mn	1,31 ^c	1,06 ^f	1,05 ^f	0,83 ⁱ	0,64 ^k	1,47 ^b	0,91 ^h	1,20 ^d	1,13 ^e	0,74 ^j	1,25 ^d	0,83 ⁱ	1,48 ^b	1,14 ^e	0,79 ⁱ	0,99 ^g	3,23 ^a	3,23 ^a	0,63 ^k	3,26 ^a
11	Zn	1,28 ^c	0,69 ^h	0,96 ^f	1,16 ^d	3,67 ^a	1,11 ^e	0,66 ⁱ	0,87 ^g	0,70 ^h	0,94 ^f	1,68 ^b	0,65 ⁱ	1,18 ^d	0,67 ^{hi}	0,57 ^j	0,47 ^k	1,29 ^c	1,31 ^c	0,43 ^l	0,56 ^j
12	Co	0,93 ^e	0,99 ^b	0,92 ^e	1,00 ^a	0,93 ^e	0,96 ^c	0,94 ^{de}	0,96 ^c	0,96 ^c	0,96 ^c	0,92 ^e	0,92 ^e	0,99 ^b	1,01 ^a	0,95 ^d	0,95 ^d	0,92 ^e	1,00 ^a	0,97 ^c	0,98 ^{bc}
13	Cr	11,57 ⁱ	19,41 ^d	10,15 ^k	9,44 ^l	15,24 ^f	8,16 ^m	28,96 ^a	14,13 ^g	16,79 ^e	11,06 ^l	13,59 ^h	5,67 ^o	17,17 ^e	23,99 ^b	8,54 ^m	6,77 ⁿ	21,01 ^c	19,29 ^d	13,69 ^h	11,32 ^{ij}
14	Li	4,29 ^m	6,58 ^k	3,63 ⁿ	2,60 ^p	7,95 ^j	5,34 ^l	21,32 ^h	3,28 ^o	4,25 ^m	5,04 ^l	26,46 ^f	2,70 ^p	15,71 ⁱ	35,79 ^c	22,07 ^g	38,35 ^b	27,45 ^e	91,4 ^a	35,80 ^c	32,35 ^d
15	Mo	0,93 ^h	0,99 ^g	2,77 ^e	1,00 ^g	0,93 ^h	0,96 ^{gh}	4,36 ^c	0,96 ^{gh}	0,96 ^{gh}	0,96 ^{gh}	0,92 ^h	0,92 ^h	0,99 ^g	8,13 ^a	0,53 ⁱ	2,42 ^e	4,27 ^c	3,63 ^d	5,01 ^b	1,77 ^f
16	Ni	24,82 ^h	23,83 ⁱ	31,17 ^e	21,85 ^j	45,61 ^b	9,37 ^f	12,05 ⁿ	52,82 ^a	19,24 ^k	30,84 ^e	25,03 ^g	11,28 ^o	33,06 ^d	17,20 ^l	25,10 ^g	4,70 ^r	29,54 ^f	38,78 ^c	16,09 ^m	7,74 ^g
17	Pb	71,38 ^f	161,04 ^b	94,85 ^d	35,95 ^j	62,72 ^g	34,76 ^j	48,87 ⁱ	13,17 ^o	53,48 ^h	16,85 ⁿ	16,97 ⁿ	239,67 ^a	86,12 ^e	29,80 ^k	28,75 ^l	52,65 ^h	20,93 ^m	1,00 ^p	128,12 ^c	12,89 ^a
18	Sb	26,79 ^k	33,11 ^g	51,08 ^a	43,38 ^b	21,47 ^m	20,58 ⁿ	35,57 ^f	39,49 ^c	3,39 ^p	32,75 ^h	28,29 ^j	37,44 ^d	11,57 ^o	29,62 ⁱ	20,39 ⁿ	37,88 ^d	34,93 ^f	24,64 ^l	36,13 ^e	32,79 ^h
19	Se	24,92 ^l	25,13 ^l	21,02 ⁿ	27,28 ^k	31,03 ⁱ	33,92 ^e	36,18 ^d	32,23 ^g	29,92 ^j	18,54 ^o	31,90 ^{gh}	34,20 ^e	30,94 ⁱ	27,29 ^k	24,20 ^m	31,63 ^h	41,86 ^b	33,18 ^f	44,78 ^a	40,55 ^c
20	Cd	2,51 ^c	1,99 ^d	1,16 ^g	1,70 ^e	4,17 ^b	1,88 ^d	1,47 ^f	2,23 ^c	1,15 ^g	1,51 ^f	4,64 ^a	0,92 ⁱ	0,03 ^m	0,11 ^l	0,76 ^j	0,95 ⁱ	1,08 ^h	0,46 ^k	0,48 ^k	1,12 ^{gh}
21	V	4,00 ^f	7,41 ^b	3,18 ^{hi}	2,90 ^j	3,11 ⁱ	4,51 ^e	5,95 ^c	1,57 ^l	2,18 ^k	5,52 ^{cd}	3,56 ^g	5,03 ^d	10,79 ^a	1,01 ^m	0,95 ^m	3,41 ^{gh}	0,79 ⁿ	4,29 ^{ef}	1,41 ^l	3,73 ^{gh}

Rezultati za elemente 1-5 prikazani su kao g/kg; Rezultati za elemente 6-11 prikazani su kao mg/kg; Rezultati za elemente 12-21 prikazani su kao µg/kg. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između sorti prema Tukey testu, $P < 0,05$. Oznake: 'Cabernet Sauvignon' (CSa), 'Merlot' (Mer), 'Cabernet Franc' (CFr), 'Sangiovese' (San), 'Shiraz' (Shi), 'Pinot Noir' (PNo), 'Riesling' (Rie), 'Sauvignon Blanc' (SBl), 'Welschriesling' (Wel), 'Pinot Gris' (PGr), 'Chardonnay' (Cha), 'Vranac' (Vra), 'Muscat Hamburg' (MHa), 'Župljanka' (Žup), 'Chasselas musque' (Cmu), 'Beogradska besemena' (Bbe), 'Prokupac' (Pro), 'Plovdina' (Plo), 'Smederevka' (Sme), 'Petra' (Pet).

Kako bi se ispitalo postojanje potencijalne veze između sadržaja makro- i mikroelemenata, sa jedne strane, i geografskog porekla, sa druge strane, rezultati elementarne analize grožđa sa područja Beograda dalje su upoređeni sa rezultatima dobijenim za grožđe sa područja Mlave (Tabela 27). U cilju jasnije klasifikacije, na dobijene podatke primenjena je *PCA*. *PCA* imala je za cilj da proveri postojanje sličnosti i razlika među uzorcima grožđa, prema vrsti i geografskom poreklu, kao i da definiše doprinos svakog elementa dobijenoj raspodeli.

Dimenzije početne matrice bile su 20 (ukupan broj uzoraka grožđa sa oba područja) x 21 (broj kvantifikovanih elemenata). Prva komponenta odgovorna je za 27,01% od ukupnog varijabiliteta, dok zajedno sa drugom čini 48,68%. Posmatrajući grafik skorova (Slika 14) može se primetiti razdvajanje uzoraka, na uzorke koji potiču sa područja Beograda i uzorke koji potiču sa područja Mlave. Iako razdvajanje nije najjasnije, može se smatrati da bi dobijeni rezultati mogli poslužiti kao pokazatelji geografskog porekla grožđa. Grafik varijabli (Slika 14B), ukazuje da su za odvajanje uzoraka sa područja Mlave zaslužne pre svega veće količine Na, Li, Al i Mo, dok je u uzorcima sa područja Beograda veći sadržaj Fe, Ni, V i Zn, ali i toksičnih elemenata (Pb i Cd). Blizina prometnih puteva, kao i industrijskih postrojenja u Beogradu, predstavljaju potencijale razloge za veće količine toksičnih elemenata u grožđu sa ovog područja.



Slika 14. *PCA*: grafik skorova (A) i varijabli (B) za uzorke grožđa.

4.5. Hemijska karakterizacija autohtonih sorti

Ispitivanje autohtonih sorti u ovom radu je obuhvatilo karakterizaciju prisutnih flavan-3-ola upotrebom tankoslojne hromatografije, u cilju dobijanja „otiska prsta“ kao karakteristike svake pojedinačne sorte. Takođe, utvrđen je ukupan sadržaj polifenola, ukupan sadržaj antocijana i antioksidativni potencijal, primenom testova koji se uobičajeno koriste u ovakvim ispitivanjima. Rezultati pomenutih testova prikazani su u Tabelama 28 i 29, dok su karakteristični hromatogrami prikazani na Slikama 15-18.

Autohtone sorte prikupljene su sa različitih lokaliteta u Srbiji, a istraživanje je obuhvatilo potpuno zrele uzorke grožđa. Od belih sorti ispitane su 'Kreaca' (Kre), 'Smederevka' (Sme), 'Tamjanika bela' (Tbe) i 'Plovdina' (Plo), dok su crne sorte bile 'Prokupac' (Pro1 i Pro2) i 'Tamjanika crna' (Tcr). U cilju poređenja rezultata, istovremeno su ispitane i dve internacionalne sorte koje su poslužile kao standard, a zastupljene su u vinogradima na području Srbije, crna sorta 'Cabernet Sauvignon' (CSa) i bela sorta 'Chardonnay' (Cha). Pored grožđa, hemijski su okarakterisana i mlada sortna vina pomenutih sorti, dobijena u postupku mikroviniifikacije.

U skladu sa očekivanjima, najveće vrednosti za *TPC* i *RSA* dobijene su u semenkama, zatim u pokožici, a najmanje u mezokarpu (Tabela 28). Posmatrajući rezultate za uzorke semenki, može se primetiti da semenke autohtone sorte 'Prokupac 1' imaju najveće *TPC* (110,15 g EGK/kg) i *RSA* (1073,63 mmol ET/kg) vrednosti, značajno veće nego u drugim sortama. U ostalim uzorcima semenki ispitivanih belih i crnih sorti opseg za *TPC* iznosio je od 60,30 g EGK/kg ('Smederevka') do 81,96 g EGK/kg ('Crna Tamjanika'), a za *RSA* od 449,76 mmol ET/kg ('Prokupac 2') do 867,45 mmol ET/kg ('Crna Tamjanika'). Neophodno je posebno istaći da su u dva uzorka sorte 'Prokupac' ('Prokupac 1' i 'Prokupac 2') sa različitih lokaliteta pronađene statistički značajne razlike u vrednostima za *TPC* i *RSA*. Veći antioksidativni potencijal pokazao je uzorak iz Prokupačkog vinogorja ('Prokupac 1'), koji je okarakterisan i većim sadržajem ukupnih polifenola u odnosu na uzorak koji potiče iz Sremskog vinogorja ('Prokupac 2'). Dobijeni rezultat ukazuje na potencijalnu mogućnost primene ovih spektrofotometrijskih podataka za klasifikaciju uzoraka grožđa na osnovu geografske pripadnosti. Razlike u ovim parametrima nisu pronađene između pokožica i mezokarpa uzoraka sorte 'Prokupac'.

Tabela 28. Sadržaj ukupnih polifenola (*TPC*) i antioksidativna aktivnost (*RSA*) u semenkama, pokožici i mezokarpu autohtonih i internacionalnih sorti. Sadržaj ukupnih antocijana u pokožici (*TAC*).

Uzorci	<i>TPC</i> (g EGK/kg)	<i>RSA</i> (mmol ET/kg)	<i>TAC</i> (g mal-3-glu/kg)
Semenke			
Prokupac 1	110,15±0,27 ^a	1073,63±22,26 ^a	/
Prokupac 2	61,31±0,09 ^d	449,76±9,88 ^g	/
Tamjanika crna	81,96±0,63 ^b	867,46±1,61 ^b	/
Cabernet Sauvignon	62,02±0,15 ^d	701,45±8,17 ^c	/
Plovdina	77,82±0,17 ^b	570,36±6,32 ^e	/
Smederevka	60,30±0,09 ^d	621,10±11,02 ^d	/
Tamjanika bela	65,00±0,09 ^c	611,08±9,45 ^d	/
Kreaca	61,71±0,71 ^d	640,74±1,59 ^d	/
Chardonnay	79,79±0,35 ^b	523,54±14,97 ^f	/
Pokožica			
Prokupac 1	7,12±0,04 ^{bc}	47,31±0,51 ^c	2,29±0,02 ^b
Prokupac 2	6,89±0,01 ^c	45,98±0,82 ^c	2,03±0,03 ^b
Tamjanika crna	10,63±0,07 ^a	66,72±0,56 ^a	2,18±0,01 ^b
Cabernet Sauvignon	7,81±0,07 ^b	59,21±0,51 ^b	5,98±0,05 ^a
Plovdina	3,93±0,05 ^f	31,84±1,05 ^e	0,76±0,03 ^c
Smederevka	5,88±0,01 ^d	47,29±0,69 ^c	/
Tamjanika bela	4,60±0,04 ^e	39,67±0,27 ^d	/
Kreaca	5,57±0,08 ^d	46,72±0,69 ^c	/
Chardonnay	4,04±0,01 ^f	34,08±0,68 ^e	/
Mezokarp			
Prokupac 1	0,37±0,01 ^d	15,21±0,25 ^e	/
Prokupac 2	0,34±0,01 ^d	16,87±0,88 ^d	/
Tamjanika crna	0,78±0,00 ^a	28,44±0,25 ^a	/
Cabernet Sauvignon	0,52±0,01 ^b	22,71±0,45 ^c	/
Plovdina	0,32±0,00 ^c	24,29±0,00 ^b	/
Smederevka	0,52±0,01 ^{bc}	26,11±0,13 ^{ab}	/
Tamjanika bela	0,53±0,01 ^{bc}	25,17±0,51 ^b	/
Kreaca	0,56±0,01 ^b	16,76±0,06 ^d	/
Chardonnay	0,49±0,01 ^c	16,39±0,06 ^d	/

Različita slova u istoj koloni označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

Takođe, iz Tabele 28 se vidi da se crne i bele sorte ne mogu jasno razlikovati na osnovu sadržaja ukupnih polifenola u semenkama i mezokarpu. Međutim, može se uočiti da je u pokožicama crnih sorti sadržaj polifenola primetno veći u odnosu na bele

sorte (vrednosti od 6,89 g EGK/kg ('Prokupac 2') do 10,63 g EGK/kg ('Tamjanika crna') i vrednosti od 3,93 g EGK/kg ('Plovdina') do 7,77 g EGK/kg ('Smederevka'). Opseg vrednosti za *RSA* u pokožicama crnih sorti iznosio je od 45,98 do 66,72 mmol ET/kg, dok je u belim sortama pronađen opseg 31,84-47,29 mmol ET/kg. Rezultati *TPC* i *RSA* vrednosti u mezokarpu bili su prilično ujednačeni u svim sortama. Vrednosti ispitanih parametara (*TPC* i *RSA*) semenki, pokožica, kao i mezokarpa internacionalnih sorti 'Cabernet Sauvignon' i 'Chardonnay' nalaze se unutar opsega vrednosti određenih u autohtonim sortama.

U Tabeli 28 su prikazane vrednosti za ukupan sadržaj antocijana, za pokožice crnih sorti, ali i za pokožicu bele sorte 'Plovdina'. Kako je 'Plovdina' bela sorta sa tamnijom bojom pokožice, u ovom uzorku je takođe utvrđeno prisustvo antocijana, ali je vrednost, očekivano, bila značajno manja (0,79 g mal 3-glu/kg) u odnosu na ostale *TAC* vrednosti. Opseg dobijenih *TAC* vrednosti u crnim sortama kretao se od 2,03 g mal 3-glu/kg ('Prokupac 2') do 5,98 g mal 3-glu/kg ('Cabernet Sauvignon'), što ukazuje na manji sadržaj antocijana u pokožicama autohtonih sorti u poređenju sa internacionalnom sortom 'Cabernet Sauvignon'.

Sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijana i antioksidativna aktivnost mladih sortnih vina dobijenih od autohtonih i internacionalnih sorti prikazan je u Tabeli 29. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je u belim vinima, sa izuzetkom uzorka 'Plovdina', izmeren znatno manji sadržaj ukupnih polifenola (0,14-0,20 g EGK/L), kao i antioksidativni potencijal (0,54-0,68 mmol ET/L), u poređenju sa crvenim vinima gde su *TPC* vrednosti bile u opsegu od 0,57 do 1,29 g EGK/L, a *RSA* u opsegu od 2,69 do 7,29 mmol ET/L). Vino sorte 'Plovdina', sa sadržajem ukupnih polifenola od 0,79 g EGK/L i antioksidativnim potencijalom u vrednosti od 4,42 mmol ET/L, izdvaja se od ostalih belih vina, što bi se moglo dovesti u vezu sa ružičastom bojom pokožice u slučaju ove sorte.

Od crvenih vina, pokazano je da su vrednosti svih ispitivanih parametara značajno veće u slučaju internacionalne sorte 'Cabernet Sauvignon' u poređenju sa vinima dobijenim od autohtonih sorti. Od svih autohtonih sorti, uzorak vina 'Prokupac 1' izdvojio se prema najvećem sadržaju ukupnih polifenola (1,01 g EGK/L) i antocijana (91,24 mg mal 3-glu/L), a takođe i prema antioksidativnom potencijalu (6,36 mmol ET/L).

Tabela 29. Sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih antocijana i antioksidativna aktivnost mladih vina dobijenih od autohtonih i internacionalnih sorti.

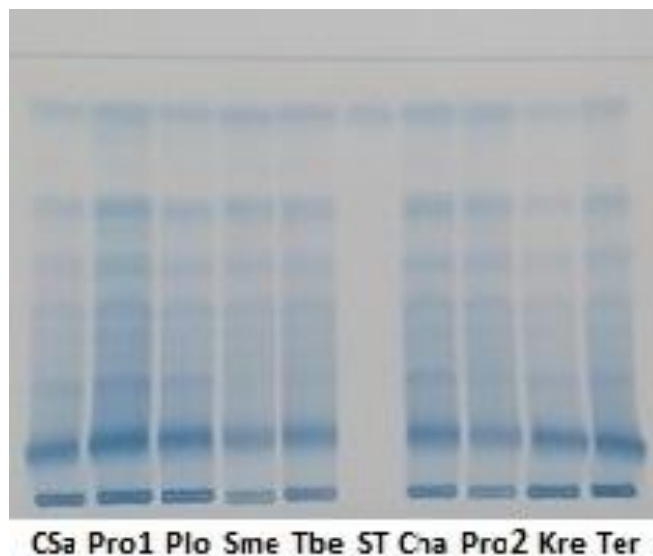
Uzorak	TPC (g EGK/L)	RSA (mmol ET/L)	TAC (mg mal 3-glu/L)
Crvena vina			
Prokupac 1	1,01±0,02 ^b	6,36±0,03 ^b	91,24±2,59 ^b
Prokupac 2	0,81±0,00 ^c	4,81±0,11 ^c	88,78±1,52 ^c
Tamjanika crna	0,57±0,00 ^d	2,69±0,14 ^d	36,99±0,78 ^d
Cabernet Sauvignon	1,29±0,01 ^a	7,29±0,22 ^a	223,35±15,32 ^a
Bela vina			
Plovdina	0,79±0,02 ^c	4,42±0,01 ^c	3,52±0,03 ^e
Smederevka	0,14±0,00 ^f	0,54±0,01 ^e	/
Tamjanika bela	0,18±0,00 ^e	0,68±0,01 ^e	/
Kreaca	0,20±0,00 ^e	0,63±0,00 ^e	/
Chardonnay	0,18±0,00 ^e	0,68±0,03 ^e	/

Različita slova u istoj koloni označavaju značajnu razliku između sorti prema *Tukey* testu, $P < 0,05$.

Profil flavan-3-ola u ekstraktima pojedinačnih delova bobice (semenke, pokožice i mezokarp) i vinima, ispitan je primenom tankoslojne hromatografije. Eksperiment je obuhvatao nekoliko faza: i) optimizaciju stacionarne faze, ii) optimizaciju mobilne faze, i na kraju iii) analizu profila flavan-3-ola. Pregled korišćenih hromatografskih sistema dat je u Tabeli 2.

Prvi izbor, pri optimizaciji hromatografskog sistema, za odvajanje flavan-3-ola u ekstraktima i vinima bila je celuloza, dok je kao mobilna faza upotrebljena trokomponentna smeša rastvarača 1-propanol-voda-sirćetna kiselina (4:2:1, v/v/v). Istovremeno sa ispitivanim ekstraktima semenki, hromatografisan je standardni rastvor (+)-katehina (na slikama obeležen kao ST). Međutim, hromatogram dobijen ispitivanjem ekstrakata semenki na celulozi kao stacionarnoj fazi pokazao je da celuloza nije najpogodniji adsorbent za ispitivanje profila flavan-3-ola, jer zone nisu bile dovoljno jasne i odvajanje zona nije bilo adekvatno.

U cilju poboljšanja odvajanja flavan-3-ola na tankom sloju, primenjen je silika-gel 60 F₂₅₄ kao stacionarna faza, dok je smeša rastvarača toluen-aceton-mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v) korišćena kao mobilna faza. Hromatogram flavan-3-ola ekstrahovanih iz semenki, dobijen primenom Sistema V (Tabela 2), predstavljen je na Slici 15.

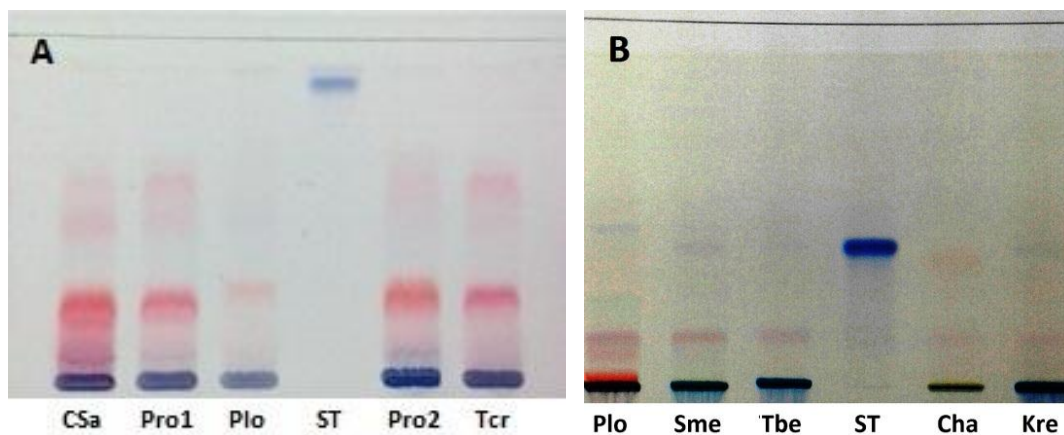


Slika 15. Hromatogrami flavan-3-ola ekstrahovanih iz semenki crnih i belih sorti.

Na osnovu hromatograma predstavljenog na Slici 15 može se konstatovati da je (+) katehin prisutan u svim ispitivanim ekstraktima. Iako u nedostatku standarda nije bilo moguće izvršiti identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih jedinjenja, na osnovu karakterističnih plavih zona na istim R_F vrednostima u svim uzorcima moguće je zaključiti da svi ekstrakti najverovatnije sadrže iste flavan-3-ole, a da se samo razlikuje količina prisutna u pojedinim uzorcima. Među ispitivanim ekstraktima semenki crnih sorti izdvojile su se 'Prokupac 1' sa vidljivo najvećim sadržajem flavan-3-ola u semenkama (boja zona je intenzivnija u odnosu na druge uzorke) i sorta 'Cabernet Sauvignon' sa vidljivo najmanjim sadržajem flavan-3-ola u semenkama (zone najslabijeg intenziteta). Sa druge strane, semenke bele sorte 'Chardonnay' imaju vidljivo veći sadržaj flavan-3-ola (intenzivnije plavo obojene zone), u poređenju sa ostalim ekstraktima semenki belih sorti. Najmanji sadržaj flavanola vizuelno se zapaža u semenkama bele sorte 'Kreaca'.

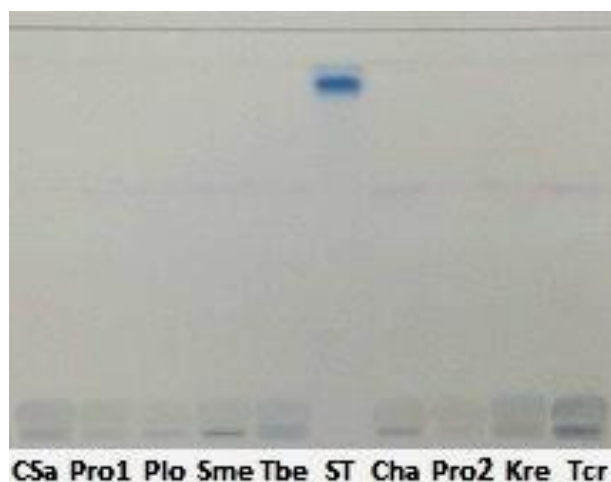
Ranija naučna istraživanja (Yilmaz i Toledo, 2004; Milanov i sar., 2014) potvrđuju zavisnost sadržaja flavan-3-ola u vinu od vremena ekstrakcije, tj. vremena maceracije, temperature i koncentracije alkohola u vinu. Jedan od navedenih faktora mogao bi biti razlog za neznatan sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima pokožice crnih sorti i bele sorte 'Plovdina'. Iako je 'Plovdina' bela sorta vinove loze, zbog obojenosti pokožice ekstrakt ovog uzorka je hromatografisan i u okviru ispitivanja crnih sorti. Slika 16A prikazuje hromatogram ovih ekstrakata (Sistema VI, Tabela 2). Hromatogram

ekstrakata pokožice belih sorti, dobijen primenom Sistema VIII (Tabela 2), prikazuje nešto veći sadržaj flavan-3-ola u poređenju sa hromatogramom ekstrakata pokožice crnih sorti (Slika 16B).



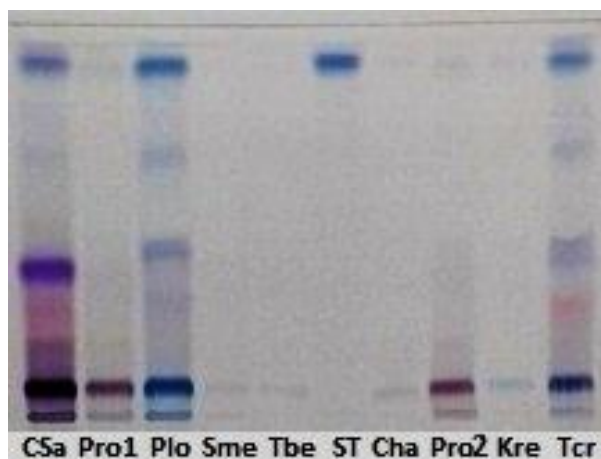
Slika 16. Hromatogram flavan-3-ola ekstrahovanih iz pokožice (A) crnih sorti i sorte 'Plovdina' i (B) belih sorti.

Profil flavan-3-ola ispitan je i u ekstraktima mezokarpa crnih i belih autohtonih sorti, kao i internacionalnih sorti 'Cabernet Sauvignon' i 'Chardonnay' (Sistem VII, Tabela 2). Na hromatogramu prikazanom na Slici 17 nisu vidljive plavo obojene zone, te se može zaključiti da ispitivani ekstrakti mezokarpa ne sadrže flavan-3-ole. Ovi rezultati su očekivani i u skladu sa literaturnim podacima koji navode da su flavan-3-oli najviše zastupljeni u semenkama i u manjoj količini u pokožici (Cantos i sar., 2002).



Slika 17. Hromatogram flavan-3-ola ekstrahovanih iz mezokarpa crnih i belih sorti.

Prisustvo flavan-3-ola ispitano je i u vinima dobijenim postupkom mikrovinifikacije od ispitivanih sorti vinove loze. Na dobijenom hromatogramu (Slika 18) identifikovan je znatno veći sadržaj katehina (intenzivnije plave zone) u vinu internacionalne sorte 'Cabernet Sauvignon' i u vinu autohtone sorte 'Tamjanika crna', kao i u belom vinu autohtone sorte 'Plovdina', u poređenju sa ostalim uzorcima ispitivanih vina.



Slika 18. Hromatogram flavan-3-ola iz crvenih i belih vina.

Hromatogram uzoraka vina (Slika 18) pokazao je bogatiji profil flavan-3-ola u poređenju sa hromatogramima ekstrakata pokožice (Slika 16, A i B), ali siromašniji u odnosu na ispitivane ekstrakte semenki (Slika 15). Ovaj trend je očekivan, jer su ranija istraživanja pokazala da monomeri flavan-3-ola u vinu potiču uglavnom iz semenki (Monagas i sar., 2003).

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije, upotrebom savremenih analitičkih postupaka, određen je hemijski sastav različitih sorti vinove loze (*V. vinifera*). Ispitivanja su obuhvatila internacionalne i autohtone sorte, kao i neke selekcionisane klonove iz različitih vinogorja u Srbiji. Određen je hemijski sastav celih bobica u tri faze razvoja, kao i sastav pojedinih delova bobice (pokožice, semenki i mezokarpa). Takođe, analizirana su mlada sortna vina pripremljena u postupku mikroviniifikacije, kao i lišće vinove loze.

Na osnovu rezultata dobijenih primenom tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom može se zaključiti da su polifenolna jedinjenja najzastupljenija u semenkama, zatim u pokožici, dok su najmanje količine pronađene u mezokarpu. Semenke karakteriše najveći sadržaj flavan-3-ola, dok su u pokožici u najvećoj meri zastupljena jedinjenja iz grupe flavonola. Takođe, ovi rezultati ukazuju i na postojanje značajne razlike među sortama u pogledu sadržaja polifenola. Pored pomenutog, u okviru ovih istraživanja dokazano je prisustvo pojedinih jedinjenja netipičnih za polifenolni profil *V. vinifera* sorti. Tako na primer, elaginska kiselina, za koju se verovalo da je jedinstvena za semenke *Vitis rotundifolia* sorti vinove loze, pronađena je u svim ispitivanim *V. vinifera* sortama, a najveće količine zabeležene su u semenkama hibridne sorte 'Petra'. Analizom prisutnih antocijana pomoću *LTQ Orbitrap* masenog analizatora utvrđeno je prisustvo malvidin 3,5-*O*-diheksozida u pokožicama ispitivanih crnih sorti vinove loze, što se takođe smatra netipičnim za *V. vinifera* sorte. Po prvi put malvidin 3,5-*O*-diheksozid je pronađen u pokožicama internacionalnih sorti 'Merlot', 'Cabernet Franc', 'Shiraz', 'Sangiovese', 'Pinot Noir', kao i u autohtonoj sorti 'Prokupac'.

Polifenolni profil sortnih vina pokazao je da su hidroksibenzoeve kiseline najzastupljenije u crvenim vinima, dok su hidroksicinaminske kiseline pronađene u svim belim sortnim vinima i prepoznate su kao dominantna klasa polifenolnih jedinjenja u ovim uzorcima. Veće količine polifenola pretežno su pronađene u crvenim vinima, u odnosu na bela vina. U ovom istraživanju prvi put je detaljno ispitan polifenolni profil mladog sortnog vina 'Prokupac'. Utvrđeno je da su u vinu ove autohtone sorte prisutne najveće količine galne kiseline, elaginske kiseline, hidroksicinaminskih kiselina,

katehina, epikatehina, hiperozida, miricetina, florizina i arbutina, u odnosu na ostale ispitivane sorte. Takođe, od svih analiziranih crvenih vina, samo u uzorku 'Prokupac' pronađeni su naringin, naringenin, apigenin i resveratrol. Ovo su očekivani rezultati ako se ima u vidu da je analizom polifenolonog sastava grožđa 'Prokupac' pokazano da ova sorta ima veći sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal u semenkama i pokožici u odnosu na ostale ispitivane sorte. U semenkama ove autohtone sorte kvantifikovane su najveće količine elaginske kiseline i flavan-3-ola (pre svega katehina i galokatehin-galata), dok je u pokožici pronađen najveći sadržaj resveratrola. Domaća hibridna sorta 'Petra' takođe se izdvojila od ostalih ispitivanih belih sorti. U semenkama pomenute hibridne sorte pronađene su najveće količine galne kiseline i ukupnih flavan-3-ola, dok je u pokožici kvantifikovan naročito visok sadržaj elaginske kiseline.

Takođe, prvi put je detaljno ispitan polifenolni profil izdvojenih klonova sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' u različitim fazama razvoja bobice. Rezultati istraživanja ukazuju na značajnu razliku između standarda i odgovarajućih klonova u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, antocijana i antioksidativne aktivnosti. Utvrđene su značajne korelacije između *TPC* i *RSA* vrednosti u uzorcima u dve faze razvoja grožđa, na samom početku formiranja bobice i u potpuno zreloom grožđu, što ukazuje na to da antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka uglavnom doprinose prisutne polifenolne komponente. Takođe, i u slučaju ispitivanih sortnih vina dobijene su značajne korelacije među ovim vrednostima. Što se tiče sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u ispitivanim klonovima primećena je raznolikost, pri čemu su se uzorci grožđa u fenofazi šarka izdvojili na osnovu većeg sadržaja pojedinih flavan-3-ola (epigalokatehin, katehin, epikatehin i katehin galat).

Na kraju, profil flavan-3-ola karakterističnih za grožđa i vina autohtonih sorti ispitan je primenom tankoslojne hromatografije. Optimizacijom hromatografskih uslova dobijen je „otisak prsta“ pojedinačnih delova bobice. U svim ispitivanim uzorcima semenci dokazano je prisustvo (+) katehina, a na osnovu hromatograma je utvrđen sličan profil flavan-3-ola. Ipak, različiti inteziteti zona ukazali su na razliku u sadržaju pojedinačnih flavanola. U pokožicama belih sorti pronađen je nešto veći sadržaj flavan-3-ola u odnosu na pokožice crnih sorti. U slučaju sortnih vina, profili su bili bogatiji flavan-3-olima u poređenju sa pokožicama, ali su u odnosu na semenke, zone bile manjeg intenziteta.

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da je ispitivane hemijske osobine, pre svega sadržaj elemenata i polifenolni sastav, moguće dovesti u vezu sa geografskim poreklom i sortnim specifičnostima vinove loze. Primenom analize glavnih komponentata na sadržaj polifenola u pokožici i semenkama utvrđena je razlika između crnih i belih sorti, što nije bilo moguće analizom polifenolnog profila mezokarpa. Takođe, polifenolni profili mladih sortnih vina je ukazao na razlike među crvenim i belim vinima, što je u bliskoj vezi sa utvrđenim razlikama u fenolnom sastavu između sorti sa belom i obojenom pokožicom. Iako uzorci lišća potiču sa dva relativno bliska vinogorja, rezultati multivarijantne analize pokazuju grupisanje uzoraka na osnovu geografske pripadnosti, do kojeg su dovele razlike u elementalnom sastavu, kao i u sastavu određenih flavonoida i fenolnih kiselina. Smatra se da različiti kapaciteti sorti za apsorpciju metalnih jona iz zemljišta, kao i razlike u distribuciji unutar biljke, mogu doprineti klasifikaciji na osnovu sortnih specifičnosti. Postojanje složenih hemijskih interakcija između elemenata i polifenola, ukazuje na moguću vezu između profila ovih komponenti i sortnih specifičnosti. PCA je pokazala jedinstvenost lišća vinove loze 'Petra', hibrida stvorenog u Srbiji, u odnosu na ostale analizirane sorte vinove loze, koje se izdvojilo po većem sadržaju protokatehuinske, gentsinske, kofeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline, kempferola, rutina i resveratrola.

Osim što predstavljaju značajan naučni doprinos karakterizaciji grožđa i vina sa prostora Srbije, rezultati ove doktorske disertacije pružaju i korisne informacije za unapređenje uslova gajenja i očuvanje genetičkih resursa vinove loze. Na kraju, može se zaključiti da primenjene validovane analitičke procedure u ispitivanju hemijskih karakteristika prirodnih proizvoda imaju veliki potencijal i u pogledu verifikacije njihovog porekla.

6. LITERATURA

- Aceto M., Robotti E., Oddone M., Baldizzone M., Bonifacino G., Bezzo G., Di Stefano R., Gosetti F., Mazzucco E., Manfredi M., Marengo E. (2013) A traceability study on the Moscato wine chain. *Food Chemistry*, 138, 1914-1922.
- Adams D.O. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 249-256.
- Agarwal C., Sharma Y., Agarwal R. (2000) Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 28, 129-138.
- Agatonovic-Kustrin S., Milojković-Opsenica D., Morton D.W., Ristivojević P. (2017) Chemometric characterization of wines according to their HPTLC fingerprints. *European Food Research and Technology*, 243, 659-667.
- Akaberi M., Hosseinzadeh H. (2016) Grapes (*Vitis vinifera*) as a potential candidate for the therapy of the metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*, 30, 540-556.
- Ali K., Maltese F., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9, 357-378.
- Alonso Borbalán Á.M., Zorro L., Guillén D.A., García Barroso C. (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 1012, 31-38.
- Alvarez-Casas M., Pajaro M., Lores M., Garcia-Jares C. (2016) Polyphenolic composition and antioxidant activity of Galician monovarietal wines from native and experimental non-native white grape varieties. *International Journal of Food Properties*, 19, 2307-2321.
- Angelova V.R., Ivanov A.S., Braikov D.M. (1999) Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil-grapevine-grape, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 713-721.
- Antignac J.P., Courant F., Pinel G., Bichon E., Monteau F., Elliott C., Le Bizec B. (2011) Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30, 292-301.

- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Arozarena I., Casp A., Marin R., Navarro M. (2000) Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 212, 108-112.
- Arranz S., Chiva-Blanch G., Valderas-Martínez P., Medina-Remón A., Lamuela-Raventos R.M., Estruch R. (2012) Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*, 4, 759-781.
- Arribas A.S., Martínez-Fernández M., Chicharro M. (2012) The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry*, 34, 78-96.
- Arrigo N., Arnold C. (2007) Naturalised *Vitis* rootstocks in Europe and consequences to native wild grapevine. *PLoS One*, 2, 521e.
- Arvantoyannis I. (2010). Wine authenticity, traceability and safety monitoring. U: Managing wine quality. Viticulture and wine quality. Reynolds A.G. (ed.) Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 218-270.
- Arvantoyannis I., Katsota M.N., Psarra P., Soufleros E., Kallinthraka S. (1999) Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science and Technology*, 10, 321-336.
- Auger C., Teissedre P.-L., Gérain P., Lequeux N., Bornet A., Serisier S., Besançon P., Caporiccio B., Cristol J.P., Rouanet J.M. (2005) Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2015-2021.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187-197.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

- Bavaresco L., Mattivi F., De Rosso M., Flamini R. (2012) Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 1366-1381.
- Berente B., Garcia D.D.L., Reichenbacher M., Danzer K. (2000) Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, 871, 95-103.
- Bertacchini L., Cocchi M., Vigni M.L., Marchetti A., Salvatore E., Sighinolfi S., Silvestri M., Durante C. (2013) The impact of chemometrics on food traceability. *Chemometrics in Food Chemistry*, 28, 371-410.
- Bešlić Z., Pantelić M., Dabić D., Todić S., Natić M., Tešić Ž. (2015) Effect of vineyard floor management on water regime, growth response, yield and fruit quality in Cabernet Sauvignon. *Scientia Horticulturae*, 197, 650-656.
- Bešlić Z., Todić S., Korać N., Lorenzi S., Emanuelli F., Grando M.S. (2012) Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Serbia. *Vitis*, 51, 183-189.
- Białońska D., Zobel A.M., Kuraś M., Tykarska T., Sawicka-Kapusta K. (2007) Phenolic compounds and cell structure in bilberry leaves affected by emissions from a Zn-Pb smelter. *Water, Air, and Soil Pollution*, 181, 123-133.
- Bogs J., Downey M., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P. (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, 139, 652-663.
- Boselli E., Giomo A., Massimo Minardi M., Frega N. (2008) Characterization of phenolics in Lacrima di Morro d'Alba wine and role on its sensory attributes. *European Food Research and Technology*, 227, 709-720.
- Boss C., Fredeen K. (2004) Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *PerkinElmer Inc, Waltham, Massachusetts, USA*.
- Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macrì F. (2008) Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling and Behavior*, 3, 626-632.

- Brewer E. (2016) Ellagic acid: Food sources, potential role in human health and antioxidant effects. *Nova Science Publishers Inc, New York, USA*.
- Brouillard R., George F., Fougèrouse A. (1997) Polyphenols produced during red wine ageing. *Bio Factors*, 6, 403-410.
- Budić-Leto I., Zdunić G., Gajdoš-Kljusurić J., Mucalo A., Vrhovšek U. (2017) Differentiation between Croatian dessert wine Prošek and dry wines based on phenolic composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 211-216.
- Buglass A.J. (2011) Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects. *John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK*.
- Burns J., Gardner P.T., O'Neill J., Crawford S., Morecroft I., McPhail D.B., Lister C., Matthews D., MacLean M.R., Lean M.E., Duthie G.G., Crosier A. (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 220-230.
- Cacciola F., Farnetti S., Dugo P., Marriott P.J., Mondello L. (2017) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for polyphenol analysis in food stuffs. *Journal of Separation Science*, 40, 7-24.
- Cantos E., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A. (2002) Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC–DAD–MS–MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5691-5696.
- Capanoglu E., de Vos R.C.H., Hall R.D., Boyacioglu D., Beekwilder J. (2013) Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. *Food Chemistry*, 139, 521-526.
- Capriotti A.L., Cavaliere C., Foglia P., Piovesana S., Ventura S. (2015) Chromatographic methods coupled to mass spectrometry detection for the determination of phenolic acids in plants and fruits. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38, 353-370.
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Castellari M., Versari A., Spinabelli U., Galassi S., Amati A. (2000) An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in

- grape musts and wines. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 23, 2047-2056.
- Castellarin S.D., Bavaresco L., Falginella L., Gonçalves M.I.V.Z., di Gaspero G. (2012) Phenolics in grape berry and key antioxidants. U: The Biochemistry of the grape berry. Gerós H., Chaves M., Delrot S. (ed.) *Bentham Science, Bussum, Netherlands*, 89-110.
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I. (2007) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 992-1002.
- Cevallos-Cevallos J., Reyes-De-Corcuera J., Etxeberria E., Danyluk M., Rodrick G. (2009) Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 557-566.
- Chabreyrie D., Chauvet S., Guyon F., Salagoty M.H.U.C., Antinelli J.F., Medina B. (2008) Characterization and quantification of grape variety by means of shikimic acid concentration and protein fingerprint in still white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6785-6790.
- Chamorro S., Goñi I., Viveros A., Hervert-Hernández D., Brenes A. (2012) Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. *European Food Research and Technology*, 234, 147-155.
- Chandrasekhar J., Madhusudhan M.C., Raqhavarao K.S.M.S. (2012) Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 615-623.
- Charradi K., Elkahoui S., Karkouch I., Limam F., Hassine F.B., Aouani E. (2012) Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochemical Research*, 37, 2004-2013.
- Cheng G., Fa J.Q., Xi Z.M., Zhang Z.W. (2015) Research on the quality of the wine grapes in corridor area of China. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35, 38-44.
- Cheynier V., Teissedre P.L. (1998) Polyphénols Œnologie: fondements scientifiques et technologiques. *Technique et Documentation Paris*, 323-324.

- Cheyrier V., Schneider R., Salmon J., Fulcrand H. (2010) Chemistry of wine. U: Comprehensive natural products II. Mander L., Liu H. (ed.) *Elsevier Inc., Amsterdam, Holland*, 1134-1145.
- Chira K., Schmauch G., Saucier C., Fabre S., Teissedre P.-L. (2009) Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 545-553.
- Cho M.J., Howard L., Prior R., Clark J. (2004) Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1771-1782.
- Christoph N., Rossmann A., Voerkelius S. (2003) Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope and meteorological data, data banks and statistical tests. Part 1: Wines from Franconia and Lake Constance 1992 to 2001. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 53, 23-40.
- Cindrić P., Korać N., Kovač V. (2000) Grape breeding in the Vojvodina province. *Acta Horticulturae*, 528, 505-510.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A.C.P., Tavares R.M., Sousa M.J., Agasse A., Delrot S., Gerós H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
- Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 35-43.
- Cozzolino D. (2015) Elemental composition in grapes and wine. U: Handbook of mineral elements in food. De la Guardia M., Garrigues S. (ed.) *John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK*, 473-487.
- Cubero-Leon E., Peñalver R., Maquet A. (2014) Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95-107.
- Cugnetto A., Santagostini L., Rolle L., Guidoni S., Gerbi V., Novello V. (2014) Tracing the “terroirs” via the elemental composition of leaves, grapes and derived wines in cv Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 172, 101-108.

- Curin Y., Ritz M.F., Andriantsitohaina R. (2006) Cellular mechanisms of the protective effect of polyphenols on the neurovascular unit in strokes. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 4, 277-288.
- Dani C., Oliboni L.S., Agostini F., Funchal C., Serafini L., Henriques J.A., Salvador M. (2010) Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology In Vitro*, 24, 148-153.
- Danezis G., Tsagkaris A., Camin F., Brusic V., Georgiou C. (2016) Food authentication: techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132.
- de Lourdes Reis Giada M. (2013) Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. U: Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants. Morales González J.A. (ed.) *Tech Publisher, Rijeka, Croatia*, 87-112.
- De Pascali S.A., Coletta A., Del Coco L., Basile T., Gambacorta G., Fanizzi F.P. (2014) Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chemistry*, 161, 112-119.
- de Villiers A., Alberts P., Tredoux A.G.J., Nieuwoudt H.H. (2012) Analytical techniques for wine analysis: an African perspective. A review. *Analytica Chimica Acta*, 730, 2-23.
- Di Lecce G., Arranz S., Jauregui O., Tresserra-Rimbau A., Quifer-Rada P., Lamuela-Raventos R.M. (2014) Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145, 874-882.
- Di Stefano V., Avellone G., Bongiorno D., Cunsolo V., Muccilli V., Sforza S., Dossena A., Drahos L., Vékey K. (2012). Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259, 74-85.
- Delcambre A., Saucier C. (2012) Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 727-736.
- Donno D., Boggia R., Zunin P., Cerutti A.K., Guido M., Mellano M.G., Prgomet Z., Beccaro G.L. (2015) Phytochemical fingerprint and chemometrics for natural food

- preparation pattern recognition: an innovative technique in food supplement quality control. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1071-1083.
- Donno D., Beccaro G.L., Carlen C., Ancay A., Cerutti A.K., Mellano M.G., Bounous G. (2016) Analytical fingerprint and chemometrics as phytochemical composition control tools in food supplement analysis: characterization of raspberry bud-preparations of different cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3157-3168.
- Downey M., Dokoozlian N., Krstic M. (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 257-268.
- Downey M., Harvey J., Simon R. (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 15-27.
- Drivelos S., Georgiou C. (2012) Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 40, 38-51.
- Du B., He B.-J., Shi P.-B., Li F.-Y., Li J., Zhu F.-M. (2012) Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 3381-3387.
- Durdjić S., Pantelić M., Trifković J., Vukojević V., Natić M., Tešić Ž., Mutić J. (2017) Elemental composition as a tool for the assessment of type, seasonal variability, and geographical origin of wine and its contribution to daily elemental intake. *RSC Advances*, 7, 2151-2162.
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R. (2001) Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 409-420.
- Esslinger S., Riedl J., Fauhl-Hassek C. (2014). Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189-204.

- Everette J., Bryant Q., Green A., Abbey Y., Wangila G., Walker R. (2010) Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139-8144.
- Farhadi K., Esmailzadeh F., Hatami M., Forough M., Molaie R. (2016) Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry*, 199, 847-855.
- Fernández-Cáceres P.L., Martín M.J., Pablos F., González G.A. (2001) Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4775-4779.
- Ferrandino A., Guidoni, S. (2010) Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. *European Food Research and Technology*, 230, 417-427.
- Ferreira V., Fernandes F., Pinto-Carnide O., Valentão P., Falco V., Martín J.P., Ortiz J.M., Arroyo-Garcia R., Andrade P., Castro I. (2016) Identification of *Vitis vinifera* L. grape berry skin color mutants and polyphenolic profile. *Food Chemistry*, 194, 117-127.
- Fillion L., Ageorges A., Picaud S., Coutos-Thévenot P., Lemoine R., Romieu C., Delrot S. (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology*, 120, 1083-1093.
- Flamini R. (2003) Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, 22, 218-250.
- Flamini R. (2008) Hyphenated techniques in grape and wine chemistry. *John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK*.
- Flamini R., Mattivi F., de Rosso M., Arapitsas P., Bavaresco L. (2013) Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19651-19669.
- Formica J.V., Regelson W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Fortes A.M., Pais M.S. (2016) Grape (*Vitis* species). U: Nutritional composition of fruit cultivars. Simmonds M., Preedy V. (ed.) Academic Press, Cambridge, USA, 257-286.

- Fukumoto L.R., Mazza G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Galanakis C.M., Goulas V., Tsakona S., Manganaris G.A., Gekas V. (2013) A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, 16, 382-396.
- Galani-Nikolakaki S., Kallithrakas-Kontos N., Katsanos A.A. (2002) Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *Science of the Total Environment*, 285, 155-163.
- Gambelli L., Santaroni G.P. (2004) Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food composition and Analysis*, 17, 613-618.
- Gatto P., Vrhovsek U., Muth J., Segala C., Romualdi C., Fontana P., Pruefer D., Stefanini M., Moser C., Mattivi F. (2008) Velasco R. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 11773-11785.
- García-Marino M., Hernández-Hierro J. M., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C., Escribano-Bailón M.T. (2011). Multivariate analysis of the polyphenol composition of Tempranillo and Graciano red wines. *Talanta*, 85, 2060-2066.
- Garrido J., Borges F. (2013) Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844-1858.
- Geana I., Iordache A., Ionete R., Marinescu A., Ranca A., Culea M. (2013) Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis. *Food Chemistry*, 138, 1125-1134.
- Georgiou C., Danezis G. (2017) Food Authentication: Management, Analysis and Regulation. *Wiley-Blackwell, Hoboken, USA*.
- Gil-Muñoz R., Fernández-Fernández J.I., Vila-López R., Martínez-Cutillas A. (2010) Anthocyanin profile in Monastrell grapes in six different areas from denomination of Origen Jumilla during ripening stage. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1870-1877.

- Giusti M., Jing P. (2007) Natural pigments of berries: Functionality and application. U: Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion. Zhao Y. (ed.) *CRC Press, Boca Raton, USA*.
- Giusti M., Wrolstad R. (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. U: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Sporns, P., (ed.) *John Wiley & Sons, New York, USA*, F1.2.1-F1.2.13.
- Gioxari A., Kogiannou D.A.A., Kalogeropoulos N., Kaliora A.C. (2016) Phenolic compounds: bioavailability and health effects. U: Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F. (ed.) *Encyclopedia of food and health. Elsevier Science, Kidlington, UK*, 339-345.
- Gođevac D., Tešević V., Veličković M., Vujusić Lj., Vajs V., Milosavljević S. (2010) Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 1641-1652.
- Goldammer T. (2015) *Grape Grower's Handbook. A guide to viticulture for wine production. Apex Publishers, Centreville, USA*.
- Goldberg D.M., Karumanchiri A., Tsang E., Soleas G.J. (1998) Catechin and epicatechin concentrations of red wines: Regional and cultivar-related differences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 23-34.
- Gomez-Alonso S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E. (2007) Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 608-613.
- González G., Peña-Méndez E.M. (2000) Multivariate data analysis in classification of must and wine from chemical measurements. *European Food Research and Technology*, 212, 100-107.
- González-Manzano S., Rivas-Gonzalo J.C., Santos-Buelga C. (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513, 283-289.
- González-Neves G., Gil G., Favre G., Baldi C., Hernández N., Traverso S. (2013) Influence of winemaking procedure and grape variety in the colour and

- composition of young red wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34, 138-146.
- González-Neves G., Barreiro L., Gil G., Franco J., Ferrer M., Moutounet M., Carbonneau A. (2004) Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay. *Analytica Chimica Acta*, 513, 197-202.
- Gould K., Davies K., Winefield C. (2009) Anthocyanins: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.
- Granato D., Santos J.S., Escher G.B., Ferreira B.L., Maggio R.M. (2018) Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 72, 83-90.
- Grembecka M., Kalis A., Szefer P. (2009) What do metals tell us about wine? *3rd International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food, Rome*, str. 130.
- Grindlay G., Mora J., Luis G., Loos-Vollebregt M. (2011) Atomic spectrometry methods for wine analysis: a critical evaluation and discussion of recent applications. *Analytica Chimica Acta*, 691, 18-32.
- Gris E.F., Mattivi F., Ferreira E.A., Vrhovsek U., Filho D.W., Pedrosa R.C., Bordignon-Luiz M.T. (2013) Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 31-40.
- Haminiuk C., Maciel G., Plata-Oviedo M., Peralta R. (2012) Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2023-2044.
- Han X., Shen T., Lou H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950-988.
- Handique J.G. (2011) Phenolic compounds in medicine. U: Chemistry of phenolic compounds: state of the art. Baruah J.B. (ed.) *Nova Science Publishers Inc., New York, USA*.
- Handoussa H., Hanafi R., Eddiasty I., El-Gendy M., El Khatib A., Linscheid M., Mahran L., Ayoub N. (2013) Anti-inflammatory and cytotoxic activities of dietary

- phenolics isolated from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1204-1216.
- Hanlin R.L., Downey M.O. (2009) Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 13-23.
- Harbertson J.F., Picciotto E.A., Adams D.O. (2003) Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 301-306.
- Haslam E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of actions. *Journal of Natural Products*, 59, 205-211.
- He F., Mu L., Yan G.L., Liang N.N., Pan Q.H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.Q. (2010) Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15, 9057-9091.
- He F., Liang N., Mu L., Pan Q., Wang J., Reeves M.J., Duan C. (2012a) Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17, 1483-1519.
- He F., Liang N., Mu L., Pan Q., Wang J., Reeves M.J., Duan C. (2012b) Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17, 1571-1601.
- Hernández-Jiménez A., Gómez-Plaza E., Martínez-Cutillas A., Kennedy J. (2009) Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 10798-10803.
- Herrmann K. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.
- Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. (2011) Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2465-2483.
- Hogan S., Zhang L., Li J., Zoecklein B., Zhou K. (2009) Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 1269-1274.

- Hosu A., Cimpoiu C. (2016) HPTLC Fingerprinting - An Useful Tool for White Wines Authentication. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39, 303-307.
- Hung L.M., Chen J.K., Huang S.S., Lee R.S., Su M.J. (2000) Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 47, 549-555.
- Ibrahim M.H., Jaafar H.Z.E., Karimi E., Ghasemzadeh A. (2012) Primary, secondary metabolites, photosynthetic capacity and antioxidant activity of the Malaysian Herb Kacip Fatimah (*Labisia Pumila Benth*) exposed to potassium fertilization under greenhouse conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 15321-15342.
- Ignat I., Volf I., Popa V. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Intrigliolo D., Llacer E., Revert J., Esteve M.D., Climent M.D., Palau D., Gómez I. (2014) Early defoliation reduces cluster compactness and improves grape composition in Mandó, an autochthonous cultivar of *Vitis vinifera* from southeastern Spain. *Scientia Horticulturae*, 167, 71-75.
- Jackson R.S. (2008) Wine science: Principles and applications, Elsevier Academic Press Amsterdam/Boston.
- Jakšić D., Ivanišević D., Đokić V., Brbaklić Tepavac M. (2012) Vinski atlas. Republički zavod za statistiku, Beograd, Srbija.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Pezzuto J.M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Jeon J.R., Kim E.J., Kim Y.M., Murugesan K., Kim J.H., Chang Y.S. (2009) Use of grape seed and its natural polyphenol extracts as a natural organic coagulant for removal of cationic dyes. *Chemosphere*, 77, 1090-1098.
- Kabata-Pendias A. (2011) Trace elements in soils and plants. *CRC Press, New York, USA*.

- Kaiser B.N., Gridley K.L., Ngaire Brady J., Phillips T., Tyerman S.D. (2005) The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany*, 96, 745-754.
- Kallithraka S., Salachaa M.I., Tzouroua I. (2009) Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113, 500-505.
- Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. (2006) Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99, 784-793.
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S. (2009) Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Katalinić V., Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Teskera A., Konta I., Boban M. (2009) Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1, 7-15.
- Katalinić V., Smole Mozina S., Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Klančnik A. (2013) Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, 16, 45-60.
- Kedare S.B., Singh R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. (2005) Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multiple isotope analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 555-567.
- Kennedy J., Saucier C., Glories Y. (2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 239-248.
- Kennedy J., Troup G., Pilbrow J., Hutton D., Hewitt D., Hunter C., Ristic R., Iland P., Jones G. (2000) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 244-254.
- Koek M.M., Jellema R.H., van der Greef J., Tas A.C., Hankemeier T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics*, 7, 307-328.
- Krol A., Amarowicz R., Weidner S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera*

- L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1491-1499.
- Kruzlicova D., Fiket Ž., Kniewald G. (2013) Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis. *Food Research International*, 54, 621-626.
- Ky I., Lorrain B., Kolbas N., Crozier A., Teissedre P.L. (2014) Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*, 19, 482-506.
- Lamuela-Raventos R.M., Waterhouse A.L. (1994) A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 1-5.
- Lees M. (2003). Food authenticity and traceability. *Woodhead Publishing, Sawston, USA*.
- Liang Z., Cheng L., Zhong G.Y., Liu R.H. (2014) Antioxidant and antiproliferative activities of twenty-four *Vitis vinifera* grapes. *Plos One*, 9, e105146.
- Liang Z., Wu B., Fan P., Yang C., Duan W., Zheng X., Liu C., Li S. (2008) Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry*, 111, 837-844.
- Likar M., Vogel-Mikuš K., Potisek M., Hančević K., Radić T., Nečemer M., Regvar M. (2015) Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. *Science of the Total Environment*, 505, 724-731.
- Lingua M.S., Fabani M.P., Wunderlin D.A., Baroni M.V. (2016) From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228-238.
- Lorrain B., Chira K., Teissedre P.-L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry*, 126, 1991-1999.
- Lorrain B., Ky I., Pechamat L., Teissedre P.L. (2013) Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18, 1076-1100.
- Lucci P., Saurina J., Núñez O. (2017) Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 88, 1-24.

- Luthria D.L., Pastor-Corrales M.A. (2006) Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205-211.
- Ma T.-T., Sun X.-Y., Gao G.-T., Wang X.-Y., Liu X.-Y., Du G.-R, Zhan J.-C. (2014) Phenolic characterisation and antioxidant capacity of young wines made from different grape varieties grown in Helanshan Donglu wine zone (China). *South African Journal for Enology and Viticulture*, 35, 321-331.
- Ma W., Guo A., Zhang Y., Wang H., Liu Y., Li H. (2014) A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, 40, 6-19.
- Mackenzie D.E., Christy A.G. (2005) The role of soil chemistry in wine grape quality and sustainable soil management in vineyards. *Water Science and Technology*, 51, 27-37.
- Makris D., Rossiter J. (2002) Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: A preliminary investigation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 103-113.
- Malešev D., Kuntić V. (2007) Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72, 921-939.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230-242.
- Martillanes S., Rocha-Pimienta J., Cabrera-Bañegil M., Martín-Vertedor D., Delgado-Adámez J. (2017) Application of phenolic compounds for food preservation: food additive and active packaging. U: Phenolic Compounds-Biological Activity. Soto-Hernández M. (ed.) In Tech, Rijeka, Croatia.
- Martin A., Watling J., Lee G. (2012) The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chemistry*, 133, 1081-1089.
- Márquez-García B., Fernández-Recamales M.A., Córdoba F. (2012). Effects of cadmium on phenolic composition and antioxidant activities of *Erica andevalensis*. *Journal of Botany*, 2012, 1-6.

- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R. (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7692-7702.
- Mattivi F., Vrhovsek U., Masuero D., Trainotti D. (2009) Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 27-35.
- Mattivi F., Zulian C., Nicolini G., Valenti L. (2002) Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 37-56.
- Maul E., Eiras Dias J.E., Kaserer H., Lacombe T., Ortiz J.M., Schneider A., Maggioni L., Lipman E., Compilers report of a working group on *Vitis*. *First Meeting Palić, Serbia and Montenegro*, 12-14 June 2003.
- Mazza G. (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 341-371.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.
- Migas P., Krauze-Baranowska M. (2015) The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, 13, 35-40.
- Milanov G., Beleski K., Nedelkovski D., Ristov G. (2014) Efekti različitog opterećenja vinove loze i dužina maceracije na polifenolni sastav vina od sorte Vranac. *Agroznanje*, 15, 319-328.
- Mitić M., Souquet J., Obradović M., Mitić S. (2012) Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1619-1626.
- Monagas M., Gomez-Cordovez C., Bartolomea B., Laureano O., Ricardo da Silva J.M. (2003) Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6475-6481.
- Moreno D., Ilic N., Poulev A., Brasaemle D., Fried S., Raskin I. (2003) Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, 19, 876-879.

- Motilva M.J., Serra A., Macià A. (2013) Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A*, 1292, 66-82.
- Murphy P.A., Song T., Buseman G., Barua K., Beecher G.R., Trainer D., Holden J. (1999) Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2697-2704.
- Musielińska R., Kowol J., Kwapuliński J., Roche R. (2016) Antagonism between lead and zinc ions in plants. *Archives of Environmental Protection*, 42, 78-91.
- Naczka M., Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Nassiri-Asl M., Hosseinzadeh H. (2009) Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 23, 1197-1204.
- Nowshehri J.A., Bhat Z.A., Shah M.Y. (2015) Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts. *Food Reviews International*, 77, 333-348.
- The International Organisation of Vine and Wine (1983) Descriptor list for grape vine varieties and *Vitis* species. Paris: Office International de la Vignette du Vin.
- Oroian M., Escriche I. (2015) Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Orescanin V., Katunar A., Kutle A., Valkovic V. (2003) Heavy metals in soil, grape, and wine. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 21, 171-180.
- Owens C.L. (2008) Grapes. Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics. Springer, Heidelberg, Germany, 197-233.
- Paixao N., Pereira V., Marques J.C., Camara J.S. (2008) Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *Journal of Separation Science*, 31, 2189-2198.
- Pajović R., Raičević D., Popović T., Sivilotti P., Lisjak K., Vanzo A. (2014) Polyphenolic characterisation of Vranac, Kratosija and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L. cv.) grapes and wines from different vineyard locations in Montenegro. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35, 139-148.

- Pavlović A., Dabić D., Momirović N., Dojčinović B., Milojković-Opsenica D., Tešić Ž., Natić M. (2013) Chemical composition of two different extracts of berries harvested in Serbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4188-4194.
- Peleg H., Gacon K., Schlich P., Noble A.C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123-1128.
- Pena-Neira A., Caceres A., Pastenes C. (2007) Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International*, 13, 153-158.
- Pfeiffer J., Kuhnel C., Brandt J., Duy D., Nimal Punyasiri P.A., Forkmann G., Fischer T.C. (2006) Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiology Biochemistry*, 44, 323-334.
- Pozo-Bayón M.A., Hernández M.T., Martín-Alvarez P.J., Polo M.C. (2003) Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2089-2095.
- Price S., Breen P., Valladao M., Watson B. (1995) Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 187-194.
- Prodanov M., Vacas V., Hernandez T., Estrella I., Amador B., Winterhalter P. (2013) Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 284-292.
- Puértolas E., Álvarez I., Raso J. (2011) Changes in phenolic compounds of Aragón red wines during alcoholic fermentation. *Food Science and Technology International*, 17, 77-86.
- Quiroga A.M., Berli F.J., Moreno D., Cavagnaro J.B., Bottini R. (2009) Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative

- effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 28-35.
- Radovanović V. (1986) Tehnologija vina. IRO Građevinska knjiga, Beograd, Srbija.
- Rathi P., Rajput C. (2014) Antioxidant potential of grapes (*Vitis Vinifera*): A review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4, 102-104.
- Ratnasooriya C.C., Rupasinghe H.P.V. (2012) Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134, 625-631.
- Renaud S., de Lorgeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Restuccia D., Sicari V., Pellicanò T.M., Spizzirri U.G., Loizzo M.R. (2017) The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. *Food Research International*, 102, 303-312.
- Revilla E., Alons, E., Kovac V. (1997) The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. U: Wine. Nutritional and therapeutic benefits. Watkins T.R. (ed.) *American Chemical Society, Washington DC, USA*, 69-80.
- Robinson S.P., Davies C. (2000) Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 175-188.
- Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Rizelio V.M., de Souza Schmidt Gonçalves A.E., Genovese M.I., Fett R. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44, 897-901.
- Rodríguez-Delgado M.A., González G., Pérez-Trujillo J.P., García-Montelongo F.J. (2002) *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 76, 371-375.
- Rodríguez-Delgado M.A., Pérez M.L., Corbella R., González G., García Montelongo F.J. (2000) Optimization of the separation of phenolic compounds by micellarelectrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, 427-438.
- Rodríguez-Montealegre R., Romero-Peces R., Chacón-Vozmediano J.L., Martínez-Gascueña J., García-Romero E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of

- ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 687-693.
- Rover M.R., Brown R.C. (2013) Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371.
- Rusjan D., Veberič R., Mikulič-Petkovšek M. (2012) The response of phenolic compounds in grapes of the variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to the infection by phytoplasma Bois noir. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 965-974.
- Sagrati G., Maggi F. Caprioli G., Cristalli G., Ricciutelli M., Torregiani E., Vittori S. (2012) Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME-GC-MS and HPLC-MS. *Food Chemistry*, 132, 1592-1599.
- Saikia A.K. (2011) Phenolic compounds in medicine. U: Chemistry of phenolic compounds: State of the art. Baruah J.B. (ed.) *Nova Science Publishers Inc., New York, USA*, 7-18.
- Sánchez-Rangel J.C., Benavides J., Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D.A. (2013) The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5, 5990-5999.
- Sandhu A., Gu L. (2010) Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4681-4692.
- Santos S., Lapa N., Alves A., Morais J., Mendes B. (2013) Analytical methods and validation for determining trace elements in red wines. *Journal of Environmental Science and Health*, 48, 364-375.
- Saurina J. (2010) Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 234-245.
- Schoedl K., Forneck A., Sulyok M., Schuhmacher R. (2011) Optimization, in-house validation, and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based method for the quantification of selected polyphenolic

- compounds in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10787-10794.
- Schoedl K., Schuhmacher R., Forneck A. (2012) Studying the polyphenols of grapevine leaves according to age and insertion level under controlled conditions. *Scientia Horticulturae*, 141, 37-41.
- Serapinas P., Venskutonis P.R., Aninkevicius V., Ezerinskis Z., Galdikas A., Juzikiene V. (2008) Step by step approach to multi-element data analysis in testing the provenance of wines. *Food Chemistry*, 107, 1652-1660.
- Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Singleton V., Zaya J., Trousdale E. (1986) Caftaric and coumaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochemistry*, 25, 2127-2133.
- Soleas G.J., Dam J., Carey M., Goldberg D.M. (1997) Toward the fingerprinting of wines: Cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 3871-3880.
- Somers T.C., Vérette E., Pocock K.F. (1987) Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 67-78.
- Stalikas C.D. (2007) Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
- Stalikas C.D. (2010) Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. *Methods in Molecular Biology*, 610, 65-90.
- Stratil P., Kuban V., Fojtova J. (2008) Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Science*, 26, 242-253.
- Stuart J.A., Robb E.L. (2013) Health effects of resveratrol and its derivatives. U: Bioactive polyphenols from wine grapes. *Springer New York Heidelberg Dordrecht London*, 9-25.
- Suhaj M., Korenovska M. (2005) Application of elemental analysis for identification of wine origin. *Acta Alimentaria*, 34, 393-401.

- Sun B., Spranger M.I. (2005) Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidin and stilbenes. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 20, 59-89.
- Szefer P., Nriagu J. (2007) Mineral components in foods. *CRC Press, New York, USA*.
- Tariba B. (2011) Metals in wine: impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144, 143-156.
- Taware P.B., Dhumal K.N., Oulkar D.P., Patil S.H., Banerjee K. (2010) Phenolic alterations in grape leaves, berries and wines due to foliar and cluster powdery mildew infections. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 1-14.
- Teixeira A., Eiras-Dias J., Castellarin S.D., Gerós H. (2013) Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 18711-18739.
- Tomás-Barberán F., Espín J. (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.
- Treutter D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 147-157.
- Tsao R., Deng Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.
- Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Vaclavik L., Lacina O., Hajslova J., Zweigenbaum J. (2011) The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytical Chimica Acta*, 685, 45-51.
- Van Leeuwen C., Seguin G. (2006) The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17, 1-10.
- Van Leeuwen C., Roby J.-P., Alonso-Villaverde V., Gindro K. (2013) Impact of clonal variability in *Vitis vinifera* Cabernet Franc on grape composition, wine quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 19-24.

- Van Leeuw R., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., Dommes J. (2014) Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from 4 various grape varieties: specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36, 40-50.
- Vanzo A., Cecotti R., Vrhovsek U., Torres A.M., Mattivi F., Passamonti S. (2007) The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1604-1611.
- Varea S., García-Vallejo M.C., Cadahía E., Fernández de Simón B. (2001) Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *European Food Research and Technology*, 213, 56-61.
- Vauzour D. (2012) Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 914273.
- Versari A., Laurie V.F., Ricci A., Laghi L., Parpinello G.P. (2014) Progress in authentication: typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60, 2-18.
- Vian M.A., Tomao V., Coulomb P.O., Lacombe J.M., Dangles O. (2006) Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 5230-5235.
- Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E.J. (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564-573.
- Vivar-Quintana A.M., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (2002) Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458, 147-155.
- von Baer D., Mardones C., Gutiérrez L., Hofmann G., Hitschfeld A., Vergara C. (2007) Anthocyanin, flavonol, and shikimic acid profiles as a tool to verify varietal authenticity in red wines produced in Chile. U Authentication of Food and Wine. Ebeler S., Winterhalter P., Takeoka G. (ed.) *ACS Symposium Series, Washington, DC*, 228-238.

- Vrhovšek U. (1998) Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4203-4208.
- Vujović D. (2013): Vinogradarstvo. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (2003) Characterization of anthocyanins in grape juices by Ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1839-1844.
- Wang Y., Wu W.H. (2017) Regulation of potassium transport and signaling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 123-128.
- Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S. (2014) Polyphenols in human health and disease. *Academic Press, London, UK*.
- Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. (2008) Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4, 75-101.
- Wu Dai Z., Ollat N., Gomès E., Decroocq S., Tandonnet J.-P., Bordenave L., Pieri P., Hilbert G., Kappel C., van Leeuwen C., Vivin P., Delrot S. (2011) Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 413-425.
- Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B. (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646.
- Xia E., He X., Li H., Wu S., Li S., Deng G. (2014) Biological activities of polyphenols from grapes. U: Polyphenols in human health and disease. Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S. (ed.) *Academic Press, London, UK*, 47-58.
- Xing R.R., Li S.Y., He F., Yang Z., Duan C.Q., Li Z., Wang J., Pan Q.H. (2015) Mass spectrometric and enzymatic evidence confirm the existence of anthocyanidin 3,5-O-diglucosides in Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3251-3260.
- Yang J., Martinson T.E., Liu R.H. (2009) Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.
- Yilmaz Y., Toledo R.T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 255-260.

- Zhang J., Zhang X., Dediu L., Victor C. (2011) Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in china. *Food Control*, 22, 1126-1135.
- Zhang X.Y., Li W.G., Wu Y.J., Zheng T.Z., Li W., Qu S.Y., Liu N.F. (2005) Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *International Immunopharmacology*, 5, 1247-1257.
- Zhao Q., Duan C.Q., Wang J. (2011) Components of non-anthocyanin phenolic compounds in wines of *Vitis amurensis* and its hybrids. *African Journal of Biotechnology*, 10, 14767-14777.
- Zhu L., Zhang Y., Deng J., Li H., Lu J. (2012) Phenolic concentrations and antioxidant properties of wines made from North American grapes grown in China. *Molecules*, 17, 3304-3323.
- Zou J.F., Peng Z.X., Du H.J., Duan C.Q., Reeves M.J., Pan Q.H. (2012) Elemental patterns of wines, grapes, and vineyard soils from Chinese wine-producing regions and their association. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 232-240.

7. Biografija

Milica Sredojević (rođ. Pantelić) rođena je 24. januara 1987. godine u Loznici. Osnovnu i srednju školu (gimnazija, opšti smer) završila je u Malom Zvorniku. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/06. godine, a diplomirala 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,63. Diplomski rad pod naslovom „Proučavanje lipofilnosti gvajanolida izolovanih iz endemskog roda *Amphoricarpus* (*Asteraceae*)“ odbranila je sa ocenom 10,00. Doktorske akademske studije pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2011. godine.

U periodu od 01. jula 2013. do 20. januara 2015. bila je zaposlena kao tehnički saradnik pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao istraživač-pripravnik, na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu, zaposlena je od 01. marta 2015. godine. U zvanje istraživač-saradnik, u kojem se i sada nalazi, izabrana je 23. juna 2015. godine. Od 2015. godine angažovana je na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije (projekat broj 172017).

Učestvovala je u realizaciji eksperimentalnih vežbi na kursevima osnovnih i master studija različitih studijskih programa: Analitička hemija 1, Praktikum iz analitičke hemije 1, Klasična analitička hemija, Odabrane oblasti analitičke hemije i Hromatografske metode.

Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni su u pet naučnih radova. Jedan rad štampan je u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), dva rada štampana su u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), a dva rada su štampana u istaknutim međunarodnim časopisima (M22). Takođe, rezultati istraživanja su prezentovani u okviru sedam naučnih saopštenja koji su štampani u izvodu na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije**1. Naučni radovi****1.1. Rad objavljen u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

1.1.1. Pantelić, M., Dabić Zagorac, D., Davidović, S., Todić, S., Bešlić, Z., Gašić, U., Tešić, Ž., Natić, M. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry* (2016), 211, 243-252. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.051. ISSN: 0308-8146 (Impact factor 2016, **4.529** - Chemistry, Applied (7/72), Food Science & Technology (6/130))

1.2. Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1.2.1. Pantelić, M., Dabić Zagorac, D., Ćirić, I., Pergal, M., Relić, D., Todić, S., Natić, M. Phenolic profiles, antioxidant activity and minerals in leaves of different grapevine varieties grown in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis* (2017), 62, 76-83. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.05.002. ISSN: 0889-1575 (Impact factor 2015, **2.780** - Chemistry, Applied (15/72), Food Science & Technology (24/130))

1.2.2. Pantelić, M., Dabić Zagorac, D., Natić, M., Gašić, U., Jović, S., Vujović, D., Popović-Djordjević, J. Impact of clonal variability on phenolics and radical scavenging activity of grapes and wines: A study on the recently developed Merlot and Cabernet Franc clones (*Vitis vinifera* L.). *PLoS One* (2016), 11(10), e0163823. DOI: 10.1371/journal.pone.0163823. ISSN: 1932-6203 (Impact factor 2014, **3.234** - Multidisciplinary Sciences (9/57))

1.3. Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1.3.1. Pantelić, M., Dabić Zagorac, D., Gašić, U., Jović, S., Bešlić, Z., Todić, S., Natić, M. Phenolic profiles of Serbian autochthonous variety 'Prokupac' and monovarietal international wines from the Central Serbia wine region. *Natural Product Research* (2018). DOI: 10.1080/14786419.2017.1408107. ISSN: 1478-6419 (Impact factor 2016, **1.828** - Chemistry, Applied (29/72))

1.3.2. Vujović, D., Žunić, D., Popović, B., Pantelić, M., Popović-Djordjević, J. Agrobiological and wine quality traits of *Vitis Vinifera* cv. Merlot clones selected in Serbia. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*

(2015), 49(4), 267-274. DOI: 10.20870/oenone.2015.49.4.1. ISSN: 1151-0285 (Impact factor 2016, 0.772 - Horticulture (16/36))

2. Saopštenja sa naučnih skupova

2.1. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M 34)

- 2.1.1. Natić M., Pantelić M., Gašić U., Dabić D., Tešić Ž., Phenolic profile of grape leaves, 51. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Niš, Srbija, 5-7 Jun 2014, Book of abstract, p 19.
- 2.1.2. Natić M., Pantelić M., Mutić J., and Tešić Ž., Differences in polyphenolic and elemental composition of red and white Serbian wines, The XXXVIIIth SYMPOSIUM 'Chromatographic methods of investigating the organic compounds' Katowice-Szczyrk, 27-29 May 2015.
- 2.1.3. Gašić U., Pantelić M., Bešlić Z., Todić S., Tešić Ž., Natić M., Investigation of phenolic profile of Serbian autochthonous wines, 2nd International Conference on Plant Biology and 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Petnica, Serbia, 17-20 June 2015, Book of abstract, p 102.
- 2.1.4. Pantelić M., Gašić U., Dojčinović B., Dabić Zagorac D., Todić S., Bešlić Z., Tešić Ž., Natić M., Chemical characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves, 45th Conference of ESNA, Belgrade, Serbia, 6-8 September 2016, Book of abstract, p 28.
- ### 2.2. Saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu (M 64)
- 2.2.1. Pantelić M., **Correlation of total phenolic and anthocyanin content with radical scavenging activity of Serbian wines**, First International Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, 19-20 October 2012, Book of abstract, p 31.
- 2.2.2. Vujović D., Popović-Đorđević J., Žunić D., Popović B., Pantelić M., Osobine kvaliteta grožđa i vina sorte merlot (*Vitis Vinifera* L.) i klonova selekcionisanih u Srbiji, XX Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Srbija, 13-14 mart 2015.
- 2.2.3. Popović-Đorđević J., Pantelić M., Natić M., Dabić-Zagorac D., Gašić U., Vujović D., Sadržaj polifenola u grožđu različitih klonova sorte *Cabernet Franc* selekcionisanih u Srbiji, XXI Savetovanje o biotehnologiji, Agronomski fakultet u Čačku, 11-12 mart 2016.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Милица М. Средојевић

број уписа дх19/2011

Изјављујем

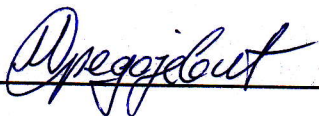
да је докторска дисертација под насловом

Хемијска карактеризација грожђа и сортних вина из различитих виногорја у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 15. 06. 2018.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица М. Средојевић

Број уписа дх19/2011

Студијски програм доктор хемијских наука

Наслов рада Хемијска карактеризација грожђа и сортних вина из различитих
виногорја у Србији

Ментор др Маја Натић

Потписана Милица М. Средојевић


изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 15.06.2018.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хемијска карактеризација грожђа и сортних вина из различитих виногорја у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- [3.] Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 15.06.2018.

Потпис докторанда

