



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Dušan Đ. Paunović

**HEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDATIVNA
AKTIVNOST PIVA I SIROVINA ZA PROIZVODNJU
PIVA. KINETIKA EKSTRAKCIJE**

Doktorska disertacija

Niš, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Dušan Đ. Paunović

**CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF BEER AND RAW MATERIALS FOR
THE PRODUCTION OF BEER. THE KINETICS OF
EXTRACTION**

PhD thesis

Niš, 2015.

Mentor:

dr Snežana Mitić,

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Članovi komisije:

dr Danijela Kostić,

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu,

dr Aleksandra Pavlović,

vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu,

dr Milan Mitić,

docent Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i

dr Ružica Micić,

docent Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Prištini.

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Izradom doktorske disertacije rukovodila je dr Snežana Mitić, redovni profesor PMF-a u Nišu, kojoj se srdačno zahvaljujem na uloženom trudu, stručnoj pomoći, strpljenju i podršci tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem svojim kolegama sa Katedre za analitičku i fizičku hemiju, Departmana za hemiju, na korisnim savetima i saradnji.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju.


Autor



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР :	
Идентификациони број, ИБР :	
Тип документације, ТД :	монографска
Тип записа, ТЗ :	текстуални / графички
Врста рада, ВР :	докторска дисертација
Аутор, АУ :	Душан Ђ. Пауновић
Ментор, МН :	Снежана Митић
Наслов рада, НР :	Хемијски састав и антиоксидативна активност пива и сировина за производњу пива. Кинетика екстракције
Језик публикације, ЈП :	српски
Језик извода, ЈИ :	српски и енглески
Земља публиковања, ЗП :	Србија
Уже географско подручје, УГП :	Србија
Година, ГО :	2015
Издавач, ИЗ :	ауторски репринт
Место и адреса, МА :	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО : <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	214 стр., граф. прикази
Научна област, НО :	Хемија
Научна дисциплина, НД :	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО :	Пиво, хмељ, јечам, полифенолна једињења, антиоксидативна активност, садржај метала, кинетика екстракције
УДК	54 : 663.42 581.192 : 663.42 544.42 : 663.443.4
Чува се, ЧУ :	библиотека
Важна напомена, ВН :	Експериментални део је урађен у лабораторији ПМФ-а у Нишу

Извод, ИЗ:	Испитивани су оптимални услови екстракције фенолних једињења и металних јона из јечма и хмеља поступком мацерације при различитим оперативним условима (концентрације воденог раствора етанола, хидромодула, концентрације киселине, времена и температуре екстракције). Кинетика екстракције фенолних једињења из јечма и хмеља је моделована коришћењем два модела: модела заснованог на теорији нестационарне дифузије кроз чврст материјал и емпиријског модела Пономарјева. Уз помоћ ова два модела, одређени су коефицијенти брзе (b) и споре (k) екстракције, а потом и термодинамички параметри. Садржај металних јона, фенолних једињења и антиоксидативне активности већег броја узорка јечма, хмеља и пива, одређен је применом спектрофотометрије, HPLC-DAD и ICP-OES методе. Добијени резултати су дискутовани и упоређени са литературним подацима.
Датум прихватања теме, ДП:	09.06.2014.
Датум одбране, ДО: Чланови комисије, КО: Председник: Члан: Члан, ментор:	

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Dušan Đ. Paunović
Mentor, MN :	Snežana Mitić
Title, TI :	Chemical composition and antioxidant activity of beer and raw materials for the production of beer. The kinetics of extraction
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	Serbian and English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2015
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	214 p., graphic representations
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Analytical chemistry
Subject/Key words, S/KW :	Beer, hop, barley, polyphenolic compounds, antioxidant activity, content of metals, kinetics of extraction
UC	54 : 663.42 581.192 : 663.42 544.42 : 663.443.4
Holding data, HD :	library
Note, N :	The experimental part of this work was performed in the research laboratory of the Faculty of Science and Mathematics in Niš.

Abstract, AB :	The extraction and the efficiency of extraction of phenolic compounds and metal ions of barley and hop by maceration at various operating conditions (concentration of the aqueous solution of ethanol, hydromodulus, acid concentration, time and temperature of extraction) were examined. The coefficients of the quick (b) and the slow extraction (k) stages of phenolic compounds in barley and hop as well as the thermodynamic parameters were modelled using two kinetic models: the model based on the theory of non-stationary diffusion through solid material and the empirical model of Ponomarev. The content of metal ions, phenolic compounds and antioxidant activity of a larger number of barley, hop and beer samples were determined using the spectrophotometry, HPLC-DAD and ICP-OES method. The results are discussed and compared with published data.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	09.06.2014.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President: Member: Member, Mentor:

Образац Q4.09.13 - Издање 1

Skraćenice

ABTS⁺ - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ATSDR – Agencija za toksične supstance i registar bolesti (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)

CE - Katehin ekvivalent

DPPH[·] - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

FRAP - Fe(III)-Fe(II) redoks kapacitet (*ferric ion reducing antioxidant power*)

GAE - Ekvivalent galne kiseline

HPLC - Tečna hromatografija sa visokim performansama (*high performance liquid chromatography*)

ICP - Induktivno spregnuta plazma (*inductively coupled plasma*)

ICP-OES - Induktivno spregnuta plazma sa optičkom detekcijom

K-Glu - kemferol-3-glukozid

K-Rut - kemferol-3-rutinozid

LOD - Limit detekcije

LOQ - Limit kvantifikacije

MDK - Maksimalno dozvoljena koncentracija

nd - nije detektovano

PCA - Analiza glavne komponente

Q-Gal - kvercetin-3-galaktozid

Q-Gli - kvercetin-glikozid

Q-Glu - kvercetin-3-glukozid

Q-Rut - kvercetin-3-rutinozid

SD - Standardna devijacija

TE - Troloks ekvivalent

TEAC - Antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa

TF - Ukupni flavonoidi

TP - Ukupni fenoli

TPTZ - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin

US EPA – Američka agencija za zaštitu životne sredine (*United States Environmental Protection Agency*)

WHO - Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	5
2.1. Ekstrakcija.....	6
2.1.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija.....	6
2.1.2. Kinetika čvrsto-tečne ekstrakcije.....	10
2.1.3. Matematički modeli procesa ekstrakcije	11
2.1.3.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal.....	12
2.1.3.2. Empirijski model Ponomarjeva.....	15
2.2. Pivo i sirovine za proizvodnju piva.....	16
2.2.1. Istorijat proizvodnje piva.....	16
2.2.2. Ječam.....	17
2.2.3. Hmelj.....	18
2.2.4. Kvasci.....	19
2.2.5. Voda.....	20
2.2.6. Proizvodnja piva.....	20
2.2.7. Hemijski sastav piva.....	21
2.2.8. Hranljiva vrednost piva.....	23
2.2.9. Lekovita svojstva piva.....	24
2.3. Fenolna jedinjenja.....	27
2.4. Antioksidansi.....	34
2.4.1. Mehanizam delovanja antioksidanasa.....	36
2.4.1.1. Primarna antioksidativna zaštita.....	36
2.4.1.2. Sistem sekundarne antioksidativne zaštite.....	37
2.4.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti.....	38
2.4.2.1. Elektron-transfer metode.....	41
2.5. Metalni joni.....	46
2.6. Metode analize.....	48
2.6.1. UV/Vis spektrofotometrija.....	48
2.6.2. HPLC hromatografija.....	50
2.6.2.1. Kvalitativna HPLC analiza.....	52
2.6.2.2. Kvanitativna HPLC analiza.....	52
2.6.3. Induktivno spregnuta plazma (ICP).....	54

3. EKPERIMENTALNI DEO.....	60
3.1.Materijal.....	61
3.2.Reagensi.....	61
3.3.Aparati.....	61
3.4.Metode.....	62
3.4.1.Priprema uzoraka.....	62
3.4.2.Postupak ekstrakcije uzoraka za UV/Vis, HPLC i ICP-OES analizu.....	62
3.4.3.Postupak mineralizacije.....	63
3.5.Spektrofotometrijska analiza.....	63
3.5.1.Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	64
3.5.2.Inicijalni sadržaj polifenolnih jedinjenja u ječmu i hmelju (q_0).....	65
3.5.3.Sadržaj polifenolnih jedinjenja u zasićenim tečnim ekstraktima ječma i hmelja (C_{max}).....	65
3.5.4.Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	65
3.5.5.Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom.....	66
3.5.6.Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS testom.....	67
3.5.7.Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP testom.....	67
3.5.8.HPLC analiza ekstrakata.....	68
3.5.9.ICP-OES metoda.....	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
4.1.Kinetika i sastav ekstrakata ječma.....	71
4.1.1.Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz ječma.....	71
4.1.1.1.Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz ječma.....	72
4.1.1.2.Modelovanje kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma.....	75
4.1.1.3.Termodinamički parametri ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma.....	79
4.1.2.Ekstrakcija metalnih jona iz ječma.....	81
4.1.2.1.Određivanja optimalnih uslova za ekstrakciju metalnih jona iz ječma....	82
4.1.2.2.Koeficijenti ekstrakcije metalnih jona iz ječma.....	100
4.1.3.Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata ječma.....	101
4.1.3.1.Spektrofotometrijska analiza ekstrakata ječma.....	101
4.1.3.2.ICP-OES analiza mineralnog sastava ječma.....	103
4.2. Kinetika i sastav ekstrakata hmelja.....	110
4.2.1.Ekstrakcija antioksidanasa iz hmelja.....	110

4.2.1.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja.....	110
4.2.1.2. Modelovanje kinetike ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja.....	114
4.2.2. Ekstrakcija ukupnih fenola iz hmelja.....	116
4.2.2.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja.....	116
4.2.3. Ekstrakcija flavonola iz hmelja.....	119
4.2.3.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja.....	119
4.2.4. Ekstrakcija fenolnih kiselina iz hmelja.....	123
4.2.4.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja.....	124
4.2.5. Termodinamički parametri ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz hmelja.....	127
4.2.5.1. Termodinamički parametri aktivacionog procesa ekstrakcije.....	127
4.2.5.2. Termodinamički parametri procesa ekstrakcije.....	130
4.2.6. Ekstrakcija metalnih jona iz hmelja.....	132
4.2.6.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju metalnih jona iz hmelja.....	133
4.2.6.2. Koeficijenti ekstrakcije metalnih jona iz hmelja.....	148
4.2.7. Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata hmelja.....	149
4.2.7.1. Spektrofotometrijska analiza ekstrakata hmelja.....	149
4.2.7.2. HPLC analiza ekstrakata hmelja.....	152
4.2.7.3. ICP-OES analiza mineralnog sastava hmelja.....	155
4.3. Sastav i antioksidativna aktivnost piva.....	161
4.3.1. Spektrofotometrijska analiza piva.....	162
4.3.1.1. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u pivu.....	162
4.3.1.2. Antioksidativna aktivnost piva.....	163
4.3.2. HPLC analiza piva.....	166
4.3.2.1. Određivanje fenolnih i hidrosicimetnih kiselina u pivu.....	166
4.3.3. ICP-OES analiza piva.....	169
4.3.3.1. Sadržaj makro i mikroelemenata.....	170
4.3.3.2. PCA analiza.....	176
5. IZVOD.....	179
6. SUMMARY.....	183
7. LITERATURA.....	187
8. PRILOG.....	201
9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	211

1. UVOD

Pivo je piće sa niskim sadržajem alkohola, karakterističnom aromom i sa prijatnim gorkim ukusom. Osnovne sirovine za proizvodnju piva su pivski slad, pivski kvasac, hmelj i voda. Od pivskog ječma se najpre dobija slad, od koga se pravi sladovina, koja nastaje ekstrakcijom aktivnih sastojaka slada i hmelja i koja se zatim fermentiše u pivo. Ječam daje pivu sastojke od kojih zavisi punoća ukusa. Hmelj daje pivu gorak i aromatičan ukus i bitno utiče na kvalitet i stabilizaciju piva.

Pitanju kinetike i efikasnosti ekstrakcije aktivnih supstanci iz ječma i hmelja nije poklonjena naročita pažnja, mada su kinetički parametri dragoceni za izbor optimalnih uslova ekstrakcije.

Ekstrakcija čvrsto-tečno se uglavnom koristi za dobijanje rastvora željene supstance iz čvrstog materijala u određenom rastvaraču. Za ekstrakciju aktivnih komponenti iz biljnog materijala najčešće se koristi smeša etanol-voda kao estragens, jer etanol u malim količinama ne deluje štetno na ljudski organizam. Smeša etanol-voda je polaran ekstragens, te se iz biljnog materijala mogu ekstrahovati polarne komponente u koje spadaju fenoli, flavonoidi idr.

Čvrsto-tečnu ekstrakciju definišu opšti zakoni prenosa mase, zatim fizičko-hemijska sličnost rastvarača i aktivnih supstanci, kao i osobine polaznog materijala. U opštem slučaju proces prenosa mase predstavlja prenos materije u smeru uspostavljanja ravnoteže. Proces difuzije je odgovoran proces prenosa mase, tj. molekulska difuzija se ostvaruje usled koncentracionog gradijenta rastvorenih materija u fazama koje su u kontaktu. Uticaj pojedinih faktora na proces difuzije matematički je definisan Fikovim zakonima difuzije. Ekstrakcija čvrsto-tečno, uprošćeno gledano, odigrava se u dve faze: prva, rastvaranje ekstrahovanih supstanci koje se nalaze na površini čvrstih čestica (tzv. ispiranje ili brza ekstrakcija) i druga, difuzija ekstrahovanih supstanci iz unutrašnjosti prema spoljašnjoj površini čestice i njihov prenos u glavninu rastvora (tzv. spora ekstrakcija). Matematički opis i analiza procesa ekstrakcije čvrsto-tečno značajno se pojednostavljuje primenom uprošćenih fizičkih modela, od kojih se najčešće koriste modeli zasnovani na teoriji filma i teoriji nestacionarne difuzije u biljnom materijalu. Upotrebljava se takođe i jednačina Ponomarjeva, koja predstavlja matematički opis promene količine ekstrahovane supstance u biljnom materijalu u periodu spore ekstrakcije, a dobija se uprošćavanjem modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal.

U okviru ove doktorske disertacije biće ispitana:

- Ekstrakcija i efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja ječma postupkom maceracije pri različitim operativnim uslovima (koncentracije vodenog rastvora etanola,

hidromodula, koncentracije kiseline, vremena i temperature ekstrakcije). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima biće određen spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom.

- Ekstrakcija i efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja i antioksidativnih komponenti hmelja postupkom maceracije pri različitim operativnim uslovima (koncentracije vodenog rastvora etanola, hidromodula, koncentracije kiseline, vremena i temperature ekstrakcije). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima biće određen spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativna aktivnost DPPH metodom.
- Ekstrakcija i efikasnost ekstrakcije fenolnih kiselina i flavonola hmelja postupkom maceracije pri različitim operativnim uslovima (koncentracije vodenog rastvora etanola, hidromodula, koncentracije kiseline, vremena i temperature ekstrakcije). Sadržaj fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima biće određen HPLC-DAD metodom.
- Mogućnost modelovanja kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma, kao i fenolnih jedinjenja, antioksidativnih komponenti, fenolnih kiselina i flavonola iz hmelja korišćenjem dva modela: modela zasnovanog na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal i empirijskog modela Ponomarjeva. Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije biće određeni koeficijenti brze (b) i spore (k) ekstrakcije, a potom i termodinamički parametri.
- Ekstrakcija i efikasnost ekstrakcije metalnih jona ječma i hmelja postupkom maceracije pri različitim operativnim uslovima (koncentracije vodenog rastvora etanola, hidromodula, koncentracije kiseline, vremena i temperature ekstrakcije). Sadržaj metalnih jona u ekstraktima biće određen ICP-OES metodom.

U okviru ove doktorske disertacije biće određen i:

- Sadržaj metalnih jona, ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS i FRAP metodama) u etanolno-vodenim ekstraktima većeg broja uzoraka ječma, primenom spektrofotometrije i ICP-OES metode.
- Sadržaj metalnih jona, ukupnih fenola, flavonoida, fenolnih kiselina, flavonola i antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS i FRAP metodama) u etanolno-vodenim

ekstraktima većeg broja uzoraka hmelja, primenom spektrofotometrije, HPLC-DAD i ICP-OES metode.

- Sadržaj metalnih jona, ukupnih fenola, flavonoida, antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS i FRAP metodama) i fenolni profil većeg broja komercijalnih piva, primenom spektrofotometrije, HPLC-DAD i ICP-OES metode.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je metoda odvajanja i koncentrovanja koja se zasniva na raspodeli supstanci između dveju faza koje se međusobno ne mešaju. Ekstrakcija je vrlo efikasna, brza i popularna tehnika razdvajanja supstanci.

Moguće metode ekstrakcije su:

- Ekstrakcija rastvaračem;
- Ekstrakcija tečno-tečno;
- Ekstrakcija čvrsto-tečno;
- Superkritična ekstrakcija;
- Ekstrakcija mikrotalasima;
- Soxlet ekstrakcija i
- Ekstrakcija ultrazvukom.

U ovom radu je vršena ekstrakcija čvrsto-tečno.

2.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno

Ekstrakcija čvrsto-tečno je operacija prenosa mase kojom se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog rastvarača (*Coulson i sar., 1991*). Jedan deo čvrstog materijala, koji po pravilu sadrži željenu supstancu, rastvara se u rastvaraču, a zatim se rastvor odvađa od iscrpljenog, nerastvornog dela čvrstog materijala. Čvrst materijal je najčešće biljna ili mineralna sirovina, dok se voda, organski rastvarači i rastvori kiselina, baza ili soli koriste kao rastvarač. Deo čvrstog materijala koji se rastvara predstavlja ekstraktivne supstance, dok se dobijeni rastvor naziva ekstrakt.

Ekstrakcija čvrsto-tečno se najčešće izvodi kao maceracija ili perkolacija. Maceracija se izvodi u suspenziji, kao šaržna operacija, tako što se čvrst materijal potapa u rastvarač, a perkolacija polušaržno, tako što kroz nepokretan sloj čvrstog materijala kontinualno protiče rastvarač.

Ekstrakcija različitim vrstama rastvarača je najčešće upotrebljavana tehnika pripreme ekstrakta iz biljnog materijala zbog njene efikasnosti i široke primenljivosti. Udeo ekstrahovanih fenolnih jedinjenja zavisi od polarnosti upotrebljenog ekstragensa, vremena i temperature ekstrakcije, kao i od fizičko-hemijskih osobina ekstrahovanog uzorka. Rastvorljivost fenolnih jedinjenja zavisi od hemijske strukture jedinjenja koja se ekstrahuju iz biljnog materijala, kao i od polarnosti rastvarača (*Bimkr i sar., 2011*). U zavisnosti od upotrebljenog rastvarača, tokom postupka ekstrakcije iz biljnog materijala će se uz fenolna

jedinjenja ekstrahovati i druga jedinjenja kao npr. šećeri, organske kiseline, masti, proteini, pigmenti i sl., koje je ponekad potrebno ukloniti iz ekstrakta.

Pošto metoda ekstrakcije ima veliki uticaj na određivanja fenolnih jedinjenja, različite komparativne studije su sprovedene od strane brojnih autora koji su koristili različita ekstrakciona sredstva i metode za ekstrakciju u cilju određivanja fenolnih jedinjenja iz različitih matriksa. Različiti rastvarači imaju različitu efikasnost za različite matrikse. Stoga, ako se ispituje jedna vrsta uzorka treba uzeti najbolji rastvarač za njega, a ako se ispituju različiti uzorci bolje je uzeti „univerzalniji” rastvarač. Interference matriksa igraju značajnu ulogu u mogućnosti ekstrakcije, prečišćavanja i kasnije određivanja.

Rastvarači kao što su metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihovi vodeni rastvori su najefikasniji za izolovanje fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. Organski rastvarači koji se koriste za ekstrakciju iz biljaka, osim što ne bi trebalo da imaju tačku ključanja veću od 80°C, bilo bi poželjno da zadovolje i sledeće karakteristike:

- polarnost;
- niska tačka ključanja (zbog lakšeg uklanjanja rastvarača iz ekstrakta);
- da hemijski ne reaguju sa ekstrahovanim supstancama, niti da ih razgrađuju;
- viskoznost mora biti niska;
- da su stabilni na toplotu, kiseonik i svetlost i
- sigurni za upotrebu (po mogućstvu nezapaljivi i netoksični).

Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od stepena hidrofилности supstanci. Prema stepenu hidrofилности, supstance koje se ekstrahuju iz biljne sirovine mogu se podeliti na:

- rastvorne u polarnim rastvaračima (hidrofilne supstance);
- rastvorne u slabo polarnim rastvaračima i
- rastvorne u nepolarnim rastvaračima (hidrofobne supstance).

Koristi se poznato pravilo: slično se rastvara u sličnom. Polarne supstance, sa visokim vrednostima dielektrične konstante, dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obratno.

Viskoznost i površinski napon su takođe veoma važne fizičke osobine rastvarača. Uvećanje viskoznosti proporcionalno smanjuje koeficijent difuzije. Takođe, smanjenje površinskog napona povoljno se odražava na brzinu ekstrakcije.

Prisustvo i udeo vode u organskom rastvaraču ima važnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala.

Na ekstrakcionu kapacitet izdvajanja fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, osim izbora i polarnosti rastvarača, značajan uticaj ima temperatura i vreme trajanja ekstrakcije, koji utiču na rastvorljivost i razlaganje analita (*Duran i sar., 2007*). Porastom temperature ekstrakcije dolazi do povećane rastvorljivosti i većeg prinosa mase. Koeficijent difuzije i temperatura povezani su međusobno jednačinom (*Ponomarev, 1976*):

$$D_1 / D_2 = T_1 \eta_2 / T_2 \eta_1 \quad (1)$$

gde su: D_1 i D_2 – koeficijenti difuzije na različitim temperaturama T_1 i T_2 , a η_1 i η_2 – viskoznost tečnosti na temperaturama T_1 i T_2 .

Zagrevanje rastvarača do ključanja ubrzava difuziju ne samo zbog povećanja temperature, već i zbog poboljšanja hidrodinamičkih uslova.

Međutim, mnoga fenolna jedinjenja vrlo lako podležu hidrolizi i oksidaciji. Predugo vreme ekstrakcije i visoka temperatura povećavaju mogućnost oksidacije fenolnih jedinjenja što dovodi do smanjenja udela fenolnih jedinjenja u ekstraktu.

Prilikom izbora tehnike i uslova ekstrakcije posebnu pažnju treba obratiti i na veličinu čestica. Ekstrakti dobijeni iz biljne sirovine različitog stepena usitnjenosti nisu jednaki po sastavu. Tehnike usitnjavanja biljne sirovine su: lomljenje, rezanje, struganje, istiranje i udar. Kvalitet usitnjavanja sirovine određuju tri karakteristike: veličina čestica, površina čestica i broj razorenih ćelija. Ekstrakcija iz biljnih sirovina kod kojih je ćelijska struktura više razorena biće brža, kao posledica ubrzavanja ispiranja supstanci iz razorenih ćelija. Kod sirovina usitnjenih rezanjem i struganjem, ekstrakcija je sporija, što je posledica preovladavanja procesa unutrašnje difuzije nad procesima ispiranja i spoljne difuzije.

Nezavisno od primenjene tehnike, postupak ekstrakcije čvrsto-tečno uključuje: rastvaranje supstanci u rastvaraču, odvajanje ekstrakta od nerastvornog ostatka čvrstog materijala i ispiranje čvrstog ostatka rastvaračem. Po završenoj ekstrakciji, ekstrakt se odvaja od iscrpljenog materijala ceđenjem ili presovanjem.

Pri procesu čvrsto-tečne ekstrakcije iz biljnog materijala principijelno se razlikuju dva slučaja: ekstrakcija iz sveže ili nabubrele sirovine, i ekstrakcija iz osušene biljne sirovine.

Proces ekstrakcije iz sveže ili nabubrele biljne sirovine se odvija u tri faze:

- ispiranje ekstraktivnih supstanci iz razorenih ćelija;
- prenos ekstraktivnih supstanci kroz porozne zidove ćelija i
- prenos supstanci sa površine biljne sirovine u rastvarač za ekstrakciju.

Proces ekstrakcije iz osušene biljne sirovine se sastoji iz više faza:

- prodiranje rastvarača u biljnu sirovinu;
- kvašenje supstanci koje se nalaze unutar ćelija;
- rastvaranje ekstraktivnih supstanci sa ćelijskih zidova;
- difuzija ekstraktivnih supstanci kroz pore ćelijskih zidova i
- prenos ekstraktivnih supstanci sa površine biljne sirovine u rastvor.

Proces prodiranja rastvarača u biljni materijal odvija se pod uticajem kapilarnih sila. Biljni materijal ima ogroman broj pora kapilarnog tipa, zbog čega rastvarač prodire u tkiva po kapilarama i popunjava ćelije i druge šupljine. Vreme popunjavanja kapilara i ćelija rastvaračem može biti veoma veliko, zbog vazduha koji se nalazi u njima, i ono će biti određeno brzinom difuzije vazduha kroz rastvarač.

Istovremeno sa prodiranjem rastvarača u biljni materijal protiče i proces kvašenja supstanci unutar ćelija. Kvašenje materijala rastvaračem zavisi od hemijske srodnosti materijala i ekstragensa. Pri tome, površinski aktivne supstance poboljšavaju proces kvašenja i prodiranja rastvarača u biljni materijal.

Brzina rastvaranja supstanci koje se nalaze na ćelijskim zidovima definiše se prvim Fikovim zakonom, i u osnovi zavisi od koeficijenta prenosa mase. Unutar rastvorenog materijala rastvarač praktično ne struji, tako da je debljina difuzionog sloja ista kao i veličina čestica biljnog materijala. Brzina rastvaranja supstanci unutar čestica je određena brzinom prenosa mase kroz šupljine biljnog materijala:

$$dm / d\tau = kS (c_s - c_e) \quad (2)$$

$$k = D / x \quad (3)$$

gde je: m – masa rastvorenih supstanci u vremenu τ ; S – površina čestica; c_s - koncentracija zasićenja; c_e - koncentracija u rastvoru; k – koeficijent; D – koeficijent difuzije i x – debljina difuzionog sloja.

Prenos mase unutar biljne sirovine uključuje difuziju ekstraktivnih supstanci kroz ćelijski rastvor i kroz ćelijske zidove.

Brzina difuzije u ćelijskom rastvoru zavisi od broja i veličine ćelija, a brzina prenosa mase kroz ćelijske zidove od više faktora: debljine i broja slojeva, broja i veličine pora u ćelijskom omotaču i broja omotača.

Prenos ekstraktivnih supstanci sa površine biljnog materijala u rastvor je poslednji stadijum ekstrakcije. Predloženo je nekoliko mehanizama ovog procesa. Najjednostavnija

teorija filma predstavlja da se difuzija supstanci vrši kroz nepokretan film rastvarača oko čvrstih čestica.

2.1.2. Kinetika čvrsto-tečne ekstrakcije

Čvrsto-tečnu ekstrakciju definišu opšti zakoni prenosa mase, zatim fizičko-hemijska sličnost rastvarača i ekstrahovanih supstanci, kao i osobine polaznog materijala (*Lepojević, 2000*). U opštem slučaju proces prenosa mase predstavlja prenos materije u smeru uspostavljanja ravnoteže (*Pekić, 1980*). Proces difuzije je odgovoran za proces prenosa mase, tj. molekulska difuzija se ostvaruje usled koncentracionog gradijenta rastvorenih materija u fazama koje su u kontaktu, kao i usled haotičnog kretanja molekula materije određene kinetičke energije (*Tolić, 1996*). Porastom temperature raste i kinetička energija molekula, te će i brzina kretanja biti veća, a samim tim kao rezultat se javlja pozitivan uticaj na brzinu difuzije. Kako sistem ima težnju da uspostavi termodinamičku ravnotežu, molekuli materije koja difunduje kretaće se haotično sa mesta veće na mesto manje koncentracije.

Na brzinu difuzije takođe utiče molekulska masa jedinjenja koje difunduje, debljina sloja kroz koji difunduje, kao i veličina dodirne površine faza. Ukoliko je površina kontakta veća, a debljina sloja manja, difuzija je brža (*Nađanin, 2013*).

Pri ekstrakciji supstanci iz biljnog materijala, prisutni su sledeći koeficijenti prenosa mase: koeficijent unutrašnje difuzije (D_u), koeficijent slobodne difuzije (D_s) i koeficijent turbulentne difuzije (β). Koeficijent unutrašnje difuzije karakteriše brzinu prenosa mase unutar čestica biljnog materijala. Koeficijent slobodne difuzije karakteriše brzinu prenosa mase u ćelijskom soku i difuzionom sloju. Koeficijent turbulentne difuzije, odnosno koeficijent konvektivne difuzije karakteriše brzinu prenosa mase u pokretnom sloju ekstragensa. Na tok ekstrakcije utiču sva tri koeficijenta, dok je sumarni koeficijent prenosa mase (K) izražen jednačinom:

$$K = 1 / (1/\beta + l/D_u + s/D_s) \quad (4)$$

gde je: l – prečnik čestice; s – debljina graničnog sloja.

Koeficijent slobodne difuzije (D_s) (molekulske) zavisi od temperature i određuje se jednačinom:

$$D_s = kT / 6\pi\eta R \quad (5)$$

gde je: k – Boltzmanova konstanta; T – apsolutna temperatura; R – radijus difundirajućih čestica i η – viskoznost tečne sredine.

Koeficijent unutrašnje difuzije (D_u) je značajno manji od koeficijenta slobodne difuzije, zbog smanjenja površine prenosa materije. Sa druge strane, koeficijent konvektivne difuzije (β), veći je od koeficijenta slobodne difuzije. Sa povećanjem konvektivnosti veličina β raste i postaje maksimalna pri turbulentnom strujanju.

Operacija čvrsto-tečne ekstrakcije ima dva perioda, brzu i sporu ekstrakciju. Neposredno pre ekstrakcije vrši se usitnjavanje osušenog biljnog materijala. Pri ekstrakciji usitnjenog biljnog materijala dolazi do kvašenja, rastvaranja i brzog prenosa mase iz razorenih ćelija (brza ekstrakcija) i period spore difuzije rastvorenih supstanci iz nerazorenih ćelija. Prva faza ekstrakcije teče nekoliko puta brže od druge i zavisi od hidrodinamičkih uslova, kao i od stepena usitnjenosti biljnog materijala. Druga faza ekstrakcije zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala (koeficijent unutrašnje difuzije D_u). U ovoj fazi ekstrakcije počinje separacija ekstraktivnih supstanci iz unutrašnjosti čestica biljnog materijala. Rastvorak iz nerazorenih biljnih ćelija na površini i u unutrašnjosti čestica biljnog materijala sporo difunduje kroz rastvarač u porama čestica.

Ovaj proces unutrašnje difuzije, ili spore ekstrakcije, odvija se u tri glavne faze:

- rastvaranje ekstraktivnih supstanci u rastvaraču koji je adsorbovan biljnim materijalom;
- difuzija ekstraktivnih supstanci kroz rastvarač koji se nalazi u porama čestica biljnog materijala prema spoljašnjoj površini i
- difuzija ekstraktivnih supstanci od spoljašnje površine čestica biljnog materijala u glavninu rastvora.

Bilo koja od faza ekstrakcije može limitirati brzinu ukupnog procesa. Obično je rastvaranje ekstraktivnih supstanci u rastvaraču brz proces koji ne utiče na brzinu celokupnog procesa, dok je po pravilu, difuzija ekstraktivnih supstanci kroz unutrašnjost čestica biljne sirovine najsporija faza. Kada difuzija ekstraktivnih supstanci kroz čestice kontroliše brzinu ekstrakcije, biljnu sirovinu treba usitniti da bi se povećao stepen razaranja biljnih ćelija i skratio put ekstraktivnih supstanci kroz čestice. Ako je difuzija ekstraktivnih supstanci sa površine čestica prema glavninu rastvora limitirajući faktor, onda je potrebno obezbediti dovoljno intenzivno mešanje suspenzije.

2.1.3. Matematički modeli procesa ekstrakcije

Matematički opis procesa ekstrakcije čvrsto-tečno je veoma složen zbog složenosti samog procesa prenosa mase iz unutrašnjosti čestica do glavnine rastvora. Matematički opis i

analiza ekstrakcije čvrsto-tečno se značajno pojednostavljuje primenom uprošćenih fizičkih modela, od kojih su u ovom radu korišćeni:

- model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal i
- empirijska jednačina Ponomarjeva, koja predstavlja matematički opis promene količine ekstraktivnih supstanci u biljnoj sirovini u periodu spore ekstrakcije, a dobija se uprošćavanjem modela nestacionarne difuzije kroz biljni materijal.

Primena matematičkih modela omogućuje kvantitativno opisivanje ekstrakcije i eksploataciju dobijenih rezultata. Koriste se u planiranju i prenosu postupaka sa laboratorijskog na industrijski nivo. Model ne sme da bude samo matematički instrument, već treba da reflektuje fizičku sliku koja proizilazi iz ispitivane materije i eksperimentalnih ispitivanja. Matematički modeli koji se ne podudaraju sa materijalom i postupkom imaju ograničenu vrednost, iako mogu biti iskorišćeni za slaganje nekih eksperimentalnih podataka (Milenović, 2001).

Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije grafičkim i analitičkim postupcima se potom određuju koeficijenti brze (b) i spore (k) ekstrakcije.

2.1.3.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal

Proces prenosa mase kroz čvrst materijal pri ekstrakciji čvrsto-tečno odigrava se difuzijom. Iako mehanizam difuzije nije jednostavan kao u slučaju gasova i tečnosti, obično se brzina prenosa mase ekstraktivnih supstanci (rastvorak) kroz čvrst materijal, natopljen rastvaračem može opisati Fikovim zakonima. Uslovi difuzije pri ekstrakciji čvrsto-tečno su po pravilu nestacionarni, tako da se brzina promene koncentracije ekstrahovanih supstanci pod uslovom da se ne odigrava hemijska reakcija, opisuje jednačinom drugog Fikovog zakona. Kada se prenos mase odigrava u jednom pravcu, diferencijalni oblik ove jednačine je:

$$dc / dt = D (d^2c / dx^2) \quad (6)$$

gde je: c – koncentracija ekstraktivnih supstanci; t – vreme; x – dužina u pravcu prenosa mase i D – koeficijent difuzije ekstraktivnih supstanci.

Analitičko rešavanje jednačine zahteva složen matematički aparat, pa se ona može koristiti za rešavanje problema nestacionarne difuzije pri ekstrakciji čvrsto-tečno samo u slučaju prostijih geometrijskih oblika čvrstih čestica (ravna ploča, cilindar i sfera), integraljenjem uz primenu odgovarajućih početnih i graničnih uslova.

U cilju analitičkog rešavanja jednačine uvode se sledeće pretpostavke:

- čestice biljnog materijala su izotropne i jednake po veličini;
- mešanje suspenzije je intenzivno;
- difuzija se odigrava samo u jednom pravcu;
- koeficijent difuzije ekstraktivnih supstanci kroz česticu je konstantan;
- na početku (za $t=0$), koncentracija ekstraktivnih supstanci je ravnomerna i iznosi c_0 ;
- koncentracija ekstraktivnih supstanci na spoljašnjoj površini čestice je stalna i iznosi c_∞ ;
- srednja koncentracija ekstraktivnih supstanci u čestici (c) menja se sa vremenom, saglasno promeni prostorne raspodele koncentracije ekstraktivnih supstanci i
- u svakom trenutku u osi čestice je $(\partial c / \partial x)_{x=0} = 0$.

Intenzivno mešanje isključuje uticaje prenosa mase od spoljašnje površine čestica prema rastvoru. Pretpostavka da je koncentracija ekstraktivnih supstanci stalna, znači da ne postoji otpor difuziji ekstraktivnih supstanci u tečnosti oko čestice, da je zapremina rastvora u suspenziji jako velika, tako da se koncentracija rastvora ne menja sa vremenom, ili da se rastvor kontinualno obnavlja svežim rastvaračem. U većini slučajeva, otpor difuziji unutar čestice je dovoljno veliki, tako da važi pretpostavka o zanemarljivom otporu difuziji u rastvoru (*Treybal, 1985*).

Kada se biljna sirovina potopi u rastvarač, ekstraktivne supstance će difundovati kroz čestice prema spoljašnjoj površini. Neka je koncentracija ekstraktivnih supstanci c_∞ na spoljašnjoj površini čestica nepromenljiva sa vremenom. Ako ekstrakcija traje beskonačno dugo, onda će koncentracija ekstraktivnih supstanci da padne na vrednost c_∞ , pa će razlika ($c_0 - c_\infty$) biti mera mase ekstraktivne supstance koja je ekstrahovana. Ako se ekstrakcija zaustavi u nekom trenutku t , tada je srednja koncentracija ekstraktivnih supstanci u čestici (c), onda će razlika ($c - c_\infty$) biti mera mase ekstraktivnih supstanci koja je zaostala u čestici do posmatranog trenutka. Odnos mase ekstraktivnih supstanci koja je zaostala u čestici i mase ekstraktivnih supstanci koje će se ekstrahovati posle beskonačnog vremena, zavisice od bezdimenzionog kriterijuma Dt / h^2 (*Ponomarev, 1976*):

$$(c - c_\infty) / (c_0 - c_\infty) = f(Dt / h^2) \quad (7)$$

gde je: h – poludebljina ravne ploče, odnosno poluprečnik cilindra ili sfere.

Za neke geometrijske oblike čestica, funkcija $f(Dt / h^2)$ se može naći u literaturi.

U slučaju drugih jednostavnih geometrijskih oblika dolazi se do jednačine opšteg oblika:

$$(c - c_{\infty}) / (c_0 - c_{\infty}) = A \cdot e^{-B(Dt/h^2)} \quad (8)$$

gde su: A i B konstante čije vrednosti zavise od oblika čestica.

Ako se pretpostavi da je $c_{\infty}=0$, onda se poslednja jednačina može uprostiti:

$$c / c_0 = A \cdot e^{-B(Dt/h^2)} \quad (9)$$

Promena sadržaja ekstraktivnih supstanci u biljnom materijalu je najčešće opisana transformisanim oblikom jednačine. Ako se koncentracije c_0 i c zamene odgovarajućim masama ekstraktivnih supstanci u biljnoj sirovini na početku (q_0) i posle odgovarajućeg vremena ekstrakcije (q_i) dobija se:

$$q_i / q_0 = A \cdot e^{-B(Dt/h^2)} \quad (10)$$

Za izračunavanje parametara jednačine koristi se njen linearni oblik:

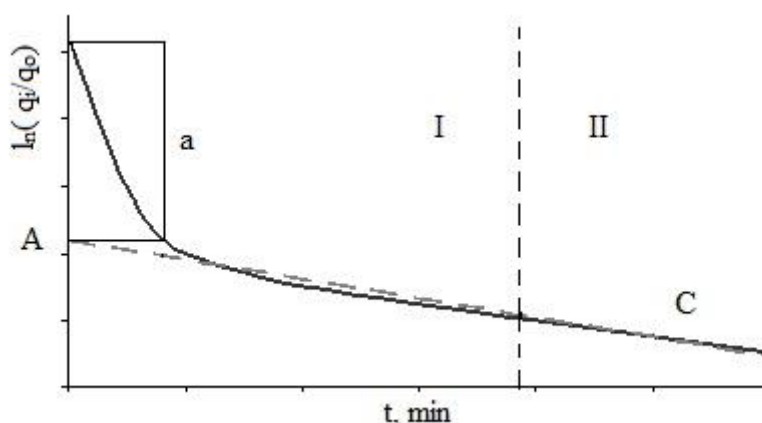
$$\ln(q_i / q_0) = \ln A - (BD / h^2) \cdot t \quad (11)$$

odnosno:

$$\ln(q_i / q_0) = \ln(1 - b) - k \cdot t \quad (12)$$

gde je: $b = (1 - A)$ – koeficijent ispiranja; $k = (BD / h^2)$ – koeficijent spore ekstrakcije.

Kinetički parametri ove jednačine mogu se izračunati grafoanalitički (*Ponomarev, 1976*), ili analitički. Grafoanalitički način je ilustrovan na Slici 2.1. Na grafikonu su naznačena dva perioda ekstrakcije: ispiranje (I) i spora ekstrakcija (II).



Slika 2.1. Dijagram zavisnosti $\ln(q_i/q_0)$ od vremena.

U periodu spore ekstrakcije zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena je linearna. Koeficijent ispiranja se izračunava iz odsečka pravolinijskog dela zavisnosti na ordinati za $t=0$, dok se koeficijent spore ekstrakcije izračunava iz nagiba zavisnosti.

2.1.3.2. Empirijski model Ponomarjeva

Ovaj model predpostavlja da u periodu spore ekstrakcije postoji linearna zavisnost između $(q_0 - q_i) / q_0$ i vremena, tako da je:

$$(q_0 - q_i) / q_0 = b + k \cdot t \quad (13)$$

gde je: b – koeficijent ispiranja; k – koeficijent pravca linearne zavisnosti.

Koeficijent ispiranja je mera mase ekstraktivnih supstanci koja se rastvori pošto se biljni materijal potopi u rastvarač, tj.:

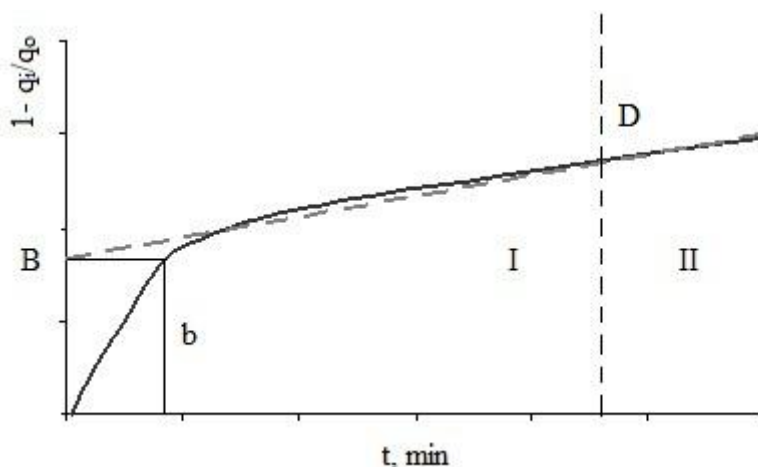
$$b = ((q_0 - q_i) / q_0)_{t=0} \quad (14)$$

Parametar k je, u stvari, brzina rastvaranja ekstraktivnih supstanci u odnosu na njihovu početnu masu u periodu spore ekstrakcije, pa se može smatrati specifičnom brzinom spore ekstrakcije, tj.:

$$k = (1/q_0 \cdot (q_0 - q_i) / q_0)_{II} \quad (15)$$

gde II označava da se radi o periodu spore ekstrakcije.

Izračunavanje parametara b i k grafoanalitičkim postupkom je prikazano na Slici 2.2.



Slika 2.2. Dijagram zavisnosti $1 - q_i / q_0$ od vremena.

2.2. PIVO I SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA

Pivo je penušavo osvežavajuće piće sa karakterističnom aromom i sa prijatnim gorkim ukusom. Pivo sadrži mali sadržaj etanola i zasićeno je ugljen-dioksidom. Pošto predstavlja dobar emulgator hrane, pivo doprinosi kod postizanja pravilnije razmene materija i povećanja iskorišćenja pojedinih sastojaka hrane u organizmu. Pored toga, ekstrakt piva organizam veoma lako i potpuno asimiluje. U pivu postoje i izvesne količine vitamina, kao na primer vitamina B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), H (biotin), B₆ (piridoksin), a znatno više vitamina PP (niacin). Pivo poboljšava apetit. Zbog svoje hranljive vrednosti i prijatnog karakterističnog ukusa, pivo je kao napitak veoma rasprostranjeno u svetu (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-piva>).

2.2.1. Istorijat proizvodnje piva

Na osnovu podataka pisanih klinastim pismom na kamenu i glini, arheolozi su utvrdili da su Vavilonci proizvodili pivo još 7.000 godina pre naše ere. Iz Vavilona se proizvodnja piva iz žitarica prenela u drevni Egipat, Persiju, Grčku i druge zemlje. Egipćani su već 2.000 godine pre naše ere znali da prave pivo iz ječma. Poznate pivare su bile u Peluziji na ušću Nila.

Grci, koji su primili civilizaciju od Egipćana, naučili su od njih da proizvode opojni napitak od ječma (ječmeno vino), koje su nazivali ziton. Rimljani su takođe od davnina upotrebljavali napitak, dobijen od ječma, pšenice i drugih trava, koji su nazivali ječmeno vino. U prvom veku pre naše ere u Aleksandriji je dobijano ječmeno pivo sa dodatkom aromatičnih materija, tzv. citos. Pivo su ljudi pili u Iberiji (drevnoj Španiji) i Frakiji, u Iliriji i Panoniji. U prvom veku pre naše ere veština proizvodnje piva preneti je iz Španije u Galiju (današnju Francusku), gde je ona brzo rasprostranjena u narodu. Čim su drevni Germani počeli da obrađuju zemlju, oni su počeli da vare pivo iz pšeničnog zrna. U drevnim letopisima Gala, Bretonaca i Skandinavaca takođe ima podataka o pivu.

Proizvodnja hmeljnog napitka, preteče savremenog piva, pojavila se u Sibiru i u jugoistočnim delovima Rusije, odakle hmelj vodi poreklo. Primena hmelja predstavlja važno otkriće, pošto ona predstavlja osnovu savremene tehnologije piva.

U početku se pivo proizvodilo samo za kućnu upotrebu ali sa razvitkom trgovine pivo postaje predmet razmene. Na ovaj način počinje razvoj pivarstva kao samostalnog zanimanja. Bez obzira na to što se pivo proizvodilo u velikim količinama, uspeh proizvodnje zavisio je

od slučaja ili od veštine majstora i njegovog višegodišnjeg iskustva. Uloga mikroorganizama kod transformacija organskih materija postala je poznata tek u XIX veku. U prvoj polovini XIX veka u tehnologiji pivarstva dolazi do korenitih promena.

Osnovne sirovine za proizvodnju piva su pivarski slad, pivarski kvasac, hmelj i voda. Od pivarskog ječma se najpre dobija slad, od koga se pravi sladovina, koja se zatim fermentiše u pivo. Proizvodnja piva je složen i dugotrajan proces koji se deli na tehnologiju slada i tehnologiju piva.

2.2.2. Ječam

Ječam je osnovna sirovina za dobijanje piva (slada). U pivarstvu se upotrebljavaju samo specijalne sorte ječma, tzv. pivarski ječam.

Anatomska građa zrna ječma je jedan od razloga što je ječam u pivarstvu uvek imao prednost pred ostalim zrnastim kulturama. Pošto je zrno ječma obuveno, kod filtracije komine od drobljenog ječmenog slada dobija se porozan sloj tropa, čime se olakšava odvajanje sladovine od tropa. Istina, upotrebom savremenih tehničkih sredstava lako se može prerađivati i pšenica, čije zrno nema plevice. Ipak, samo pivo od ječma predstavlja pravo pivo (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Ječam (*Hordeum vulgare* L.)

Ječam je najstarija kultivisana žitarica i nezaobilazni deo ishrane naroda istočne Evrope, Bliskog i Dalekog istoka. Potiče iz Etiopije i jugoistočne Azije, gde se uzgajao još pre deset milenijuma. U antičkoj Grčkoj bio je osnovni sastojak u pripremi hleba i važna namirnica u ishrani vojnika i tadašnjih sportista. Izuzetno je cenjen i u starom Rimu, a snažne

gladijatore su zvali "hordeari", što je značilo "oni koji jedu ječam". Drevni Kinezi su ga smatrali simbolom muške zrelosti.

Danas se najviše koristi kao sirovina u proizvodnji piva, mada se od slada dobija i brašno visoke hranljive vrednosti, bogato vitaminom B12, koji je redak u namirnicama biljnog porekla. Posедуje i zavidnu količinu vitamina E, kao i enzime koji podstiču lučenje želudačnih sokova, zbog čega se preporučuje i rekonvalescentima, deci i starijima.

2.2.3. Hmelj

Hmelj daje pivu gorak i aromatičan ukus i bitno utiče na kvalitet i stabilizaciju piva (Slika 2.4.). Specifični sastojci hmelja značajni za pivarstvo su: ukupne smole (meke i tvrde), hmeljna ulja i taninske materije (polifenoli). Prisustvo tvrdih smola je nepoželjno.

Šišarice hmelja su jajaste, lake, rastresite cvasti, dugačke 3-4 cm, široke oko 2 cm, nešto pljosnate, toplog i gorkog ukusa, prijatnog aromatičnog mirisa. Šišarice se lepe za prste. Oko krivudave osovine, dugačke oko 2 m, poređani su plodni listići u cik cak. Na njihovoj bazi golim okom se mogu videti oble, sjajne, prozirne, žute žlezde koje se lako mogu istresti (lupulin). Plodni listići (brakteje) su vrlo tanki, hartijasti, jajasti, žuto-zelenkasti ili žuti, oko 10 mm dugački i oko 7 mm široki, mrežasto išarani sitnim nervima i lako se mogu odvojiti. Upotrebljava se samo gajen hmelj. Hmelj potiče iz istočne Evrope. Kod nas raste uz grmlje po vlažnim mestima kao divlja povijuša.

Gaji se kod nas i u drugim zemljama za potrebe pivara. Upotreba hmelja u pivarstvu je novijeg datuma, a u medicini tek od početka XIX veka. Smola lupulina konzervira pivo sprečavajući razvoj mlečno-kiselih bakterija, etarsko ulje mu daje prijatan miris, gorke materije gorčinu, a tanin ga bistri taložeći belančevine ječmenog slada. Hmelj se bere u septembru po lepom i suvom vremenu i brzo suši na tavanu ili u zagrejanim sušarama. Dobro osušeni hmelj ima lepu zelenu boju. Pre pakovanja se sumporiše radi konzervisanja.



Slika 2.4. Hmelj (*Humulus lupulus* L.)

2.2.4. Kvasci

Kvasci razlažu šećere iz slada u etanol i ugljen-dioksid. Kvasci koji se upotrebljavaju u pivarstvu dele se na vrste koje se međusobno razlikuju po karakteru rasta na hranljivim podlogama (kolonijama), veličini i obliku ćelija, stepenu fermentacije šećera, itd. Pivski kvasac je kultivisani rod *Saccharomices* (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Kvasci

Kvasac koji se na kraju vrenja taloži na dno fermentacione posude naziva se kvasac donjeg vrenja. Kvasac koji se na kraju vrenja nalazi na površini piva je kvasac gornjeg vrenja.

Izbor vrste kvasca ima veliki značaj, pošto od osobina kvasca zavise brzina fermentacije, stepen fermentisanosti i izbistravanje piva, a takođe i ukus i aroma piva. U pivarstvu se cene oni kvasci kod kojih je fermentacija brza, a stepen fermentacije veliki, i koji obezbeđuju dobro izbistravanje, blag i čist ukus, i prijatnu aromu piva. Sve ove osobine nema, međutim, ni jedna određena vrsta tako, da se u proizvodnji primenjuju mešane vrste, ili se fermentacija vodi upotrebom raznih rasa, i zatim se vrši mešanje mladog piva u ležnim tankovima.

2.2.5. Voda

Voda je jedna od osnovnih sirovina za proizvodnju piva. Sastav vode koja se upotrebljava za proizvodnju sladovine utiče na kvalitet piva.

U prirodnoj vodi uvek postoji manja ili veća količina raznih rastvorenih soli. Soli iz vode predstavljaju tek neznatan deo ekstrakta piva (0,3-0,5 g/l) ali one izrazito utiču na ukus piva. Mineralne materije vode ne utiču toliko neposredno na ukus piva, koliko posredno, svojim uticajem na enzimske i koloidno-hemijske reakcije, do kojih dolazi u toku procesa proizvodnje piva. Kvalitet pivarske vode je jedan od najvažnijih faktora dobrog kvaliteta piva.

Pošto utiču na promene kiselosti komine i sladovine, soli vode utiču na enzimsku hidrolizu skroba, fermentaciju i druge biohemiske transformacije kod proizvodnje piva, i samim tim, i na prinos i kvalitet gotovog piva.

2.2.6. Proizvodnja piva

Proizvodnja piva sastoji se od dve osnovne faze: od pripremanje sladovine i vrenje.

Ekstrakcijom vrednih sastojaka slada i hmelja dobija se sladovina. Cilj proizvodnje sladovine je da se nerastvorne materije u sladu prevedu u rastvorni oblik delovanjem enzima. Pripremanje sladovine obuhvata niz operacija: mlevenje slada; komljenje; kuvanje komine; ceđenje sladovine; ohmeljavanje sladovine; ceđenje ohmeljene sladovine; hlađenje ohmeljene sladovine; bistenje sladovine.

Pripremanjem sladovine dobija se ekstrakt pivarskog slada, a od njegovog sastava zavisi vrsta piva. Kako pivarski slad sadrži samo 10-15% materija rastvorljivih u vodi (šećeri,

deo proteina i proizvodi njihove razgradnje), to se komljenjem pivarskog slada, ako su uslovi za delovanje enzima prisutnih u sladu optimalni, menjaju nerastvorljive materije slada, uglavnom skrob. Pod dejstvom enzima amilaze slada skrob se transformiše u maltozu i dekstrine, a pod dejstvom proteolitičkih enzima razlažu se proteini. Na ovaj način se nerastvorljive materije transformišu u šećere i druge organske materije koje se rastvaraju u vodi, odnosno postiže se maksimalna ekstrakcija pivarskog slada.

Sastav sladovine zavisi od vrste slada i načina na koji se izvode pojedine faze i od uslova pod kojima se one odvijaju, a posebno od postupka ekstrakcije.

Vrenje je najvažnija faza u proizvodnji piva. Od vrenja zavisi vrsta i kvalitet gotovog proizvoda. Proces vrenja počinje dodavanjem pivarskog kvasca u sladovinu. U glavnom vrenju veći deo šećera razlaže se do etil-alkohola i ugljen-dioksida, a u naknadnom vrenju fermentiše ostatak šećera, stvaraju se buketne materije, pivo se bistri i zasićuje ugljen-dioksidom.

U pivarstvu se uglavnom koriste kvasci donjeg vrenja, prilagođeni alkoholnom vrenju sladovine pri niskoj temperaturi sa manjim ili većim stepenom previranja.

2.2.7. Hemijski sastav piva

Glavni sastojci piva su voda, alkohol, ugljendioksid i ekstrakt (nefermentisani deo ekstrakta osnovne sladovine).

Sadržaj *alkohola* zavisi od koncentracije osnovne sladovine i stepena fermentacije. Zavisno od vrste piva, sadržaj alkohola kreće se od 2,8 do 6% vol. Pored etanola, u pivu se nalaze male količine viših alkohola i 0,2-0,3% glicerola.

U pivu normalno ima 0,35-0,45% *ugljen-dioksida*. Samo u prekomerno presićenom pivu ima do 0,7% CO₂. U toku vrenja i naknadnog vrenja ekstrakt se troši na nastajanje alkohola i ugljendioksida, na ishranu kvasca, gubi se sa cedeljkom i talozima koji zaostaju u fermentoru, ležnom tanku i na filtru. Prema tome, ekstrakt piva je ostatak nefermentisanih materija uvećan sa količinom organskih materija, koje su prešle u pivo iz kvasca u toku glavnog i naknadnog vrenja (Šakić, 2005).

Na osnovu *ugljenohidratnog* sastava piva može se doneti sud o ugljenohidratnom sastavu sladovine iz koje je ono dobijeno. U pivu zaostaju relativno velike količine maltoze, a od ugljenih hidrata ima još i gumastih materija, pentozana i proizvoda karamelizacije ugljenih hidrata.

Znatan deo ekstrakta (8-10%) čine *azotne materije* među kojima su proteini, albumoze, peptoni, amidi, aminokiseline, amonijačne soli. Količina azotnih materija u pivu se smanjuje ako se koristi slad dobijen iz ječma siromašnog azotom i kod upotrebe nesladovanog ječma ili šećera. Zbog toga je sadržaj azotnih materija u ekstraktu vrlo promenljiv. Izvesna količina azota (oko 10%) ulazi u sastav melanoidina, holina i drugih materija (Petersen, 2004).

Od *ostalih organskih materija* ekstrakta, koje se u pivu nalaze u malim količinama, treba spomenuti gorke materije hmelja, taninske materije (hmelja i slada), obojene materije (melanoidini) i organske kiseline mlečna, ćilibarna, oksalna, jabučna. Sadržaj gorkih materija hmelja (izohumulona) kreće se od 0,03-0,09 g/l, zavisno od količine hmelja upotrebene u fermentaciji.

Vredne su pažnje i *mineralne materije*, koje čine 3-4% ekstrakta. Količina ovih materija varira u zavisnosti od sastava sirovine i naročito od sastava vode. U sastav pepela piva ulaze KCl, NaCl, P₂O₅, SiO₂, A₂O₃, Fe₂O₃, CaO, MgO. Pepeo piva čine soli kalijuma i natrijuma (oko 30%), soli fosforne kiseline (oko 30%, kao P₂O₅), silicijumove kiseline (oko 10% SiO₂) i male količine Ca, Mg, Al i Fe (Semiz, 1979).

Udeo ekstrakta piva, zavisno od koncentracije osnovne sladovine i stepena fermentacije, kreće se od 3-10%. Hemijski sastav piva zavisi uglavnom od koncentracije osnovne sladovine koja je za svaku sortu piva utvrđena standardom.

Znatan deo ekstrakta piva su *koloidne materije*. Uporedo sa hemijskim sastavom, treba uzeti u obzir i fizičko-hemijsko stanje pojedinih sastojaka piva, koje je presudno za pojedine osobine piva. Dekstrini, pentozani, složene azotne materije, hmeljne smole, taninske i obojene materije nalaze se u pivu u obliku koloida, koji su električno nabijeni. Ukus, punoća ukusa, penivost i stabilnost piva u velikoj meri zavise od veličine i sastava ovih micela. Mineralne materije i kiseline se u pivu nalaze najvećim delom kao joni, koji se adsorbuju na koloidima, i utiču na njihovo naelektrisanje i hidrataciju. Ovde naročito važnu ulogu imaju

H-joni. Sve ove materije u pivu uzajamno su povezane i nalaze se u koloidno-hemijskoj ravnoteži.

Pojedine osobine piva, kao penušavost, ukus i koloidna stabilnost, zavise od koloidne ravnoteže u pivu, koja se brzo menja. Usled braunovog kretanja micela, svaki koloidni rastvor se menja u smeru koagulacije. Koloidi piva takođe posle dužeg ili kraćeg vremena koagulišu. Pivo počinje da opalescira i na kraju u njemu se izdvaja koloidni talog. Istovremeno se menja i ukus piva. Penivost piva predstavlja karakterističan koloidni proces (*Malčev, 1967*).

2.2.8. Hranljiva vrednost piva

Pivo se pre svega posmatra kao piće prijatnog ukusa koje gasi žeđ. Međutim, pivo ima i određenu hranljivu vrednost jer u njemu ima ugljenih hidrata i azotnih materija. Ekstrakt piva se skoro potpuno iskorišćava u organizmu (do 95%).

Pivo je slab rastvor alkohola u vodi. Alkohol u ljudskom organizmu sagoreva do CO₂ i H₂O skoro bez ostatka. Pri sagorevanju 1 g alkohola oslobađa se 29,6 kJ, a sagorevanjem 1 g ekstrakta oslobađa se 15,9 kJ energije. Na osnovu ovoga, može se reći da 1 litar piva sa 35 g alkohola i 50 g ekstrakta daje 1793 kJ energije (*Semiz, 1979*).

Energetska vrednost piva može odrediti na osnovu količina alkohola i ekstrakta, ili na osnovu količina alkohola i ugljenih hidrata zajedno sa proteinima, pošto su energetske vrednosti ugljenih hidrata i proteina jednake.

Energetska vrednost litra piva se kreće u granicama 1670-3350 kJ. Poređenja radi energetska vrednost mleka iznosi oko 2850 kJ po litri.

Bez obzira na veliku energetska vrednost pivo se ne smatra prehrambenim proizvodom, pošto samo jedan deo materija koje se nalaze u njemu služi za izgradnju tkiva ljudskog organizma. Oko 60% energetske vrednosti piva otpada na alkohol koji ne predstavlja hranljivu materiju, pošto ne služi za sintezu novih tkiva (*Malčev, 1967*).

Pivo sadrži i biološki vredne materije, koje su potrebne za dobar rad organa za varenje, i sa fiziološke tačke gledišta igraju važnu ulogu. Tako ugljendioksid, koji daje pivu

karakter osvežavajućeg pića, povoljno deluje na rad organa za varenje. Gorke materije hmelja pobuđuju lučenje žuči i poboljšavaju proces varenja hrane.

Pored ovoga, pivo je dobar emulgator hrane. Koloidi piva, koji u organima za varenje emulguju i dispreguju materije, povećavaju površine enzimskih akcija i dodira hrane sa crevima. Ovo utiče na pravilnije varenje i povećanje koeficijenta iskorišćenja hrane. Pored toga, materije koje se nalaze u pivu ljudski organizam lako asimiluje (*Petersen, 2004*).

U pivu takođe ima i vitamina. Među njima u značajnijim količinama se sreću tiamin, riboflavin i nikotinske koesline. Tiamina ima mnogo u sladu i sladovini, ali ga kvasac apsorbira. U gramu ječma ima 1-2 µg riboflavina i njegov sadržaj se povećava u toku proizvodnje slada, i on prelazi u pivo. Vitamin B₁ se sreće ređe. Najbogatiji izvor ovog vitamina je kvasac. Zbog toga je i predložen čitav niz postupaka za obogaćivanje piva vitaminom B₁, dobijenim iz kvasca (*Šakić, 2005*).

2.2.9. Lekovita svojstva piva

Specifičan hemijski sastav omogućava da pivo poseduje definisana terapijska i dijetetska svojstva. Najmanje što se može reći je to da ako se unosi u umerenoj količini poboljšava opšte stanje organizma. Međutim, u umerenoj količini povoljno deluje i u smanjenju rizika od pojave pojedinih bolesti, pre svega bubrežnih i kardiovaskularnih, ali i čitavog niza drugih.

Umerena količina piva skraćuje vreme zadržavanja vode u organizmu. Nizak sadržaj natrijuma, mala količina alkohola i derivata nukleinskih kiselina, odnosno visok sadržaj kalijuma izazivaju diuretski efekat. Zbog toga pivo pokazuje povoljno delovanje u lečenju hipertenzije, edema i koronarne profilakse (*Piendl, 1982*). Prisustvo citrata u kombinaciji sa diuretskim svojstvima smanjuje stvaranje kamena u bubrezima, a mala količina prisutnog alkohola u kombinaciji sa ostalim sastojcima potpomaže izlučivanje urina. Istovremeno povoljno utiče na cirkulaciju krvi u mozgu, bubrezima i koži i utiče na širenje krvnih sudova, što takođe snižava krvni pritisak. Pokazalo se da osobe koje redovno unose umerene količine piva imaju manje srčanih smetnji, problema sa visokim pritiskom i u manjoj meri oboljevaju od čira (*Buday i Denis, 1974; Muller-Limmroth i Brauwelt, 1982*). U prilog tome govore rezultati brojnih istraživanja vršenih poslednjih godina, koji pokazuju da umerena količina alkohola ima povoljno delovanje na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti i da osobe koje svakodnevno konzumiraju umerenu količinu alkohola u manjoj meri oboljevaju od ovih

bolesti od onih koji uopšte ne konzumiraju alkohol, ili ga unose u prekomernoj količini (WHO, 1994).

Pored toga, pivo sadrži polifenole slične onima u crnom vinu. Oni se po reaktivnosti ne razlikuju mnogo, a polifenoli poreklom iz hmelja su čak i reaktivniji od onih prisutnih u vinu. Kao što je poznato, oni učestvuju u brojnim enzimskim reakcijama koje katalizuju hidrolaze, kinaze i hidrosilaze, a poseduju sposobnost da vezuju slobodne radikale u organizmu i kao takvi su efikasni agensi u koronarnoj i kancerogenoj profilaksi (Piendl, 1990). Najnovija istraživanja pokazuju da u pogledu antioksidativnog delovanja efekat koji se postiže konzumiranjem vina i piva se praktično ne razlikuje (Hendriks, 1999).

Postavlja se pitanje šta je to "umereno" konzumiranje alkohola i da li je svejedno u kom se obliku on unosi. U najširem smislu posmatrano, pod umerenim konzumiranjem alkohola smatra se unošenje alkoholnog pića u količini koja ne uzrokuje štetne posledice po organizam i okolinu pojedinca.

U kvantitativnom smislu najčešće je reč o 1 - 3 (u proseku 2) alkoholna pića na dan, odnosno 10 - 40 g apsolutnog alkohola na dan. To odgovara količini od 1 do 3 boce piva od 0,331 sa 40g/l, ili 50 ml alkohola (Piendl, 1999). U pogledu prirode alkohola, nekoliko momenata zaslužuje pažnju. Utvrđeno je da od koncentracije alkohola i prirode rastvora zavisi brzina i način resorpcije alkohola, a samim tim i maksimalna vrednost koja prelazi u jetru i krv. Pivo je blago alkoholno piće i koloidni rastvor iz koga se alkohol sporo distribuira i resorbuje.

Zahvaljujući tome, sadržaj alkohola u krvi raste sporije nego u slučaju drugih alkoholnih pića, a maksimalna vrednost koja se dostiže je niža (Piendl, 1982; Leskosck-Cukalovic, 1998). Sve je to razlog da se pivo preporučuje kao sastavni deo različitih terapija. Uspešno se koristi u dijetama u kojima je limitiran sadržaj natrijuma, kalcijuma, proteina, lipida. Dozvoljava se pacijentima koji smeju uneti umerenu količinu alkohola. Onima kojima je zabranjen, preporučuje se bezalkoholno pivo. Posebno povoljno delovanje pivo je u umerenim količinama pokazalo kod starijih osoba (zdravih) kod kojih je važno postići umirujući efekat, poboljšati san i poboljšati vazodilataciju i diurezu (Gastineau i sar., 1979). Pri tome treba biti svestan da pivo pojačava delovanje pojedinih medikamenata: sedativa, trankvilizera, anksiolitika, diuretika, o čemu treba voditi računa prilikom primene odgovarajućih terapija.

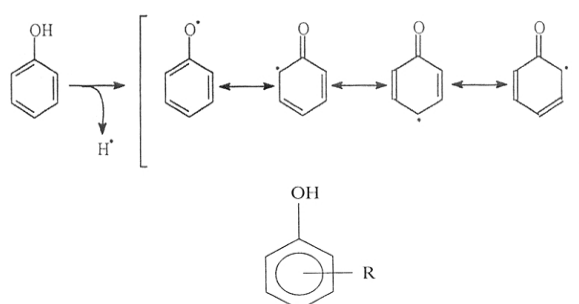
Poslednjih godina opsežno je ispitivano delovanje piva u kondicionim treninzima vrhunskih sportista. Pokazalo se da je u situacijama kada je potrebno nadoknaditi veliku količinu vode u organizam, pivo izuzetno pogodno sredstvo. Povoljan odnos sadržaja vode i

energetske vrednosti, prisustvo vitamina, minerala i elektrolita i činjenica da se prisutne komponente brzo i lako resorbuju omogućava adekvatnu nadoknadu 3 - 5 % telesne težine koja se gubi prilikom treninga. To je pogotovo od značaja pri teškom fizičkom radu i intenzivnim treninzima, kada se gubitak elektrolita mora relativno brzo nadoknaditi, kako ne bi došlo do gubitka radne sposobnosti (drhtavice i malaksalosti). Registrovano je da umereno konzumiranje piva poboljšava radni učinak, izdržljivost i sposobnost koncentracije sportista (*Piendl, 1990*).

Specifična svojstva piva mogu se uspešno iskoristiti i kod još šire populacije. Pivo se može preporučiti svim zdravim osobama koje su izložene velikim fizičkim naporima i visokim temperaturama, ekološki štetnim supstancama, pogotovo pušačima i ženama u vreme trudnoće i dojenja. Pivo u svim ovim slučajevima ne samo da obogaćuje ishranu i pomaže normalizovanju metaboličkih procesa narušenih primenom odgovarajućih dijeta, uslova rada, odnosno stanjem organizma, već ima i povoljan psihološki efekat.

2.3. FENOLNA JEDINJENJA

Fenolna jedinjenja su veoma rasprostranjeni proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka i antioksidativno delovanje biljnih ekstrakata uglavnom se vezuje za njihovo prisustvo. Poznato je više od 8000 fenolnih jedinjenja, koja se po svojoj strukturi veoma razlikuju, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do visoko polikondenzovanih jedinjenja kao što su tanini. Fenolna jedinjenja ili polifenoli, u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Antioksidativna aktivnost fenola se prepisuje njihovoj sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i da kao takvi uklanjaju slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (Slika 2.6.)



Slika 2.6. Mehanizam nastajanja fenoksil radikala.

Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetine kiseline), flavanoli, flavonoidi i dihidrohalkoni.

Fenoli imaju kiseo karakter usled disocijacije hidroksilne grupe. Oni su slabo reaktivna jedinjenja i obično grade vodonične veze. Druga njihova veoma važna osobina je da mogu da grade komplekse sa teškim metalima. Takođe se mogu lako oksidovati i mogu graditi polimere tamne boje. Tamnjenje biljnih delova na mestu preseka je posledica ovih reakcija kojima podležu fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja se veoma retko nalaze slobodna u biljnim ćelijama. Ona se najčešće kupluju sa drugim molekulima, kao što su ostaci šećera (glikozidi), ostaci sumporne kiseline i sirćetne kiseline.

Fenolna jedinjenja su toksična u obliku aglikona (slobodnom obliku), njihova toksičnost se smanjuje kada se vežu sa drugim molekulima. Zaštitna uloga fenolnih jedinjenja

se može objasniti činjenicom da na mestu oštećenja biljke dolazi do porasta sinteze fenolnih jedinjenja koja se nagomilavaju na mestu oštećenja u obliku polimerne mase. Glikozidacija flavonoida ima važan ekološki značaj. Oni štite biljke od različitih insekata i drugih štetočina. Mnoga fenolna jedinjenja imaju ulogu fungicida i pesticida.

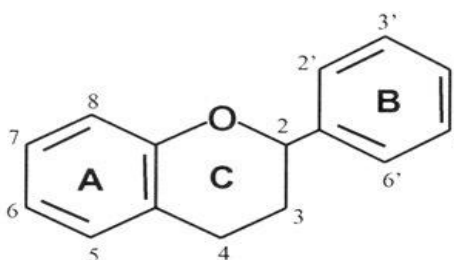
U Tabeli 2.1. prikazane su najvažnije klase fenolnih jedinjenja.

Tabela 2.1. Najvažnije klase fenolnih jedinjenja.

Broj C-atoma	Osnovni skelet	Klasa	Jedinjenje
6	C ₆	Prosti fenoli, Benzohinoni	Katehol, hidrohionon, rezorcinol
7	C ₆ - C ₁	Fenolne kiseline	p-hidroksibenzoeva kiselina
8	C ₆ - C ₂	Fenilsirćetne kiseline	p-hidroksifenilsirćetna
9	C ₆ - C ₃	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
		Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
		Kumarini	Umbeliferon, skopolin
		Hromoni	Eugenin
10	C ₆ - C ₄	Naftohinoni	Juglon
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Hantoni	Mangostin, magniferin
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	Stilbeni	Rezveratrol
		Antrahinoni	Apigenin, luteolin, sinensitin
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavanoli	Dihidrokvarcetin i dihidrokamferol glikozidi
		Flavanoni	Hesperidin, naringenin
		Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin
		Antocijanini	Glikozidi peralgonidina, peonidina, delfinidina, petunidina, cijanidina
		Katehini	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin
		Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonarigenin
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignani, neolignani	Pinorezinol
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavon

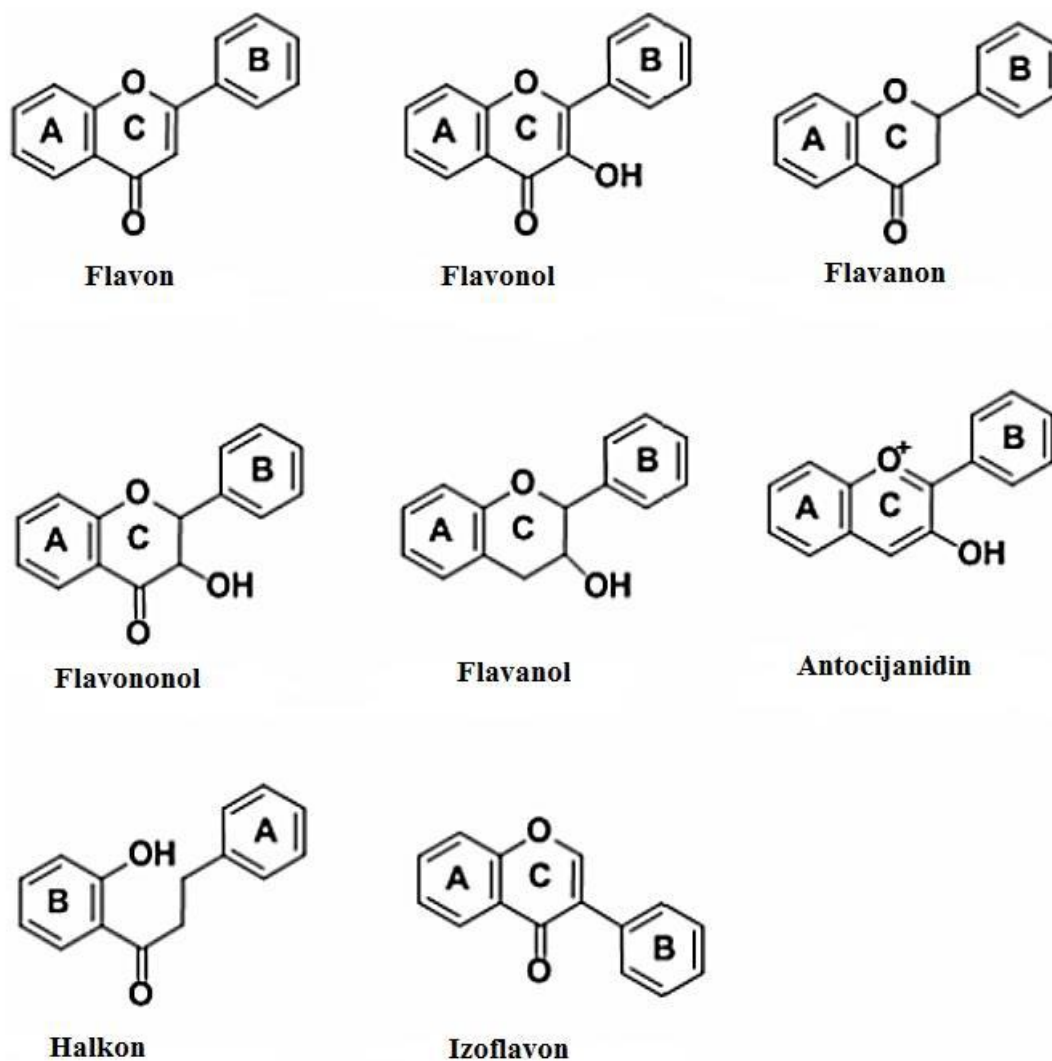
Flavonoidi su najrasprostranjenija grupa polifenolnih jedinjenja i u prirodi se najčešće nalaze u obliku monoglikozida, a ređe u obliku di i tri glikozida. Glikozide najčešće grade sa D-glukozom, D-galaktozom i L-ramnozom. Ostali monosaharidi su manje zastupljeni. Flavonoidna jedinjenja su veoma značajni biljni pigmenti. Flavonoidi i njihovi glikozidi se znatno razlikuju po nijansama boja. Nalaze se u svim delovima biljaka.

Hemijska struktura flavonoida bazira se na C_{15} skeletu sa hromanovim prstenom za koji je vezan bezenov prsten u položajima najčešće 2, ređe 3 ili 4 (Slika 2.7.).



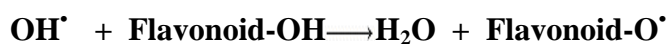
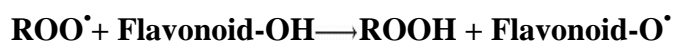
Slika 2.7. Osnovni skelet flavonoida.

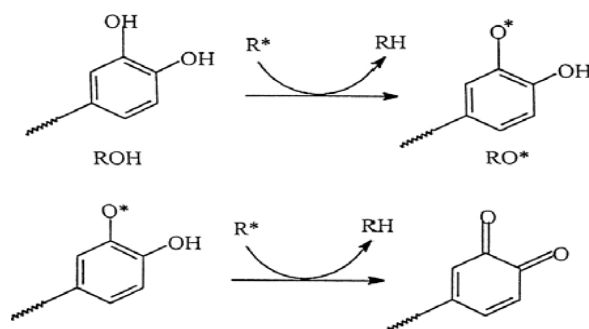
Klase flavonoida međusobno se razlikuju prema oksidacionom statusu heterocikličnog prstena C i poziciji vezivanja B-prstena. Najznačajnijih grupe flavonoida su prikazane na Slici 2.8.



Slika 2.8. Najzastupljenije klase flavonoida.

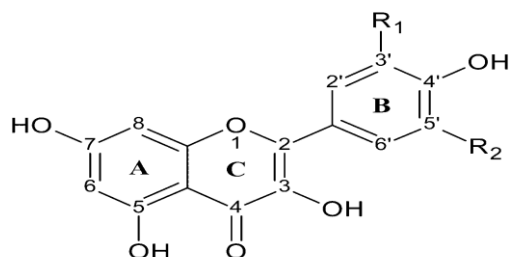
Flavonoidi su prirodni antioksidansi. Prisustvo flavonoida dovodi do prekidanja slobodno-radikalских reakcija, pri čemu oni predaju vodonikov atom radikalima i sami prelaze u slobodne radikale. Ovako nastali slobodni radikali rezonantno su stabilizovani i nemaju dovoljno energije da pokrenu lančanu reakciju sa supstratom (Slika 2.9.):





Slika 2.9. Mehanizam delovanja flavonoida.

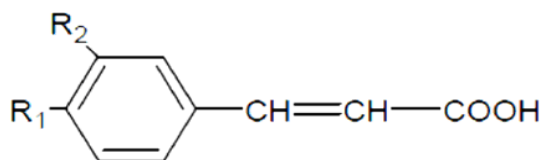
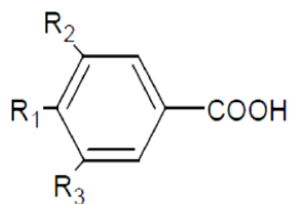
Flavonoli su veoma rasprostranjeni u biljkama i javljaju se najčešće kao glikozidi, a mogu da budu i kopigmenti antocijana u cvetnim laticama i lišću viših biljaka. Nalaze se u svim delovima biljaka. Poznato je preko 100 flavonolnih aglikona, a najrasprostranjeniji su kemferol, kvercetin i miricetin (Slika 2.10.).



<i>Kemferol</i>	$R_1=R_2=H$
<i>Kvercetin</i>	$R_1=OH, R_2=H$
<i>Miricetin</i>	$R_1=R_2=OH$

Slika 2.10. Strukture najznačajnijih flavonola.

Fenolne kiseline su derivati benzoeve i cimetne kiseline. Para-hidroksi benzoeva, vanilinska, galna i prokatehinska kiselina su derivati benzoeve kiseline dok su ferulna, kafena i kumarinska kiselina derivati cimetne kiseline (Slika 2.11.).



<i>Benzoeva kiselina</i>	$R_1=R_2=R_3=H$	<i>Cimetna kiselina</i>	$R_1=R_2=H$
<i>p-hidroksibenzoeva kiselina</i>	$R_1=OH; R_2=H$	<i>Kafena kiselina</i>	$R_1=R_2=OH$
<i>Vanilinska kiselina</i>	$R_1=OH; R_2=CH_3O; R_3=H$	<i>Ferulna kiselina</i>	$R_1=OH, R_2=OCH_3$
<i>Galna kiselina</i>	$R_1=R_2=R_3=OH$	<i>p-kumarna kiselina</i>	$R_1=H, R_2=OH$

Slika 2.11. Najznačajnije fenolne kiseline.

Fenolne kiseline su poznati antioksidansi zbog sposobnosti da predaju vodonik ili elektron kao i zato što njihovi stabilni interemedijeri radikali sprečavaju oksidaciju različitih komponenti, naročito masnih kiselina i ulja.

Hidroksi derivati benzoeve i cimetne kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice). Nalaze se u svim delovima biljaka (koren, stabljika, lišće, seme). U različitim delovima biljaka nalaze se različite koncentracije fenolnih kiselina. Osim toga, u različitim stadijumima razvoja biljaka prisutne su različite fenolne kiseline. Uslovi rasta, kao što je temperatura, utiču na sadržaj fenolnih kiselina.

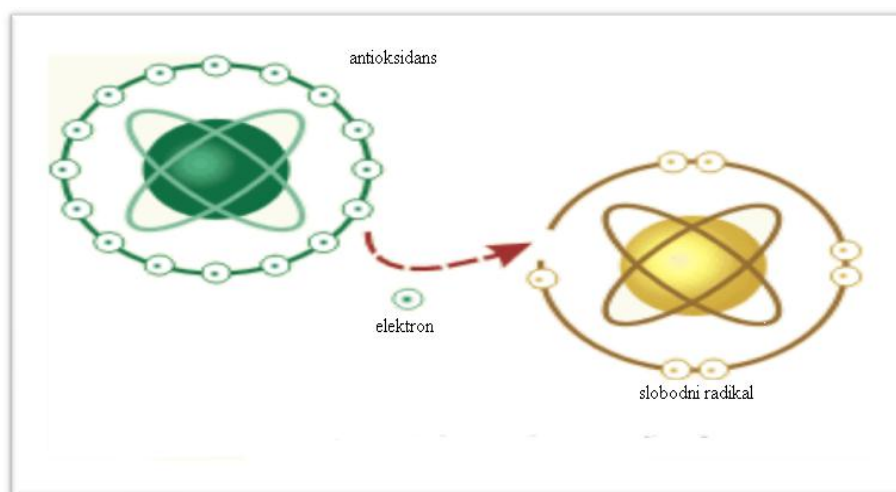
Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni).

Fenolne kiseline su prisutne u voću u glikozidnoj formi, iz koje se mogu osloboditi kiselom hidrolizom (*Riberau-Gayon, 1965*). Slobodne fenolne kiseline prisutne u obojenom voću i sokovima, uglavnom su nastale reakcijama kiselom hidrolizom glikozida, alkalnom hidrolizom estara ili termičkom degradacijom kompleksa antocijana (*Galvin, 1993*). Estri sa vinskom kiselinom, pre svega estar kafene kiseline lako podležu oksidaciji i odgovorni su za brzo potamnjivanje šire.

2.4. ANTIOKSIDANSI

Slobodni radikali su reakcione intermedijerne čestice koje imaju barem jedan nespareni elektron, uglavnom nemaju naelektrisanje dok u hemijskim reakcijama reaguju sa neutralnim molekulima ili drugim radikalima. Nespareni elektron, odnosno radikalski centar, može se stvarati i postojati na sp^3 i sp^2 hibridizovanim ugljenikovim atomima (alkil, vinil, aril radikali), zatim na kiseoniku (alkoksi radikali), azotu (amino, amido radikali), sumporu, fosforu i mnogim drugim elementima (Čeković, 2000).

Antioksidansi su prirodne ili veštačke supstance koje imaju sposobnost da se suprotstave oksidaciji ili da inhibiraju reakcije koje iniciraju reaktivne vrste (Slika 2.12.).



Slika 2.12. Mehanizam neutralisanja (stabilizacije) slobodnog radikala antioksidansom.

Tokom višegodišnjeg istraživanja otkriveno je da različiti oblici reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS) učestvuju u oksidativnoj degradaciji prehrambenih proizvoda i u patogenezi nekih humanih oboljenja: arteroskleroza, *Dijabetes melitus*, hronične upale, neurodegenerativni poremećaji i određene vrste raka.

Zaštitni efekti antioksidanasa u odnosu na oksidacijom izazvane reakcije, danas se ispituju sa velikom pažnjom, naročito u medicini, biologiji, hemiji, prehrambenoj tehnologiji, itd. Istraživanje obuhvata postojanje jednostavne, pogodne i pouzdane analitičke metode (*in vitro*) za brzo određivanje antioksidativnog kapaciteta čistog jedinjenja ili kompleksa u hrani ili u biološkim uzorcima. Neke od najčešće korišćenih metoda za *in vitro* određivanje antioksidativnog kapaciteta biće opisane u tekstu.

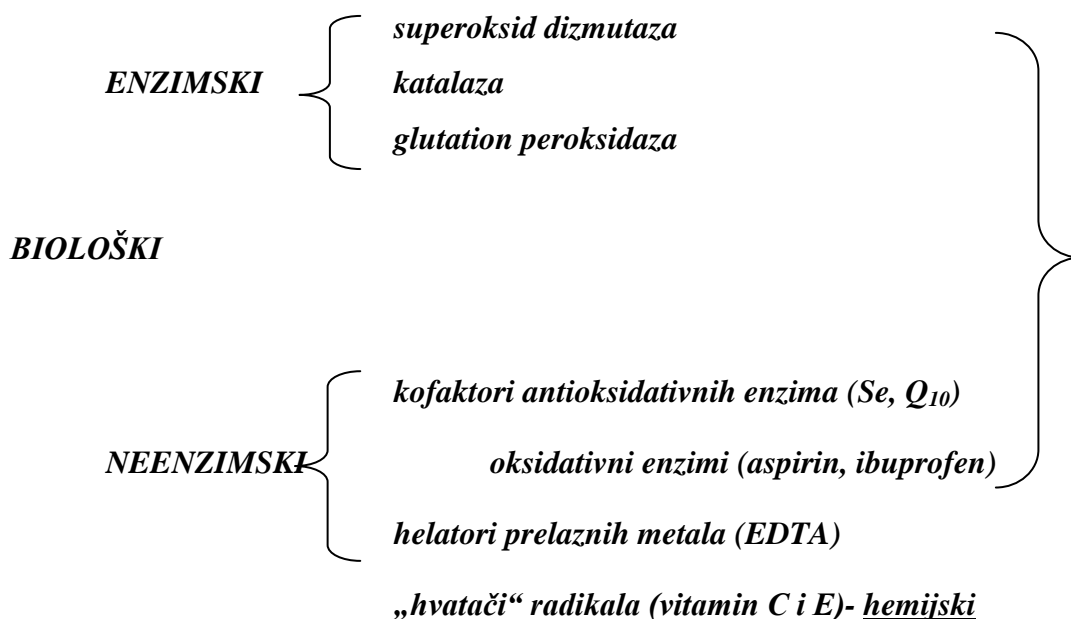
U zavisnosti od oblasti primene, mete koje antioksidansi štite su različite. Na primer u hemijskoj industriji to su najčešće proizvodi od plastike i gume. Efikasan antioksidans je onaj koji interaguje sa reaktivnim vrstama i prekida autooksidaciju. Sterno zaklonjeni fenoli i amini pokazuju takve osobine i često se koriste kao antioksidansi u proizvodnji plastike i gume. Naročito su značajni antioksidansi u prehrambenoj industriji, jer sprečavajući neželjene reakcije i omogućavaju normalno odvijanje mnogih procesa u organizmu.

Antioksidans je supstanca koja može efikasno da smanji štetno dejstvo pro-oksidansa, a da istovremeno dovede do formiranja proizvoda bez ili sa niskim nivoom štetnosti. Oni uspevaju da zaštite biološke mete od lošeg uticaja.

Zaštita bioloških meta se zasniva na sledećim mehanizmima (*Leposavić, 2008*):

- inhibicija stvaranja i hvatanje ROS i RON
- redukcion kapacitet
- metal-helatni kapacitet
- aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze)
- inhibicija oksidativnih enzima (NOS sintaze, ksantin oksidaze, ciklooksigenaze)

Biološki antioksidansi podrazumevaju enzimske antioksidanse i neenzimske antioksidanse (*Shi i sar., 2001*):



Prema načinu delovanja u ljudskom organizmu antioksidansi su podeljeni na:

1. **preventivne antioksidanse**– antioksidansi koji sprečavaju nastanak slobodnih radikala i iniciranje lančane reakcije peroksidacije dekompozicijom vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida, kompleksiranjem jona metala i eliminacijom ROS.
2. **"skevindžer" antioksidanse**– antioksidansi koji poseduju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale i tako inhibiraju inicijaciju i prekidaju propagaciju reakcije lipidne oksidacije, pa se nazivaju i "prekidači" lančanih radikalskih reakcija. Prema rastvorljivosti ovi antioksidansi dele se na:
 - hidrosolubilne- rastvorljive u vodi (vitamin C, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, glutation, neki polifenoli)
 - liposolubilne- ne rastvorljive u vodi a rastvorljivi u lipidima (vitamini E i A, karotenoidi, neki polifenoli) (*Ohara i sar., 1993*).
3. **"reparacione" antioksidanse**– ovi antioksidansi deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa.

Antioksidansi značajni za ljudski organizam dele se na endogene i egzogene.

Endogeni antioksidansi predstavljaju antioksidanse koji nastaju u ljudskom organizmu i izgrađuju sistem antioksidansne zaštite organizma. Tu spadaju: enzimski sistemi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), mokraćna kiselina, bilirubin, tioli (glutation, lipolna kiselina, N-acetil cistein), koenzim Q10 (ubihinon), proteini koji kompleksiraju jone metala.

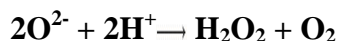
Antioksidansi koji se u organizam unose putem hrane ili lekova predstavljaju *egzogene antioksidanse* (vitamin C, vitamin E, karotenoidi (β -karoten), oksikarotenoidi (likopen), polifenolna jedinjenja (flavonoidi, fenolne kiseline, proantocijanidoli), itd (*Piletić i sar., 2003*).

2.4.1. Mehanizam delovanja antioksidanasa

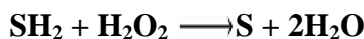
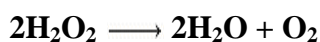
2.4.1.1. Primarna antioksidativna zaštita

Enzimski sistemi koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza. *Superoksid dismutaza* (SOD) katalizuje

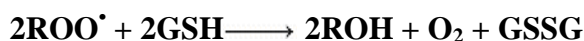
dismutacije među superoksid anjon radikalima uz produkciju H_2O_2 i kiseonika. Neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše glutation peroksidaza ili katalaza.



Glutation peroksidaza (GSHPx) redukuje H_2O_2 i hidroperokside masnih kiselina. Ovaj enzim je prisutan u citosolu gde štiti fosfo- i sfingolipide membrana od oksidativne destrukcije.



Katalaza (CAT), katalizuje razgradnju nastalog H_2O_2 , dok peroksidaza katalizuje oksidaciju različitih supstrata pomoću H_2O .



Pored ovih enzima, postoji i niz drugih sa sličnom funkcijom kao što su selennezavisna GSHPx, glutation reduktaza, redukovani glutation (GSH) i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza.

U sistem primarne antioksidantne zaštite ubrajaju se i neenzimske supstance kao što su proteini transferin i ceruloplazmin koji imaju bitnu ulogu u transportu metalnih jona, zatim albumin, mokracna kiselina i bilirubin (*Ruberto i sar., 2007*). Svi navedeni primarni antioksidanti čine koordiniranu odbranu organizma od reaktivnih radikalskih oblika.

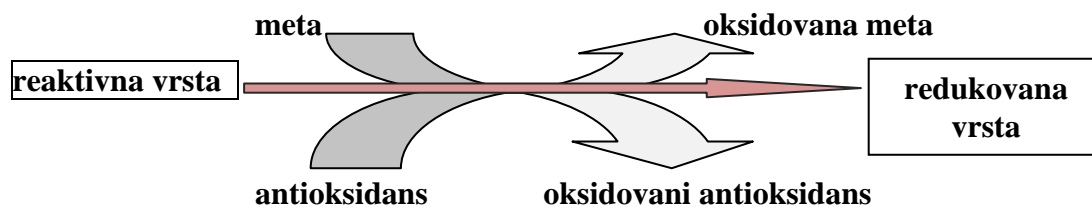
2.4.1.2. Sistem sekundarne antioksidativne zaštite

Sistem sekundarne antioksidativne zaštite čine brojna niskomolekularna jedinjenja razlicitog porekla i karaktera, kao što su ubihinon, L-askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, derivati hidroksicinamata i dr. (*Halliwell, 1990; Acworth, 2003*). Kako je struktura ovih jedinjenja veoma raznovrsna, tako su različiti i mehanizmi kojima ona ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidantne zaštite. Najčešće su to hvatači ("skevindžeri") slobodnih radikala, donori protona, inhibitori enzimskih sistema, helatori jona prelaznih metala, itd. (*Halliwell, 1989*). U sistem sekundarne antioksidantne zaštite mogu se ubrojiti i enzimi koji aktivno učestvuju u otklanjanju oksidativnih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina, kao što su: endo- i egzokleaze, DNK polimeraze i ligaze, fosfolipaza A2, GSHPx i fosfolipid-zavisna GSHPx, glikozilaze, kao i brojni proteolitički enzimi. Ovi enzimi "popravljaju" oštećene molekule DNK, uklanjaju oksidovane masne kiseline membranskih lipida i kroz procese resinteze obnavljaju oksidovane aminokiseline i proteine (*Vertuani, 2004*).

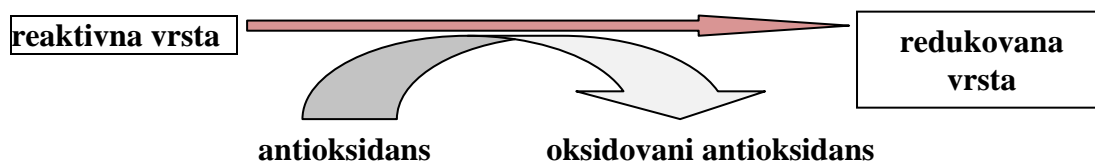
2.4.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

In vitro analitičke metode za određivanje antioksidantnog kapaciteta oslanjaju se na dva različita pristupa: konkurentna i nekonkurentna reakcija (Slika 2.13.).

Konkurentna reakcija



Nekonkurentna reakcija



Slika 2.13. Konkurentna i nekonkurentna reakcija.

U konkurentnoj reakciji ciljna vrsta- meta (biomolekuli koji mogu biti napadnuti *in vivo*) i antioksidansi se takmiče za reaktivno jedinjenje (radikal ili neradikal). Procena antioksidativne sposobnosti (kapaciteta) se zasniva kvantifikaciji, tj. određivanju količine jedinjenja koje olakšava analitičko merenje i definiše se kao proba. Kod konkurentnih testova proba je ciljna vrsta ili oksidovani oblik. Proba može biti i neka vrsta koja se dodaje nakon navedenih reakcija koje prate kvantifikaciju preostalih reaktivnih vrsta ili ciljnih molekula.

U ovim testovima, antioksidativni kapacitet testiranih jedinjenja zavisi od:

- brzine reakcije između njih i reaktivnih vrsta,
- brzine reakcije ciljnih molekula i reaktivnih vrsta i
- koncentracionog odnosa između antioksidanasa i ciljnog molekula.

Neophodno je ispuniti uslove za izvođenje ovih testova:

- test proba mora biti reaktivna sa antioksidansom pri niskim koncentracijama
- maksimalna osetljivost u spektroskopskom ispitivanju između polaznog i oksidovanog oblika

- ne smeju postojati sporedne reakcije
- antioksidans ne bi trebalo da reaguje sa ciljnim molekulom.

U nekonkurentnim testovima, navedena je reakcija između antioksidansa i reaktivne vrste u odsustvu ciljnih molekula, što, u početnoj smeši, uključuje dve komponente, koje takođe mogu biti probe za praćenje reakcije. Preostale reaktivne vrste se mogu meriti dodatkom pogodnog reagensa (*Vertuani, 2004*).

Metode koje se koriste za određivanje antioksidativnog kapaciteta mogu se podeliti u tri velike grupe (Tabela 2.2.):

- metode koje uključuju H- transfer reakcije
- ET- metode (elektron transfer)
- ostale metode

Tabela 2.2. Glavne metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta.

Metode in vitro određivanja antioksidativnog kapaciteta	
<p><u>Metode koje uključuju H- transfer reakcije</u></p> <p>$ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$</p> <p>$ROO\cdot + LH \rightarrow ROOH + L\cdot$</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 2. TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) 3. Crocin test izbeljivanja 4. IOU (inhibited oxygen uptake) 5. Inhibicija oksidacije linoleinske kiseline 6. Inhibicija oksidacije LDL
<p style="text-align: center;"><u>ET- metode</u></p> <p>$M(n) + e^- \text{ (iz AH)} \rightarrow AH\cdot + M(n-1)$</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) 2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 3. FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) 4. Cu(II) redukcionu kapacitet 5. Određivanje ukupnih fenola FC reagensom
<p style="text-align: center;">Ostale metode</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. TOSC (total oxidant scavenging capacity) 2. Hemiluminiscencija (CL)

2.4.2.1. Elektron-transfer metode

ET- metode su veoma korišćene metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta *in vitro*. Ove metode podrazumevaju prisustvo dve komponente u reakcionoj smeši: oksidans (proba) i antioksidans, kao i odvijanje elektron- transfer reakcije:

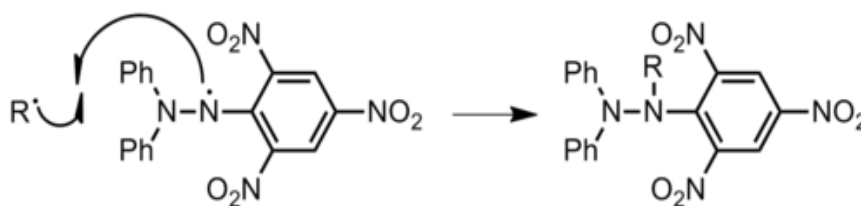


Proba, odnosno oksidans, uzima elektron iz antioksidansa i dovodi do promene boje rastvora. Promena intenziteta obojenosti rastvora je proporcionalna koncentraciji antioksidansa. Reakcija između antioksidansa i oksidansa je završena onda kada boja rastvora prestane da se menja. U svim metodama spektrofotometrijski se meri apsorpcija ispitivanog rastvora i prati njena zavisnost od molarne koncentracije. Zavisnost između promene asorbancije (ΔA) i koncentracije antioksidansa je linearna. Nagib krive daje kapacitet antioksidansa koji se predstavlja kao Trolox ekvivalent (TE) ili kao ekvivalent galne kiseline (GAE).

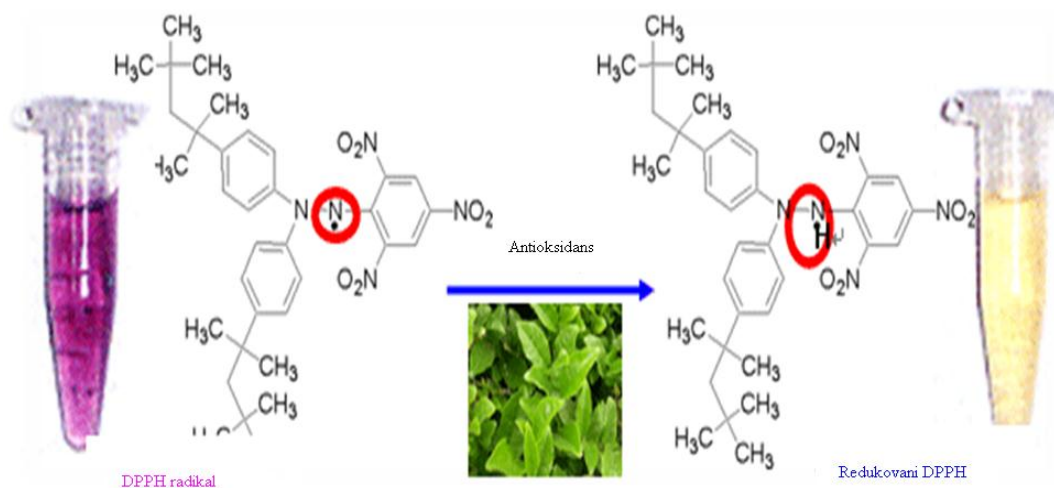
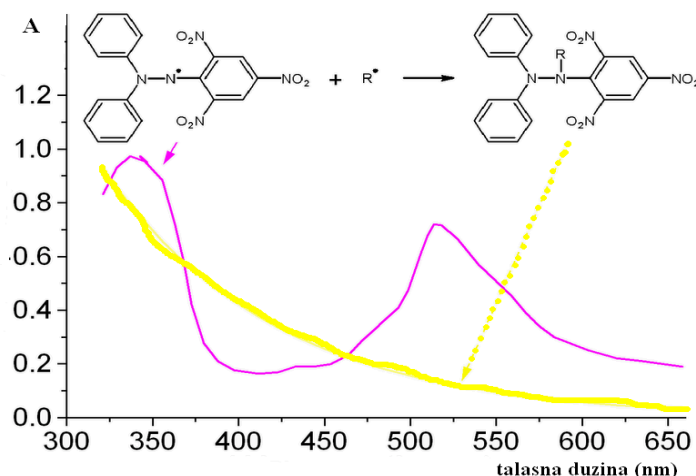
Metode koje su korišćene u ovom radu su:

- DPPH- metoda (*Scavenging of 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil Radical Assay*)
- TEAC- metoda (*Total Equivalent Capacity Assay*)
- FRAP- metoda (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay*)

DPPH- metoda (Scavenging of 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil Radical Assay) - Određivanje „scavenging“ antioksidanskog slobodno-radikalnog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalom zasniva se na redukciji ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]) odgovarajućim oksidansima do blede-žutog hidrazina (Slika 2.14. i 2.15.). Antioksidativna aktivnost se određuje u organskom sistemu praćenjem promene apsorpcije na 515 do 528 nm, sve dok apsorpcija ne postane konstantna (Slika 2.16.); ili ESR-om (*elektron-spin rezonancom*).



Slika 2.14. Mehanizam neutralisanja slobodnog radikala DPPH-radikalom.

Slika 2.15. Redukcija DPPH^\bullet do hidrazina.Slika 2.16. Promena apsorbanice u toku redukcije DPPH^\bullet .

Određivanje antioksidativnog kapaciteta se zasnivalo na amperometrijskoj redukciji DPPH^\bullet na staklastoj ugljenikskoj elektrodi (*Brand-Williams i sar., 1995*). Rezultujuća struja je proporcionalna koncentraciji DPPH^\bullet posle reakcije sa antioksidansom. Biamperometrijski metod koristi par $\text{DPPH}/\text{DPPH}^\bullet$ i dve identične staklaste ugljenikove elektrode u obliku diska. Reakcioni mehanizam se bazira na elektron-transfer reakciji (ET). Antioksidativni kapacitet u odnosu na DPPH^\bullet je pod jakim uticajem rastvarača i pH reakcije. Stask je zaključio da je smeša vode i etanola u odnosu 1:1 (50%) dobar izbor za lipofilne i hidrofilne antioksidanse i brzina reakcije DPPH^\bullet i antioksidansa može značajno da raste sa povećanjem količine vode. (*Fuhrman i sar., 2001*) Za sadržaj vode veći od 60% antioksidativni kapacitet opada, jer deo DPPH^\bullet koaguliše što otežava reakciju sa antioksidansima.

Rezultati su predstavljeni kao efiksna koncentracija (EC_{50}): količina antioksidansa koja je smanjuje koncentraciju DPPH za 50%. Vreme potrebno da se postigne stabilno stanje sa efikasnom koncentracijom (EC_{50}) je izračunato iz kinetičke krive i definiše se kao TEC_{50} .

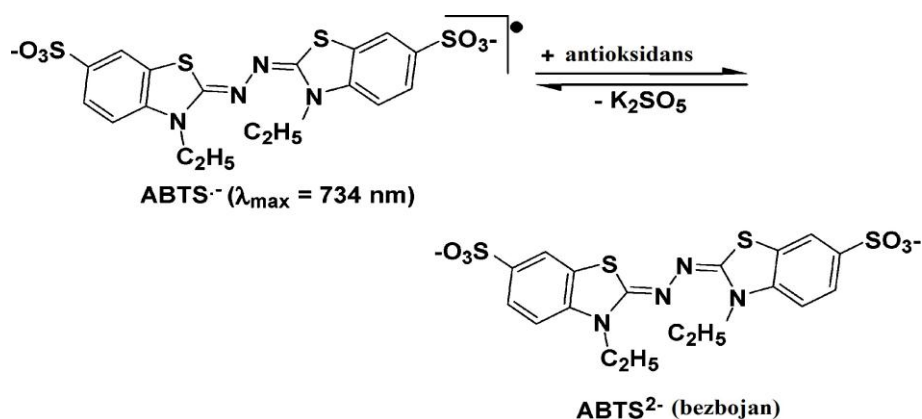
Antiradikalna efikasnost može biti određena izračunavanjem recipročne vrednosti od $EC_{50} \times TEC_{50}$, što znači da se efikasnost povećava sa smanjenjem $EC_{50} \times TEC_{50}$ vrednosti. Efikasnost hvatača (RSE) predstavlja odnos brzine reakcije (dobijene u prvom minutu) i efikasne koncentracije (EC_{50}). Ograničenje ove metode predstavlja određivanje EC_{50} vrednosti. Iz ovog razloga bolje je koristiti utrošenu koncentraciju DPPH[•].

Sterni prilaz DPPH[•] određuje reakciju, jer mali molekuli lakše prilaze ovom radikalu i imaju relativno veći antioksidativni kapacitet. Sa druge strane, veoma veliki antioksidansi, koji brzo reaguju sa peroksil radikalom, u ovom slučaju reaguju sporo ili ne reaguju.

Spektrofotometrijska merenja mogu biti pod uticajem jedinjenja, kao što su karotenoidi koji apsorbuju na talsnoj dužini određivanja, i pod uticajem zamućenosti uzoraka.

DPPH test nije pogodan za merenje antioksidativnog kapaciteta plazme, jer se proteini precipituju u alkoholnom reakcionom medijumu. DPPH reakcija je „vremenska“ i može da traje od 20 minuta do 6 sati (*Magalhaesi sar., 2009*).

TEAC- metoda (Total Equivalent Capacity Assay) - Ova metoda uključuje stvaranje dugo-živećih radikala, 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat) radikal-katjon ($ABTS^{•+}$) koji ima apsorpcione maksimume na talasnim dužinama od 414, 645, 734 i 815 nm (Slika 2.17.).



Slika 2.17. Mehanizam delovanja $ABTS^{•+}$.

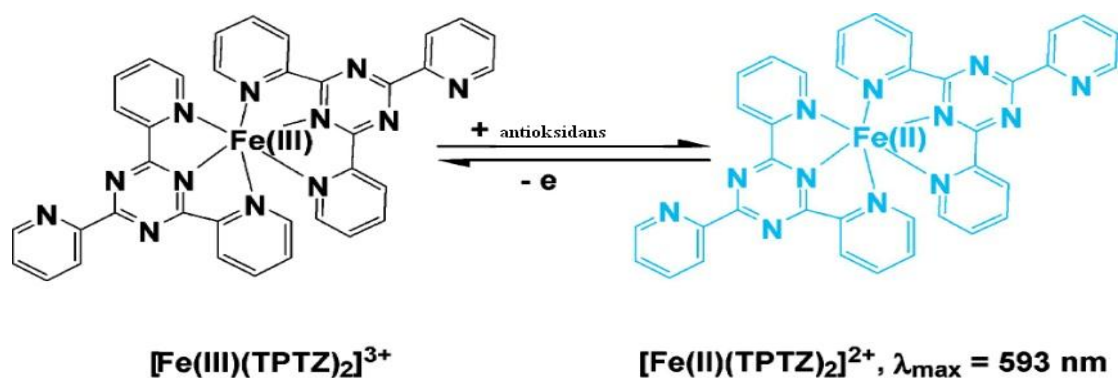
Ova metoda se zasniva na aktivaciji mioglobina, delujući kao peroksidaza, sa H_2O_2 do formiranja feri-mioglobina, radikala koji zatim reaguje sa ABTS pri čemu nastaje $ABTS^{•+}$.

Testirano jedinjenje/uzorak redukuje $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (rastvor plave boje se obezbojava), meri se indukcionni period koji predstavlja vreme kašnjenja formiranja radikala. Redosled dodavanja reagenasa i uzoraka je veoma važan i predstavlja zamku, zato što antioksidansi (npr. kvercetin) mogu reagovati ili sa H_2O_2 ili sa derivatima oksidovane vrste, što dovodi do inhibicije $\text{ABTS}^{+\bullet}$ i određivanja antioksidativne aktivnosti.

U zavisnosti od uslova korišćenja metoda, za određivanje $\text{ABTS}^{+\bullet}$ mogu se koristiti različite strategije. $\text{ABTS}^{+\bullet}$ može biti određen reakcijom u kojoj se koristi mangan-dioksid ili kalijum-persulfat, enzimskim reakcijama korišćenjem mioglobina ili ren-peroksidaze, ili elektrohemijski. Vreme trajanja reakcije je od 1 do 30 minuta. Određivanje se uglavnom vrši talasnoj dužini od 734 nm.

Rezultati se izražavaju kao Trolox ekvivalenti. Kako bi se antioksidativna moć predstavila na razumljiv način, askorbinska kiselina (vitamin C) je predložena kao referentno jedinjenje umesto Troloxa, a rezultati su dati kao masa askorbinske kiseline na 100 g ili 100 ml testiranog uzorka (VCEAC- *vitamin C equivalent antioxidant capacity*). Svako jedinjenje koje ima niži redoks potencijal od ABTS^{\bullet} može reagovati sa radikalom (*Re i sar., 1999*).

FRAP- metoda (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay) - Metoda se zasniva se na sposobnosti antioksidanasa da redukuju gvožđe-2,4,6-tripiridil-S-triazin kompleks $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ do intenzivno plavo obojenog kompleksa $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ u kiseloj sredini (Slika 2.18.). FRAP vrednosti se izračunavaju merenjem rasta apsorpcije na $\lambda = 593$ nm i upoređivanjem istih sa standardnim rastvorom obojenih jona, ili standardnim rastvorom antioksidansa (npr. askorbinska kiselina).



Slika 2.18. Redukcija kompleksa $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ do kompleksa $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$.

Svako jedinjenje sa redoks potencijalom nižim od redoks potencijala para Fe(III)/Fe(II), teorijski može redukovati Fe(III) do Fe (II) i usloviti lažno visoke rezultate FRAP- vrednosti. Sa druge strane, mnogi antioksidansi ne mogu dovoljno brzo redukovati Fe(III) kako bi se brzina reakcije mogla meriti u posmatranom vremenskom intervalu (obično 4 minuta). U zavisnosti od vremena analize red njihove reaktivnosti se menja. Polifenoli sa takvim ponašanjem su: kvercetin, feruminska kiselina, kofeinska kiselina, taninska kiselina.

Antioksidansi koji deluju kao ‘gasioci’ radikala (transferi H-atoma) ne mogu se određivati ovom metodom.

FRAP-metoda određuje redukcionu moć na osnovu redukcije jona gvožđa. Produkcija Fe(II) jona, koji je veoma poznati pro-oksidans, može da dovede do stvaranja dodatnih radikala u reakcionom medijumu, kao što je OH[•] iz H₂O₂.

Jedinjenja koja apsorbuju na talasnoj dužini određivanja mogu interferirati i izazvati precenjivanje FRAP vrednosti, npr. neobično visoke vrednosti za bilirubin (duplo više od askorbinske kiseline i Troloxa), jer se oksiduje do biliverdina koji značajno apsorbuje na 593 nm. Niska vrednost pH, koja je neophodna za metodu, može da dovede do precipitacije nekih proteina, kao što je kazein iz mleka (*Kranl i sar., 2005*).

2.5. METALNI JONI

Mineralne materije predstavljaju neorganske elemente koji čine posebnu grupu bitnih faktora ishrane. Održavaju hemijsku ravnotežu organizma, učestvuju u njihovoj izgradnji i posreduju u mnogim životnim funkcijama. U prirodi se nalaze u tlu i u vodi, a odatle dospevaju u biljni i životinjski organizam. Živi organizmi ih ne stvaraju sami, te ih moraju unositi putem ishrane. Biljke se snabdevaju mineralnim materijama iz zemljišta, a životinje i ljudi raznovrsnom ishranom. Minerali su esencijalni nutrijenti. Uneseni hranom dospevaju u ljudski organizam u mnogo većoj količini nego vitamini. Kod odrasle osobe minerali čine čak oko 4 % telesne mase. Najviše ih ima u kostima.

Danas je poznato da mineralne materije, u celini, imaju sledeće uloge:

- održavaju koncentraciju vodonikovih jona na određenom nivou,
- izgrađuju skelet i koštano tkivo,
- učestvuju u izgradnji gotovo svih ostalih ćelija organizma, uključujući tu i izgradnju telesnih tečnosti: krvi, limfe, citoplazme, protoplazme i dr.,
- održavaju osmotski pritisak, od koga zavisi normalan mehanizam ishrane ćelije i ravnoteže tečnosti u organizmu,
- regulišu metabolizam vode,
- održavaju koloidno stanje, koje je važno pri nekim hemijskim reakcijama u ćelijama i tkivima organizama.

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (*eng.* World Health Organization-WHO) (1996), elementi u tragovima se na osnovu hranljivog značaja koji imaju za ljudski organizam dele u tri grupe:

- esencijalni elementi,
- elementi koji su najverovatnije esencijalni i
- potencijalno toksični elementi koji nemaju nikakvu esencijalnu funkciju.

Prema *Dančiću* (2012), minerali se dele na:

- **esencijalne ili glavne:** kalcijum, magnezijum, fosfor, natrijum, kalijum, hlor;
- **esencijalne u tragovima:** gvožđe, bakar, hrom, cink, jod, selen, fluor, kobalt, mangan, molibden;
- **verovatno esencijalne u tragovima:** silicijum, nikl, kalaj, vanadijum;

- **neesencijalne**: arsen, živa, olovo, aluminijum, bor, zlato, srebro, titan, litijum, stroncijum, germanijum, kadmijum, bizmut, rubidijum, brom.

Nedostatak, tako i povišene koncentracije esencijalnih elemenata, mogu imati negativan uticaj na zdravlje ljudi. Sadržaj metala u namirnicama je definisan maksimalno dozvoljenim koncentracijama, koje predstavljaju onu količinu toksične supstance koja kod odrasle osobe od 70 kg, konzumiranjem tokom celog života, neće izazvati neželjene, toksične efekte.

U Tabeli 2.3. prikazane su potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata.

Tabela 2.3. Potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata.

ELEMENT	RDI ¹	DRI ²	UL ³
Ca	1 mg	1,3 mg	2,5 mg
Fe	18 mg	18 mg	45 mg
Mg	400 mg	420 mg	350 mg*
Zn	15 mg	11 mg	40 mg
Se	70 µg	55 µg	400 µg
Co	2 mg	0,9 mg	10 mg
Mn	2 mg	2,3 mg	11 mg

¹Referentni dnevni unos (RDI - Reference daily intake) propisan od strane FDA (Food and Drug Administration), ²Dijetetski referentni unos (DRI - Dietary Reference Intakes) propisan od strane Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, ³Dozvoljena gornja granica unosa (UL - Upper Limit), * gornja granica unosa za Mg koja se odnosi isključivo na unos kroz dijetetske suplemente ili farmaceutske proizvode.

2.6. METODE ANALIZE

2.6.1. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta/Vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. Koristi se za kvantitativno određivanje organskih jedinjenja u rastvoru. Ona je nezamenljiva metoda za identifikaciju prirodnih konjugovanih jedinjenja, kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), poliacetileni, porfirini, flavonoidi, itd. Njene prednosti nad ostalim metodama su u velikoj osetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom.

UV/VIS spektrofotometrija je kvalitativna i kvantitativna metoda.

Kvalitativna analiza zasniva se na činjenici da apsorpcioni spektar supstance zavisi od njenog sastava i strukture. Na osnovu zavisnosti apsorptiviteta talasne dužine ili vrednosti apsorptiviteta na određenoj talasnoj dužini moguće je identifikovati apsorbujuću supstancu.

Kvantitativna analiza zasnovana je na *Lambert-Beer*-ovom zakonu, koji kaže da je apsorbanca rastvora direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi:

$$A = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (16)$$

A-apsorbancija

I_0 -intenzitet upadnog svetla

I-intenzitet propuštenog svetla

ε -konstanta (molarna apsortivnost)

c-tražena koncentracija supstance

l- debljina sloja

U rastvoru koji sadrži više komponenti koje apsorbuju elektromagnetno zračenje, a koje međusobno ne reaguju, apsorbanca rastvora jednaka je zbiru pojedinačnih apsorbanca svih komponenti.

$$A = \sum A_i = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_i \quad (17)$$

Molarna apsorptivnost, (naziva se još i ekstinkcioni koeficijent) je karakteristika analizirajuće supstance i konstantna je vrednost za konstantne uslove snimanja (talasna dužina, temperatura i rastvarač). U praksi, vrednost molarne apsorptivnosti takođe zavisi i od karakteristika upotrebljenog aparata. Zbog toga se u kvantitativnoj analizi najčešće ne koristi već određena vrednost, nego se svaki put snima kalibraciona prava koristeći standardni rastvor ispitivane supstance.

Za kvantitativnu analizu je bitno da se merenja apsorbance vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osetljivošću. Da bi se to postiglo bitan je izbor talasne dužine na kojoj se merenje vrši. Ona mora da ispuni nekoliko uslova:

- merenjem mora da se postigne maksimalna osetljivost,
- mala promena talasne dužine ne sme da utiče na reproduktivnost,
- mora da važi *Lambert-Beer-ov zakon*.

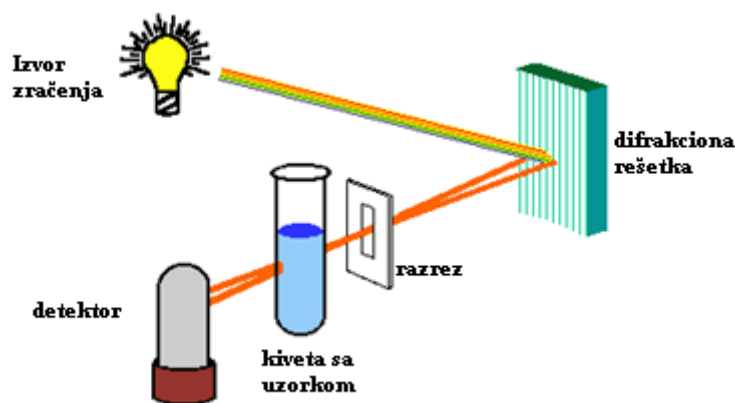
U zavisnosti od uslova, merenje apsorbance se može vršiti na:

- talasnoj dužini gde je maksimalna apsorpcija, λ_{\max} ,
- na talasnoj dužini optimalne apsorbance, λ_{opt} ,
- na talasnoj dužini izobestičke tačke, λ_{izob} .

Lambert-Berr-ov zakon ne važi kada:

- rastvorak postoji u više oblika koji su u međusobnoj ravnoteži,
- rastvorak i rastvarač grade asocijat,
- postoji termička ravnoteža između osnovnog i pobuđenog stanja,
- jedinjenja fluoresciraju ili se hemijski menjaju prilikom apsorpcije zračenja (*Todorović, 1997*).

Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Sastoji se od izvora zračenja, monohromatora i detektora. Monohromator menja talasnu dužinu zračenja koje propušta. Registrovanjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbovao, propustio ili reflektovao u zavisnosti od talasne dužine nastaje spektar (Slika 2.19.).



Slika 2.19. Šema spektrofotometra.

Najčešće se mere tečni uzorci, iako se mogu meriti i čvrsti i gasoviti uzorci. Uzorak je smešten u prozirnoj posudi (kiveti) koja ja najčešće širine 1 cm. Za vidljivi deo spektra kivete su staklene, a za UV deo spektra (staklo ne propušta UV zračenje) koriste se kvarcne kivete.

Za vidljivi deo spektra najčešće se koristi volframova lampa, dok se za ultraljubičasti deo spektra koristi deuterijumska lampa.

Spektrofotometri se dele na jednozračne i dvozračne. Jednozračni spektrofotometri imaju jedan svetlostni put i jedan uzorak. Referentni uzorak (slepa proba) se mora analizirati posebno. Dvozračni spektrofotometri imaju dva svetlostna puta i istovremeno mogu primiti dva uzorka: mereni uzorak i referentni uzorak (slepu probu). Spektri se automatski oduzimaju jedan od drugoga, pa naknadna obrada spektra nije potrebna.

2.6.2. HPLC hromatografija

Visoko-efikasna tečna hromatografija (*high performance liquid chromatography* – HPLC) je metoda visoke tačnosti, preciznosti, brzine i efikasnosti, a veoma niskih granica detekcije. Ovo je čini pogodnom kako za kvalitativne tako i za kvantitativne analize, posebno uzoraka u kojima je koncentracija ispitivane supstance niska.

Hromatografske metode su separacione metode koje se zasnivaju na procesu raspodele molekula ili jona uzorka između mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Stacionarna faza, mobilna faza i analizirana supstanca su osnovni elementi hromatografskog sistema (*Milovanović, 1985*). *Mobilna faza* je tečnog agregatnog stanja, najčešće voda ili neki organski rastvarač, dok je *stacionarna faza* granulovana čvrsta faza ili tečnost nanosena na granule čvrstog nosača i nerastvorna je u tečnosti koja predstavlja mobilnu fazu.

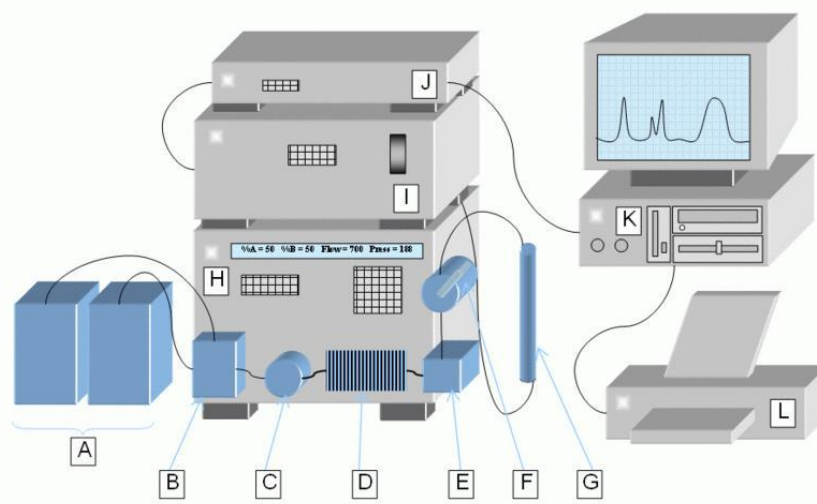
Kod HPLC hromatografije mobilna, tečna faza funkcioniše pod visokim pritiskom, što je razlikuje od ostalih tečnih hromatografija. Visok pritisak omogućava kontinuiran protok mobilne faze i uspostavljenje dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom, što je uslov dobre selektivne raspodele komponenti datog uzorka. Visok pritisak omogućuje i efikasno eluiranje razdvojenih komponenti smeše iz kolone. Tu su pre svega snažne pumpe koje mogu stvarati pritisak 106 Pa (10-tak atmosfera), osposobljene za kontinualnu promenu brzine mobilne faze. Uzorak se ubacuje u inekcioni blok, nakon čega ulazi u mobilnu fazu pod visokim pritiskom, podleže razdvajanju na koloni, zatim detekciji i na kraju analizi kao i kvantitativnoj kolekciji ukoliko se koristi preparativni tip kolone.

HPLC metoda se izvodi tako što se analizirana smeša jedinjenja u odgovarajućem rastvaraču (mobilna faza) propušta kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza. Raspodela komponenti uzoraka između faza je uzrokovana fizičko-hemijskim procesima: adsorpcijom,

raspodelom između dve faze, jonskom izmenom, gel filtracijom, stvaranjem jonskih parova. Posledica toga je da se komponente smeše različito raspodeljuju između faza i pod uticajem mobilne faze kreću se kroz stacionarnu fazu različitim brzinama.

Uređaj za HPLC se sastoji od sledećih komponentata (Slika 2.20.):

- Rezervoar mobilne faze
- Pumpa
- Injektor
- Kolona
- Detektor



Slika 2.20. Šema uređaja za tečnu hromatografiju visokih performansi: A-rezervoar mobilne faze; B-ventil za mešanje i pumpa; C- ventil; D-uređaj za kontrolu pritiska; E-komora za mešanje (mikser); F-injektor; G-kolona; H-HPLC komponenta; I-detektor; J-kontroler; K-kompjuter; L-štampač.

U zavisnosti od polarnosti uzorka i rastvarača (mobilne faze) HPLC metoda se deli na:

- HPLC na normalnim fazama i
- HPLC na obrnutim fazama

HPLC na normalnim fazama koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu, a koristi se kada je supstanca koja se analizira polarna. Polarna supstanca se adsorbuje i zadržava na česticama stacionarne faze. Jačina adsorpcije je veća što je veća polarnost supstance, a samim tim veće i vreme zadržavanja. Korišćenje polarnijih rastvarača u mobilnoj fazi smanjuje retenciono vreme. Ovaj tip hromatografije je napušten 1970-tih sa razvojem

HPLC-a na obrnutim fazama, zbog slabe reproduktivnosti, usled promena na česticama stacionarne faze pod uticajem rastvarača.

HPLC na obrnutim fazama (RP-HPLC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Najčešća stacionarna faza je silikatna, tretirana sa RMe_2SiCl , gde je R alkilna grupa ravnog lanca kao $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ili C_8H_{17} . Vreme zadržavanja je duže za manje polarne supstance. Vreme zadržavanja se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu a smanjuje se dodatkom hidrofobnih rastvarača. RP-HPLC funkcioniše na principu hidrofobnih interakcija, koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog rastvarača i relativno nepolarne supstance koja se analizira i nepolarne stacionarne faze.

Na brzinu eluiranja utiče pH, zbog mogućnosti promene polarosti supstance. Zbog toga se često u mobilnu fazu dodaju puferi. Kolone za RP-HPLC ne bi trebalo koristiti sa jakim bazama, zbog mogućnosti razgradnje silikatnih čestica.

2.6.2.1. Kvalitativna HPLC analiza

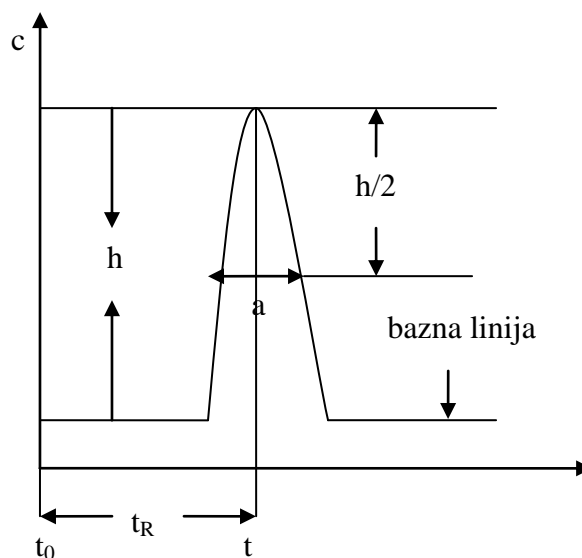
Dobijen hromatogram sa pikovima koji predstavljaju izdvojene komponente ukazuje samo na broj komponenti u nekom uzorku, odnosno smeši, ali ništa ne kazuje o vrsti supstance. Kod kvalitativne analize identifikacija se vrši poređenjem standarda sa nepoznatom komponentom ispitivanog uzorka. Upoređuju se vreme zadržavanja standarda i izdvojene komponente u hromatografskoj koloni. To jedino i ima fizički smisao jer se vrši merenje vremena od ulaska uzorka u kolonu do dostizanja maksimuma pika izdvojene komponente. Vreme zadržavanja ili kako se u literaturi naziva *retenciono vreme* (lat. *retentio* – zadržavanje) meri se od trenutka kada se uzorak ubaci u kolonu do izlaska, jedne ili više komponenti iz kolone.

Kada se identifikuje komponenta tada se metodom standardnog dodatka, odnosno dodatkom određene količine standarda u ispitivanom uzorku, sa apsolutnom sigurnošću identifikuje određena komponenta pod uslovom da se standardni dodatak i izdvojena komponenta po retencionom vremenu potpuno poklapaju. To se utvrđuje na osnovu povećanja visine pika izdvojene komponente.

2.6.2.2. Kvantitativna HPLC analiza

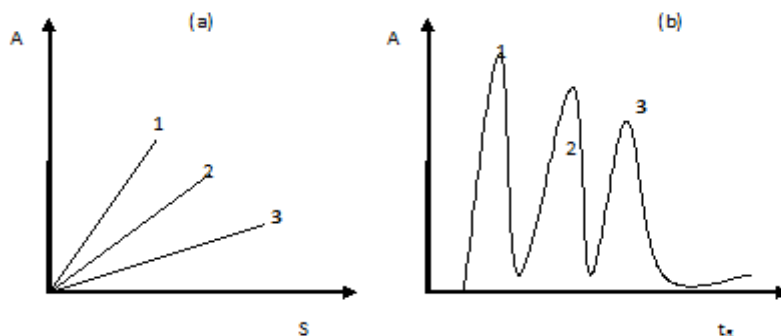
Visina pika, ili tačnije površina ispod pika, izdvojene komponente direktno je proporcionalna koncentraciji. Kada se radi o simetričnom piku tada se najčešće koristi

metoda poluvisine. Naime, kada se visina pika h pomnoži sa njegovom širinom a na poluvisini $h/2$ dobija se vrednost koja približno predstavlja 94% površine ispod pika. Ako se ista metoda koristi i za standard i za uzorak greška od 6% se poništava, a dobijeni rezultati potpuno zadovoljavaju (Slika 2.21.).



Slika 2.21. Kvantitativna HPLC analiza.

Treba voditi računa da izračunate površine pikova predstavljaju meru relativnih koncentracija komponenti u smeši. Ukoliko se žele apsolutne koncentracije komponenata potrebno je napraviti kalibracioni dijagram koji će povezati površine pikova sa apsorbcijama odgovarajućih komponenti. Osnov za povezivanje je kalibracioni dijagram $A = f(S)$, prikazan na Slici 2.21., gde je A – apsorbcija, a S – integrisana površina pikova. ApSORBANCE A su određene za niz standardnih koncentracija rastvora supstanci, koje se analiziraju HPLC-om. Kada se nakon izvršene HPLC analize odredi integrisana površina za dati pik, sa kalibracionog dijagrama pročita se odgovarajuća vrednost apsorbcije A na ordinati, a odatle se preko Beer-ovog zakona ($A = abc$) izračuna i tačna koncentracija (Slika 2.22.).



Slika 2.22. Kalibracioni dijagram (a) i hromatogram (b) za tri komponente date smeše, gde je A – apsorbancija, S – površina pika, t_R – retenciono vreme.

Nekada je potrebno da pored određivanja tačne koncentracije komponenti u uzorku i njihova kvantitativna kolekcija (skupljanje). Tada se koriste preparativne kolone, znatno šireg prečnika (i do 1cm) posebno konstruisane za visoki pritisak. Kolekcije se vrši prostim skupljanjem odgovarajućih vrakcija mobilne faze koje sadrže datu komponentu. Početak i kraj kolekcije se vezuje za momente pojavljivanja i nestajanja odgovarajućeg pika na hromatogramu.

2.6.3. Induktivno spregnuta plazma (ICP)

Metode analize teških metala u uzorcima namirnica i uzorcima iz životne sedine se zasnivaju na različitim spektrometrijskim analitičkim tehnikama: atomska apsorpciona spektrofotometrija (AAS), optička emisiona spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES) i masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-MS) (Perić-Grujić i sar., 2009).

ICP spektrometrija je relativno nova metoda emisione spektrohemijske analize koja koristi ICP kao izvor pobuđivanja u kombinaciji sa spektrometrima.

Velika prednost ove metode jeste da se zbog visoke temperature plazme, metoda u principu koristi za određivanje svih elemenata periodnog sistema, osim za argon. Upotrebom hidridne tehnike mogu se odrediti niske koncentracije elemenata koji grade hidride (arsen, bizmut, germanijum, antimon, selen, kalaj i telurijum). Međutim, u praksi je ograničena za određivanje nekih elemenata koji zahtevaju posebne uslove (npr. radioaktivnih) ili posebnu optiku (kao što su hlor, bor i fluor) ili se određuju sa manjom osetljivošću nego pomoću drugih metoda (kao azot ili rubidijum).

Prednosti ICP-spektrometrije nad drugim metodama emisione spektrohemijske analize su (Antić-Jovanović, 2006):

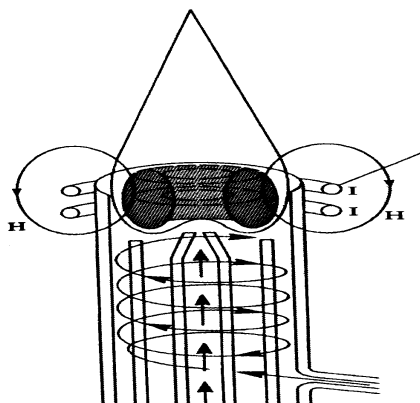
- *moгуćnost izvođenja višeelementarne analize*: za manje od dva minuta može da se odredi 20-60 elemenata u probi, zavisno od tipa aparata, sa tačnošću koja je istog reda veličine ili veća nego u drugim instrumentalnim metodama;
- *široka dinamička oblast*: kao posledica malog efekta samoapsorpcije u posmatranoj zoni plamena, analitička kriva je linearna u intervalu koncentracija od nekoliko redova veličine, tako da podjednako mogu da se određuju elementi, kako niskih koncentracija (ispod 1 µg), tako i na visokom, što je uslov za izvođenje višeelementne analize;
- *analiza uzoraka u obliku rastvora*: prevođenje analita u rastvor znatno uprošćava analizu, posebno heterogenog materijala, pošto se pri rastvaranju, uz eventualno prethodno topljenje, razaranje i slično, svi elementi prevode u isti hemijski oblik, čime se redukuju efekti osnove i olokšava priprema standarda;
- *mala količina rastvora* dovoljna za analizu, što podrazumeva i malu količinu uzorka;
- *relativno dugo vreme boravka čestica u plazmi*: zadržavanje čestica u plazmi nekoliko milisekundi i njena inertna atmosfera doprinose efikasnosti atomizacije i pobuđivanja, a time i osetljivosti određivanja.

Izvor pobuđivanja - Izvor ima osobinu da svojom energijom dovede atome u stanje u kome su sposobni da emituju zračenje. U tom smislu svaki izvor prilagođen za potrebe kvalitativne i kvantitativne spektrohemijske analize mora da obezbedi isparavanje uzorka kada je u tečnom ili čvrstom stanju, atomizaciju čestica pare na slobodne atome i pobuđivanje atoma.

Induktivno spregnuta plazma - Kao izvor pobuđivanja se najčešće koristi induktivno spregnuta plazma ili skraćeno ICP (*Inductively Coupled Plasma*). To je jonizovan gas koji se zbog jedinstvenih osobina smatra posebnim agregatnim stanjem materije uz čvrsto, tečno i gasovito stanje. Slobodna naelektrisanja (katjoni i elektroni) čine plazmu električno provodljivom zbog čega ona snažno oseća uticaj elektromagnetnog polja. To je bezelektrodna argonska (ređe azotna) plazma koja radi na atmosferskom pritisku, a održava se induktivnim sprežanjem sa radiofrekventnim elektromagnetskim poljem.

Plazmenik (Slika 2.23.) se sastoji od tri koncentrične kvarcne cevi kojima struji argon ukupne brzine između 5 i 20 L min⁻¹. Prečnik najveće cevi je približno 2,5 cm. Kroz unutrašnju cev se uvodi uzorak, najčešće u obliku rastvora koji se prevodi u fini aerosol pomoću struje argona od približno 1 L min⁻¹. Argon za formiranje plazme uvodi se kroz

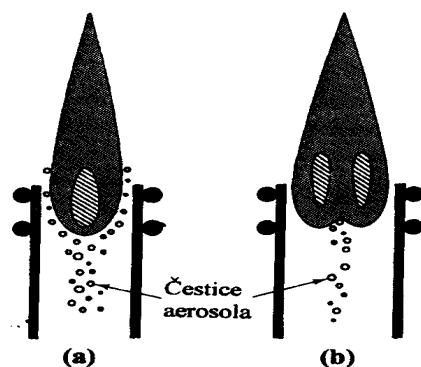
srednju cev dok se termička izolacija postiže tangencionim uvođenjem struje argona kroz spoljašnju cev gorionika (prečnika 15-30 mm), brzinom od $\sim 10 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$. Ova struja hladi zidove kvarcne cevi ali takođe i stabilizuje i centrira plazmu. Oko spoljašnje kvarcne cevi obmotana su 3-4 navoja indukcionog kalema vezanog za radiofrekventni generator frekvencije od 5-50 MHz i izlazne snage 1-5 kW. Visokofrekventna struja koja protiče kroz indukcionom kalem stvara oscilatorno magnetno polje H koje indukuje elektrone u gasu koji protiče unutar kvarcne cevi. Oni se ubrzavaju vremenski promenljivim električnim poljem, što dovodi do zagrevanja i dodatne jonizacije.



Slika 2.23. Izgled plazmenika.

Temperatura plazme varira od 6000 do 10000 K i opada sa visinom iznad indukcionog kalema tako da se za svako određivanje može odabrati pogodna visina na kojoj će se vršiti posmatranje.

Ako se koristi polje niže frekvencije, npr. od 5 MHz, plazma ima oblik kapi (Slika 2.24.a). Pri uvođenju aerosola, kapljice zaobilaze ovaj deo zbog velikog otpora (prouzrokovanog širenjem gasa), što ima za posledicu nedovoljno zagrevanje uzorka, odnosno neefikasno isparavanje. Primenom generatora veće frekvencije (obično 27 MHz) najtopliji deo plazme dobija prstenast ili toroidni oblik (Slika 2.24.b) pošto je vrtložna struja elektrona tada bliža kalem, odnosno spoljašnjem sloju plazme. U ovom slučaju aerosol ulazi u središnji deo, tzv. kanal plazme, u kome je temperatura nešto niža (6000-8000 K), a otpor manji. U kanalu plazme čestice se zadržavaju relativno dugo (2-3 ms) što, u kombinaciji sa visokom temperaturom, obezbeđuje efikasno isparavanje, atomizaciju i pobuđivanje.



Slika 2.24. Oblik plazme.

Argon kao noseći gas obezbeđuje hemijski inertnu sredinu tako da atomi ostaju relativno dugo u slobodnom stanju, što povećava verovatnoću pobuđivanja, a samim tim i osetljivost određivanja, koja je za većinu elemenata reda $\mu\text{g cm}^{-3}$ (ppm).

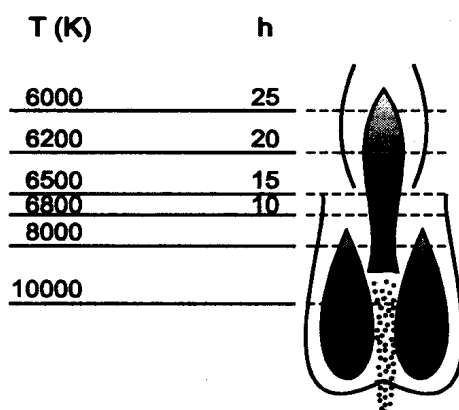
Izgled plazme - Zbog visokih temperatura u ICP izvorima dobijaju se dosta složeni spektri. Tipična plazma ima vrlo intenzivno, blistavo belo jezgro prekriveno repom sličnom plamenu (Slika 2.25.).



Slika 2.25. Izgled plazme.

U plazmi mogu da se razlikuju tri oblasti različitih spektralnih osobina (Slika 2.26.): visokotemperaturno jezgro u čijem centralnom delu (kanalu plazme) uzorak podleže

efikasnom isparavanju i atomizaciji, analitička zona koja se nalazi 15-20 mm iznad indukcionog kalema, u kojoj se pobuđuje većina elemenata i, niskotemperaturni deo – rep plazme, u kome se pobuđuju elementi sa niskim energijama pobuđivanja.

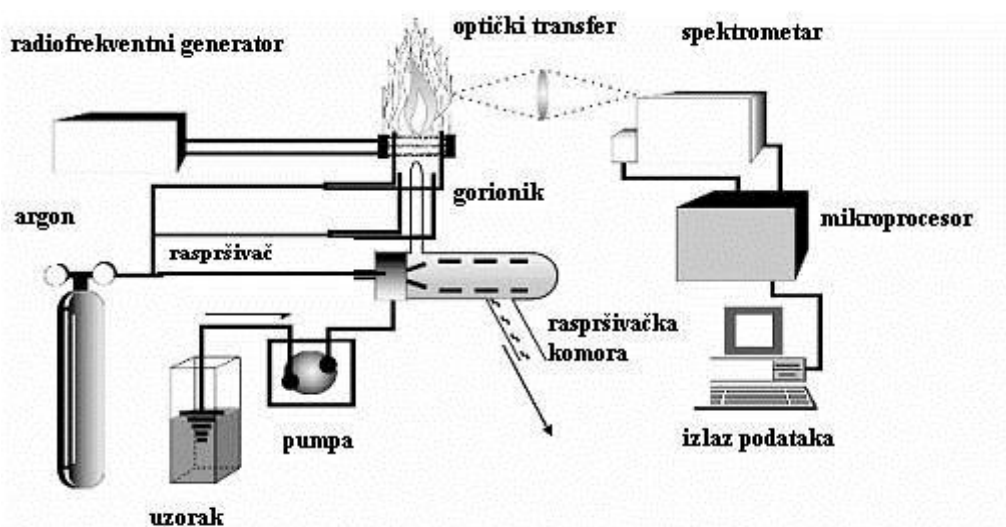


Slika 2.26. Temperaturne zone u plazmi.

Uvođenje analita u plazmu - ICP-spektrometrija se uspešno koristi za analizu različitih uzoraka (stena, minerala, vode, bioloških materijala itd.) u rastvoru. Određivani elementi se po pravilu prevode u rastvor koji se u obliku aerosola uvodi u plazmu.

Za raspršivanje rastvora koriste se uglavnom koncentrični pneumatski raspršivači istog tipa kao u plamenoj spektrometriji, od kojih se razlikuju samo po veličini protoka gasa i prečniku kapilare.

Šema optičkog emisionog spektrometra data je na Slici 2.27.



Slika 2.27. Optički emisioni spektrometar.

Tačnost i osetljivost metode - Tačnost metode se kreće od 1-10% u zavisnosti od koncentracije određivanog elementa. U praksi, sa komercijalnim aparatima namenjenim analitičkim potrebama, granice detekcije (LD) mogu da budu veće za faktor 10 i više, pošto zavise u velikoj meri od kvaliteta (moći razlaganja i svetlosne jačine) spektrometra i tipa raspršivača.

ICP spektrometrija je superiornija u detekciji elemenata sa većom energijom pobuđivanja, pa se alkalni metali i danas u analitičkim laboratorijama određuju plamenom spektrometrijom.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJAL

Za analizu je korišćeno 10 uzoraka ječma, 8 uzoraka hmelja i 24 vrste svetlih, tamnih i bezalkoholnih piva (Carlsberg, Efes Draft, Efes Pilsener, Pils Plus, Staropramen, Nikšičko, Lav, Lowenbrau, Beck's, Amstel, Tuborg, Heineken, Stella Artios, Leffew, Jelen, Laško, Weifert, Guinness, Jelen Cool, Schlossgold, Union) kupljenih u lokalnim marketima u Srbiji.

3.2. REAGENSI

U radu korišćeni reagensi: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), kalijum-persulfat, metanol, etanol, acetonitril, mravlja i sirćetna kiselina kupljeni su kod J. T. Baker (Deventer, Holland). Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) i 2,4,6-tris-2-piridil-1,3,5-triazin (TPTZ) su kupljeni od Acros Organics (Geel, Belgium). Folin-Ciocalteu reagens (FC), Na_2CO_3 , NaNO_2 , NaOH , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HCl , FeCl_3 , trihlorsirćetna kiselina (TCA) i AlCl_3 kupljeni su kod Merck (Darmstadt, Germany). Korišćeni su i sledeći sertifikovani standardi: galna kiselina, kupljena od Carl Roth (Karlsruhe, Germany), katehin, epikatehin, ferulna, kafena, vanilinska, sinapinska, salicilna, 4-hidroksibenzoeva i 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, kupljeni kod Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), kvercetin, kvercetin-rutinozid, kvercetin-glukozid, kemferol, kemferol-glukozid, p-kumarna, hlorogenska i protokatehinska kiselina, kupljeni kod Merck (Darmstadt, Germany) i kvercetin-galaktozid kupljen od Extrasynthese (Genay, France). Sve hemikalije i rastvarači koji su korišćeni bili su p.a. i HPLC čistoće.

Svi rastvori, koji se nisu mogli pripremiti kao primarni standardni rastvori, standardizovani su poznatim metodama u cilju određivanja tačne koncentracije.

Sudovi koji su korišćeni prani su etanolnim rastvorom KOH , zatim rastvorom HCl (1:1), isprani česmenskom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Vodeni rastvori su pripremani dejonizovanom vodom specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$.

3.3. APARATI

Za ispitivanje sadržaja fenolnih komponenti, antioksidativne aktivnosti, kao i metalnih jona u odabranim uzorcima korišćena je sledeća aparatura:

- Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmeravanje uzoraka i čvrstih supstanci;
- Blender za homogenizovanje materijala;

- Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations za termostatiranje rastvora;
- pH metar Hanna Instruments za merenje pH vrednosti rastvora;
- Varijabilne automatske pipette Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
- Hronometar za merenje vremena;
- MicroMed high purity water system, TKAWasseraufbereitungsszsteGmbH za dobijanje demineralizovane vode;
- Električna peć za žarenje (VIMS, Srbija);
- Ultrazvučno kupatilo Bandelin SONOREX® Digital 10 P (Sigma, USA);
- HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) koji se sastoji od kvaternarne pumpe G1354A, automatskog injektora G1329A, termostatiranog kolonskog dela G1316A, UV/Vis detektora G1315D, fluorescentnog detektora G1321A kontrolisanog sa HP Chemstation softverom, za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja;
- UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm za određivanje sadržaja i ispitivanje kinetike fenolnih jedinjenja;
- ICP-OES iCAP 6000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka) za kvalitativno i kvantitativno određivanje metalnih jona.

3.4. METODE

3.4.1. Priprema uzoraka

Uzorci za analizu su pripremani postupkom ekstrakcije maceracijom ili postupkom mineralizacije u zavisnosti da li se u njima određuje sadržaj fenolnih komponenti ili sadržaj metalnih jona.

3.4.2. Postupak ekstrakcije uzoraka za UV/Vis, HPLC i ICP-OES analizu

Odmereno je 2 g svakog uzorka ječma a zatim je vršena ekstrakcija rastvaračem etanol-voda (30/70, v/v%). Rastvarač je zakišljen pomoću hlorovodonične kiseline. Ekstrakcija je vršena sa po 60 ml rastvarača u toku 2 h. Suspenzija je filtrirana kroz Bihnerov levak i Whatman No.1 filter papir. Ekstrakti su smešteni u frižideru i na tamnom mestu do njihovog korišćenja (*Iacopini i sar., 2008; Borowska i sar., 2009; Katalinić i sar., 2010*).

Na isti način pripremljeni su ekstrakti hmelja ali bez zakišeljavanja rastvarača za ekstrakciju.

Za praćenje kinetike ekstrakcije, proces ekstrakcije uzoraka ječma i hmelja je vršen pri različitim vremenima (1, 5, 10, 15, 20, 40, 80 i 120 minuta) i temperaturama (25, 35 i 45 °C).

Kupljeni uzorci piva su čuvani u frižideru na 4°C i analizirani odmah nakon otvaranja kako bi se sprečio gubitak fenolnih jedinjenja oksidacijom.

3.4.3. Postupak mineralizacije

Suva mineralizacija: Uzorci (ječam, hmelj) tačno odmerene mase (2 g), prebačeni su u porculanski lončić i zagrevani u električnoj peći. Peć je programirana da podiže temperaturu sa 50 °C na 450 °C u toku 8 sati a zatim da tu temperature održava konstantnom narednih 12 časova. Ohlađeni uzorak rastvoren je u 2,5 ml HNO₃ (1:1, v/v), filtriran kroz filter papir (plava traka) i dopunjen dejonizovanom vodom do 50 ml (*Radojević i Bashkin, 1999*).

Prednosti suve mineralizacije jesu mogućnost spaljivanja velike količine uzoraka, mala potreba za reagensima i pogodnost tehnike za pripremu velikog broja uzoraka. Nedostaci se ogledaju u gubicima usled zaostajanja na zidovima suda, kontaminaciji od suda za spaljivanje i peći za žarenje, gubitku pepela male gustine usled strujanja vazduha (otvorena vrata peći za žarenje) i teškoćama pri rastvaranju određenih metalnih oksida.

Mokra mineralizacija : Zapremina uzorka (pivo, ekstrakti ječma i hmelja) od 5 ml je prenešena u erlenmajer od 50 ml i dodato je 10 ml koncentrovane azotne kiseline i 4 ml 30% vodonik peroksida (HNO₃:H₂O₂ je 5:2). Tako pripremljen uzorak zagrevan je na 140±10°C oko 30 minuta. Kada se rastvor ohladi do sobne temperature procediti, preneti u normalni sud od 25 ml i dopuniti do crte 0,5% HNO₃.

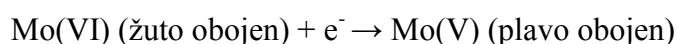
To je relativno brza i jeftina tehnika (primenjuje se oprema koja se koristi u rutinskoj analizi), a njeni nedostaci su: niske temperature mineralizacije (temperature ključanja kiseline ili primenjene smeše), rizik od kontaminacije iz laboratorijskog vazduha, potrebna veća količina reagenasa, veliki gubici elemenata u tragovima.

3.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA

UV/Vis spektrofotometrija je primenjena za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti primenom DPPH, ABTS i FRAP testa.

3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima korišćena je modifikovana metoda po Folin-Ciocalteu (*Singleton i Rossi, 1965; Stratil i sar., 2006*). Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću reagensa, odnosno rastvora Folin-Ciocalteu. Rastvor Folin-Ciocalteu sadrži smešu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Ovaj reagens oksidiše fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida i molibden-oksida.



Rastvor postaje intenzivno plave boje, čiji je intenzitet srazmeran količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini $\lambda = 760$ nm.

Rastvori i reagensi:

- 20% Na_2CO_3 ,
- Folin-Ciocalteu reagens
- Standardni rastvor galne kiseline

Postupak:

U normalni sud od 10 ml unosi se zapremina uzorka od (0,5 ml ekstrakta ječma; 0,1 ml ekstrakta hmelja; 0,25 ml piva). Nakon toga, dodaje se 2,5 ml dejonizovane vode (smeša etanol-voda, 50:50 v/v, u slučaju piva), 0,5 ml rastvora Folin-Ciocalteu i 2 ml rastvora natrijum karbonata (20%). Sud se dopuni do crte vodom (smeša etanol-voda, 50:50 v/v, u slučaju piva) i nakon 2 h se meri apsorbanca na talasnoj dužini $\lambda = 760$ nm, u odnosu na vodu kao slepu probu.

Proračun:

Na osnovu izmerenih apsorbaneci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) polifenolnih jedinjenja korišćenjem jednačine prave ($A = 0,0855 [\text{GA}] + 0,0065$, $n = 5$, $r^2 = 0,9998$), i dobijeni rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mgGAE/g za ječam i hmelj i mgGAE/L za pivo).

3.5.2. Inicijalni sadržaj polifenolnih jedinjenja u ječmu i hmelju (q_0)

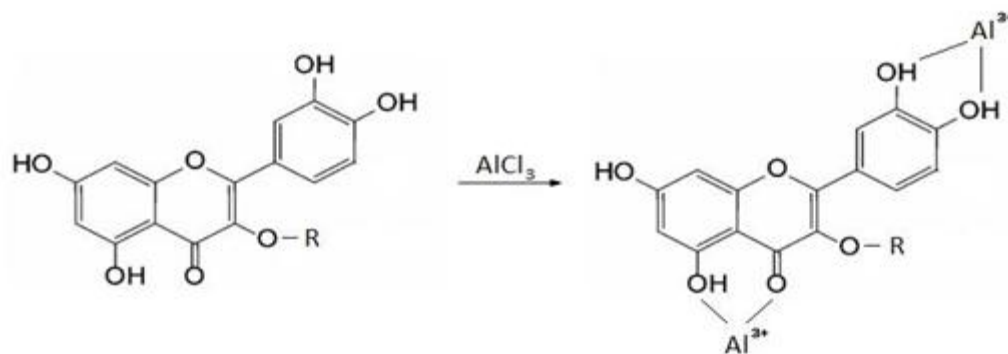
Maceriran biljni materijal (2 g) je u erlenmajeru od 250 ml preliven sa 100 ml ekstrakcionog rastvarača. Ekstrakcija je vršena postupkom maceracije u toku 120 minuta. Ekstrakti su odvojeni od ostatka filtriranjem kroz Whatman No. 1 filter papir. Ostatak je ekstrahovan dva puta istim svežim rastvaračem a dobijeni ekstrakti su spojeni. Ekstrakti su zatim koncentrovani i iz njih je uklonjen rastvarač na sniženom pritisku na 45°C pomoću vakuum uparivača (BUCHI Rotavapor R-200). Osušeni, suvi i koncentrovani ekstrakti su rastvoreni u ekstrakcionom rastvaraču do analize. Osušeni ekstrakti su pripremljeni tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost.

3.5.3. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u zasićenim tečnim ekstraktima ječma i hmelja (C_{max})

Maceriran biljni materijal (2 g) je u erlenmajeru od 250 ml preliven sa 100 ml ekstrakcionog rastvarača. Ekstrakcija je vršena postupkom maceracije u toku 120 minuta. Tečni ekstrakt je odvojen kao ranije i korišćen za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz daljeg dela (2 g) biljnog materijala. Ekstrakcija je ponovljena sa tečnim ekstraktom. Rastvarač je uklonjen na rotacionom uparivaču na 45°C. Osušeni, suvi i koncentrovani ekstrakti su rastvoreni u ekstrakcionom rastvaraču do analize. Osušeni ekstrakti su pripremljeni tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost.

3.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Flavonoidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalne komplekse (*Jia i sar., 1999*). Naročito je važan kompleks sa Al^{3+} (Slika 3.1.). Sadržaj ukupnih flavonoida određivan je korišćenjem spektrofotometrijske metode koja je zasnovana na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijuma (*Ordomb i sar., 2006, Zhishen i sar., 1999*).



Slika 3.1. Kompleks Al^{3+} jona sa rutinom.

Rastvori i reagensi:

- 5% NaNO₂
- 2% AlCl₃
- 1mol/L NaOH
- Standardni rastvor katehina i kvercetina (0,5 mg/L)

Postupak:

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem zapremine uzorka od (2 ml ekstrakta ječma; 0,5 ml ekstrakta hmelja; 0,25 ml piva), 3 ml dejonizovane vode (smeša etanol-voda, 50:50 v/v, u slučaju piva) i 0,3 ml 5% NaNO₂. Nakon 5min stajanja na sobnoj temperaturi dodato je 3 ml 1% AlCl₃, nakon 5 minuta još 2 ml 1mol/L NaOH i dejonizovana voda (smeša etanol-voda, 50:50 v/v, u slučaju piva) do 10 ml. Apsorbanca je merena na $\lambda = 510$ nm (katehin) i $\lambda = 360$ nm (kvercetin), u odnosu na dejonizovanu vodu kao slepu probu.

Proračun:

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora katehina (za analizu ječma i hmelja) i kvercetina (za analizu piva) određuje se koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) flavonoida korišćenjem jednačina: ($A = 0,02486 [C] - 0,00507$, $n = 7$, $r^2 = 0,9994$) i ($A = 0,0592 [Q] + 0,8718$, $n = 5$, $r^2 = 0,9992$), a zatim se sadržaj ukupnih flavonoida u polaznom uzorku izražava kao mg ekvivalenta katehina na g biljnog materijala \pm standardna devijacija (mg CE/g \pm SD), odnosno mg ekvivalenta kvercetina po L piva \pm standardna devijacija (mg QE/L \pm SD).

3.5.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom

Postupak:

Za DPPH test (*Brand-Williams i sar., 1995*), rastvor DPPH reagensa ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) je pripremljen u metanolu. 5 ml ovog rastvora i 0,5 ml ekstrakta ječma ili 0,1 ml ekstrakta hmelja, odnosno 100 μl piva, je pomešano u normalni sud od 10 ml koji je dopunjen metanolom (smeša metanol-voda, 50:50 v/v, u slučaju piva) do crte. Obezbojavanje DPPH radikala je mereno na 520 nm 30 minuta nakon reakcije, u odnosu na metanol kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Proračun:

Na osnovu izmerenih razlika apsorbanci $\Delta A = A_{\text{slepa proba}} - A_{\text{uzorak}}$, sa kalibracione krive standardnog rastvora troloksa određena je ukupna antioksidativna aktivnost u $\mu\text{mol/ml}$

korišćenjem jednačine prave ($\Delta A = 0,0313 [T] - 0,01$, $n = 5$, $r^2 = 0,9998$), a zatim je ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena kao μmol ekvivalenta troloksa na gram biljnog materijala za ječam i hmelj ($\mu\text{molTE/g}$), odnosno mmolTE/L za uzorke piva.

3.5.6. *Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS testom*

Postupak:

ABTS test je izveden metodom koju su opisali Re (*Re i sar.*, 1999) i Arts (*Arts i sar.*, 2004) uz male izmene. ABTS je rastvoren u metanolu do koncentracije $7 \cdot 10^{-3}$ mol/L. ABTS radikal katjon nastaje kao proizvod reakcije između ABTS rastvora i $2,4 \cdot 10^{-3}$ mol/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Nakon stajanja u mraku na sobnoj temperaturi 12-16 sati pre upotrebe. Rastvor $\text{ABTS}^{\cdot+}$ je razblažen metanolom do apsorbanace od $0,7 \pm 0,02$ na 734 nm. 0,1 ml ekstrakta ječma i hmelja, odnosno 100 μl uzorka piva, je pomešano sa 3,9 ml rastvora ABTS radikal katjona. Nakon 6 minuta reakcije na sobnoj temperaturi meri se smanjenje apsorbanace na 734 nm ($\Delta A = A_{\text{blank}} - A$).

Proračun:

Rezultati su predstavljeni na sledeći način: TEAC (antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa), izračunat iz standardne krive za troloks ($\Delta A = 0,0262 [T] - 0,0154$, $n = 5$, $r^2 = 0,9975$, gde je $[T]$ koncentracija troloksa u $\mu\text{mol/ml}$) i izražen kao μmol ekvivalenta troloksa na gram biljnog materijala za ječam i hmelj ($\mu\text{molTE/g}$), odnosno mmolTE/L za uzorke piva.

3.5.7. *Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP testom*

Postupak:

FRAP test je izveden po proceduri koju su opisali Benzie i Strain (*Benzie i Strain*, 1996). Određena zapremina ekstrakta (5 ml ekstrakta za ječam, 1 ml ekstrakta za hmelj i 100 μl uzorka piva) pomešana je dejonizovanom vodom, a zatim je dodato 2,1 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa (25 ml acetatnog pufera, 0,3 M, pH 3,6 + 2,5 ml 10 mM TPTZ u 40 mM HCl + 2,5 ml 20 mM FeCl_3). Nakon inkubacije od 5 min na 37°C merena je apsorbanca na 595 nm. FRAP reagens je termostatiran na 37°C pre upotrebe.

Proračun:

Koncentracija Fe^{2+} (μM) ekvivalentata u svakom ekstraktu očitana je direktno sa kalibracione krive i preračunata pomoću jednačine prave ($A = 0,02344 [\text{Fe}^{2+}] + 0,00702$, $n =$

6, $r^2 = 0,9999$) kao ekvivalent gvožđa(II) na g biljnog materijala ($\mu\text{molFE/g}$), odnosno mmolFE/L za uzorke piva.

3.5.8. HPLC analiza ekstrakata

Tečna hromatografija sa UV/Vis i fluorescentnim detektorom visoke rezolucije (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) primenjena je za razdvajanje i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u pripremljenim uzorcima. Izvršen je razvoj HPLC metode pri čemu su sledeći parametri pokazali najbolje rezultate.

Za analizu ekstrakata ječma i hmelja hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (4,6mm x 150 mm) uz sistem rastvarača: A – ($\text{H}_2\text{O} + 5\% \text{HCOOH}$) i B - ($80\% \text{HCN} + 5\% \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-28 min, 0% B; 28-35 min, 25% B; 35-40 min, 50% B; 40-45 min, 80% B, i na kraju poslednjih 10 min ponovo 0% B. Protok mobilne faze je iznosio 0,8 ml/min. Injektovano je 5 μl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosemplera. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C.

Prilikom analize uzoraka piva hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (4,6mm x 150 mm) uz sistem rastvarača: A – (acetonitril) i B - ($0,1\% \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0 min, 10% A; 15 min, 10% A; 35 min, 30% A. Protok mobilne faze je takođe iznosio 0,8 ml/min i kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C. Injektovano je 20 μl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosemplera.

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi: katehina, epikatehina, kvercetina, kvercetin-3-galaktozida, kvercetin-3-rutinozida, kvercetin-3-glukozida, kemferola, kemferol-3-glukozida, p-kumarne, hlorogenske, ferulne, kafene, galne, protokatehinske, 4-hidroksibenzoeve, 2,5-dihidroksibenzoeve, vanilinske, sinapinske i salicilne kiseline. Kvantitativno određivanje komponenata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda masene koncentracije 1,0 mg/ml, rastvaranjem u 10% rastvoru metanola. Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u uzorcima. Za komponente u

uzorcima za koje nije bio dostupan standard, kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracione krive, po strukturi odgovarajućeg standarda.

Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

3.5.9. ICP-OES metoda

ICP-OES metoda je korišćena za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka, pripremljenih postupkom mineralizacije, na sadržaj metalnih jona.

Rastvori i reagensi:

- multi standard – Ultra scientific analytical solution USA,
- HCl (1:1),
- argon 5.0 (99,999% čistoće).

Parametri metode:

- snaga RF generator – 1150 W,
- brzina pumpe – 50 rpm,
- protok gasa za hlađenje – 12 L/min,
- protok raspršivača gasa – 0,7 L/min,
- pravac posmatranja plazme – aksijalni,
- vreme ispiranja – 30 s,
- tri probe za svaki uzorak,
- prikaz rezultata u ppm sa četiri značajne cifre.

Za svaki element čiji sadržaj je bilo potrebno odrediti, formirana je metoda tako što je izvršen izbor odgovarajućih parametara metode i odabirom više talasnih dužina. U cilju konstruisanja kalibracione prave koja daje zavisnost relativnog intenziteta signala na odgovarajućoj talasnoj dužini u funkciji od koncentracije analita, snimana je slepa proba (dejonizovana voda) i dva rastvora standarda različitih koncentracija dobijenih razblaživanjem osnovnog, referentnog standarda. Za svako merenje rađene su po tri probe.

Izbor najbolje, pa samim tim i radne talasne dužine vršen je na osnovu relativnog intenziteta signala kao mere osetljivosti metode, grešaka na odzivu standarda kao i na osnovu veličine interferiranja prisutnih elemenata u ovakvom realnom uzorku.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. KINETIKA I SASTAV EKSTRAKATA JEČMA

Ječam je osnovna sirovina za dobijanje piva, odnosno za dobijanje slada. Drobljenje slada predstavlja mehaničku pripremu slada za ekstrakciju. Glavni zadatak drobljenja slada je olakšavanje i ubrzavanje fizičkih i biohemijskih procesa rastvaranja sadržaja zrna u toku ukomljavanja, radi maksimalno mogućeg prevodjenja ekstraktivnih materija u vodeni rastvor, tj. sladovine.

Cilj ovog dela istraživanja bio je da se odrede optimalni uslovi ekstrakcije fenolnih jedinjenja i mineralnih materija iz ječma. Definisanje optimalnih uslova ekstrakcije baziraće se na postizanju maksimalne količine ukupnih fenolnih jedinjenja ili mineralnih materija uz primenu etanola kao rastvarača. Biće ispitana kinetika ekstrakcije, a potom, na osnovu eksperimentalnih rezultata kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja, izvršiće se modelovanje ekstrakcionog sistema ječam-maceracija primenom dva modela.

Budući da kvalitet ječma može značajno varirati u zavisnosti od područja gde se gaji, potrebno je bilo odrediti i sadržaj mineralnih materija u ječmu, kao i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata više različitih uzoraka ječma, dobijenih pri predhodno odabranim optimalnim uslovima ekstrakcije.

4.1.1. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz ječma

Optimalne uslove ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma odredili smo variranjem koncentracije etanola, koncentracije kiseline HCl, solvomodula, vremena i temperature ekstrakcije uz primenu postupka maceracije. U Tabeli 4.1. je dat pregled uslova ekstrakcije.

Tabela 4.1. Ispitivani parametri i njihovi intervali vrednosti za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz ječma.

Parametar	Interval
Koncentracija etanola, %	20, 30, 50, 70, 90
Koncentracija HCl, %	0, 0.1, 1, 5
Solvomodul, V/m	15, 20, 25, 30
Vreme ekstrakcije, min	20, 40, 80, 120
Temperatura ekstrakcije, °C	25, 35, 45

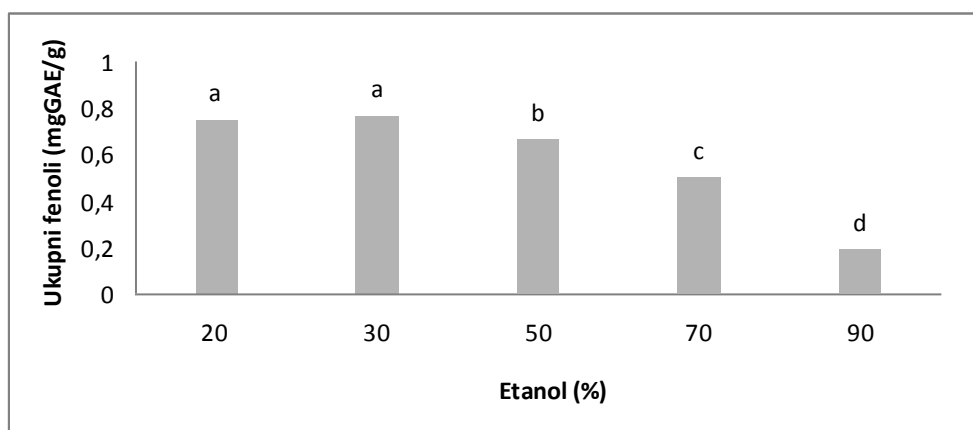
Primenom Folin-Ciocalteu-ove spektrofotometrijske metode (*Singleton i Rossi, 1965*) određen je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima.

4.1.1.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz ječma

Za ispitivanje je korišćen ječam koji je neposredno pre eksperimenta samleven na mlinu. Mlevenjem ječma je dobijen materijal sa srednjim prečnikom usitnjenosti manjim od 0,6 mm.

Na Slici 4.1. je prikazana zavisnost sadržaja ukupnih fenola od koncentracije etanola. Rezultati pokazuju da se bolji ekstrakcioni kapacitet postiže primenom binarnog sistema rastvarača tj. vodenih rastvora etanola, ali se sa porastom udela organskog rastvarača u vodenim rastvorima ekstrakcioni kapacitet smanjuje. Može se takođe videti da je najveći sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu koncentracije etanola 30% (v/v), što je i očekivano jer se radi o najpolarnijem rastvaraču. Ova koncentracija etanola je odabrana za dalja ispitivanja.

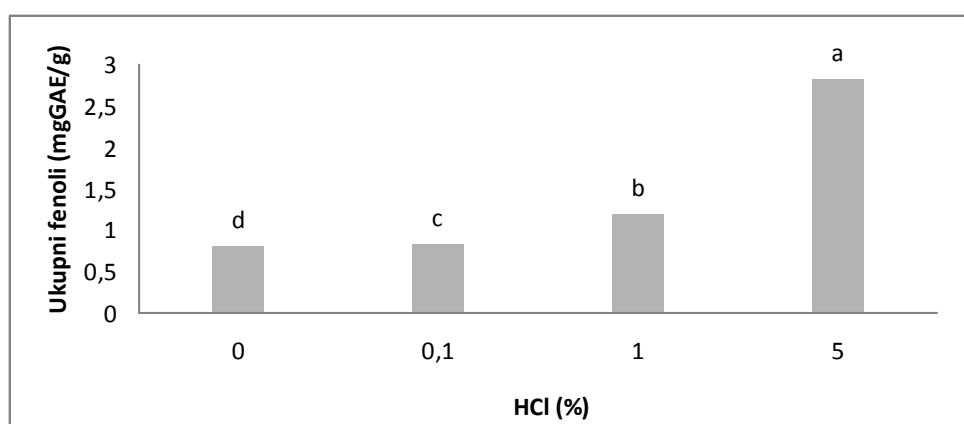
Da se prilikom ekstrakcije suvog biljnog materijala bolji rezultati dobijaju primenom ekstragensa sa većim udelom vodene faze u rastvaraču dokazali su i drugi autori (*Meneses i sar., 2013*). Prisustvo i udeo vode u organskoj fazi ima značajnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. *Bimark i sar. (2011)* su pokazali da je dodatak vode u etanol povećao polarnost rastvarača i da je ekstrahovano više flavonoidnih jedinjenja iz mente nego primenom čistog etanola. *Meneses i sar. (2013)* su ispitivali uticaj koncentracije etanola na ekstrakciju antioksidativnih fenolnih jedinjenja iz ječma u intervalu od 20 do 100%, pri čemu je najbolje rezultate pokazao ekstrakt dobijen 40% etanolom.



Slika 4.1. Uticaj koncentracije etanola na ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

U cilju ispitivanja uticaja koncentracije hlorovodonične kiseline na efikasnost ekstrakcije, menjali smo koncentraciju kiseline, dok su ostali uslovi ekstrakcije bili

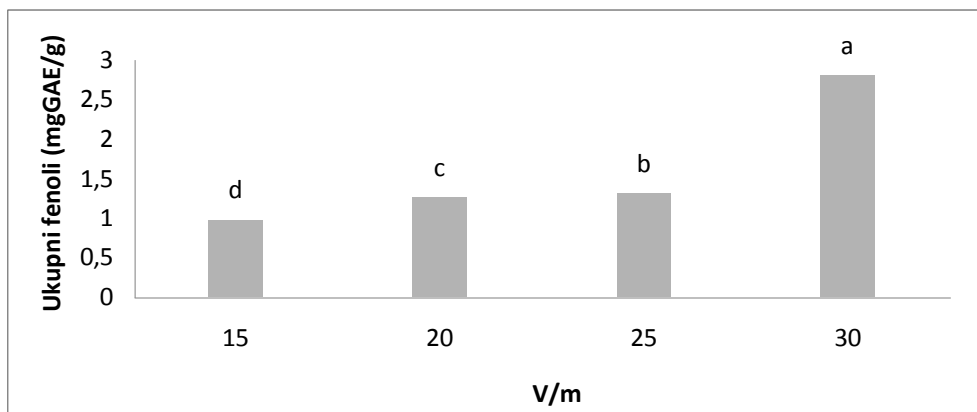
konstantni. Sa Slike 4.2. se vidi da se najpre sadržaj ukupnih fenola bitno ne menja sa povećanjem kiselosti ekstragensa, a da potom naglo raste pri koncentraciji kiseline od 5%, pa je stoga u daljem radu upotrebljavana ta koncentracija kiseline. Ječam je prema literaturnim podacima (Bonoli i sar., 2004; Maillard i Berset, 1995; Zhao i sar., 2006) bogat izvor fenolnih kiselina. Fenolne kiseline su prisutne u nerastvornom obliku, tj. u obliku estara ili glikozidnih kompleksa, pa se njihova ekstrakcija osim primene organskog rastvarača , sprovodi u kombinaciji sa kiselom ili baznom hidrolizom. Dodatkom baze ili kiseline dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih drugih nestabilnih jedinjenja (Roberts, 2003), što dovodi do povećanja vrednosti za ukupne fenole.



Slika 4.2. Uticaj koncentracije kiseline na ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=20; t=25°C). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

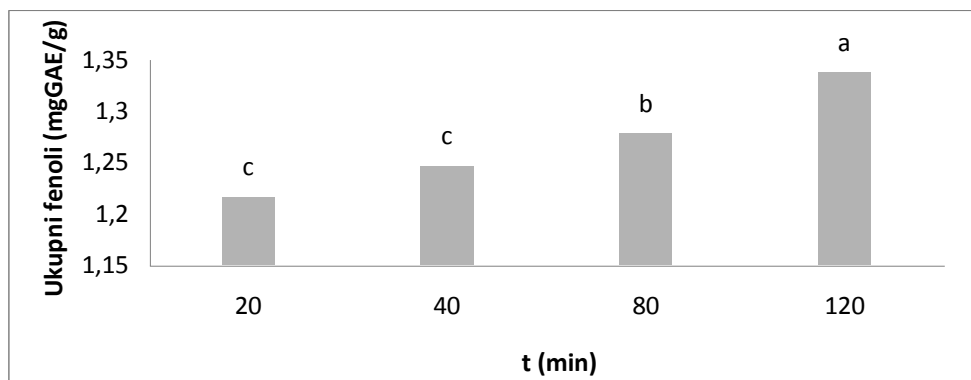
Na Slicu 4.3. je prikazana zavisnost sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima od solvomodula. Iz slike se može videti da se najveća vrednost ukupnih fenola dobija pri solvomodulu 30 (V/m), te je zbog toga u daljem radu upotrebljavana ova vrednost. Veći solvomodul tj. veće zapremine rastvarača za ekstrakciju povećavaju efikasnost ekstrakcije. U opštem slučaju, ekstrakcija čvrsto-tečno odvija se u dve faze: najpre kvašenje i bubrenje materijala, a zatim ekstrakcija, što zahteva veće količine rastvarača. U mnogim slučajevima se tokom kvašenja i bubrenja iz biljne sirovine mogu ekstrahovati određene količine supstanci, pa ovaj proces treba uklopiti u proces ekstrakcije (Ponomarev, 1976). Pri ekstrakciji značajna količina rastvarača je adsorbovana sirovinom, tako da bubrenje utiče na sam proces ekstrakcije. „Puna” adsorptivnost, koja predstavlja ukupnu količinu rastvarača adsorbovanu od strane sirovine i zadržanu na površini i među ćelijama sirovine, zavisi od stepena usitnjenosti sirovine i sa njenim uvećanjem znatno raste. Međutim, ni preveliki

solvomoduli ne daju dobre rezultate, pa je neophodno odrediti optimalnu vrednost. Zhong (2012) je ispitivao uticaj solvomodula (10, 20, 30, 40 i 50 V/m) na ekstrakciju flavonoida iz voća, i pri tome je dobio znatno veći prinos ekstrakcije pri solvomodulu 40 u odnosu na solvomodul 30 ili 50 V/m. Pri većem solvomodulu javlja se uticaj razblaženja.



Slika 4.3. Uticaj solvomodula na ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

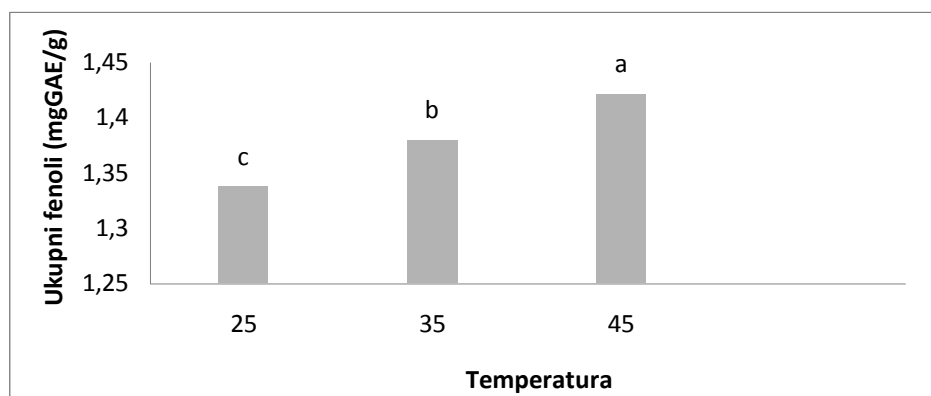
Ispitivanjem uticaja vremena ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima (Slika 4.4.), vidi se da sadržaj ukupnih fenola raste sa vremenom ekstrakcije u celom ispitivanom vremenskom intervalu, te je stoga u daljem radu vreme maceracije od 120 minuta držano konstantnim.



Slika 4.4. Uticaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Pri optimalnim uslovima ekstrakcije (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$), praćena je zavisnost sadržaja

ukupnih fenola od temperature (Slika 4.5.). Sa porastom temperature povećava se i sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima usled povećanja rastvorljivosti ekstraktivnih jedinjenja i usled povećanja brzine difuzije, tj. usled većeg prenosa mase, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Sant' Anna i sar., 2012*). Međutim, mnoga fenolna jedinjenja vrlo lako podležu oksidaciji. Predugo vreme ekstrakcije i visoka temperatura povećavaju mogućnost oksidacije fenolnih jedinjenja što dovodi do smanjenja udela fenolnih jedinjenja u ekstraktu. *During i sar. (2007)* su istraživali uticaj vodenih rastvora etanola na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz žalfije i pri tome su varirali vreme trajanja (1 do 6 sati) i temperaturu ekstrakcije (22 do 63°C). Najbolji rezultati su postignuti pri temperaturi ekstrakcije od 40°C i vremenu ekstrakcije od 1 do 3 sata, što je potpuno u skladu sa našim rezultatima. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (*Uma i sar., 2010*).



Slika 4.5. Uticaj temperature ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

4.1.1.2. Modelovanje kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma

Za modelovanje kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma 30% (v/v) etanolom, primenjena su dva kinetička modela: model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal i empirijski model Ponomarjeva. U Tabeli 4.2. dat je prikaz korišćenih kinetičkih modela ekstrakcije.

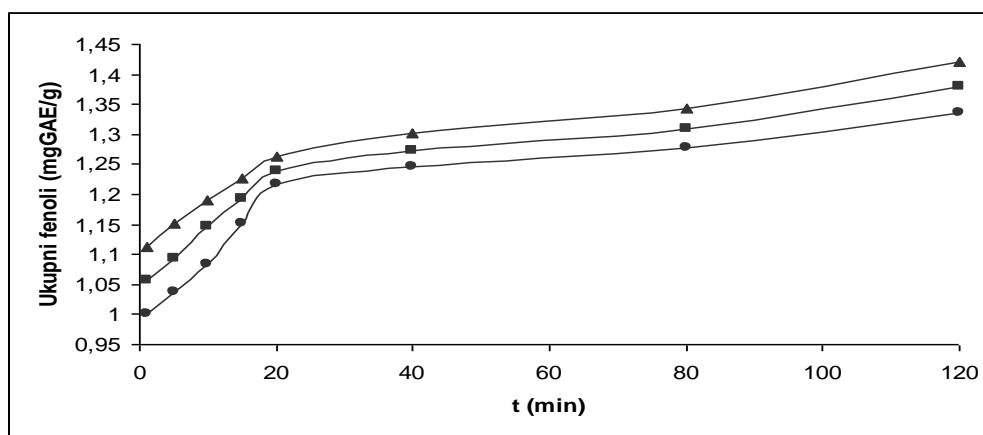
Tabela 4.2. Kinetički modeli ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala.

	Kinetička jednačina	Linearna transformacija
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	$q_i/q_0 = (1-b) \cdot e^{-kt}$	$\ln(q_i/q_0) = \ln(1-b) - k \cdot t$
Empirijski model Ponomarjeva		$1 - (q_i/q_0) = b + k \cdot t$

b – koeficijent brze ekstrakcije (ispiranja); k – koeficijent spore ekstrakcije; q_i - količina ekstraktivnih materija prisutnih u biljnom materijalu posle određenog vremena ekstrakcije; q_0 - količina ekstraktivnih materija prisutnih u biljnom materijalu na početku.

Da bi odredili kinetiku ekstrakcije fenolnih jedinjenja ispitivali smo promenu sadržaja ukupnih fenola sa vremenom ekstrakcije pri konstantnoj temperaturi.

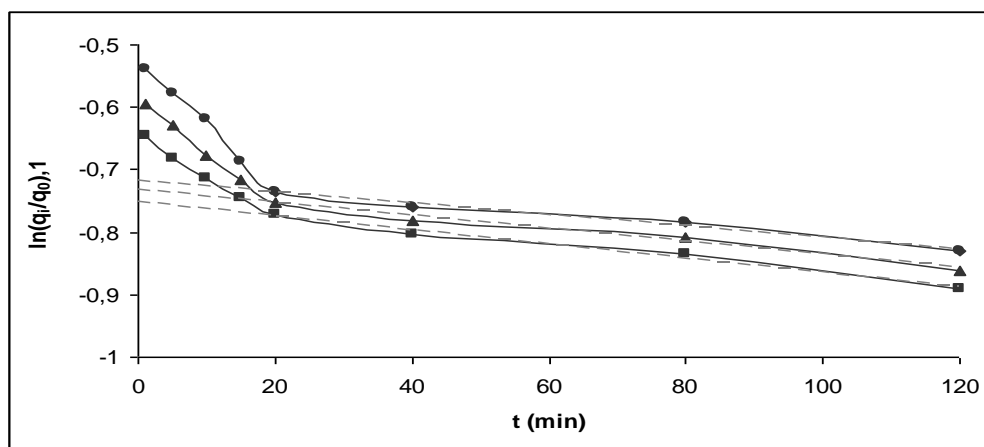
Na Slici 4.6. prikazane su promene sadržaja ukupnih fenola u toku ekstrakcije na temperaturama od 25, 35 i 45°C, dok su vrednosti date u Tabeli 8.1. (Prilog). Sa slike se vidi da se ekstrakcija fenolnih jedinjenja odigrava u dve faze. Na početku, fenolne komponente koje se nalaze na površini čestica ječma rastvaraju se u kratkom vremenskom periodu (za dvadesetak minuta). U ovoj fazi, poznatoj kao ispiranje ili brza ekstrakcija, rastvara se veći deo ekstrahovanih fenolnih jedinjenja. Kasnije, sadržaj fenolnih jedinjenja sve sporije raste, kao rezultat difuzije ekstrahovanih jedinjenja iz unutrašnjosti čestica ječma. U ovoj fazi spore ekstrakcije sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dostiže najveću vrednost.



Slika 4.6. Promena sadržaja ukupnih fenola sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Na osnovu početne vrednosti sadržaja ukupnih fenola (q_0), za slučaj maceracije 30% etanolom sa 5% HCl (procedura data u delu 3.5.2.), koji iznosi 1,585 mgGAE/g, i na osnovu jednačina prikazanih u Tabeli 4.2., izračunati su kinetički parametri ekstrakcije fenolnih

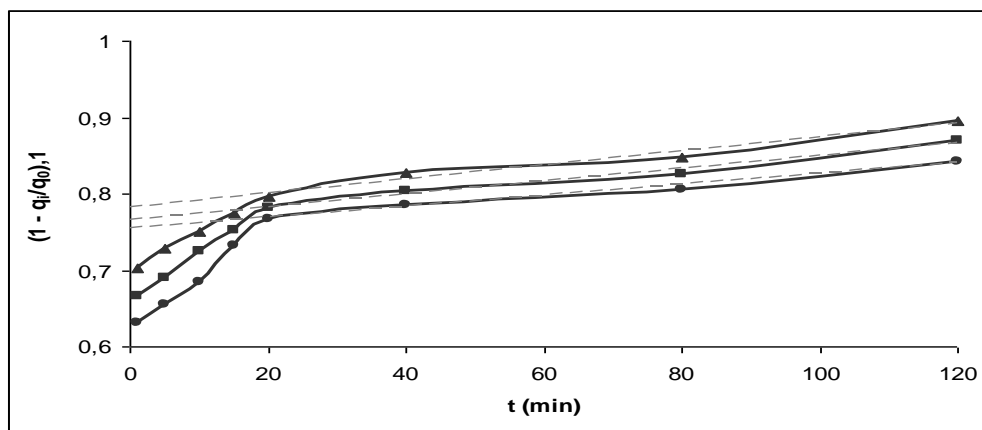
jedinjenja iz ječma. Slika 4.7. predstavlja grafički prikaz proračuna kinetičkih parametara ekstrakcije čvrsto-tečno po modelu zasnovanom na nestacionarnoj difuziji.



Slika 4.7. Zavisnost $\ln(q_i/q_0), 1$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji).

Analizom vrednosti koeficijenta ispiranja (b), koji se izračunava iz odsečka pravolinijskog dela zavisnosti na ordinati za $t = 0$, i koeficijenta spore ekstrakcije (k), koji se izračunava iz nagiba zavisnosti (Tabela 4.3.), može se zaključiti da se najveće vrednosti kinetičkih parametara postižu za optimalne uslove ekstrakcije pri 45°C .

Na Slici 4.8. je prikazana zavisnost $1 - q_i/q_0$ od vremena na osnovu empirijskog modela Ponomarjeva, za slučaj ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma, pod optimalnim uslovima na temperaturama 25, 35 i 45°C . Kao i u slučaju jednačine modela zasnovanog na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal, empirijska jednačina Ponomarjeva važi samo u oblasti spore ekstrakcije, jer je zavisnost $1 - q_i/q_0$ od vremena linearna.



Slika 4.8. Zavisnost $1 - q/q_0$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (empirijski model Ponomarjeva).

Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) izračunate po ovom modelu date su u Tabeli 4.3.

U tabeli su prikazane i vrednosti koeficijenata ispiranja i koeficijenata spore ekstrakcije na različitim temperaturama. Koeficijenti rastu sa povećanjem temperature zbog bolje rastvorljivosti ekstraktivnih supstanci i povećanja koeficijenta difuzije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Veljković i Milenović, 2002; Amarante i sar., 2014).

Tabela 4.3. Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) za proces ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma.

	Temperatura, K	b	k, min^{-1}
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	298	0,810	$0,95 \cdot 10^{-3}$
	308	0,818	$1,08 \cdot 10^{-3}$
	318	0,824	$1,18 \cdot 10^{-3}$
Empirijski model Ponomarjeva	298	0,754	$0,76 \cdot 10^{-3}$
	308	0,765	$0,89 \cdot 10^{-3}$
	318	0,773	$1,03 \cdot 10^{-3}$

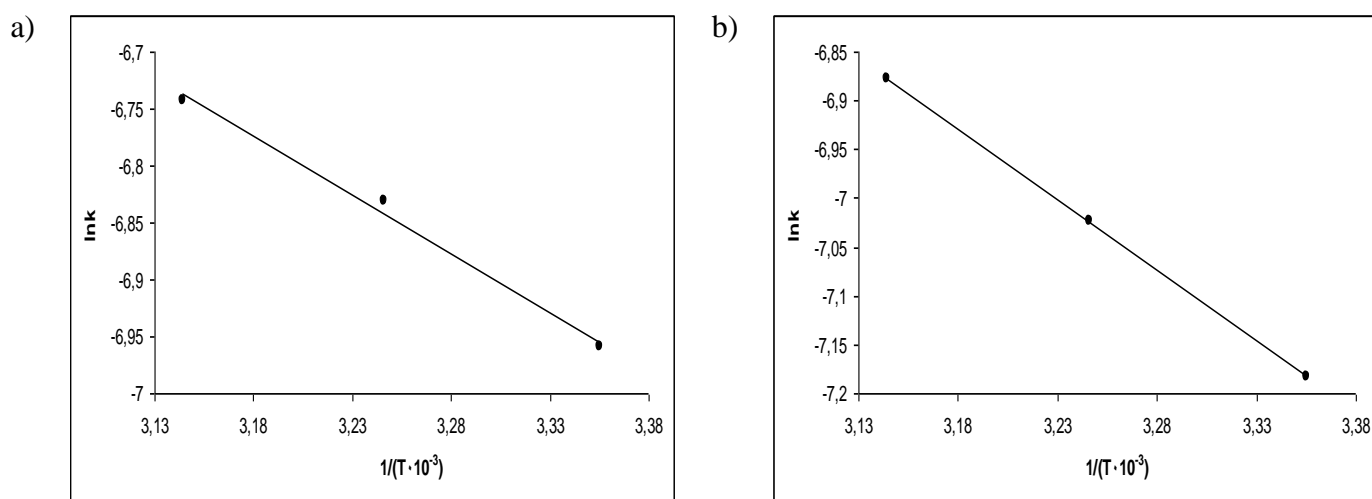
Analiza vrednosti ovih koeficijenata pokazuje da koeficijenti ispiranja i koeficijenti spore ekstrakcije prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije imaju veće vrednosti od koeficijenata izračunatih prema empirijskom modelu Ponomarjeva. Koeficijent ispiranja je parametar koji određuje ceo proces ekstrakcije. Ako je u usitnjennoj sirovini broj razorenih ćelija mali, to je proces ekstrakcije usporen i određen je brzinom difuzije materije

iz biljnog materijala. Nasuprot, pri uvećanju količine razorenih ćelija sledi ubrzanje procesa ekstrakcije zbog uvećanja koeficijenta ispiranja.

4.1.1.3. Termodinamički parametri ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma

Vrednosti koeficijenata spore ekstrakcije (k) su nam poslužili da odredimo termodinamičke parametre aktiviranog procesa, dok smo termodinamičke parametre procesa ekstrakcije odredili na osnovu vrednosti koeficijenata brzine ekstrakcije (k_e) koji je određen prinosom tokom ekstrakcije.

Na osnovu zavisnosti logaritma koeficijenata spore ekstrakcije izračunatih pomoću modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji i empirijskog modela Ponomarjeva (Tabela 4.3.) u funkciji recipročne vrednosti apsolutne temperature, dobijene su prave prikazane na Slici 4.9 iz čijih nagiba ($-E_a/R$) možemo izračunati energiju aktivacije (Tabela 4.4.).



Slika 4.9. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma: a) model zasnovan na nestacionarnoj difuziji; b) empirijski model Ponomarjeva.

Termodinamički parametri aktivacionog procesa izračunavaju se iz jednačina:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (18)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (19)$$

gde je ΔH^* aktivaciona entalpija; ΔS^* - aktivaciona entropija; ΔG^* - aktivaciona slobodna energija (Gibsova energija). Izračunati termodinamički parametri dati su u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Termodinamički parametri aktivacionog procesa ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma.

	Ea, kJ/mol	ΔH^*, kJ/mol	ΔS^*, J/Kmol	ΔG^*, kJ/mol
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	8,56	6,08	-357,53	112,62
Empirijski model Ponomarjeva	11,97	9,48	-350,45	113,83

Pozitivan znak za ΔH^* podrazumeva endotermno stanje između aktiviranog kompleksa i polaznih reaktanata, što vodi povećanju brzine ekstrakcije sa povećanjem temperature. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. *Meziane i Kadi* (2008) su za proces ekstrakcije ulja iz masline dobili vrednost energije aktivacije od 8,56 kJ/mol. Energija aktivacije procesa ekstrakcije flavonola iz zelenog čaja se kretala u opsegu od 30 do 50 kJmol⁻¹ (*Price i Spitzer, 1994*).

Razmatranje termodinamike procesa ekstrakcije je neophodno da bi se zaključilo da li je proces spontan ili ne. Promena Gibsove slobodne energija (ΔG^0), entalpije (ΔH^0) i entropije (ΔS^0) se izračunavaju korišćenjem sledećih jednačina:

$$k_e = c_t / c_{\max} \quad (20)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln k_e \quad (21)$$

$$\ln k_e = -\Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R \quad (22)$$

gde je k_e - koeficijent brzine ekstrakcije, c_t - sadržaj ukupnih fenola u tečnom ekstraktu na temperaturi T, a c_{\max} je sadržaj ukupnih fenola u zasićenom tečnom ekstraktu (*Saxena i sar., 2012*).

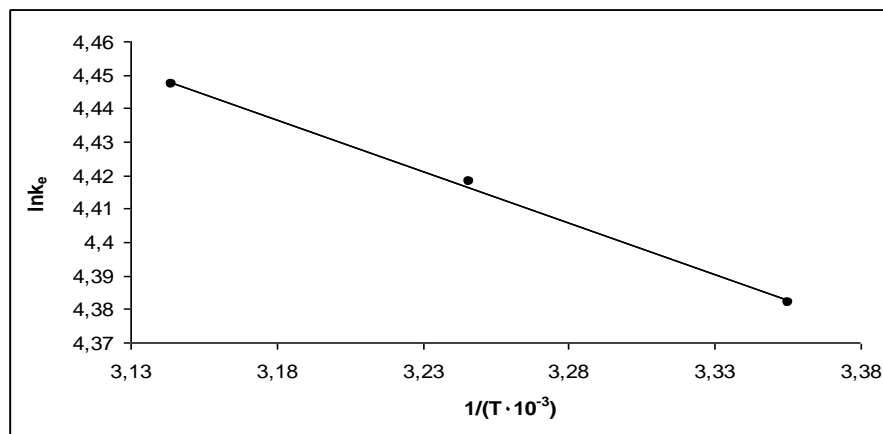
Sadržaj ukupnih fenola u zasićenom 30% etanolu sa 5% HCl (c_{\max}) (procedura data u delu 3.5.3.), iznosi 18,002 mgGAE/g.

Jednačina (22) je poznata kao Van't Hoff-ova jednačina. Grafička zavisnost $\ln k_e$ od $1/T$ daje pravu iz čijeg se nagiba dobija vrednost za ΔH^0 (Slika 4.10.)

Vrednosti za k_e , ΔG^0 , ΔH^0 i ΔS^0 za proces ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma, pomoću 30% rastvora etanola sa 5% HCl, izračunate su korišćenjem jednačina (20)-(22), i date su u Tabeli 4.5. Na Slici 4.10. prikazana je grafička zavisnost $\ln k_e$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma.

Tabela 4.5. Termodinamički parametri procesa ekstrakcije ukupnih fenola iz ječma.

Temperatura, K	k_e , %	ΔG^0 , kJ/mol	ΔH^0 , kJ/mol	ΔS^0 , J/Kmol
298	80,39	-10,86	2,36	44,39
308	82,92	-11,31		
318	85,39	-11,76		

Slika 4.10. Zavisnost $\ln k_e$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih fenola iz ječma.

Negativna vrednost Gibsove slobodne energije pokazuje da je proces ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma spontan. Sa porastom temperature vrednost ΔG^0 postaje negativnija, a proces ekstrakcije efikasniji. Pozitivna vrednost za ΔH^0 pokazuje da je ekstrakcija endoterman i ireverzibilan proces. Rezultati su slični onima koje su dobili Topallar i Gecgel (2000) i Saxena i sar. (2012).

4.1.2. Ekstrakcija metalnih jona iz ječma

Za određivanje sadržaja minerala u ispitivanim ekstraktima kreirane su analitičke metode za svaki element. Za svaki ispitivani element su izabrane po četiri talasne dužine sa najvećim relativnim intenzitetom emisije. Najpre su konstruisane kalibracione prave korišćenjem tri standarda, od kojih su dva pripremljena razblaživanjem referentnog multistandarda a treći je bila dejonizovana voda. Radna talasna dužina je izabrana na osnovu relativnog intenziteta emisije, standardne devijacije nagiba, standardne devijacije odsečka, korelacionog koeficijenta, interferencije na talasnim dužinama levo i desno od odabrane. U Tabeli 4.6. prikazane su odabrane talasne dužine za svaki element, korelacioni koeficijent (R^2), limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).

Tabela 4.6. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata u ekstraktima ječma.

Element	λ (nm)	LOD ¹ ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ² ($\mu\text{g/g}$)	Korelacioni koeficijent
Al	308,215	0,0053	0,0177	0,9999
As	189,042	0,0025	0,0084	0,9999
B	249,773	0,0006	0,0020	0,9997
Ba	455,403	0,0001	0,0001	0,9999
Ca	422,673	0,0005	0,0017	0,9995
Cd	228,802	0,0002	0,0006	1
Cr	283,563	0,0007	0,0024	0,9998
Cu	324,754	0,0007	0,0022	0,9998
Fe	259,940	0,0005	0,0017	0,9999
K	766,490	0,0019	0,0064	0,9998
Li	670,784	0,0001	0,0002	0,9997
Mg	285,213	0,0002	0,0007	1
Mn	257,610	0,0001	0,0004	0,9999
Na	589,592	0,0008	0,0026	0,9997
Pb	220,353	0,0021	0,0069	0,9999
Se	196,090	0,0030	0,0099	0,9997
Si	251,611	0,0018	0,0059	0,9993
Sr	407,771	0,0001	0,0001	0,9997
V	309,311	0,0011	0,0036	0,9998
Zn	213,856	0,0002	0,0006	0,9991

¹LOD – granica detekcije, ²LOQ – granica kvantifikacije.

Ekstrakcija minerala iz ječma vršena je vodenim rastvorom etanola postupkom maceracije. U Tabeli 4.7. je dat pregled uslova ekstrakcije.

Tabela 4.7. Ispitivani parametri i njihovi intervali vrednosti za ekstrakciju metalnih jona iz ječma.

Parametar	Interval
Koncentracija etanola, %	30, 50, 70, 90
Koncentracija HCl, %	0, 0.1, 1, 5
Solvo modul, V/m	15, 20, 25, 30
Vreme ekstrakcije, min	5, 10, 15, 20, 40, 80, 120

4.1.2.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju metalnih jona iz ječma

U cilju određivanja optimalnih uslova za ekstrakciju minerala iz ječma ispitivan je uticaj koncentracije etanola, hlorovodonične kiseline, solvomodula i vremena ekstrakcije.

Svi određivani minerali podeljeni su u četiri grupe (Dančić, 2012):

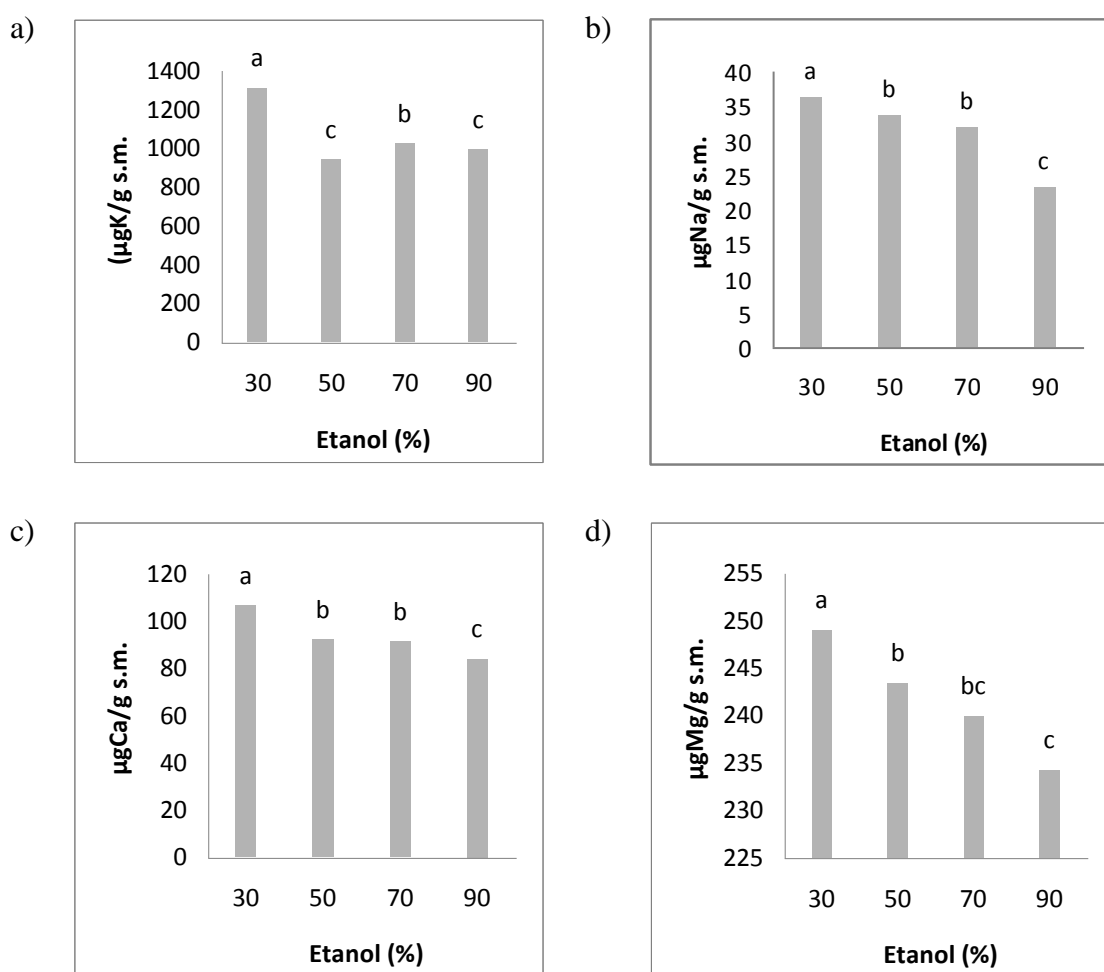
- esencijalni makrominerali (kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum)
- esencijalni u tragovima (gvožđe, bakar, mangan, cink, hrom i selen)

- verovatno esencijalni u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalni i toksični (arsen, olovo, kadmijum, aluminijum, bor, litijum, stroncijum i barijum).

Nadalje ćemo pratiti promenu sadržaja minerala tokom ekstrakcije u okviru svake grupe pojedinačno.

Uticaj koncentracije etanola

Zavisnost sadržaja esencijalnih makrominerala u etanolnim ekstraktima od koncentracije etanola je prikazana na Slici 4.11., dok su vrednosti date u Tabeli 8.2. (Prilog).

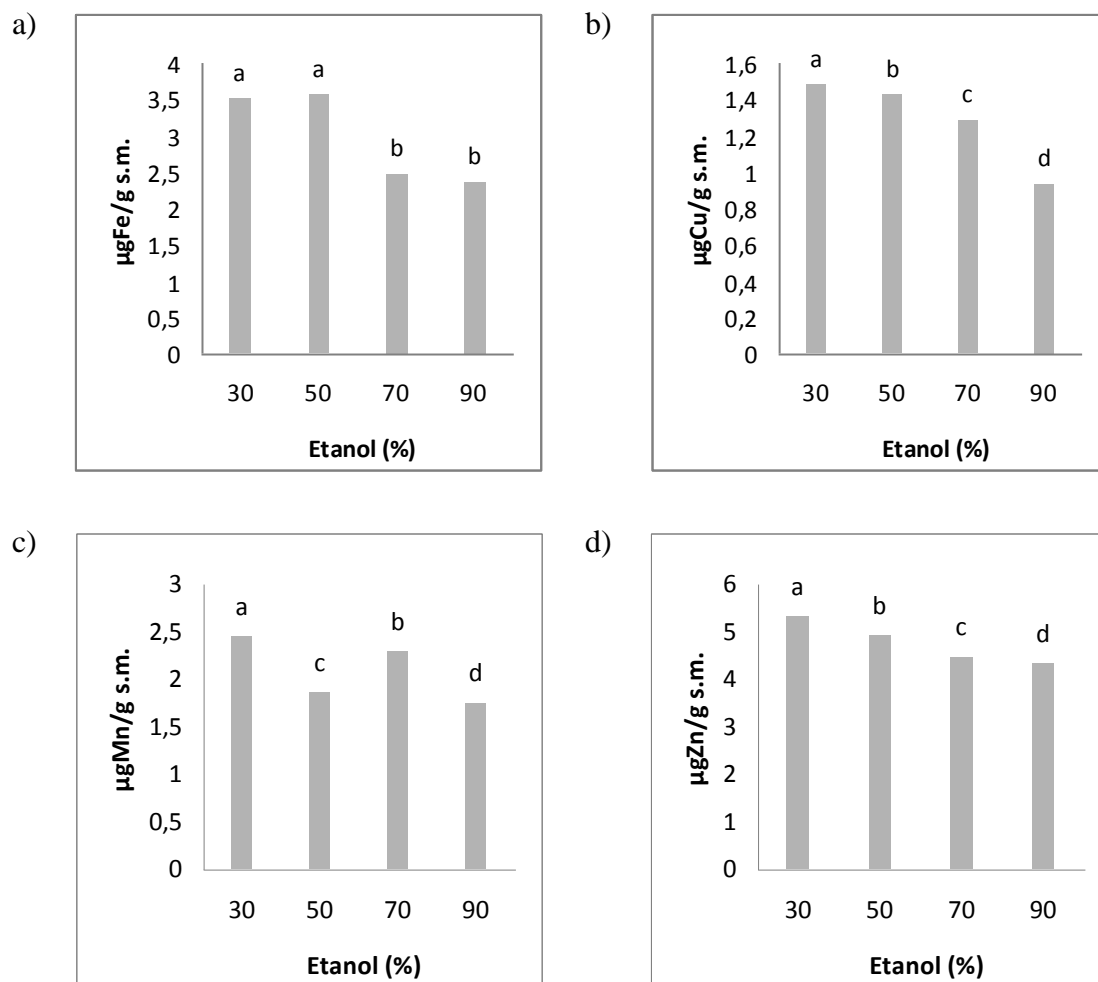


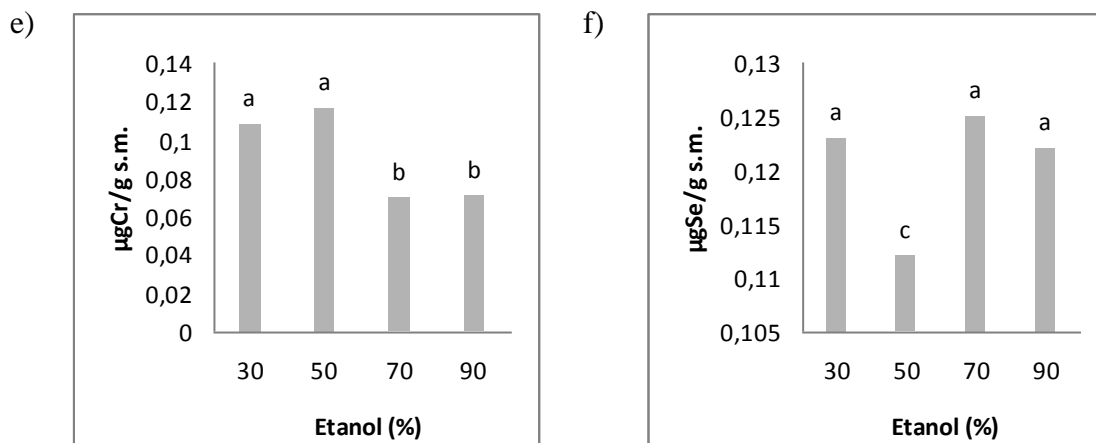
Slika 4.11. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: V/m=20; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Na Slici 4.11. vidi se da koncentracija svih elemenata opada sa porastom koncentracije etanola u rastvaraču za ekstrakciju. Za dalji rad je odabrana koncentracija

etanola od 30% (v/v) i u daljem ispitivanju optimalnih uslova za ekstrakciju esencijalnih makroelemenata ova vrednost je održavana konstantnom.

Zavisnost sadržaja esencijalnih minerala u tragovima u etanolnim ekstraktima od koncentracije etanola prikazana je na Slici 4.12.

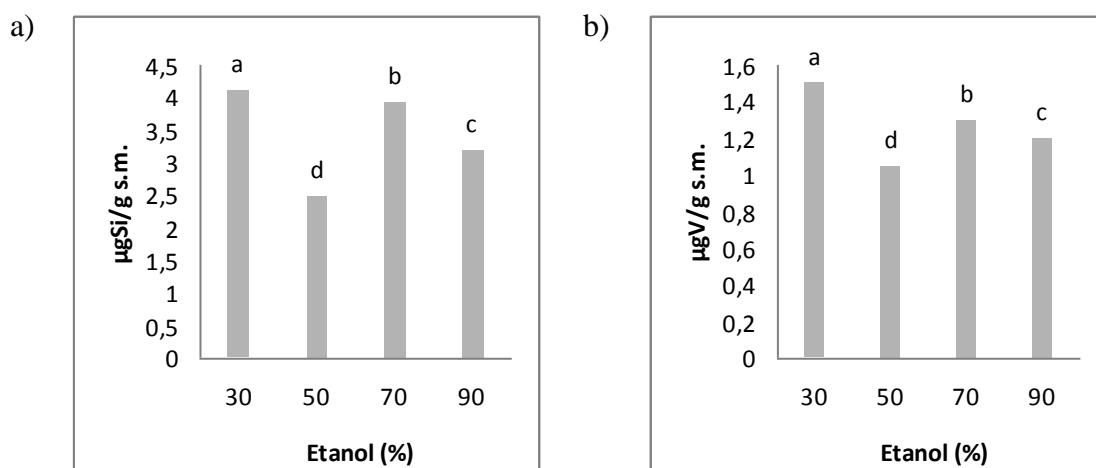




Slika 4.12. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn; e)Cr i f)Se u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

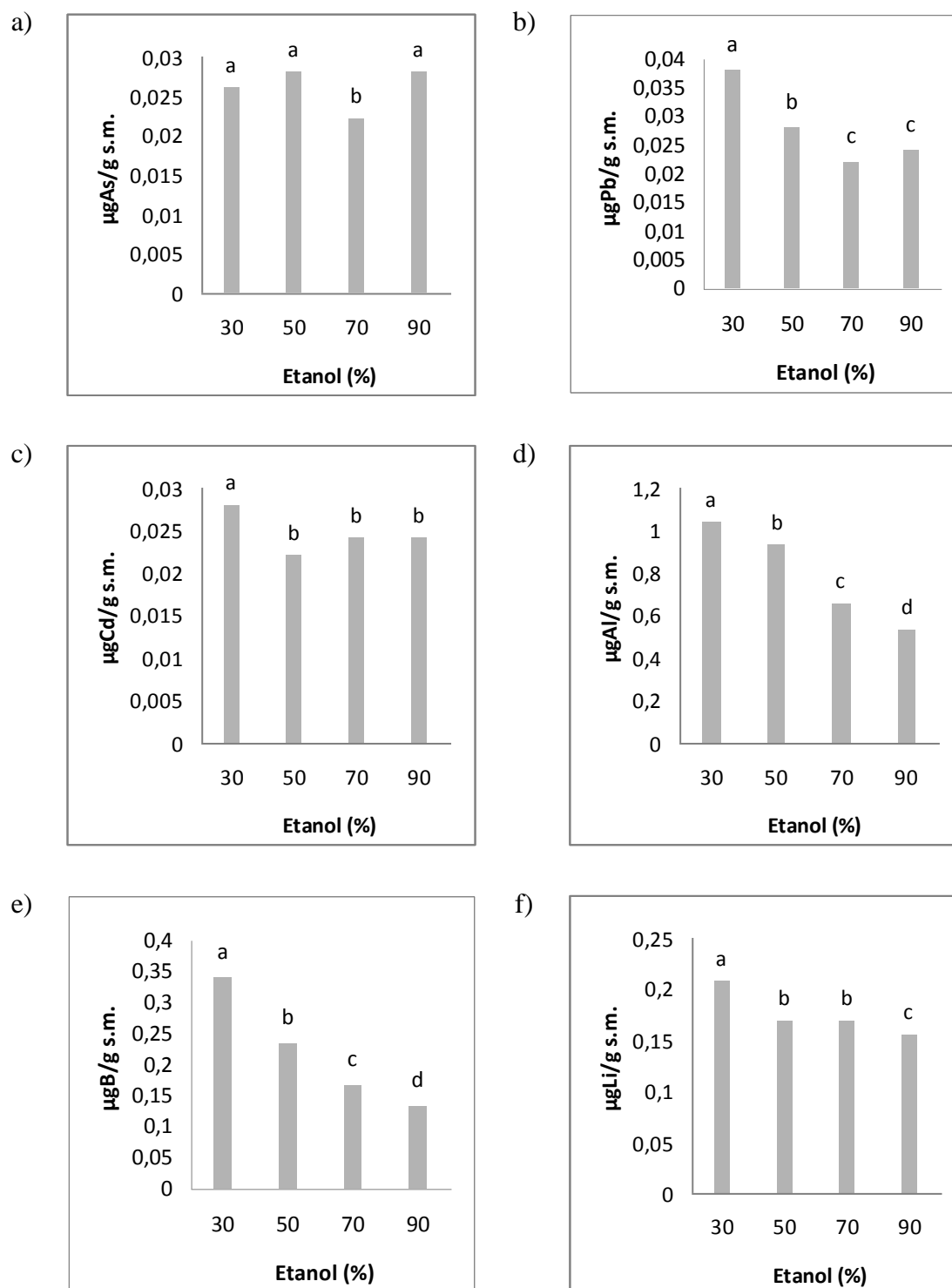
Sa slike se vidi da je najveći sadržaj bakra, mangana i cinka određen u 30% etanolu, za gvožđe i hrom mogu se koristiti 30% i 50% ekstrageni s obzirom da ne postoje značajne razlike u sadržaju između ovih ekstragenasa. U slučaju selena pokazalo se da 50% etanol nije pogodan za ekstrakciju. 30% etanol je odabran kao optimalna koncentracija rastvarača za ekstrakciju esencijalnih minerala u tragovima.

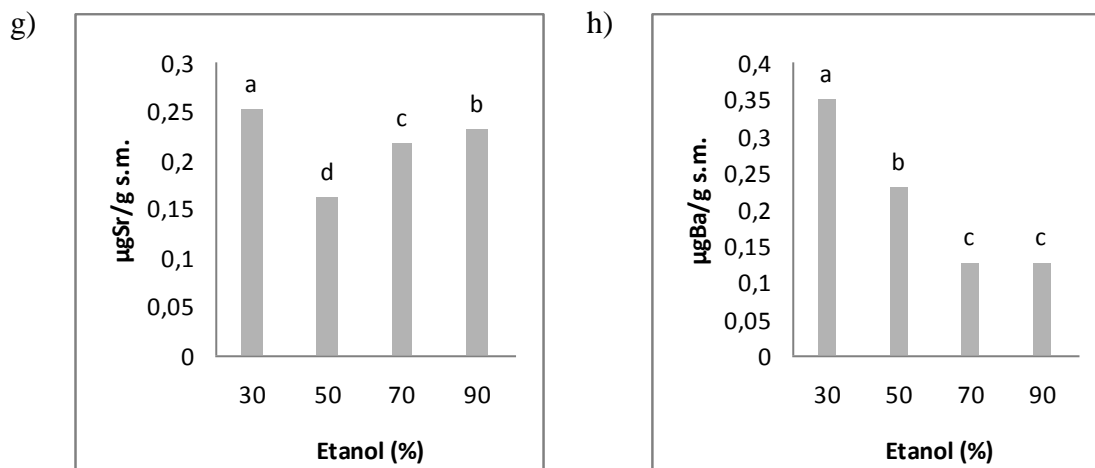
Na Slici 4.13. prikazana je zavisnost sadržaja verovatno esencijalnih minerala u ekstraktima od koncentracije etanola. Za oba minerala najpogodniji ekstragens je 30% etanol.



Slika 4.13. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a)Si i b)V u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

I na kraju ispitan je uticaj koncentracije etanola na ekstrakciju neesencijalnih toksičnih minerala, a rezultati ispitivanja prikazani su na Slici 4.14.





Slika 4.14. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj neesencijalnih minerala: a)As; b)Pb; c)Cd; d)Al; e)B; f)Li; g)Sr i h)Ba u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

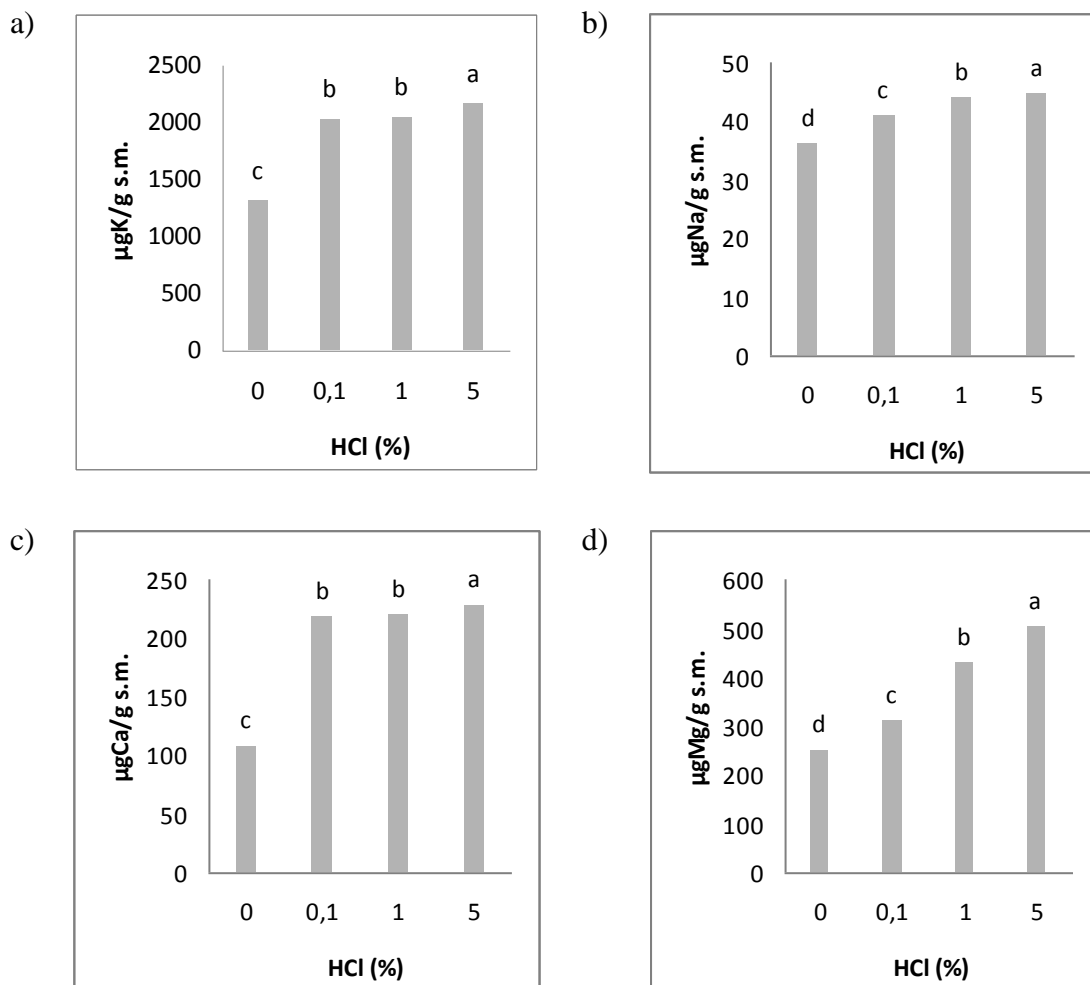
Sa slike se vidi da je optimalna koncentracija etanola 30% (v/v) za sve ispitivane neesencijalne i toksične metale.

Uticaj koncentracije kiseline

U daljem radu ispitivan je uticaj koncentracije hlorovodonične kiseline u 30% etanolu na sadržaj sledećih minerala:

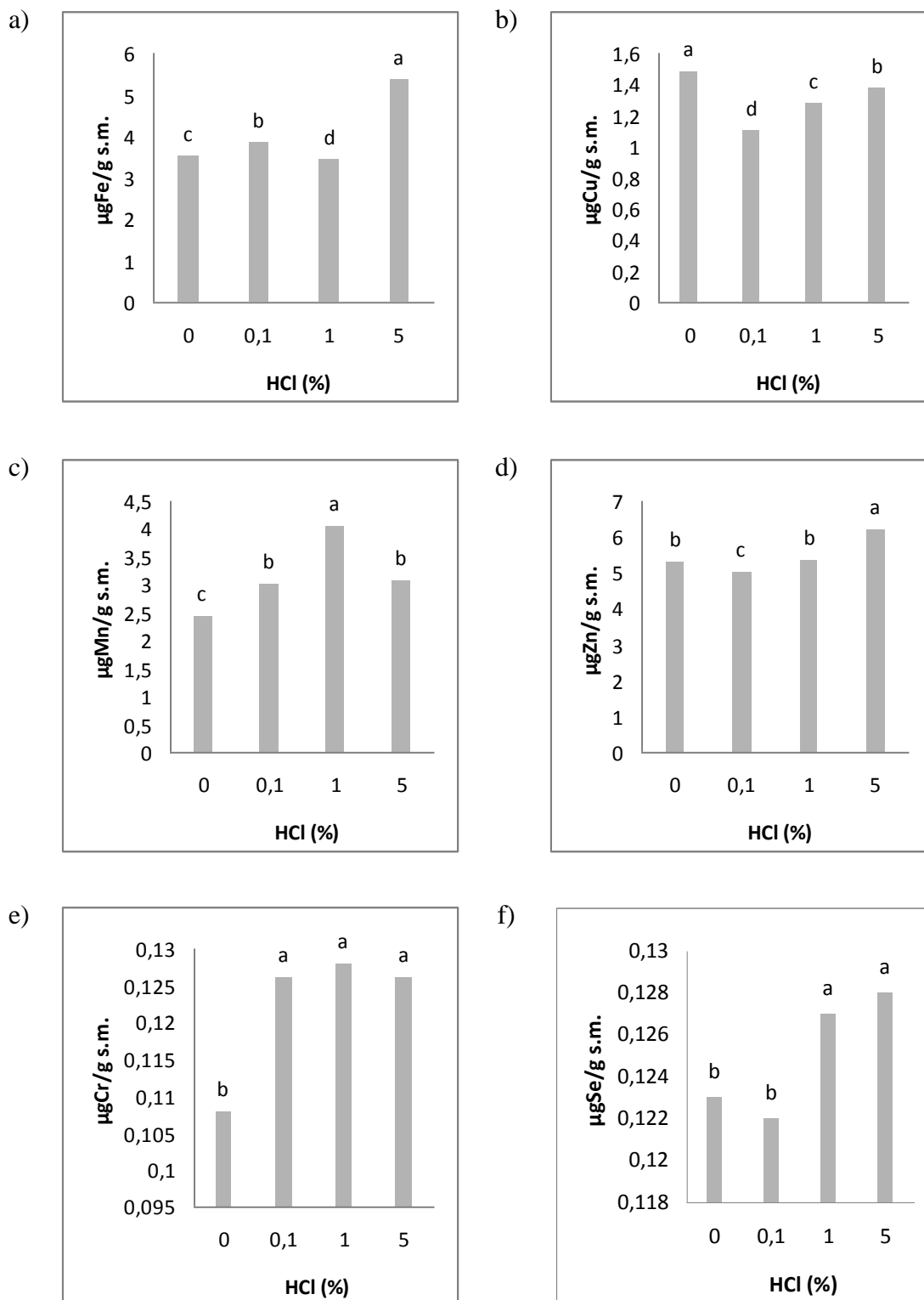
- esencijalni makrominerali (kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum)
- esencijalni u tragovima (gvožđe, bakar, mangan, cink, hrom i selen)
- verovatno esencijalni u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalni i toksični (arsen, olovo, kadmijum, aluminijum, bor, litijum, stroncijum i barijum).

Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih makrominerala u ekstraktima su dati na Slici 4.15., dok su vrednosti date u Tabeli 8.3. (Prilog).



Slika 4.15. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=20; t=25°C). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

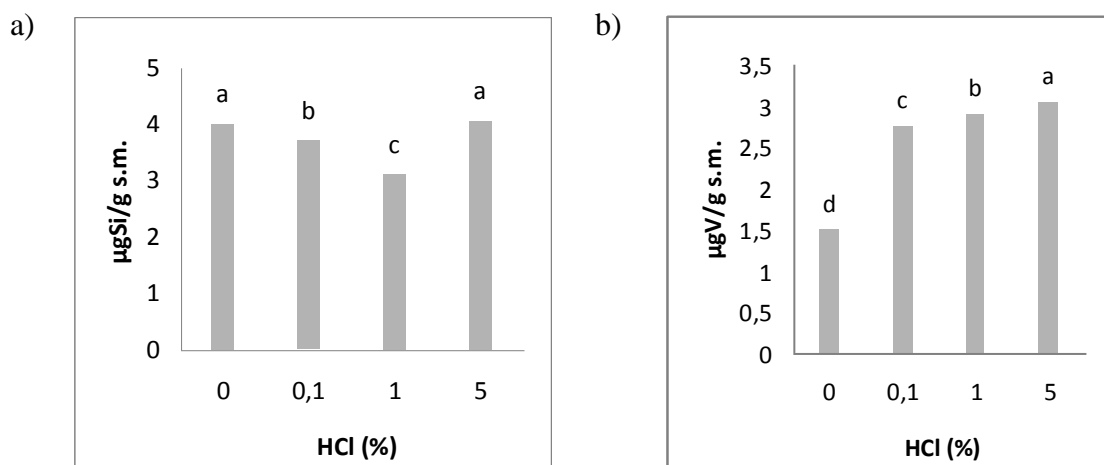
Sa Slike 4.15. se vidi da je za ekstrakciju K, Na, Ca i Mg najpogodniji ekstragens 30% etanol sa 5% HCl.



Slika 4.16. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn; e)Cr i f)Se u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Slika 4.16. pokazuje da je za ekstrakciju Fe, Zn i Se najpogodniji 30% etanol sa 5% HCl, dok selenu odgovara i ekstragens sa 1% kiseline. Za ekstrakciju Cr se može koristiti

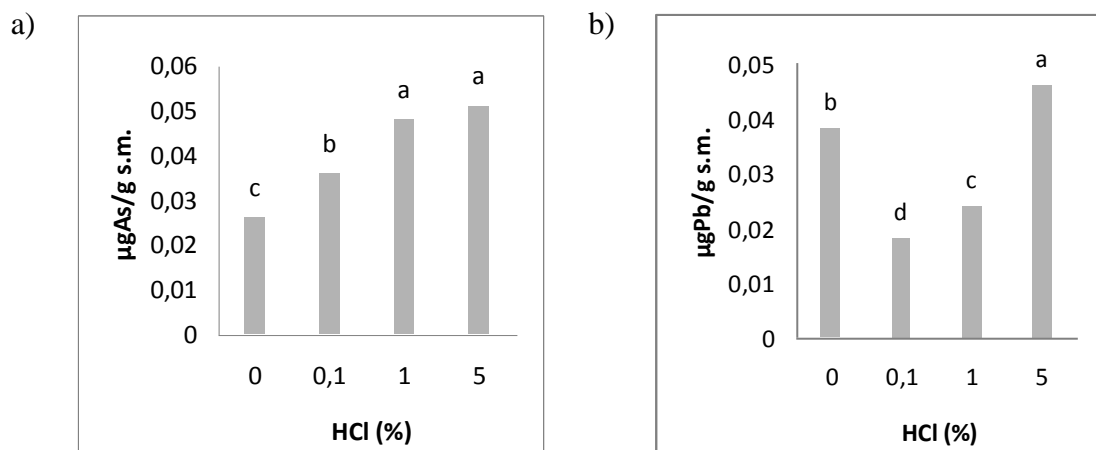
30% etanol sa 0,1, 1 ili 5% HCl, a za ekstrakciju Mn 30% etanol sa 1% HCl, dok bakru odgovara neutralni ekstragens.

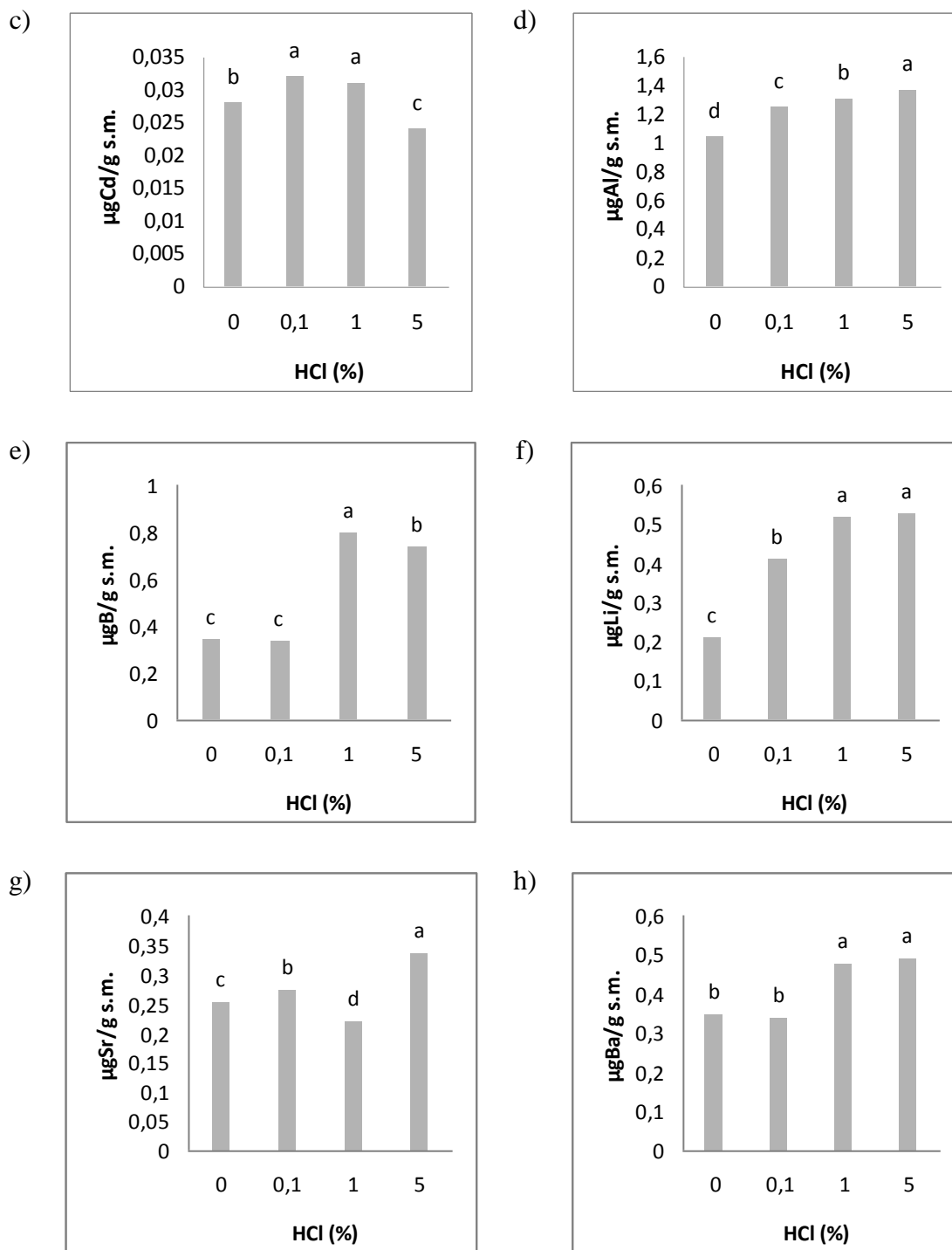


Slika 4.17. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si i b) V u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Slika 4.17. pokazuje da je efikasnost ekstrakcije Si i V najveća korišćenjem 30% etanola sa 5% HCl kao ekstragensa.

Slika 4.18. prikazuje zavisnost sadržaja As, Pb, Cd, Al, B, Li, Sr i Ba u ekstraktima u zavisnosti od koncentracije kiseline.





Slika 4.18. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj neesencijalnih minerala: a)As; b)Pb; c)Cd; d)Al; e)B; f)Li; g)Sr i h)Ba u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

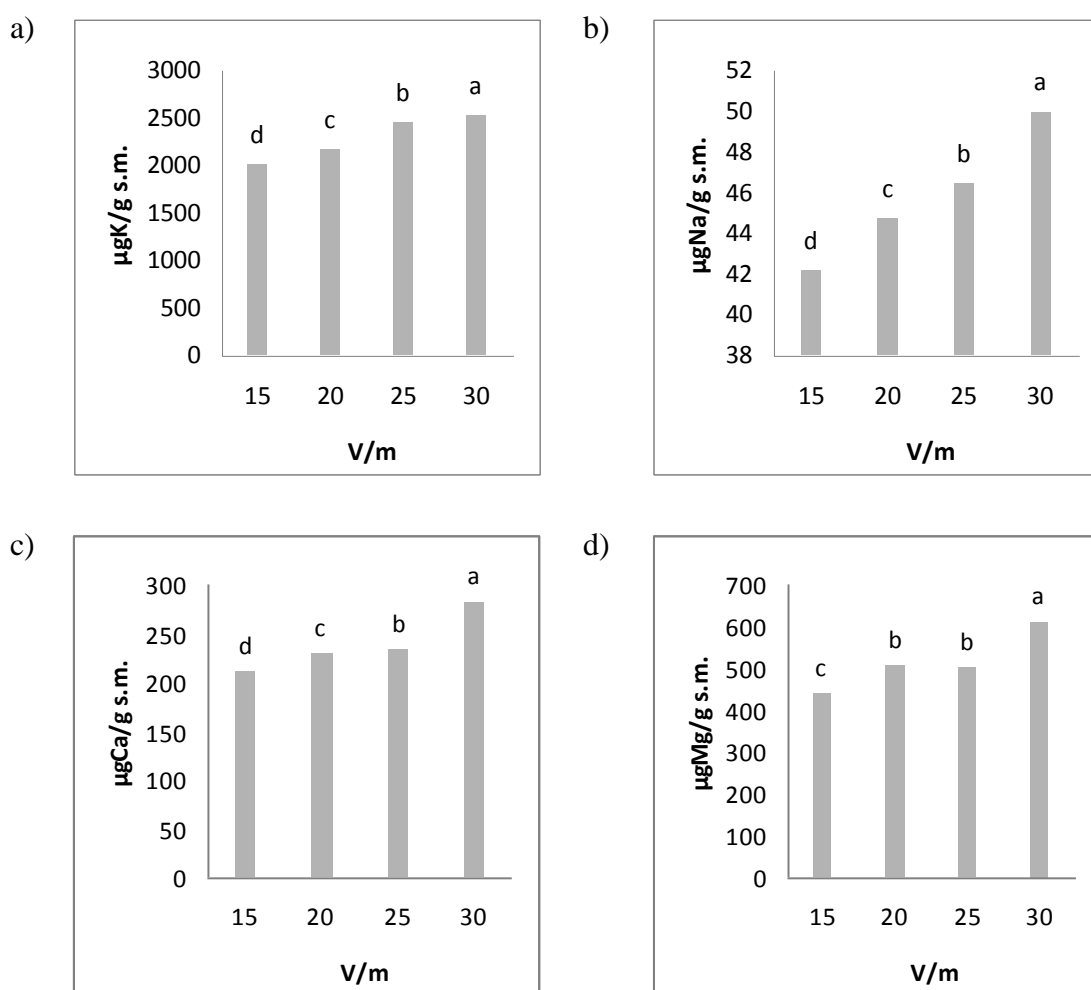
Sa Slike 4.18. se vidi da je 30% etanol sa 5% HCl najpogodniji ekstragens za ekstrakciju As, Pb, Al, Li, Sr i Ba.

Uticaj solvomodula

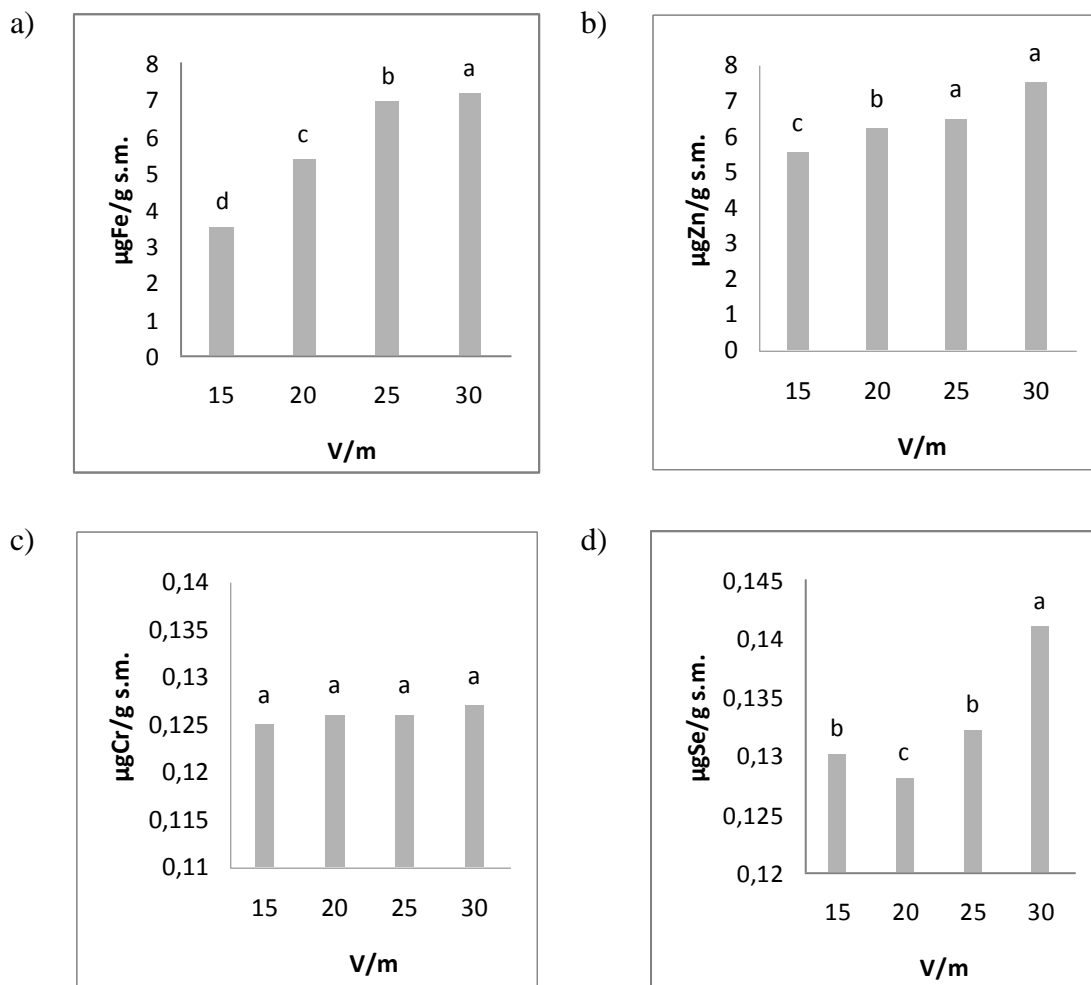
Pri odabranoj koncentraciji etanola (30%) i HCl (5%) ispitan je uticaj solvomodula za sledeće minerale:

- esencijalne makromineralne (kalijum, natrijum, kalcijum i magnezijum)
- esencijalne u tragovima (gvožđe, cink, hrom i selen)
- verovatno esencijalne u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalne i toksične (arsen, olovo, aluminijum, litijum, stroncijum i barijum).

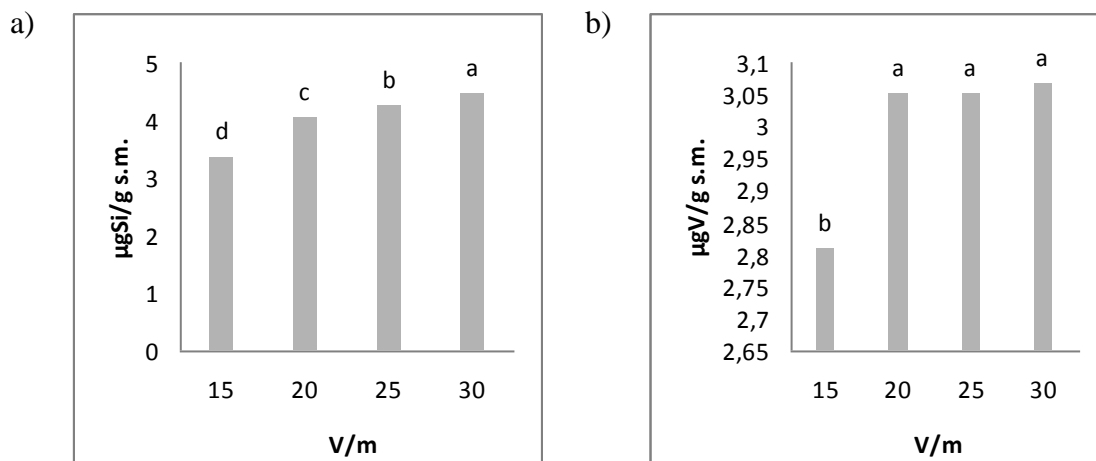
Rezultati ispitivanja uticaja solvomodula na sadržaj ovih minerala u ekstraktima prikazani su na Slikama od 4.19. do 4.22. (svi podaci su dati u Tabeli 8.4. u Prilogu).



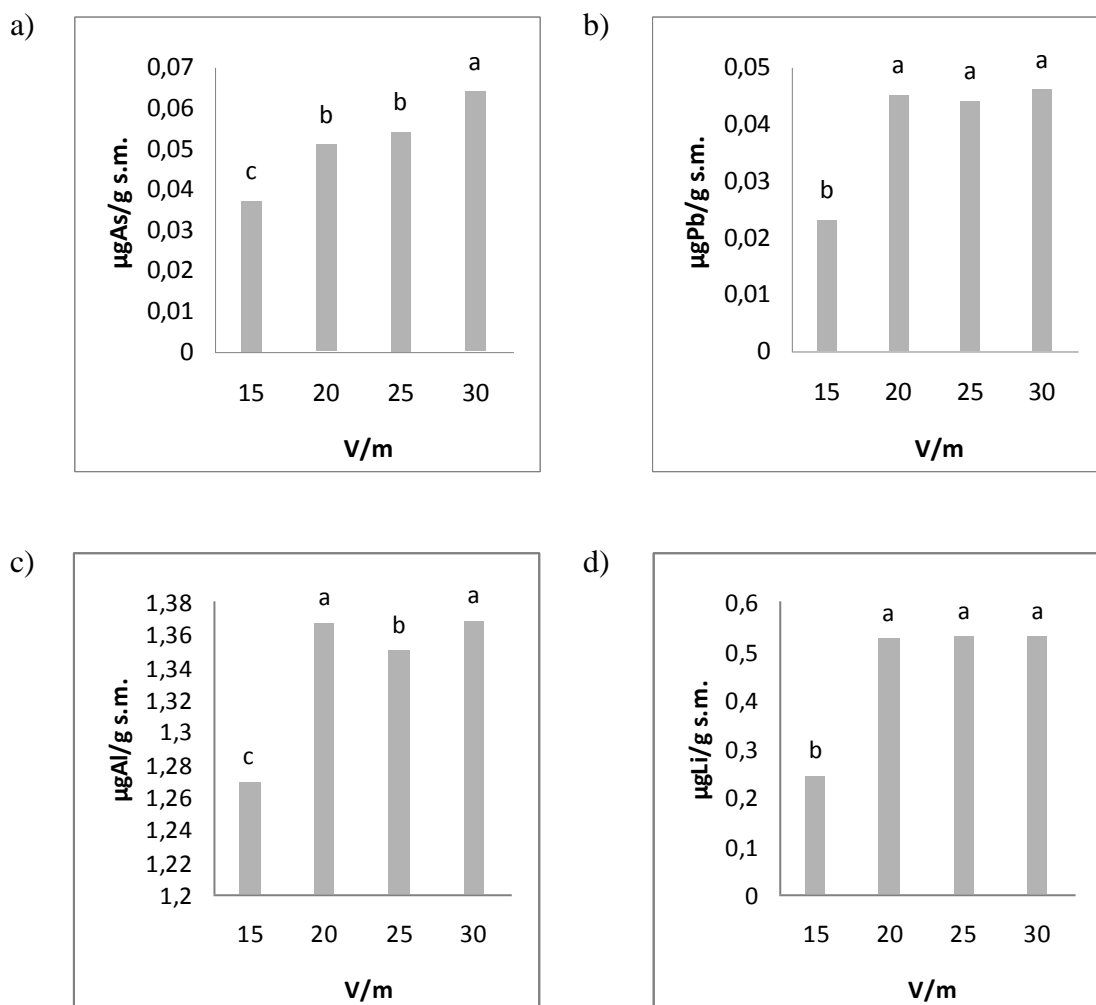
Slika 4.19. Uticaj solvomodula na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

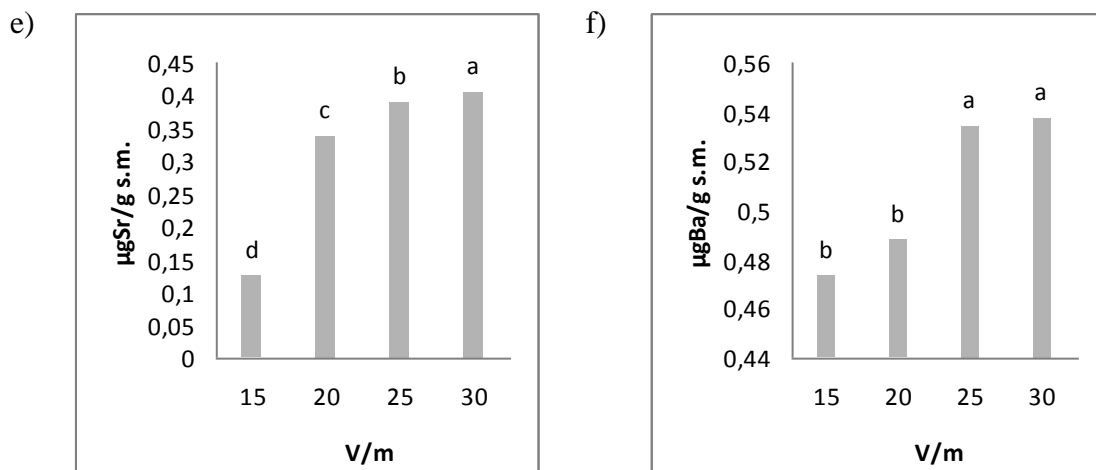


Slika 4.20. Uticaj solvomodula na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Zn; c)Cr i d)Se u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.



Slika 4.21. Uticaj solvomodula na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si; b) V u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.



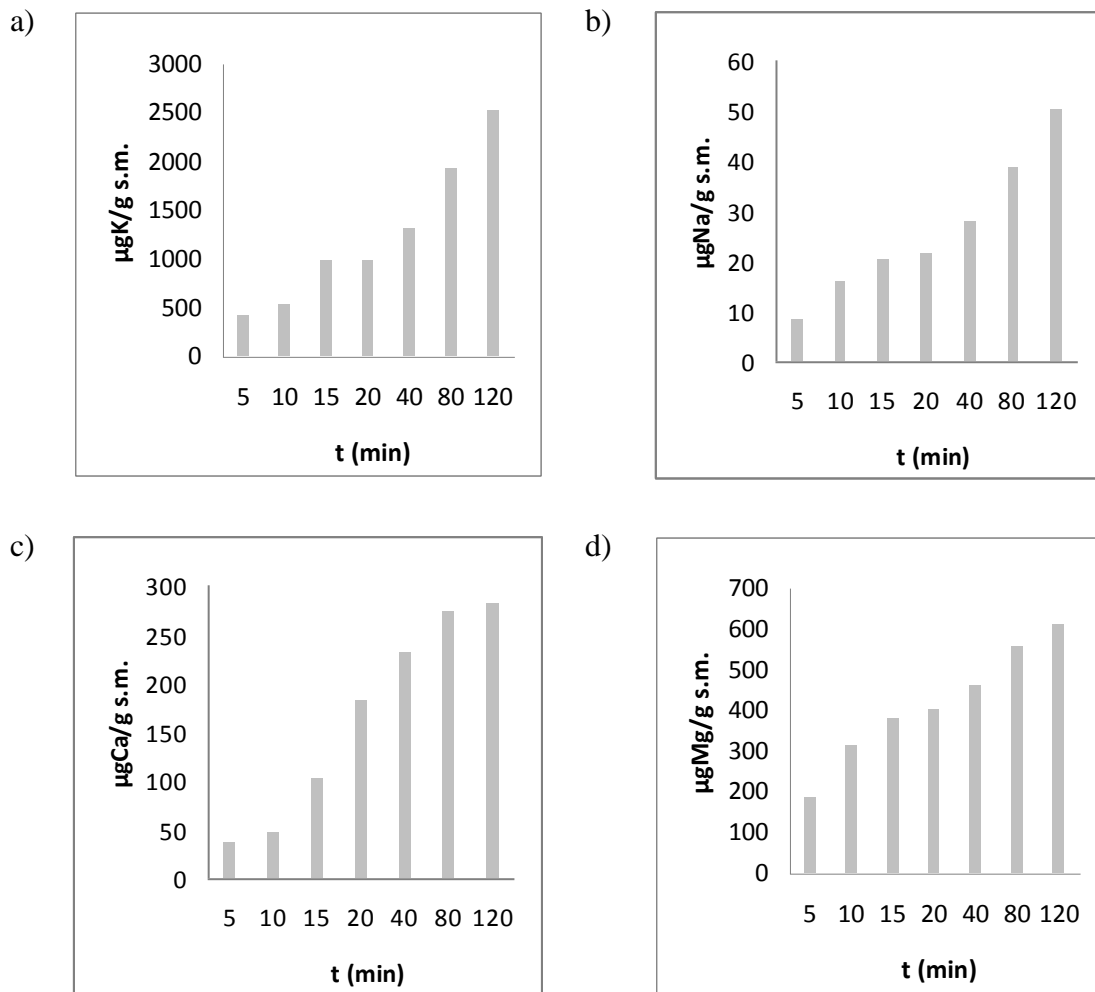


Slika 4.22. Uticaj solvomodula na sadržaj neesencijalnih minerala: a)As; b)Pb; c)Al; d)Li; e)Sr i f)Ba u ekstraktu ječma (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Slike pokazuju da je u svim slučajevima solvomodul 30 (V/m) najpogodniji za ekstrakciju.

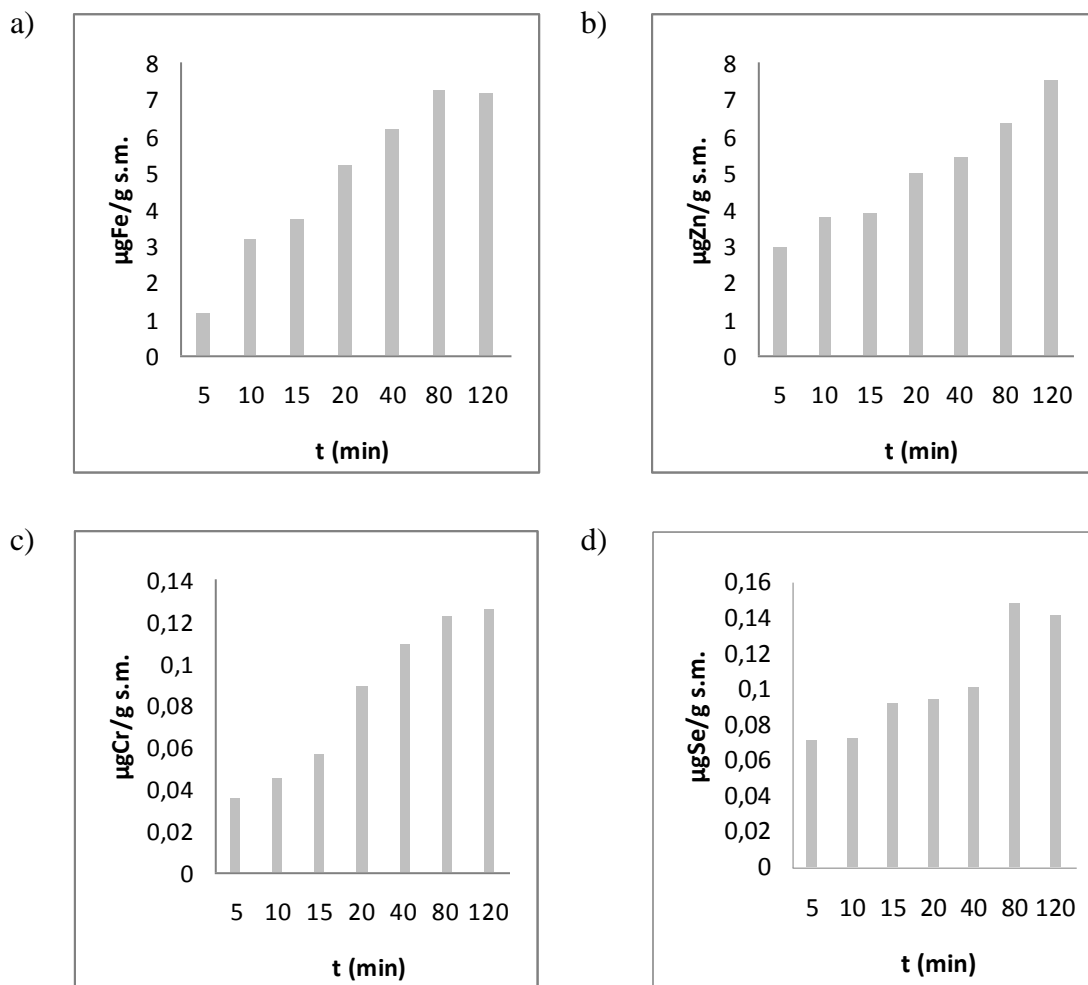
Uticaj vremena ekstrakcije

Pri optimalnim uslovima ekstrakcije metalnih jona (30% etanol sa 5% HCl (v/v), 30 (V/m) solvomodul) ispitan je uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cr, Se, Si, V, As, Pb, Al, Li, Sr i Ba. Rezultati ispitivanja su prikazani na Slikama 4.23 - 4.26., odnosno u Tabeli 8.5. (Prilog).



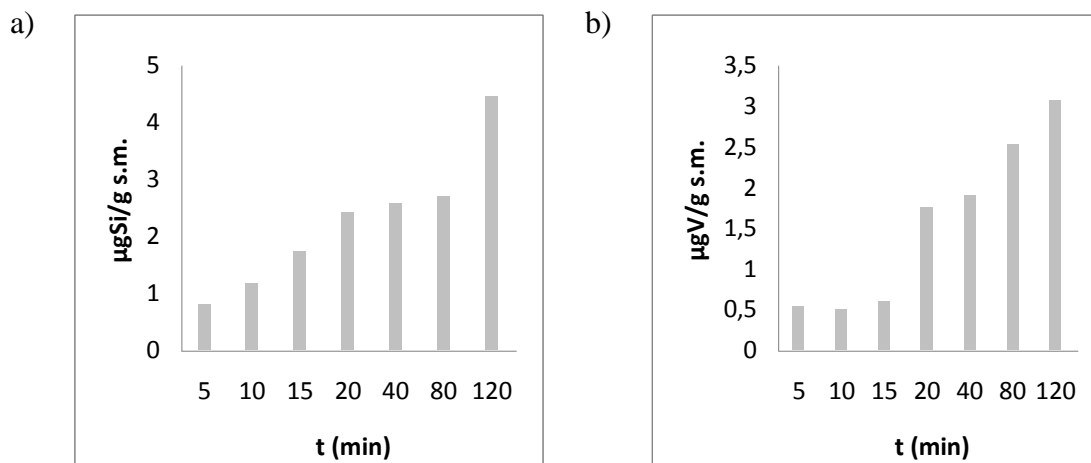
Slika 4.23. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvomodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$).

Slika 4.23. pokazuje da se najveći sadržaj K, Na, Ca i Mg postiže nakon 120 minuta ekstrakcije.



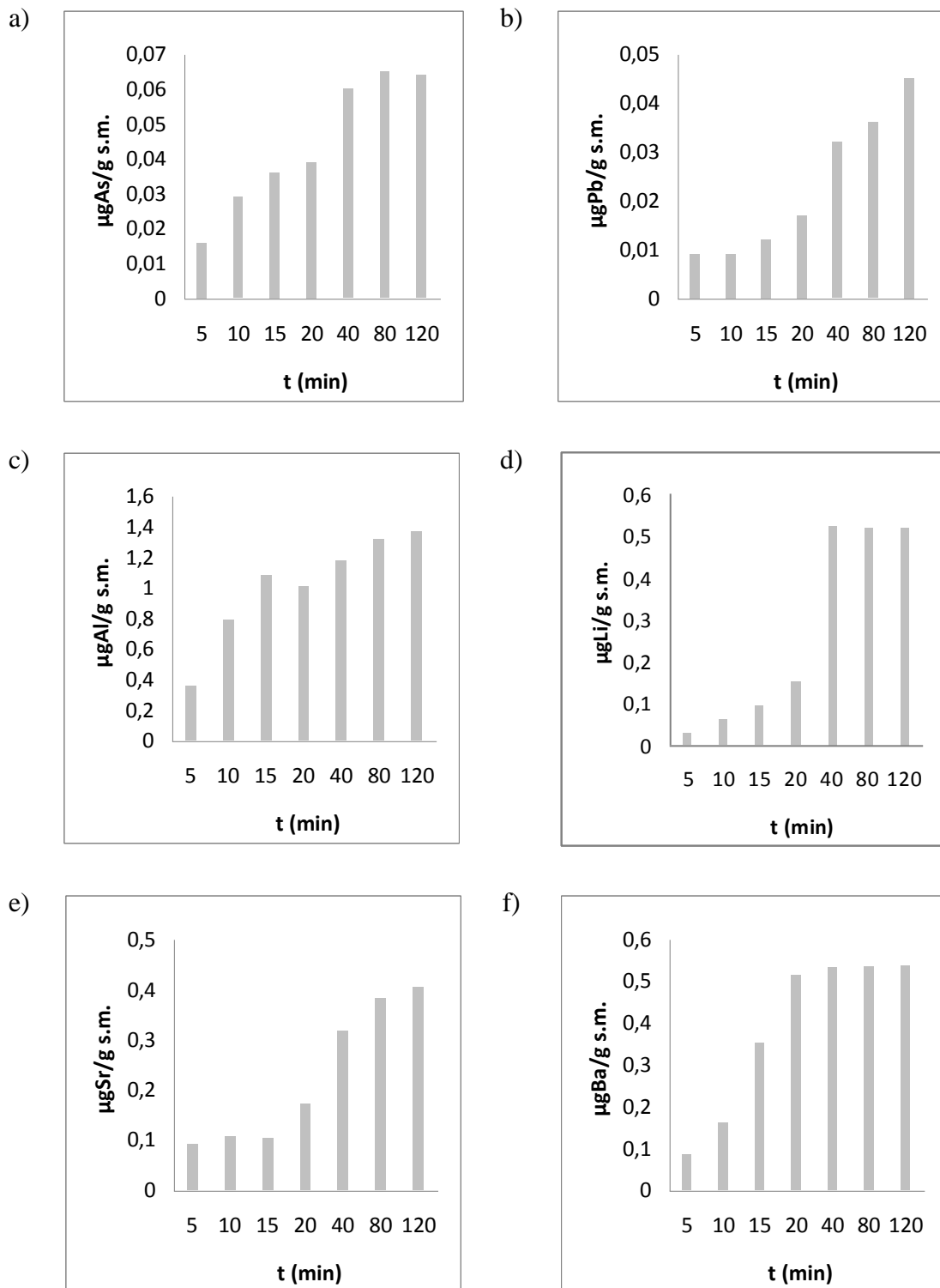
Slika 4.24. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Zn; c)Cr i d)Se u ekstraktu ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvomodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$).

Slika 4.24. pokazuje da se najveći sadržaj Zn i Cr postiže nakon 120 minuta ekstrakcije, dok je za Fe i Se dovoljno 80 minuta za ekstrakciju.



Slika 4.25. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si i b) V u ekstraktu ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvomodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$).

Slika 4.25. pokazuje da je za ekstrakciju Si i V potrebno 120 minuta, dok se na Slici 4.26. vidi da je za Pb, Al i Sr potrebno isto vreme ekstrakcije. U slučaju As, Li i Ba dovoljno vreme maceracije je 80 minuta.



Slika 4.26. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj neesencijalnih minerala: a)As; b)Pb; c)Al; d)Li; e)Sr i f)Ba u ekstraktu ječma (koncentracija etanola: 30%; koncentracija kiseline: 5%; solvomodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$).

4.1.2.2. Koeficijenti ekstrakcije metalnih jona iz ječma

Mineralni sastav ekstrakata ječma dobijenih pri optimalnim uslovima ekstrakcije predstavljen je u Tabeli 4.8. Dobijen je sadržaj elemenata K, Na, Ca, Mg, Zn, Cr, Si, V, Pb, Al i Sr nakon 120 minuta ekstrakcije, kao i sadržaj Fe, Se, As, Li i Ba nakon 80 minuta ekstrakcije. Svaki rezultat predstavlja srednju vrednost \pm standardna devijacija.

Ako se količina metala koja se nalazi u ekstraktu (c_i – računato kao μg po gramu suve materije) podeli količinom metala u ječmu od koga je napravljen ekstrakt, pripremljenog po proceduri datoj u delu 3.4.3. (c_0 - takođe računato kao μg po gramu suve materije), dobija se procenat ekstrakcije datog metala pri odabranim optimalnim uslovima ekstrakcije: 30% etanol, 5% HCl, solvomodul 30 (V/m) i $t=25^\circ\text{C}$ (Tabela 4.8.). Tako se ovi metali mogu podeliti na (*Szywczycha-Madeja i sar., 2012*):

- visoko ekstraktibilne (procenat ekstrakcije je veći od 55%): Na, Ca, Mg, Se i As
- srednje ekstraktibilne (procenat ekstrakcije je između 20 i 55%): K, Zn, Cr, Si, V, Pb, Al, Sr, Fe i Ba
- slabo ekstraktibilne (procenat ekstrakcije je manji od 20%): Li.

Oslobađanje metala u ekstraktu zavisi od jačine veze kojom je on vezan za organski matriks kao i od rastvorljivosti datog metala u 30% etanolu sa 5% HCl. Kod žitarica, dakle i kod ječma, minerali se prvenstveno nalaze u spoljnom sloju omotača zrna (K, Ca, Mg, Fe, Zn, Si), pa se ovom činjenicom mogu objasniti relativno visoki koeficijenti ekstrakcije za većinu metala. pH vrednost ekstragensa ima veliki uticaj na stepen ekstrakcije metala iz ječma. Pri tome, smanjenje pH upotrebljenog ekstragensa povećava ekstrakciju elemenata iz biljne sirovine zbog povećane rastvorljivosti.

Potvrdu naših podataka u pogledu transfera metala u ekstraktima dobijamo poređenjem rezultata sa literaturnim podacima. Koeficijenti ekstrakcije kreću se u opsegu 22,78 – 54,19% za Zn i 35,69 – 67,30% za Pb, što je u skladu sa našim rezultatima, dok su ekstrakcioni koeficijenti za Fe (4,7 – 11,20%) nešto niži od naših (30,57%) (*Sembratowicz i Rusinek-Prystupa, 2014*). *Diaconu i sar. (2012)* su za vodene ekstrakte različitih lekovitih biljaka odredili da se koeficijenti ekstrakcije kreću od 19,86 – 42,79% za Fe i od 12,50 – 83,56% za Cr u zavisnosti od matriksa. *Randelović i sar. (2013)* su pokazali da koeficijenti ekstrakcije dosta variraju u zavisnosti od biljnog materijala i postupka pripreme vodenih ekstrakata i to: 42,89 – 88,86% za Zn, 24,98 – 80,73% za Mn, 5,14 – 23,53% za Fe, 23,02 – 56,90% za Pb i 3,27 – 23,22% za Cu. U ovom radu su dobijene nešto manje vrednosti koeficijenata ekstrakcije sa obzirom na manju rastvorljivost metalnih jona u vodeno-etanolnom ekstragensu, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Micić i sar., 2013*).

Tabela 4.8. Koeficijenti ekstrakcije pri optimalnim uslovima u odnosu na vrednost dobijenu u uzorku ječma dobijenog procesom mineralizacije.

Vreme ekstrakcije (min)	Element	c_i	c_0	% ekstrakcije
120	K	2518,9±2,1	4692,5±4,5	53,68
	Na	49,94±0,11	64,85±0,05	77,00
	Ca	280,7±0,3	441,3±0,7	63,61
	Mg	611,0±1,2	1031,8±0,6	59,22
	Zn	7,494±0,003	22,35±0,02	33,53
	Cr	0,126±0,001	0,320±0,001	39,37
	Si	4,436±0,052	11,458±0,009	38,71
	V	3,065±0,021	10,393±0,002	29,49
	Pb	0,045±0,005	0,1063±0,0002	42,45
	Al	1,368±0,017	3,543±0,008	38,61
80	Sr	0,405±0,006	1,050±0,001	38,57
	Fe	7,251±0,001	23,72±0,03	30,57
	Se	0,148±0,004	0,1938±0,0002	76,29
	As	0,065±0,006	0,1075±0,0002	60,18
	Li	0,520±0,012	4,443±0,005	11,70
	Ba	0,534±0,009	1,2550±0,0008	42,55

4.1.3. Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata ječma

Proces pretvaranja ječma u slad je najbitniji za proizvodnju piva, dok je za kvalitet slada odgovoran ječam. Slad se može napraviti i od drugih žitarica osim ječma: mogu se upotrebiti i pšenica, zob ili raž. Zapravo, za neke vrste piva, poput nemačkih pšeničnih piva, potreban je pšenični slad. Međutim, ječam stvara najviše šećera, pa se i najviše koristi.

U daljem radu određen je hemijski sastav i antioksidativna aktivnost ječma, proizvedenog u Srbiji, da bi se odredio kvalitet ove sirovine u proizvodnji piva.

4.1.3.1. Spektrofotometrijska analiza ekstrakata ječma

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ječma korišćeni su deset različitih uzoraka ječma kupljenih u lokalnim marketima. Ekstrakcija je vršena pri odabranim optimalnim uslovima prema proceduri opisanoj u delu 3.4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativne aktivnosti u etanolnim ekstraktima prikazani su u Tabelama 4.9. i 4.10.

Tabela 4.9. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima ječma.

Uzorak	Ukupni fenoli* mgGAE/g	Ukupni flavonoidi* mgCE/g
1	1,372±0,010	0,664±0,017
2	1,474±0,015	0,602±0,003
3	1,334±0,005	0,586±0,008
4	1,414±0,010	0,554±0,018
5	1,299±0,005	0,619±0,004
6	1,302±0,020	0,498±0,013
7	1,260±0,010	0,465±0,008
8	1,295±0,020	0,643±0,004
9	1,348±0,015	0,625±0,013
10	1,411±0,005	0,492±0,013

*srednja vrednost ± SD (n = 3)

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ječma se kreće od 1,260 mgGAE/g (uzorak 7) do 1,474 mgGAE/g (uzorak 2). Vrednosti su veće od onih koje su publikovali *Bonoli i sar.* (2004) (0,38 mgGAE/g). *Zhao i sar.* (2008) dobili su veće vrednosti za ukupne fenole od naših (2,17-2,56 mgGAE/g). Slične rezultate našim dobili su *Zhao i sar.* (2006), čije se vrednosti za ukupne fenole kreću od 1,03 do 1,87 mg of GAE/g. Količina ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu ječma iz Kine je 1,75 mgGAE/g (*Liu i Yao, 2007*).

Sadržaj ukupnih flavonoida (Tabela 4.10.) u ispitivanim ekstraktima ječma kreće se od 0,465 mgCE/g (uzorak 7) do 0,664 mgCE/g (uzorak 1). *Bonoli i sar.* (2004) su publikovali niže vrednosti za ukupne flavonoide od naših.

Tabela 4.10. Antioksidativna aktivnost uzoraka ječma (DPPH, ABTS i FRAP metoda).

Uzorak	DPPH* µmolTE/g	ABTS* µmolTE/g	FRAP* µmolFE/g
1	8,799±0,027	7,530±0,065	11,082±0,764
2	9,106±0,028	9,133±0,129	12,165±0,768
3	8,713±0,040	8,400±0,130	7,290±1,536
4	8,952±0,027	8,858±0,130	13,251±0,768
5	8,665±0,028	7,759±0,065	8,373±1,532
6	8,579±0,040	6,522±0,065	5,664±0,764
7	8,473±0,027	6,728±0,033	6,747±0,768
8	8,319±0,054	6,843±0,065	10,539±1,532
9	8,646±0,028	8,583±0,065	13,791±1,532
10	9,019±0,041	9,568±0,098	14,877±1,532

*srednja vrednost ± SD (n = 3)

Relativno stabilan organski radikal DPPH se široko koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti čistih antioksidativnih jedinjenja, kao i kod ekstrakata žitarica

(Goupy i sar., 1999). Antioksidativna aktivnost (DPPH) ispitivanih ekstrakata uzoraka ječma, izražena kao $\mu\text{molTE/g}$, se kreće u opsegu od 8,319 (uzorak 8) do 9,106 (uzorak 2) (Tabela 4.11.). Razlike u pogledu antioksidativne aktivnosti ekstrakata ječma nisu značajne. Bonoli i sar. (2004) su objavili veće vrednosti od naših (oko 13 $\mu\text{molTE/g}$). Slične i veće vrednosti za DPPH antioksidativnu aktivnost dobili su Zhao i sar. (2008) (9,33-11,78 $\mu\text{molTE/g}$).

ABTS je takođe organski radikal koji se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti pojedinačnih jedinjenja i kompleksnih smeša (Zhou i sar., 2004). Vrednosti za antioksidativnu aktivnost određenu pomoću ABTS metode, za 10 različitih ekstrakata ječma, kreću se od 6,522 (uzorak 6) do 9,568 (uzorak 10) $\mu\text{molTE/g}$. Zhao i sar. (2008) objavljuju veće vrednosti od naših (11,39-11,58 $\mu\text{molTE/g}$). Analiza ekstrakata ječma iz Kine pokazuje niže vrednosti za antioksidativnu aktivnost od naših rezultata (Zhao i sar., 2006).

Određivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata ječma FRAP metodom, dobili smo vrednosti koje se kreću od 5,664 (uzorak 6) do 14,877 $\mu\text{molTE/g}$ (uzorak 10). Slične rezultate za antioksidativnu aktivnost ekstrakata ječma dobili su Stratil i sar. (2007). Uzorci ječma koje su analizirali Pellegrini i sar. (2006) pokazali su veću aktivnost (18,97 $\mu\text{molTE/g}$).

4.1.3.2. ICP-OES analiza mineralnog sastava ječma

Niska granica detekcije i široki radni opseg za mnoge elemente čine ICP-OES metodu idealnom za analizu uzoraka biljnog porekla. U cilju određivanja sadržaja minerala u ispitivanim uzorcima ječma, izvršena je priprema uzoraka po proceduri prikazanoj u delu 3.4.3. (suva mineralizacija). U Tabeli 4.11. prikazane su odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijenti korelacije, granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ).

Tabela 4.11. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata u uzorcima ječma.

Element	λ (nm)	LOD ¹ ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ² ($\mu\text{g/g}$)	Korelacioni koeficijent
Al	308,215	0,0053	0,0177	0,9999
As	189,042	0,0025	0,0084	0,9999
B	249,773	0,0006	0,0020	0,9997
Ba	455,403	0,0001	0,0001	0,9999
Ca	422,673	0,0005	0,0017	0,9995
Cd	228,802	0,0002	0,0006	1
Cr	283,563	0,0007	0,0024	0,9998
Cu	324,754	0,0007	0,0022	0,9998
Fe	259,940	0,0005	0,0017	0,9999
K	766,490	0,0019	0,0064	0,9998
Li	670,784	0,0001	0,0002	0,9997
Mg	285,213	0,0002	0,0007	1
Mn	257,610	0,0001	0,0004	0,9999
Mo	202,030	0,0006	0,0018	1
Na	589,592	0,0008	0,0026	0,9997
Ni	221,647	0,0006	0,0019	0,9994
Pb	220,353	0,0021	0,0069	0,9999
Sb	206,883	0,0027	0,0091	0,9999
Se	196,090	0,0030	0,0099	0,9997
Si	251,611	0,0018	0,0059	0,9993
Sn	189,989	0,0011	0,0037	1
Sr	407,771	0,0001	0,0001	0,9997
V	309,311	0,0011	0,0036	0,9998
Zn	213,856	0,0002	0,0006	0,9991

¹LOD – granica detekcije, ²LOQ – granica kvantifikacije.

Mineralni sastav deset uzoraka ječma je određen ICP-OES metodom i dobijene vrednosti za 24 elementa (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, V i Zn) su prikazane u Tabelama 4.12., 4.13. i 4.14. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri uzastopna merenja.

Tabela 4.12. Sadržaj makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima ječma.

Uzorak	K	Na	Ca	Mg	Na/K
1	4692,5 \pm 4,5	64,85 \pm 0,05	441,3 \pm 0,7	1031,8 \pm 0,6	0,014
2	3975,0 \pm 0,4	74,68 \pm 0,11	394,3 \pm 0,3	846,0 \pm 0,5	0,019
3	3847,5 \pm 2,8	79,85 \pm 0,04	366,8 \pm 0,1	836,3 \pm 0,4	0,021
4	3620,0 \pm 0,6	47,73 \pm 0,05	349,8 \pm 0,1	777,8 \pm 0,8	0,013
5	3722,5 \pm 1,3	54,28 \pm 0,04	357,5 \pm 0,2	776,3 \pm 0,3	0,015
6	3572,5 \pm 1,9	60,85 \pm 0,04	355,5 \pm 0,1	775,3 \pm 0,3	0,017
7	3812,5 \pm 2,1	68,03 \pm 0,03	367,8 \pm 0,1	789,0 \pm 0,3	0,017
8	3775,0 \pm 3,0	69,68 \pm 0,04	376,8 \pm 0,2	783,8 \pm 0,2	0,018
9	3640,0 \pm 1,9	83,53 \pm 0,09	384,5 \pm 0,1	773,5 \pm 0,6	0,023
10	3700,0 \pm 1,5	60,08 \pm 0,04	350,0 \pm 0,1	758,3 \pm 0,2	0,016

U analiziranim uzorcima najzastupljeniji su alkalni (K, Na) i zemnoalkalni (Ca, Mg) metali, dok su biološki važni elementi (Fe, Zn, Mn, Cu) u sledećoj grupi po zastupljenosti.

Iz Tabele 4.12. se može videti da je u svim uzorcima ječma sadržaj kalijuma bio najveći u poređenju sa ostalim detektovanim makroelementima (Ca, Mg i Na). Sadržaj kalijuma u uzorcima ječma kreće se u intervalu 3572,5 – 4692,5 $\mu\text{g/g}$. Pšenica gajena u Poljskoj sadrži K u intervalu od 3320 – 4100 $\mu\text{g/g}$ (*Debski i sar., 2001*), dok pšenica gajena u Kini sadrži znatno više (13029 $\mu\text{g/g}$) (*Tang i sar., 2008*). Preporučeni dnevni unos kalijuma (*Institute of Medicine, 2004*) se kreće od 0,4 g za odojčad, 3,8 g za decu od 4 - 8 godina do 4,7 g za adolescente, žene i muškarce. Kalijum je važan sastojak ćelija i telesnih tečnosti koje pomažu kontrolu rada srca i krvnog pritiska. Sadržaj natrijuma se kreće u intervalu 47,73 – 83,53 $\mu\text{g/g}$. U radu *Shtangeeva i sar. (2011)* određen je sadržaj ovog elementa koji je u skladu sa našim rezultatima. Uz sve savete o smanjenju unosa natrijuma, treba istaći činjenicu da natrijum i kalijum deluju zajedno i da je ustvari bilans ova dva minerala u ishrani vrlo važan. Koeficijent odnosa natrijuma i kalijuma (Na/K), izračunat na osnovu preporučenih dnevnih unosa je 0,3 (600 mg za Na i 2000 mg za K dnevno) (*Reports of the Scientific Committete for Food, 1993*). Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.12. može se videti da su vrednosti za Na/K koeficijente značajno male za sve uzorke zbog velike koncentracije kalijuma u svim uzorcima. Sa druge strane najniži sadržaj od svih detektovanih makroelemenata u uzorcima ječma je određen za natrijum.

Sadržaj kalcijuma u uzorcima ječma je u intervalu 349,8 – 441,3 $\mu\text{g/g}$. Kalcijum je najobilniji mineral u ljudskom organizmu. Njegove soli direktno utiču na čvrstinu kostiju i zuba. U organizmu se nalazi oko 1 kg kalcijuma, od čega je najveći deo u kostima. Magnezijum ima veoma važnu ulogu u vezivanju kalcijuma za kosti. Takođe, on učestvuje u regulisanju srčanog ritma i snižavanju nivoa holesterola. Ječam je bogat izvor magnezijuma. U ispitivanim uzorcima njegov sadržaj se kreće u rasponu od 758,3 do 1031,8 $\mu\text{g/g}$.

Pregledom radova u kojima su određivani makroelementi u uzorcima ječma može se videti da analizirani uzorci ječma iz Pakistana pokazuju veći sadržaj ovih metala od naših (*Shar i sar., 2007*). *Cheng i sar. (2012)* su dobili slične rezultate za sadržaj Mg i veće vrednosti za Ca. *Nikkhah (2012)* je objavio slične i veće vrednosti za ove metale u ječmu (5700 $\mu\text{g/g}$ za K, 500 $\mu\text{g/g}$ za Ca i 1200 $\mu\text{g/g}$ za Mg). Uzorci ječma iz Kine pokazuju manji sadržaj ovih metala (*Liu i Zhang, 2010*).

Tabela 4.13. Sadržaj mikroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima ječma: a) Fe, Cu, Mn i Zn; b) Cr, Se, Si, V i Mo i c) Ni i Sn.

a)

Uzorak	Fe	Cu	Mn	Zn
1	23,72 \pm 0,03	4,460 \pm 0,004	13,50 \pm 0,01	22,35 \pm 0,02
2	21,49 \pm 0,02	4,365 \pm 0,018	11,95 \pm 0,01	19,08 \pm 0,02
3	24,87 \pm 0,01	4,963 \pm 0,002	12,68 \pm 0,03	24,00 \pm 0,01
4	18,88 \pm 0,01	3,043 \pm 0,002	10,36 \pm 0,01	15,76 \pm 0,01
5	19,40 \pm 0,01	3,928 \pm 0,002	11,11 \pm 0,01	16,44 \pm 0,01
6	19,18 \pm 0,01	3,585 \pm 0,003	10,60 \pm 0,04	17,00 \pm 0,02
7	20,70 \pm 0,01	3,790 \pm 0,001	11,98 \pm 0,07	19,77 \pm 0,03
8	19,24 \pm 0,01	3,508 \pm 0,004	11,94 \pm 0,02	18,56 \pm 0,01
9	19,13 \pm 0,02	3,563 \pm 0,004	11,32 \pm 0,01	19,12 \pm 0,02
10	19,49 \pm 1,08	3,053 \pm 0,001	11,60 \pm 0,03	18,71 \pm 0,03

b)

Uzorak	Cr	Se	Si	V	Mo
1	0,320 \pm 0,001	0,1938 \pm 0,0002	11,458 \pm 0,009	10,393 \pm 0,002	0,6225 \pm 0,0019
2	0,358 \pm 0,001	0,0963 \pm 0,0009	9,565 \pm 0,013	9,748 \pm 0,004	0,4500 \pm 0,0009
3	0,370 \pm 0,003	0,0975 \pm 0,0006	7,853 \pm 0,005	9,693 \pm 0,001	0,5200 \pm 0,0005
4	0,385 \pm 0,001	0,1488 \pm 0,0011	6,263 \pm 0,004	9,413 \pm 0,002	0,3675 \pm 0,0004
5	0,413 \pm 0,003	0,0225 \pm 0,0011	5,868 \pm 0,002	9,525 \pm 0,002	0,3850 \pm 0,0002
6	0,383 \pm 0,001	0,0388 \pm 0,0001	7,058 \pm 0,003	9,415 \pm 0,001	0,3875 \pm 0,0004
7	0,383 \pm 0,001	0,1750 \pm 0,0003	8,488 \pm 0,003	9,745 \pm 0,002	0,5200 \pm 0,0004
8	0,428 \pm 0,002	0,1850 \pm 0,0003	9,198 \pm 0,008	9,863 \pm 0,001	0,5475 \pm 0,0007
9	0,355 \pm 0,001	0,1100 \pm 0,0003	9,933 \pm 0,005	9,728 \pm 0,002	0,5725 \pm 0,0001
10	0,410 \pm 0,001	0,1613 \pm 0,0025	10,980 \pm 0,004	9,703 \pm 0,001	0,5900 \pm 0,0006

c)

Uzorak	Ni	Sn
1	0,1900 \pm 0,0001	0,2088 \pm 0,0015
2	0,0375 \pm 0,0001	0,1188 \pm 0,0001
3	0,0638 \pm 0,0002	0,1163 \pm 0,0004
4	0,0238 \pm 0,0001	0,1425 \pm 0,0003
5	0,0213 \pm 0,0001	0,1225 \pm 0,0003
6	0,0113 \pm 0,0002	0,1275 \pm 0,0004
7	0,0063 \pm 0,0001	0,1075 \pm 0,0006
8	nd*	0,1613 \pm 0,0004
9	0,0450 \pm 0,0001	0,1163 \pm 0,0002
10	0,0275 \pm 0,0001	0,0788 \pm 0,0004

*-nije detektovano

Mikroelementi su neophodni za izgradnju enzima koji u organizmu imaju bitnu ulogu u svim biohemijskim procesima. Iz grupe mikroelemenata najveći sadržaj u svim ispitivanim uzorcima detektovan je za gvožđe i kreće se od 19,13 do 24,87 $\mu\text{g/g}$. Preporučeni dnevni unos za Fe se kreće od 0,27 mg za odojčad, 10 mg za decu od 4 - 8 godina, 11 mg za adolescente, 8 mg za muškarce i 18 mg za žene (*Institute of Medicine, 2001*). Žitarice sadrže

veliku količinu gvožđa koja se kod pšenice, raži i ječma kreće oko 40 $\mu\text{g/g}$ (*Jaredić i Vučetić, 1997*). Drugi autori su dobili veće vrednosti koncentracije Fe u uzorcima ječma (*Shar i sar., 2013; Cheng i sar., 2012; Liu i Zhang, 2010*).

Cink je esencijalna komponenta za veliki broj (>300) enzima koji učestvuju u sintezi i razgradnji ugljenih hidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina kao i u metabolizmu drugih mikronutrijenata. *Cheng i sar. (2012)* su objavili veoma slične rezultate (23,31 mg/kg). Vrednosti sa koncentracije Zn u ječmu iz Pakistana su veće od naših (*Shar i sar., 2013*), dok su za ječam iz Kine manje (6-12 mg/kg) (*Liu i Zhang, 2010*).

Sledeći po zastupljenosti mikroelemenata je mangan čiji se sadržaj u ispitivanim uzorcima kreće 10,36 do 13,50 $\mu\text{g/g}$. Najveći izvor mangana su žitarice, povrće i voda. *Shar i sar. (2007)* su objavili slične rezultate za Mn, dok su veće vrednosti dobili *Cheng i sar. (2012)*. Količine ostalih metala su pratile sledeći opadajući niz: V>Si>Cu. Sadržaj vanadijuma u uzorcima ječma je gotovo isti i kreće se od 9,413 do 10,393 $\mu\text{g/g}$. Preporučena dnevna doza za V nije određena (*Institute of Medicine, 2001*). Njegova uloga u ishrani je malo poznata, ali se pretpostavlja da utiče na stvaranje insulina. Nalazi se u žitaricama, orasima i korenastom povrću. Sadržaj Cu se kreće od 3,0425 do 4,9625 $\mu\text{g/g}$ i ove vrednosti su niže od onih dobijenih od strane drugih autora (*Shar i sar., 2013; Liu i Zhang, 2010*). *Cheng i sar. (2012)* su objavili slične rezultate za Cu (4,19 mg/kg). Ostali mikroelementi (hrom, selen, molibden, nikl i kalaj) su u uzorcima ječma prisutni u malim količinama (manje od 1 $\mu\text{g/g}$).

Uzorak 8 sadrži najveću količinu Cr (0,4275 $\mu\text{g/g}$), dok se najmanja količina nalazi u uzorku 1 (0,3200 $\mu\text{g/g}$). Naši rezultati za Cr su manji od rezultata dobijenih za ječam iz Pakistana (*Shar i sar., 2007*). Uzorak 7 sadrži veoma malu koncentraciju Ni (0,0063 $\mu\text{g/g}$) dok je najveća koncentracija u uzorku 1 (0,19 $\mu\text{g/g}$). Ni nije detektovan u uzorku 8. Koncentracija Se se kreće od 0,0225 (uzorak 5) do 0,1938 $\mu\text{g/g}$ (uzorak 1). U analiziranim uzorcima ječma koncentracija Se je u opsegu od 0,0788 do 0,2088 $\mu\text{g/g}$. Najveću količinu Si sadrži uzorak 1 (11,4575 $\mu\text{g/g}$), a najmanju uzorak 5 (5,8675 $\mu\text{g/g}$).

Tabela 4.14. Sadržaj neesencijalnih elemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima ječma: a) As, Pb, Cd, Al i B; b) Ba, Li, Sr i Sb.

a)

Uzorak	As	Pb	Cd	Al	B
1	0,1075±0,0002	0,1063±0,0002	0,0475±0,0001	3,543±0,008	1,8400±0,0057
2	0,0625±0,0004	0,0750±0,0003	0,0525±0,0002	3,220±0,019	0,6300±0,0028
3	0,0975±0,0016	0,0625±0,0007	0,0600±0,0001	3,203±0,012	0,3075±0,0009
4	0,0650±0,0004	0,3438±0,0008	0,0350±0,0001	3,068±0,009	0,2600±0,0008
5	0,0850±0,0004	0,0763±0,0004	0,0425±0,0001	3,218±0,005	0,1363±0,0001
6	0,0725±0,0018	nd*	0,0400±0,0001	3,290±0,006	0,0925±0,0003
7	0,0700±0,0004	0,0425±0,0004	0,0350±0,0001	2,154±0,003	0,1438±0,0002
8	0,0575±0,0008	0,0550±0,0004	0,0313±0,0001	2,348±0,005	0,1300±0,0001
9	0,1000±0,0009	0,0750±0,0006	0,0015±0,0001	2,005±0,007	0,2250±0,0001
10	0,0400±0,0007	0,0350±0,0003	0,0019±0,0001	2,413±0,006	0,2600±0,0007

b)

Uzorak	Ba	Li	Sr	Sb
1	1,2550±0,0008	4,443±0,005	1,050±0,001	0,1300±0,0009
2	0,8325±0,0010	0,600±0,001	1,368±0,001	0,1100±0,0001
3	0,7400±0,0001	0,358±0,001	1,185±0,002	0,1025±0,0003
4	0,9575±0,0008	2,103±0,002	1,158±0,001	0,1986±0,0012
5	0,8450±0,0004	2,193±0,001	1,265±0,001	0,1413±0,0002
6	0,9150±0,0005	7,115±0,005	1,200±0,001	0,1913±0,0004
7	0,9700±0,0004	5,738±0,003	1,375±0,001	0,1175±0,0001
8	1,0000±0,0003	6,540±0,003	1,475±0,003	0,1625±0,0001
9	1,0650±0,0008	6,038±0,008	1,773±0,002	0,2263±0,0005
10	0,8675±0,0003	3,043±0,002	1,305±0,001	0,1750±0,0007

*-nije detektovano

Aluminijum i litijum su metali koji su detektovani u najvećem sadržaju od svih ostalih prisutnih neesencijalnih metala u uzorcima ječma. Sadržaj aluminijuma se kreće u rasponu od 2,005 do 3,543 $\mu\text{g/g}$. Ovi rezultati za sadržaj Al u ječmu su manji od rezultata iz Pakistana (*Shar i sar.*, 2013).

U svim ispitivanim uzorcima ječma detektovano je prisustvo kadmijuma i arsena, dok olovo nije detektovano samo u jednom uzorku. Sadržaj toksičnih metala je jedan od parametara koji je neophodno odraditi radi ispitivanja zdravstvene ispravnosti namirnica. Koncentracije olova, kadmijuma i arsena se u uzorcima ječma nalaze u intervalu (0,0350 - 0,3438; 0,0015 - 0,0600 i 0,0400 - 0,1075 $\mu\text{g/g}$). Koncentracije teških metala u uzorcima ječma su ispod MDK vrednosti propisanih domaćom regulativom. Razlika uzorka sa najvećim i uzorka sa najmanjim sadržajem je 9,8 puta za olovo, 40 puta za kadmijum i 2,7 puta za arsen. Ovakva razlika u sadržaju detektovanog kadmijuma u istoj vrsti žitarice, ali sa

različitog lokaliteta, potvrđuje da izduvni gasovi iz industrijskih postrojenja i motornih vozila mogu dovesti do povećanja sadržaja kontaminanata u žitaricama. Sadržaji Pb, Cd i As jesu niski u ispitivanim uzorcima ječma, ali imajući u vidu toksičan i kumulativni efekat koji ovi metali mogu imati u ljudskom organizmu, neophodno je stalno praćenje i određivanje sadržaja ovih metala u žitaricama. *Shar i sar.* (2013) su objavili rezultate za Cd koji su u opsegu od 0,23 do 0,45 mg/kg. Ječam iz Kine sadrži sličnu koncentraciju Cd našim (0,033 mg/kg) (*Cheng i sar.* 2012). Slične vrednosti za Pb su dobijene za ječam iz Kine (*Cheng i sar.* 2012).

Uzorak 6 sadrži najmanju količinu B (0,0925 µg/g), a uzorak 1 najveću (1,8400 µg/g). Sadržaj Ba u ispitivanim uzorcima ječma varira u opsegu od 0,7400 (uzorak 3) do 1,2550 µg/g (uzorak 1). *Shar i sar.* (2013) su dobili veće vrednosti za Ba. Uzorak 3 sadrži najmanju količinu Li (0,3575 µg/g) a najveću uzorak 6 (7,1150 µg/g). Nivo Sb varira između 0,1025 i 0,2263 µg/g. Sr je zastupljen u koncentracijama od 1,0500 (uzorak 1) do 1,7725 µg/g (uzorak 9).

4.2. KINETIKA I SASTAV EKSTRAKATA HMELJA

U toku proizvodnje piva, vrši se kuvanje sladovine sa hmeljom, pri čemu se ekstrahuju gorke i aromatične materije. Količina hmelja koja se dodaje u sladovinu varira od 200 – 500 g po hektolitr piva, što zavisi od više faktora. Na primer, svetla piva u odnosu na tamna zahtevaju 20 – 30% više hmelja po hektolitr piva. Razlog je da svetla piva treba da imaju hmeljnu gorčinu, dok su tamna piva slabo aromatičnog ukusa.

U ovom delu rada određeni su optimalni uslovi ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola, fenolnih kiselina i mineralnih materija iz hmelja. Određen je i mineralni i fenolni sastav više različitih uzoraka hmelja.

Ekstrakcija iz hmelja vršena je vodenim rastvorima etanola postupkom maceracije. U Tabeli 4.15. je dat pregled uslova ekstrakcije.

Tabela 4.15. Ispitivani parametri i njihovi intervali vrednosti za ekstrakciju antioksidansa iz hmelja.

Parametar	Interval
Koncentracija etanola, %	20, 30, 50, 70, 90
Koncentracija HCl, %	0, 0.1, 1, 5
Solvomodul, V/m	15, 20, 25, 30
Vreme ekstrakcije, min	20, 40, 80, 120
Temperatura ekstrakcije, °C	25, 35, 45

4.2.1. Ekstrakcija antioksidanasa iz hmelja

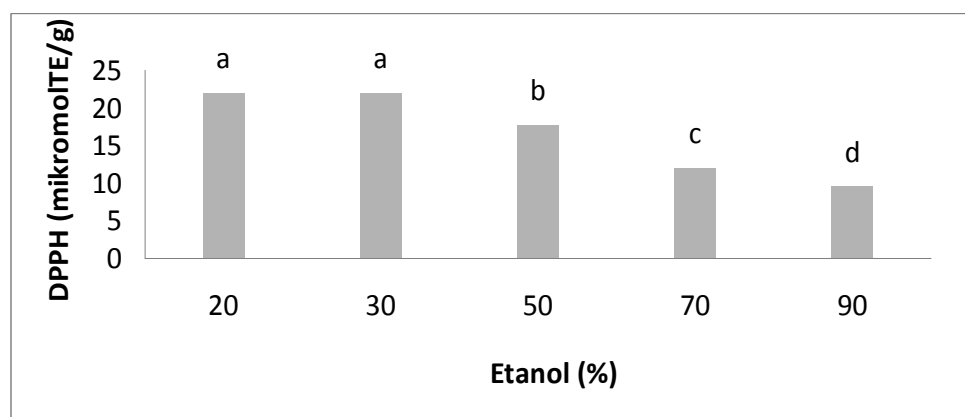
Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata određen je merenjem njihove sposobnosti da redukuju DPPH[•] radikale (DPPH test) (*Brand-Williams i sar., 1995*). Ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena je kao ekvivalent troloksa po gramu uzorka. Na osnovu eksperimentalnih rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije izvršeno je modelovanje ekstrakcionog sistema hmelj-maceracija primenom dva modela.

4.2.1.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju antioksidanata iz hmelja

U cilju određivanja optimalnih uslova za ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja ispitan je uticaj koncentracije etanola, koncentracije kiseline, solvomodula, vremena i temperature ekstrakcije na antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata.

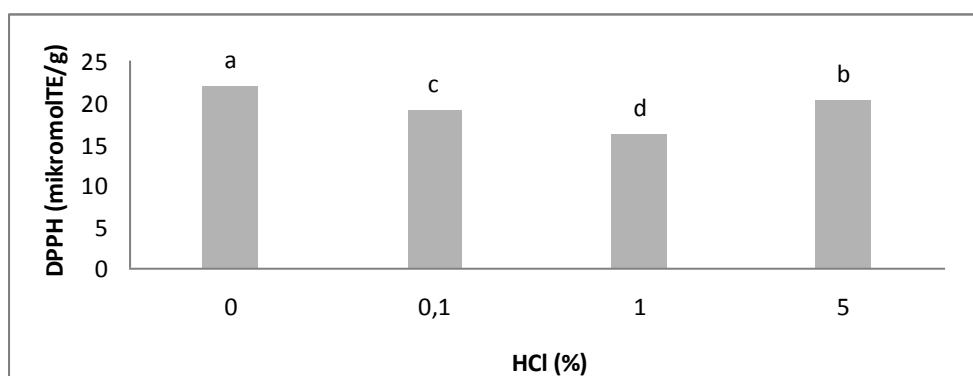
Ekstrakcija antioksidanasa iz hmelja sprovedena je primenom binarnih sistema rastvarača (20, 30, 50, 70 i 90% vodeni rastvori etanola).

Zavisnost antioksidativne aktivnosti ekstrakata od koncentracije etanola u ekstragensu prikazana je na Slici 4.27. Rezultati su pokazali da se sa porastom udela organskog rastvarača u vodenim rastvorima ekstrakcioni kapacitet smanjuje. Primenom 30% vodenog rastvora etanola postignut je najveći ekstrakcioni kapacitet, te je ekstrahovan najveći maseni udeo antioksidanasa. Rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora, koji su pokazali da se bolji ekstrakcioni kapacitet postiže primenom binarnog sistema rastvarača. *Diankov i sar.* (2011) su sprovedi ekstrakciju upotrebom 20, 50 i 70% vodenih rastvora etanola pri čemu su zaključili da najveću antioksidativnu aktivnost imaju ekstrakti sa 50% etanolom.



Slika 4.27. Uticaj koncentracije etanola na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

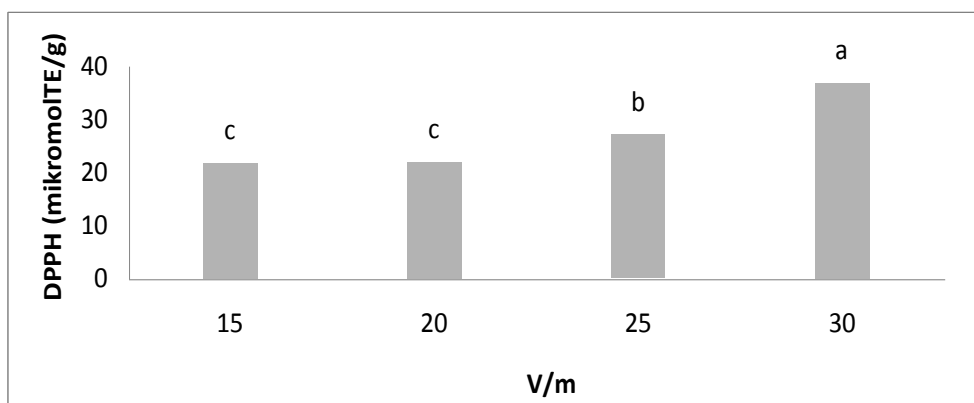
Uticaj kiselosti rastvarača na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja je ispitan upotrebom različitih koncentracija HCl u 30% etanolu kao rastvaraču (Slika 4.28.).



Slika 4.28. Uticaj koncentracije kiseline na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Rezultati pokazuju da sadržaj antioksidanasa opada sa porastom koncentracije kiseline do 1%, a potom opet raste. Međutim kako se najbolji rezultati dobijaju kada u rastvaraču za ekstrakciju nije dodavana kiselina, to smo u daljem radu koristili 30% etanol bez dodatka kiseline. *Libran i sar.* (2013) su pokazali da pri ekstrakciji 75% etanolom, najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje ekstrakt pri pH=2. Međutim, isti autori su pokazali da u slučaju ekstrakcije 25% i 50% etanolom optimalna vrednost pH je u intervalu 5,3 – 8,66.

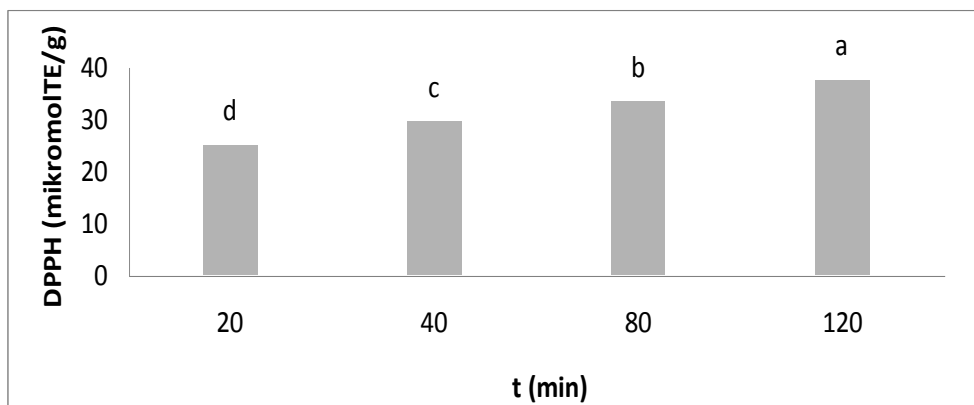
Odnos rastvarača i čvrste materije (solvomodul) pokazuje značajan efekat na antioksidativnu aktivnost ekstrakta što je prikazano na Slici 4.29.



Slika 4.29. Uticaj solvomodula na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Pri solvomodulu od 30 (V/m) antioksidativna aktivnost je najveća i iznosi 36,66 $\mu\text{molTE/g}$. Visoka vrednost solvomodula dovodi do povećanja koncentracionog gradijenta što dalje dovodi do povećanja procesa difuzije koja omogućava bolju ekstrakciju (*Tan i sar.*, 2011; *Wong i sar.*, 2013).

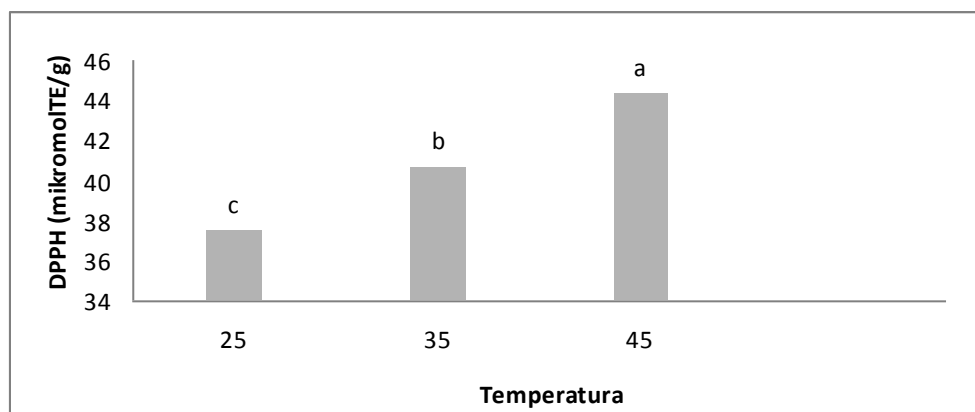
Uticaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja je prikazan na Slici 4.30.



Slika 4.30. Uticaj vremena ekstrakcije na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: V/m=30; t=25°C). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Sa Slike 4.30. može se videti da se sa povećanjem vremena ekstrakcije sadržaj antioksidanata blago povećava, ali i da se najveća vrednost dobija pri 120 minuta ekstrakcije, te je nadalje ekstrakcija vršena u trajanju od 120 minuta.

Na Slici 4.31. prikazan je uticaj temperature na antioksidativnu aktivnost ekstrakta hmelja.



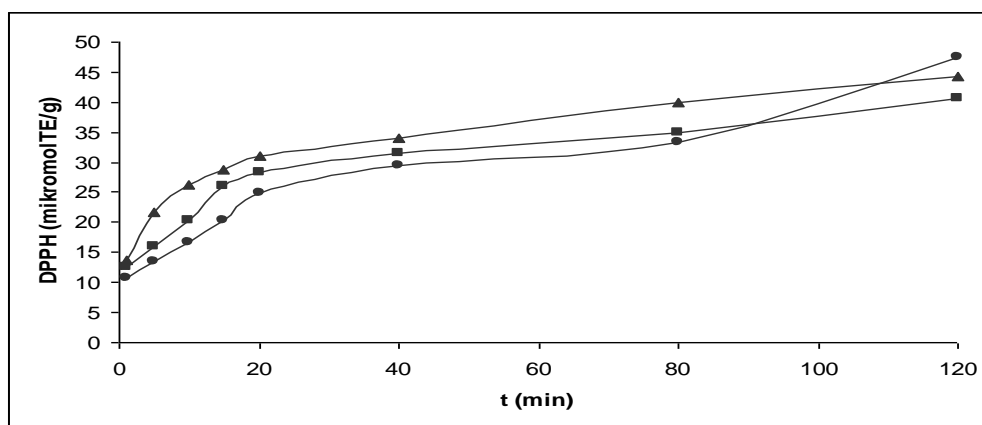
Slika 4.31. Uticaj temperature ekstrakcije na ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvmodul: V/m=30). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da temperatura ekstrakcije značajno utiče na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala (Durling i sar., 2007). Antioksidativna aktivnost ekstrakata u vodeno-etanolnim ekstraktima značajno se razlikovala zavisno od primenjene temperature ekstrakcije, pri čemu je veći ekstrakcioni kapacitet izdvajanja antioksidanasa iz hmelja postignut pri višoj temperaturi (45°C). Rezultati naših istraživanja su u skladu sa većinom istraživanja drugih autora. Kosar i sar. (2005) su u biljkama iz porodice *Lamiaceae* (bosiljak, ruzmarin, žalfija i dr.) najveći maseni udeo ukupnih fenola postigli primenom klasične ekstrakcije pri 60°C sa 50% vodenim rastvorom metanola. Pri višim temperaturama dolazi do ekstrakcije i drugih jedinjenja, degradacije fenolnih jedinjenja kao i do povećanog isparavanja i gubitka rastvarača. Alonso-Salces i sar. (2001) su takođe konstatovali da na temperaturama većim od 60°C dolazi do smanjenja ekstrakcionog kapaciteta što je posledica degradacije fenolnih jedinjenja koja je uzrokovana hidrolizom, unutrašnjim redoks reakcijama i polimerizacijom. Do sličnih rezultata su došli i Bucić-Kojić i

sar. (2011), koji su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakata voća 80% etanolom na temperaturama od 20 do 80°C.

4.2.1.2. Modelovanje kinetike ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja

U cilju modelovanja kinetike ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja pratili smo promene antioksidativne aktivnosti sa vremenom ekstrakcije na temperaturama 25, 35 i 45°C, a dobijene zavisnosti prikazane su na Slici 4.32. (vrednosti date u Tabeli 8.6. u Prilogu).

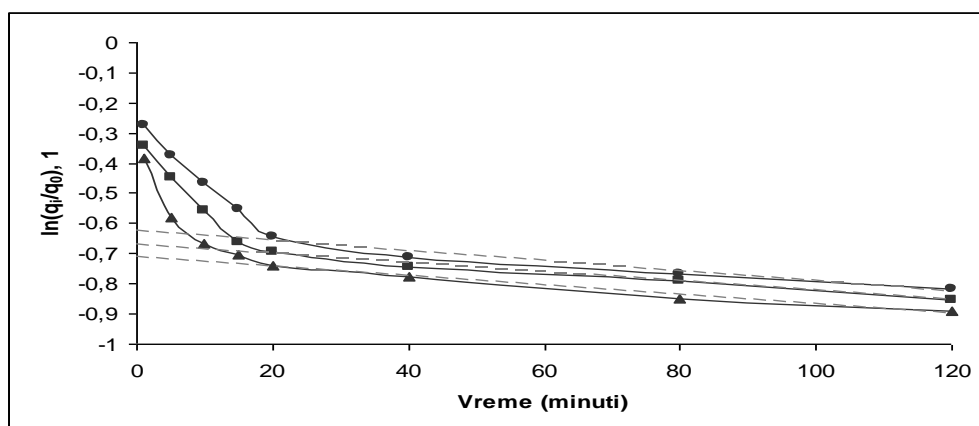


Slika 4.32. Promena antioksidativne aktivnosti sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Za modelovanje kinetike ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja 30% (v/v) etanolom, primenjena su dva kinetička modela: model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal i empirijski model Ponomarjeva. U Tabeli 4.2. dat je prikaz korišćenih kinetičkih modela ekstrakcije.

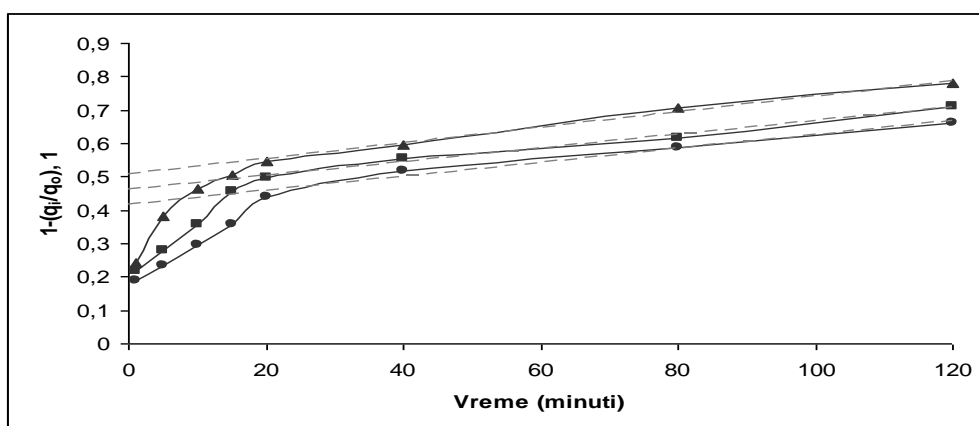
Početna vrednost antioksidativne aktivnosti (q_0), za slučaj maceracije 30% etanolom (procedura data u delu 3.5.2.), iznosi $56,79 \mu\text{molTE/g}$.

Na Slici 4.33. prikazana je zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena ekstrakcije na temperaturama 25, 35 i 45°C, dobijena po modelu zasnovanom na nestacionarnoj difuziji. Krive kinetike ekstrakcije su tipične krive za ekstrakciju iz biljnog materijala sa dva perioda ekstrakcije. Linearna zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena postoji u kasnijem periodu ekstrakcije (posle 20 minuta), ali ne u početnom periodu gde se uočava odstupanje eksperimentalnih tačaka od prave linije. Na osnovu modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji određene su vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) na tri temperature, koje su prikazane u Tabeli 4.16.



Slika 4.33. Zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji).

Na Slici 4.34. je prikazana zavisnost $1-(q_i/q_0)$ od vremena na osnovu empirijskog modela Ponomarjeva, pri optimalnim uslovima ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja. Vrednosti koeficijenta b i k na tri temperature date su u Tabeli 4.16.



Slika 4.34. Zavisnost $1-(q_i/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije antioksidanasa iz ječma (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (empirijski model Ponomarjeva).

Tabela 4.16. Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) za proces ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja.

	Temperatura, K	b	k, min^{-1}
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	298	0,783	$1,31 \cdot 10^{-3}$
	308	0,793	$1,38 \cdot 10^{-3}$
	318	0,799	$1,45 \cdot 10^{-3}$
Empirijski model Ponomarjeva	298	0,445	$1,75 \cdot 10^{-3}$
	308	0,466	$1,87 \cdot 10^{-3}$
	318	0,498	$2,15 \cdot 10^{-3}$

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.16. vidi se da su koeficijenti ispiranja dobijeni po modelu nestacionarne difuzije veći od koeficijenata dobijenih po modelu Ponomarjeva, dok koeficijenti spore ekstrakcije dobijeni po modelu Ponomarjeva imaju veće vrednosti.

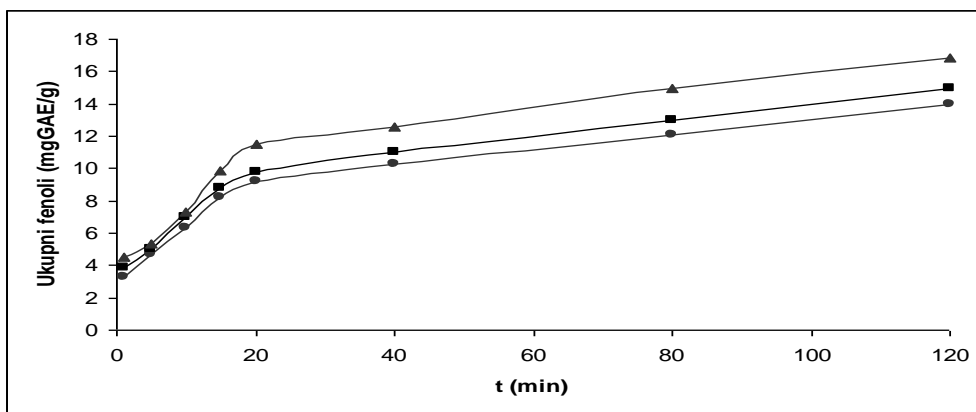
Analizom dobijenih rezultata se vidi da oba kinetička modela mogu biti korišćena za modelovanje procesa ekstrakcije antioksidanasa iz hmelja pomoću 30% vodenog rastvora etanola.

4.2.2. Ekstrakcija ukupnih fenola iz hmelja

Mnogi autori su pokazali da postoji velika korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ($R^2 > 0,95$). Naša ispitivanja su takođe dokazala postojanje visoke korelacije između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (deo 4.2.7). Na osnovu toga se može zaključiti da su fenolna jedinjenja (među kojima su flavonoli i fenolne kiseline) zaslužna za antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata i da osim njih ima veoma malo drugih jedinjenja odgovornih za opaženu aktivnost. To praktično znači da će odabrani optimalni uslovi za ekstrakciju antioksidanasa odgovarati i za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz hmelja. Iz tog razloga smo, polazeći od već odabranih optimalnih uslova ekstrakcije (deo 4.2.1.1.), pristupili modelovanju kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja, flavonola i fenolnih kiselina iz hmelja.

4.2.2.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja

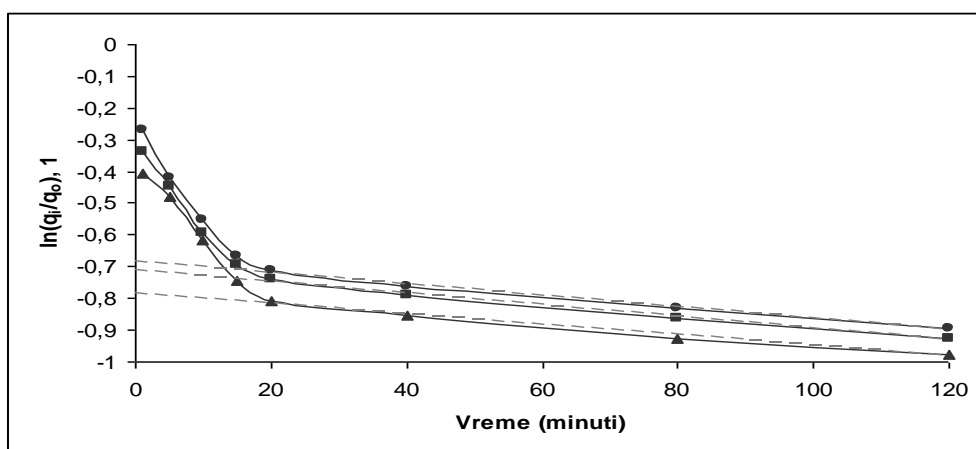
Na osnovu podataka (Tabela 8.7., Prilog), prikazana je na Slici 4.35. zavisnost sadržaja ukupnih fenola (mgGAE/g) u ekstraktima hmelja sa promenom vremena ekstrakcije na različitim temperaturama.



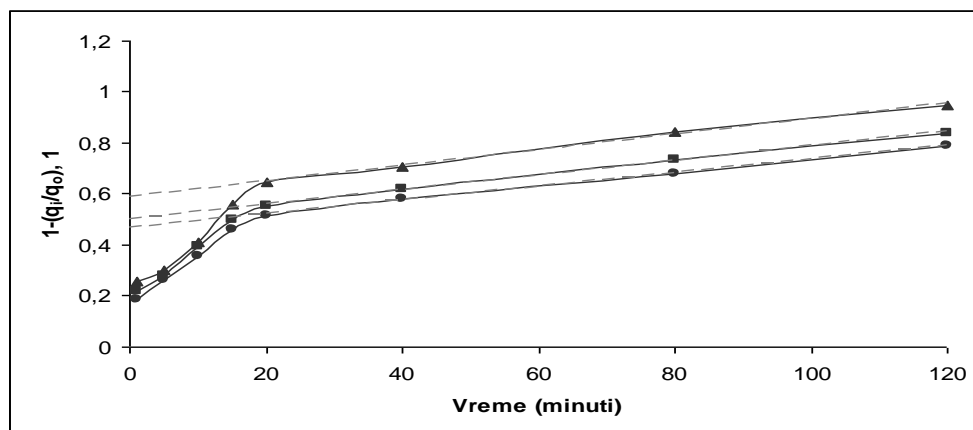
Slika 4.35. Promena sadržaja ukupnih fenola sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Početna vrednost sadržaja ukupnih fenola (q_0), za slučaj maceracije 30% etanolom (procedura data u delu 3.5.2.), iznosi 17,749 mgGAE/g.

Na Slici 4.36. prikazana je zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji), a na Slici 4.36. zavisnost $1-(q_i/q_0)$ (empirijski model Ponomarjeva), od vremena ekstrakcije pri različitim temperaturama.



Slika 4.36. Zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji).



Slika 4.37. Zavisnost $1-(q/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (empirijski model Ponomarjeva).

Parametri kinetičkih jednačina, koeficijent ispiranja (b) i koeficijent spore ekstrakcije (k) za proces ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja zasnovanih na modelu nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i empirijskom modelu Ponomarjeva prikazani su u Tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) na različitim temperaturama za proces ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja.

	Temperatura, K	b	k, min^{-1}
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	298	0,791	$1,62 \cdot 10^{-3}$
	308	0,809	$1,76 \cdot 10^{-3}$
	318	0,830	$1,88 \cdot 10^{-3}$
Empirijski model Ponomarjeva	298	0,475	$2,71 \cdot 10^{-3}$
	308	0,496	$2,98 \cdot 10^{-3}$
	318	0,598	$3,02 \cdot 10^{-3}$

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.17. vidi da su koeficijenti ispiranja (b) dobijeni po modelu nestacionarne difuzije veći od koeficijenata dobijenih po empirijskom modelu Ponomarjeva, dok koeficijenti spore ekstrakcije (k) dobijeni po empirijskom modelu Ponomarjeva imaju veće vrednosti, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u Tabeli 4.16. S obzirom da se vrednosti koeficijenata b i k , dobijenih za proces ekstrakcije ukupnih fenola (Tabela 4.17) i proces ekstrakcije antioksidanasa (Tabela 4.16.) malo razlikuju, to potvrđuje polaznu pretpostavku da antioksidativna aktivnost hmelja uglavnom potiče od fenolnih jedinjenja prisutnih u njemu.

4.2.3. Ekstrakcija flavonola iz hmelja

Tečna hromatografija visokih performansi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sa UV/Vis detektorom visoke rezolucije primenjena je za razdvajanje i kvantifikaciju flavonola u pripremljenim ekstraktima hmelja pri optimalnim uslovima ekstrakcije (30% etanol (v/v), solvomodul 30 (V/m)).

U uzoku hmelja, koji je korišćen za ispitivanje kinetike, identifikovani su i kvantifikovani sledeći flavonoli: kvercetin-3-galaktozid (1), kvercetin-3-rutinozid (2), kvercetin-3-glukozid (3), kemferol-3-rutinozid (4) i kvercetin (5), kao što se može videti sa hromatograma (Slika 4.72.).

Početna vrednost sadržaja ukupnih flavonola (q_0), za slučaj maceracije 30% etanolom (procedura data u delu 3.5.2.), iznosi 2,502 mg/g, dok je sadržaj pojedinačnih flavonola dat u Tabeli 4.18.

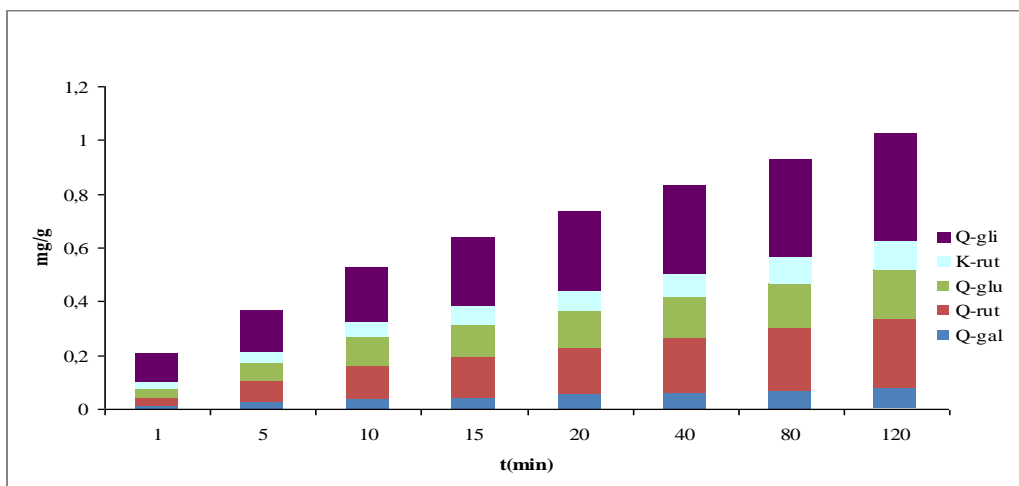
Tabela 4.18. Sadržaj flavonola u ekstraktu hmelja.

Flavonol	mg/g
kvercetin-3-galaktozid	0,487
kvercetin-3-rutinozid	0,654
kvercetin-3-glukozid	0,266
kemferol-3-rutinozid	0,534
kvercetin- glikozid	0,561
ukupni flavonoli	$q_0 = 2,502$

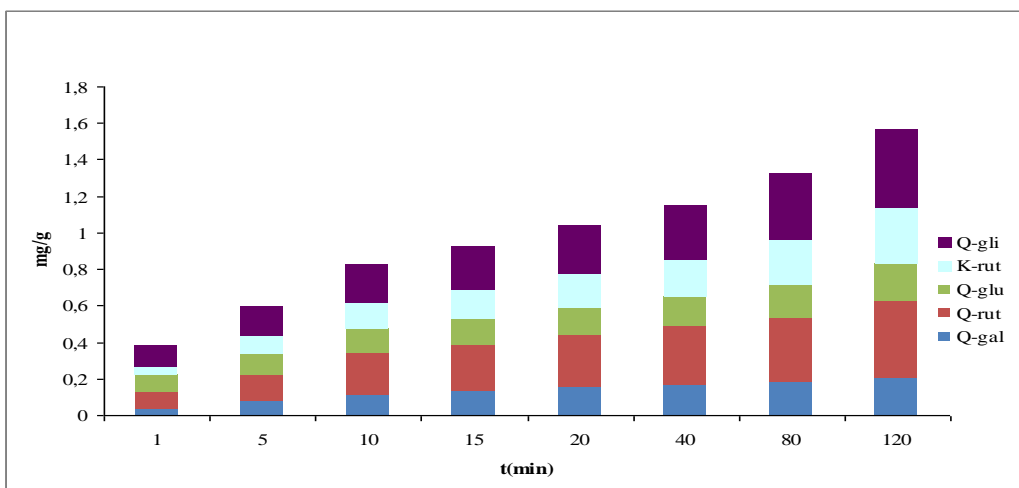
Iz grupe flavonola dominiraju derivati kvercetina i to sa najvećim sadržajem kvercetin-3-rutinozid. Uz derivate kvercetina u značajnoj količini je zastupljen i derivat kemferola i to kemferol-3-rutinozid. Navedeni flavonoli su i prema drugim autorima karakteristični za hmelj (*Magalhaes i sar., 2010; Alekseeva i sar., 2004*).

4.2.3.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja

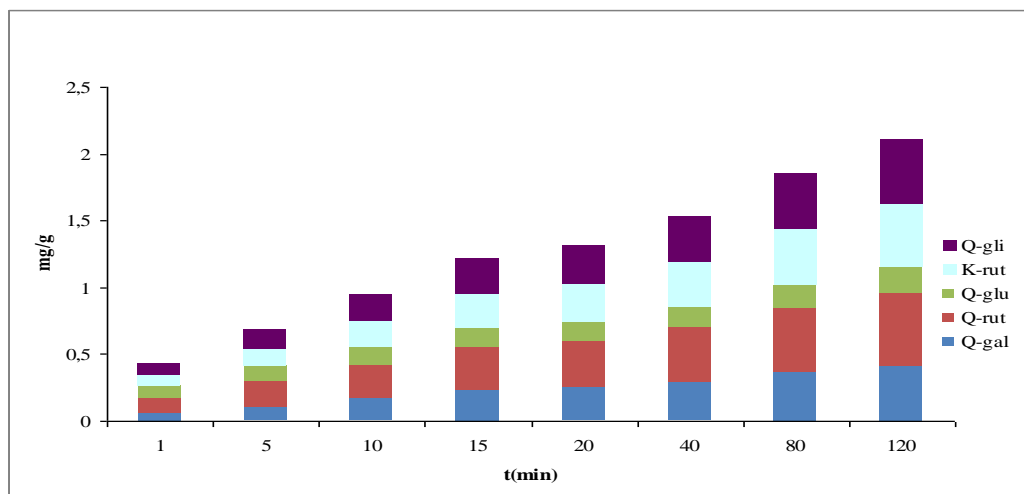
U ekstraktima hmelja dobijenih pri optimalnim uslovima ekstrakcije (30% etanol (v/v), solvomodul 30 (V/m)) nakon 1, 5, 10, 15, 20, 40, 80 i 120 minuta maceracije na temperaturama od 25, 35 i 45°C, određeni su sadržaji pojedinačnih flavonola. Na osnovu podataka (Tabela 8.8, 8.9. i 8.10., Prilog) prikazane su na Slikama 4.38. – 4.40. zavisnosti sadržaja pojedinačnih flavonola u ekstraktima hmelja sa promenom vremena ekstrakcije na različitim temperaturama.



Slika 4.38. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih flavonola: Q-gli (kvercetin-glikozid), K-rut (kemferol-3-rutinozid), Q-glu (kvercetin-3-glukozid), Q-rut (kvercetin-3-rutinozid) i Q-gal (kvercetin-3-galaktozid) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 25°C.



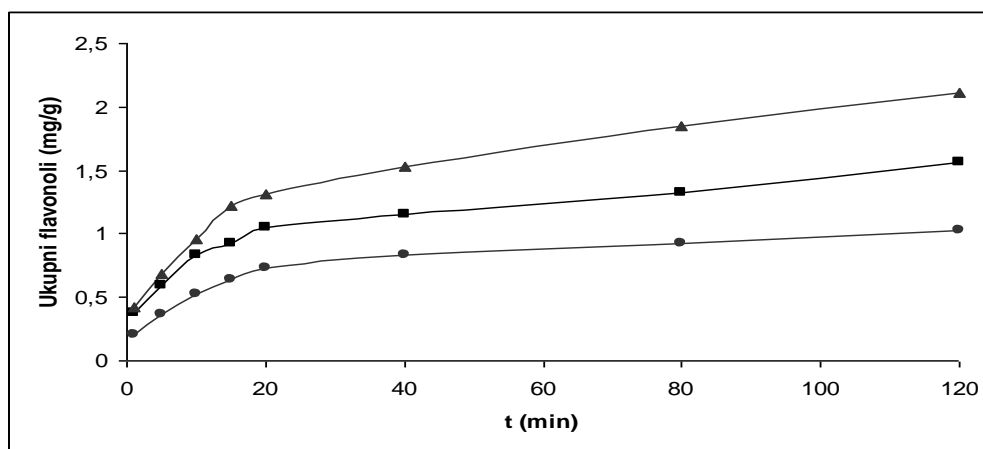
Slika 4.39. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih flavonola: Q-gli (kvercetin-glikozid), K-rut (kemferol-3-rutinozid), Q-glu (kvercetin-3-glukozid), Q-rut (kvercetin-3-rutinozid) i Q-gal (kvercetin-3-galaktozid) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 35°C.



Slika 4.40. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih flavonola: Q-gli (kvercetin-glikozid), K-rut (kemferol-3-rutinozid), Q-glu (kvercetin-3-glukozid), Q-rut (kvercetin-3-rutinozid) i Q-gal (kvercetin-3-galaktozid) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 45°C.

Na osnovu podataka predstavljenih na Slikama 4.38.-4.40., može se videti da se sadržaj pojedinačnih flavonola znatno povećava sa produžetkom vremena ekstrakcije od 1 do 20 minuta, a da se blag porast uočava pri produžetku vremena ekstrakcije od 20 do 120 minuta. Najveće promene su uočene kod kvercetin-3-galaktozida koji se povećao za 6,38 puta sa produžetkom vremena ekstrakcije od 1 do 20 minuta, odnosno za 1,55 puta sa produžetkom vremena ekstrakcije od 20 do 120 minuta. Najmanje promene su uočene kod kvercetina-glikozida.

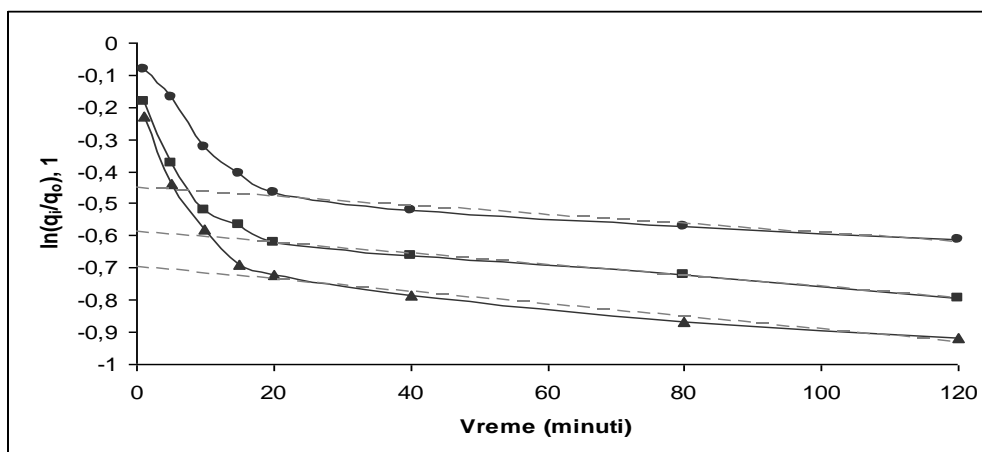
Promene sadržaja ukupnih flavonola sa vremenom na različitim temperaturama prikazane su na Slici 4.41. (vrednosti date u Tabeli 8.11., Prilog).



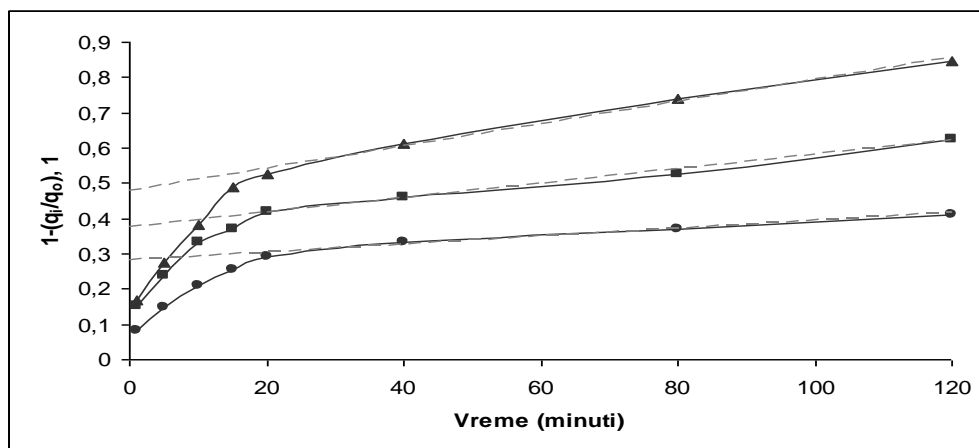
Slika 4.41. Promena sadržaja ukupnih flavonola sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: V/m=30) na temperaturama: (●) 25±0.1°C; (■) 35±0.1°C i (▲) 45±0.1°C.

Za modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja korišćena su dva kinetička modela: model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal i empirijski model Ponomarjeva (Tabela 4.2.).

Na Slici 4.42. prikazana je zavisnost $\ln(q_i/q_o)$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji), a na Slici 4.43. zavisnost $1-(q_i/q_o)$ (empirijski model Ponomarjeva), od vremena ekstrakcije na različitim temperaturama pri definisanim uslovima ekstrakcije.



Slika 4.42. Zavisnost $\ln(q_i/q_o)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji).



Slika 4.43. Zavisnost $1-(q_i/q_o)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0.1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0.1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^\circ\text{C}$ (empirijski model Ponomarjeva).

Parametri kinetičkih jednačina su izračunati i njihove vrednosti su prikazane u Tabeli 4.19.

Tabela 4.19. Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) na različitim temperaturama za proces ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja.

Model	Temperatura, K	b	k, min^{-1}
Nestacionarna difuzija	298	0,64	$1,46 \cdot 10^{-3}$
	308	0,74	$1,74 \cdot 10^{-3}$
	318	0,80	$2,05 \cdot 10^{-3}$
Ponomarjev	298	0,28	$1,11 \cdot 10^{-3}$
	308	0,36	$2,20 \cdot 10^{-3}$
	318	0,46	$3,33 \cdot 10^{-3}$

Koeficijenti ispiranja dobijeni po modelu nestacionarne difuzije su veći od koeficijenata dobijenih po empirijskom modelu Ponomarjeva, dok koeficijenti spore ekstrakcije dobijeni po empirijskom modelu Ponomarjeva imaju veće vrednosti (Tabela 4.19.)

4.2.4. Ekstrakcija fenolnih kiselina iz hmelja

U uzorku hmelja, korišćenom za ispitivanje kinetike ekstrakcije, identifikovane i kvantifikovane su jedna hidroksibenzoeva kiselina: 4-hidroksibenzoeva kiselina (1) i tri hidroksicimetne kiseline: hlorogenska kiselina (2), p-kumarna kiselina (3) i ferulna kiselina (4), kao što se može videti sa hromatograma (Slika 4.73.).

Početna vrednost sadržaja ukupnih fenolnih kiselina (q_0), za slučaj maceracije 30% etanolom (procedura data u delu 3.5.2.), iznosi 0,619 mg/g, dok je sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina dat u Tabeli 4.20.

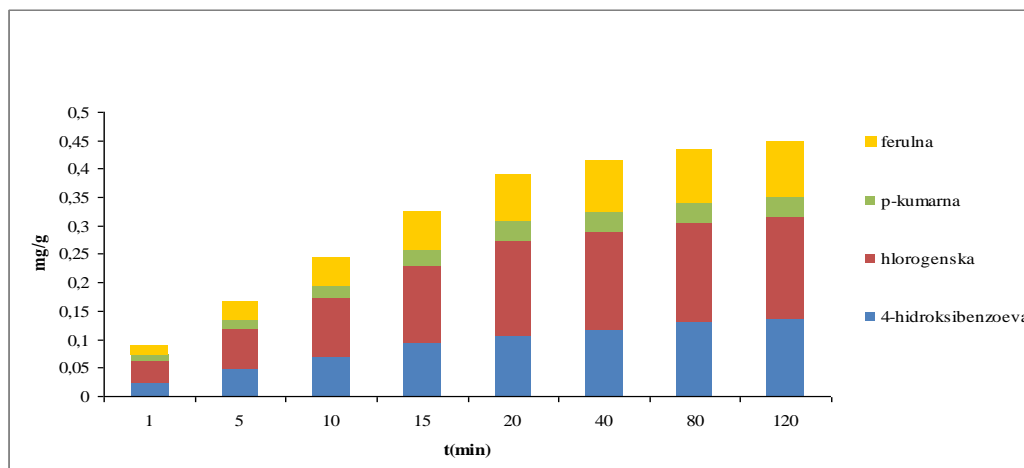
Tabela 4.20. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu hmelja.

Fenolna kiselina	mg/g
4-hidroksibenzoeva kiselina	0,171
hlorogenska kiselina	0,278
p-kumarna kiselina	0,052
ferulna kiselina	0,118
ukupne fenolne kiseline	$q_0 = 0,619$

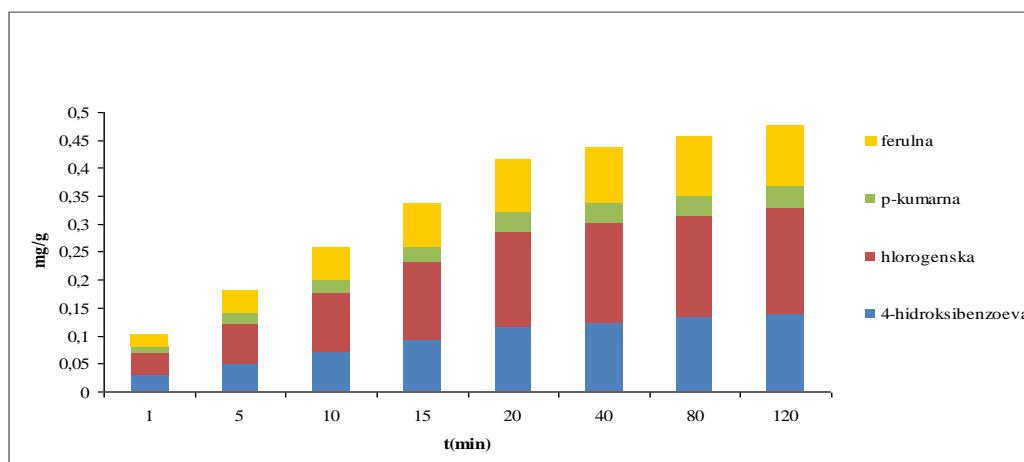
Hlorogenska kiselina je prisutna u najvećem masenom udelu, što je u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora (Kellner i sar., 2007).

4.2.4.1. Modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja

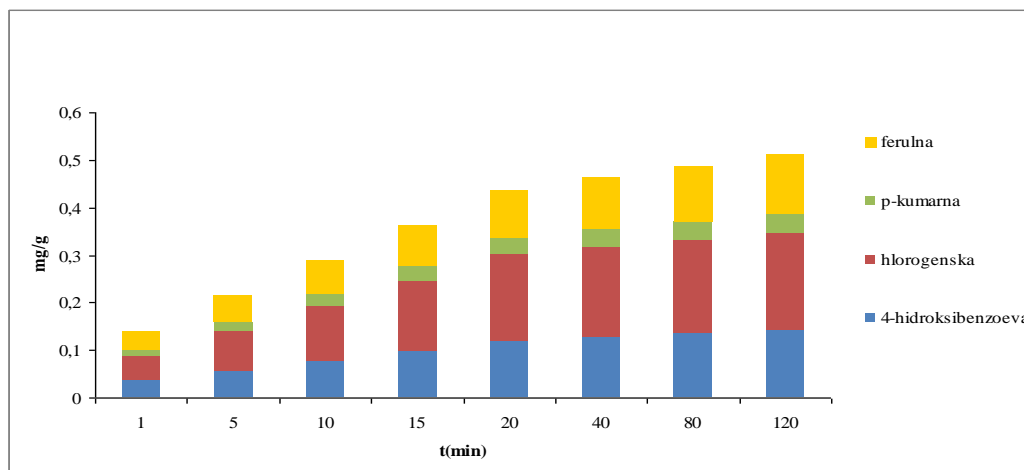
Promene sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina u zavisnosti od vremena ekstrakcije na temperaturama 25, 35 i 45°C prikazane su na Slikama 4.44. – 4.46., odnosno u Tabelama 8.12., 8.13. i 8.14. (Prilog).



Slika 4.44. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih fenolnih kiselina (ferulna, p-kumarna, hlorogenska i 4-hidroksibenzoeva) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 25°C.



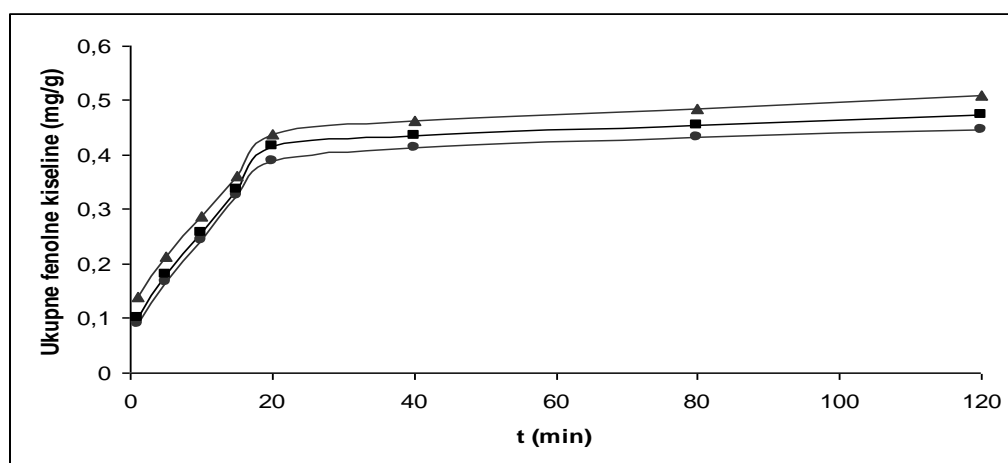
Slika 4.45. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih fenolnih kiselina (ferulna, p-kumarna, hlorogenska i 4-hidroksibenzoeva) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 35°C.



Slika 4.46. Promena sadržaja (mg/g) pojedinačnih fenolnih kiselina (ferulna, p-kumarna, hlorogenska i 4-hidroksibenzoeva) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 45°C.

Sa Slika 4.44.-4,46. , može se videti da se sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina znatno povećava sa produžetkom vremena ekstrakcije od 1 do 20 minuta, a da se blag porast uočava pri produžetku vremena ekstrakcije od 20 do 120 minuta. Kod 4-hidroksibenzoeve kiseline su uočene najveće promene na temperaturi od 25°C, i njen sadržaj se povećao za 4,57 puta sa produžetkom vremena ekstrakcije od 1 do 20 minuta, odnosno za 1,30 puta sa produžetkom vremena ekstrakcije od 20 do 120 minuta. Najmanje promene su uočene kod p-kumarne kiseline.

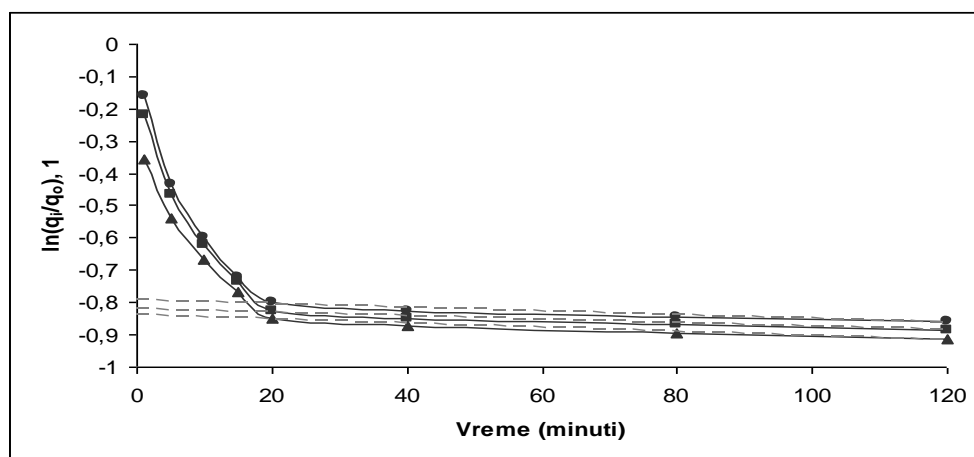
Promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina sa vremenom na različitim temperaturama prikazane su na Slici 4.47. (vrednosti date u Tabeli 8.15., Prilog).



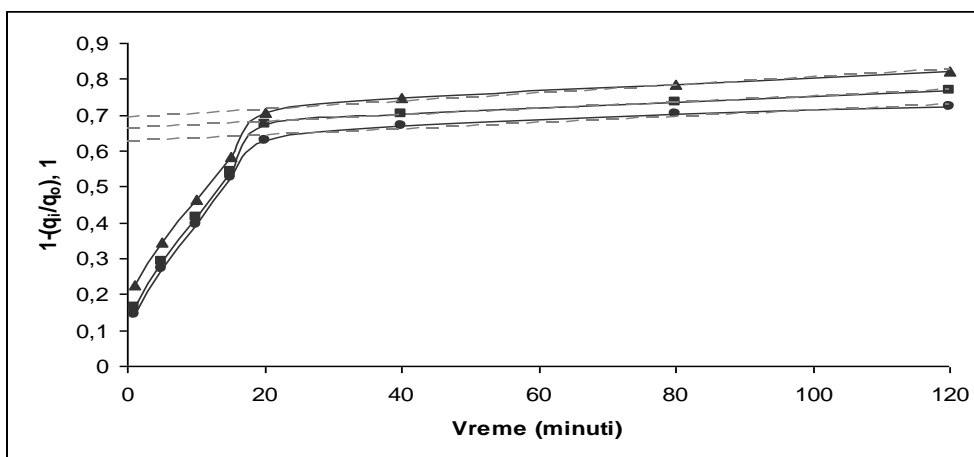
Slika 4.47. Promena sadržaja ukupnih fenolnih kiselina sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: V/m=30) na temperaturama: (●) 25±0.1°C; (■) 35±0.1°C i (▲) 45±0.1°C.

I u ovom slučaju, za modelovanje kinetike ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja 30% etanolom korišćena su dva kinetička modela: model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal i empirijski model Ponomarjeva (Tabela 4.2.).

Na Slici 4.48. prikazana je zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji), a na Slici 4.49. zavisnost $1-(q_i/q_0)$ (empirijski model Ponomarjeva), od vremena ekstrakcije pri različitim temperaturama pri definisanim uslovima ekstrakcije.



Slika 4.48. Zavisnost $\ln(q_i/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0,1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0,1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0,1^\circ\text{C}$ (model zasnovan na nestacionarnoj difuziji).



Slika 4.49. Zavisnost $1-(q_i/q_0)$ od vremena pri optimalnim uslovima ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvmodul: $V/m=30$) na temperaturama: (●) $25\pm 0,1^\circ\text{C}$; (■) $35\pm 0,1^\circ\text{C}$ i (▲) $45\pm 0,1^\circ\text{C}$ (empirijski model Ponomarjeva).

Parametri kinetičkih jednačina (koeficijent ispiranja (b) i koeficijent spore ekstrakcije (k) za proces ekstrakcije fenolnih kiselina iz hmelja) zasnovanih na modelu nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i empirijskom modelu Ponomarjeva prikazani su u Tabeli 21.

Tabela 4.21. Vrednosti koeficijenta ispiranja (b) i koeficijenta spore ekstrakcije (k) na različitim temperaturama za proces ekstrakcije ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja.

Model	Temperatura, K	b	k, min ⁻¹
Nestacionarna difuzija	298	0,84	0,54·10 ⁻³
	308	0,85	0,59·10 ⁻³
	318	0,86	0,66·10 ⁻³
Ponomarjev	298	0,64	0,68·10 ⁻³
	308	0,66	0,82·10 ⁻³
	318	0,69	0,97·10 ⁻³

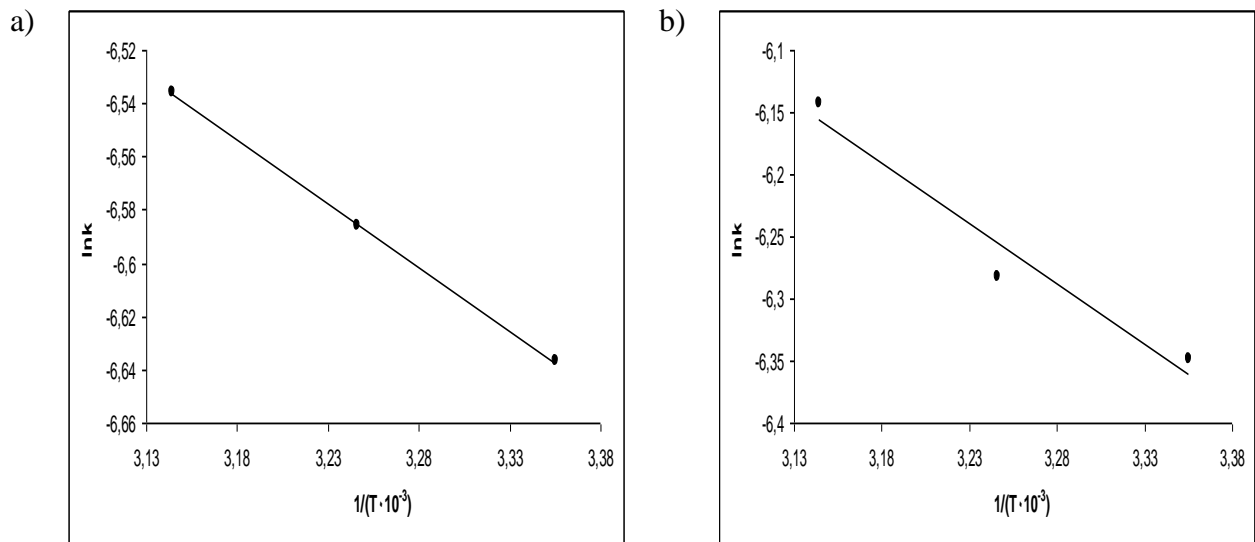
Kao i u slučaju ukupnih flavonola (Tabela 4.19.), koeficijenti ispiranja dobijeni po modelu nestacionarne difuzije su veći od koeficijenata dobijenih po empirijskom modelu Ponomarjeva, dok koeficijenti spore ekstrakcije dobijeni po empirijskom modelu Ponomarjeva imaju veće vrednosti (Tabela 4.21.)

4.2.5. Termodinamčki parametri ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz hmelja

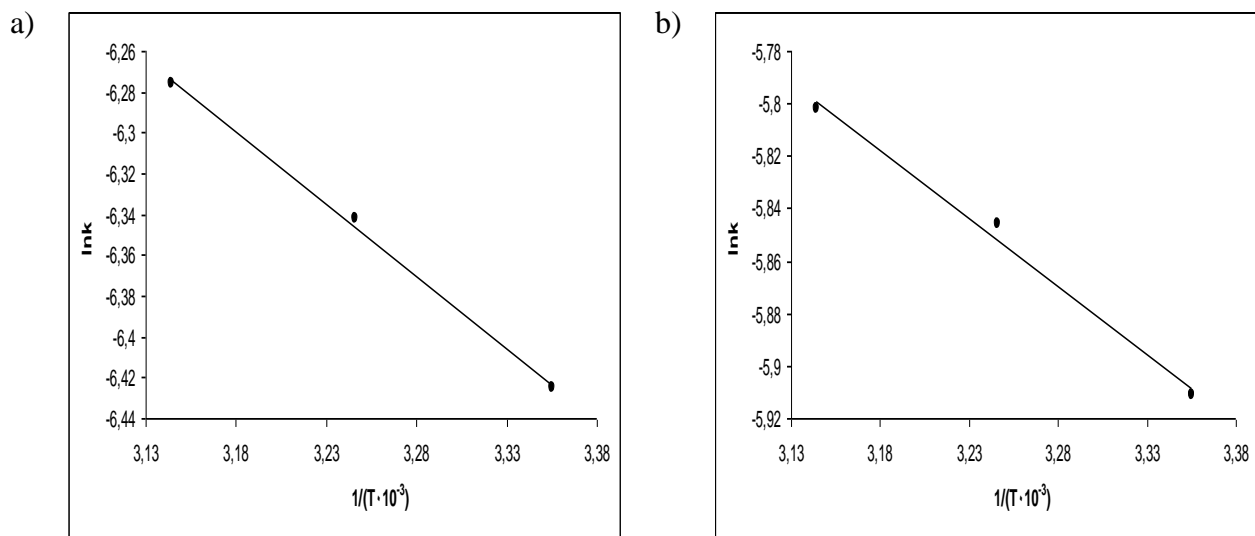
Pomoću vrednosti koeficijenata spore ekstrakcije (k) na različitim temperaturama odredili smo termodinamičke parametre aktivacionog procesa ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina, dok su nam vrednosti koeficijenata brzine ekstrakcije (k_e) poslužili za određivanje termodinamičkih parametara njihove ekstrakcije.

4.2.5.1. Termodinamčki parametri aktivacionog procesa ekstrakcije

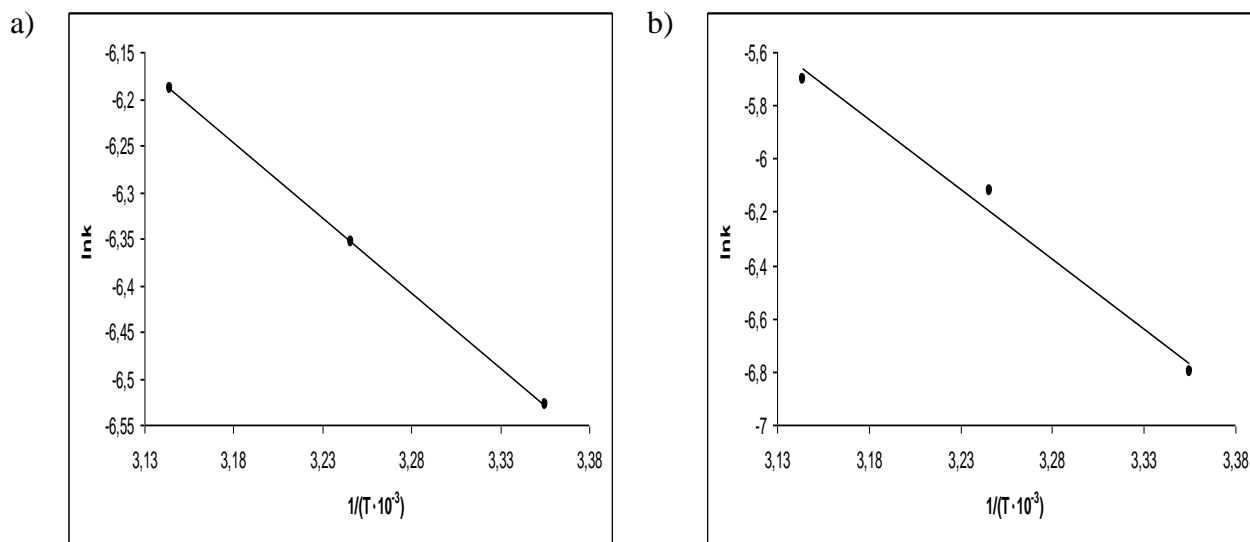
Ako predstavimo logaritam koeficijenata spore ekstrakcije (k) izračunatih pomoću modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji i empirijskog modela Ponomarjeva za proces ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina, u funkciji od recipročne vrednosti apsolutne temperature, dobijamo prave prikazane na Slikama 4.50.-4.53., iz čijih nagiba možemo izračunati energiju aktivacije.



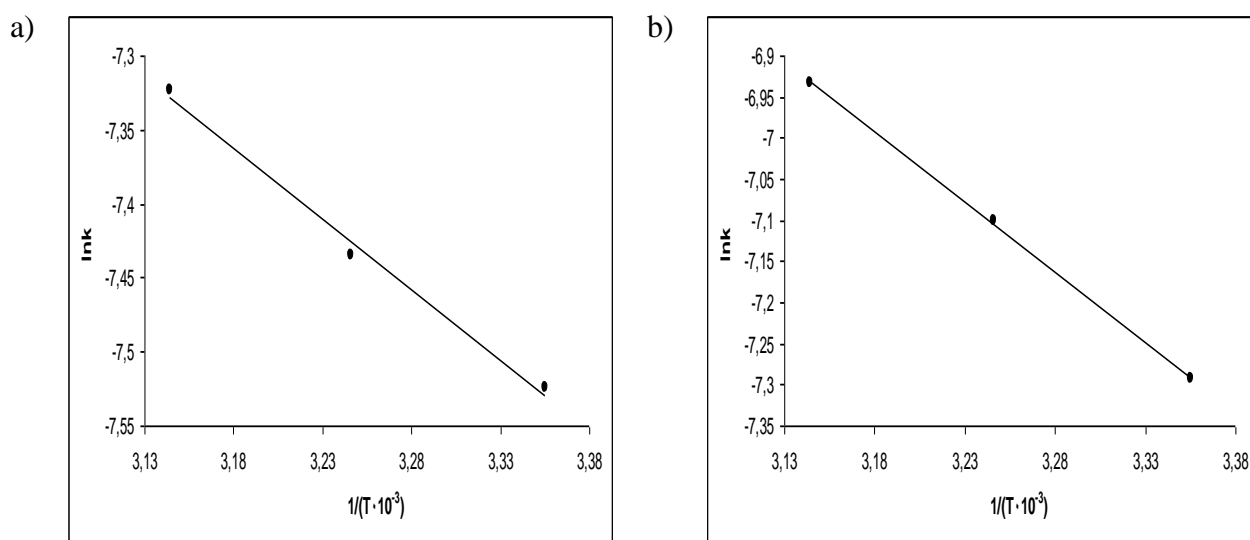
Slika 4.50. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za ekstrakciju antioksidanasa iz hmelja: a) model zasnovan na nestacionarnoj difuziji; b) empirijski model Ponomarjeva.



Slika 4.51. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih fenola iz hmelja: a) model zasnovan na nestacionarnoj difuziji; b) empirijski model Ponomarjeva.



Slika 4.52. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih flavonola iz hmelja: a) model zasnovan na nestacionarnoj difuziji; b) empirijski model Ponomarjeva.



Slika 4.53. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za ekstrakciju ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja: a) model zasnovan na nestacionarnoj difuziji; b) empirijski model Ponomarjeva.

Ostale termodinamičke parametre, entalpiju aktivacije (ΔH^*), entropiju aktivacije (ΔS^*) i slobodnu energiju aktivacije (ΔG^*) izračunali smo primenom jednačina (18) i (19). Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara aktivacionog procesa ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina prikazane su u Tabeli 4.22.

Tabela 4.22. Termodinamički parametri aktivacionog procesa ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina iz hmelja.

	Model	Ea, kJ/mol	ΔH^* , kJ/mol	ΔS^* , J/Kmol	ΔG^* , kJ/mol
Antioksidansi	Nestacionarna difuzija	4,32	1,85	-365,68	110,82
	Ponomarjev	7,15	4,67	-350,65	109,71
Ukupni fenoli	Nestacionarna difuzija	5,65	3,18	-357,15	109,61
	Ponomarjev	4,65	2,18	-350,66	106,67
Flavonoli	Nestacionarna difuzija	13,39	10,92	-406,64	132,03
	Ponomarjev	44,89	42,42	-232,83	111,79
Fenolne kiseline	Nestacionarna difuzija	7,92	5,45	-370,55	115,87
	Ponomarjev	13,30	10,82	-348,11	114,56

Slični rezultati su dobijeni za proces ekstrakcije polifenola drugim rastvaračima. Za ekstrakciju polifenola iz grožđa pomoću 50% vodenog rastvora etanola, vrednost energije aktivacije bila je 1,10 – 7,70 kJ/mol (Bucić-Kojić i sar., 2007), dok je za ekstrakciju sa 60% metanolom, zakišelenog sa HCl, vrednost Ea bila 23 kJmol⁻¹ (Sant'Anna i sar., 2012).

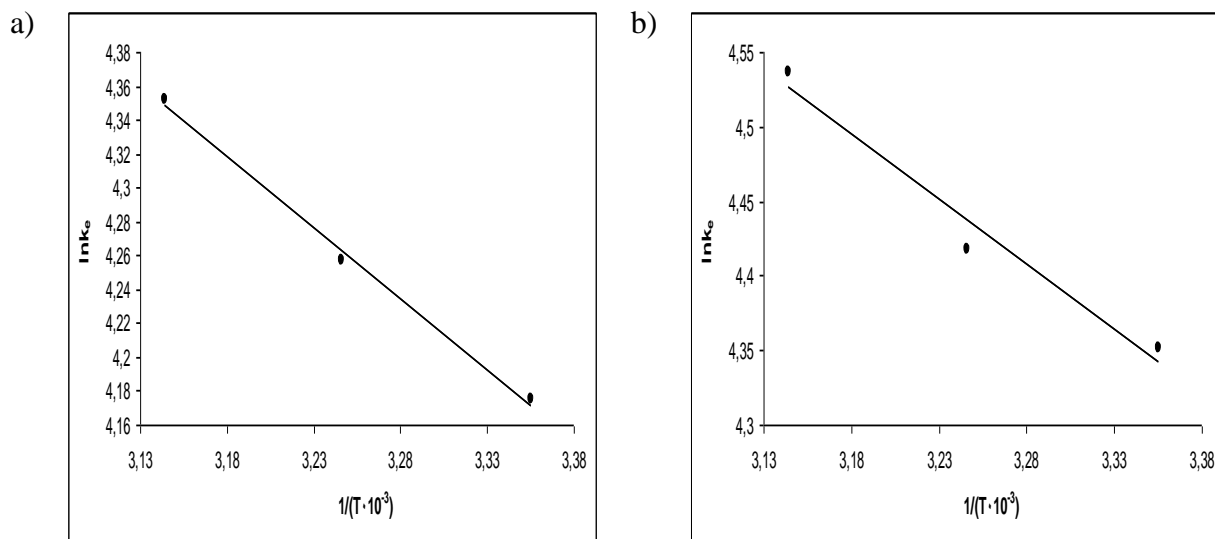
Energija aktivacije procesa ekstrakcije pojedinačnih flavonola iz zelenog čaja kreće se u opsegu od 30 do 50 kJ/mol (Price i Spitzer, 1994), što je u skladu sa našim rezultatima.

4.2.5.2. Termodinamički parametri procesa ekstrakcije

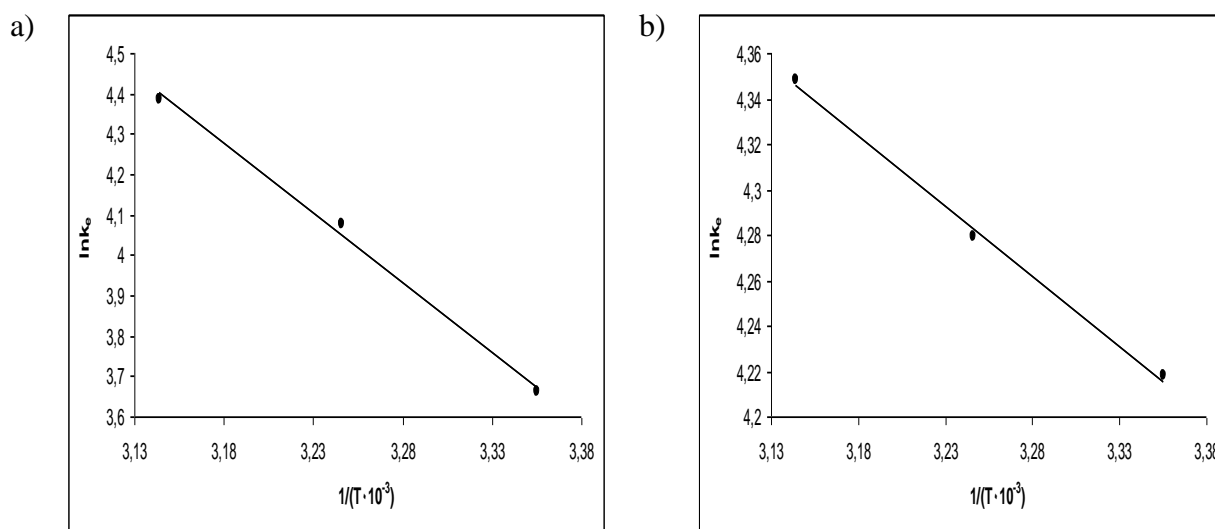
Sadržaji (c_{max}) antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina u zasićenom ekstraktu (procedura data u delu 3.5.3.) iznose: 57,610 μ molTE/g, 18,002 mgGAE/g, 2,628 mg/g i 0,658 mg/g.

Vrednosti za koeficijente brzine ekstrakcije (k_e) za proces ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina iz hmelja, pomoću 30% rastvora etanola, izračunate su korišćenjem jednačine (20), i date su u Tabeli 4.23.

Ako predstavimo logaritam koeficijenta brzine ekstrakcije (k_e) za proces ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina u funkciji recipročne vrednosti apsolutne temperature, dobijamo prave prikazane na Slikama 4.54. i 4.55. iz čijih nagiba možemo izračunati entalpiju ekstrakcije.



Slika 4.54. Zavisnost $\ln k_e$ od $1/T$ za ekstrakciju: a) antioksidanasa i b) ukupnih fenola iz hmelja.



Slika 4.55. Zavisnost $\ln k_e$ od $1/T$ za ekstrakciju: a) flavonola i b) fenolnih kiselina iz hmelja.

Ostali termodinamički parametri: entropija ekstrakcije (ΔS^0) i slobodna energija ekstrakcije (ΔG^0), izračunati su na osnovu jednačina (21) i (22) i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 4.23.

Tabela 4.23. Termodinamički parametri procesa ekstrakcije antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina iz hmelja, pri različitim temperaturama.

	T, K	k_e , %	ΔG^0 , kJ/mol	ΔH^0 , kJ/mol	ΔS^0 , J/Kmol
Antioksidansi	298	65,05	-10,35	6,65	57,04
	308	70,63	-10,92		
	318	76,86	-11,49		
Ukupni fenoli	298	77,67	-10,78	7,32	60,74
	308	82,93	-11,39		
	318	93,46	-11,99		
Flavonoli	298	39,04	-9,07	28,26	125,26
	308	58,98	-10,32		
	318	80,40	-11,57		
Fenolne kiseline	298	67,93	-10,36	5,21	52,25
	308	72,19	-10,88		
	318	77,35	-11,40		

Negativna vrednost Gibsove slobodne energije pokazuje da je proces ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz hmelja spontan. Sa porastom temperature vrednost ΔG^0 postaje negativnija, a proces ekstrakcije efikasniji. Pozitivna vrednost za ΔH^0 pokazuje da je ekstrakcija endoterman i ireverzibilan proces. Rezultati su slični onima koje su dobili Topallar i Gecgel (*Topallar i Gecgel, 2000*) i Saxena i saradnici (*Saxena i sar., 2012*).

Ako se uporede sadržaji antioksidanasa, ukupnih fenola, flavonola i fenolnih kiselina nakon 120 minuta ekstrakcije na temperaturama od 25°C i 45°C ($\Delta t=20^\circ\text{C}$), možemo uočiti da su se sadržaji povećali u slučaju antioksidanasa za 1,18, za ukupne fenole 1,20, za flavonole 2,06, a za fenolne kiseline 1,14 puta. Najveći uticaj temperature se pokazao u slučaju ekstrakcije flavonola. Ovo se može objasniti i činjenicom da se standardna slobodna energija ekstrakcije smanjila za 2,5 kJ/mol ($\Delta G^0_{25}-\Delta G^0_{45}$) u slučaju ekstrakcije flavonola, dok u ostalim slučajevima smanjenja iznose 1,14; 1,21 i 1,04 kJ/mol.

4.2.6. Ekstrakcija metalnih jona iz hmelja

Za određivanje sadržaja minerala u ispitivanim ekstraktima hmelja kreirane su analitičke metode za svaki element (procedura opisana u delu 4.1.2.). U Tabeli 4.24. prikazane su odabrane talasne dužine za svaki element, korelacioni koeficijent (R^2), limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).

Tabela 4.24. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata u ekstraktima hmelja.

Element	λ (nm)	LOD ¹ ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ² ($\mu\text{g/g}$)	Korelacioni koeficijent
Al	308.215	0.0045	0.0150	0.9841
Ba	455.403	0.0001	0.0002	0.9999
Ca	393.366	0.0001	0.0004	0.9901
Cr	283.563	0.0008	0.0026	0.9997
Cu	324.754	0.0006	0.0020	1
Fe	259.940	0.0006	0.0020	0.9957
K	766.490	0.0017	0.0058	0.9979
Mg	279.553	0.0001	0.0006	0.9985
Mn	257.610	0.0001	0.0003	0.9999
Na	588.995	0.0008	0.0027	1
Pb	220.353	0.0029	0.0097	0.9999
Si	251.611	0.0018	0.0059	0.9993
Sr	407.771	0.0001	0.0007	0.9995
V	309.311	0.0008	0.0027	1
Zn	213.856	0.0001	0.0004	0.9998

¹LOD – granica detekcije, ²LOQ – granica kvantifikacije.

Ekstrakcija minerala iz hmelja vršena je vodenim rastvorom etanola postupkom maceracije. U Tabeli 4.25. je dat pregled uslova ekstrakcije.

Tabela 4.25. Ispitivani parametri i njihovi intervali vrednosti za ekstrakciju metalnih jona iz hmelja.

Parametar	Interval
Koncentracija etanola, %	30, 50, 70, 90
Koncentracija HCl, %	0, 0.1, 1, 5
Solvo modul, V/m	15, 20, 25, 30
Vreme ekstrakcije, min	5, 10, 15, 20, 40, 80, 120

4.2.6.1. Određivanje optimalnih uslova za ekstrakciju metalnih jona iz hmelja

U cilju određivanja optimalnih uslova za ekstrakciju minerala iz hmelja ispitan je uticaj koncentracije etanola i hlorovodonične kiseline, solvomodula i vremena ekstrakcije.

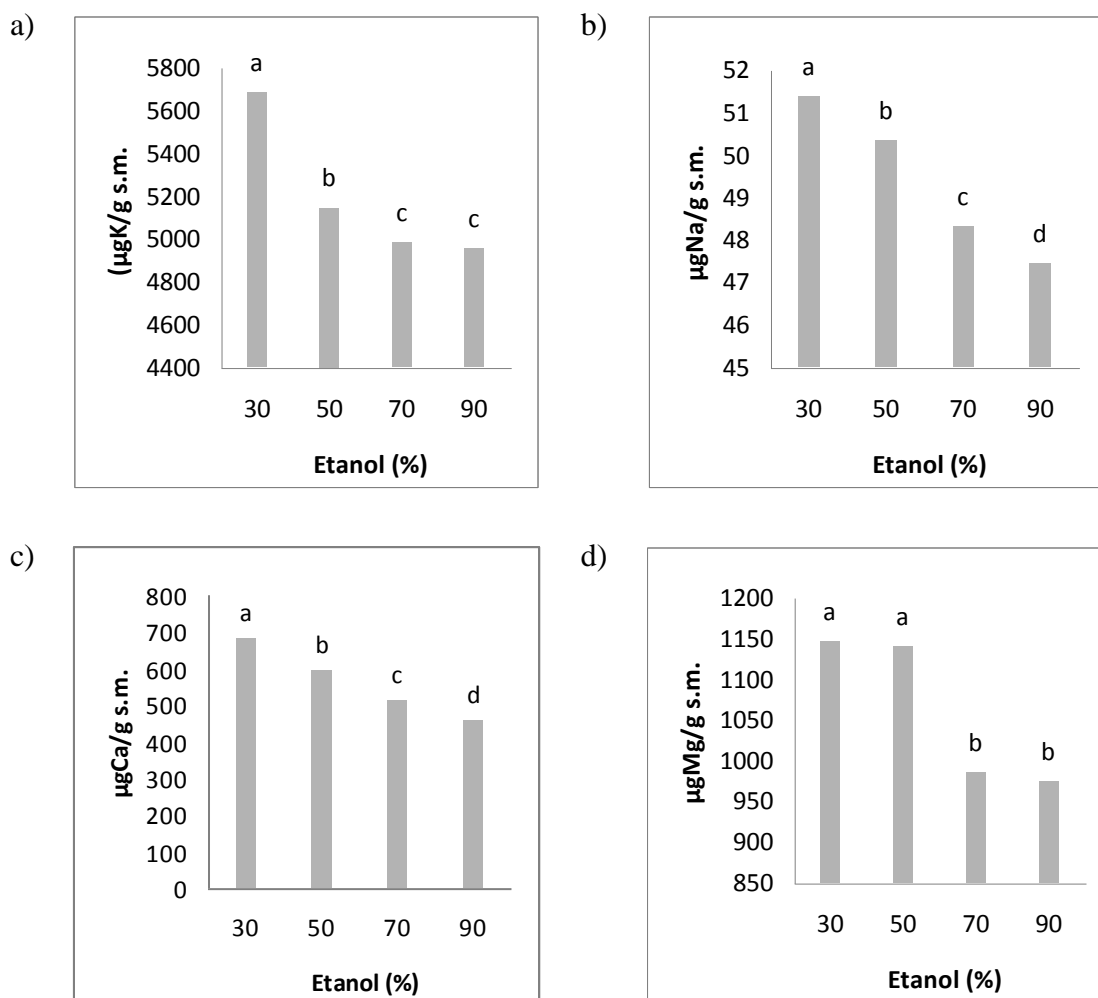
I u ovom slučaju svi određivani minerali podeljeni su u četiri grupe (Dančić, 2012):

- esencijalni makrominerali (kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum)
- esencijalni u tragovima (gvožđe, bakar, mangan, cink i hrom)
- verovatno esencijalni u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalni i toksični (olovo, aluminijum, stroncijum i barijum)

i nadalje je praćena promena sadržaja minerala tokom ekstrakcije u okviru svake grupe pojedinačno.

Uticao koncentracije etanola

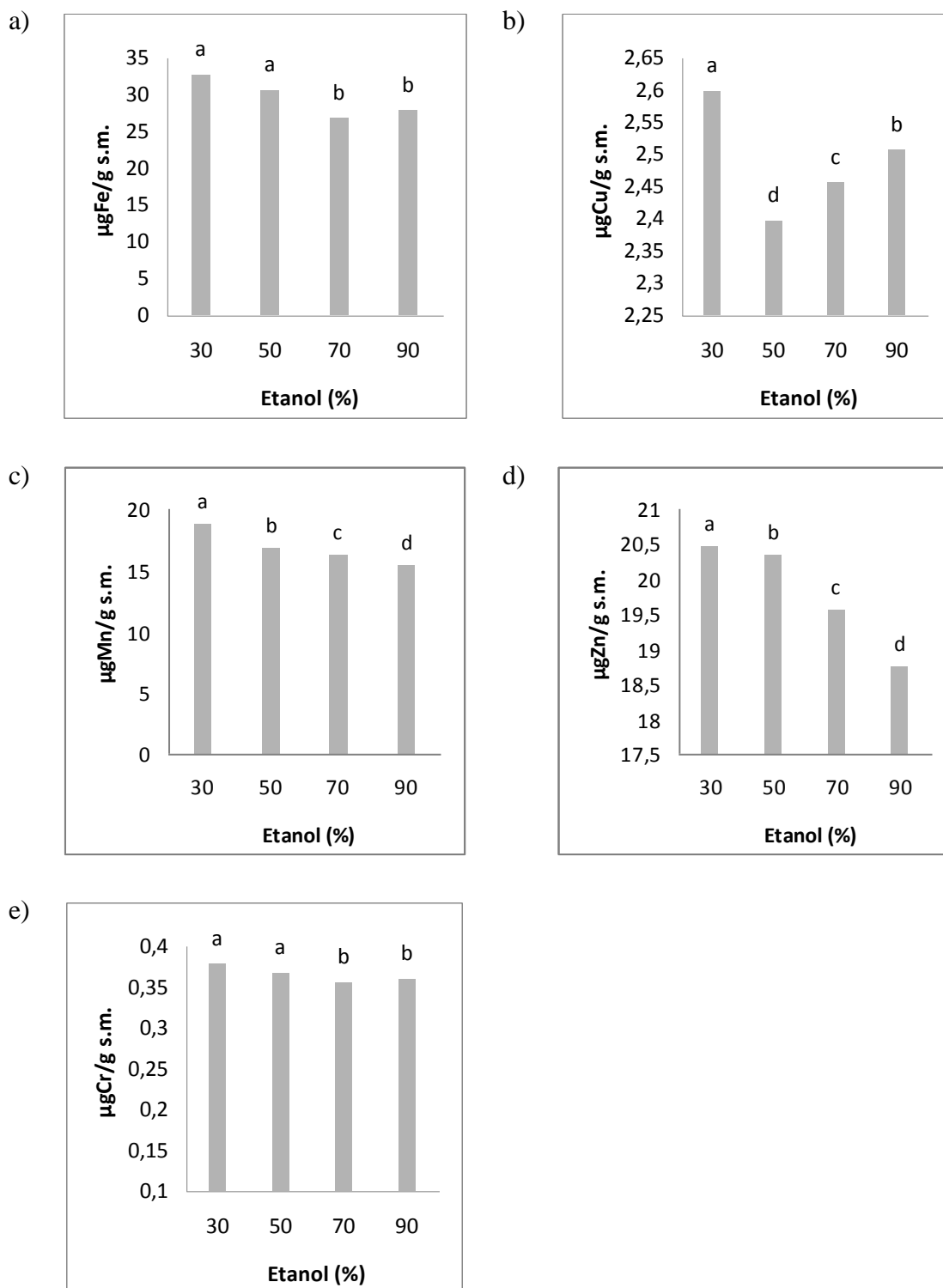
Pracene su promene sadržaja esencijalnih makroelemenata u etanolnim ekstraktima od koncentracije etanola i dobijene zavisnosti prikazane na Slici 4.56., dok su sve vrednosti date u Tabeli 8.16. (Prilog).



Slika 4.56. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: V/m=20; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Na Slici 4.56. vidi se da koncentracija svih elemenata opada sa porastom koncentracije etanola u rastvaraču za ekstrakciju, sem u slučaju Mg gde se skoro iste vrednosti dobijaju i u 30% i u 50% etanolu. Za dalji rad je odabrana koncentracija etanola od 30% (v/v) i u daljem ispitivanju uslova ekstrakcije esencijalnih makrominerala održavana konstantnom.

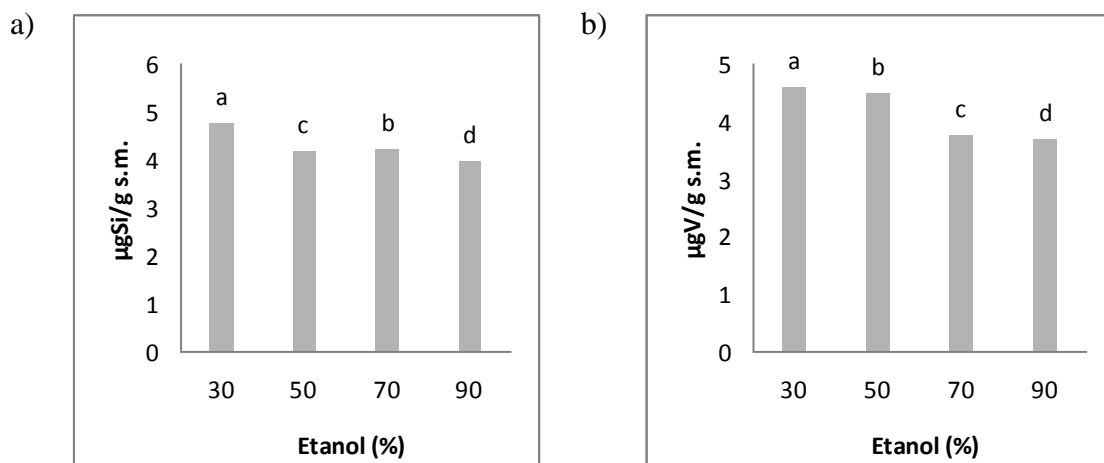
Zavisnost sadržaja esencijalnih minerala u tragovima u 30, 50, 70 i 90% etanolnim ekstraktima prikazana je na Slici 4.57.



Slika 4.57. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn i e)Cr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Sa slike se vidi da je najveći sadržaj esencijalnih minerala u tragovima određen u 30% etanolu, pa je 30% etanol odabran kao optimalna koncentracija za ekstrakciju Fe, Cu, Mn, Zn i Cr.

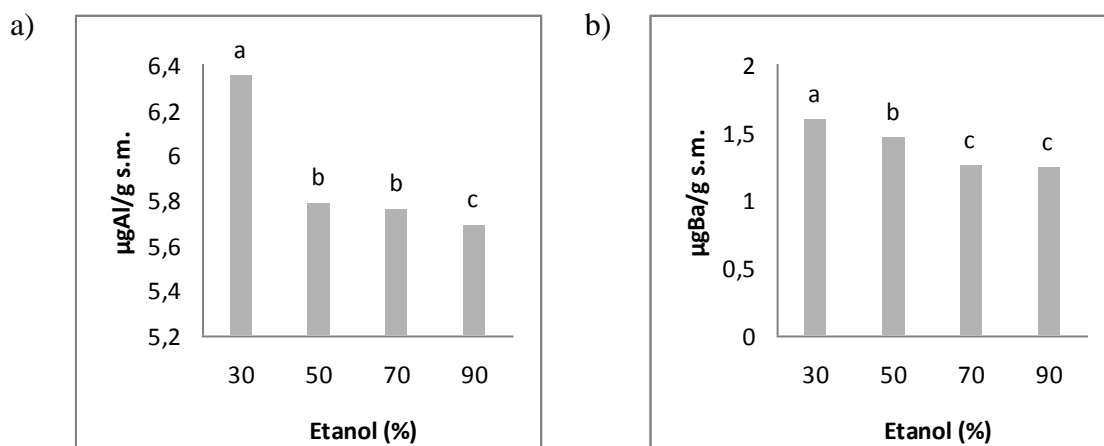
Na Slici 4.58. prikazana je zavisnost sadržaja verovatno esencijalnih minerala u ekstraktima od koncentracije etanola.

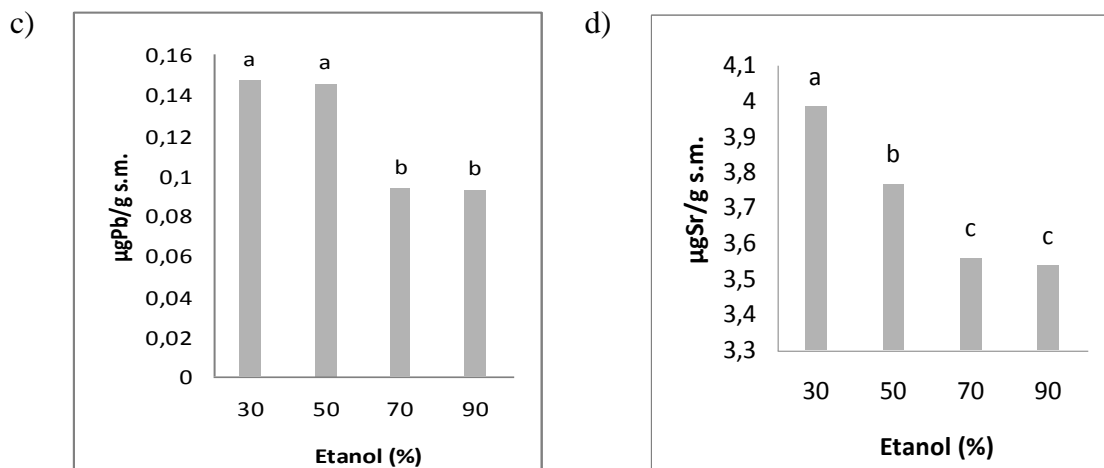


Slika 4.58. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si i b) V u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Za oba minerala (Si i V) najpogodniji ekstragens je 30% etanol.

Ispitan je i uticaj koncentracije etanola na ekstrakciju neesencijalnih i toksičnih minerala, a rezultati ispitivanja prikazani su na Slici 4.59.





Slika 4.59. Uticaj koncentracije etanola na sadržaj neesencijalnih minerala: a)Al; b)Ba; c)Pb i d)Sr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; solvomodul: V/m=20; t=25°C). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

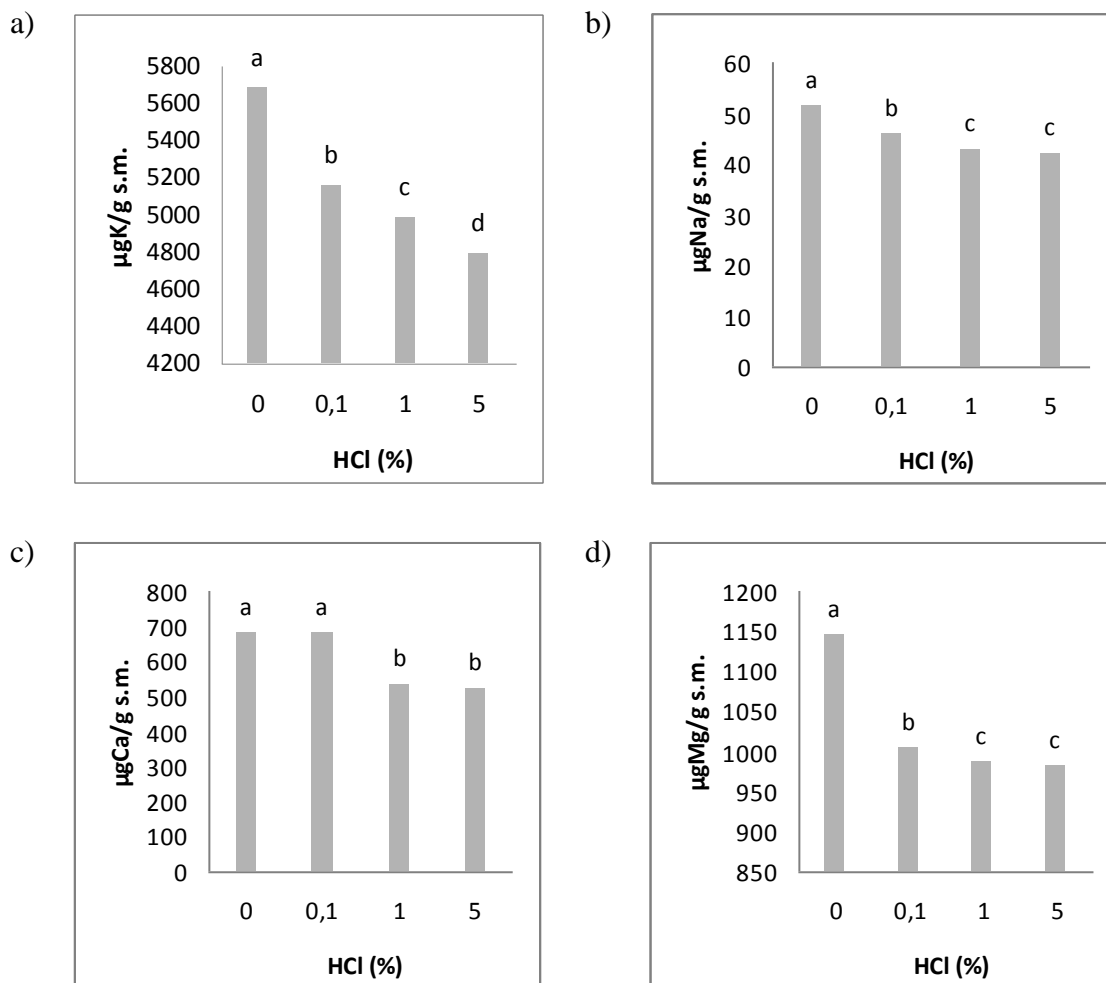
Sa slike se vidi da je optimalna koncentracija etanola 30% (v/v) za sve ispitivane neesencijalne i toksične metale.

Uticaj koncentracije kiseline

U daljem radu ispitivan je uticaj koncentracije hlorovodonične kiseline u 30% etanolu na sadržaj sledećih minerala:

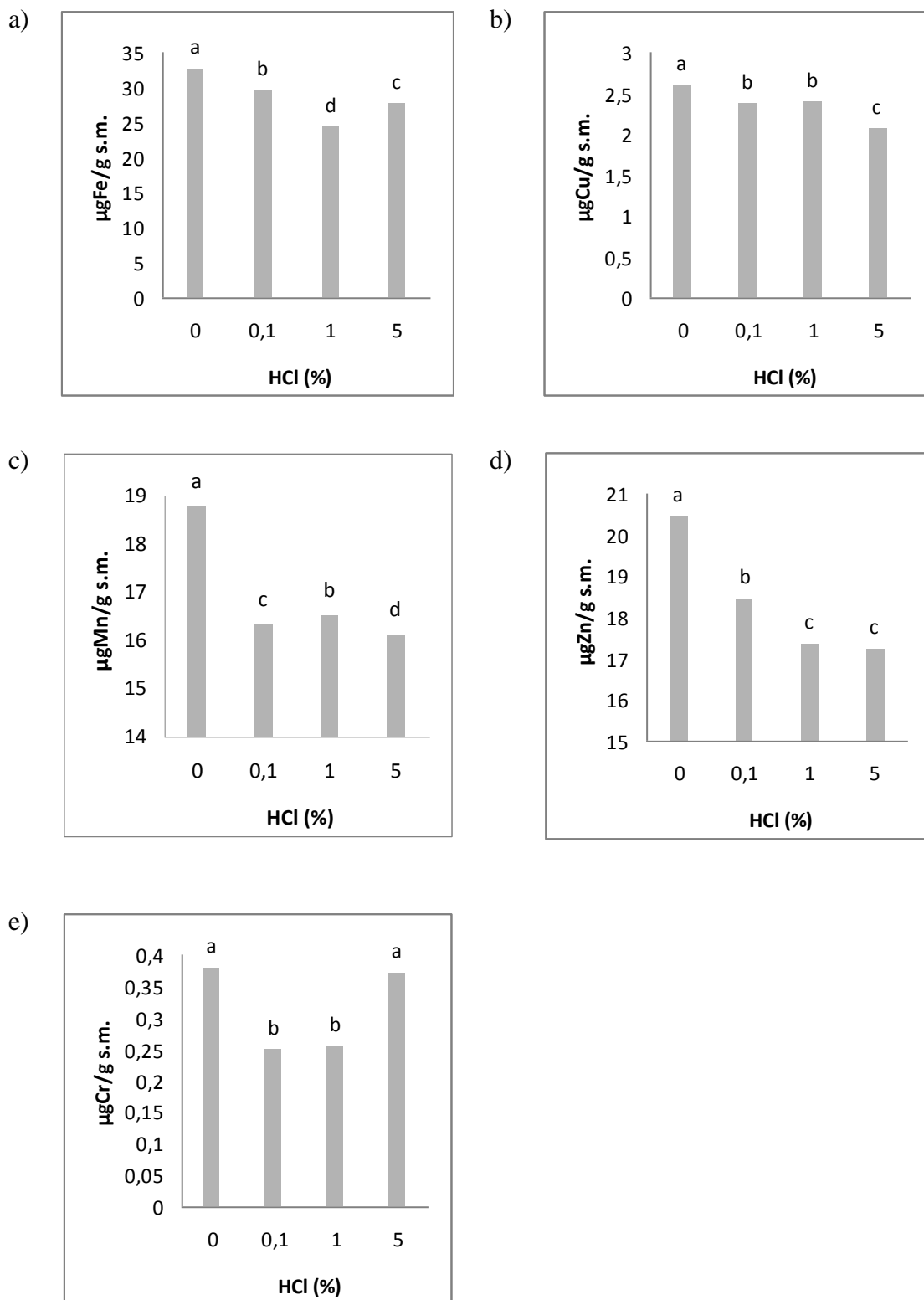
- esencijalni makrominerali (kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum)
- esencijalni u tragovima (gvožđe, bakar, mangan, cink i hrom)
- verovatno esencijalni u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalni i toksični (olovo, aluminijum, stroncijum i barijum).

Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih makrominerala u ekstraktima su dati na Slici 4.60., dok su vrednosti date u Tabeli 8.17. (Prilog).



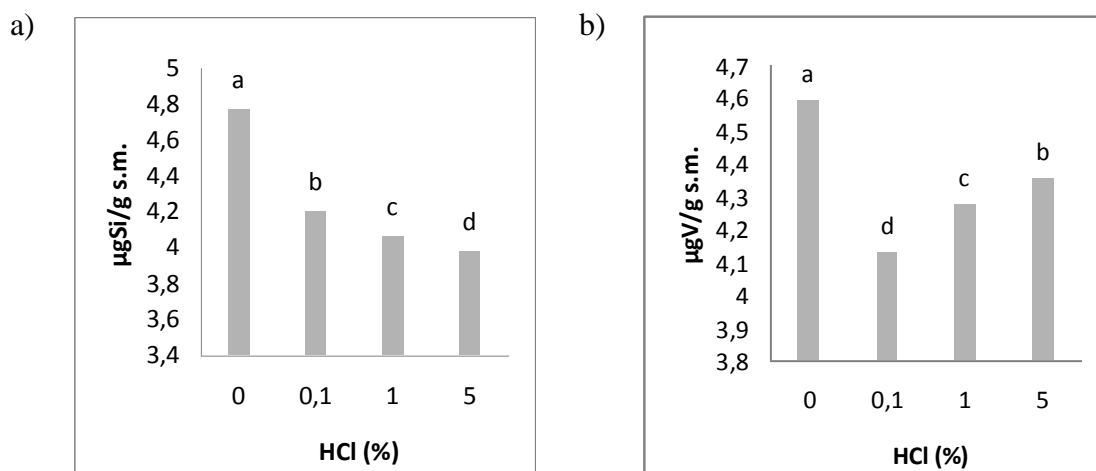
Slika 4.60. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Sa Slike 4.60. se vidi da je za ekstrakciju esencijalnih makrominerala (K, Na, Ca i Mg) najpogodniji ekstragens 30% etanol sa 0% HCl.



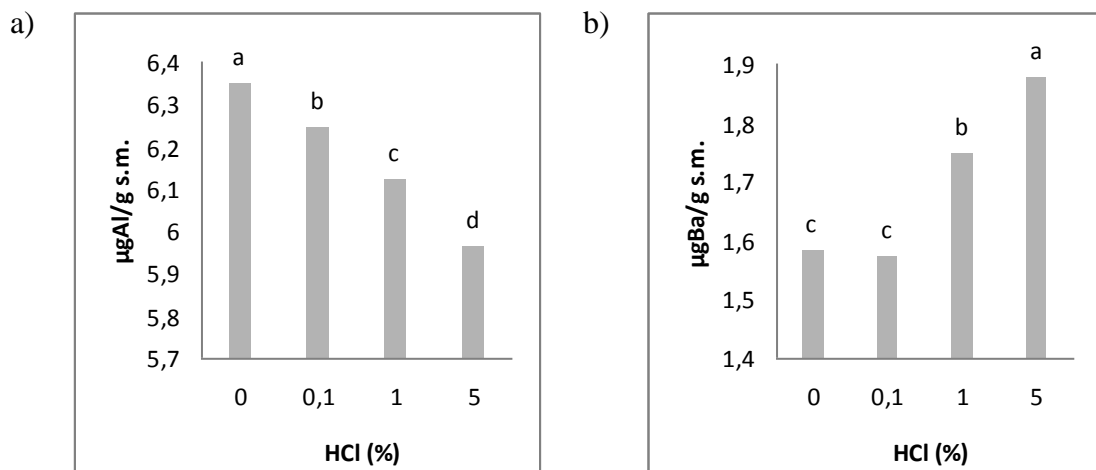
Slika 4.61. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn i e)Cr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

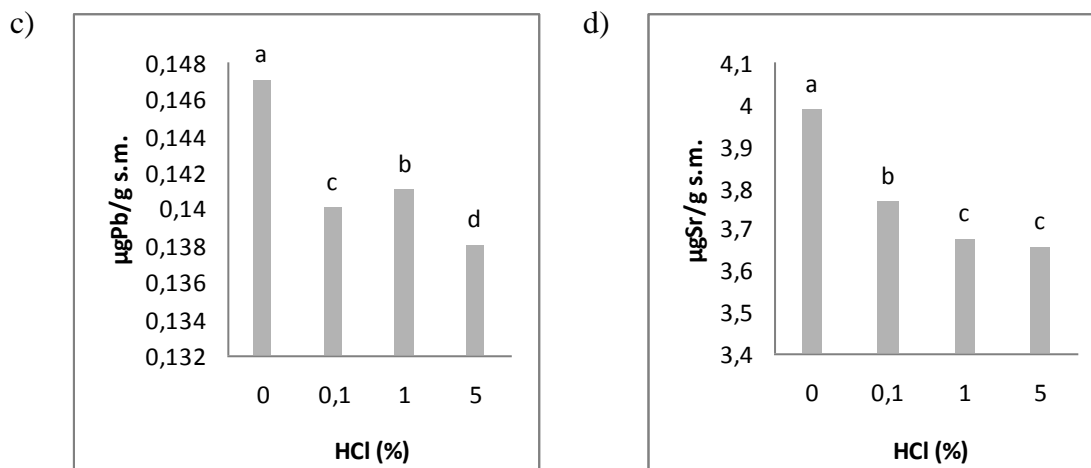
Slika 4.61. pokazuje da je za ekstrakciju Fe, Cu, Mn, Zn i Cr najpogodniji 30% etanol sa 0% HCl, dok se za Cr može koristiti i 30% etanol sa 5% HCl kao ekstragens.



Slika 4.62. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si i b) V u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=20; t=25°C). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Slika 4.62. pokazuje da je za ekstrakciju Si i V najpogodniji 30% etanol sa 0% HCl kao ekstragens.





Slika 4.63. Uticaj koncentracije kiseline na sadržaj neesencijalnih minerala: a)Al; b)Ba; c)Pb i d)Sr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=20$; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

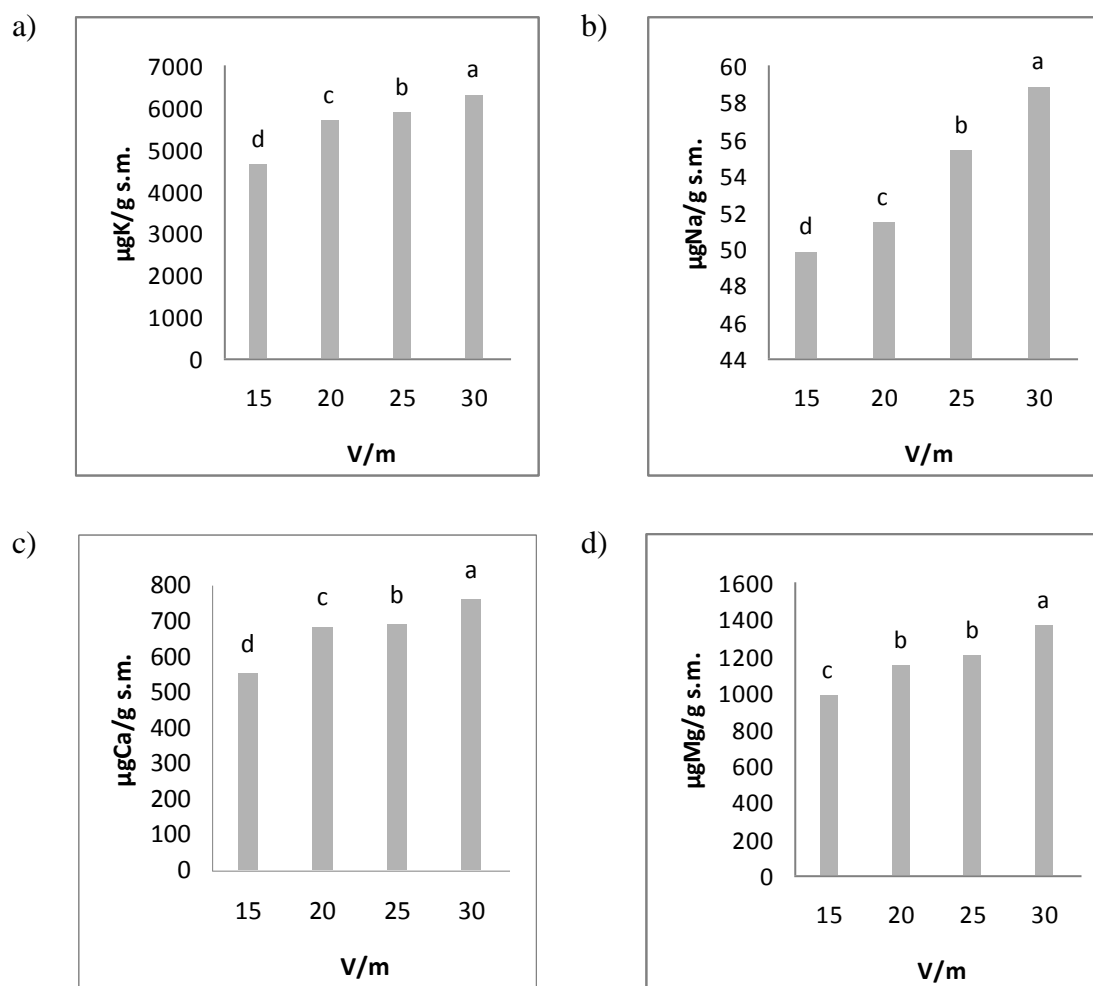
Sa Slike 4.63. se vidi da je 30% etanol sa 0% HCl najpogodniji ekstragens za ekstrakciju Al, Pb i Sr, dok je ekstrakcija Ba najefikasnija korišćenjem 30% etanola sa 5% HCl kao ekstragensa.

Uticaj solvomodula

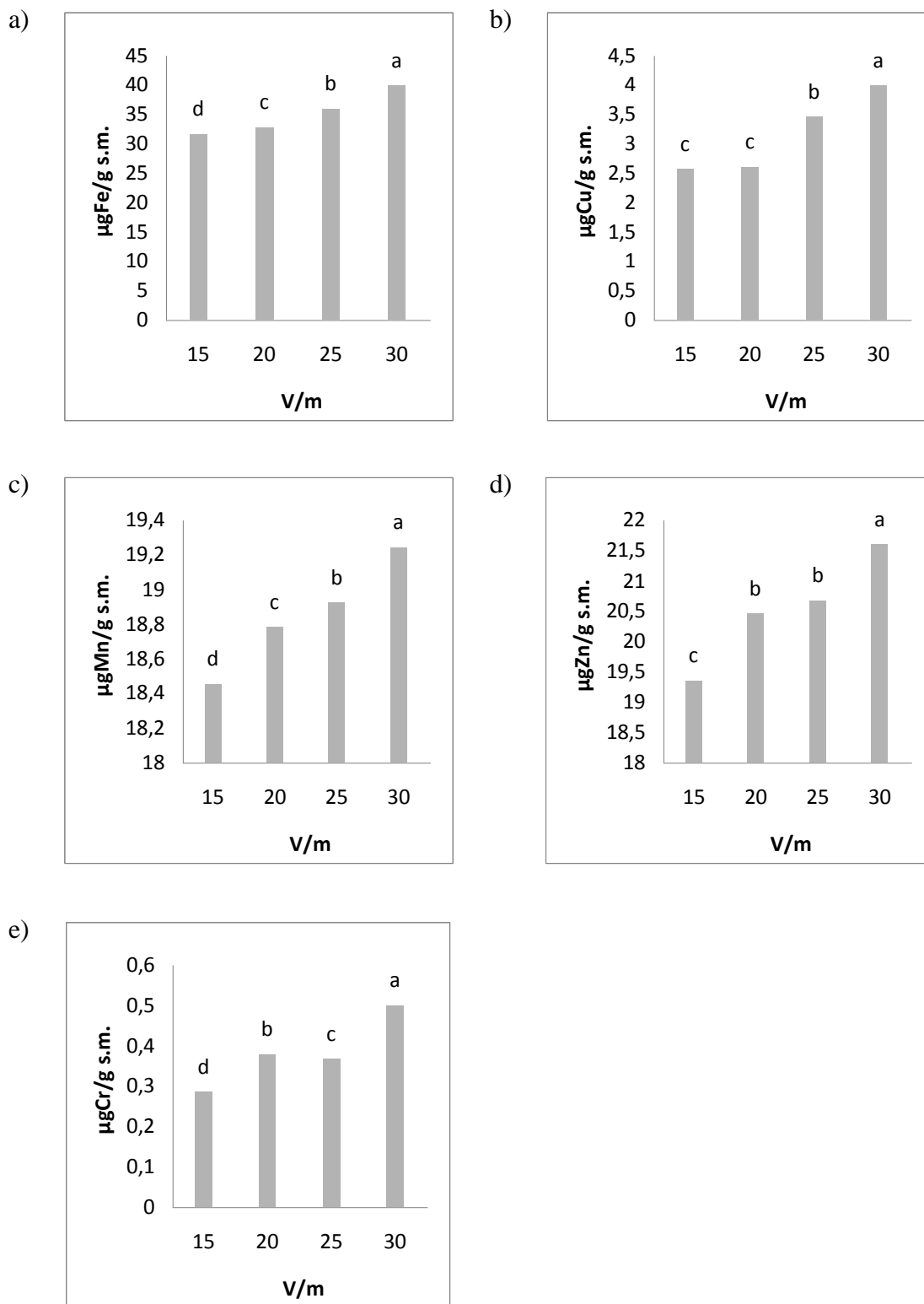
Pri odabranoj koncentraciji etanola (30%) i HCl (0%) ispitan je uticaj solvomodula na ekstrakciju sledećih minerala:

- esencijalni makrominerali (kalcijum, magnezijum, natrijum i kalijum)
- esencijalni u tragovima (gvožđe, bakar, mangan, cink i hrom)
- verovatno esencijalni u tragovima (silicijum i vanadijum)
- neesencijalni i toksični (aluminijum, olovo i stroncijum).

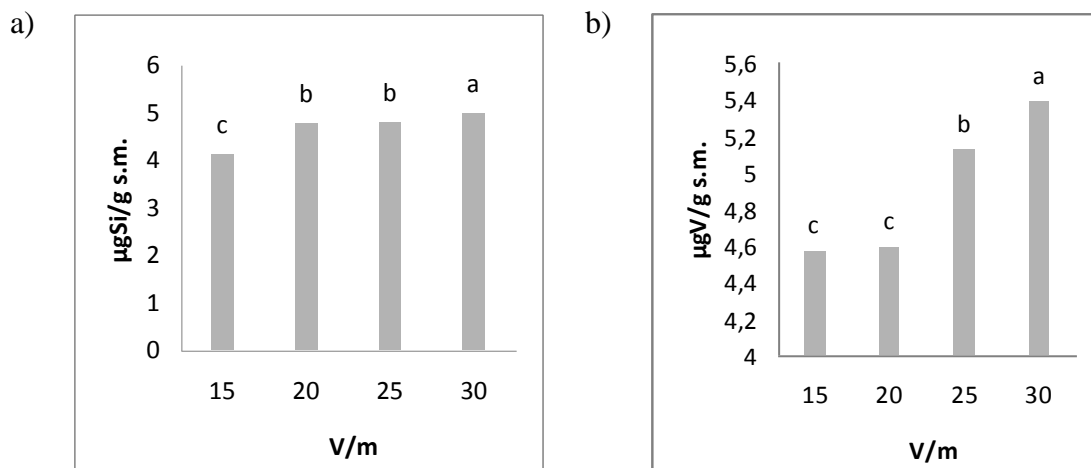
Rezultati ispitivanja uticaja solvomodula na sadržaj ovih minerala u ekstraktima prikazani su na Slikama od 4.64. do 4.67. (vrednosti su date u Tabeli 8.18., Prilog).



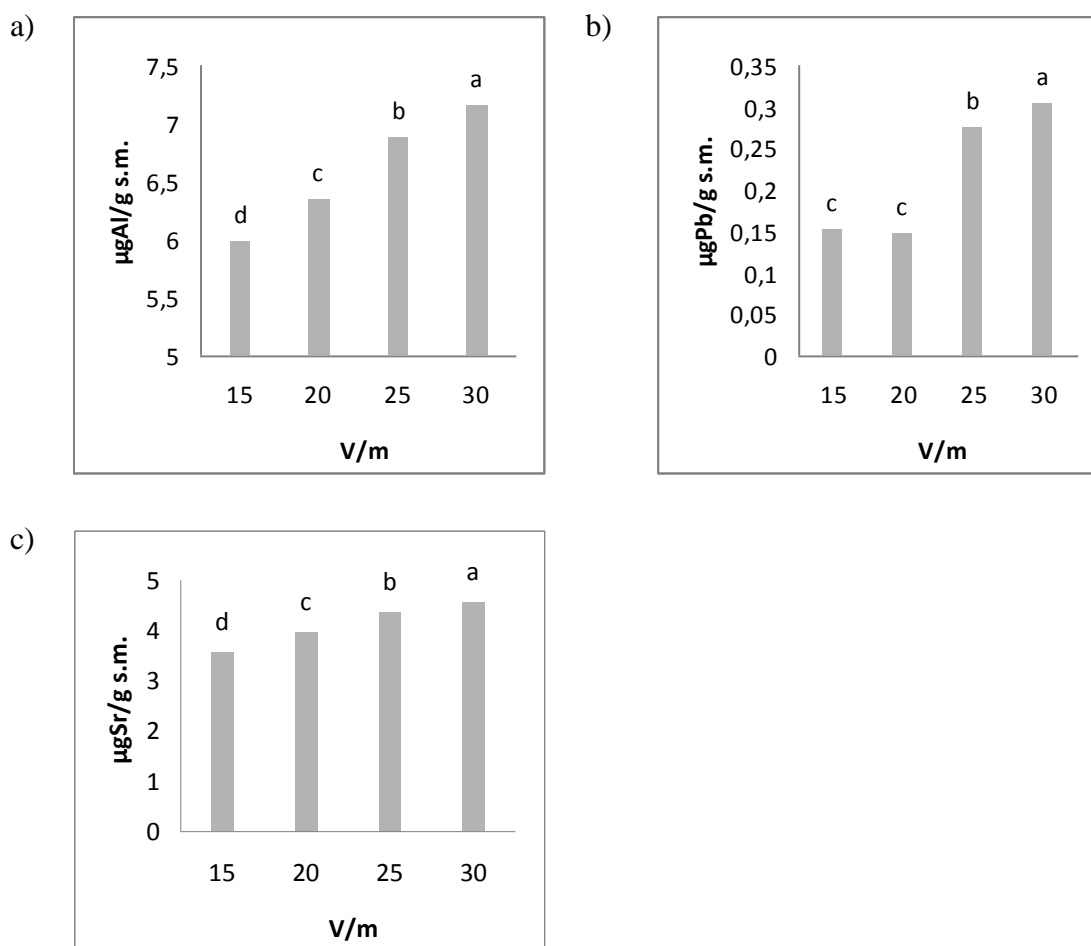
Slika 4.64. Uticaj solvomodula na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.



Slika 4.65. Uticaj solvomodula na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn i e)Cr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.



Slika 4.66. Uticaj solvomodula na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a)Si; b)V u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala

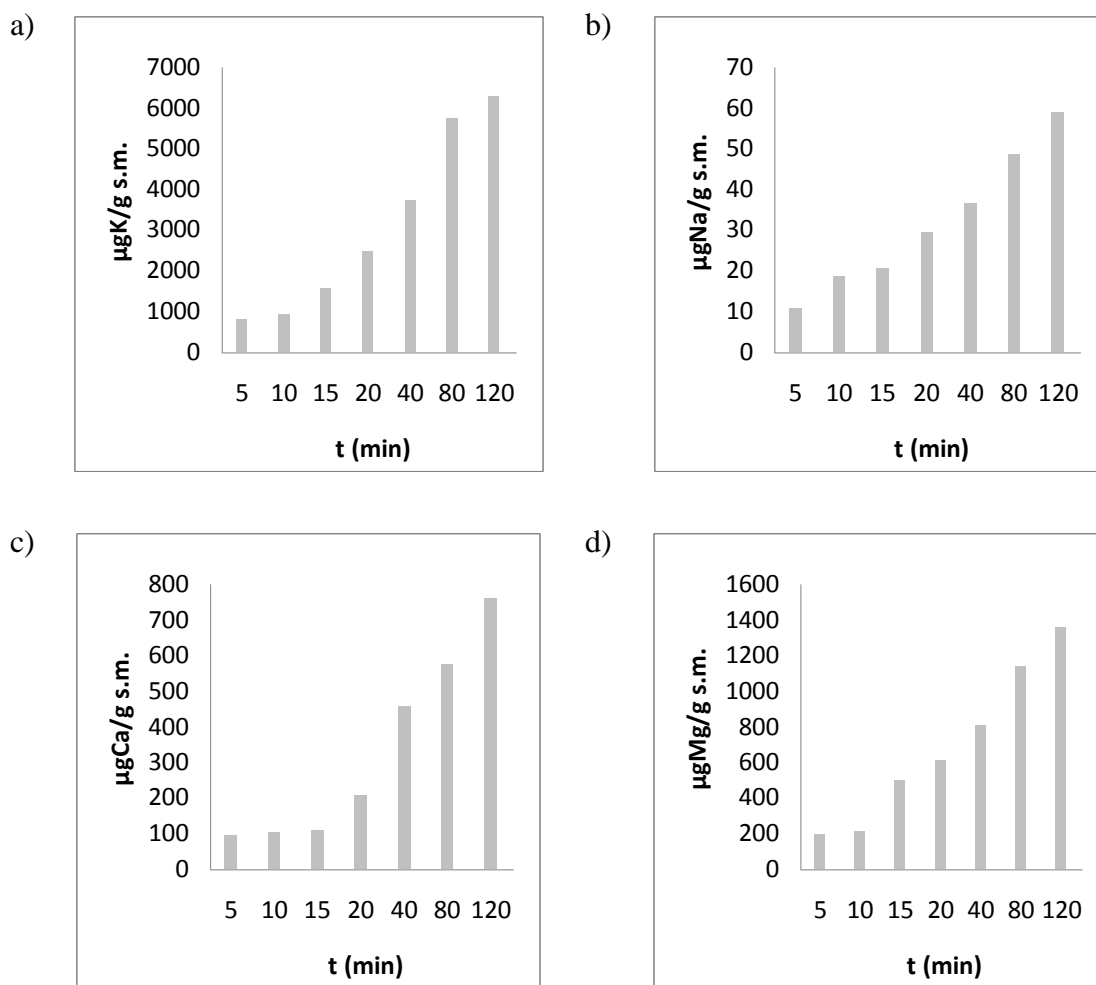


Slika 4.67. Uticaj solvomodula na sadržaj neesencijalnih minerala: a)Al; b)Pb i c)Sr u ekstraktu hmelja (vreme ekstrakcije: 120 minuta; koncentracija etanola: 30%; $t=25^{\circ}\text{C}$). Vrednosti označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala.

Sa slika vidimo da je solvomodul 30 (V/m) najpogodniji za ekstrakciju metalnih jona iz hmelja.

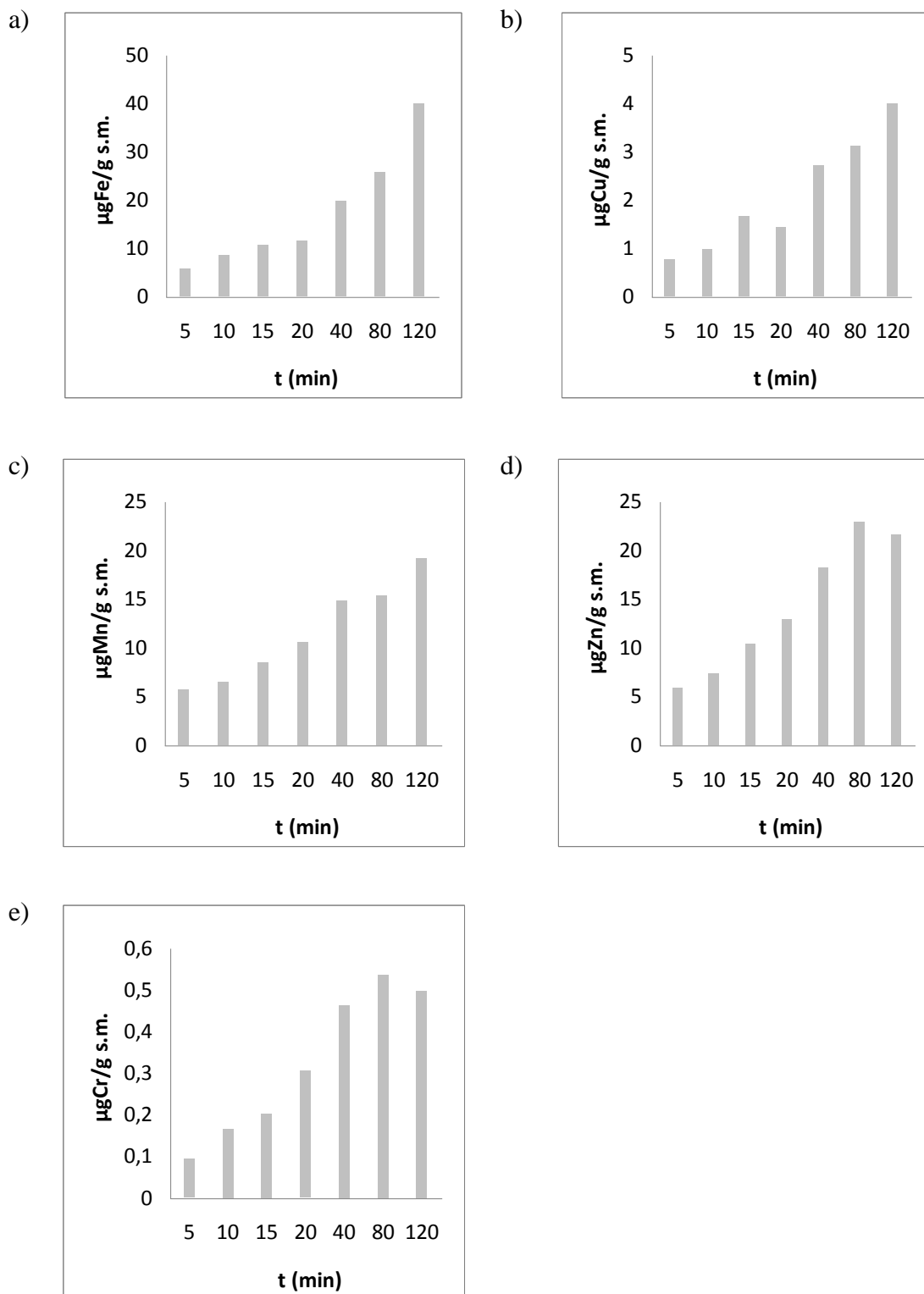
Uticaj vremena ekstrakcije

Pri optimalnim uslovima ekstrakcije (30% etanol (v/v), 30 (V/m) solvomodul) ispitan je uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn Zn, Cr, Si, V, Al, Pb i Sr. Rezultati ispitivanja su prikazani na Slikama 4.68 - 4.71., odnosno u Tabeli 8.19. (Prilog).



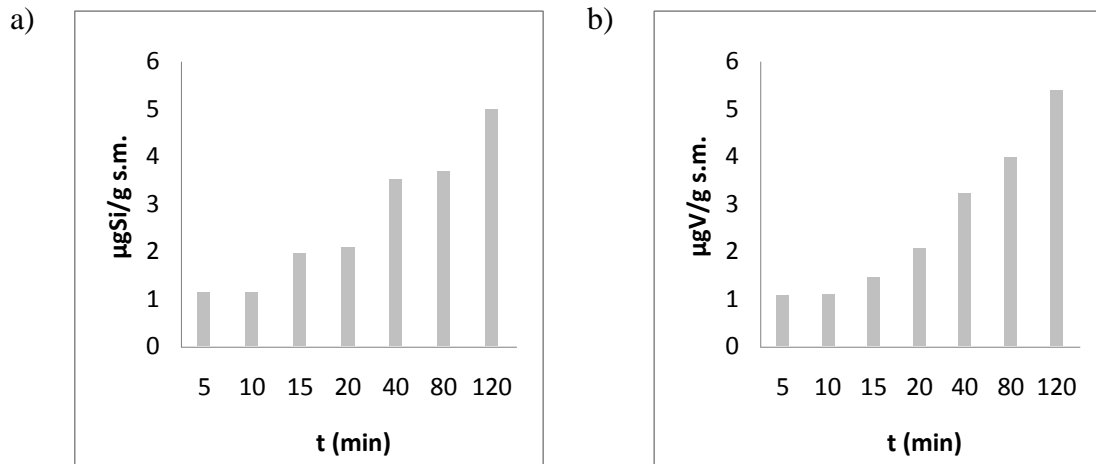
Slika 4.68. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj esencijalnih makrominerala: a)K; b)Na; c)Ca i d)Mg u ekstraktu hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=30; t=25°C).

Sa Slike 4.68. se vidi da se najveći sadržaj K, Na, Ca i Mg postiže nakon 120 minuta ekstrakcije.



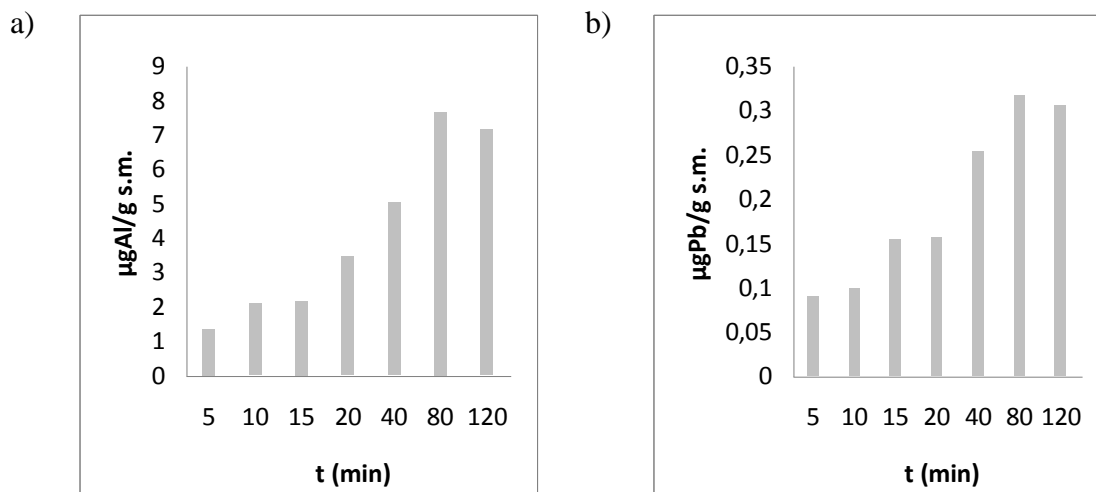
Slika 4.69. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj esencijalnih minerala u tragovima: a)Fe; b)Cu; c)Mn; d)Zn i e)Cr u ekstraktu hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvomodul: $V/m=30$; $t=25^{\circ}\text{C}$).

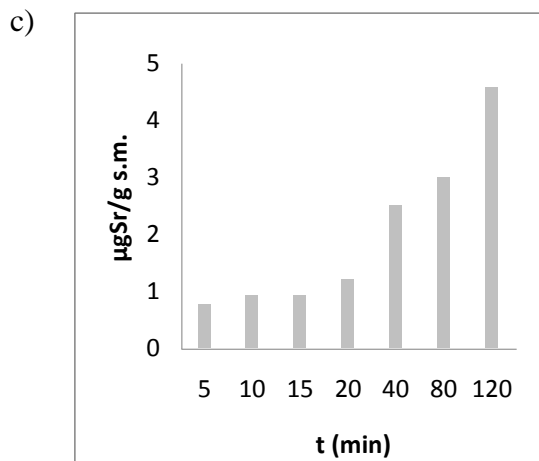
Najveći sadržaj Zn i Cr postiže se nakon 80 minuta ekstrakcije, dok je sadržaj Fe, Cu i Mn najveći nakon 120 minuta ekstrakcije (Slika 4.59.).



Slika 4.70. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj verovatno esencijalnih minerala u tragovima: a) Si i b) V u ekstraktu hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=30; t=25°C).

Slika 4.70. pokazuje da je za ekstrakciju Si i V potrebno 120 minuta.





Slika 4.71. Uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj neesencijalnih minerala: a)Al; b)Pb i c)Sr u ekstraktu hmelja (koncentracija etanola: 30%; solvomodul: V/m=30; t=25°C).

Na Slici 4.71. se vidi da je za Sr potrebno 120 minuta ekstrakcije, dok za Al i Pb dovoljno vreme maceracije je 80 minuta.

4.2.6.2. Koeficijenti ekstrakcije metalnih jona iz hmelja

U Tabeli 4.26. prikazani su procenti ekstrakcije pri utvrđenim optimalnim uslovima za ekstrakciju metalnih jona iz hmelja (30% vodeni rastvor etanola, bez dodatka kiseline, solvomodul: V/m=30) u odnosu na vrednosti u uzorku hmelja dobijenim procesom mineralizacije, nakon 120 minuta ekstrakcije za K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Si, V, Sr i 80 minuta ekstrakcije za Zn, Cr, Pb i Al.

Tabela 4.26. Procenti ekstrakcije pri optimalnim uslovima u odnosu na vrednost dobijenu u uzorku hmelja dobijenog procesom mineralizacije.

Vreme ekstrakcije (min)	Element	c_i	c_0	% ekstrakcije
120	K	6273,4±2,2	10511,3±4,1	59,68
	Na	58,75±0,25	89,26±0,19	65,82
	Ca	758,7±1,1	1253,6±0,9	60,52
	Mg	1356,7±1,4	2055,6±2,2	66,00
	Fe	39,84±0,09	83,15±0,05	47,91
	Cu	3,985±0,009	8,924±0,021	44,65
	Mn	19,24±0,08	31,49±0,04	61,10
	Si	4,983±0,005	12,02±0,01	41,46
	V	5,384±0,012	7,928±0,051	67,91
80	Sr	4,565±0,008	9,234±0,005	49,44
	Zn	22,94±0,01	39,18±0,09	58,55
	Cr	0,536±0,003	0,781±0,001	68,63
	Pb	0,317±0,006	0,471±0,009	67,30
	Al	7,654±0,017	15,37±0,11	49,80

Pri optimalnim uslovima ekstrakcije minerala iz hmelja (30% etanol, solvomodul 30 i $t=25^{\circ}\text{C}$), oni se mogu podeliti na (Szywczycha-Madeja i sar., 2012):

- visoko ekstraktibilne (procenat ekstrakcije je veći od 55%): K, Na, Ca, Mg, Mn, V, Zn, Cr i Pb
- srednje ekstraktibilne (procenat ekstrakcije je između 20 i 55%): Fe, Cu, Si, Sr i Al.

4.2.7. Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata hmelja

Hmelj svojim svojstvom bitno utiče na kvalitet i stabilizaciju piva, i iz tog razloga potrebno je odrediti hemijski sastav i antioksidativnu aktivnost hmelja proizvedenog u Srbiji.

U cilju ispitivanja kvaliteta hmelja koji se koristi za proizvodnju piva analiziran je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao i antioksidativna aktivnost ekstrakata 8 različitih uzoraka hmelja kupljenih u lokalnim marketima, metodama spektrofotometrije i tečne hromatografije. Mineralni sastav istih uzoraka hmelja određen je ICP-OES metodom.

4.2.7.1. Spektrofotometrijska analiza ekstrakata hmelja

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima dobijenim pri predhodno odabranim optimalnim uslovima ekstrakcije (30% etanol, solvomodul 30 (V/m), $t=25^{\circ}\text{C}$ i 120 minuta), prikazani su u Tabeli 4.27.

Tabela 4.27. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima hmelja.

Uzorak	Ukupni fenoli* mgGAE/g	Ukupni flavonoidi* mgCE/g	TF/TP
1	9,54±0,07	3,82±0,03	0,40
2	13,33±0,03	5,54±0,05	0,42
3	10,11±0,07	4,15±0,07	0,41
4	10,54±0,09	4,60±0,02	0,44
5	9,91±0,05	3,57±0,07	0,36
6	10,91±0,07	4,47±0,03	0,41
7	12,68±0,05	4,78±0,07	0,38
8	11,46±0,09	5,05±0,03	0,44

*srednja vrednost ± SD (n = 3)

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima hmelja se kreće od 9,54 mgGAE/g (uzorak 1) do 13,334 mgGAE/g (uzorak 2). Poznato je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiče vrsta biljnog materijala, ali i uslovi gajenja. Spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature i prisustva hranljivih materija u zemljištu, imaju bitan uticaj na sastav i količinu fenolnih jedinjenja. Dobijene vrednosti sadržaja ukupnih fenola u hmelju su uporedive sa literaturnim podacima koje su dobili *Kirca i Arslan* (2008) i *Lermusieau i sar.* (2001), dok su znatno veće od vrednosti koje su objavili *Proestos i sar.* (2006), *Mudura i sar.* (2010) i *Wojdylo i sar.* (2007). Rezultati za sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu hmelja (23,1 mg/g), koje su publikovali *Kahkonen i sar.* (1999), su veći od naših.

Flavonoidi su najzastupljenija fenolna jedinjenja i u prirodi se nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani sa različitim molekulima šećera. Oni doprinose ukusu, najčešće gorčini i oporosti biljaka u kojima se nalaze. Naši rezultati ukazuju da se ispitivani ekstrakti malo razlikuju u pogledu sadržaja flavonoida. Sadržaj flavonoida kreće se od 3,57 mgCE/g (uzorak 5) do 5,54 mgCE/g (uzorak 2), odnosno od 36 do 44% od ukupnog sadržaja fenola.

Imajući u vidu kompleksnost antioksidativnih mehanizama, i činjenice da je u procesu određivanja antioksidativnog potencijala uzoraka neophodno izabrati više *in vitro* nezavisnih testova, antioksidativna aktivnost ekstrakata 8 uzoraka hmelja ispitana je DPPH, ABTS i FRAP testovima (Tabela 4.28.).

Tabela 4.28. Antioksidativna aktivnost uzoraka hmelja (DPPH, ABTS i FRAP).

Uzorak	DPPH* μmolTE/g	ABTS* μmolTE/g	FRAP* μmolFe/g
1	32,25±0,07	41,67±0,07	37,28±2,68
2	37,52±0,20	46,85±0,26	66,26±3,07
3	34,03±0,27	43,78±0,19	54,89±2,29
4	35,13±0,20	43,04±0,07	44,86±1,92
5	32,97±0,27	42,17±0,13	30,50±1,53
6	37,09±0,14	46,25±0,19	71,41±3,45
7	36,52±0,14	44,74±0,13	70,06±0,77
8	35,90±0,20	45,43±0,07	75,48±1,53

*srednja vrednost ± SD (n = 3)

Etanolni ekstrakti hmelja pokazuju relativno velike radikal-hvatačke sposobnosti prema stabilnom DPPH radikal, pri čemu su dobijene vrednosti od 32,25 do 37,52 μmolTE/g. Redukcija ABTS može da bude pouzdaniji test, a zbog manje stabilnosti ovog radikala dobijene vrednosti su veće i kreću se od 41,67 do 46,85 μmolTE/g. FRAP (Ferric Reducing Antioxidan Power) je metoda koja se bazira na sposobnosti ispitivane vrste (u ovom slučaju ekstrakta hmelja) da redukuje Fe(III) do Fe(II). Rezultati dobijeni ovom metodom se nalaze u opsegu od 30,50 do 75,48 μmolTE/g.

Smatra se da fenolna jedinjenja imaju najveću ulogu u biološkoj aktivnosti ekstrakata i njihovo prisustvo doprinosi antioksidativnoj aktivnosti biljke. Od fenolnih jedinjenja veliki broj studija ukazuje da je uloga flavonoida od posebnog značaja. Od strukturnih elemenata koji su značajni za antioksidativnu aktivnost flavonoida, hidroksilne grupe imaju najveći značaj (Cotelle, 2001; Heim i sar., 2002). Utvrđeno je da položaj hidroksilnih grupa ima mnogo veći uticaj na aktivnost nego njihov broj.

Analizirana je korelacija sadržaja ukupnih fenola, odnosno ukupnih flavonoida i pojedinačnih antioksidativnih testova (Tabela 4.29.).

Tabela 4.29. Koeficijenti korelacije sadržaja ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i in vitro antioksidativnih testova (DPPH, ABTS i FRAP).

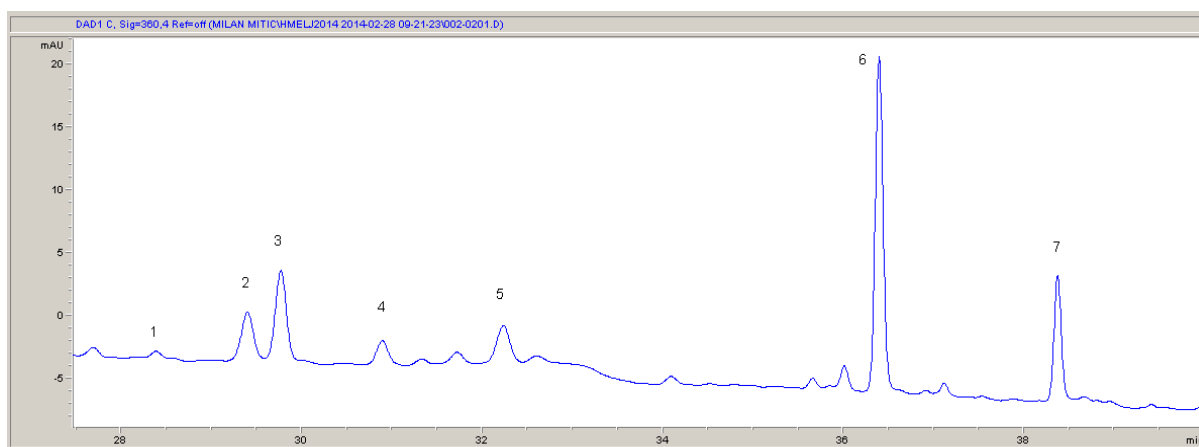
	TP	TF	DPPH	ABTS	FRAP
TP	1				
TF	0,7892	1			
DPPH	0,7226	0,7717	1		
ABTS	0,6366	0,6812	0,8951	1	
FRAP	0,5633	0,5614	0,8077	0,8191	1

Najveća korelacija je zapažena između DPPH i ABTS testa ($r^2=0,8951$). Jako pozitivna linearna korelacija ($r^2>0,7$) postoji između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida ($r^2=0,7892$), ukupnih fenola i DPPH testa ($r^2=0,7226$), totalnih flavonoida i DPPH testa ($r^2=0,7717$), DPPH i FRAP testa ($r^2=0,8077$) i ABTS i FRAP testa ($r^2=0,8191$).

4.2.7.2. HPLC analiza ekstrakata hmelja

U cilju identifikacije i kvantifikacije pojedinih grupa jedinjenja, HPLC metodom određen je sadržaj flavonola, fenolnih kiselina i flavan-3-ola.

Na Slikama 4.72., 4.73. i 4.74. dati su hromatogrami etanolnih ekstrakata hmelja snimljeni na 360, 320 i fluorescentnim detektorom.



Slika 4.72. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta hmelja na 360 nm: kvercetin-3-galaktozid (1), kvercetin-3-rutinozid (2), kvercetin-3-glukozid (3), kemferol-3-rutinozid (4), kemferol-3-glukozid (5), kvercetin-glikozid (6) i kemferol-glikozid (7).

Od flavonola identifikovani su i kvantifikovani: kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kemferol-3-rutinozid, kemferol-3-glukozid i neidentifikovani glikozidi kvercetina i kemferola. Prema literaturnim podacima (Magalhaes i sar., 2010) kvercetin i kemferol nisu u hmelju prisutni u slobodnom obliku, već samo u obliku glikozida sa odgovarajućim šećerom u poziciji 3. Isti autori su ove glikozide kvercetina i kemferola identifikovali kao kvercetin-3-acetilheksoza i kemferol-3-acetilheksoza.

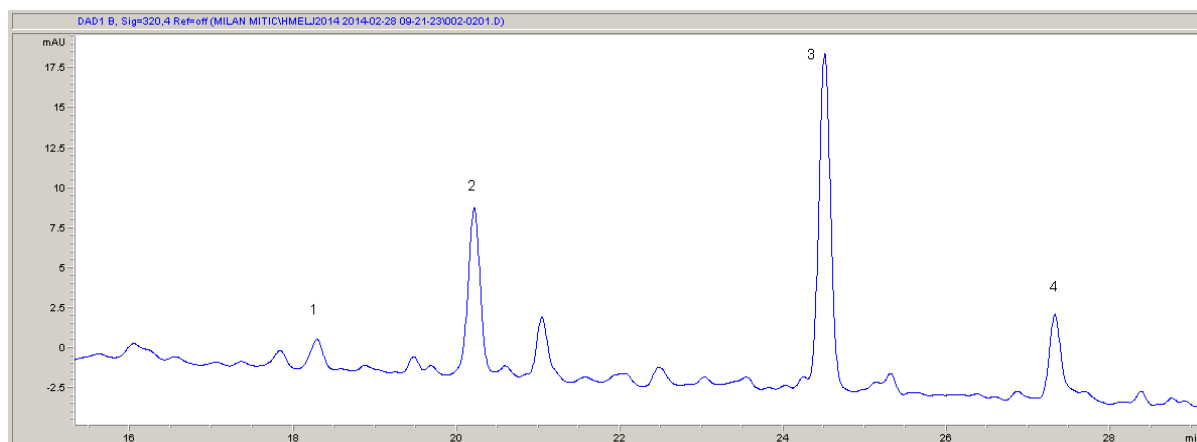
U Tabeli 4.30. su prikazani rezultati određivanja flavonola HPLC metodom u uzorcima hmelja na 360 nm.

Tabela 4.30. Sadržaj flavonola u ekstraktima hmelja izražen kao mg/g suve mase.

	1	2	3	4	5	6	7	8
kvercetin-3-galaktozid	0,015 ¹	0,017	0,036	0,041	0,050	0,027	0,029	0,068
kvercetin-3-rutinozid	0,035	0,033	0,091	0,077	0,236	0,122	0,034	0,248
kvercetin-3-glukozid	0,082	0,135	0,319	0,178	0,177	0,236	0,108	0,187
kemferol-3-rutinozid	0,048	0,051	0,122	0,058	0,049	0,070	0,058	0,068
kemferol-3-glukozid	nd ²	nd ²	0,220	0,099	0,088	0,115	nd ²	0,086
kvercetin-glikozid	0,158	0,459	0,435	0,536	0,438	0,394	0,460	0,462
kemferol-glikozid	nd ²	nd ²	0,204	0,177	0,154	0,120	0,095	0,153
Σ glikozidi kvercetina	0,290	0,644	0,881	0,832	0,901	0,779	0,631	0,965
Σ glikozidi kemferola	0,048	0,051	0,546	0,334	0,291	0,305	0,153	0,307
Σ	0,338	0,695	1,427	1,166	1,192	1,084	0,784	1,272

¹srednja vrednost izražena u mg/g suve mase; ²nije detektovano.

Iz Tabele 4.30. se može videti da je od glikozida kvercetina najzastupljeniji kvercetin-3-rutinozid. Sadržaj ukupnih flavonola u ispitivanim ekstraktima kreće se od 0,338 do 1,427 mg/g. Naši rezultati su pokazali da je ukupni sadržaj glikozida kvercetina (0,290 – 0,965 mg/g) veći od ukupnog sadržaja glikozida kemferola (0,048 – 0,546 mg/g) u svim ispitivanim uzorcima hmelja, što je suprotno rezultatima *Mc Murrough i sar.* (1982) (0,92 mg/g i 1,20 mg/g), ali je u skladu sa rezultatima *Kovačova i sar.* (2011) (0,165 mg/g i 0,126 mg/g).



Slika 4.73. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta hmelja na 320 nm: 4-hidroksibenzoeva kiselina (1), hlorogenska kiselina (2), p-kumarna kiselina (3) i ferulna kiselina (4).

Sa Slike 4.73. se jasno vide pikovi identifikovanih fenolnih kiselina: 4-hidroksibenzoeva kiselina (1), hlorogenska kiselina (2), p-kumarna kiselina (3) i ferulna kiselina (4).

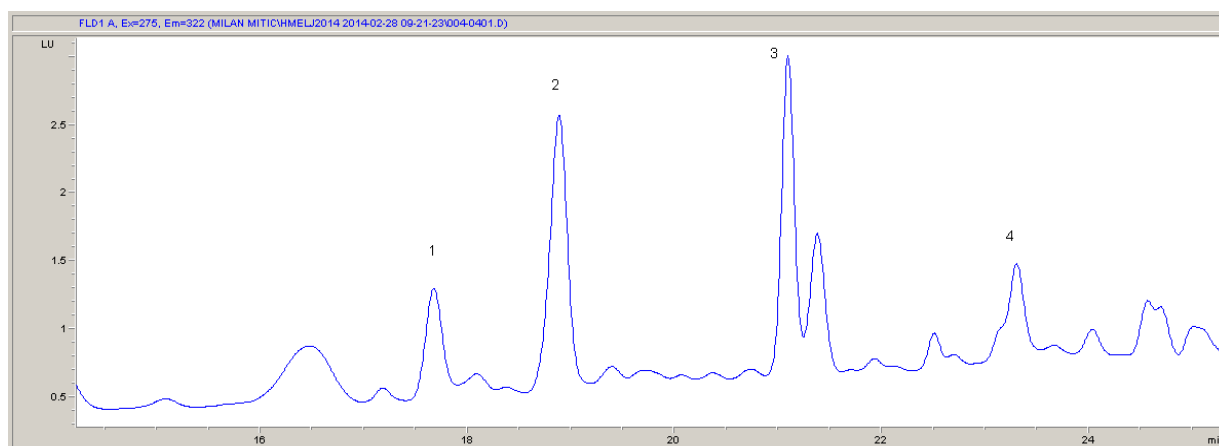
U Tabeli 4.31. prikazani su rezultati određivanja fenolnih kiselina HPLC metodom u uzorcima hmelja na 320 nm.

Tabela 4.31. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima hmelja izražen kao mg/g suve mase.

	1	2	3	4	5	6	7	8
4-hidroksibenzoeva	0,018 ¹	0,020	0,124	0,111	0,047	0,019	0,018	0,118
hlorogenska	0,152	0,316	0,349	0,304	0,257	0,294	0,273	0,245
p-kumarna	0,040	0,019	0,203	0,197	0,178	0,194	0,191	0,176
ferulna	0,076	0,039	0,076	0,073	0,085	0,066	0,067	0,098
Σ	0,286	0,394	0,752	0,685	0,567	0,573	0,549	0,637

¹srednja vrednost izražena u mg/g suve mase.

Rezultati pokazuju da se ukupni sadržaj fenolnih kiselina kreće u intervalu od 0,286 do 0,752 mg/g. Najzastupljenija komponenta u etanolnim ekstraktima hmelja je hlorogenska kiselina, čija se koncentracija nalazi u intervalu od 0,152 do 0,349 mg/g. Fenolna kiselina sa najmanjom koncentracijom u većini ispitivanih ekstrakata je 4-hidroksibenzoeva kiselina (0,018 – 0,118 mg/g). Sadržaj p-kumarne kiseline se kreće od 0,019 do 0,203 mg/g, dok se koncentracija ferulne kiseline nalazi u opsegu od 0,039 do 0,098 mg/g. *Proestos i sar.* (2006) su dobili rezultate koji su u skladu sa našim u pogledu sadržaja 4-hidroksibenzoeve kiseline (0,015 mg/g) i p-kumarne kiseline (0,038 mg/g) u ekstraktu hmelja, dok ferulna kiselina nije detektovana. *Wojdylo i sar.* (2007) su publikovali veće rezultate za sadržaj p-kumarne (0,228 mg/g) i ferulne kiseline (0,143 mg/g) u hmelju.



Slika 4.74. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta hmelja na 275/322 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$): procijanidin B1 (1), katehin (2), procijanidin B2 (3) i epikatehin (4).

Kao što se može videti sa hromatograma (Slika 4.74.), jasno se uočavaju izraženi pikovi flavan-3-ola: procijanidin B1 (1), katehin (2), procijanidin B2 (3) i epikatehin (4).

U Tabeli 4.32. prikazani su rezultati određivanja flavan-3-ola u ispitivanim ekstraktima hmelja HPLC metodom na 275/322 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

Tabela 4.32. Sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima hmelja izražen kao mg/g suve mase.

	1	2	3	4	5	6	7	8
B1	0,131 ¹	0,165	0,143	0,123	0,089	0,117	0,148	0,079
katehin	0,264	0,229	0,278	0,209	0,112	0,249	0,255	0,115
B2	0,311	0,339	0,416	0,310	0,260	0,331	0,325	0,132
epikatehin	nd ²	nd ²	0,159	0,107	0,084	nd ²	0,159	0,103
Σ	0,706	0,733	0,996	0,749	0,545	0,697	0,887	0,429

¹srednja vrednost izražena u mg/g suve mase; ²nije detektovano.

Iz Tabele 4.32. se može videti da je u ekstraktima hmelja od flavan-3-ola najzastupljeniji procijanidin B2, a najmanje zastupljen epikatehin. Sadržaj ukupnih flavan-3-ola u ispitivanim ekstraktima kreće se od 0,429 (uzorak 8) do 0,996 mg/g (uzorak 3). *Callemien i sar.* (2005) su u vodeno-etanolnom ekstraktu hmelja odredili sličnu količinu katehina (0,238 mg/g), ali i znatno veću količinu epikatehina (1,438 mg/g). Prisustvo katehina, epikatehina i procijanidina u ekstraktima hmelja potvrdili su *Magalhaes i sar.* (2010). Drugi autori su objavili rezultate da je u biljnom materijalu od flavan-3-ola katehin najzastupljenija komponenta (*Proestos i sar.*, 2006).

4.2.7.3. ICP-OES analiza mineralnog sastava hmelja

U cilju određivanja sadržaja minerala u ispitivanim uzorcima hmelja, izvršena je priprema uzoraka po proceduri prikazanoj u delu 3.4.3. (suva mineralizacija). U Tabeli 4.33. su prikazane odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijenti korelacije, granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ).

Tabela 4.33. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata u uzorcima hmelja.

Element	λ (nm)	LOD ¹ ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ² ($\mu\text{g/g}$)	Koeficijent korelacije
Al	308,215	0,0045	0,0150	0,9841
As	189,042	0,0026	0,0086	0,9997
Ba	455,403	0,0001	0,0002	0,9999
Ca	393,366	0,0001	0,0004	0,9901
Cd	228,802	0,0002	0,0007	0,9999
Co	238,892	0,0011	0,0034	0,9999
Cr	283,563	0,0008	0,0026	0,9997
Cu	324,754	0,0006	0,0020	1
Fe	259,940	0,0006	0,0020	0,9957
K	766,490	0,0017	0,0058	0,9979
Li	670,784	0,0001	0,0002	0,9983
Mg	279,553	0,0001	0,0006	0,9985
Mn	257,610	0,0001	0,0003	0,9999
Mo	202,030	0,0007	0,0025	0,9999
Na	588,995	0,0008	0,0027	1
Ni	231,406	0,0006	0,0021	0,9999
Pb	220,353	0,0029	0,0097	0,9999
Sb	217,581	0,0029	0,0098	1
Se	196,090	0,0028	0,0094	0,9993
Si	251,611	0,0018	0,0059	0,9993
Sn	189,989	0,0015	0,0049	0,9999
Sr	407,771	0,0001	0,0007	0,9995
V	309,311	0,0008	0,0027	1
Zn	213,856	0,0001	0,0004	0,9998

¹LOD – granica detekcije, ²LOQ – granica kvantifikacije.

Mineralni sastav osam uzoraka hmelja je određen ICP-OES metodom i dobijene vrednosti za 24 elementa (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, V i Zn) su prikazane u Tabelama 4.34., 4.35. i 4.36. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri uzastopna merenja.

Tabela 4.34. Sadržaj makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima hmelja.

Uzorak	K	Na	Ca	Mg	Na/K
1	10511,3 \pm 4,1	89,26 \pm 0,19	1253,6 \pm 0,9	2055,6 \pm 2,2	0,008
2	10602,6 \pm 1,4	78,66 \pm 0,11	1198,2 \pm 0,3	2102,5 \pm 0,7	0,007
3	9687,6 \pm 2,1	81,94 \pm 1,21	1224,2 \pm 0,1	1945,6 \pm 0,7	0,008
4	10124,5 \pm 0,6	88,54 \pm 0,12	1096,5 \pm 1,2	1987,5 \pm 0,8	0,009
5	10422,7 \pm 1,2	89,67 \pm 0,09	1255,4 \pm 0,2	2176,4 \pm 0,3	0,009
6	10734,5 \pm 1,8	85,71 \pm 0,04	1175,8 \pm 0,8	1874,6 \pm 0,5	0,008
7	10065,9 \pm 2,3	80,14 \pm 0,14	1167,5 \pm 0,4	2067,4 \pm 1,2	0,008
8	11006,7 \pm 3,5	83,74 \pm 0,31	1202,5 \pm 0,6	2115,3 \pm 0,6	0,008

Sadržaj određivanih makroelemenata u ispitivanim uzorcima hmelja opada u sledećem nizu: $K > Mg > Ca > Na$. Sadržaj kalijuma u uzorcima hmelja kreće se u intervalu 9687,6 – 11006,7 $\mu\text{g/g}$, dok je natrijum najmanje zastupljen od ostalih makroelemenata u analiziranim uzorcima i njegov sadržaj se kreće u intervalu od 78,66 $\mu\text{g/g}$ do 89,67 $\mu\text{g/g}$. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.34. može se videti da su vrednosti za Na/K koeficijente značajno male za sve uzorke zbog velike koncentracije K u svim uzorcima hmelja. Sadržaj kalcijuma u uzorcima hmelja je u intervalu 1096,5 – 1255,4 $\mu\text{g/g}$, dok se koncentracije magnezijuma kreću od 1874,6 do 2176,4 $\mu\text{g/g}$. Kara (2009) je objavio sledeće rezultate za sadržaj makroelemenata u biljnim čajevima: K (7010 - 19700 $\mu\text{g/g}$), Na (34,4 – 2132 $\mu\text{g/g}$), Ca (762 – 26908 $\mu\text{g/g}$) i Mg (802 – 5636 $\mu\text{g/g}$), što je u skladu sa našim rezultatima.

Tabela 4.35. Sadržaj mikroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima hmelja: a) Fe, Cu, Mn, Zn i Co; b) Cr, Se, Si, V i Mo; c) Ni i Sn.

a)

Uzorak	Fe	Cu	Mn	Zn	Co
1	83,15±0,05	8,924±0,021	31,49±0,04	39,18±0,09	0,081±0,005
2	65,87±0,12	9,541±0,017	32,76±0,12	31,65±0,13	0,052±0,006
3	81,98±0,34	9,776±0,009	28,56±0,01	42,74±0,03	0,075±0,001
4	72,77±1,22	8,931±0,023	28,54±0,04	37,65±0,11	0,085±0,003
5	79,55±0,15	8,113±0,008	30,75±0,05	36,75±0,21	0,091±0,005
6	85,11±0,22	7,473±0,011	31,77±0,04	36,43±0,08	0,035±0,001
7	84,56±0,11	8,354±0,007	31,89±0,09	39,78±0,15	0,058±0,009
8	76,03±0,09	7,881±0,005	33,04±0,05	35,75±0,04	0,066±0,002

b)

Uzorak	Cr	Se	Si	V	Mo
1	0,781±0,001	0,631±0,003	12,02±0,01	7,928±0,051	1,234±0,021
2	0,456±0,006	0,667±0,006	11,56±0,01	8,653±0,022	2,056±0,009
3	0,678±0,006	0,345±0,006	12,67±0,05	8,014±0,009	1,892±0,011
4	0,871±0,001	0,167±0,012	9,59±0,12	9,017±0,078	1,346±0,004
5	0,613±0,012	0,378±0,011	11,74±0,09	7,124±0,055	1,675±0,015
6	0,688±0,004	0,455±0,008	9,45±0,01	7,765±0,008	1,125±0,008
7	0,487±0,005	0,422±0,011	8,98±0,05	8,345±0,025	1,874±0,016
8	0,556±0,009	0,527±0,009	10,64±0,09	7,752±0,087	1,254±0,007

c)

Uzorak	Ni	Sn
1	0,732±0,001	0,681±0,001
2	0,564±0,009	0,792±0,001
3	0,792±0,002	0,626±0,002
4	0,694±0,002	0,455±0,013
5	0,611±0,011	0,667±0,008
6	0,705±0,007	0,551±0,002
7	0,642±0,006	0,611±0,008
8	0,648±0,002	0,712±0,001

Iz grupe mikroelemenata najveći sadržaj u svim ispitivanim uzorcima detektovan je za gvožđe i kreće se od 65,87 do 85,11 µg/g. Nedostatak gvožđa dovodi do anemije. Simptomi anemije su slabost i veća podložnost organizma stresu i bolestima. Bakar je sastavni deo nekih enzima i neophodan je za sintezu hemoglobina. Međutim, redoks aktivni elementi (Fe i Cu) mogu izazvati oksidativnu opasnost i time doprineti razvoju nekih bolesti (*Bush, 2002*). Sadržaj Cu u uzorcima hmelja se kreće od 7,473 do 9,776 µg/g.

Na osnovu sadržaja cinka (31,65 – 42,74 µg/g) u uzorcima hmelja, može se zaključiti da je hmelj dobar izvor cinka, ali treba reći da na povišen sadržaj ovog elementa u hmelju može uticati zemljište koje je bogato cinkom. Mangan je esencijalni element koji učestvuje u formiranju kostiju i metabolizmu aminokiselina, holesterola i uglejnih hidrata, dok ima malo podataka koji se odnose na posledice nedostatka ovog elementa kod ljudi. Njegova koncentracija u ispitivanim uzorcima hmelja je oko 30 µg/g. U svim uzorcima hmelja detektovan je i kobalt (0,035 - 0,091 µg/g). Kobalt je esencijalan za čoveka i sastavni je deo vitamina B12. On učestvuje u regulisanju krvnog pritiska i važan je za normalno funkcionisanje štitne žlezde (*Yilmaz i sar., 2010*).

Sadržaj selena se u ispitivanim uzorcima hmelja kreće od 0,167 do 0,667 µg/g. U literaturi se mnogo pažnje posvećuje selenu zbog svojih zaštitnih efekata po zdravlje. Selen je poznat po svom zaštitnom dejstvu protiv oksidativnog stresa (*Patching i Gardiner, 1999*) i u prevenciji raka (*Cobo-Fernandez i sar., 1995*). Preporučeni dnevni unos Se se kreće od 15 µg za odojčad, 30 µg za decu od 4-8 godina, 55 µg za adolescente, muškarce i žene. U trudnoći, preporučeni dnevni unos Se iznosi 60 µg (*Institute of Medicine, 2000*).

Od posebnog značaja je hrom koji se smatra teškim metalom i zagađivačem a u isto vreme je i mikroelement koji ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze. Hrom postoji u različitim oksidacionim stanjima koja imaju različite biološke efekte. Kod ljudi i životinja

Cr(III) ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze, masti i proteina, dok je Cr(VI) kancerogen (Costa, 2003). Uzorak 4 sadrži najveću količinu Cr (0,871 $\mu\text{g/g}$).

Ostali detektovani mikroelementi u uzorcima hmelja su prisutni u sledećim koncentracijama: Si (8,98 – 12,67 $\mu\text{g/g}$), V (7,124 – 9,017 $\mu\text{g/g}$), Mo (1,125 – 2,056 $\mu\text{g/g}$), Ni (0,564 – 0,792 $\mu\text{g/g}$) i Sn (0,455 – 0,792 $\mu\text{g/g}$). Vrednosti za nikl su manje od publikovanih rezultata za sadržaj ovog metala u biljnim čajevima (Kara, 2009). Kalaj je u ishrani prisutan u vrlo malim količinama, u obliku kompleksnog jona, Sn(II). Kod normalne ishrane (bez konzumiranja hrane ili pića iz limenke) unosi se približno 0,2 mg kalaja na dan. Ukupni prosečni unos Sn iznosi 4 mg/dan (Šarkanj, 2010).

Tabela 4.36. Sadržaj neesencijalnih elemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima hmelja: a) As, Pb, Cd i Al; b) Ba, Li, Sr i Sb.

a)

Uzorak	As	Pb	Cd	Al
1	0,351±0,051	0,471±0,009	0,098±0,003	15,37±0,11
2	0,112±0,042	0,193±0,005	0,066±0,001	16,66±0,09
3	0,362±0,061	0,376±0,013	0,078±0,001	15,01±0,18
4	0,214±0,044	0,301±0,009	0,092±0,003	14,66±0,14
5	0,303±0,043	0,501±0,023	0,055±0,004	13,88±0,02
6	0,281±0,011	0,221±0,015	0,082±0,002	15,32±0,08
7	0,241±0,012	0,157±0,005	0,088±0,001	14,71±0,15
8	0,382±0,082	0,287±0,032	0,059±0,003	16,02±0,11

b)

Uzorak	Ba	Li	Sr	Sb
1	4,221±0,021	6,125±0,008	9,234±0,005	0,537±0,001
2	4,002±0,008	5,876±0,009	7,653±0,002	0,455±0,002
3	3,453±0,009	6,711±0,002	6,984±0,012	0,565±0,008
4	3,769±0,002	7,026±0,009	7,112±0,001	0,489±0,011
5	4,319±0,001	6,111±0,003	7,656±0,006	0,546±0,005
6	4,067±0,014	7,832±0,013	8,623±0,015	0,435±0,002
7	2,871±0,009	6,165±0,003	8,142±0,008	0,378±0,005
8	3,886±0,001	6,664±0,009	9,189±0,005	0,466±0,001

Metali koji su detektovani u najvećem sadržaju od svih ostalih prisutnih neesencijalnih metala u uzorcima hmelja su aluminijum i stroncijum. Sadržaj aluminijuma se kreće u rasponu od 13,88 do 16,66 $\mu\text{g/g}$, a sadržaj stroncijuma od 6,984 do 9,234 $\mu\text{g/g}$. Slične rezultate za sadržaj Sr, a veće za sadržaj Al, dobili su Fernandez-Caceres i sar. (2001). Koncentracije Li i Ba variraju u opsegu od: 5,876 – 7,832 $\mu\text{g/g}$ i od 2,871 – 4,319 $\mu\text{g/g}$.

Karadas i Kara (2012) su publikovali rezultate za sadržaj barijuma u biljnim čajevima (8,2 – 81,6 $\mu\text{g/g}$), koji su veći od naših.

Teški metali kojima je hrana najčešće kontaminirana su olovo, kadmijum i arsen. Koncentracije As i Pb u našim uzorcima su manje od 1 $\mu\text{g/g}$. Kadmijum je veoma toksičan element i ozbiljan zagađivač. Sadržaj Cd u ispitivanim uzorcima hmelja se kreće od 0,055 $\mu\text{g/g}$ do 0,098 $\mu\text{g/g}$. Sadržaj antimona je veoma sličan u svim uzorcima piva i kreće se od 0,378 do 0,565 $\mu\text{g/g}$. Koncentracije teških metala u uzorcima hmelja su ispod MDK vrednosti propisanih domaćom regulativom. Olovo se može naći u hrani prilikom njene proizvodnje, distribucije ili skladištenja. On se taloži u kostima i manjim delom u jetri, bubrezima i mekim tkivima. U organizmu on može da zameni cink, kalijum i kalcijum, pa ga je teško ukloniti. Arsen je manje toksičan od ostalih teških metala. Arsen koji je vezan u organskim jedinjenjenjima (As^{5+}) i elementarni arsen nisu toksični za razliku od neorganskog trovalentnog arsena (As^{3+}) (Šarkanj, 2010).

4.3. SASTAV I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PIVA

U ovom radu je analizirano 24 uzoraka tri vrste piva (svetlo, tamno i bezalkoholno). U Tabeli 4.37. su prikazane karakteristike analiziranih komercijalnih piva.

Tabela 4.37. Karakteristike analiziranih komercijalnih piva.

Uzorak	Brend	Tip	Sadržaj alkohola (% v/v)	Sirovine	Zemlja porekla
1	Carlsberg	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
2	Efes Draft	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
3	Efes Pilsener	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
4	Pils Plus	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
5	Staropramen	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
6	Nikšićko	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
7	Lav	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
8	Lowenbrau	Svetlo	4,7	Slad, hmelj	Srbija
9	Beck's	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
10	Amstel	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
11	Tuborg	Svetlo	4,6	Slad, hmelj	Srbija
12	Heineken	Svetlo	5	Slad, hmelj	Holandija
13	Stella Artios	Svetlo	5	Slad, hmelj	Mađarska
14	Lefte	Svetlo	6,6	Slad, hmelj	Belgija
15	Jelen	Svetlo	5	Slad, hmelj	Srbija
16	Lav	Tamno	6,2	Slad, hmelj	Srbija
17	Nikšićko	Tamno	6,2	Slad, hmelj	Srbija
18	Laško	Tamno	5,9	Slad, hmelj	Slovenija
19	Weifert	Tamno	6,5	Slad, hmelj	Srbija
20	Lefte	Tamno	6,5	Slad, hmelj	Belgija
21	Guinness	Tamno	5	Slad, hmelj	Irska
22	Jelen Cool	Bezalkoholno	0	Slad, hmelj	Srbija
23	Schlossgold	Bezalkoholno	0	Slad, hmelj	Austrija
24	Union	Bezalkoholno	0	Slad, hmelj	Slovenija

Pivo je jedan od glavnih izvora fenolnih jedinjenja. Njihovo prisustvo u pivu doprinosi njegovom ukusu i boji. Takođe, fenolna jedinjenja mogu doprineti održavanju redoks ravnoteže u ljudskom organizmu (Scalbert i Williamson, 2000). Piva bogata antioksidansima pokazuju bolji kvalitet, ukus i aromu, stabilnost pene i duži rok trajanja u odnosu na piva sa manjim sadržajem antioksidanasa (McMurrough i sar., 1996; Woffenden i sar., 2001; Guido i sar., 2007).

4.3.1. Spektrofotometrijska analiza piva

Spektrofotometrijska metoda je korišćena za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH, ABTS i FRAP testa u ispitivanim uzorcima piva.

4.3.1.1. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida u pivu

Rezultati određivanja ukupnih fenola i flavonoida su prikazani u Tabeli 4.38.

Tabela 4.38. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima piva.

Uzorak	Brend	Ukupni fenoli* (mgGAE/L)	Ukupni flavonoidi* (mgQE/L)
1	Carlsberg	510,24 ± 15,51 ^{hg}	185,27 ± 1,91 ^h
2	Efes Draft	415,21 ± 13,44 ^d	171,08 ± 2,87 ^{gh}
3	Efes Pilsener	386,70 ± 6,20 ^c	135,61 ± 1,44 ^d
4	Pils Plus	331,88 ± 5,17 ^a	121,42 ± 1,43 ^b
5	Staropramen	545,32 ± 15,51 ⁱ	166,01 ± 4,30 ^g
6	Nikšičko	330,41 ± 13,44 ^a	146,76 ± 3,83 ^e
7	Lav	459,07 ± 13,44 ^f	129,86 ± 6,69 ^c
8	Lowenbrau	367,69 ± 2,06 ^b	125,82 ± 0,95 ^c
9	Beck's	481,73 ± 14,47 ^{gh}	154,19 ± 2,87 ^e
10	Amstel	342,84 ± 2,07 ^a	103,85 ± 5,26 ^a
11	Tuborg	456,88 ± 4,14 ^f	146,76 ± 6,69 ^e
12	Heineken	420,32 ± 8,27 ^d	148,45 ± 3,34 ^e
13	Stella Artios	380,85 ± 6,20 ^c	116,35 ± 4,78 ^b
14	Leffe	430,56 ± 22,75 ^e	174,12 ± 7,17 ^g
15	Jelen	445,18 ± 18,60 ^e	152,84 ± 2,86 ^e
16	Lav	466,38 ± 5,17 ^f	186,96 ± 3,34 ^{hg}
17	Nikšičko	448,10 ± 4,13 ^e	208,58 ± 2,39 ^j
18	Laško	510,97 ± 8,27 ^h	197,78 ± 3,34 ⁱ
19	Weifert	490,50 ± 8,27 ^g	161,62 ± 3,82 ^f
20	Leffe	483,19 ± 10,34 ^g	183,92 ± 1,91 ^h
21	Guinness	542,40 ± 3,10 ^{ih}	166,69 ± 3,34 ^{gh}
22	Jelen Cool	328,22 ± 8,27 ^a	136,29 ± 3,34 ^{de}
23	Schlossgold	356,73 ± 5,17 ^{ba}	145,07 ± 4,30 ^{ed}
24	Union	336,26 ± 7,23 ^a	107,57 ± 0,95 ^a

*Srednja vrednost ± SD (n = 3). Vrednosti označene različitom slovnim oznakom (a-j) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju kada se koristi *t* test (p < 0,05).

Sadržaj ukupnih fenola varira u zavisnosti od tipa piva i kreće se od 328,22 mgGAE/L kod bezalkoholnih do 545,32 mgGAE/L kod tamnih piva, sa srednjom koncentracijom od 427,82 mgGAE/L. Sadržaj ukupnih fenola je veći kod tamnih i svetlih piva u odnosu na bezalkoholna. Rezultati dobijeni Folin-Ciocalteu metodom su slični rezultatima koje su dobili *Shahidi i Naczk* (1995) (270-600 mgGAE/L), *Piazzon i sar.* (2010) (366-622 mgGAE/L) i

Lugasi (2003) sa srednjom vrednošću od 376 mgGAE/L. Niže vrednosti ukupnih fenola dobili su Zhao i sar. (2010) (152,01-339,12 mgGAE/L) i Obruča i sar. (2009) (156,49-201,15 mgGAE/L). Razlike u rezultatima mogu biti posledica prisustva redoks-aktivnih supstanci, kao što su proteini (Davalos i sar., 2003) koji su prisutni u pivu u koncentraciji od 3-5 g/L piva (Bamforth, 2002).

Slično sadržaju ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida (Tabela 4.38) u odabranim uzorcima piva pokazuje značajne razlike u zavisnosti od vrste piva i kreće se u rasponu od 107,57 mg QE/L za bezalkoholna piva do 208,58 mgQE/L kod tamnih piva. Rezultati su veći od rezultata koje su dobili Obruča i sar. (Obruča i sar., 2009) (53,49-76,80 mg/L).

4.3.1.2. Antioksidativna aktivnost piva

U Tabeli 4.39. prikazane su antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka piva primenom DPPH, ABTS i FRAP metode.

Tabela 4.39. Antioksidativna aktivnost uzoraka piva (DPPH, ABTS i FRAP).

Uzorak	Brend	DPPH* (mmolTE/L)	ABTS* (mmolTE/L)	FRAP* (mmolFE/L)
1	Carlsberg	0,60 ± 0,01 ^h	0,21 ± 0,00 ^c	524,17 ± 6,39 ⁱ
2	Efes Draft	0,50 ± 0,02 ^e	0,25 ± 0,02 ^e	535,91 ± 15,32 ^l
3	Efes Pilsener	0,42 ± 0,02 ^d	0,19 ± 0,01 ^b	231,59 ± 14,04 ^e
4	Pils Plus	0,39 ± 0,02 ^c	0,14 ± 0,01 ^a	91,62 ± 7,67 ^c
5	Staropramen	0,61 ± 0,01 ^h	0,23 ± 0,01 ^d	762,57 ± 11,49 ^m
6	Nikšićko	0,46 ± 0,00 ^d	0,17 ± 0,00 ^b	583,03 ± 4,89 ^j
7	Lav	0,52 ± 0,00 ^f	0,22 ± 0,02 ^c	419,42 ± 6,39 ^g
8	Lowenbrau	0,50 ± 0,01 ^e	0,21 ± 0,01 ^c	412,19 ± 3,83 ^g
9	Beck's	0,52 ± 0,00 ^f	0,23 ± 0,01 ^c	354,40 ± 6,39 ^f
10	Amstel	0,44 ± 0,01 ^d	0,21 ± 0,01 ^c	22,99 ± 5,11 ^a
11	Tuborg	0,65 ± 0,01 ⁱ	0,32 ± 0,00 ^g	427,55 ± 10,22 ^g
12	Heineken	0,51 ± 0,00 ^e	0,23 ± 0,00 ^d	65,43 ± 8,94 ^b
13	Stella Artios	0,55 ± 0,01 ^g	0,21 ± 0,01 ^c	116,00 ± 11,50 ^d
14	Leffe	0,59 ± 0,01 ^h	0,26 ± 0,01 ^e	535,01 ± 6,39 ⁱ
15	Jelen	0,60 ± 0,02 ^h	0,20 ± 0,01 ^c	430,26 ± 6,39 ^g
16	Lav	0,74 ± 0,02 ^j	0,35 ± 0,01 ^h	632,53 ± 11,50 ^j
17	Nikšićko	0,83 ± 0,01 ^k	0,29 ± 0,01 ^f	708,38 ± 3,83 ^l
18	Laško	0,76 ± 0,01 ^j	0,31 ± 0,01 ^{gf}	712,90 ± 12,77 ^{lm}
19	Weifert	0,74 ± 0,01 ^j	0,33 ± 0,01 ^g	831,20 ± 3,83 ⁿ
20	Leffe	0,55 ± 0,02 ^g	0,26 ± 0,00 ^e	629,82 ± 10,21 ^j
21	Guinness	0,35 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,01 ^{fg}	673,17 ± 10,22 ^k
22	Jelen Cool	0,26 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^b	87,11 ± 6,39 ^c
23	Schlossgold	0,33 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	492,57 ± 10,22 ^h
24	Union	0,34 ± 0,01 ^b	0,20 ± 0,00 ^c	572,03 ± 10,22 ^j

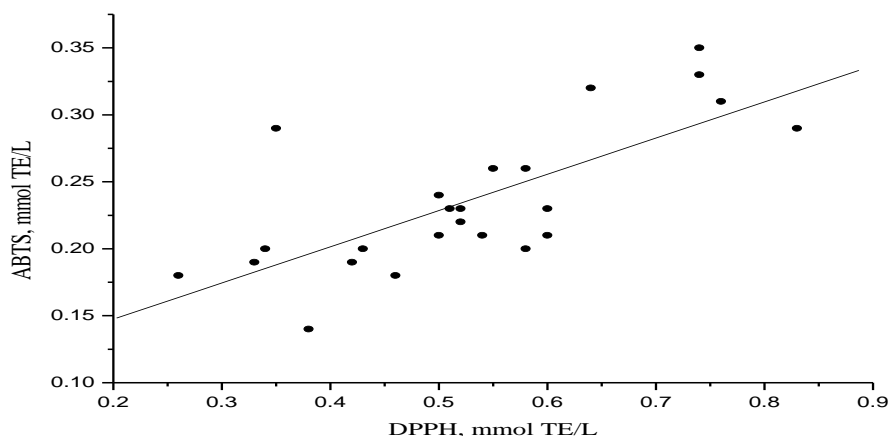
*Srednja vrednost ± SD (n = 3). Vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a-n) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju kada se koristi *t* test (p < 0,05).

Antioksidativna aktivnost svetlih, tamnih i bezalkoholnih piva, primenom DPPH metode, izražena kao mmolTE/L, iznosi 0,39-0,65, 0,35-0,83 i 0,26-0,34, respektivno (Tabela 4.39.). Najmanju antioksidativnu aktivnost imaju bezalkoholna piva, dok tamna piva imaju najveću. Pils Plus pokazuje najmanju, dok Tuborg ima najveću antioksidativnu aktivnost kod svetlih piva. Kod tamnih piva Guinness ima najmanju, a Nikšićko najveću antioksidativnu aktivnost. Od ispitanih bezalkoholnih piva Jelen Cool pokazuje nisku, dok Union pokazuje visoku antioksidativnu aktivnost. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili *Zhao i sar.* (2010) (0,24-0,70 mmolTE/L; od 24 uzoraka piva samo 4 imaju aktivnost veću od 0,70 mmolTE/L) i *Lugasi* (2003). Rezultati ukazuju da sirovine za proizvodnju piva i sam proces proizvodnje mogu imati značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost piva (*Vanbeneden i sar.*, 2008; *Krofta i sar.*, 2008).

Sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost rastu u sledećem nizu: bezalkoholna<svetla<tamna piva, tako da je sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost tamnih piva veća 1,5-2 puta u odnosu na bezalkoholna. *Vinson i sar.* (2003) i *Gorjanović i sar.* (2010) su takođe dobili veći sadržaj polifenola u tamnim pivima u odnosu na svetla i bezalkoholna.

Antioksidativna aktivnost svetlih, tamnih i bezalkoholnih piva, primenom ABTS metode, izražena kao mmolTE/L, iznosi 0,20-0,32, 0,26-0,35 i 0,18-0,20, respektivno (Tabela 4.39.). Antioksidativna aktivnost raste u sledećem nizu: bezalkoholna<svetla<tamna piva, što je u skladu sa rezultatima dobijenim DPPH metodom. Vrednosti dobijene ABTS metodom su niže od onih dobijenih DPPH metodom. Ovo zapažanje može biti rezultat različitih reakcija između fenolnih jedinjenja i ABTS i DPPH radikala (*Campos i sar.*, 1997). Ista zapažanja su potvrđena prilikom određivanja antioksidativne aktivnosti voća i povrća (*Pellegrini i sar.*, 2003; *Zhao i sar.*, 2008).

Na Slici 4.75 je prikazana korelacija između antioksidativnih aktivnosti dobijenih ABTS i DPPH metodom.

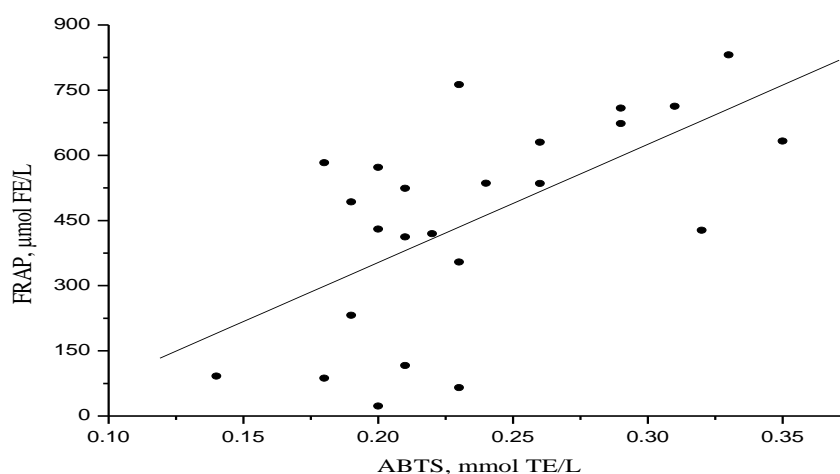


Slika 4.75. Korelacija između DPPH i ABTS antioksidativne aktivnosti ($r = 0,83$, $p < 0,0001$).

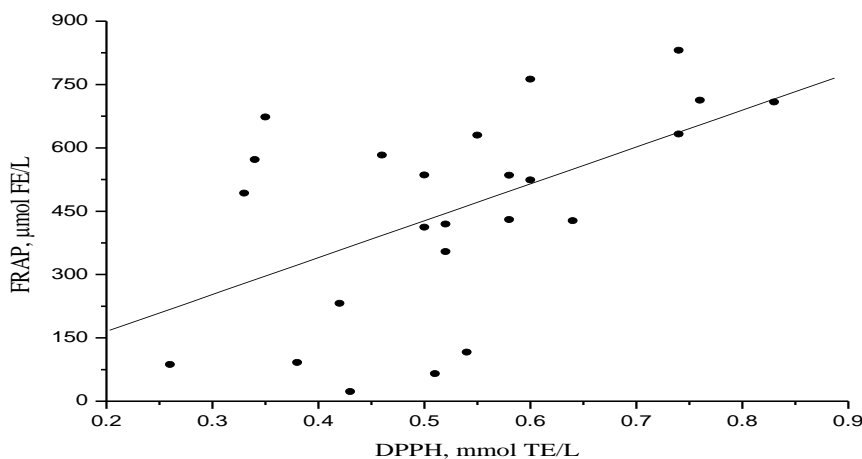
Postoji značajna korelacija između vrednosti dobijenih ovim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti.

Vrednosti dobijene određivanjem antioksidativne aktivnosti FRAP metodom su veće u odnosu na dobijene vrednosti prethodnim metodama (Tabela 4.39.). Slično DPPH i ABTS metodi, rezultati dobijeni FRAP metodom pokazuju značajne razlike u zavisnosti od tipa piva. Uzorci tamnih piva pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost, manju aktivnost pokazuju svetla, a najmanju bezalkoholna piva. Slične rezultate dobili su *Tafulo i sar.* (2010). Veće antioksidativne aktivnosti u uzorcima piva dobili su *Piazzon i sar.* (2010).

Takođe, korelacija između vrednosti dobijenih FRAP i ABTS (Slika 4.76.) i FRAP i DPPH metodom (Slika 4.77.) određena je linearno regresionom analizom.



Slika 4.76. Korelacija između FRAP i ABTS antioksidativne aktivnosti ($r = 0,62$, $p < 0,001$).



Slika 4.77. Korelacija između FRAP i DPPH antioksidativne aktivnosti ($r = 0,53$, $p < 0,007$).

Korelacije između FRAP i ABTS metode i FRAP i DPPH metode za određivanje antioksidativne aktivnosti su 0,62 ($p < 0,001$) i 0,53 ($p < 0,007$).

4.3.2. HPLC analiza piva

HPLC metoda se koristi za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Ona daje više informacija o sadržaju fenolnih jedinjenja, njihovih hemijskih karakteristika i antioksidativne aktivnosti.

4.3.2.1. Određivanje fenolnih i hidroksimetnih kiselina u pivu

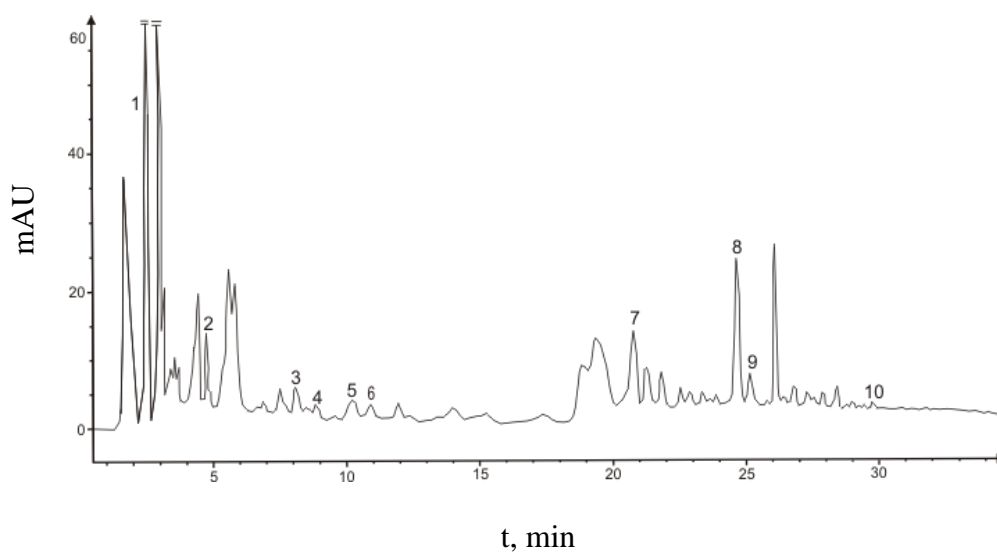
Deset fenolnih jedinjenja, uključujući galnu, protokatehinsku, 4-hidroksibenzoevu, 2,5-dihidroksibenzoevu, vanilinsku, kafenu, p-kumarnu, ferulnu, sinapinsku i salicilnu kiselinu, su identifikovana u ispitivanim uzorcima piva. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli 4.40.

Tabela 4.40. Sadržaj fenolnih i hidroksicimetnih kiselina u pivima^a.

Uzorak	Brend	Galna	Protokatehinska	4-hidroksibenzoeva	2,5-dihidroksibenzoeva	Vanilinska	Kafena	p-kumarna	Ferulna	Sinapinska	Salicilna
1	Carlsberg	1,93±0,07	1,35±0,09	0,11±0,01	0,18±0,02	0,28±0,03	0,14±0,03	0,62±0,07	1,78±0,09	0,38±0,06	0,036±0,005
2	Efes Draft	1,88±0,07	1,23±0,12	0,13±0,02	nd	0,25±0,04	0,12±0,02	0,46±0,05	1,62±0,07	0,32±0,05	0,032±0,004
3	Efes Pilsener	1,96±0,07	1,06±0,11	0,092±0,011	nd	0,31±0,05	0,15±0,03	0,68±0,07	1,81±0,09	0,31±0,05	0,038±0,005
4	Pils Plus	1,43±0,09	1,29±0,12	0,066±0,008	0,034±0,007	0,12±0,02	0,13±0,07	0,22±0,03	1,26±0,06	0,27±0,04	nd
5	Staropramen	1,95±0,07	2,04±0,06	0,11±0,02	0,046±0,008	0,28±0,03	0,21±0,04	0,28±0,03	2,16±0,11	0,29±0,05	0,044±0,006
6	Nikšićko	1,34±0,09	1,05±0,11	0,12±0,02	0,033±0,007	0,19±0,02	0,15±0,03	0,62±0,05	1,31±0,07	0,25±0,04	0,042±0,006
7	Lav	1,56±0,08	1,27±0,12	0,023±0,003	0,47±0,06	0,23±0,04	0,13±0,02	0,26±0,03	0,97±0,04	0,24±0,04	0,031±0,004
8	Lowenbrau	1,63±0,07	1,47±0,08	0,041±0,006	0,39±0,08	0,16±0,02	0,11±0,02	0,31±0,04	1,21±0,05	0,28±0,05	0,038±0,005
9	Beck's	1,51±0,08	1,49±0,07	0,021±0,003	0,43±0,05	0,31±0,05	0,14±0,03	0,23±0,02	1,23±0,05	0,20±0,03	0,044±0,006
10	Amstel	1,56±0,08	1,06±0,11	0,069±0,008	0,021±0,003	0,13±0,02	0,10±0,02	0,26±0,03	1,63±0,07	0,27±0,04	nd
11	Tuborg	1,35±0,09	1,48±0,09	0,079±0,009	0,047±0,008	0,17±0,02	0,11±0,02	0,21±0,03	1,65±0,07	0,21±0,03	0,032±0,004
12	Heineken	1,53±0,08	1,65±0,07	0,056±0,007	0,11±0,01	0,23±0,04	0,17±0,03	0,21±0,03	0,85±0,04	0,21±0,03	0,044±0,006
13	Stella Artios	1,51±0,08	1,41±0,09	0,036±0,004	0,35±0,05	0,16±0,02	0,12±0,02	0,18±0,02	1,53±0,06	0,29±0,05	0,049±0,006
14	Leffe	1,58±0,08	1,49±0,07	0,13±0,02	0,39±0,08	0,22±0,03	0,13±0,02	0,21±0,03	1,57±0,06	0,33±0,06	0,037±0,005
15	Jelen	1,41±0,09	1,51±0,07	0,093±0,012	0,041±0,008	0,17±0,02	0,16±0,03	0,26±0,04	1,39±0,07	0,29±0,05	0,029±0,004
16	Lav	1,61±0,08	1,38±0,12	0,051±0,005	0,59±0,06	0,31±0,04	0,19±0,03	0,21±0,03	1,59±0,06	0,28±0,05	0,052±0,007
17	Nikšićko	1,59±0,08	1,30±0,12	0,048±0,006	0,57±0,06	0,39±0,05	0,24±0,04	0,18±0,02	1,55±0,06	0,26±0,04	0,049±0,006
18	Laško	1,49±0,09	1,25±0,16	0,039±0,004	0,48±0,05	0,29±0,03	0,33±0,04	0,17±0,02	1,52±0,06	0,25±0,04	0,043±0,006
19	Weifert	1,55±0,08	1,31±0,12	0,045±0,006	0,51±0,05	0,32±0,04	0,46±0,05	0,23±0,03	1,57±0,06	0,27±0,04	0,047±0,006
20	Leffe	1,71±0,07	1,58±0,08	0,053±0,005	0,63±0,07	0,49±0,06	0,57±0,06	0,28±0,04	1,67±0,07	0,33±0,05	0,056±0,007
21	Guinness	1,68±0,07	1,43±0,09	0,052±0,006	0,54±0,06	0,44±0,05	0,51±0,06	0,37±0,05	1,62±0,07	0,28±0,05	0,053±0,007
22	Jelen Cool	1,13±0,14	1,04±0,12	0,097±0,011	0,024±0,003	0,06±0,01	0,07±0,01	0,11±0,01	1,03±0,07	0,13±0,02	0,019±0,003
23	Schlossgold	1,24±0,16	1,15±0,14	0,018±0,002	0,031±0,007	0,07±0,01	0,09±0,01	0,15±0,02	1,19±0,08	0,19±0,02	0,027±0,004
24	Union	1,19±0,13	1,07±0,12	0,014±0,002	0,029±0,003	0,06±0,01	0,08±0,01	0,14±0,02	1,11±0,07	0,15±0,02	0,023±0,003

^aSrednja vrednost ± SD (n=3); rezultati su izraženi kao mg/l; nd- nije detektovano

Na Slici 4.78. prikazan je hromatogram fenolnih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima piva.



Slika 4.78. HPLC hromatogram na 320 nm fenolnih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima piva: galna (1); protokatehinska (2); 4-hidroksibenzoeva (3); 2,5-dihidroksibenzoeva (4); vanilinska (5); kafena (6); p-kumarna (7); ferulna (8); sinapinska (9); salicilna (10).

U svim uzorcima piva najzastupljenije kiseline su galna, ferulna i protokatehinska, zatim p-kumarna, sinapinska, vanilinska, kafena, 2,5-dihidroksibenzoeva i 4-hidroksibenzoeva. Dobijeni rezultati se slažu sa podacima iz literature (Piazzon i sar., 2010; Zhao i sar., 2010; Nardini i Ghiselli, 2004; Floridi i sar., 2003; Bartolome i sar., 2000). Razlike u sadržaju ukupnih fenola dobijenih Folin-Ciocalteu i HPLC metodom su rezultat nespecifičnosti Folin-Ciocalteu metode.

Jaka korelacija između antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom i ukupnih fenola, kao i slaba korelacija između vrednosti određenih FRAP metodom i slobodnih fenolnih kiselina (Tabela 4.41.) pokazuju da estarske veze prisutnih fenolnih kiselina u pivu smanjuju antioksidativnu moć. Iz Tabele 4.41. se takođe može videti da kafena, vanilinska, sinapinska i ferulna kiselina najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti piva.

Tabela 4.41. Korelacija između antioksidativne aktivnosti (FRAP) i sadržaja slobodnih fenolnih i hidroksicimetnih kiselina i ukupnih fenola.

Kiseline	Korelacioni koeficijent	p
Galna	0,24	0,0261
Protokatehinska	0,25	0,0253
4-hidroksibenzoeva	0,008	0,9969
2,5-dihidroksibenzoeva	0,47	0,0204
Vanilinska	0,54	0,0071
Kafena	0,55	0,0049
p-kumarna	0,07	0,7388
Ferulna	0,42	0,0392
Sinapinska	0,49	0,0197
Salicilna	0,061	0,0341
Ukupni fenoli	0,78	<0,0001

4.3.3. ICP-OES analiza piva

ICP-OES metoda je korišćena za određivanje 17 elemenata (As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr i Zn) u 21 uzorku piva. Parametri ICP-OES metode su dati u eksperimentalnom delu, dok su karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata i karakteristike ispitivanih piva date u Tabelama 4.42. i 4.43.

Tabela 4.42. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata u uzorcima piva.

Element	λ (nm)	LOD ¹ (mg/L)	LOQ ² (mg/L)	Korelacini koeficijent
As	228,812	0,0828	0,2759	0,999946
B	208,959	0,5947	1,9824	0,997202
Ba	230,424	0,1832	0,6108	0,999733
Ca	422,673	0,0984	0,3279	0,999923
Cd	228,802	0,0828	0,2759	0,999946
Cr	267,716	0,0588	0,1960	0,999973
Cu	324,754	0,1181	0,3936	0,999889
Fe	259,940	0,3089	1,0298	0,999243
K	404,721	0,0203	0,0677	0,999999
Mg	285,213	0,0449	0,1496	0,999984
Mn	257,610	0,0362	0,1206	0,999999
Co	228,616	0,1279	0,4262	0,999879
Ni	341,476	0,1807	0,6023	0,999741
Pb	220,353	0,2191	0,7304	0,999619
Se	196,090	0,2970	0,9900	0,999300
Sr	421,552	0,8929	2,9766	0,993724
Zn	202,548	0,0779	0,2598	0,999952

¹LOD – granica detekcije, ²LOQ – granica kvantifikacije.

Tabela 4.43. Karakteristike komercijalnih piva.

Uzorak	Brend	Tip	Sadržaj alkohola (% _{v/v})	Sirovine	Zemlja porekla
1	Carlsberg	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
2	Efes Draft	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
3	Efes Pilsener	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
4	Pils Plus	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
5	Staropramen	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
6	Nikšičko	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
7	Lav	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
8	Lowenbrau	Svetlo	4,7	Slad, hmelj	Srbija
9	Beck's	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
10	Amstel	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
11	Tuborg	Svetlo	4,6	Slad, hmelj	Srbija
12	Heineken	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Holandija
13	Stella Artios	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Mađarska
14	Leffe	Svetlo	6,6	Slad, hmelj	Belgija
15	Jelen	Svetlo	5,0	Slad, hmelj	Srbija
16	Lav	Tamno	6,2	Slad, hmelj	Srbija
17	Nikšičko	Tamno	6,2	Slad, hmelj	Srbija
18	Laško	Tamno	5,9	Slad, hmelj	Slovenija
19	Jelen Cool	Bezalkoholno	0,0	Slad, hmelj	Srbija
20	Schlossgold	Bezalkoholno	0,0	Slad, hmelj	Austrija
21	Union	Bezalkoholno	0,0	Slad, hmelj	Slovenija

4.3.3.1. Sadržaj makro i mikroelemenata

Određivani elementi su svrstani u dve grupe. Prva grupa sadrži makroelemente koji su prisutni u svim pivima, kao što su K, Ca i Mg. Ovi metali su esencijalni za normalno odvijanje fizioloških funkcija u ljudskom organizmu. Vrednosti ovih elemenata u uzorcima piva dati su u Tabeli 4.44.

Tabela 4.44. Sadržaj makroelemenata (mg/L) u uzorcima piva.

Uzorak	Ca	K	Mg
1	6,90±0,03	11,04±0,02	3,2±0,1
2	32,67±0,05	101,90±0,04	48,9±0,1
3	29,20±0,05	84,45±0,07	49,1±0,1
4	29,10±0,01	82,125±0,007	49,1±0,1
5	28,07±0,05	78,77±0,08	49,2±0,3
6	29,7±0,2	85,52±0,07	49,0±0,3
7	31,27±0,06	91,47±0,08	49,1±0,4
8	32,85±0,01	98,60±0,08	48,9±0,6
9	30,45±0,06	91,1±0,2	49,1±0,1
10	30,5±0,1	89,7±0,2	49,1±0,3
11	33,30±0,03	104,1±0,1	48,8±0,1
12	29,12±0,07	81,8±0,1	48,9±0,2
13	27,90±0,06	78,47±0,04	49,1±0,2
14	28,60±0,08	1,880±0,001	49,1±0,2
15	27,85±0,03	72,73±0,02	49,1±0,5
16	30,50±0,01	91,57±0,06	49,1±0,6
17	15,64±0,07	39,20±0,09	49,1±0,3
18	31,20±0,02	90,82±0,09	49,1±0,4
19	24,48±0,07	61,20±0,04	47,9±0,3
20	27,9±0,1	76,8±0,2	49±1
21	26,0±0,1	68,02±0,03	46±2

Sadržaj makroelemenata se kreće u sledećem opsegu: K (1,88-104,1 mg/L), Ca (6,9-33,3 mg/L) i Mg (3,2-49,2 mg/L). Dobijene vrednosti su u skladu sa onim iz literature: K (135-1100 mg/L) (*Bellido-Milla i sar., 2000*), (124-648 mg/L) (*Alcazar i sar., 2002*) i (46,7-833 mg/L) (*Brigs i sar., 2004*); Ca (40-140 mg/L) (*Bellido-Milla i sar., 2000*), (42,2-68,8 mg/L) (*Alcazar i sar., 2002*) i (3,80-108 mg/L) (*Bellido-Milla i sar., 2000*); Mg (60-200 mg/L) (*Bellido-Milla i sar., 2000*), (55,5-265 mg/L) (*Alcazar i sar., 2002*), (23,7-266 mg/L) (*Brigs i sar., 2004*) i (42-110 mg/L) (*Pohl i Prusisz, 2004*). Visoke koncentracije K, Ca i Mg potiču iz sirovina za proizvodnju piva (hmelj, ječam i druge žitarice). Kvasac je takođe bogat izvor ovih metala kao i voda. Nekoliko autora (*Brigs i sar., 2004; Hardwick, 1995; Moll, 1995; Walker i sar., 1996; Chanrasena i sar., 1997; Goldammer, 1999; Baxter i Hughes, 2001*) je ispitalo efekat makro i mikroelemenata na kvalitet piva. Kalijum u koncentraciji iznad 10 mg/L ima laksativni efekat i daje slan ukus pivu. Preporučena koncentracija Ca u pivu je između 20 i 150 mg/L. Sadržaj Ca iznad 100 mg/L uzrokuje uklanjanje fosfata i neadekvatan rast kvasca. Preporučena gornja granica koncentracije Mg je 30 mg/L. Njegova visoka koncentracija doprinosi kiselom i gorkom ukusu piva.

Drugu grupu elemenata čine mikroelementi i elementi prisutni u tragovima. Neki od njih su esencijalni za ljudski organizam, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Sr, B i Ba. Neesencijalni elementi su Cr, Ni, Pb, Cd i Al, i mogu uticati na zagađenje životne sredine (*Carvalho i sar., 2005*). Ovi elementi se nazivaju toksični i njihove koncentracije date su u tabeli 4.45.

Tabela 4.45. Sadržaj mikroelemenata i elemenata u tragovima (mg/L) u uzorcima piva: a) B, Ba, Sr i Fe; b) Co, Cu, Mn, Se i Zn; c) Cr, Ni, Pb, Cd i As.

a)

Uzorak	B	Ba	Sr	Fe
1	0,250±0,004	0,0760±0,0001	0,372±0,001	0,435±0,002
2	1,792±0,001	0,1740±0,0003	3,91±0,01	0,598±0,004
3	1,285±0,005	0,1425±0,0002	6,755±0,009	0,912±0,007
4	1,271±0,009	0,1420±0,0005	6,23±0,02	0,720±0,002
5	2,344±0,009	0,1301±0,0003	5,338±0,007	0,558±0,001
6	1,414±0,002	0,1858±0,0002	3,94±0,02	0,874±0,006
7	1,361±0,005	0,5265±0,0007	4,043±0,009	0,670±0,001
8	2,186±0,004	0,1790±0,0001	5,86±0,02	0,381±0,001
9	1,287±0,006	0,1785±0,0001	3,69±0,02	1,204±0,006
10	0,921±0,001	0,1335±0,0004	2,93±0,02	0,485±0,002
11	1,797±0,004	0,2133±0,0006	3,728±0,009	0,495±0,001
12	0,498±0,002	0,1873±0,0001	2,98±0,01	0,826±0,001
13	0,928±0,005	0,1723±0,0006	2,89±0,01	1,352±0,002
14	1,132±0,004	0,1323±0,0005	4,74±0,01	1,111±0,002
15	2,128±0,007	0,1575±0,0002	4,603±0,009	2,678±0,001
16	1,384±0,001	0,1350±0,0003	4,21±0,01	0,629±0,001
17	0,572±0,003	0,0465±0,0003	1,118±0,004	1,163±0,006
18	1,217±0,002	0,1820±0,0005	3,615±0,003	0,728±0,002
19	0,441±0,002	0,4940±0,0021	2,918±0,007	1,553±0,006
20	0,963±0,003	0,1170±0,0004	2,94±0,02	2,350±0,005
21	0,787±0,005	0,0833±0,0001	2,38±0,02	0,551±0,004

b)

Uzorak	Co	Cu	Mn	Se	Zn
1	-	0,1993±0,0006	0,0193±0,0001	0,048±0,004	0,950±0,004
2	-	0,1993±0,0009	0,290±0,001	0,063±0,003	-
3	-	0,1008±0,0005	0,378±0,002	0,11±0,05	-
4	-	0,1718±0,0003	0,2965±0,0004	0,111±0,009	0,299±0,002
5	-	0,212±0,002	0,371±0,001	0,08±0,01	0,112±0,002
6	0,0215±0,0002	0,210±0,003	0,382±0,003	0,079±0,002	0,174±0,005
7	0,0048±0,0003	0,1968±0,0003	0,2758±0,0002	0,07±0,01	0,227±0,008
8	0,0503±0,0005	0,176±0,002	0,390±0,002	0,08±0,01	0,118±0,002
9	0,0013±0,0002	1,054±0,004	0,237±0,001	0,06±0,01	1,239±0,001
10	-	0,753±0,006	0,191±0,001	0,034±0,007	0,941±0,004
11	-	0,327±0,001	0,3165±0,0005	0,055±0,002	0,758±0,003
12	-	0,2785±0,0004	0,1670±0,0004	0,06±0,01	0,345±0,007
13	0,0033±0,0003	0,1533±0,0007	0,1353±0,0006	0,099±0,004	0,238±0,001
14	-	0,1880±0,0007	0,2280±0,0008	0,13±0,01	0,088±0,006
15	-	0,300±0,001	0,2495±0,0003	0,034±0,007	0,426±0,003
16	-	0,1233±0,0005	0,370±0,001	0,073±0,005	-
17	-	0,0773±0,0004	0,0753±0,0002	0,08±0,01	-
18	-	0,1775±0,0007	0,2643±0,0009	0,061±0,007	0,24±0,01
19	0,0051±0,0001	0,2733±0,0008	0,0618±0,0003	0,051±0,006	0,012±0,003
20	0,0032±0,0008	0,0935±0,0007	0,2195±0,0007	0,091±0,007	-
21	-	0,0525±0,0001	0,184±0,001	0,08±0,02	-

c)

Uzorak	Cr	Ni	Pb	Cd	As
1	0,013±0,001	0,009±0,003	0,062±0,002	0,0023±0,0001	0,0023±0,0001
2	0,025±0,002	0,025±0,006	0,004±0,001	0,0032±0,0001	0,0031±0,0001
3	0,0158±0,0007	0,003±0,004	0,002±0,002	0,0025±0,0002	0,0025±0,0002
4	0,0185±0,0002	0,022±0,004	0,002±0,004	0,0033±0,0001	0,0033±0,0001
5	0,0171±0,0009	0,018±0,002	0,0071±0,0004	0,0028±0,0003	0,0028±0,0003
6	0,037±0,001	0,018±0,003	0,0572±0,0008	0,0615±0,0002	0,0062±0,0002
7	0,0248±0,0007	0,008±0,004	0,006±0,001	0,0065±0,0004	0,0065±0,0004
8	0,026±0,001	0,001±0,005	0,005±0,003	0,0051±0,0001	0,0051±0,0001
9	0,026±0,001	0,059±0,003	0,006±0,003	0,0038±0,0003	0,0038±0,0003
10	0,026±0,001	0,014±0,001	0,0077±0,0006	0,0031±0,0002	0,0031±0,0002
11	0,024±0,001	0,006±0,006	0,014±0,003	0,0031±0,0001	0,0032±0,0001
12	0,0268±0,0005	0,012±0,006	0,022±0,002	0,0131±0,0002	0,0131±0,0002
13	0,0201±0,0003	0,002±0,005	0,0087±0,0006	0,0153±0,0001	0,0153±0,0001
14	0,0195±0,0008	0,023±0,004	0,004±0,006	0,0043±0,0004	0,0043±0,0004
15	0,019±0,001	0,011±0,004	0,0077±0,0006	0,0025±0,0001	0,0025±0,0001
16	0,0261±0,0006	0,002±0,009	0,006±0,003	0,0033±0,0001	0,0033±0,0001
17	0,014±0,002	0,012±0,002	0,006±0,002	0,0035±0,0003	0,0035±0,0003
18	0,0223±0,0005	0,019±0,004	0,007±0,002	0,0043±0,0003	0,0043±0,0003
19	0,0233±0,0004	0,016±0,004	0,008±0,003	0,0028±0,0003	0,0028±0,0003
20	0,031±0,001	0,027±0,005	0,0061±0,0004	0,0021±0,0004	0,0021±0,0004
21	0,020±0,002	-	0,004±0,001	0,0031±0,0003	0,0031±0,0003

Koncentracije mikroelemenata kao što su Sr, B i Ba variraju u opsegu od: 0,372 mg/L do 6,755 mg/L, od 0,25 mg/L do 2,344 mg/L, i od 0,0465 mg/L to 0,5265 mg/L. Vrednosti za Sr i Ba su slične ili veće u odnosu na vrednosti iz literature: 0,23-0,41 mg/L (*Alcazar i sar., 2002*), 0,14-0,30 mg/L (*Nascentes i sar., 2005*) i 0,020-0,032 mg/L (*Alcazar i sar., 2002*), 0,034-0,049 mg/L (*Vela i sar., 1998*). Metali kao što su Fe, Cu, Zn i Mn su esencijalni i imaju važnu ulogu u biološkom sistemu, dok neesencijalni metali kao što su Cr, Ni, Pb i Cd, su toksični čak i u tragovima.

Gvožđe je najzastupljenije od svih ispitivanih metala i neophodno je za normalno funkcionisanje određenih enzima u organizmu. Koncentracija gvožđa u uzorcima piva kreće se od 0,381 mg/L do 2,678 mg/L. Postoje značajne razlike u sadržaju gvožđa u okviru istog tipa a različitog brenda piva. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima: 0,044–1,20 mg/L (*Matshushige i Oliviera, 1993*), 0,059-0,545 mg/L (*Bellido-Milla i sar., 2000*), 0,045-0,530 mg/L (*Wyrzykowska i sar., 2001*), 0,057-1,065 mg/L (*Alcatraz i sar., 2002*) i 0,145-0,862 mg/L (*Bellido-Milla i sar., 2004*). Preporučena gornja granica u pivu je 0,1 mg/L. Visoka koncentracija gvožđa doprinosu neprijatnom ukusu i tamnoj boji piva (*Brigs i sar., 2004; Hardwick, 1995; Moll, 1995; Walker i sar., 1996; Chanrasena i sar., 1997; Goldammer, 1999; Baxter i Hughes, 2001*).

Koncentracija bakra u različitim brendovima piva varira od 0,0525 mg/L do 1,054 mg/L. Nivo bakra u ovom radu je veći od vrednosti iz literature: 0,019-0,068 mg/L (*Bellido-Milla i sar., 2000*), 0,029-0,150 mg/L (*Wyrzykowska i sar., 2001*), 0,072–0,098 mg/L (*Pohl i Sergiel, 2000*), 0,004–0,057 mg/L (*Asita i sar., 2011*). Preporučena gornja granica koncentracije bakra u pivu je 0,1 mg/L. Visoka koncentracija je toksična za kvasac i dovodi do zamućenja piva (*Brigs i sar., 2004; Hardwick, 1995; Moll, 1995; Walker i sar., 1996; Chanrasena i sar., 1997; Goldammer, 1999; Baxter i Hughes, 2001*).

Koncentracija mangana u ispitivanim pivima se kreće od 0,0193 mg/L do 0,390 mg/L. Vrednosti su unutar opsega vrednosti dobijenih od strane drugih autora: 0,044-0,197 mg/L (*Bellido-Milla i sar., 2000*), 0,053-0,470 mg/L (*Wyrzykowska i sar., 2001*), 0,033-0,304 mg/L (*Alcazar i sar., 2002*). Preporučena koncentracija u pivu je od 0,05 mg/L do 0,2 mg/L.

Od svih metala cink je najmanje toksičan, esencijalan element u ljudskoj ishrani i poboljšava imunitet organizma. Preporučena dnevna doza cinka za muškarce je 15 mg a za žene 12 mg (*ATSDR, 1994*). Koncentracija cinka u uzorcima piva je u opsegu od 0,012 mg/L do 1,239 mg/L. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su publikovali Bellido-Milla i sar. (0,020-0,457 mg/L) (*Bellido-Milla i sar., 2000*), Wyrzykowska i sar. (0,004-0,120 mg/L) (*Wyrzykowska i sar., 2001*), Alcazar i sar. (0,012-0,975 mg/L) (*Alcazar i sar., 2002*)

and Pohl (*Pohl, 2008*). Preporučena koncentracija u pivu je od 0,15 mg/L do 0,5 mg/L. Visoka koncentracija je štetna za kvasac i utiče na fermentaciju (*Brigs i sar., 2004; Hardwick, 1995; Moll, 1995; Walker i sar., 1996*).

Kobalt je detektovan u samo sedam uzoraka piva i njegove vrednosti se kreću od 0,0013 mg/L do 0,0503 mg/L. U literaturi koncentracija kobalta se kreće između 0,08 ng/mL i 0,57 ng/mL (*Wyrzykowska i sar., 2001*) i između 0,007 mg/L i 0,010 mg/L (*Iwegbue, 2010*).

U ovom radu koncentracija selena varira od 0,034 mg/L do 0,13 mg/L. Slično tome, Asita i sar. (*Asita i sar., 2011*) su dobili rezultate koji se kreću od 0,645 mg/L do 0,942 mg/L selena u južnoafričkim pivima.

Hrom je detektovan u svim uzorcima sa koncentracijom od 0,013 mg/L do 0,037 mg/L. Prema podacima Agency for Toxic Substances & Disease Registry (*ATSDR, 2004*) dozvoljena koncentracija hroma u hrani je 0,1 mg/L. Svi ispitivani uzorci sadrže koncentraciju hroma ispod preporučene vrednosti u hrani. Dobijeni rezultati se slažu sa onima koje su objavili Wyrzykowska i sar. (*Wyrzykowska i sar., 2001*) (3,8-45 ng/mL) u poljskim pivima, i niži od rezultata koje su objavili Matsushige i Oliveira (*Matsushige i Oliveira, 1993*) (0,43-0,84 µg/mL) u pivima iz Brazila.

Sadržaj kadmijuma u pivima varira od 0,0021 mg/L do 0,0615 mg/L. ATSDR (*ATSDR, 2004*) preporučuje dozu od 0,005 mg/L u hrani. Koncentracija kadmijuma je ispod dozvoljene granice, osim u uzorcima 6, 12 i 13. Asita i sar. (*Asita i sar., 2011*) su publikovali sadržaj kadmijuma u južnoafričkim pivima koji varira od 0,032 do 0,035 mg/L. U brazilskim pivima sadržaj kadmijuma je manji od 0,014 mg/L (*Soares i Morales, 2003*). Sadržaj kadmijuma u ispitivanim pivima je veći od sadržaja u nigerijskim (0,001-0,01 mg/L) (*Iwegbue, 2010*) i poljskim pivima (0,02-0,53 ng/mL) (*Wyrzykowska i sar., 2001*).

Koncentracija nikla se kreće u rasponu od 0,001 do 0,059 mg/L. Prema WHO (*WHO, 2003*) maksimalna dozvoljena koncentracija nikla u pijaćoj vodi je 0,05 mg/L a u alkoholnim pićima 0,3 mg/kg. Koncentracija nikla u pivima je ispod maksimalno dozvoljene koncentracije koju propisuje WHO (*WHO, 2003*). Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa onima dobijenim od strane Wyrzykowska i sar. (*Wyrzykowska i sar., 2001*) (0,003–0,045 mg/L) i Asita i sar. (*Asita i sar., 2011*) (0,004–0,031 mg/L).

Najveći sadržaj olova je zapažen u uzorku 1 (0,062 mg/L) i 6 (0,0572 mg/L). U drugim uzorcima piva koncentracija olova je ispod dozvoljene granice u alkoholnim pićima (0,5 mg/L) (*WHO, 2003*). Španska piva sadrže koncentraciju olova koja se kreće od 0,003 do 0,015 mg/L (*Biurrun i sar., 1991*), dok u brazilskim pivima koncentracija se kreće od 0,013 do 0,052 mg/L (*Matsushige i Oliveira, 1993*).

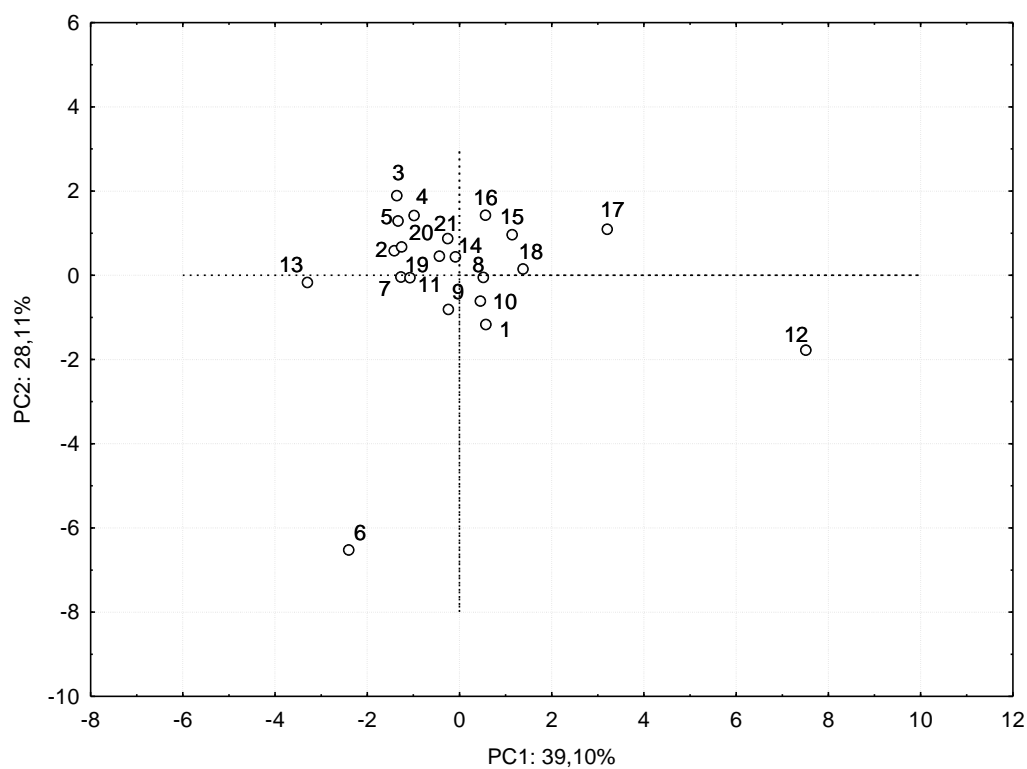
Koncentracije arsena su u rasponu od 0,0021 mg/L do 0,0153 mg/L. United States Environmental Protection Agency (*US EPA, 2009*) propisuje koncentraciju arsena u vodi za piće od 0,010 mg/L. Koncentracija arsena u ispitivanim pivima je ispod dozvoljene granice u pijaćoj vodi osim u uzorcima 12 i 13. Dobijeni rezultati su slični onima koje su publikovali Wyrzykowska i sar. (*Wyrzykowska i sar., 2001*) (0,0022–0,013 mg/L). Neorganska jedinjenja arsena su dominantne forme u vodi za piće (*ATSDR, 2007*).

4.3.3.2. PCA analiza

U cilju diferencijacije ispitivanih uzoraka piva na osnovu sadržaja metala, analiza glavnih komponentata (PCA) je korišćena. Za ovu analizu, formirana je matrica podataka dimenzije 17×21, sa analiziranim elementima u kolonama (17) i uzorcima piva u redovima (21). Broj optimalnih faktora koji je korišćen u analizi izabran je na osnovu kriterijuma tačke preloma na Cattelovom scree testu. Na osnovu ovog testa, kriterijum za određivanje broja faktora predstavlja tačka u kojoj karakteristične vrednosti formiraju silazni trend, tzv. tačku preloma. Karakteristične vrednosti su varijanse glavnih komponentata. Dve glavne komponente (PC) su ekstrahovane prema Kaiser-ovom (*Kaiser, 1960*) kriterijumu (*Jackson, 1991*). Pomoću prve komponente (PC1) je objašnjeno 39,10%, a pomoću druge komponente (PC2) 28,11% disperzije merenja (Tabela 4.46.). Dijagram rasipanja prikazan na Slici 4.79. uzima u obzir prva dva faktora koji objašnjavaju zajedno 67,21% disperzije merenja.

Tabela 4.46. Faktori zasićenja varijabli.

Varijabla	PC1	PC2
B	0,7382	0,1301
Ba	0,2287	-0,0916
Ca	0,9196	0,0686
K	0,7469	-0,0821
Mg	0,7871	0,2249
Sr	0,7919	0,2759
Co	0,4198	-0,3733
Cu	0,0237	-0,2094
Fe	0,0473	0,1224
Mn	0,8730	-0,0211
Se	0,2033	0,2678
Zn	-0,3121	-0,2891
Cr	0,5515	-0,6222
Ni	0,0378	-0,1115
Pb	-0,4318	-0,8154
Cd	0,2519	-0,8651
As	0,2519	-0,8651



Slika 4.79. Dijagram rasipanja.

Sa slike se može videti da se uzorci tamnih piva (16, 17 i 18) nalaze na desnoj strani biplota, dok se uzorci bezalkoholnih piva (19, 20 i 21) nalaze na levoj strani. Uzorci svetlih piva (1-15) se nalaze između ove dve grupe.

Takođe, iz Tabele 4.46. se može videti da prvu komponentu opisuje većina varijabli i to sa pozitivnim faktorskim zasićenjem, sem Zn i Pb koji imaju negativno faktorsko zasićenje. B, K, Mg i Mn su sa najvećim faktorskim zasićenjem ($> 0,7$) i samim tim su i najdominantnije varijable. Imaju veoma bliske vrednosti faktorskih zasićenja i mogu pružiti istu vrstu informacija u pogledu klasifikovanja ispitivanih uzoraka piva. Fe, Cu i Ni imaju i najmanja zasićenja u odnosu na obe komponente i samim tim imaju mali uticaj u diferencijaciji uzoraka. Cd, Pb i Cr imaju najveća negativna zasićenja ($> -0,8$) sa veoma bliskim vrednostima i oni opisuju drugu komponentu. To može biti pokazatelj zajedničkog porekla ovih elemenata u uzorcima piva. Na osnovu svega gore navedenog, dobijena faktorska opterećenja mogu biti rezultat superpozicije dva glavna izvora porekla metala u pivu. Prva komponenta (PC1) je povezana sa sirovinama koje se koriste za proizvodnju piva, dok druga komponenta (PC2) može biti povezana sa eventualnom kontaminacijom tokom procesa proizvodnje i skladištenja piva (Ivegbue, 2010). Takođe, među ispitivanim elementima, Mg, Mn i K mogu da posluže kao najvažnije varijable u cilju diferencijacije i klasifikacije piva prema vrsti i poreklu. Takođe, mogu da budu i diferencijalni faktor sirovina koje se koriste u proizvodnji piva (Alcazar i sar., 2002).

5. IZVOD

Na osnovu rezultata određivanja optimalnih uslova ekstrakcije kao i rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma i hmelja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Kao rastvarač za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz mineralnih materija iz ječma i hmelja korišćeni su vodeni rastvori etanola koncentracija 20, 30, 50, 70 i 90% sa hlorovodoničnom kiselinom koncentracija 0, 0,1, 1,0 i 5,0%, pri odnosu rastvarač – biljna sirovina 15, 20, 25 i 30 v/m. Ekstrakcija je vršena na tri temperature: 25, 35 i 45°C i sa različitim vremenima: 20, 40, 80 i 120 min. Optimalni uslovi ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ječma su: 30% etanol, 5% HCl, 30 v/m i 120 min, dok su za ekstrakciju antioksidanata ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina iz hmelja: 30% etanol, 30 v/m i 120 min.
- Od 20 određivanih metala u ekstraktima ječma za K, Na, Ca, Mg, Zn, Cr, Si, V, Pb, Al i Sr optimalni uslovi ekstrakcije su: 30% etanol, 5% HCl, 30 v/m i 120 min, dok je za Fe, Se, As, Li i Ba dovoljno 80 min. Svi ekstrahovani metali spadaju u visoko (>55%) i srednje (20-55%) ekstraktibilne metale, sa izuzetkom Li koji spada u slabo ekstraktibilne (sa koeficijentom ekstrakcije 11,70%).
- Od 15 određivanih metala u ekstraktima hmelja optimalni uslovi ekstrakcije su: 30% etanol, solvomodul 30 v/m, pri čemu je za K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Si, V i Sr potrebno 120 min, dok je za ekstrakciju Zn, Cr, Pb i Al potrebno 80 min. Svi metali spadaju u visoko i srednje ekstraktibilne.
- Čvrsto – tečna ekstrakcija odigrava se u dve faze: ispiranje (brza ekstrakcija) i difuzija (spora ekstrakcija). U početnoj fazi ispiranja, ekstrakcione supstance koje se nalaze u razorenim ćelijama na površini čestica biljne sirovine brzo se rastvaraju u ekstragensu. U kasnijoj fazi difuzije, ekstraktivne supstance difunduju iz unutrašnjosti čestica biljne sirovine prema glavnini rastvora. Kako koncentracija ekstraktivnih supstanci sporo raste sa vremenom, u ovoj kasnijoj fazi postize se najveća koncentracija ekstraktibilnih supstanci.
- Za modelovanje kinetike ekstrakcijefenolnih jedinjenja korišćena su dva modela: model zasnovan na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal i empirijski model Ponomarjeva. Oba modela se dobro slažu sa eksperimentalnim podacima u periodu spore ekstrakcije. Kinetički parametri fizičkih modela su koeficijent ispiranja i koeficijent spore ekstrakcije. Vrednosti kinetičkih parametara zavise od primenjenog modela kinetike, porekla biljne sirovine i oprativnih uslova. Koeficijenti ispiranja

prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije imaju generalno veće vrednosti od koeficijenata ispiranja izračunatih prema empirijskom modelu Ponomarjeva. Ovo odstupanje je najizraženije kod ekstrakcije ukupnih flavonola iz hmelja. Veće vrednosti koeficijenata spore ekstrakcije određene su u slučaju ekstrakcije komponenata iz hmelja.

- Termodinamički parametri procesa ekstrakcije (E_a , ΔH^* , ΔS^* , ΔG^* , ΔH° , ΔS° , ΔG°) ukazuju da je proces ekstrakcije endoterman i spontan.

Na osnovu rezultata ispitivanja hemijskih i antioksidativnih svojstava ekstrakata 10 uzoraka ječma, 8 uzoraka hmelja i 24 uzoraka piva primenom spektrofotometrijskih metoda, HPLC-DAD metode i ICP emisione spektrometrije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Sadržaj ukupnih fenola kretao se od 1,26-1,47 mg GAE/g ječma; 9,54-13,33 mg GAE/g hmelja i 328,22-542,32 mg GAE/L piva.
- Sadržaj ukupnih flavonoida kretao se od 0,465-0,664 mg CE/g ječma; 3,57-5,54 mg CE/g hmelja i 107,57-208,00 mg CE/L piva.
- Veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazali su ekstrakti hmelja (32,25-37,52 $\mu\text{mol TE/g}$) od ekstrakata ječma (8,32-9,10 $\mu\text{mol TE/g}$). Najmanju sposobnost neutralizacije DPPH radikala imaju bezalkoholna piva (0,25-0,34 $\mu\text{mol TE/L}$), zatim svetla (0,39-0,65 $\mu\text{mol TE/L}$), dok tamna piva neutrališu DPPH radikale u najvećoj meri (0,35-0,83 $\mu\text{mol TE/L}$).
- Veću sposobnost neutralizacije ABTS katjon radikala pokazali su etanolni ekstrakti hmelja (41,67-46,85 $\mu\text{mol TE/g}$) u odnosu na ekstrakte ječma (6,52-9,57 $\mu\text{mol TE/g}$). Antioksidativne aktivnosti tamnih, svetlih i bezalkoholnih piva primenom ABTS metode, izražene kao $\mu\text{mol TE/L}$, iznose: 0,26-0,35; 0,20-0,32 i 0,18-0,20.
- Svi ekstrakti i uzorci piva su pokazali visok redukcionni potencijal određen FRAP metodom: 5,66-14,88 $\mu\text{mol Fe/g}$ ječma, 30,50-75,48 $\mu\text{mol Fe/g}$ hmelja i 22,99-831,20 $\mu\text{mol Fe/L}$ piva. (proveri)
- U etanolnim ekstraktima hmelja je identifikovano i kvantifikovano: sedam flavonola (kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, kemferol-3-rutinozid, kemferol-3-glukozid, kvercetin-glikozid i kemferol-glikozid), jedna benzoeva, 4-hidroksibenzoeva i tri hidroksicimetne kiseline

(hlorogenska, p-kumarna i ferulna) i četiri flavan-3-ola (procijanidin B1, katehin, procijanidin B2 i epikatehin).

- Deset fenolnih jedinjenja, uključujući galnu, protokatehinsku, 4-hidroksibenzoevu, 2,5-dihidroksibenzoevu, vanilinsku, kafenu, p-kumarnu, ferulnu, sinapinsku i salicilnu kiselinu, su identifikovana i kvantifikovana u 24 uzoraka piva.
- ICP-OES metodom određen je sadržaj 24 elementa u 10 različitih uzoraka ječma, 24 elementa u 8 različitih uzoraka hmelja i 19 elementa u 21 uzorku piva.
- Dobijeni rezultati ICP-OES određivanja su diskutovani u kontekstu poređenja sa literaturnim podacima, dobijenih od strane drugih istraživača na istim tipovima uzoraka; prema dnevnim potrebama organizma kao istim odnosno preporučenim dozama od strane evropskih i svetskih zdravstvenih organizacija; kao i sa aspekta toksičnosti pojedinih metala.
- Radi bolje ilustracije rezultata urađena je korelaciona i PCA analiza.
- Analiza ječma i hmelja proizvedenih u Srbiji, a takođe i piva koja ih koriste kao sirovine u procesu proizvodnje pokazala je da su ove namirnice bogat izvor jedinjenja iz klase fenola i da pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost. Rezultati određivanja mineralnih materija su korisni u smislu pozitivne preporuke ječma, hmelja i piva kao izvora nutrijenata u svakodnevnoj ljudskoj ishrani (u ograničenim količinama zbog prisustva alkohola).

6. SUMMARY

Analyses of the optimal conditions for extraction of phenolic compounds from barley and hops produced in Serbia together with examination of the extraction kinetics yielded the following results:

- As solvent for the extraction of phenolic compounds from the mineral substances from hops and barley using an aqueous solution of ethanol concentration of 20, 30, 50, 70 and 90% hydrochloric acid with a concentration of 0, 0.1, 1.0 and 5.0%, with compared to solvent – plant raw materials 15, 20, 25 and 30 V/m. The extraction is carried out at three temperatures: 25, 35 and 45°C and with different times: 20, 40, 80 and 120 min. The optimum conditions of extraction of phenolic compounds from barley were 30% ethanol, 5% HCl, 30 v/m and 120 min, while the extraction of antioxidants total phenol, total flavonoids and total phenolic acids from hops: 30% ethanol, 30 v/m and 120 min.

- For the 20 metals measured in extracts of barley for K, Na, Ca, Mg, Zn, Cr, Si, In, Pb, Al and Sr optimal condition of extraction are: 30% ethanol, 5% HCl, 30 v/m and 120 min, while for Fe, Se, As, Li and Ba enough 80 min. Most analyzed metals proved highly (>55%) extractable or medium (20-55%) with only a few being weakly extractable (with a coefficient of 11,70% extraction).

- For the 15 metals measured in extracts of hops optimal extraction conditions were: 30% ethanol, solvomodul 30 V/m. Extracting K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Si, V, Sr required 120 min, whereas the extraction of Zn, Cr, Pb and Al takes 80 min. All metals are in high and medium-extractable.

- Solid-liquid extraction takes place in two phases: rinse (fast extraction) and diffusion (slow extraction). In the initial stage of leaching, extraction substances found in the destroyed cells in surface of particles of plant material is rapidly dissolved in the extraction agent. At a later stage of diffusion, extractive substances diffuse from the interior of the particles plant material to the main part of the solution. Since the concentration of extractive substances slowly increases with time; the largest concentration of extractable substances is found at later extraction stages.

- For modeling the kinetic fenolic compounds two models were used: the model based on the theory of non-stationary diffusion through solids material and the empirical model of Ponomarev. Both models are in good agreement with the experimental data for the period of slow extraction. Kinetic parameters of the physical model are the coefficient of leaching and the slow extraction coefficient. The precise values of the kinetic parameters depended on the applied kinetics model, the origin of plant material and experimental conditions. Coefficients

were generally higher for the model based on the theory of non-stationary diffusion than for the empirical model of Ponomarev. The difference between models was stronger for the extraction of total flavonols from hops. Higher values of slow extraction coefficients were determined in the case of extraction of components from the hops.

- Thermodynamic parameters of the extraction process (E_a , ΔH^* , ΔS^* , ΔG^* , ΔH° , ΔS° , ΔG°) indicate that the extraction process exotherm and spontaneous.

Investigating of chemical and antioxidant properties of extracts of 10 samples of barley, 8 samples of hop and 24 samples of beer by using spectroscopic methods, HPLC-DAD method and ICP emission spectrometry, yielded the following results:

- The content of total phenols ranged from 1.26 to 1.47 mg GAE/g for barley; 9.54 to 13.33 mg GAE /g for hop and 328.22 to 542.32 mg GAE /L for beer.

- The content of total flavonoids ranged from 0.465 to 0.664 mg CE/g for barley; 3.57 to 5.54 mg CE/g for hop and 107.57 to 208.00 mg CE/L for beer.

- The buffering capacity of DPPH radicals was higher for extracts of hop (32.25 to 37.52 micromol TE/g) relative to barley (8.32 to 9.10 micromol TE/g). The lowest buffering capacity of DPPH radicals had non-alcoholic beer (from 0.25 to 0.34 micromol TE /L), followed by the light beer (from 0.39 to 0.65 micromol TE/L), while dark beer had the highest capacity (0.35 to 0, 83 micromol TE/L).

- Ethanol extracts of the hop (from 41.67 to 46.85 micromol/g TE) showed greater ability to neutralize ABTS cation radicals relative to extracts of barley (6.52 to 9.57 micromol/g TE). Antioxidant activity of dark, light and soft beer using the ABTS method, expressed as micromol TE/L were as follows: 0.26 to 0.35; 0.20-0.32 and 0.18-0.20.

- All extracts and beer samples showed a high reduction potential as determined by the FRAP method: 5.66 to 14.88 micromol Fe/g barley, hops from 30.50 to 75.48 micromol Fe/g and 22.99 to 831.20 micromol Fe/L beer.

- Analyses of ethanolic extracts of hop found seven flavonols (quercetin-3-galactoside, quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-glucoside, kaempferol-3-rutinoside, kaempferol-3-glucoside, quercetin-glycoside and kaempferol-glycoside), one benzoic, 4-hydroxybenzoic and three hydroxycinnamic acid (chlorogenic, p-coumaric and ferulic) and four flavan-3-ol (procyanidins B1, catechin, epicatechin and procyanidin B2).

- Ten of phenolic compounds, including gallic, protocatechin, 4-hydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic, vanillic, caffeic, p-coumaric, ferulic, sinapic and salicylic acid, were identified and quantified in the beer samples.

- ICP-OES method was employed to determined 24 elements in 10 different samples of barley, 24 elements in 8 different samples of hop and 19 elements in 21 samples of beer.

- The results of ICP-OES estimates were discussed in the context of comparison with literature data obtained by other researchers in the same types of samples; the daily need organism to the same or recommended doses by the European and world health organizations; in terms of the toxicity of certain metals.

- The correlation and PCA analysis were performed for better illustration of the results.

- In summary, the results of the present study showed that the barley and hop produced in Serbia, as well as beer produced out of these plants, are a rich source of phenolic compounds and show a high antioxidant activity. These results indicate that barley, hop and beer may serve as a source of nutrients in the daily human diet (in limited quantities due to the presence of alcohol).

7. LITERATURA

- Acworth I. N., *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, (2003).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Division of Toxicology, US Public Health Service, US Department of Health and Human Services, Atlanta, (2004).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for zinc and cobalt. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 205-88-0608 (1994).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Arsenic (Update), US Public Health Service, US Department of Health and Human Services, Atlanta, (2007).
- Alcazar A., Pablos F., Martin M.J., Gonzales A.G., Multivariate characterization of beers according to their mineral content. *Talanta*, 57 (2002) 45-51.
- Alekseeva M.A., Eller K.I., Arzamastsev A.P., Determining polyphenolic components of common hop by reversed-phase HPLC. *Pharm. Chem. J.*, 38 (2004) 687-689.
- Alonso-Salces R.M., Korta E., Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *J. Chromatogr. A*, 933 (2001) 37-43.
- Amarante R.C.A., Oliveira P.M., Schwantes F.K., Moron-Villarreyes J.A., Oil extraction from castor cake using ethanol: Kinetics and thermodynamics. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53 (2014) 6824-6829.
- Antić-Jovanović A., *Atomska spektroskopija, spektrohemijski aspekti*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, (2006).
- Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A., Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol.*, 42 (1) (2004) 45–49.
- Asita A., Tanor E.B., Magama S., Khoabane N.M., Assessment of sorghum beer for alcohol and metal ions content and genotoxicity in mice bone marrow. *J Toxicol Env Health*, 3 (2011) 317-323.
- Bamforth C.W., Nutrition aspect of beer: a review. *Nutr. Res.*, 22(1-2) (2002) 227-237.
- Bartolome B., Pena-Neira A., Gomez-Cordoves C., Phenolics and related substances in alcohol-free beers. *Eur. Food Res. Technol.*, 210(6) (2000) 419-423.
- Baxter E.D., Hughes P.S., *Beer: quality, safety and nutritional aspects*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2001).

- Bellido-Milla D., Moreno-Pereze, Hernandez-Artiga M.P., Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves. *Spectrochim Acta B*, 55 (2000) 855-862.
- Bellido-Milla D., Onate Jean A., Palacios-Santander J.M., D. Palacio-Tejero D., Hernandez-Artiga M.P., Beer digestion for metal determination by atomic strometry abd residual organic matter. *Microchim Acta*, 144 (2004) 183-190.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299 (1999) 15–27.
- Bimark M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M., Comparision of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod. Process.*, 89 (2011) 67-72.
- Biurru M.C.Y., Dopazo M.C.G., Barrera M.P.B., Barrea A.B., Determination de plomo en cerveza por espectrometria de absorpcion atomic con atomizacion electrometrica. *Alimentaria*, 223 (1991) 59-65.
- Bonoli M., Verado V., Marconi E., Caboni M.F., Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction method of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 52(16) (2004) 5195-5200.
- Borowska E. J., Mazur B., Kopciuch R., Buszewski B., Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fraction and Antioxidant Properties of Clanberry Cultivars, *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (2009) 56-61.
- Brand-Williams W, Cuvelier M. E, Berset C., Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 28 (1995) 25-30.
- Brigs D.E., Boulton C.A., Brokes P.A., Stevens R., *Brewing science and practice*. Cambridge, UK, Woodhead (2004).
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M., Velić, D., Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.*, 81 (2007) 236-240.
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Jokić S., Mujić I., Bilić M., Velić D., Effect of extraction conditions of the extractibility of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61 (2011) 195-199.

- Buday A.Z., Denis G., Isolation of stimulants of gastrointestinal motility in beer Brewers' Digest, 49 (1974) 56-58.
- Bush A.I., Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 23 (2002) 1031-1038.
- Callemien D., Jerković V., Rozenberg R., Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 424-429.
- Campos A.M., Lissi E.A., Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cation and phenols. Int. J. Chem. Kinet., 29(3) (1997) 219-224.
- Carvalho M.L., Santiago S., Nunes M.L., Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. Anal Bioanal Chem, 382 (2005) 426-433.
- Čeković Ž., Jedan vek hemije slobodnih radikala 1900 - 2000, Hemijski pregled 41 (2000) 4-12.
- Chanrasena G., Walker G.M., Staines H.J., Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations. J Am Soc Brew Chem, 55 (1997) 24-30.
- Cheng Q.I.U., Yao-bin Y.U., Xue-lian W.U., Analysis of trace elements in hullless barley by ICP-OES. J. Agric. Sci. Technol., 14(3) (2012) 94-100.
- Cobo-Fernandez M.G., Palacios M.A., Chakraborti D., Quievauuiller P., Camara C., On line speciation of Se(VI), Se (IV) and trimethylselenium by HPLC-microwave oven-hydride generation – atomic absorption spectrometry. Fresen J Anal Chem, 351 (1995) 438-441.
- Costa M., Potential hazards of hexavalent chromate in our drinking water. Toxicol Appl Pharm, 188 (2003) 1-6.
- Cotelle N., Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem., 1 (2001) 569-590.
- Coulson J. M., Richardson J. F., Backhursts J. R., Harker J.H., Chemical engineering, Vol. 2, 2th ed.: Particle technology and separation processes, Pergamon Press, Oxford, (1991).
- Dančić V., Vitaminologija, sve o vitaminima i mineralima, Tarifa, Beograd, (2012).
- Davalos A., Gomez-Cordoves C., Bartolome B., Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. J. Agric. Food Chem., 51(9) (2003) 2512-2519.
- Debski B., Gralak M., Komosa Ryzova – charakterystyka i wartosc dietetyczna. Zywienie Czlowieka i Metabolizm, 28(4) (2001) 360-369.

- Diaconu D., Diaconu R., Narotescu T., Estimation of heavy metals in medicinal plants and their extracts. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 23 (2012) 115-120.
- Diankov S., Karsheva M., Hinkov I., Extraction of natural antioxidants from lemon peels. Kinetics and antioxidant capacity. *Journal of the University of Chemical Technology*, 46(3) (2011) 315-319.
- Durling N. E., Catchpole O. J., Grez J. B., Webby R. F., Mitchell K. A., Foo L. Y., Perrz N. B. Extraction of phenols and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chem*, 101 (2007) 1417-1424.
- Fernandez-Caceres P.L., Martin M.J., Pablos F., Gustavo Gonzalez A., Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 4775-4779.
- Floridi S., Montanari L., Marconi O., Fantozzi P., Determination of free and phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. *J. Agric. Food Chem.*, 51(6) (2003) 1548-1554.
- Fuhrman B., Volkova N., Suraski A., Aviram M., White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 3164-3168.
- Galvin C., *Theze de dostorat Enologie-Ampelologie*, Universite de Bordeaux II, (1993).
- Gastineau D.E., Darby W., Turner T.B., *Fermented food beverages in nutrition*, Academic Press, New Yourk, (1979) 537-542.
- Goldammer T., *The brewer's handbook*. Clifton (VA), Apex KUP Publ (1999).
- Gorjanovic S., Novakovic M., Potkonjak N., Leskosek-Cukalovic I., Suznjevic D., Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *J. Agric. Food Chem.*, 58(2) (2010) 744-751.
- Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amiot M.J., Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 79 (1999) 1625-1634.
- Guido L.F., Curto A.F., Boivin P., Benismail N., Goncalves C.R., Barros A.A., Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55(3) (2007) 728-733.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine* (2nd edn) Clarendon Press, Oxford, (1989).

- Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Res. Com.*, 9 (1990) 1-32.
- Hardwick W.A., In: Hardwick WA (ed) *The properties of beer. Handbook of brewing.* Marcel Dekker, New York (1995).
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13 (2002) 572-584.
- Hendriks H.F., *EBC Proceedings of the 19th Congress, (1999) Cannes, in press.*
- <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>.
- <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-piva>
- Iacopini P., Baldi M., Starchi P., Sebastiani L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *J. Food Compos. Anal.*, 21 (2008) 589-598.
- Institute of Medicine, *Dietry reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc, National Academy of Science, (2001).*
- Institute of Medicine, *Dietry reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids National Academy of Science, (2000).*
- Institute of Medicine, *Dietry reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulphate, National Academy of Science, (2004).*
- Iwegbue C.M.A., *Composition and daily intakes of some trace metals from canned beers in Nigeria. J I Brewing, 116 (2010) 312-317.*
- Jackson J.E., *A User's Guide to Principal Components.* John Wiley & Sons, New York (1991).
- Jaređić M., Vučetić J.I., *Mikroelementi u biološkom materijalu, Studentski trg, Beograd (1997).*
- Jia Z., Tang T., Wu J., *The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals, Food Chem., 64 (1999) 555-562.*
- Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., *Antioxidant Activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 3954-3962.*
- Kaiser H.F., *The application of electronic computers to factor analysis. Educ Psychol Meas, 20 (1960) 141-149.*

- Kara D., Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chem.*, 114 (2009) 347- 354.
- Karadas C., Kara D., Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. *Food Chem.*, 130 (2012) 196-202.
- Katalinić V., Mošina S. S., Sktroza D., Generalić I., Polyphenolic profile antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extract of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia), *Food Chem.*, 119 (2010) 715-723.
- Kellner V., Jurkova M., Čulík J., Horak T., Čejka P., Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. *Brew. Sci.*, (2007) 32-37.
- Kirka A., Arslan E., Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 43 (2008) 2038-2046.
- Kosar M., Dorman H.J.D., Hiltunen R. Effect on an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. *Food Chem.*, 91 (2005) 525-533.
- Kovačova J., Lebotay J., Urgeova E., Mocak J., Čížmorik J., Determination of selected flavonoids in hop extract by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 34(5) (2011) 329-340.
- Kranl K., Schlesier K., Bitsch R., Hermann H., Rohe M., Böhm V., Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays, *Food Chem.*, 93 (2005) 171–175.
- Krofta K., Mikyska A., Haskova D., Antioxidant characteristics of hops and hop products. *J. Int. Brew.*, 114(2) (2008) 160-166.
- Lachman J, Šulc M, Schilla M., Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine – making process, *Food Chem.*, 103 (2007) 802-807.
- Lepojević T., Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (2000).
- Leposavić G., Patološka fiziologija, Farmaceutski fakultet, Beograd, (2008).
- Lermusieau G., Liegeois C., Collin S., Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chem.*, 72 (2001) 413- 418.
- Leskosck-Cukalovic, 1.:4. savetovanje Industrije alkoholnih i bezalkoholnih pica i sirceta, Vrnjacka banja, Zbornik radova, (1998) 49-56.
- Libran C.M., Mayor L., Garcia-Castello E.M., Vidol-Brotous D., Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effects. *Agric. Sci.*, 4(9b) (2013) 56-62.

- Liu J., Zhang H., Determination of nine mineral elements in hullless barley by ultraviolet spectrophotometry and flame atomic absorption spectrometry. *Spectrosc. Spect. Anal.*, 30(4) (2010) 1126-1129.
- Liu Q., Yao H., Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem.*, 102 (2007) 732-737.
- Lugasi A., Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Aliment. Hung.*, 32 (2003) 181-192.
- Magalhaes P.J., Vieira J.S., Goncalves L.M., Pacheco J.G., Guido L.F., Barros A.A., Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography – diode array detection – electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3258-3268.
- Magalhaesi A.S., Silva B.M., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P., Carvalho M., Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes, *Food Chem Toxicol.*, 47 (2009) 1372-1377.
- Maillard M.N., Berset C., Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 1789-1793.
- Malčev P.M., Tehnologija slada i piva, Poslovno udruženje industrije piva, Beograd, (1967).
- Matshushige I., Oliviera E., Determination of trace elements in Brazilian beers by ICP-AES. *Food Chem*, 47 (1993) 205-211.
- Mc Murrough I., Hennigan G.P., Loughrey M., Quantitative analysis of hop flavonols using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 30 (1982) 1102-1106.
- Mc Murrough I., Madigan D., Kelly R.J., The role of flavonoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54(3) (1996) 141-148.
- Meneses N.G.T., Martins S., Teixeira J.A., Mussatto S.I., Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep. Purif. Technol.*, 108 (2013) 152-158.
- Meziane S., Kadi H., Kinetics and thermodynamics of oil extraction from olive cake. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85(4) (2008) 392-396.
- Micić R.J., Dimitrijević D.S., Kostić D.A., Stojanović G.S., Mitić S.S., Mitić M.N., Pavlović A.N., Randelović S.S., Content of heavy metals in mulberry fruits and their extracts – correlation analysis. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4 (2013) 674-682.
- Milenović D., *Analiza kinetike procesa ekstrakcije čvrsto-tečno*, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac, (2001).

- Milovanović G., Hromatografske metode odvajanja, PMF Univerziteta u Beogradu i Jugoslovenski zavod za produktivnost rada i informacione sisteme, Beograd, (1985).
- Moll M.M., In: Hardwick WA (ed) Water. Handbook of brewing. Marcel Dekker, New York (1995).
- Mudura E., Tofana M., Paucean A., Socaci S., The evaluation of antioxidant capacity of Romanian hops. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 16(2) (2010) 262-264.
- Muller-Limmroth W., Bier nach dem Reinheitsgebot. Ein gesundes Volksnahrungsmittel, *Brauwelt*, 122 (1982) 2252-2253.
- Nadanin V., Ispitivanje ekstrakcije i ekstrakata gajene lavande (*Lavandula officinalis* L.), Doktorska disertacija, Novi Sad, Tehnološki fakultet, (2013).
- Nardini M., Ghiselli A., Determination of free and bound phenolic acids in beer, *Food Chem.*, 84(1) (2004) 137-143.
- Nascentes C.C., Kamogawa M.Y., Fernandes K.G., Arruda M.A.Z., Nogueira A.R.A., Nobrega A.J., Direct determination of Cu, Mn, Pb and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta B*, 60 (2005) 749-754.
- Nikkhah A., Barley grain for ruminants: a global treasure or tragedy., *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 3 (2012) 22-33.
- Obruča S., Marova I., Parilova K., Muller L., Zdrahal Z., Mikulikova R.A., Contribution to analysis of Czech Beer authenticity. *Czech J. Food Sci.*, 27(1) (2009) S323-S326.
- Ohara Z., Peterson T. E., Harrison D. G., Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production, *J. Clin. Invest.*, 91 (1993) 2546-2551.
- Ordóñez E.Z., Gomez J.D., Attuone M.A., Isla M.L., Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts, *Food Chem.*, 97 (2006) 452-458.
- Patching S.G., Gardiner P.H., Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. *J Trace Elem Med Bio*, 13 (1999) 193-199.
- Pekić B., Miljković D., Hemija i tehnologija kardioprotektivnih glikozida, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (1980).
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F., Total antioxidant Capacity of plant foods beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.*, 133(9) (2003) 2812-2819.
- Pellegrini N., Serafini M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M., Brighenti F., Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in

- Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50 (2006) 1030-1038.
- Perić–Grujić A.A., Pocajt V.V., Ristić M.Đ., Određivanje sadržaja teških metala u čajevima sa tržišta u Beogradu, Srbija, Stručni rad, *Hem. Ind.*, 63(5) (2009) 433-436.
- Petersen H., Pivara i njena oprema, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd, (2004).
- Piazzon A., Forte M., Nardini M., Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J. Agric. Food Chem.*, 58(19) (2010) 10677-10683.
- Piendl A., Bier als Sportgetraenk, *Brauwelt*, 130 (1990) 370-375.
- Piendl A., Consumption of Alcoholic Beverages and Blood Alcohol Levels, *Brewers Digest*, 57 (1982) 24-29.
- Piendl A., Definitions of a moderate alcohol consumption, *Brauwelt International*, 1 (1999) 49-55.
- Piletić M. V., Milić B. Lj., Đilas S. M., *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad, (1993).
- Pohl P., Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Addit Contam A*, 25 (2008) 693-670.
- Pohl P., Prusisz B., Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection. *Anal Chim Acta*, 502 (2004) 83-90.
- Pohl P., Sergiel I., Evaluation of the total content and the operationally defined species of copper in beers and wines. *J Agr Food Chem*, 57(2000) 9378-9385.
- Ponomarev V.D., *Ekstragirovanie lekarstvennogo syr'ya*, Medicina, Moscow, (1976).
- Price W.E., Spitzer J.C., The kinetics of extraction of individual flavanols and caffeine from a Japanese green tea (Sen Cha Uji Tsuyu) as a function of temperature. *Food Chem.*, 50(1) (1994) 19-23.
- Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M., Analysis of flavonoids and phenolic acids In Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, 95 (2006) 664-671.
- Radojević M., Bashkin V., *Practical Environmental Analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- Randelović S.S., Kostić D.A., Zarubica A.R., Mitić S.S., Mitić M.N., The correlation of metal content in medicinal plants and their water extracts. *Hem. Ind.*, 67(4) (2013) 585-591.

- Re R., Pellegrin N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio. Med.*, 26 (1999) 1231-1237.
- Reports of the Scientific Committee for Food, Nutrient and energy intakes for the European Community, Commission of the European Communities, Luxemburg, (1993).
- Riberau-Gayon J., Stonestreet E., Le dosage des anthocyanins dans le Vin rouge, *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9 (1965) 2649-2655.
- Roberts K., Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 657-691.
- Ruberto G., Randa A., Daquino C., Amico V., Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars, *Food Chem.*, 100 (2007) 203-210.
- Šakić N., Tehnologija proizvodnje piva, *Gospodarska komora Federacije Bosne i Hercegovine*, Sarajevo, (2005).
- Sanchez-Moreno J, Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *J. Agric. Food Chem.*, 79 (1999) 1301-1304.
- Sant' Anna V., Brandell A., Marczak L.D.F., Tessaro I.C., Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Sep. Purif. Technol.*, 100 (2012) 82-87.
- Šarkanj B., Kipčić D., Vasić-Rački Đ., Delaš F., Galić K., Katalenić M., Dimitrov N., Klapac T., *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, (2010).
- Saxena D.K., Sharma S.K., Sambhi S.S., Kinetics and thermodynamics gossypol extraction from defatted cottonseed meal by ethanol. *Pol. J. Chem. Technol.*, 14(2) (2012) 29-34.
- Scalbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130(8) (2000) 2073S-2085S.
- Sembratowicz I., Rusinek-Prystupa E., Effects of dekokting time on the content of minerals in infuss of medicinal herbs. *Pol. J. Environ. Stud.*, 23 (2014) 177-186.
- Semiz M., Tehnologija piva, *Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije*, Beograd, (1979).
- Shahidi F., Naczk M., Phenolic compounds of beverages. In *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*; Technomic Publishing Co.: Lancaster, PA, 1995; pp. 128-136.

- Shar G.Q., Kazi T.G., Jatoi W.B., Makhija P.M., Sahito S.B., Shar A.H., Soomro F.M., Determination of heavy metals in eight barley cultivars collected from wheat research station Tandojam, Sindh, Pakistan. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, 14(1) (2013) 47-53.
- Shar G.Q., Shar L.A., Kazi T.G., Afridi H.I., Arain M.B., Jamali M.K., Multielement analysis of Pakistani barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties by flame atomic absorption spectrometry. *J. Res. Sci.*, 18(2) (2007) 69-77.
- Shi H., Noguchi N., Niki E., Introducing natural antioxidants, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, (2001) 22-70.
- Shtangeeva I., Steinnes E., Lierhagen S., Macronutrients and trace elements in rye and wheat: Similarities and differences in uptake and relationships between elements. *Environ. Exp. Bot.*, 70(2) (2011) 259-265.
- Singleton V.L., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.*, 16 (1965) 144–158.
- Soares L.M.V., DE MORAES A.M.M., Lead and cadmium content of Brazilian beers. *Cienc Technol Aliment Campinas*, 23 (2003) 285-291.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V., Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71 (2007) 1741-1751.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V., Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem*, 54 (3) (2006) 607–616.
- Szywczycha-Madeja A., Welna M., Pohl P., Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 35 (2012) 165-181.
- Tafulo P.A.R., Querios R.B., Delerue-Matos C.M., Sales M.G.F., Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Res. Int.*, 43(6) (2010) 1702-1709.
- Tan, P.W., Tan C.P., Ho C.W., Antioxidant properties: Effect of solid to solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *IFRJ*, 18 (2011) 553-557.
- Tang J., Zou C., He Z., Shi R., Ortiy-Monasterio I., Qu Y., Zhang Y., Mineral element distributions in milling fractions of chinese wheats. *J. Cereal Sci.*, 48(3) (2008) 821-828.
- Todorović M., Optičke metode instrumentalne analize, Hemijski fakultet, Beograd, (1997).

- Tolić A., Operacija ekstrakcije tečno-tečno, Novi Sad , Tehnološki fakultet, (1996).
- Topallar H., Gecgel U., Kinetics and thermodynamics of oil extraction from sunflower seeds in the presence of aqueous acidic hexane solutions, *Turk. J. Chem.*, 24 (2000) 247-253.
- Treybal R.E., Mass transfer operations, 3rd ed., Mc Graw-Hill, Singapore, (1985).
- Uma D.B., Ho C.W., Aida W.H.W., Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves, *Sains Malaysiana* 39 (2010) 119–128.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). National Primary Drinking Water Regulations, EPA 816-F-09-004, United States Environmental Protection Agency, Washington (2009).
- Vanbeneden N., Van Roey T., Willems F., Delvaux F., Delvaux R.F., Release of phenolic flavour precursors during wort production: influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chem.*, 111(1) (2008) 83-91.
- Vela M.M., Toma R.B., Reibolt W., Pierri A., Detection of aluminum residue in fresh and stored canned beer. *Food Chem*, 63 (1998) 235-243.
- Veljković V., Milenović D., Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.). II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije. *Hem. Ind.*, 56 (2002) 60-67.
- Vertuani S., Angusti A., Manfredini S., The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Curr. Pharm. Des.*, 10 (2004) 1677–94.
- Vinson J.A., Mandarano M., Hrist M., Trevithick J.R., Bose P., Phenol antioxidant quantity in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *J. Agric. Food Chem.*, 51(18) (2003) 5528-5533.
- Walker G.M., Birch R.M., Chandrasena G., Maynard A.I., Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeasts. *J Am Soc Brew Chem*, 54 (1996) 13-21.
- WHO N. N. Alcohol u Cardiovascular disease risk factors: "New areas for research". WorldHealth Organization, WHO Technical Report Series, 841 (1994) 21-24.
- WHO, Trace Elements in Human Nutrition and Health, World Health Organization, Geneva, (1996).
- Woffenden H.M., Ames J.M., Chandra S., Relationships between antioxidant activity, color, and flavour compounds of crystal malt extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11) (2001) 5524-5530.
- Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105 (2007) 940-949.

- Wong B.Y., Tan C.P., Ho C.W., Effect of solid to solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak” (*Phyllanthus niruri*). *IFRJ*, 20 (2013) 325-330.
- World Health Organization (WHO). Health and Safety Guide, No 62: Nickel, World Health Organization, Geneva (2003).
- Wyrzykowska B., Szymczyk K., Ichichashi H., Falandysz J., Skwarzec B., Yamasaki S., Application of ICP sector field MS and principal component analysis for studying interdependences among 23 trace elements in Polish beers. *J Agr Food Chem*, 49 (2001) 3425-3433.
- Yilmaz A.B., Sangun M.K., Yaglioglu D., Turan C., Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from İskenderun Bay, Turkey. *Food Chem*, 123 (2010) 410-418.
- Zhao H., Chen W., Lu J., Zhao M., Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food. Chem.*, 119(3) (2010) 1150-1158.
- Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W., Gu G., Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chem.*, 54 (2006) 7277-7286.
- Zhao H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., Kong W., Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, 107(1) (2008) 296-304.
- Zhing Z., Optimization of ultrasound-assisted extraction content of flavonoids from *Tartary Buckwheat*. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Inovation*, 6 (2012) 39-43.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64 (4) (1999) 555–559.
- Zhou K., Laux J.J., Yu L., Comparison of swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1118-1123.

8. PRILOG

Tabela 8.1. Promena sadržaja ukupnih fenola (mg/g) u ekstraktima ječma sa vremenom na različitim temperaturama.

Vreme (min)	25°C	35°C	45°C
1	1,000	1,056	1,112
5	1,038	1,094	1,152
10	1,084	1,147	1,190
15	1,161	1,192	1,227
20	1,216	1,238	1,263
40	1,246	1,273	1,302
80	1,278	1,309	1,342
120	1,337	1,379	1,421

Tabela 8.2. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m.}$) minerala u ekstraktima ječma sa promenom koncentracije etanola.

	Element	Koncentracija etanola (%)			
		30	50	70	90
Esencijalni elementi	K	1308,0	940,2	1019,4	991,3
	Na	36,18	33,74	31,92	23,10
	Ca	106,6	91,76	90,98	83,87
	Mg	249,0	243,4	239,9	234,2
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	3,510	3,564	2,462	2,364
	Cu	1,482	1,428	1,286	0,934
	Mn	2,444	1,854	2,288	1,744
	Zn	5,316	4,910	4,452	4,320
	Cr	0,108	0,116	0,070	0,071
	Se	0,123	0,112	0,125	0,122
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	4,103	2,488	3,910	3,184
	V	1,500	1,040	1,296	1,202
Neesencijalni	As	0,026	0,028	0,022	0,028
	Pb	0,038	0,028	0,022	0,024
	Cd	0,028	0,022	0,024	0,024
	Al	1,038	0,928	0,652	0,534
	B	0,340	0,234	0,166	0,132
	Li	0,208	0,168	0,168	0,154
	Sr	0,252	0,162	0,216	0,230
	Ba	0,348	0,228	0,124	0,125

Tabela 8.3. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m.}$) minerala u ekstraktima ječma sa promenom koncentracije HCl (30% etanol).

	Element	Koncentracija HCl (%)			
		0	0,1	1	5
Esencijalni elementi	K	1308,0	2024,0	2042,0	2160,0
	Na	36,18	40,70	43,84	44,70
	Ca	106,6	218,2	220,0	228,2
	Mg	249,0	311,0	430,6	503,2
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	3,510	3,854	3,414	5,335
	Cu	1,482	1,104	1,276	1,368
	Mn	2,444	3,013	4,034	3,072
	Zn	5,316	5,022	5,356	6,210
	Cr	0,108	0,126	0,128	0,126
	Se	0,123	0,122	0,127	0,128
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	4,003	3,706	3,110	4,046
	V	1,500	2,753	2,896	3,050
Neesencijalni	As	0,026	0,036	0,048	0,051
	Pb	0,038	0,018	0,024	0,046
	Cd	0,028	0,032	0,031	0,024
	Al	1,038	1,246	1,306	1,366
	B	0,340	0,337	0,792	0,736
	Li	0,208	0,408	0,516	0,523
	Sr	0,252	0,272	0,220	0,336
	Ba	0,348	0,340	0,476	0,488

Tabela 8.4. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m.}$) minerala u ekstraktima ječma sa promenom solvomodula (30% etanol, 5% HCl).

	Element	Solvomodul (V/m)			
		15	20	25	30
Esencijalni elementi	K	2008,5	2160,0	2441,3	2518,9
	Na	42,14	44,70	46,43	49,94
	Ca	210,9	228,2	233,1	280,7
	Mg	438,8	503,2	502,3	611,0
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	3,465	5,335	6,915	7,115
	Zn	5,535	6,210	6,471	7,494
	Cr	0,125	0,126	0,126	0,127
	Se	0,130	0,128	0,132	0,141
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	3,330	4,046	4,248	4,436
	V	2,808	3,050	3,050	3,065
Neesencijalni	As	0,037	0,051	0,054	0,064
	Pb	0,023	0,045	0,044	0,046
	Al	1,268	1,366	1,350	1,368
	Li	0,240	0,523	0,525	0,527
	Sr	0,125	0,336	0,388	0,405
	Ba	0,473	0,488	0,534	0,537

Tabela 8.5. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m.}$) minerala u ekstraktima ječma sa vremenom ekstrakcije (30% etanol, 5% HCl, V/m=30).

	element	Vreme ekstrakcije (minuti)						
		5	10	15	20	40	80	120
Esencijalni	K	417,0	522,0	973,1	977,4	1303,6	1922,5	2518,9
	Na	8,27	16,02	20,31	21,35	27,99	38,66	49,94
	Ca	36,63	47,30	101,5	181,5	230,7	273,7	280,7
	Mg	184,4	313,5	380,0	401,0	460,9	555,2	611,0
Esencijalni u tragovima	Fe	1,150	3,155	3,705	5,150	6,153	7,251	7,115
	Zn	2,947	3,759	3,858	4,967	5,374	6,297	7,494
	Cr	0,035	0,045	0,056	0,089	0,109	0,122	0,126
	Se	0,071	0,072	0,092	0,094	0,101	0,148	0,141
Verovatno esencijalni	Si	0,804	1,159	1,734	2,411	2,560	2,694	4,436
	V	0,532	0,494	0,592	1,747	1,893	2,523	3,065
Neesencijalni	As	0,016	0,029	0,036	0,039	0,060	0,065	0,064
	Pb	0,009	0,009	0,012	0,017	0,032	0,036	0,045
	Al	0,356	0,790	1,080	1,005	1,173	1,316	1,368
	Li	0,027	0,060	0,094	0,153	0,523	0,520	0,520
	Sr	0,092	0,107	0,103	0,172	0,317	0,382	0,405
	Ba	0,085	0,161	0,353	0,515	0,533	0,534	0,537

Tabela 8.6. Promena antioksidativne aktivnosti određene DPPH testom ($\mu\text{mol/g}$) u ekstraktima hmelja na različitim temperaturama sa vremenom ekstrakcije.

Vreme (min)	25°C	35°C	45°C
1	10,639	12,460	13,700
5	13,419	15,911	21,661
10	16,677	20,428	26,275
15	20,319	25,974	28,658
20	24,920	28,233	31,109
40	29,425	31,505	33,930
80	33,305	34,905	40,064
120	47,467	40,639	44,281

Tabela 8.7. Promena sadržaja ukupnih fenola (mg/g) u ekstraktima hmelja na različitim temperaturama sa vremenom ekstrakcije.

Vreme (min)	25°C	35°C	45°C
1	3,316	3,877	4,544
5	4,684	5,000	5,351
10	6,333	6,965	7,316
15	8,228	8,825	9,895
20	9,175	9,807	11,474
40	10,298	11,000	12,575
80	12,084	13,000	14,965
120	13,982	14,930	16,825

Tabela 8.8. Promena sadržaja pojedinačnih flavonola (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 25°C.

Vreme (min)	kvercetin-3-galaktozid	kvercetin-3-rutinozid	kvercetin-3-glukozid	kemferol-3-rutinozid	kvercetin-glikozid
1	0,008	0,030	0,035	0,028	0,106
5	0,023	0,078	0,070	0,042	0,157
10	0,035	0,127	0,104	0,056	0,206
15	0,041	0,152	0,120	0,067	0,257
20	0,051	0,177	0,136	0,077	0,293
40	0,060	0,202	0,152	0,088	0,329
80	0,069	0,229	0,168	0,098	0,365
120	0,079	0,253	0,185	0,108	0,401

Tabela 8.9. Promena sadržaja pojedinačnih flavonola (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 35°C.

Vreme (min)	kvercetin-3-galaktozid	kvercetin-3-rutinozid	kvercetin-3-glukozid	kemferol-3-rutinozid	kvercetin-glikozid
1	0,033	0,089	0,099	0,047	0,114
5	0,073	0,147	0,118	0,091	0,165
10	0,112	0,224	0,137	0,142	0,216
15	0,130	0,256	0,143	0,154	0,239
20	0,149	0,286	0,156	0,180	0,268
40	0,164	0,319	0,169	0,197	0,302
80	0,179	0,357	0,179	0,246	0,358
120	0,202	0,424	0,204	0,303	0,433

Tabela 8.10. Promena sadržaja pojedinačnih flavonola (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 45°C.

Vreme (min)	kvercetin-3-galaktozid	kvercetin-3-rutinozid	kvercetin-3-glukozid	kemferol-3-rutinozid	kvercetin-glikozid
1	0,054	0,113	0,103	0,068	0,087
5	0,106	0,186	0,117	0,132	0,147
10	0,168	0,253	0,130	0,196	0,207
15	0,228	0,322	0,143	0,262	0,266
20	0,249	0,352	0,142	0,284	0,289
40	0,288	0,416	0,149	0,338	0,341
80	0,357	0,493	0,171	0,412	0,420
120	0,406	0,553	0,190	0,477	0,487

Tabela 8.11. Promena sadržaja ukupnih flavonola (mg/g) u ekstraktima hmelja na različitim temperaturama sa vremenom ekstrakcije.

Vreme (min)	25°C	35°C	45°C
1	0,207	0,382	0,425
5	0,370	0,594	0,685
10	0,528	0,831	0,954
15	0,637	0,922	1,221
20	0,734	1,049	1,316
40	0,831	1,150	1,532
80	0,929	1,319	1,853
120	1,029	1,566	2,113

Tabela 8.12. Promena sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 25°C.

Vreme (min)	4-hidroksibenzoeva	hlorogenska	p-kumarna	ferulna
1	0,023	0,038	0,011	0,018
5	0,046	0,071	0,017	0,034
10	0,068	0,104	0,022	0,051
15	0,092	0,138	0,028	0,069
20	0,105	0,169	0,034	0,082
40	0,117	0,172	0,035	0,091
80	0,129	0,175	0,036	0,094
120	0,136	0,178	0,037	0,096

Tabela 8.13. Promena sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 35°C.

Vreme (min)	4-hidroksibenzoeva	hlorogenska	p-kumarna	ferulna
1	0,028	0,040	0,012	0,022
5	0,049	0,073	0,018	0,040
10	0,071	0,106	0,023	0,058
15	0,093	0,139	0,029	0,076
20	0,115	0,171	0,035	0,095
40	0,123	0,178	0,036	0,099
80	0,132	0,182	0,037	0,104
120	0,139	0,189	0,039	0,108

Tabela 8.14. Promena sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina (mg/g) u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije na 45°C.

Vreme (min)	4-hidroksibenzoeva	hlorogenska	p-kumarna	ferulna
1	0,036	0,052	0,012	0,040
5	0,056	0,085	0,018	0,055
10	0,077	0,117	0,024	0,070
15	0,097	0,150	0,030	0,085
20	0,119	0,183	0,035	0,100
40	0,127	0,189	0,037	0,109
80	0,135	0,196	0,039	0,116
120	0,143	0,203	0,041	0,122

Tabela 8.15. Promena sadržaja ukupnih fenolnih kiselina (mg/g) ekstraktima hmelja na različitim temperaturama sa vremenom ekstrakcije.

Vreme (min)	25°C	35°C	45°C
1	0,090	0,102	0,140
5	0,168	0,180	0,214
10	0,245	0,258	0,288
15	0,327	0,337	0,362
20	0,390	0,416	0,437
40	0,415	0,436	0,462
80	0,434	0,456	0,486
120	0,447	0,475	0,509

Tabela 8.16. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m}$) minerala u ekstraktima hmelja sa promenom koncentracije etanola.

	Element	Koncentracija etanola (%)			
		30	50	70	90
Esencijalni elementi	K	5683,5	5143,4	4984,3	4952,4
	Na	51,38	50,34	48,32	47,45
	Ca	682,3	595,6	510,4	456,7
	Mg	1145,6	1140,2	985,6	974,5
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	32,67	30,56	26,76	27,84
	Cu	2,598	2,396	2,456	2,506
	Mn	18,78	16,78	16,23	15,34
	Zn	20,45	20,34	19,56	18,76
	Cr	0,378	0,367	0,356	0,360
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	4,765	4,187	4,196	3,954
	V	4,593	4,473	3,765	3,674
Neesencijalni	Al	6,346	5,784	5,754	5,683
	Ba	1,583	1,463	1,256	1,234
	Pb	0,147	0,145	0,093	0,092
	Sr	3,984	3,765	3,557	3,536

Tabela 8.17. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m}$) minerala u ekstraktima hmelja sa promenom koncentracije HCl (30% etanol).

	Element	Koncentracija HCl (%)			
		0	0,1	1	5
Esencijalni elementi	K	5683,5	5156,5	4983,1	4792,4
	Na	51,38	45,76	42,65	42,11
	Ca	682,3	680,4	532,6	522,5
	Mg	1145,6	1003,2	985,3	980,5
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	32,67	29,45	24,34	27,54
	Cu	2,598	2,375	2,386	2,054
	Mn	18,78	16,32	16,52	16,12
	Zn	20,45	18,45	17,34	17,23
	Cr	0,378	0,250	0,253	0,370
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	4,765	4,196	4,058	3,977
	V	4,593	4,127	4,275	4,352
Neesencijalni	Al	6,346	6,243	6,123	5,964
	Ba	1,583	1,573	1,747	1,875
	Pb	0,147	0,140	0,141	0,138
	Sr	3,984	3,765	3,674	3,654

Tabela 8.18. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m}$) minerala u ekstraktima hmelja sa promenom solvomodula (30% etanol, 0% HCl).

	Element	Solvomodul (V/m)			
		15	20	25	30
Esencijalni elementi	K	4598,3	5683,5	5876,1	6273,4
	Na	49,74	51,38	55,34	58,75
	Ca	550,5	682,3	688,5	758,7
	Mg	978,4	1145,6	1196,4	1356,7
Esencijalni elementi u tragovima	Fe	31,56	32,67	35,87	39,84
	Cu	2,564	2,598	3,456	3,985
	Mn	18,45	18,78	18,92	19,24
	Zn	19,34	20,45	20,67	21,59
	Cr	0,284	0,378	0,366	0,498
Verovatno esencijalni u tragovima	Si	4,102	4,765	4,785	4,983
	V	4,564	4,593	5,122	5,384
Neesencijalni	Al	5,986	6,346	6,876	7,162
	Pb	0,152	0,147	0,274	0,305
	Sr	3,567	3,984	4,374	4,565

Tabela 8.19. Promena koncentracije ($\mu\text{g/g s.m}$) minerala u ekstraktima hmelja sa vremenom ekstrakcije (30% etanol, 0% HCl, $V/m=30$).

	element	Vreme ekstrakcije (minuti)						
		5	10	15	20	40	80	120
Esencijalni	K	805,2	904,3	1543,2	2467,8	3732,5	5732,6	6273,4
	Na	10,64	18,45	20,45	29,32	36,43	48,37	58,75
	Ca	95,73	102,5	109,6	205,8	456,7	574,3	758,7
	Mg	192,5	208,6	498,2	608,9	805,6	1138,2	1356,7
Esencijalni u tragovima	Fe	5,674	8,453	10,63	11,47	19,76	25,65	39,84
	Cu	0,776	0,974	1,654	1,435	2,720	3,124	3,985
	Mn	5,643	6,436	8,456	10,63	14,84	15,36	19,24
	Zn	5,865	7,345	10,38	12,88	18,20	22,94	21,59
	Cr	0,094	0,165	0,202	0,305	0,462	0,536	0,498
Verovatno esencijalni	Si	1,127	1,134	1,952	2,067	3,502	3,684	4,983
	V	1,064	1,093	1,432	2,056	3,202	3,974	5,384
Neesencijalni	Al	1,345	2,094	2,155	3,453	5,024	7,654	7,162
	Pb	0,090	0,099	0,154	0,156	0,254	0,317	0,305
	Sr	0,765	0,925	0,916	1,200	2,510	2,983	4,565

9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Dušan Đ. Paunović je rođen 30.05.1981. godine u Nišu. Osnovne studije, na Odseku za hemiju Prorodno-matematičkog fakulteta u Nišu, upisao je školske 2001/2002 i diplomirao na istom 28.06.2007. prosečnom ocenom 8,92 i odbranjenim diplomskim radom „Uticaj temperature na oksidaciju metil-oranža i uree” sa ocenom 10. Školske 2007/2008 upisao je doktorske studije na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Položio je sve ispite i odbranio sve studijske istraživačke radove sa prosečnom ocenom 9,25.

Stipendista je Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja od 2008 do 2012. godine. Decembra 2012. godine zasniva radni odnos kao istraživač-saradnik na naučno-istraživačkom projektu Ministarstva pod nazivom : ”Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena” (evidencioni broj 172047).

Angažovan je u izvođenju vežbi na Katedri za analitičku hemiju iz predmeta: Bioanalitička hemija, Savremene elektroanalitičke metode analize i Analitička hemija životne sredine.

Koautor je četiri rada iz doktorata, od kojih su tri prihvaćena za objavljivanje u časopisima međunarodnog značaja, a jedan u domaćem časopisu.

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja:

1. Milan N. Mitić, Mirjana V. Obradović, Danijela A. Kostić, Ružica J. Micić, Dušan Đ. Paunović, Phenolic profile and antioxidant capacities of dried red currant from Serbia, extracted with different solvent, *Food Science and Biotechnology*, 20(6), 1625-1631, 2011.
2. Snežana S. Mitić, Dušan Đ. Paunović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Milan B. Stojković, Milan N. Mitić, Phenolic profiles and total antioxidant capacity of marketed beers in Serbia, *International Journal of Food Properties*, 17:4, 908-922, 2014, DOI:10.1080/10942912.2012.680223.
3. Dušan Đ. Paunović, Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Danijela A. Kostić, Milan N. Mitić, Branka T. Stojanović, Multielemental determination and characterization of beers consumed in Serbia, *Oxidation communications*, 37(2), 605-618, 2014.
4. Milan N. Mitić, Danijela A. Kostić, Dušan Đ. Paunović, Branka T. Stojanović, Jovana LJ. Pavlović, A new kinetic spectrophotometric method for total polyphenol determination in white wines, *South African Journal of Chemistry*, 67, 104-108, 2014.

5. Dušan Đ. Paunović, Snežana S. Mitić, Gordana S. Stojanović, Milan N. Mitić, Branka T. Stojanović, Milan B. Stojković, Kinetics of the solid-liquid extraction process of phenolic antioxidants and antioxidant capacity from hop (*Humulus lupulus L.*), *Separation Science and Technology*, 2015, DOI: 10.1080/01496395.2014.978019.
6. Milan N. Mitić, Danijela A. Kostić, Danica S. Dimitrijević, Branka T. Stojanović, Dušan Đ. Paunović, Miloš S. Krstić, Determination of monomeric Anthocyanins in red wines based on their degradation with hydrogen peroxide in the presence of Cu (II), *Agro Food industry hi-tech*, 26(2), 57-60, 2015.

Radovi objavljeni u domaćim časopisima:

1. Dušan Đ. Paunović, Snežana S. Mitić, Danijela A. Kostić, Milan N. Mitić, Branka T. Stojanović, Jovana Lj. Pavlović, Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols from barley, *Advanced Technologies*, 3(2), 58-63, 2014.
2. Milan B. Stojković, Snežana S. Mitić, Jovana Lj. Pavlović, Branka T. Stojanović, Dušan Đ. Paunović, Antioxidant potential of *Tanacetum vulgare L.* extracts, *Biologica Nyssana*, 5(1), 47-51, 2014.
3. Branka T. Stojanović, Snežana S. Mitić, Milan N. Mitić, Dušan Đ. Paunović, Biljana B. Arsić, Gordana S. Stojanović, The multielement analysis of the apple peel using ICP-OES method, *Advanced Technologies*, 3(2), 96-104, 2014.

Radovi saopštenjeni na skupovima međunarodnog značaja:

1. D.Đ. Paunović, S.S Mitić, A.N. Pavlovic, S.B. Tošić, M.N. Mitić, M.B. Stojković, R.J. Micić, Antioxidative capacity of commercial beers from Serbia, Thirteenth annual conference YUCOMAT 2011, Book of abstracts P.S.B.45., September 5-9, 2011, Herceg Novi, Montenegro.
2. Jovana Pavlović, Snežana Mitić, Milan Mitić, Branka Stojanović, Dušan Paunović, Evaluatin of DPPH, FRAP, FRP antioxidant activity of thirteen diferent strawberry cultivars, XXII Congress of Chemists and Technologist of Macedonia, Book of abstracts BFP-29, September 5-9, 2012, Ohrid, Macedonia.
3. Dušan Đ. Paunović, Milan N. Mitić, Milan B. Stojković, Branka B. Stojanović, Danica S. Dimitrijević, Phenolic profiles of commercial dark beers from Serbia, XXII

Congress of Chemists and Technologist of Macedonia, Book of abstracts BFP-30, September 5-9, 2012, Ohrid, Macedonia.

4. Snežana Mitić, Milan Mitić, Branka Stojanović, Milan Stojković, Dušan Paunović, Jovana Pavlović, Antioxidant activity of six apple cultivars in Serbia, XXII Congress of Chemists and Technologist of Macedonia, Book of abstracts BFP-31 September 5-9, 2012, Ohrid, Macedonia.
5. Jovana N. Veljković, Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Milan M. Stojković, Dušan Đ. Paunović, Branka T. Stojanović, Total Polyphenol, Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of Chokeberry, 15th JCF-Frühjahrssymposium, march 6th -9th, 2013, Berlin, Germany.

Radovi saopštteni na nacionalnim naučnim skupovima :

1. Milan B. Stojković, Jovana Lj. Pavlović, Branka T. Stojanović, Dušan Đ. Paunović, Aleksandra N. Pavlović, Antioksidativna sposobnost ekstrakata *Geranium macrorrhizum L.*, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Knjiga izvoda radova, XA P26, 37, Beograd, 19-20. oktobar 2012.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Хемијски састав и антиоксидативна активност пива и сировина за производњу пива. Кинетика
екстракције

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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 кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу,
18.05.2015. _____

Аутор дисертације:
Душан Ђ. Пауновић

Потпис докторанда:

Душан Пауновић



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора:

Душан Ђ. Пауновић

Студијски програм:

Хемија

Наслов рада:

Хемијски састав и антиоксидативна активност пива и сировина за производњу пива. Кинетика екстракције

Ментор:

др Снежана Митић

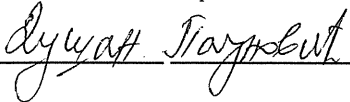
Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу,
18.05.2015. _____

Аутор дисертације:
Душан Ђ. Пауновић

Потпис докторанда:





Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Хемијски састав и антиоксидативна активност пива и сировина за производњу пива. Кинетика екстракције која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу,
18.05.2015. _____

Аутор дисертације:
Душан Ђ. Пауновић

Потпис докторанда:

Душан Пауновић